

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06569

研究課題名(和文) 蛋白質の構造変化過程を標的とした新規分子設計法による緑膿菌MurDの阻害剤探索

研究課題名(英文) Inhibitor development of Pseudomonas aeruginosa MurD using a novel molecular design method targeting the conformation changing process.

研究代表者

福原 秀雄 (Fukuhara, Hideo)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80707191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌がもつ細胞壁合成酵素の1つであるMurDは、その基質特異性から抗菌薬開発の有力な標的とされながら、十分な薬効を持つ阻害剤は開発されていない。本研究では緑膿菌MurDの結晶構造を決定するとともに、MDシミュレーションと酵素反応アッセイ、結合評価を組み合わせてMurDの構造変化を阻害する化合物の設計と評価を試み、既知の阻害剤よりも低いIC50を有する新規リード化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日和見感染症を引き起こす緑膿菌は、近年多剤耐性の獲得が問題となっている。本研究で構造決定した緑膿菌のMurDはこれまでに報告がなく、その構造情報は広く開示されるため、他の研究にも利用できることから学術的に意義がある。また、この構造を基にした計算による化合物の結合予測と実際の酵素反応阻害アッセイ、結合評価を組み合わせて見出した新規化合物は、既知の阻害剤よりも低いIC50を示したが、構造展開によってさらに阻害活性を高めることができると見込んでおり、新たな抗菌薬の開発基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：MurD, which is one of the cell wall synthases, is a promising target for antibacterial drug agents against Pseudomonas aeruginosa. While MurD recognizes substrates specifically, no inhibitors with sufficient efficacy have been developed. In this study, we have determined the crystal structure of Pseudomonas aeruginosa MurD. Based on this, some inhibitors were designed and evaluated using MD simulation, enzymatic assay, and binding analysis. As a result, we found a promising lead compound showing lower IC50 than known inhibitors.

研究分野：構造生物学

キーワード：緑膿菌 MurD 構造解析 阻害剤 スクリーニング MDシミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

現在、世界中の医療現場で多剤耐性菌の発生が大きな問題となっている。グラム陰性好気性桿菌の一種である緑膿菌は、自然環境中に存在する代表的な常在菌であり、ヒトに対する病原性を有する。健康者に感染することはほとんどないが、免疫力が低下した人には感染して日和見感染症の一種である緑膿菌感染症を引き起こす。緑膿菌は元来、消毒薬や抗生物質に対する抵抗力が高く、後天的に薬剤耐性を獲得した報告も多いため、特に院内感染の原因菌として医学上重要視されている。緑膿菌は褥瘡(床ずれ)の原因菌でもあり、ベッドサイドに親和性があるため、カテーテル等の侵襲性の高い治療行為に伴って血中に混入することで敗血症に至る。緑膿菌感染症を発症してからの治療は困難で、敗血症による致死率は約 80%に上るため、治療の選択肢を増やす新たなカテゴリーの抗菌薬開発が望まれている。

抗菌薬開発において、細菌に特有のペプチドグリカンからなる細胞壁の合成酵素を標的とした阻害剤はヒトに対して安全性が高く、ペニシリン系やセフェム系の抗生物質等が古くから利用されてきた。Mur 合成酵素ファミリーは、ペプチドグリカン層を合成する一連の酵素群であり、いずれも細菌の生存に不可欠である。なかでも MurC, MurD, MurE, MurF は細胞質のリボソーム非依存的にペプチド合成を触媒する。このうち MurD は、UDP-MurNAc-L-Ala (UMA) を基質として D 体のグルタミン酸 (D-Glu) を付加するユニークな反応を触媒する。その反応機構は大腸菌 MurD の構造解析と、生化学的な研究から、まず基質末端のカルボキシ基を ATP によってリン酸化し、遷移状態である四面体中間体が D-Glu のアミノ基による求核攻撃を受けて、アミド体と ADP、無機リン酸塩を生じると考えられている。

MurD は、グラム陽性・陰性菌を問わずよく保存されており、N 末端から D1~D3 の 3 つのドメイン構造をもち、D1 は UDP 前駆体、D2 は ATP、D3 は D-Glu とそれぞれ結合する。大腸菌 MurC および MurF の研究により、これらの基質は ATP、UDP 基質、縮合するアミノ酸の順に結合すること、また大腸菌 MurD の構造解析によって基質結合前の open-form から基質結合によって C 末端の D3 ドメインが D1 ドメイン側に配置されることで基質結合部位を閉塞した closed-form のコンフォメーションをとることが示されていた。大腸菌の MurD を標的として阻害剤の開発が試みられていたが、いずれも IC<sub>50</sub> が数十  $\mu$ M 程度と、十分な活性をもつ化合物の報告はなかった (J. Med. Chem. 2010, J. Chem. Biol. 2010, Biochem. Pharmacol. 2012)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、緑膿菌 MurD のように大きな構造変化を伴う対象を標的として、反応中間体の semi-closed 状態を含む open~closed 各状態のスナップショット構造の決定と MD シミュレーションを併用し、ドメイン構造の大きな動きを途中で「繋ぎ止める」ことにより、酵素反応を阻害する低分子化合物「ケミカルクリップ」を設計することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず、既に放射光施設にて X 線回折データを得ていた緑膿菌 MurD の closed 構造について精密化を進め、構造決定する。この構造を基に in silico スクリーニングを実施し、結合予測の上位化合物について実際に酵素活性測定系により阻害能の評価を行う。酵素アッセイは緑膿菌由来組換え MurD に合成 UMA 基質と D-Glu、ATP を加え、酵素反応により生じる ADP を定量する系を用いた。ヒット化合物については再現性、濃度依存性試験および酵素を除いたカウンターアッセイで活性を確認する。得られたヒット化合物の類縁体を検索し、これをさらに酵素アッセイで評価する。

標的タンパク質を常磁性ランタニドイオンで標識することにより、大腸菌 MurD の基質結合によるドメイン配置の大きな変化を溶液 NMR で観測する系を既に確立している (Medicinal Chem. 2012) ため、これを緑膿菌 MurD に適用し、阻害剤存在化でのドメイン配置を観測する。並行して緑膿菌 MurD とヒット化合物の結合を表面プラズモン共鳴により直接検出する。また、共結晶化によりヒット化合物との複合体構造の決定を試みる。加えて MD シミュレーションにより結合状態を予測する。

## 4. 研究成果

Closed-form の緑膿菌 MurD について精密化を進め、最終的に 2.3 Å の高分解能で構造決定した。この構造を基に、東京大学創薬機構が提供する約 21 万の化合物についてドッキングアルゴリズム sievgen を用いて in silico スクリーニングを実施し、MTS (Multiple target screening) 法により結合予測の上位約 1000 化合物を選抜した。入手できた 1040 化合物について、最終濃度 20  $\mu$ M で実際に酵素アッセイの阻害能による評価を行い、阻害率 0.6 以下のクライテリアで 25

化合物を選抜した。なお、25 化合物には既報の大腸菌 MurD 阻害剤が含まれており、この系の有効性が示された。続いて 25 のヒット化合物については再現性試験、開始 1000 化合物については酵素を除いたカウンターアッセイを実施し、その阻害活性が確認できたため、25 化合物の類縁体を検索した。入手できた類縁体 161 化合物をさらに酵素アッセイで評価したところ、IC50 が数  $\mu\text{M}$  の化合物を複数取得することができた。これにより、MurD に対して IC50 が 10  $\mu\text{M}$  を切る陽性化合物が初めて得られたが、薬剤として利用するためには数十 nM 程度の IC50 が求められる。最も活性の高い化合物については NMR で緑膿菌 MurD との結合評価を試みたが、NMR の測定条件が化合物に適していなかったためか NMR シグナルの解像度が悪く、解析には至らなかった。また、緑膿菌 MurD とヒット化合物の結合モードについて、Amber18 および AmberTools19 に含まれる MM-PBSA で得られる結合自由エネルギー差を結合親和性の指標に MD シミュレーションを行った。しかしながら開始構造が open-form であるため、cavity が大きく、化合物のドッキングフォームが正しいかは今後検証する必要がある。また MurD の open-closed form 遷移は数百  $\mu$  秒のゆっくりとした動きであったため、MD による計算が困難であった。本研究により決定した緑膿菌 MurD の構造については現在論文投稿を準備している一方、緑膿菌 MurD に対して取得できた IC50 が数  $\mu\text{M}$  のヒット化合物については、公開せず構造最適化を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 児玉耕太
2. 発表標題 WetとDryのコミュニケーションによる レジデンス化合物の検索
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	児玉 耕太  (Kodama Kota)  (90419424)	立命館大学・テクノロジー・マネジメント研究科・准教授   (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------