

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07549

研究課題名(和文)熱力学情報に基づく多剤排出トランスポーター阻害薬開発のための基盤研究

研究課題名(英文)Basic research on thermodynamics-based drug design of multi drug efflux transporter inhibitors

研究代表者

下野 和実 (Shimono, Kazumi)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：30415187

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)：本研究では、病原菌の多剤耐性化の一因である多剤排出輸送担体EmrEが、多種多様の薬物を認識できる機構を熱力学的に解釈した。EmrEのpH依存的な基質親和性の制御は、水分子が排除されることが主要因であることが明らかとなった。水分子の排除による疎水性相互作用は、基質の種類に依存しないため、排除水分子が多剤認識性に大きく寄与している。排除される水分子を計算科学的手法により解析した結果、結合親和性は、EmrEと強く水素結合した2個の水分子の排除が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の出現と拡散は、人類にとって脅威となっている。病原菌の多剤耐性化の一因である多剤排出輸送担体に強い結合力を持った阻害剤は、既存抗菌薬への耐性化を無効にする。そのため、多剤排出輸送担体阻害剤は、多剤耐性菌感染症に対する有効な治療薬となり得る。多剤排出輸送担体EmrEの多剤認識メカニズムについて熱力学的検討を行った本研究の成果は、合理的医薬品設計において、水分子の排除の重要性を再確認したものである。さらに、強く水素結合した水分子の排除が、基質親和性上昇に有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：EmrE is a multidrug transporter from Escherichia coli that extrudes a wide range of toxic compounds from the cell. We thermodynamically interpreted the multi-drug recognition mechanism. The pH-dependent regulation of substrate affinity of EmrE was found to be the main factor in the exclusion of water molecules. Since the hydrophobic interaction due to the exclusion of water molecules does not depend on the substrate, the excluded water molecules greatly contribute to multi-drug recognition. As a result of analyzing the water molecules by a computational method, it was clarified that the binding affinity is involved in the exclusion of two water molecules strongly hydrogen-bonded to EmrE.

研究分野：生物物理学

キーワード：多剤排出輸送担体 多剤認識機構 エンタルピー-エントロピー補償則 脱水和エントロピー 疎水性相互作用 等温滴定型熱量計 合理的医薬品設計

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬の不適切使用や新規抗菌薬開発の停滞を背景として、薬剤耐性菌の出現と拡散は、人類にとって脅威となっている。病原菌の多剤耐性化の一因として、多様な抗菌薬を細菌外へと排出する多剤排出トランスポーターが挙げられる。多剤排出トランスポーターに強い結合力を持った阻害剤は、既存抗菌薬の排出を阻害し、既存抗菌薬への耐性化を無効にする。そのため、既存抗菌薬との併用により、多剤排出トランスポーター阻害剤は、多剤耐性菌感染症に対する有効な治療薬となり得る。

多剤排出トランスポーターによって排出される薬物は、構造上相関が見られず、あたかも非選択的に薬物を認識しているように見える。近年、多くの多剤排出トランスポーターの立体構造モデルが報告されてきた。立体構造解析からタンパク質分子内に複数の結合部位を持ち、それらの結合部位を組み合わせて基質が結合しているモデル (multi-site model) が提唱されている。しかし多様な基質の結合親和性は様々であり、その定量的解釈はなされていない。すなわち「多剤排出トランスポーターと多様な薬物との結合力の強弱はどのようにして生み出されているのか？」という疑問は十分に明らかにされていない。このことは、多剤排出トランスポーターの合理的医薬品設計の妨げとなり、阻害剤開発の停滞の一因となっていると考えられる。

熱量測定では、立体構造情報は与えないものの結合に伴う熱量変化から、結合親和性やその様式についての情報を得ることができる。多剤排出トランスポーターの多剤認識機構の解明に熱力学量を考慮することで、これまでにない阻害剤の開発につながると考えられる。我々は、研究開始前までに、等温滴定型熱量計を用いた EmrE と基質との相互作用解析から、基質結合の駆動力が pH により変化することを見いだしている。

2. 研究の目的

分子間の結合親和性は、平衡結合定数 (K_a) で定量化される。 K_a は、結合自由エネルギー変化 (G) と関係があり ($G = -RT \ln K_a$, R は気体定数、 T は絶対温度) G は、エンタルピー (H) とエントロピー (S) のバランスで決定される ($G = H - T S$)。 H 効果は、静電相互作用を反映し、 $T S$ 効果は、疎水性相互作用と構造の自由度変化を反映する。一般に H と $T S$ は補償関係にあることが知られている。すなわち H を有利にすると構造が固定され、乱雑さがなくなり $T S$ が不利になるというエンタルピー-エントロピー補償則がはたらく。このため、補償程度により H または S を有利にしたときの G に対する効果が異なることとなる。したがって、基質結合の熱力学特性を知り、立体構造情報と合わせることで、より効率的に結合が強い医薬品を設計できる。

我々は、大腸菌由来の多剤排出トランスポーター (EmrE) の基質多様性とその結合力の違いを生み出す機構を熱力学的に解釈し、新規阻害薬創成へ応用することを目的とし、研究を進めた。EmrE は、110 アミノ酸の小さなタンパク質でありながら、多剤認識能を持っているため、必要最小限の機構を有していると考えられる。そのため、EmrE は、本研究に適したタンパク質の 1 つである。

これまで我々は、EmrE の多剤認識に対する熱力学情報を蓄積し、EmrE の基質結合力は静電相互作用よりも水分子排除が支配的であると推察している。一方、立体構造情報は、原子レベルで基質結合を明らかにできる。さらに計算化学的手法により、水分子排除によるエネルギー利得を含む詳細なメカニズムの議論も可能である。そこで、本研究課題では、これまでの研究を発展させて、熱力学情報、立体構造情報を計算化学的手法により統合的に解釈することで EmrE の多剤認識機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

EmrE は、透析法を用いた大腸菌抽出液由来の無細胞タンパク質合成によって大量合成した。反応液 (透析内液) に 0.4 % w/v ジギトニン (Wako) と 6.7 mg/mL の大腸菌極性脂質 (Avanti) を添加した。反応は、30、6 時間回転震盪することで行った。合成沈殿物を 10 mM TrisHCl pH 6.8、400 mM NaCl、1 % ドデシルマルトシド (DDM, Anatrace) で可溶化後、ニッケル親和性カラムクロマトグラフィー (HisTrap, GE healthcare) にて EmrE を精製した。ITC 測定は、iTC₂₀₀ (MicroCal) を用いた。タンパク質量は、280 nm の吸光度からモル吸光係数 32,430 として見積もった。解析は、付属のソフトウェア (Origin) の ITC One set of site function model を用いた。

(1) EmrE 野生型、D84N 変異体と基質および誘導体結合に伴う熱力学量解析

EmrE 精製試料を 10 mM グリセロール 2 リン酸、0.025% DDM、pH6.5 または pH7.4 に対して一晚透析し、ITC 測定試料を調製した。ITC 測定は、25 °C で行った。EmrE 試料は、10–30 μ M とした。TPP⁺試料は、80 μ M とし、トリフェニルフォスホニウム誘導体 (TPC₁₋₄P) 試料

は、55–666 μM とした。

(2) 計算科学的手法による水分子の解析

水分子の動的解析では、まず、Karplus らの分子動力学計算構造である EmrE 基質非結合型または TPP 結合型構造をもとに、WaterDock プログラムにより結合ポケット内の初期水分子を発生させ、初期構造とした。初期構造に対し、UCSF Chimera を用い、EmrE 内と周囲に水分子を発生させ、1 fs 刻みで 10 ps 計算した。3D-RISM 理論に基づく水分子の解析は、統合計算化学システム MOE (Chemical Computing Group) を用いて行った。解析には、pH5.8 で明らかにされた NMR 構造と pH 6.8 で明らかにされた結晶構造をもとにした分子動力学計算構造を用いた。

4. 研究成果

研究期間内に得た成果は、1) EmrE の pH 依存的結合様式のマカニズム、2) EmrE 基質結合に伴うエントロピー効果の解析、3) 基質結合に伴う排除水分子の特性、である。以下に具体的な内容を記す。

(1) EmrE の pH 依存的結合様式のマカニズム

我々は、既に EmrE の熱力学パラメータの pH 依存性について、pH が高くなると、基質結合の駆動力に対する寄与が、エンタルピーよりもエントロピーの方が大きくなることを明らかにしている。まず、ギブズエネルギー ΔG 、エンタルピー ΔH 、エントロピー項 $T\Delta S$ の pH 依存性について、同時回帰を行った。その結果、この結合駆動エネルギー転換は、 pK_a 6.85 のアミノ酸残基によって引き起こされることが明らかとなった。

一般に H と $T S$ は補償関係にあることが知られている。すなわち H を有利にすると構造が固定され、乱雑さがなくなり $T S$ が不利になるというエンタルピー-エントロピー補償則がはたらく。EmrE の基質結合には pH 依存性があることから、結合自由エネルギー (ΔG_{bind}) のエンタルピー項とエントロピー項の相関プロットを、 pK_a 6.85 としたヘンダーソンハッセルバルヒの式に基づき pH を考慮して解析した。図 1 に示すように回帰直線の傾きから示される構造柔軟性に pH 依存性は見られなかった (pH6.5, 0.80; pH7.4, 0.97)。また、それらの傾きは 1 に近いことから、 ΔH_{bind} の利得は、立体配座エントロピー効果 ($T\Delta S_{\text{conf}}$) の損失でほぼ補償され、 ΔG_{bind} をあまり変化させないと考えられる。一方、切片から示される ΔS_{desolv} は酸性とアルカリ性で大きく異なっていた (pH6.5, 6.6 kcal mol⁻¹; pH7.4, 11.2 kcal mol⁻¹) (図 1)。これらのことから EmrE の pH 依存的な基質親和性の制御には、主に水分子が排除されることによる ΔS_{desolv} 増大に起因していると考えられる。

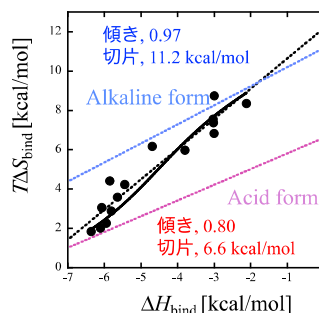


図 1. pH を考慮したエンタルピー-エントロピー補償解析

EmrE には、酸性残基が 3 ヶ所 (Glu14, Glu25, Asp84)、塩基性残基が 5 ヶ所 (Lys22, Arg29, Arg82, Arg106, His110) 存在している。これまでに E14Q、E25Q の解析を行い、Glu25 が基質相互作用の駆動力の pH 依存的変化に関与していることを見いだしたが、Glu25 のみの効果では、説明できないことから、他の残基との協同作用によって基質結合親和性制御が行われていると考えられる。そこで、D84N 変異体を用いた熱力学測定を行った。EmrE は、基質結合に伴いプロトン放出することが知られている。正確な結合熱を算出するために、緩衝液成分を変化させた熱力学量を解析した。 ΔG_{bind} 、 ΔH_{bind} 、 $T\Delta S_{\text{bind}}$ は、それぞれ pH 6.5 では -8.1 kcal/mol、-12.4 kcal/mol、-4.6 kcal/mol であり、pH 7.4 では、-8.6 kcal/mol、-8.5 kcal/mol、-0.12 kcal/mol であった。D84N 変異体では、野生型で見られる基質駆動力の変換が起こらず、pH 7.4 においても基質結合の駆動力は、pH 6.5 と同様にエンタルピーのままであった。したがって、Asp84 の荷電状態が、基質結合の駆動力に寄与していると考えられる。D84N は、エントロピー効果が小さいことから、2 つのモノマーの Asp84 が両方プロトン化すると、構造が固定され、エントロピー損失が大きいと考えられる。また、pH 6.5 で放出プロトン数が 1.73 から 0.89 と減少したことから、内側の Glu25、Asp84 の両方がプロトン化し、構造変化中間体を安定化していると考えられる。この中間体形成時に基質結合の駆動力が転換する。これらの結果から、Asp84 が非電荷状態となると、基質輸送構造変化中間体で固定されると考えられ

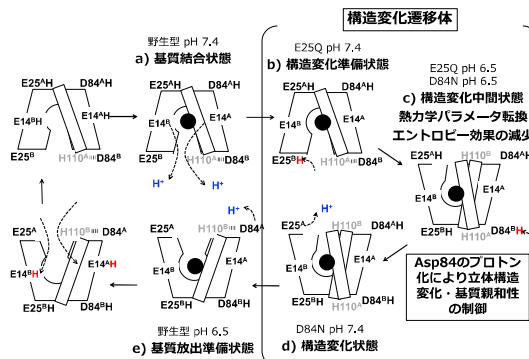


図 2. 変異体の熱力学解析によって得られた EmrE のプロトン共役基質輸送サイクルモデル

る。基質結合駆動エネルギー転換には、基質輸送サイクル中における Glu25 と Asp84 の荷電状態が重要であることを示唆している(図2)。また、報告されている立体構造モデルを考慮すると、Asp84 は His110 との静電相互作用が、基質輸送サイクルにおける EmrE の立体構造変化を制御している可能性がある。

(2) EmrE 基質結合に伴うエントロピー効果の解析

TPP の1つのフェニル基をアルキル基に置換した誘導体 TPC_nP は、アルキル鎖の炭素数の偶奇により水和する水分子の数が異なり、偶奇効果が見られることが知られている。そのため、TPC_nP の熱力学量を比較することにより、水分子の由来を検討することができる。

アルキル鎖長 n を 1 から 4 の TPP 誘導体の EmrE への結合に伴う熱力学量を解析した結果、TPC_nP の S_{bind} には偶奇効果が認められなかった。また、エンタルピー・エントロピー補償則の解析では、アルキル鎖炭素数が 1 の TPMP 以外では、直線で回帰可能であったことから、脱水和エントロピーが等しく排除水分子の数が同じであると考えられる。これらのことから、排除水分子は、基質ではなく、主に EmrE 内部水であると考えられる。内部水分子の排除によるエントロピー利得は、基質の種類に依存しないと考えられる。よって結合ポケット内の水分子は EmrE の多剤認識性に大きく寄与していると推察される。

一方、結合エンタルピー (H_{bind}) に偶奇効果が認められた。EmrE と TPC_nP の結合を予測した結果、TPC_nP の末端メチル基と Phe44 は CH/ 相互作用をしていると考えられ、結合エンタルピーの偶奇効果の主要因であると考えられる。

(3) 基質結合に伴う排除水分子の特性

分子動力学法による水分子の動的解析を行った。基質非結合型構造では、基質結合ポケット内に水分子が 14 個存在していた。一方、基質結合型構造では、水分子数は 8 個であった。したがって、基質結合に伴い、水分子が 6 個排除されると考えられる。次に、基質結合に伴い排除される 6 個の水分子の運動性を解析した。その結果、運動性が低く強固に結合していると考えられる水分子が 2 個見つかった。この 2 個の水分子はともに、基質結合やプロトン輸送に重要である Glu14 と水素結合していた。このため、水分子が排除される際のエントロピー利得が大きいと考えられる。疎水性相互作用は、基質の種類に比較的依存しないと考えられるため、水分子は多剤認識に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、Glu14 と水素結合した 2 個の水分子が、EmrE の結合親和性に大きく寄与していると考えられる。

3D-RISM 理論により EmrE と基質が結合する際に排除される水分子の解析を行った。pH5.8 で明らかにされた NMR 構造を鋳型とした場合、基質結合やプロトン輸送に重要である Glu14 と強固に結合していると考えられる水分子のうち、3つの水分子が排除されると推察された。一方、pH6.8 で明らかにされた結晶構造をもとにした計算構造を鋳型とした場合、2つの Glu14 付近の 6 個の水分子が排除される可能性があることを明らかにした。この違いが、pH 依存的なエントロピー効果に関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyamoto Shuichi, Shimono Kazumi	4. 巻 25
2. 論文標題 Molecular Modeling to Estimate the Diffusion Coefficients of Drugs and Other Small Molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25225340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Omori Akiko, Fujisawa Yuki, Sasaki Shotaro, Shimono Kazumi, Kikukawa Takashi, Miyauchi Seiji	4. 巻 44
2. 論文標題 Protonation State of a Histidine Residue in Human Oligopeptide Transporter 1 (hPEPT1) Regulates hPEPT1-Mediated Efflux Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 678 ~ 685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-01013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Shuichi, Shimono Kazumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Estimation of the Diffusion Coefficients of Small Molecules by Diffusion Measurements with Agar-gel and Theoretical Molecular Modeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem-Bio Informatics Journal	6. 最初と最後の頁 13 ~ 20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1273/cbij.22.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下野 和実, 染谷 友美, 白水 美香子, 横山 茂之, 宮本 秀一, 宮内 正二
2. 発表標題 大腸菌多剤排出トランスポーターEmrEにおける基質結合駆動エネルギーのpH依存的転換メカニズム
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下野和実, 宮本秀一, 宮内正二
2. 発表標題 大腸菌多剤排出トランスポーターEmrEの基質結合における水分子の役割
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下野和実, 宮本秀一
2. 発表標題 分子動力学法による多剤排出トランスポーターEmrEの基質結合における水分子の動的解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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

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