

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0141

研究課題名（和文）改変型プレニル基転移酵素による新規抗菌活性分子探索法の開発

研究課題名（英文）Identification of novel antibacterial compound produced by artificial prenyltransferase.

研究代表者

松井 崇（Matsui, Takashi）

北里大学・理学部・講師

研究者番号：30463582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：プレニル基転移酵素によってイソプレニユニット（プレニル基）を転移・付加された化合物は修飾前の母骨格にはない抗寄生虫、抗腫瘍等の生物活性を獲得することがある。そこで、基課題ではインドールに対してプレニル基を転移するインドールプレニル基転移酵素（IPT）に着目し、その構造・機能解析と機能改変を進めてきた。本研究では、さらに、IPTから得られた化合物から、電子顕微鏡および質量分析計を用いて、細菌の細胞分裂を抑制する化合物の探索およびその分子機序の解明のための新規抗菌活性分子の探索法の構築を目指し、微量な試料量でも標的蛋白質分子の構造変化を検出可能となる測定系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の細胞分裂に關するFtsZは、既存の細菌感染症治療ターゲットと異なることから、新規標的分子として注目されている。代表者の先行研究ではFtsZに対する阻害活性分子の阻害活性機序を明らかにし、また、人工酵素による機能性化合物も創出してきた。そこで、本研究では、新規創出化合物からFtsZの活性を阻害する分子の探索系の確立を目指した。その結果、標的蛋白質分子の構造様式の変化を検出を可能とする測定・解析手法を確立できた。今後は、細胞分裂過程で立体構造変化を生じるFtsZに対し化合物を添加することで構造様式がどのように促進・抑制・変化するか検出し、さらなる阻害分子の導出と阻害機序の解明を目指す。

研究成果の概要（英文）：Some secondary metabolites derived from Streptomyces show a wide variety of the biological activity, such as antiparasitic and antitumor. During a previous project, we got novel compounds produced by artificial enzymes based on indole prenyltransferase. In the other project, we determined the complex crystal structure of FtsZ, which is a critical role for bacterial cell division, with compound and revealed its inhibitory mechanism as well. Therefore, in this study, to evaluate the anti-FtsZ activity of the novel compounds, we used electron microscopy and LC-MS/MS, resulting that we developed a novel measurement procedure for identification of protein state using LC-MS/MS.

研究分野：構造生物学

キーワード：FtsZ プレニル基転移酵素 電子顕微鏡 LC-MS

1. 研究開始当初の背景

プレニル基転移酵素によってプレニル基供与基質よりイソプレニユニット (プレニル基) を転移・付加された化合物は修飾前の母骨格にはない抗寄生虫 (artemisinin), 抗腫瘍 (paclitaxel) などの生物活性を獲得できる場合がある。そこで、基課題ではインドールに対してプレニル基を転移するインドールプレニル基転移酵素 (IPT) に着目し、その構造・機能解析と機能改変を進めてきた。

一方申請者は、基課題とは別に、これまで細菌の細胞分裂に必須な蛋白質で、新たな抗菌標的分子として着目されている FtsZ の構造・機能解析および、その阻害分子探索研究を行ってきた。FtsZ は GTP 結合により自己重合し直線型のフィラメント (原線維) を形成する (図 1)。さらに、FtsZ が持つ GTPase により GDP へ加水分解する過程で直線型原線維は湾曲化し、細胞分裂の最終段階で脱重合することで、細胞分裂を制御している。したがって、FtsZ の重合・乖離阻害作用を持つ化合物は細胞分裂を抑制する新たな抗菌活性分子となる可能性を秘めている。これまで、申請者は、黄色ブドウ球菌 FtsZ から、直線型原線維を形成する Tense 型 FtsZ、湾曲化後や脱重合後の構造と考えられている Relax 型 FtsZ 構造の立体構造解析と、両構造間に構造遷移があることを初めて明らかにしてきた (Matsui et al., (2015) J. Biol. Chem.)。また、Tense 型構造には FtsZ の脱重合を抑制する化合物が結合するポケットが存在することを FtsZ-化合物との複合体 X 線結晶構造解析で明らかにしてきた (Matsui et al., (2012) Acta Cryst. D)。さらに、このポケットに結合すると考えられる、天然有機化合物を薬用植物である甘草より抽出し同定することにも成功している (Matsui et al., (2017) Bioorg. Med. Chem. Lett.)。

申請者が同定した化合物を含むこれまでの FtsZ に対する阻害活性分子探索の多くは、GTPase 活性阻害、重合による分子サイズの変化を動的な光散乱等で観測、または、低分解能な電子顕微鏡で原線維形成の阻害や変質を観測することでその阻害活性機構を議論していた。しかし、電子顕微鏡像で原線維形成の変化が観測される化合物であっても、上述した FtsZ-化合物複合体の結晶構造解析などいくつかの特殊な例を除いて原子分解能での複合体構造は得られていない。その結果、なぜこれらの阻害活性分子が FtsZ の機能を阻害するのか？その分子機構を詳細に明らかにできておらず、画期的な阻害活性分子の設計・導出には至っていない。

そこで、本課題では、X 線結晶構造解析に劣らない分解能で構造解析可能となり、また、結晶が得られない場合でも構造解析可能な手法であるクライオ電子顕微鏡 (CryoEM) による単粒子構造解析等の技術を用いた、FtsZ に対する新規な阻害活性分子探索法の構築を目指した。

2. 研究の目的

本課題では、基課題で合成される新規分子の機能性評価や種々の有機化合物や、さらに、ペプチド性化合物を対象に、CryoEM による線維性分子の構造解析技術を用いて、FtsZ に対する新規な阻害活性分子探索法の構築を目指した。特に、これまで知られている多くの FtsZ の阻害活性分子は FtsZ との複合体結晶は得られていない。一方、ウラン染色透過型電子顕微鏡 (NSEM) による解析ではこれらの化合物を添加することで FtsZ 繊維構造に変化が見られることがわかっている。したがって、電子顕微鏡による FtsZ 線維構造の構造解析が可能となれば、阻害活性分子の阻害活性機構をより詳細に明らかにすることも可能となる。特に、CryoEM による単粒子構造解析では、観測された粒子を 1 つ 1 つ解析し、同一粒子種と思われる画像を平均化して抽出できるため、原線維中の阻害剤が結合した FtsZ 分子に該当する平均画像を解析することで阻害剤の結合様式を明らかにする、新たな阻害活性分子探索法へと応用することが可能となる。

3. 研究の方法

はじめに、電子顕微鏡による観測に適した FtsZ 試料の調製方法は NSEM を用いて検討した。また、FtsZ のクライオ電子顕微鏡に解析には、フィラメント状繊維に対する単粒子解析など、粒子性の蛋白質で一般的に行われている単粒子構造解析より技術的に困難な手法を用いる必要がある。そこで、まず、いくつかの粒子性のモデル蛋白質を用いて、現在広く行われている粒子性分子に対する単粒子構造解析方法、具体的には、NSEM 解析による単粒子構造解析および、CryoEM による観測・単粒子構造解析を行った。

また、新規阻害性分子の取得に向け、基課題で取り扱っている IPT を用いて生成化合物を調製し、HPLC を用いて単離した。さらに、予め FtsZ の重合線維化に影響を及ぼす化合物であることを推定するため、微量測定可能な分析機器であるナノフロー LC-MS/MS を用い、化合物添加に

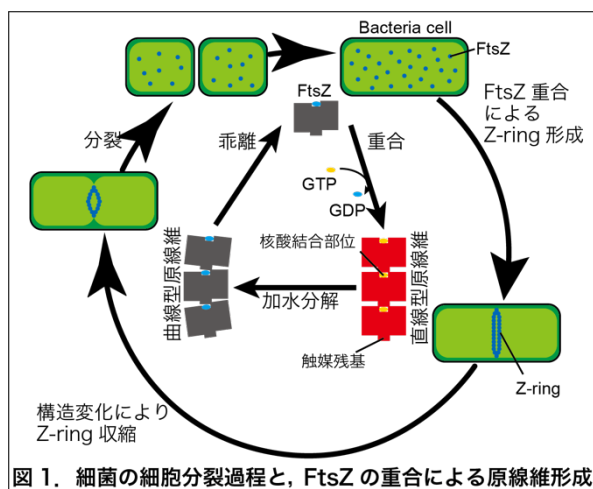


図 1. 細菌の細胞分裂過程と、FtsZ の重合による原線維形成。

よる FtsZ の構造状態の変化を捉える測定系の確立を行った。

4. 研究成果

FtsZ は GTP と混合することで原線維を形成するがその後 FtsZ の持つ GTPase 活性により結合分子が GDP へと変化し、GDP への加水分解に伴って構造変化・脱重合を引き起こす。そのため、FtsZ が安定に線維構造を形成する条件を検討した。その結果、図 2 に示すような線維構造を安定的に調製し、NSEM で観測することに成功した。

次に、CryoEM による観測・単粒子構造解析法を取得するため、いくつかのモデル蛋白質について、構造解析を行った。その結果、巨大蛋白質会合体の立体構造解析に成功した (Tanaka et al., (2019) IUCrJ)。また、分子量 150kDa の蛋白質の NSEM 画像から単粒子構造を解析し、約 20Å 分解能の構造が得られる試料調製・測定条件を決定した。現在、CryoEM による解析・単粒子構造を解析中である。また、共同研究先であるマックス・プランク分子生理学研究所で開発している CryoEM 画像から粒子を抽出するソフトウェア (cryolo) や単粒子構造解析ソフトウェア (SPHIRE) また、デファクトスタンダードである単粒子構造解析ソフトウェア (relion) およびそれらを解析可能なハードウェア環境を帰国後に研究室に導入・移植することに成功した。

次に、阻害活性分子の調製・探索を進めた。阻害活性分子評価のスクリーニングとして CryoEM を利用することは現状の国内配備数では難しく、阻害活性分子による FtsZ 重合線維の形成変化が確実に認められる試

料に対してのみ CryoEM 測定を実施する必要がある。そこで、あらかじめ、FtsZ の自己重合線維化を検出可能な測定系の確立を目指した。しかし、IPT による調製で得られる化合物試料量はこれまでの酵素反応実験から、極微量となることが予想された (図 3)。また、FtsZ に阻害反応を示す化合物の多くは水溶液に溶けにくく、アッセイに用いることができる濃度が低い。また、一般的に、線維化の観察には動的光散乱などを用いるが、使用できる化合物濃度が低いために変化が検出できない可能性がある。そこで、nM 程度のより微量試料に対しても自己重合線維化を検出可能な測定系を確立するために、ナノフロー LC-MS/MS を用いた。まず、モデル試料の試料状態の違いを比較解析するための測定系を構築した。その結果、参照タンパク質と比較対象タンパク質にそれぞれ異なる安定同位体元素を有するホルムアルデヒド (軽ホルムアルデヒド、 ^{13}C , ^2H 標識重ホルムアルデヒド) で修飾し、参照タンパク質と比較対象タンパク質を混合して一度に LC-MS/MS 分析することで、同一ペプチド断片の軽ホルムアルデヒド修飾および重ホルムアルデヒド修飾の信号強度比ら、高精度に試料の存在状態を比較解析可能な分析計の確立に成功した (Konno et al., (2021) Biophys. Biochem. Res. Commun.)。今後は、この評価系を用いてあらかじめ FtsZ と化合物との構造状態をスクリーニングしたのち、NSEM や CryoEM による化合物の FtsZ 原線維の重合・脱重合阻害機構を明らかにする。

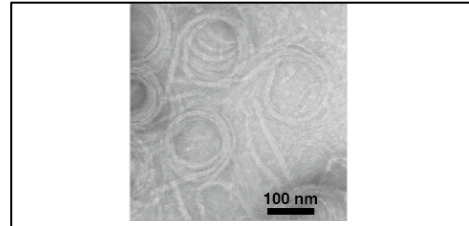
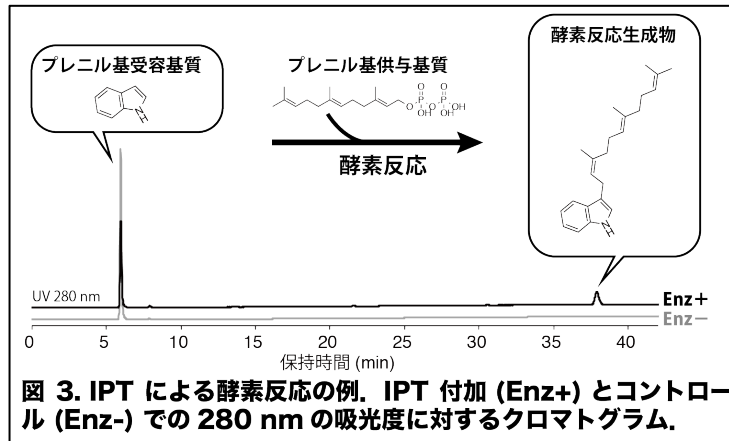


図 2. 化合物を混合した FtsZ の線維構造。曲線状に存在するものが FtsZ 繊維。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hashimoto Tsubasa, Ye Yuxin, Ui Mihoko, Ogawa Tomohisa, Matsui Takashi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 514
2. 論文標題 Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 31 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.062	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 Yano Shigekazu, Suyotha Wasana, Oguro Natsuki, Matsui Takashi, Shiga Shota, Itoh Takafumi, Hibi Takao, Tanaka Yoshikazu, Wakayama Mamoru, Makabe Koki	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of GH 87-type α -1,3-glucanase AgI-KA from <i>Bacillus circulans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51822-5	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 該当する
1. 著者名 松井 崇、加藤 早苗、田中 良和	4. 巻 92
2. 論文標題 クライオ電子顕微鏡で明らかになった超巨大酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの会合構造	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 113 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920113	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 松井 崇、加藤 早苗、田中 良和	4. 巻 61
2. 論文標題 クライオ電子顕微鏡で明らかになったスルメイカヘモシアニン (TpH) の立体構造	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本結晶学会誌	6. 最初と最後の頁 211 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5940/jcrsj.61.211	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 Hashimoto Tsubasa, Ye Yuxin, Matsuno Asuka, Ohnishi Yuki, Kitamura Akira, Kinjo Masataka, Abe Satoshi, Ueno Takafumi, Yao Min, Ogawa Tomohisa, Matsui Takashi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 509
2. 論文標題 Encapsulation of biomacromolecules by soaking and co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 577 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/J.BBRC.2018.12.096	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 Matsui Takashi, Kamata Shizuka, Ishii Kentaro, Maruno Takahiro, Ghanem Nouran, Uchiyama Susumu, Kato Koichi, Suzuki Atsuo, Oda-Ueda Naoko, Ogawa Tomohisa, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 9
2. 論文標題 SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38861-8	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 Tanaka Yoshikazu, Kato Sanae, Stabrin Markus, Raunser Stefan, Matsui Takashi, Gatsogiannis Christos	4. 巻 6
2. 論文標題 Cryo-EM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 426 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S205225251900321X	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 該当する

1. 著者名 Konno Ryo, Matsui Takashi, Ito Hiroaki, Kawashima Yusuke, Itakura Makoto, Kodera Yoshio	4. 巻 550
2. 論文標題 Highly accurate and precise quantification strategy using stable isotope dimethyl labeling coupled with GeLC-MS/MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 37 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.101	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 Nakagawa Yuzuru, Matsui Takashi, Konno Ryo, Kawashima Yusuke, Sato Toshiya, Itakura Makoto, Kodera Yoshio	4. 巻 548
2. 論文標題 A highly efficient method for extracting peptides from a single mouse hypothalamus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.041	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 加藤 早苗、松井 崇、田中 良和	4. 巻 90
2. 論文標題 3.8?MDaの超巨大酸素運搬タンパク質ヘモシアニン会合体の結晶構造	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 238 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900238	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12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松井崇, 鎌田しずか, 石井健太郎, 丸野孝浩, Ghanem Nouran, 内山進, 加藤 晃一, 鈴木淳巨, 上田直子, 小川智久, 田中良和
2. 発表標題 包括的な物性解析によって見えてきたハブ毒蛋白質のSDSによる多量体化
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田貴樹, 紺野亮, 板倉誠, 松井崇, 小寺義男
2. 発表標題 脳の機能状態モニタリングを目指した脳脊髄液の詳細な比較分析への取り組み
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川謙, 山田拓也, 佐藤雅, 松井崇, 板倉誠, 岩淵和也, 小寺義男
2. 発表標題 マウスの小腸・大腸を対象としたペプチドーム解析の基礎的検討
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤大晃, 紺野亮, 福井朋也, 松井崇, 長塩亮, 佐藤雄一, 小寺義男
2. 発表標題 安定同位体標識法とGeLC-MS/MS法を組み合わせたタンパク質存在様式の比較分析法の確立と応用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井崇, 加藤早苗, 田中良和
2. 発表標題 スルメイカヘモシアニンの構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会令和元年度年会および会員総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紺野亮, 伊藤大晃, 樋口雅崇, 松井崇, 佐藤俊哉, 板倉誠, 小寺 義男
2. 発表標題 水中拘束ストレスマウスの大脳皮質を対象とした包括的なタンパク質存在様式の比較分析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山大夢, 小野寺かこ, 松井崇, 小川智久, 田中良和
2. 発表標題 S-SAD法を利用した海洋生物由来タンパク質の構造解析
3. 学会等名 2019年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井崇, 鎌田しずか, 石井健太郎, 丸野孝浩, ガーネムノーラン, 内山進, 加藤晃一, 鈴木淳臣, 上田直子, 小川智久, 田中良和
2. 発表標題 ホスホリパーゼA2アナログの立体構造解析とSDSによる多量体化
3. 学会等名 2018年度量子ビームタイムサイエンスフェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本翼, 松井崇, 小川智久, 田中良和
2. 発表標題 蛋白質結晶中の巨大な空隙への蛋白質の包摂
3. 学会等名 2018年度量子ビームタイムサイエンスフェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山大夢, 小野寺かこ, 松井崇, 小川智久, 横山武司, 田中良和
2. 発表標題 新規レクチン用タンパク質の結晶構造解析と糖との結合解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝木泰司, 中澤光, 松井崇, 田中良和, 梅津光央
2. 発表標題 そのエピトープは創薬標的と成り得るか?:天然蛋白質の相互作用情報を利用したツール抗体設計
3. 学会等名 第51回化学工学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本翼, 松井崇, 小川智久, 田中良和
2. 発表標題 蛋白質を包摂可能な新規ホスト分子としての多孔性蛋白質結晶の利用
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kato Sanae, Matsui Takashi, Tanaka Yoshikazu	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 24
3. 書名 Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北里大学理学部物理学科教員個人ページ https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/seitai/matsui/ 東北大学生命科学研究科応用生命分子解析分野 https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/labmos/ 北里大学若手lab https://sites.google.com/view/wakatelab/main/past_events4?authuser=0 北里大学理学部セミナー https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/research/seminar/sci_res_s_2019_10.html 新着情報 https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/univ/physics/news/n20210301.html 新着情報 https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/univ/physics/news/n20210308.html 北里大学理学部物理学科特設HP「宇宙から生命へ」 https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/phys_sp/index.html</p>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ガトギアニス クリストス (Gatsogiannise Christos)	マックスプランク分子生理学研究所・Structural Biochemistry・Project Group Leader	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ラウンザー ステファン (Raunser Stefan)	マックスプランク分子生理学研究所・Structural Biochemistry・Director	

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		
ドイツ	マックスプランク分子生理学研究所		