

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」
平成24年度採択研究代表者

H27 年度
実績報告書

山口 明人

大阪大学産業科学研究所
特任教授

異物排出輸送の構造的基盤解明と阻害剤の開発

§ 1. 研究実施体制

(1) 「構造・排出輸送研究」グループ

- ① 研究代表者: 山口 明人 (大阪大学産業科学研究所、特任教授)
- ② 研究項目
 - ・異物排出輸送の構造的基盤解明と阻害剤の開発

(2) 「有機合成研究」グループ

- ① 主たる共同研究者: 加藤 修雄 (大阪大学産業科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・異物排出タンパクに対するユニバーサル阻害剤の分子設計および化学合成

(3) 「タンパク質動態解析」グループ

- ① 主たる共同研究者: 松田 知己 (大阪大学産業科学研究所、准教授)
- ② 研究項目
 - ・異物排出タンパク質及び排出薬剤の動態解析

§ 2. 研究実施の概要

異物排出タンパクは細菌から高等生物に至るまで、ほとんど全ての細胞に存在し、細胞レベルのもっとも基本的な生体防御システムを構成している。現実の生育環境の中では生物にとって必須なものである。ところが、何らかの原因により過剰発現すると、多剤耐性感染菌やがん細胞の多剤耐性といった問題を引き起こし、現代における化学療法に深刻な問題を提起している。異物排出タンパクが原因となる多剤耐性を克服する有効な臨床治療薬は全くない。

本研究プロジェクトは、世界で初めて異物排出タンパクの X 線結晶構造決定に成功し、世界の異物排出輸送研究を終始牽引してきた実績の上に立ち、異物排出輸送の構造的基盤と異物認識機構を全面的に解明するとともに、異物排出タンパクの過剰発現が原因で生じる多剤耐性感染症を克服するための阻害剤開発のための基盤研究を行う。

(1) 異物排出の構造的基礎の解明:

MexB の基質結合構造の決定: 可溶化精製 MexB は界面活性剤 DDM と結合しており、その結合構造はすでに決定している(Nakashima, R. et al. Nature 2013)。このため、他の薬剤との結合構造はすでに結合している DDM に妨げられて、強く結合する阻害剤 ABI-PP との結合以外は検証されていない。そこで、DDM に代わって、その約 2 倍の分子量があり、DDM 結合ポケットにははまらないと考えられる界面活性剤 LMNG を用いることで、基質非結合型 MexB の構造決定を目指した。ところが、予期に反して LMNG 結合型構造が決定された。LMNG 結合位置は、その大分子量にもかかわらず、DDM や ABI-PP と同じ遠位結合ポケットで、しかし結合サイトは DDM とは大きく異なっていた。先の論文(Nakashima et al. Nature 2011)で大分子量薬物は近位ポケット、小分子量薬物は遠位ポケットに結合が観察されたことを報告したが、LMNG は大分子量でも遠位ポケットに結合していたことから、結合ポケット選択は単純に分子量によるものでは無いことが示された。今後、阻害剤のインシリコスクリーニングにも役立つ情報である。

in vitro 再構成系による基質排出時における AcrAB-TolC 複合体の 1 分子動態解析: 脂質二重膜を張ったマイクロチャンバーにより膜タンパク質の輸送活性を測る測定系が最近になって報告された (Watanabe R., et al., Nat Commun. 5:4519, 2014)。本方法を開発した東大野地研の渡邊力也博士との共同研究により、

AcrAB-TolC 複合体の異物排出活性の 1 分子解析を行う観察系を確立し、より定量的な構造機能相関の理解を目指している。

本年度は、産業化学研究所技術室との連携によりマイクロチャンバーの作製と各 well への脂質二重膜の形成の系を確立した。平成28年度に作製したマイクロチャンバー上の脂質二重膜への AcrB の取り込みと動態イメージングを行う。

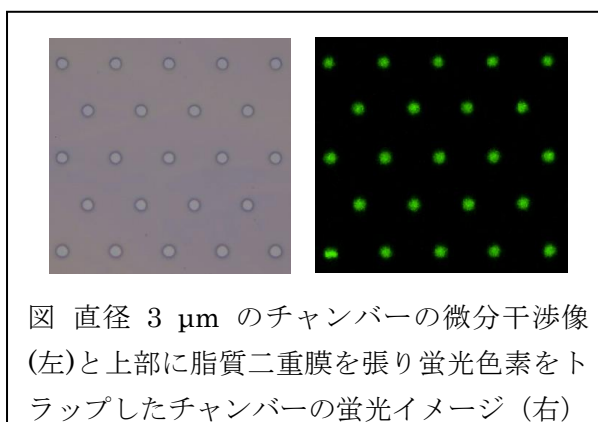


図 直径 3 μm のチャンバーの微分干渉像 (左)と上部に脂質二重膜を張り蛍光色素をトラップしたチャンバーの蛍光イメージ (右)

(2) 異物排出タンパクの多様性と生理的役割の解明:

RND 型以外の排出タンパクの構造決定: ABC 型であっても AcrB などと同じく TolC と共役する

MacB の大量発現・大量精製系を確立し、結晶化に大きく前進した。

(3)異物排出複合体の構造機能解明:

2者, 3者複合体構造解析:本研究を開始して以後、海外の研究者から、cryoEM を用いた AcrAB-TolC 3者複合体構造が相次いで報告された。これまで定説とされてきた、AcrB と TolC が直接結合している構造ではなく、間に AcrA6 個からなる筒状構造がサンドイッチされるという構造であった。この構造は必然的に AcrB:AcrA:TolC 構成比が 3:6:3 であることを意味している。私たちは、独立に、AcrB-AcrA をリンカーを介して 1:1 で結合した融合タンパクを作成し、排出輸送活性を保持している事を示した。融合タンパクの比排出活性は野生型 AcrAB に比べて低かったが、重要なことは、野生型 AcrA を発現させる条件下でも、融合タンパクの比活性は変化しなかったことである。これは少なくとも排出には融合タンパクと TolC のみで十分であること、すなわち、排出活性に必要な構成比は AcrB:AcrA:3:3 であることを意味している。この融合タンパク質と全長 TolC を用いた共結晶化条件スクリーニングの結果、微結晶だがX線を回折する結晶を得ており、2者、3者複合体構造解析に向けて大きく前進した。

FDAP 解析を用いた探索・排出モード切替仮説の検証:異物排出タンパクは、普段は AcrB-AcrA2 者複合体として細胞膜を自由に拡散しており、基質を結合すると初めてペプチドグリカンに固定されている TolC と結合して基質を排出すると推定される(探索・排出モード切替仮説)。AcrB に蛍光標識して、細胞膜上での拡散速度を FDAP により測定し、この仮説を検証した。その結果、AcrA が不在時には AcrB の膜拡散速度は TolC が不在時と同様に AcrAB-TolC 3者共存下よりも有意に速いことがわかった。近位結合基質存在下では拡散速度に大きな変化はなかったが、遠位結合基質存在下では有意に拡散速度が低下した。動態観察のための TolC の抗体標識を行い FRAP による予備的な動態解析を行った。

(4)構造に基づくユニバーサル阻害剤の開発

SBDD による阻害剤の開発:多剤耐性緑膿菌の主たる異物排出トランスポーターである MexB および MexY に対するユニバーサル阻害剤を創出すべく、MexB と既知の阻害剤との共結晶構造および MexY のホモロジーモデルをもとに構造展開した結果、昨年度、トランスポーター発現大腸菌に対して、エリスロマイシンとの併用により、強力な増殖抑制効果を示すユニバーサル阻害剤候補化合物の創出に成功していた。そこで、知財化するべく幾つかの周辺化合物の合成と評価を行い、平成 27 年 12 月 7 日に科学技術振興機構から特許出願を行った。

さらに新たに導入した分子構造最適化支援ソフト(WaterMap, Schrödinger K. K.)による解析をもとに、新規阻害剤設計を行った。

阻害剤の感染症治療薬としての可能性の検証:上記ユニバーサル阻害剤を国内製薬企業に導出し、各種グラム陰性菌の多剤耐性株のみならず薬剤感受性株に対しても既存抗菌薬との併用効果を検証した。その結果、アミノグリコシド系抗菌薬を除く多くの抗菌薬との顕著な併用効果が確認できた。以上から、異物排出トランスポーター阻害剤と抗菌薬との併用をグラム陰性菌感染症に対する標準的治療戦略とすべきことを提唱する。

化合物データベースを用いた阻害剤バーチャルスクリーニング:昨年度東大化合物ライブラリーを用いたバーチャルスクリーニングから選定し、MexY 選択的阻害能を有する化合物を基盤にフォーカストライブラリーを構築した。その結果、MexY 阻害能の向上を達成することに成功した。