

I. 総論

3. 微生物の鉄捕捉分子と生体の防御機構

森 潔 向山 政志 中尾 一和

日本内科学会雑誌 第99巻 第6号別刷

2010年6月10日

## トピックス

## I. 総論

## 3. 微生物の鉄捕捉分子と生体の防御機構

森 潔 向山 政志 中尾 一和

## 要 旨

鉄は細胞分裂に必須の元素であるので、微生物は鉄濃度の低い環境から効率よく鉄を捕捉するためにシデロフォアと総称される鉄結合性有機化合物を合成、分泌する。一方、最近の研究により、哺乳類にはシデロフォア結合蛋白が存在し、大腸菌や結核菌の鉄利用を阻害することで感染防御に役立っていることが解明された。シデロフォア結合蛋白は、感染のほかにも細胞分化、癌、造血、アポトーシスなどの多彩な生命現象にも関わっている。

〔日内会誌 99：1188～1193, 2010〕

**Key words** : siderophore, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal), キレート, トランスフェリン

## はじめに

鉄はヒトの体内に最も多く含まれる金属で、約3gも存在している。鉄は2価と3価を行き来しやすい性質をもつことから、生体内で化学反応を触媒し、酵素反応（ペルオキシダーゼやカタラーゼにおいて）やガス交換（ヘモグロビンにおいて）の場を提供することに役立っている。Fe<sup>2+</sup>は毒性が強く、Fe<sup>3+</sup>は水に難溶性であるため、生体内の鉄はキャリアー（ヘム、トランスフェリン、ラクトフェリン、フェリチン、ヘモジデリンなど）と結合して、貯蔵・運搬されている。

微生物においても、哺乳類においても、DNA (deoxyribonucleic acid) の合成のためにはリボヌクレオチド・リダクターゼという酵素が律速

段階のひとつとなっており、その活性発揮にはFe<sup>2+</sup>イオンが必要である。従って、鉄がなければ（ほとんど全ての）細菌も癌細胞も増殖することができない<sup>1)</sup>。そこで、細菌、真菌、植物は鉄濃度の低い環境に曝されると、効率よく鉄を捕捉するためにシデロフォア (siderophore) と総称される鉄結合性小分子を産生する。本稿では、シデロフォアを介する微生物と宿主の間の激しい鉄獲得の戦いについて概説し、最近注目を浴びている（哺乳類が産生する）シデロフォア結合蛋白の性質を紹介したい<sup>2)</sup>。

## 1. 微生物とシデロフォア

Fe<sup>3+</sup>イオンは元来水に溶けにくいですが、さらに哺乳類の血液中には鉄と結合していない不飽和トランスフェリン（分子量 80 kDa）が存在し、寿命を終えた赤血球の処理や組織障害などに伴って血中に放出されるFe<sup>3+</sup>濃度を低く保ち、病原

もり きよし, むこうやま まさし, なかお かずわ: 京都大学大学院医学研究科内分分泌代謝内科



図1. 代表的なシデロフォアの化学構造

カテコール型の enterochelin, ヒドロキサム酸型の desferrioxamine, 大麦の根から単離された mugineic acid の3つを示す。



図2. 大腸菌のシデロフォア受容体 (左) 及び哺乳類のリポカリン蛋白群 (右) の立体構造

左は 22 回膜貫通型 enterochelin 受容体である FepA 蛋白を横から眺めた様子。(文献7より引用) 右は脂溶性分子のキャリア蛋白群であるリポカリンスーパーファミリーの一般的な構造。(文献8より引用)

性微生物の増殖を予防している<sup>3)</sup>。さらに感染症や慢性炎症性疾患においては網内系 (マクロファージ) にフェリチンの形で鉄が貯蔵され、血清鉄濃度低値を伴う貧血を呈する (anemia of chronic disease)。この病態は血液中での細菌の増殖を抑制するために合理的な戦略であり、肝臓から分泌されるヘプシジンの増加が重要な役割を果たしている<sup>4)</sup>。したがって、感染症の急性

期で感染のコントロールができていない時には鉄剤の投与を見合わせる必要がある。フェリチンは 24 個のサブユニットからなる 500 kDa の大型蛋白で、1 分子のフェリチンは 4,000 個もの  $Fe^{3+}$  イオンを結合し、細胞質内に余剰鉄を貯蔵することができる。

シデロフォアは鉄欠乏に応答して細菌などから分泌される鉄結合性、非ペプチド性の小分子

で、その分子量は 1,000 Da 以下である<sup>1)</sup>。シデロフォアの鉄に対する結合力は著しく強いため、哺乳類などの宿主の体内に存在するトランスフェリン、フェリチン、ヘムなどの鉄結合性分子から鉄を引き剥がして、細菌に鉄を供給できる<sup>3)</sup>。微生物や植物の産生するシデロフォアの種類、構造は多岐にわたっており、すでに数百種類以上が見つかっている(図 1)<sup>5)</sup>。鉄の注射用キレート薬として臨床応用されている desferrioxamine (DFO) は放線菌の産生するシデロフォアで、副作用として DFO を利用できるエルシニア菌やムコール真菌による感染症が知られている。稲は元来シデロフォアを産生する能力が低く、アルカリ性で鉄を利用しづらい土地では生育が悪いが、シデロフォア合成酵素を導入した遺伝子改変作物はそのような環境でもよく育つ<sup>6)</sup>。大腸菌ではシデロフォアの合成酵素 6 種類 (EntA から EntF)、取り込みに必要な蛋白 8 種類 (FepA など) が同定されている(図 2)<sup>7)</sup>。シデロフォアは Fe<sup>3+</sup> イオンと結合することで吸光波長に変化を来し、肉眼的にも色彩変化として認識される。緑膿菌は緑色色素のほかにシデロフォアの一つであるフルオレセインという蛍光色素を分泌するが、これは現在、蛍光眼底検査、蛍光染色、入浴剤などに応用されている。

## 2. 宿主はシデロフォア結合蛋白を産生する

neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal または lipocalin 2, siderocalin, human neutrophil lipocalin, 24p3) は好中球分泌顆粒から単離された機能未知の分泌蛋白であった<sup>2)</sup>。Ngal は脂肪酸、フェロモン、レチノイン酸などの脂溶性分子を運搬する蛋白群であるリポカリンスーパーファミリーに属する(図 2)<sup>8)</sup>。大腸菌に発現させたヒト Ngal 蛋白が赤みを帯びていることを契機に、Ngal は大腸菌由来のシデロフォア (enterochelin) に結合することが解明された<sup>9)</sup>。Ngal

蛋白は試験管内で大腸菌の増殖を抑制する。また Ngal knockout マウスを用いた検討により、Ngal は大腸菌の産生するシデロフォアを捕捉して鉄を利用できなくするために大腸菌による敗血症を阻止していることが示されている<sup>10)</sup>。そのほかに Ngal は結核菌や肺炎桿菌の感染に対しても防御的に働いている。血液、腎臓、肺、消化管、肝臓などにおいて、グラム陰性桿菌由来のエンドトキシン (リポポリサッカライド) や炎症性サイトカイン (インターロイキン-1 $\beta$ ) などにより Ngal が速やかに強力に誘導されることは、Ngal が生体防御に働く上で重要な性質となっている<sup>11)</sup>。涙の主成分である tear lipocalin にもシデロフォア結合活性がある<sup>1)</sup>。

## 3. 鉄を巡るヒトと微生物の戦い

微生物はシデロフォア結合蛋白である Ngal による監視の目をすり抜けるために種々の方法を編み出してきた。サルモネラ菌・病原性大腸菌・肺炎桿菌では iroA 遺伝子クラスターと呼ばれる 5 つの遺伝子を用いて、Ngal に捕獲されてしまうシデロフォアの enterochelin に糖鎖を付加し構造を変化させた salmochelin を産生したり、salmochelin 専用の菌体内膜・外膜の通り道を作ることで、自らの病原性を高めて Ngal による包囲網を回避する<sup>12)</sup>。炭疽菌は特殊な低分子を材料としてステルス・シデロフォアを作ることができ、Ngal からの監視を逃れる<sup>13)</sup>。ステルスとは隠密、お忍びなどの意味で、レーダーに映りにくい戦闘機はステルス戦闘機と呼ばれる。Ngal は血液中では非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium* の増殖を抑制するが、一旦マクロファージに侵入した菌はトランスフェリン陽性、Ngal 陰性の early endosome に留まり、Ngal からの妨害を受けずにトランスフェリンから必要な鉄を獲得する<sup>14)</sup>。

ヒトのほうも、微生物にやられ放題ではない。結核菌の産生するシデロフォア carboxymyco-

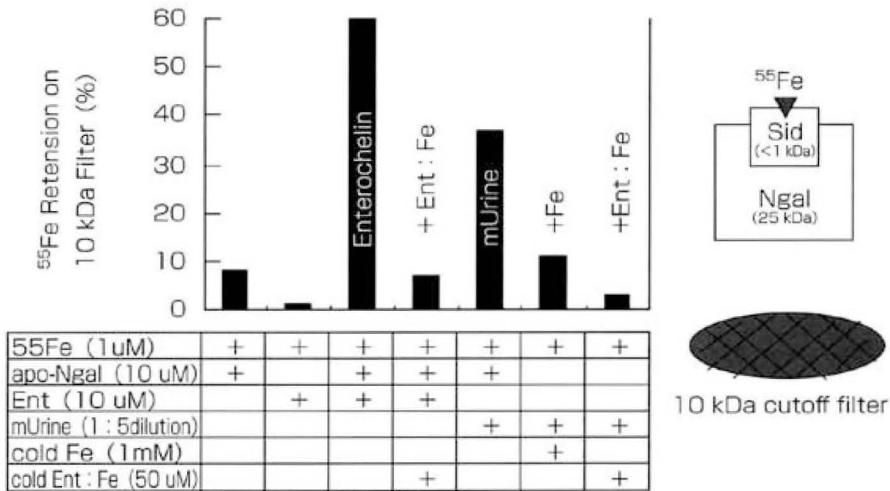


図3. 哺乳類シデロフォアの新しい検出法 (retention assay)

<sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup> (1 μM), 非放射性 Fe<sup>3+</sup> (9 μM), apo-Ngal (裸の Ngal, 10 μM), enterochelin (Ent, 10 μM) を混合し, 10 kDa cutoff のフィルターの上で繰り返し洗うと, 添加した <sup>55</sup>Fe の 60% がフィルター上に保持された. この反応は 5 倍量の Ent:Fe の共存にて阻害された. 3 kDa cutoff フィルターを素通りした正常マウス尿の分画 (m Urine, 5 倍希釈で使用) には siderophore 様分子 (Sid) が存在し, 38% の <sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup> が保持された. これは 100 倍量の ferric ammonium chloride (cold Fe, 1 mM) あるいは 5 倍量の Ent : Fe の共存にて阻害された. 以上のことからマウス尿中に Ngal と Fe<sup>3+</sup> の結合を仲介する Sid が存在すると考えられた. (文献 19 より一部改変)

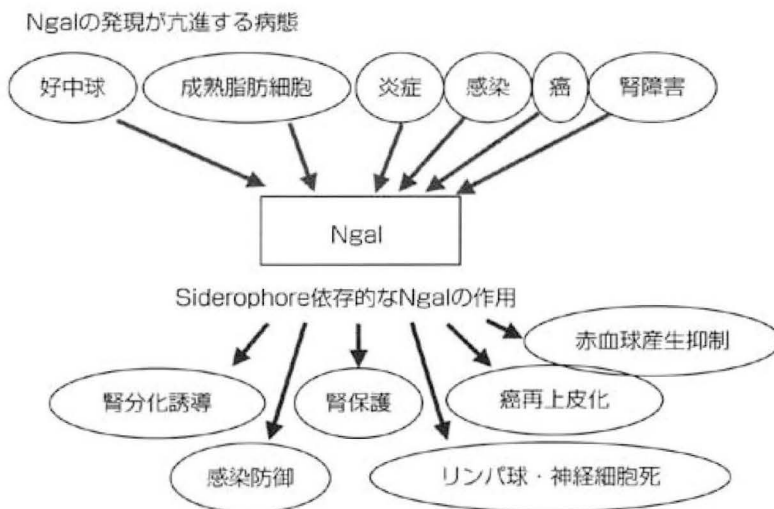


図4. Ngal の発現調節及び多彩な全身的作用

bactinの合成酵素阻害薬を用いた抗生物質の開発が進められている<sup>15)</sup>. 緑膿菌にはDFO取り込み能力があるため, Ga<sup>3+</sup>イオン (Fe<sup>3+</sup>とサイズが似ているが, Fe<sup>3+</sup>のような化学反応活性化作用

がない) とDFOの複合体を投与すると, 本来のシデロフォアになりすまして緑膿菌に盛んに取り込まれて, 感染の治療に有用である(「トロイの木馬」療法)<sup>16)</sup>. 以上のようにヒトと微生物の

間の鉄の奪い合いに終焉はない(「鉄泥棒」現象)<sup>17)</sup>。

#### 4. シデロフォア結合蛋白の多彩な生物学的作用

上述のようにNgalは微生物のシデロフォアを捕捉することで大腸菌、結核菌、肺炎桿菌などの増殖を抑制する働きを有し、自然免疫(抗原特異的なリンパ球の活性化を介さない、生まれつきの抵抗力)の重要な一翼を担っていることが解明されてきたが、他にもNgalは幅広い生物現象に関与している(図4)<sup>2,10)</sup>。

まずラット胎児腎臓の器官培養において、分化誘導因子を蛋白レベルで精製する過程でNgalが同定された<sup>18)</sup>。次にマウスやラットの腎障害モデルにおいて、Ngal遺伝子発現は100~1,000倍に増加することが報告された<sup>2,11,19,20)</sup>。そこで筆者らはヒト腎生検組織を検討し、腎障害においては血液、尿、腎組織中のNgal含量が増加することを見出した<sup>19,20)</sup>。マウスの腎虚血再灌流障害において虚血の直前にNgalを腹腔内投与しておく、腎障害が著しく軽減された<sup>19)</sup>。シデロフォアの存在がNgalの作用に及ぼす影響を検討したところ、大腸菌由来シデロフォアとFe<sup>3+</sup>イオンが共存すると、Ngalによる腎分化誘導、腎保護作用が増強された<sup>2,11,19,20)</sup>。次に哺乳類の体内に、感染症とは無関係にシデロフォアが存在するかを明らかにするために、新しいシデロフォア測定系を樹立したところ、正常のヒトあるいはマウス尿中に(分子量3 kDa以下の)シデロフォア様分子が確かに存在することが示された(図3)<sup>19)</sup>。ペーパークロマトグラフィーにて評価しても、マウス尿中にはFe<sup>3+</sup>と結合して、鉄の移動度を増加させる物質が存在した。大腸菌は複数の酵素の働きで、アミノ酸などからシデロフォアを自ら合成するが<sup>7)</sup>、ヒトの体内のシデロフォアについては必ずしも体内で合成される必要はなく、ビタミンのように食物から吸収される可能性、あるいは腸内細菌から分泌されたものをヒトが

利用する可能性なども想像できる。

このほかにもNgalは癌の再上皮化(mesenchymal-epithelial transitionに伴う局所浸潤抑制・遠隔転移抑制)、リンパ球・神経細胞・赤芽球のアポトーシスなどを引き起こすことも報告されている<sup>2)</sup>。ただし、癌におけるNgalの役割については反対意見も提出されている<sup>21)</sup>。また慢性骨髄性白血病の原因のBCR-ABL癌遺伝子はNgalの発現を増強し周辺の正常造血細胞を物理的に除去する一方で、白血病細胞ではNgal受容体(brain-type organic cation transporter)の発現を減弱させることでアポトーシスが回避されること、BCR-ABLチロシンキナーゼ阻害薬Glivec/Gleevec<sup>®</sup>はNgal受容体の発現回復による細胞死誘導によって抗腫瘍効果を発揮することが報告されている<sup>2)</sup>。

#### おわりに

Ngalがシデロフォア結合蛋白であるということが2002年に報告されたことを契機に感染症に対する新しい考え方が導入され、新規治療法の種も見つかりつつある。哺乳類の体内に存在するシデロフォアの構造、量、発現調節や代謝が分かってくれば、シデロフォア結合蛋白の生物学は一層発展することが期待される。

#### 文 献

- 1) 森 潔, 他: 多彩な生物現象に関わる鉄結合性小化合物シデロフォアの意義. 細胞工学 27: 2-6, 2008.
- 2) 森 潔, 他: Siderophore結合蛋白の生物学—分化誘導, 組織障害, 癌, 感染, 造血の新しい接点—. 臨床血液 50: 519-526, 2009.
- 3) Ratledge C, et al: Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 54: 881-941, 2000.
- 4) 生田克哉, 他: 鉄代謝におけるヘプシジンの機能. 臨床血液 48: 36-45, 2007.
- 5) Roosenberg JM 2nd, et al: Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. Curr Med Chem 7: 159-197, 2000.
- 6) Takahashi M, et al: Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine

- aminotransferase genes. *Nat Biotechnol* 19: 466-469, 2001.
- 7) Raymond KN, et al: Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3584-3588, 2003.
  - 8) Flower DR, et al: The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 1482: 9-24, 2000.
  - 9) Goetz DH, et al: The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10: 1033-1043, 2002.
  - 10) Flo TH, et al: Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917-921, 2004.
  - 11) Mori K, Nakao K: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 71: 967-970, 2007.
  - 12) Fischbach MA, et al: The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16502-16507, 2006.
  - 13) Abergel RJ, et al: Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18499-18503, 2006.
  - 14) Halaas O, et al: Intracellular Mycobacterium avium intercept transferrin in the Rab11 (+) recycling endocytic pathway and avoid lipocalin 2 trafficking to the lysosomal pathway. *J Infect Dis* 201: 783-792, 2010.
  - 15) Ferreras JA, et al: Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis and Yersinia pestis. *Nat Chem Biol* 1: 29-32, 2005.
  - 16) Banin E, et al: The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-Pseudomonas therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16761-16766, 2008.
  - 17) Barasch J, Mori K: Cell biology: iron thievery. *Nature* 432: 811-813, 2004.
  - 18) Yang J, et al: An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 10: 1045-1056, 2002.
  - 19) Mori K, et al: Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 115: 610-621, 2005.
  - 20) 森 潔, 他: CKDにおける新規バイオマーカーNgalの意義. *日本臨床* 67: 1233-1241, 2009.
  - 21) Bolignano D, et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer Lett* 288: 10-16, 2010.