

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06071

研究課題名（和文）糖非発酵グラム陰性細菌のペプチド代謝機構を標的とした創薬研究

研究課題名（英文）Drug discovery research targeting the mechanism of peptide metabolism in sugar non-fermenting Gram-negative bacteria

研究代表者

阪本 泰光（Sakamoto, Yasumitsu）

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：00349036

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）：本研究により、多剤耐性菌対策に寄与する新たな作用機序による抗菌薬開発に結びつく成果が得られた。

我々は、神戸大学、新潟大学、長岡技術科学大学、北里大学、JAXAらとの共同研究により、ペプチドを栄養源とする糖非発酵性グラム陰性細菌である多剤耐性菌由来DPP7のS2サブサイトの認識機構解明など、SBDDに必要な標的分子の立体構造と化合物の相互作用に関する研究を進めてきた。本研究では、前身研究により得られたリード化合物からSBDDによる化合物構造の最適化を進め、多剤耐性菌や歯周病菌の増殖を阻害する化合物を見出すことに成功し、特許を出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開発により、ペプチドを栄養源とする糖非発酵性グラム陰性細菌に特有なペプチド分解酵素であるS46 DPPを標的とする阻害剤が実際に抗菌効果を示すことを証明できた。このことは、S46 DPPを有する多剤耐性菌や歯周病菌などの病原菌に対する新たな治療手段を提供し、薬剤耐性により既存抗菌薬が効かなくなった場合に必要となる新規作用機序の抗菌薬へと結びつく持続可能な社会をみざすSDGsにとっても重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：In this research, we led to the development of antimicrobial agents with new mechanisms of action that contribute to the treatment of infections caused by certain multidrug-resistant bacteria. In collaboration with Kobe University, Niigata University, Nagaoka University of Technology, Kitasato University, JAXA, and others, we have been studying the crystal structure of target molecules and compound interactions required for SBDD, including the recognition mechanism of the S2 subsite of DPP7 from multidrug-resistant bacteria, which are sugar non-fermentative gram-negative bacteria that use peptides as a nutrient source. We have been conducting research on the crystal structure of target molecules and compound interactions required for SBDD. In this study, we advanced compound design by SBDD and succeeded in finding the compounds that inhibit the growth of certain multidrug-resistant bacteria and periodontal disease bacteria and patent application was filed.

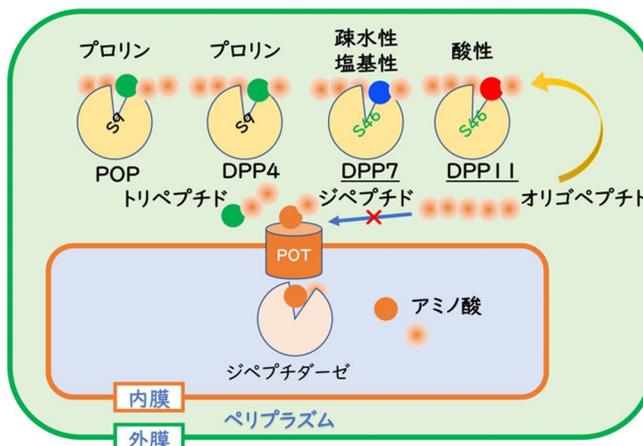
研究分野：構造生物学

キーワード：薬剤耐性 DPP NFGNB 糖非発酵 歯周病 多剤耐性 微小重力

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、糖非発酵グラム陰性菌(NFGNR)がペプチドを栄養源とする仕組みに興味を持ち、その仕組みを利用した新しい作用機序による抗菌薬の開発を進めている。

既存抗菌薬の作用は主に、細胞壁合成阻害、タンパク質合成阻害、細胞膜障害、核酸合成阻害、葉酸合成阻害に分類されるが、これまでに NFGNR のペプチド代謝機構の分子群(DPP, プロトン共役型オリゴペプチド輸送体(POT)など)を標的とする抗菌薬はない。多剤耐性菌の *Stenotrophomonas maltophilia*(Sm) や歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis*(Pg)などの

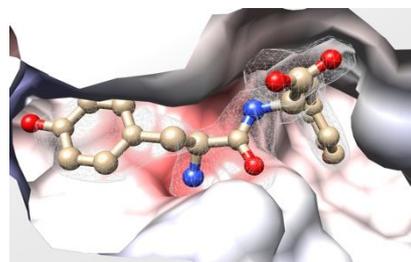


NFGNR では、S46 DPP の DPP7 や DPP11 がその増殖に重要である(右上図)。研究開始当初の 2020 年 10 月現在で、ペプチダーゼデータベース MEROPS に 540、2024 年 6 月現在で 1028 の S46 DPP が登録されている。研究代表者等は、前身研究において DPP7 及び DPP11 に対する阻害化合物を、その立体構造情報に基づく創薬(SBDD)を用い、探索、最適化及び合成を進めてきた。そして、Sm, Pg の各 DPP7 を標的とし設計した化合物について、抗菌活性及びヒト細胞に対する毒性を評価し、抗菌作用を有するリード化合物を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに取り組んでいた S46 DPP 阻害剤の研究を発展させ、阻害化合物を活用した種々の実験によって NFGNR のペプチド代謝系全体の理解を進め、細菌選択性を有し、副作用及び細胞毒性の低い抗菌薬開発を目指す。

これまで、研究代表者等は、NFGNR のペリプラズムに存在する S46 DPP の立体構造を世界で初めて明らかにし、そのジペプチド単位での切断及び基質認識機構を分子レベルで解明した。その後、多剤耐性菌類縁菌 Pm 及び多剤耐性菌 Sm 由来 DPP7 のジペプチド複合体構造(右図)に基づいて、前述した DPP7 を標的とするリード化合物の創出に結びついた。また、微生物 S9 DPP である多剤耐性菌

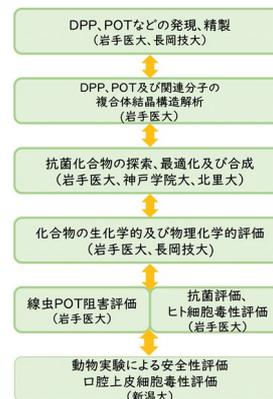


SmDPP7 ジペプチド複合体の結晶構造

類縁菌 DPP4 の構造を明らかにし、微生物 DPP4 とヒト DPP8/9 の類似性を示し、副作用の少ない化合物開発に関する構造的知見を得た。そして、歯周病菌 PgDPP11 の化合物複合体構造に基づき、歯周病菌由来 PgDPP11 を標的とする抗菌リード化合物を見出した。これら微生物 DPP 及び阻害化合物に関する構造生物学研究は、微生物 DPP の機能解明のみならず、NFGNR のペプチド取り込みの分子機構の全体像の解明に結びつく成果であり、学術的独自性、創造性を兼ね合わせている。

そこで、本研究では、構造生物学の手法を中心に、生化学、物理化学及び実験動物といった研究手法を有機的に連携して研究を進めた。（右：研究内容模式図及び下部項目）これまでに DPP7, DPP11 を標的分子として探索、設計及び合成した化合物は 100 種以上ある。これらの化合物で DPP 阻害活性があるものについて、物理化学的評価(ITC) 結晶構造解析 抗菌評価 細胞毒性評価を実施する。

本研究では、既存化合物とともに化合物最適化のサイクルを回し、NFGNR への選択性を持つ新規抗菌薬を創出することを目的とした。



3. 研究の方法

1. 抗菌化合物の設計、最適化及び合成、評価

Sm 及び Pg の DPP7, DPP11 と種々の化合物複合体の構造を明らかにし、その酵素阻害活性、抗菌効果、物理化学的性質から化合物構造の最適化を進めた。

2. ペプチドトランスポータに対する評価

線虫由来の PepT に対する蛍光基質の輸送性の阻害評価を行った。

3. 動物実験での有効性評価、細胞毒性評価

Pg 感染歯周病モデルを用いて、有効性及び毒性評価を実施した。

4. 研究成果

研究開始当初は、NFGNR に存在する 2 種類の S46 DPP である DPP7 と DPP11 の両方の阻害が抗菌活性に必要なだと考えていたが、抗菌評価を行ったところ、DPP7 ものみの阻害物質でも既存抗菌薬と同程度の MIC (最小発育阻止濃度) での効果があることが明らかとなった。また、DPP の遺伝子破壊株は、致死的でないため、これら DPP を標的とする化合物は静菌的な効果を持つと考えていたが、殺菌的な効果を有するもの、Sm と Pg での選択性を示すもの、ヒト細胞に対する毒性の有無に違いのある化合物があり、これらの化合物から、微生物 DPP7 に対する選択的な阻害化合物を開発し「ペプチド型細菌ジペプチジルペプチダーゼ 7 阻害剤」を開発し、2023 年に特許権を取得した (特許 第 7228828 号)。そして、その後、この特許化合物をベースとして、 IC_{50} が $1\sim 3\mu\text{M}$ で、歯周病菌及び多剤耐性菌に対して**選択的抗菌・殺菌効果を有し、細胞毒性および動物有害性のない化合物を開発し、「抗菌性ジペプチド化合物」の特許を 2022 年に出願した (特願 2022-110510)**。

殺菌効果を有することから、これらの抗菌化合物がペプチドトランスポータに対して、作用する可能性を考慮して、ペプチドトランスポータに対する評価を実施したが、有意に阻害している抗菌化合物は見出されなかったため、ペプチドトランスポータとの複合体構造の解析は実施しなかった。

今後は、微生物 DPP7 阻害化合物の構造最適化、実用化に向けた大量合成、投与方法の検討等を実施する必要がある。また、微生物 DPP11 に対する選択的な阻害化合物を発見し、既存抗菌薬のモル濃度の 10 倍程度で抗菌活性を有することを確認したことから、微生物 DPP11 に対する阻害化合物の構造最適化等を進め、微生物 DPP7 および微生物 DPP11 阻害化合物の抗菌薬等としての実用化を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakamoto Y., Roppongi S., Nakamura A., Tanaka N.	4. 巻 2021 #39
2. 論文標題 X-ray crystallographic analysis of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DPP7	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report 2021, #39, Part B	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Nakamura Akihiro, Suzuki Yoshiyuki, Sakamoto Yasumitsu, Roppongi Saori, Kushibiki Chisato, Yonezawa Natsuri, Takahashi Masato, Shida Yosuke, Gouda Hiroaki, Nonaka Takamasa, Tanaka Nobutada, Ogasawara Wataru	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural basis for an exceptionally strong preference for asparagine residue at the S2 subsite of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> dipeptidyl peptidase 7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86965-x	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 阪本泰光, 日高興士, 石原 司, 中村彰宏, 鈴木義之, 關谷瑞樹, 六本木沙織, 小笠原 渉, 田中信忠	4. 巻 35
2. 論文標題 多剤耐性菌及び歯周病菌感染症の治療を目指した新たな作用機序による抗菌薬の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本放射光学会誌	6. 最初と最後の頁 88-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 阪本泰光	4. 巻 59
2. 論文標題 タンパク質の立体構造予測は、化合物設計に役立つか？	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.59.5_433	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 阪本泰光	4. 巻 47
2. 論文標題 新型コロナウイルス(SARS-CoV2)の 治療薬開発における構造生物学	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 医薬品相互作用研究	6. 最初と最後の頁 8-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kikuchi S, Wada A, Kamihara Y, Okazaki K, Jawaid P, Rehman MU, Kobayashi E, Susukida T, Minemura T, Nabe Y, Iwao N, Ozawa T, Hatano R, Yamada M, Kishi H, Matsuya Y, Mizuguchi M, Hayakawa Y, Dang NH, Sakamoto Y, Morimoto C, Sato T.	4. 巻 12
2. 論文標題 DPP8 Selective Inhibitor Tominostat as a Novel and Broad-Spectrum Anticancer Agent against Hematological Malignancies.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12071100	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10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阪本泰光
2. 発表標題 糖非発酵性微生物由来DPPを標的とするペプチド系抗菌化合物の開発
3. 学会等名 神戸学院大学第5回三学部合同研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阪本泰光
2. 発表標題 宇宙空間で広がる創薬の可能性
3. 学会等名 第20回 Link - J オンライン・ネットワーキングトーク（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪本泰光
2. 発表標題 微生物DPPの構造から創薬へ
3. 学会等名 フォーラム富山（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koushi Hidaka, Yuko Tsuda, Mizuki Sekiya, Yasumitsu Sakamoto, Saori Roppongi, Akihiko Nakamura, Yoshiyuki Suzuki, Wataru Ogasawara, Nobutada Tanaka
2. 発表標題 Combination study of partial structures in Phe-Tyr derivatives for antibacterial activity against <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪本泰光、中村彰宏、鈴木義之、六本木沙織、榎引千里、米澤夏里、高橋聖人、志田洋介、合田浩明、野中孝昌、田中信忠、小笠原渉
2. 発表標題 多剤耐性菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DPP7 に対する抗菌薬開発に向けた阻害剤開発の構造基盤
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪本泰光
2. 発表標題 「宇宙環境を利用したペプチド分解酵素を標的とする新規抗菌薬の開発」
3. 学会等名 第11回物理分析系若手研究者セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阪本泰光
2. 発表標題 「宇宙医学マンスリーウェビナー2023」
3. 学会等名 宇宙医学ユースコミュニティ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sakamoto Y, Nakamura A, Suzuki Y, Roppongi S, Kushibiki C, Yonezawa N, Takahashi M, Shida Y, Gouda H, Nonaka T, Ogasawara W, Tanaka N.
2. 発表標題 A water-mediated hydrogen bond network facilitates an exceptionally strong preference for asparagine in the S2 subsite of dipeptidyl peptidase 7 from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3. 学会等名 第26回国際結晶学連合会議 IUCr 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村彰宏, 阪本泰光, 鈴木義之, 六本木沙織, 志田洋介, 田中信忠, 小笠原涉
2. 発表標題 病原性細菌由来ジペプチジルペプチダーゼのS2サブサイト特異性の構造的基盤
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日高興士, 宮崎杏奈, 北條恵子, 津田裕子, 櫛引千里, 六本木沙織, 阪本泰光, 關谷瑞樹, 中村彰宏, 鈴木義之
2. 発表標題 ステノトロフォモナス・マルトフィリアのDPP7を阻害するジペプチド抗菌剤の創製
3. 学会等名 第26回日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗菌性ジペプチド化合物	発明者 日高興士、野中由香莉、多部田康一、阪本泰光、關谷瑞樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-110510	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	日高 興士 (Hidaka Koshi) (30445960)	神戸大学・研究基盤センター・特命技術員 (14501)	
研究協力者	野中 由香莉 (Nonaka Yukari) (40710520)	新潟大学・歯学部・講師 (13101)	
研究協力者	中村 彰宏 (Nakamura Akihiro) (50983988)	長岡技術科学大学・工学部・助教 (13102)	
研究協力者	關谷 瑞樹 (Sekiya Mizuki) (70509033)	岩手医科大学・薬学部・准教授 (31201)	
研究協力者	田中 信忠 (Tanaka Nobutada) (00286866)	北里大学・薬学部・教授 (32607)	
研究協力者	錦織 健児 (Nishikori Kenji) (20563844)	岩手医科大学・薬学部・助教 (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	多部田 康一 (Tabeta Koichi) (20401763)	新潟大学・歯学部・教授 (13101)	

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