

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菌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:

**FRET 解析によるマルチサイト基質振動仮説の検証:** 私たちはこれまでの研究で、異物排出タンパクによる多剤認識の構造的基礎は、空間的に余裕のある多剤結合ポケットの中に基質の部分構造を認識する多数の結合サイトがあり、それらの組み合わせで多数の基質が認識されるとするマルチサイト結合機構を証明してきた。さらに、その多剤結合ポケットは 2 つあり、基質取り入れ口も膜への開口部、ペリプラズムへの開口部、中央空洞への開口部と、基質の物理的性質に対応した複数の取り入れ口があることを示してきた。しかし、非常に広範な基質を輸送するにもかかわらず、結晶構造中に結合位置を特定できる基質はごく少数に限られること、にもかかわらず、異物排出タンパクが発現すると薬物の細胞内侵入はほぼ完全にシャットアウトされることに見られるように、極めて効率的な排出であることの理由が完全に解明されたとは言いがたい。これを説明するため我々はマルチサイト基質振動仮説(multisite-drug- oscillation hypothesis)を提唱している(Yamaguchi, A. et al. *Frontier's Rev.* 2015, in press)。多剤結合ポケットの中で基質分子が複数の結合サイト間を振動しているとする仮説である。これにより、個々の結合サイトとの親和性は低くても、全体としての効率は高くなり、結合位置が結晶中で特定できない理由もはつきりする。これを証明するため、FRET 解析によるタンパク質動態解析系を開発中である。

**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)、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。

## (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:** AcrB-AcrA 融合タンパクを各種構築し、排出活性が野生型と変わらないことを確認し、大量発現にも成功して結晶化に大きく前進した。また、ジスルフィド結合を利用して、AcrB-AcrA リンカータンパクと TolC の複合体形成も確認し、3 者複合体結晶作成に向けても前進した。

**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、TolC が不在時には AcrB の膜拡散速度は TolC 存在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。

## (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、in silico に設計した分子群の中から、昨年度、既知の MexB 阻害剤と同等の活性を持ち、かつ、はるかに分子サイズの小さな阻害剤の創出に成功した。本年度は、さらに構造活性相関研究を展開した結果、MexB のみならず MexY 強制発現大腸菌に対しても、erythromycin 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た。

**阻害剤の感染症治療薬としての可能性の検証:** 臨床分離多剤耐性緑膿菌株 55 株に対して、既存抗生物質との併用による阻害剤の効果を検証した。その結果、とくに単環  $\beta$  ラクタム剤モノバクタムやキノロン剤シプロフロキサシンとの併用により著しく高い併用効果が得られた。これを元に、ユニバーサル阻害剤、MexB 特異的阻害剤の両方を国内製薬企業に導出し、開発前の他菌種も加えた詳細な阻害剤評価を行っている。

**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:** 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た 995 化合物の阻害活性評価を行い 24 種の単独ポンプ阻害剤候補化合物と 4 種のユニバーサル阻害剤候補化合物を抽出した。ヒット化合物の一つを基盤にフォーカストライブラリーを構築した結果、これまで報告例の無い MexY 選択的排出阻害剤の創出に成功した。