

博士論文審査報告書

氏名 Md. Mahfuzur Rahman (ムハマド マフザー ラフマン)
学位の種類 博士 (理学)
学位記番号 博理第 1 1 1 号
学位授与報告番号 甲第 3 4 3 号
学位授与年月日 平成 3 0 年 9 月 2 7 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条 1 項該当
論文題目 Structural and Functional Analysis of a Periplasmic Heme-Binding Protein (PBP) Involved in the Bacterial Heme Acquisition System
「細菌のヘム獲得機構に関するペリプラズムヘム結合タンパク質の構造機能解析」
論文審査委員 (主査) 教授 樋口 芳樹
(副査) 教授 城 宜嗣
(副査) 教授 吉久 徹
(副査) 教授 水島 恒裕
(副査) 教授 青野 重利
(自然科学研究機構)
(副査) Thomas L. Poulos
(University of California, Irvine, Professor)

* Poulos 委員の審査結果については別紙 (英文) として添付する。

1. 論文内容の要旨

鉄イオンは、ほぼ全ての生物において必須な栄養素であり、生体内の多くのタンパク質に結合して活性中心として利用されており、生理活性物質の生合成・代謝やエネルギー・情報変換などの様々な生体内反応に関与している。感染性のある細菌においては、増殖に必須の鉄を、宿主 (感染先) の体内に多量に含まれる赤血球のヘモグロビンからヘム (鉄-ポルフィリン錯体) を奪い取って補給している。このことから、病原菌のヘム獲得戦略に関する研究は、感染症の予防や治療法の確立に貢献するとして、近年注目されている。病原菌によるヘム奪取の過程において、そのペリプラズム層に存在するタンパク質 (PBP: Periplasmic heme-Binding Protein) がヘムを結合して内膜に存在するトランスポーター (膜輸送体) へと受け渡し、続いてトランスポーターが膜輸送によりヘムを菌体内に取り込んでいる。本論文で着目した PBP については、これまでに 3 種類の細菌の PBP の全体構造は報告されていたが、種間のアミノ酸残基の違いによるヘム認識の相違、ヘム結合によって引き起こされる構造変

化が解明されておらず、PBP におけるヘム結合・解離のメカニズムについて詳細な理解に至っていないかった。

Rahman 氏は、本論文において、好熱菌由来の PBP を研究対象とし、X 線結晶構造解析、可視光吸収と共鳴ラマン分光解析、等温滴定型熱量測定法を用いて、PBP へのヘムの結合・解離を追跡している。好熱菌 PBP の全体構造は、今まで報告された PBP 同様に、2 つの球状ドメインが長いヘリックスでつながれた構造を示し、2 つのドメイン間にヘム結合部位が存在していた。溶液状態でのヘム滴定では、この結合部位にまず 1 分子のヘムが結合し（1 分子ヘム結合型）、続いて 2 分子目のヘムが結合すること（2 分子ヘム結合型）を示した。また、2 分子ヘム結合型 PBP の結晶構造を決定し、ヘム結合部位には 2 つのドメインからチロシン-アルギニン残基のペアが対称的に 1 つずつ配置しており、それぞれが 2 分子のヘム結合に関与することを明らかにした。ヘムが結合していない（ヘム非結合型）PBP と 2 分子ヘム結合型 PBP との構造比較から、ヘム結合部位の構造変化のみならず、2 つのドメイン間距離の変化と、ヘムトランスポーターとの相互作用に関与すると予測されるループ領域の構造変化を明らかにした。

これらの結果を、他の細菌由来の PBP の結果と比較することにより、ヘム結合に関与する配位子、疎水性残基、極性残基の構造的な多様性を明らかにした。さらに、PBP からヘムが解離するためのヘム親和性の制御機構においても、PBP のドメイン構造変化が鍵となると提案し、ヘム膜輸送に伴うトランスポーターの構造変化と連動することが示唆された。このように、本研究により、細菌のヘム輸送システムにおけるヘム結合・解離のメカニズムが原子レベルで詳細に明らかとなった。

2. 論文審査結果

本論文では、細菌が鉄源としてヘムを細胞外から細胞内へと取り込む際に必要なタンパク質であるペリプラズムヘム結合タンパク質 (PBP) を解析対象としている。好熱菌由来の PBP の立体構造に基づいて、ヘムの結合の特性や構造変化のメカニズムについての解析が行われている。特に、ヘム結合ポケットに存在する 2 つのチロシン残基をはじめとする各残基の役割について詳細に明らかにした初めての研究である。本研究の成果は、細菌によるヘムの取り込みに関与するタンパク質におけるヘム認識の特異性と多様性に加え、細胞膜で機能しているトランスポーターへのヘムの受け渡しに必要な構造的なメカニズムを理解するための基盤となり、好熱菌のみならず病原性細菌などが有するヘム獲得のメカニズムを解明するために重要な意義を有する成果であると評価できる。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、2018 年 7 月 26 日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。

Evaluation Report for Doctoral Thesis

Title: Structural and functional analysis of a periplasmic heme-binding protein (PBP) involved in the bacterial heme acquisition system

Applicant: Md. Mahfuzur Rahman

1. Abstract of the thesis

Iron is an essential nutrient for all life since it is involved in many important biological phenomena by virtue of characteristic chemical properties such as oxidation-reduction and reversible binding of ligands. Many pathogenic bacteria acquire heme from the host as a source of iron for their growth and virulence. Periplasmic heme-binding proteins (PBPs) are components of the heme acquisition system of Gram-negative bacteria. These proteins shuttle heme across the periplasmic space from outer membrane receptors to ATP-binding cassette (ABC) heme importers located in the inner-membrane. The structural mechanism of the recognition of the heme and control of the substrate affinity by the heme transporter are still unclear. In this study, X-ray crystallographic, spectroscopic and biochemical approaches were used to address these questions for the PBP (RhuT) from *Roseiflexus* sp. RS-1, a thermophilic gram-negative bacteria. In solution, RhuT has the ability to bind one and two hemes sequentially and we determined crystal structures of RhuT in apo and two-heme-bound forms at the resolution of 2.4 and 2.0 Å, respectively. The overall structure of RhuT showed typical two-domain structure of type III periplasmic binding proteins. The heme-binding site locates between the two domains. Unlike other PBPs, pairs of Tyr and Arg residues from each domain are symmetrically located to interact with the hemes. Structural comparison of PBP from five different species revealed the diverse mode of the heme-recognition, which indicates that ability of domain motion together with the flexibility of loop region for interaction with heme would be the important structural mechanism to control the protein-heme affinity.

2. Evaluation of the thesis and final examination

The structural mechanism of the heme-binding and release by the transport proteins is one of the interesting problems and challenges in the study of the iron acquisition system of bacteria. In this thesis, the applicant showed that RhuT takes substantial heme-induced conformational changes in the interacting loop and the open/closed motion of two domains, which has never been observed in other structurally characterized PBPs. The structural and spectroscopic analysis of RhuT represented the first characterization of a PBP with two Tyr ligands. In addition, structural comparison of the heme-binding cleft of PBPs revealed the diverse mechanism of the protein-heme interaction. The applicant proposed these properties could be the result of an evolutionary consequence to increase affinity and maintain an

efficient release mechanism of heme following interaction with an ABC heme importer. These findings provide important mechanistic insight into heme binding and transfer by PBP in the heme acquisition system, which is a fundamental biological process for bacteria.

Thus, the review committee members listed below hereby state our full approval of the thesis completed by the applicant in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science.

The committee also certifies that the applicant passed the final oral examination on his thesis and related issues held on July 26 in 2018.

The chief examiner : Yoshiki Higuchi _____

The second reader : Yoshitsugu Shiro _____

Toru Yoshihisa _____

Tsunehiro Mizushima _____

Shigetoshi Aono _____

(Professor, National Institutes Of Natural Sciences)

Thomas L. Poulos _____

(Professor, University of California, Irvine,)

Evaluation Report for Doctoral Thesis

Title: Structural and functional analysis of a periplasmic heme-binding protein (PBP) involved in the bacterial heme acquisition system

Applicant: Md. Mahfuzur Rahman

1. Abstract of the thesis

Iron is an essential nutrient for all life since it is involved in many important biological phenomena by virtue of characteristic chemical properties such as oxidation-reduction and reversible binding of ligands. Many pathogenic bacteria acquire heme from the host as a source of iron for their growth and virulence. Periplasmic heme-binding proteins (PBPs) are components of the heme acquisition system of Gram-negative bacteria. These proteins shuttle heme across the periplasmic space from outer membrane receptors to ATP-binding cassette (ABC) heme importers located in the inner-membrane. The structural mechanism of the recognition of the heme and control of the substrate affinity by the heme transporter are still unclear. In this study, X-ray crystallographic, spectroscopic and biochemical approaches were used to address these questions for the PBP (RhuT) from *Roseiflexus* sp. RS-1, a thermophilic gram-negative bacteria. In solution, RhuT has the ability to bind one and two hemes sequentially and we determined crystal structures of RhuT in apo and two-heme-bound forms at the resolution of 2.4 and 2.0 Å, respectively. The overall structure of RhuT showed typical two-domain structure of type III periplasmic binding proteins. The heme-binding site locates between the two domains. Unlike other PBPs, pairs of Tyr and Arg residues from each domain are symmetrically located to interact with the hemes. Structural comparison of PBP from five different species revealed the diverse mode of the heme-recognition, which indicates that ability of domain motion together with the flexibility of loop region for interaction with heme would be the important structural mechanism to control the protein-heme affinity.

2. Evaluation of the thesis and final examination

The structural mechanism of the heme-binding and release by the transport proteins is one of the interesting problems and challenges in the study of the iron acquisition system of bacteria. In this thesis, the applicant showed that RhuT takes substantial heme-induced conformational changes in the interacting loop and the open/closed motion of two domains, which has never been observed in other structurally characterized PBPs. The structural and spectroscopic analysis of RhuT represented the first characterization of a PBP with two Tyr ligands. In addition, structural comparison of the heme-binding cleft of PBPs revealed the diverse mechanism of the protein-heme interaction. The applicant proposed

these properties could be the result of an evolutionary consequence to increase affinity and maintain an efficient release mechanism of heme following interaction with an ABC heme importer. These findings provide important mechanistic insight into heme binding and transfer by PBP in the heme acquisition system, which is a fundamental biological process for bacteria.

Thus, the review committee members listed below hereby state our full approval of the thesis completed by the applicant in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science.

The committee also certifies that the applicant passed the final oral examination on his thesis and related issues held on July 26 in 2018.

The chief examiner : Yoshiki Higuchi _____

The second reader : Yoshitsugu Shiro _____

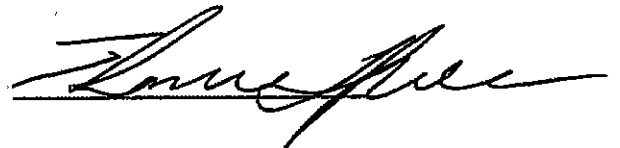
Toru Yoshihisa _____

Tsunehiro Mizushima _____

Shigetoshi Aono _____

(Professor, National Institutes Of Natural Sciences)

Thomas L. Poulos



(Professor, University of California, Irvine,)