

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08458

研究課題名(和文)メタロベータラクタマーゼの酵素活性を阻害する新規薬物の創出

研究課題名(英文)Development of Inhibitors for Metallo-beta-lactamases

研究代表者

星野 忠次 (Hoshino, Tyuji)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90257220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： $\beta$ -ラクタマーゼは、ペニシリンなどで知られる  $\beta$ -ラクタム系抗生物質を失活させる酵素の1種であり、薬剤耐性を示す細菌の多くが  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する。本研究では、病原細菌の薬剤耐性に対処するために、抗生物質補助剤の創出を見据えて、メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼに対する阻害化合物を見出した。薬物スクリーニングにより、3種類の阻害化合物を同定した。このうちの2種は、本研究で有機合成したものであり、同定された阻害化合物をさらに改良した。1種の化合物については、メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼとのタンパク質共結晶の作出に成功し、同定した阻害化合物と標的との結合構造をX線結晶解析から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Beta-lactamase is one kind of enzymes which dissociate beta-lactam antibiotics such as penicillin and imipenem. Many bacteria that are resistant to antibiotics carry the genome of beta-lactamase and generate it for drug-resistance. In this study, we focused on the metallo-beta-lactamase that is high enzymatic activity among several types of beta-lactamases. As a consequence of the in silico and in vitro chemical screening, we identified three chemical compounds that block the action of metallo-beta-lactamase. Two of them were synthesized in our study and utilized as a fundamental skeleton of further chemical modification. The other one was purchased from a supplier. We successfully obtained the binding structure between metallo-beta-lactamase and one of the identified compounds. The information of the binding structure will be important for the rational design of the chemicals that have high inhibitory potency.

研究分野：物理化学

キーワード：阻害化合物 薬剤耐性菌 メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ 理論薬物設計 有機合成 X線結晶構造解析 酵素  
活性阻害 構造活性相関

## 1. 研究開始当初の背景

感染症は、医療の発達した現在でも、時に健常人を死に至らしめる程の重篤な病状を引き起こす。β-ラクタマーゼは、ペニシリンなどで知られるβ-ラクタム系抗生物質を失活させる酵素の1種であり、薬剤耐性を示す細菌の多くがβ-ラクタマーゼを産生する。特にメタロβ-ラクタマーゼ産生菌は、イミペネムやカルバペネムなど抗生物質の切り札とも言える薬剤を含めて、ほぼ全てのβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性を持つため、感染拡大が危惧されている。最近では、メタロβ-ラクタマーゼの一種である New Delhi メタロβ-ラクタマーゼ (NDM-1) が問題となっている。NDM-1 は、緑膿菌やアシネトバクターだけではなく、大腸菌や肺炎桿菌にも取り込まれたことで、欧州では健常者からの死亡例が報告されている。従って、新規の抗菌薬あるいは抗菌薬補助剤の開発は、緊急の課題である。

β-ラクタマーゼは、クラスA～Dに分類される。メタロβ-ラクタマーゼは、このうちクラスBに区分され、活性中心に2つのZn原子が存在することが大きな特徴である。2つのZn原子が強い触媒作用を示し、既存のβ-ラクタム系抗生物質を幅広く分解してしまう。従って、クラスBβ-ラクタマーゼの酵素活性を抑制しない限り多剤耐性菌には対抗できないと思われる。

## 2. 研究の目的

病原細菌の薬剤耐性に対処するために、作用機序の異なる抗生物質あるいは抗生物質補助剤の開発は緊急の課題である。本研究では抗生物質補助剤の創出を見据えて、メタロβ-ラクタマーゼに対する阻害化合物を作出する。

## 3. 研究の方法

有機合成・生化学実験・理論計算を融合させ、メタロβ-ラクタマーゼの阻害剤を創出する。

### 3-1. X線構造解析から得られた結合構造を

もとに計算機による薬物の分子設計を行う。

具体的には、X線共結晶構造解析から得られた構造情報をもとに、化合物と標的タンパク質との結合親和性を計算機で算出した。官能基付加や官能基置換を施した修飾化合物についても、結合親和性を予測した。この予測評価を繰り返して、有望な化合物構造を探索し、活性増加の見込める分子構造をデザインした。計算には申請者が独自に開発したOrientationソフトウェアを用いた。

### 3-2. 計算機解析により有望と判断された化合物とその誘導体の有機合成を行う。

具体的には、計算機予測により有望と判断された構造を持つ化合物とその周辺化合物について、有機合成を行った。合成中間体も活性測定に使用する。同定された3種類の化合物のいずれについても合成展開をして、構造活性相関の手掛かりとした。

### 3-3. 化合物によるβ-ラクタム剤の分解阻害能を、精製した酵素タンパク質で定量化する。

具体的には、NDM-1もIMP-1も、抗生物質の1つであるセファロスポリン (Cephalosporin C) を分解する。セファロスポリンは、260nmに特徴的な吸収波長を持つので、紫外線分光法により容易に、β-ラクタム系抗生物質が分解する速度を測定した。合成された化合物の存在下で、NDM-1あるいはIMP-1によるセファロスポリンの分解速度の変化を測定し、合成化合物の酵素活性阻害能を求めた。

### 3-4. 化合物と抗菌薬の存在下でβ-ラクタマーゼ産生菌を培養し、薬物の阻害活性を確認する。

具体的には、合成化合物の存在下で、細菌が増殖する能力を定量化することで、細菌レベルでの阻害剤の効果を確かめた。初めにディスク法による阻止円の径の測定

から化合物の有効性を確認する。その上で阻害化合物を混合させた液体培地を使って、メロペナムやイミペナム等の抗生物質の薬剤耐性菌に対する最小阻害濃度(MIC)を算出した。阻害活性測定の結果を、化合物の設計と合成に反映させて、候補薬物の最適化を繰り返した。

3-5. 阻害活性測定の結果を、化合物の設計と合成に反映させて、候補薬物の最適化を繰り返す。既に同定済みのヒット化合物を足掛かりに構造改変することで、阻害活性の向上を目指す。ヒット化合物は、代表的なメタロ-ラクタマーゼであるNDM-1(New Delhi Metallo-beta-lactamase)ならびにIMP-1(imipenemase)のいずれでも阻害活性があることが確認されている。

#### 4. 研究成果

研究の初年度は、同定化合物からの合成展開を中心に行った。同定された化合物と同程度の阻害活性を持つ化合物は作成できたが、より活性の増強した化合物は得られなかった。また東京大学・創薬機構から化合物データベースの提供を受けて、同定化合物と類似構造を持つ化合物の計算機探索を行った。探索結果を参考に、実際に創薬機構から240種類の化合物の提供を受け、阻害活性の測定を行った。提供を受けた化合物の中には、同定化合物を超える強い活性の物質は見出せなかったが、阻害活性を持つ化合物と持たない化合物についての知見が蓄積された。

次年度は、商用のデータベースから類似化合物を検索し、13種類の化合物を購入した。幾つかの化合物で阻害効果が認められ、このうち1種類については、強い活性が見られた。また新規に設計し合成した周辺化合物の中には、先導化合物と同程度の阻害活性を持つものが得られたものの、同定された化合物より活性の増強した化合物は得られていなか

った。そこで商用のデータベースより、類似構造を持つ化合物を選出し、阻害活性を測定した。その結果、今後の研究の足掛かりとなる有望な化合物が得られた。さらにメタロ-ラクタマーゼについて、タンパク質結晶が得られる条件が確立したことで、必要に応じて標的タンパク質と阻害化合物の結合構造が解明できるようになった。現在、新規に同定した化合物とメタロ-ラクタマーゼの共結晶化に取り組み始めた。結合構造から、阻害活性の高い新規合成化合物を理論設計することが可能になった。本研究では、先導化合物を足掛かりに、理論計算・有機合成・生化学実験を融合させ、標的タンパク質に対する阻害剤の開発を進めた。

研究の最終年度には、化合物の更なる改良を行った。また研究の取り纏めと、知的財産権の取得を見据えた研究を遂行した。現在のところ報告されている中では、トップクラスの活性を持つメタロ-ラクタマーゼ阻害薬の化学構造が見出せている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

M. Vahed, S. Neya, K. Matsuzaki, T. Hoshino : Analysis of Physicochemical Interaction of A $\beta$ <sub>40</sub> with GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane, *J. Phys. Chem. B*, 122(14), 3771-3781 (2018), DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b00139

M. Vahed, S. Neya, K. Matsuzaki, T. Hoshino : Simulation study on complex conformations of A $\beta$ <sub>42</sub> peptides on a GM1 ganglioside-containing lipid membrane, *Chem. Pharm. Bull., Chem. Pharm. Bull.*, 66(2), 170-177 (2018); DOI: 10.1248/cpb.c17-00740

H. Fuji, F. Qi, L. Qu, Y. Takaesu, T. Hoshino : Prediction of ligand binding affinity to target proteins by molecular mechanics theoretical calculation, Chem. Pharm. Bull., 65(5), 461-468 (2017), DOI: doi.org/10.1248/cpb.c16-00913

S. Fudo, F. Qi, M. Nukaga, T. Hoshino : Influence of precipitants on molecular arrangement and space group of protein crystals, Cryst. Growth Des., 17(2), 534-542 (2017), DOI: 10.1021/acs.cgd.6b01385.

T. Osajima, T. Hoshino : Roles of the respective loops at complementarity determining region on the antigen-antibody recognition, Computational Biology and Chemistry, 64, 368-383 (2016), DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2016.08.004

T. Hoshino, K. Matsuo, J. Komano, F. Maeda, M. Takekoshi : Enhancement of the stability of single chain Fv molecules with the amino acid substitutions predicted by high-performance computer, Asia Pacific Biotech News, 20 (8), 32-34 (2016).

S. Fudo, N. Yamamoto, M. Nukaga, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Hoshino : Two distinctive binding modes of endonuclease inhibitors to the N-terminal region of influenza virus polymerase acidic subunit, Biochemistry, 55 (18), 2646-2660 (2016), DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01087.

S. Fudo, N. Yamamoto, M. Nukaga, T. Odagiri, M. Tashiro, S. Neya, T. Hoshino : Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase, Bioorg. Med. Chem. 23, 5466-5475 (2015). DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.046

F. Qi, S. Fudo, S. Neya, T. Hoshino : A

Dominant Factor for Structural Classification of Protein Crystals, J. Chem. Inform. Model. 55(8), 1673-1685 (2015). DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00052

〔学会発表〕(計 6 件)

齊 非、米田 友貴、根矢 三郎、星野 忠次  
タンパク質結晶の初期原子座標の差異性が除去されるのに必要な計算時間  
日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月)

瞿 良、米田 友貴、根矢 三郎、星野 忠次  
タンパク質複合体の構造の予測方法の探索  
日本薬学会第 138 年会(2018 年 3 月)

星野 忠次  
金属原子を活性中心に持つウイルス酵素とその阻害剤開発  
生物無機化学夏季セミナー(2017 年 8 月)

齊 非、米田 友貴、根矢 三郎、星野 忠次  
タンパク質構造の結晶依存性が消失するのに必要な分子動力学シミュレーションの計算時間  
日本薬学会第 137 年会(2017 年 3 月)

瞿 良、米田 友貴、根矢 三郎、星野 忠次  
タンパク質複合体構造の計算予測  
日本薬学会第 137 年会(2017 年 3 月)

近藤 翔太、林 初咲、不動 聡志、額賀 路嘉、米田 友貴、根矢 三郎、星野 忠次  
新規メタロ- -ラクタマーゼ阻害剤における構造活性相関研究  
日本薬学会第 136 年会(2016 年 3 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学大学院薬学研究院薬品物理化学研究室

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 忠次 (HOSHINO, Tyuji)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90257220

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )