

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 四 坂 勇 磨

論 文 題 目

Uncovering Novel Functions of Bacterial Haemoproteins Incorporating Artificial Metal Complexes

(合成金属錯体を内包したヘム蛋白質の新奇機能探索)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(工学) 莊司長三

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(工学) 田中健太郎

委 員 理化学研究所 専任研究員 博士(理学) 杉本宏

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

申請者は、ヘム置換によるヘム蛋白質の機能改変や機能強化の研究において、これまでに活用されたことのない合成金属錯体を内包したヘム蛋白質を開発し、既存の人工ヘム蛋白質にはない、新奇機能の発現に成功した。緑膿菌やセラチア菌など、特定の病原菌が生存に必要な鉄源として、ヘムを獲得するために分泌する蛋白質の HasA に、フタロシアニンなどの平面性の金属錯体や、ポルフィリンの meso 位を嵩高い官能基に置換した合成ポルフィリンを内包することで、(1) 緑膿菌の増殖抑制（静菌作用）、(2) 緑膿菌特異的な光増感剤の輸送（抗菌作用）、(3) 蛋白質の超高分解能 X 線結晶構造解析、を達成した。

鉄ジフェニルポルフィリン誘導体を HasA と複合化すると、緑膿菌の増殖抑制剤として機能することを明らかにした。ポルフィリン環の meso 位に修飾する官能基の違いが、異なる増殖抑制効果をもたらすことも見出した。さらに、緑膿菌そのもの宿主として用いることで、HasA 特異的な外膜受容体 HasR を、機能と構造を保持した状態で発現することに成功し、ヘムの取り込み口である HasR に、合成金属錯体を内包する偽の HasA が蓋をし、緑膿菌のヘム欠乏、ひいては鉄欠乏を引き起こすという、増殖抑制の作用機序を解明した。さらに、光増感剤のガリウムフタロシアニンを内包させた HasA を開発し、これを緑膿菌に投与すると、HasA の外膜受容体 HasR と特異的に相互作用した後、HasR を経由して、緑膿菌の細胞内へガリウムフタロシアニンが輸送されることを発見した。10 分間の近赤外光照射により緑膿菌の細胞内で活性酸素が発生し、緑膿菌を高選択的かつ高効率に殺菌できることを明らかにした。さらに、既存の抗菌薬では殺菌が困難な多剤耐性緑膿菌も、本手法を用いて殺菌することに成功した。

また、これまでに蛋白質に内包することは、嵩高い構造と疎水性のために不可能と考えられてきたテトラフェニルポルフィリン鉄錯体と、HasA の複合化に成功し、複合体の結晶化にも成功した。X 線回折実験では、最高分解能 0.74 Å という、ヘム蛋白質の結晶構造解析としては世界最高分解能のデータセット収集に成功している。SHELXL を用いた完全行列最小二乗法による構造精密化を行い、鉄ポルフィリン錯体と HasA の強固な結合に関わる重要な水素結合について、通常の水素結合よりもエネルギー的に安定な、低障壁水素結合を形成していることを示した。

これまでに、宿主内における病原菌のヘムの略奪能力と病原性の緊密性に関する報告はあったものの、病原菌のヘム輸送システムを抗菌薬の輸送経路として活用する取り組みはなかった。本報告を端緒とし、緑膿菌をはじめとした病原菌のヘム獲得システムを標的とする薬剤送達技術の開発が活性化され、特定の病原菌に薬剤を運搬できる、副作用の少ない新たな抗菌薬群が探究されることが期待される。また、テトラフェニルポルフィリン誘導体の HasA への内包は、ヘム蛋白質の機能改変においてこれまでに例のない、革新的な結果であり、テトラフェニルポルフィリンの特性を蛋白質工学の分野に活かした多様な展開が見込まれる。以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資質があるものと認められる。