

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07909

研究課題名(和文)新規標的タンパク質の構造解析に基づく新たな抗結核薬の創製

研究課題名(英文)Origination of antibiotic drugs for tuberculosis based on the structural analyses of novel target proteins

研究代表者

山下 沢 (YAMASHITA, Taku)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398246

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)：抗結核菌作用を示すAgelasine Dの標的タンパク質BCG3185cに対し、単結晶の作製に成功し、X線結晶構造解析に成功した。一方、Agelasine DとBCG3185cとの共結晶化は困難であったため、単結晶として得られた構造に対してドッキングシミュレーションによって結合様式に関する情報を計算化学によって得た。また、その結果を受け、Agelasine Dの結合に影響を及ぼし得る二種の変異体を作製する段階まで至った。一方、新たな標的タンパク質BCG2664のクローニングにも成功し、その高純度での獲得にも成功した。

研究成果の概要(英文)：BCG3185c is a novel protein from M. Tuberculosis, and the protein is emerged to be a target of Agelasine D. Agelasine D is derived from Marine sponge and shows inhibition to a tubercle bacillus. In order to clarify mechanism of the inhibition, we performed purification and X-ray crystallographic analysis on BCG3185c protein. Although co-crystallization of BCG3185c and Agelasine D was extremely difficult, we succeeded to acquire structural information on BCG3185c protein without Agelasine D. Subsequently, we performed docking simulation on Agelasine D to BCG3185c, and the results suggested that several aromatic amino acids in BCG3185c could be critical for binding of Agelasine D.

While, we have been exploring other target protein for Helicyclamine A, an antibiotic for tuberculosis, and BCG2664 was identified to be a candidate applied for tuberculosis. Finally, we could establish a protocol for purification of BCG2664 protein.

研究分野：物理系薬学

キーワード：結核菌 抗結核薬 構造解析 ドッキングシミュレーション

1. 研究開始当初の背景

日本において、BCG ワクチンをはじめとした医療の発達により、結核は一昔前ほどの死亡率の高い感染症ではなくなった。しかしながら、現在でも年間で二万人ほどの新規感染者が増えていることや、現在の抗菌薬には耐性を有する結核菌の存在も報告されていることから、新たな抗結核薬の創製は社会的ニーズの高い研究である。国内外で多くの研究がなされている中、2014年にAraiらは、海綿から単離したAgelasine Dという化学物質が、結核菌に対して抗菌活性を示すことを見出した。また、BCG3185cというタンパク質の過剰発現株に有意に違いが見られたことなどから、Agelasine Dの抗菌活性にはBCG3185cが関与していることを発見した。さらに、分子間相互作用実験によって、同タンパク質はAgelasine Dが抗菌活性を示すためのターゲットである可能性を同定していた(Arai, M., *et al.*, *ChemBioChem*, 2014)。興味深いことに、当時を含め現時点でもBCG3185cに関する研究は国内外を問わず、他に全く報告がなく、当該タンパク質の機能は未知であった。BCG3185cは、アミノ酸配列の相同性からジオキシゲナーゼの一種である可能性が示唆されていたものの、類似するタンパク質について立体構造を同定されたものがなく、機能や構造に関する情報が皆無であった。そこで、蛋白質研究所の竹下特任助教を連携研究者として迎え、BCG3185c単独およびAgelasine Dとの複合体に関して構造解析を行うことで、作用機序に関する知見を得ることが出来、さらに新規抗結核薬の*in silico*での創薬にも繋がると考えた。研究開始当初までの進捗状況としては、BCG3185cの大腸菌での発現系を構築することに成功し、種々の結晶化条件を検討した結果、同タンパク質の結晶化にも成功した。さらに、兵庫県にある大型放射光施設 SPring-8 において X 線を照射した結果、2.0 Å の分解能で回折データを得ることに成功していた。

2. 研究の目的

本研究課題では、期間内に以下の三つの点を明らかにすることを目的としていた。

(1) BCG3185c 単独での立体構造

BCG3185cの結晶化およびX線照射に伴う回折データの取得にはすでに成功していたため、この回折データの解析を行いBCG3185cの構造を決定する。また、更に良質な結晶を得ら

れる条件を模索し、より高分解能での結晶構造解析も試みる。

(2) BCG3185c に Agelasine D が結合した構造
BCG3185c に対する Agelasine D の抗菌活性の作用機序を明らかにするため、複合体の構造に関する情報を得ることを目的とし、以下の A と B の二つのアプローチで試みる。

A. ドッキングシミュレーションによる構造予測

上記の(1)で得られた構造を用いて、Agelasine D の取り得る配座を計算により求め、結晶構造解析で求めた構造中にポケットを発生させてドッキングさせることで、実際のゆらぎがある構造の中での結合部位の予測および結合状態に関する知見を得る。

B. Agelasine D 結合型の結晶構造解析

BCG3185c 単独の結晶化条件を参考に、竹下の協力の下、Agelasine D との複合体の結晶化を試みる。結晶構造にはゆらぎの要素が含まれないため、実際に酵素として BCG3185c が働く際の情報が含まれない可能性があるため、上記の A のシミュレーションの結果と組み合わせることで、通常の結晶構造解析のみでは得られない詳細な検討が出来る。

(3) BCG3185c に作用する新規抗結核薬のシース探索

分担研究者である宇野が有する化合物ライブラリを用い、分子間相互作用解析や *in silico* でのスクリーニングを実施し、Agelasine D よりも BCG3185c に対して親和性が高い化合物を探索し、その結合状態に関する構造的な情報をシミュレーションによって獲得する。

3. 研究の方法

前項『研究目的』で列記した項目(1)～(3)に従い、順次遂行していった。

(1) BCG3185c 単独での立体構造

すでに得ていた回折データを用い、まずは BCG3185c 単独の構造決定を行った。相同性の高い構造が存在しないため、分子置換法での解析が困難であったが、金属を含む結晶である点を利用し、多波長異常分散法を用いて構造解析を行った。CCP4 などの解析ソフトを用いて、最終的に BCG3185c の構造決定に至った。一方、前項で記載したように、より分解能の高い構造を得るため、BCG3185c タンパク質の精製条件および結晶化条件をさらに検討して良質な結晶の獲得を目指した。得られた結晶については、随時、連携研究者である竹下が SPring-8 にて蛋白質研究所が所有す

るビームライン BL-44XU を用い、X 線照射による回折データの取得を行った。

(2) BCG3185c に Agelazine D が結合した構造 A. ドッキングシミュレーションによる構造予測

項目(1)で得られた BCG3185c タンパク質の立体構造情報を用いて、Agelazine D をコンピュータ上で結合させ、複合体の構造を予測する。ドッキングシミュレーションには Schrödinger 社のソフトウェア Maestro に含まれる Glide、SiteMap、および Induced Fit を用い、BCG3185c 内で Agelazine D の結合部位を予測した。BCG3185c の構造情報を基に、計算によって水素原子の付加、および結晶構造の周囲および内部に水分子を付加した。さらに、金属を含んでいることから、金属が結合している周辺に Agelazine D の結合部位があることを想定し、SiteMap で結合部位を数カ所抽出した。一方、Agelazine D についても取り得る配座を計算によって求め、最終的に、双方を結合させたものを Glide によってエネルギー最小化したものを、結合型構造として算出した。

B. Agelazine D 結合型の結晶構造解析

(1)で得られた BCG3185c 単独の結晶に対し、次は Agelazine D が結合した構造情報を X 線結晶構造解析によって得るため、BCG3185c に Agelazine D が結合した状態での結晶化を試みた。主な手法としては、すでに結晶化条件が確立された BCG3185c 単独の結晶に Agelazine D を添加する方法、および先に結合型を溶液として形成させてから結晶化する方法である。前者の方法では、先に報告された結合親和性に関する情報を基に、濃度の異なる Agelazine D 溶液を調製し、BCG3185c が結晶化した溶液に対し、添加することで Agelazine D が結合することを狙った。一方、結合型を先に形成させてから結晶化する後者の方法では、BCG3185c と Agelazine D との混合比が異なるいくつかの条件を検討し、新たに結晶化スクリーニングキットを 4 種類ほど用い、結晶化ロボットを用いてシッティングドロップ法によって結晶化条件を模索した。いずれの方法においても、Agelazine D の可溶化には多少の DMSO が必要であったこともあり、次項 (4) にて詳述するように、結合型の結晶化は当初の予定通り、障害が大きく、途中で計画を中止した。

(3) BCG3185c に作用する新規抗結核薬のシーム探索

シミュレーションと結合型の結晶構造解析

の結果から、Agelazine D とタンパク質との相互作用部位を推測することが可能となった。そこで、研究分担者である宇野が管理する化合物ライブラリを用いて、その収載化合物に関して Maestro を用いて in silico スクリーニングを実施し、結合性がある程度認められるものを選別する計画であった。本計画を進めるにあたり、分担者である宇野に依るところは大きかったが、研究計画途中で病に伏し、昨年、逝去された。従って、宇野の逝去後、彼の研究室の助教である辻野に参画してもらい、BCG3185c の変異体の調製および分子間相互作用解析法を用いて、Agelazine D と BCG3185c との結合性を詳細に調べる実験を行ってもらったこととした。

4. 研究成果

本申請課題は、結核菌に対して抗菌作用を示す海綿由来物質 Agelazine D の標的タンパク質である BCG3185c に対し、初年度に世界で初めてその立体構造の同定に成功した。一方、得られたタンパク質の構造にはニッケルが含まれていたが、この金属がタンパク質の精製過程で本来含まれていた金属に置換して導入された可能性が考えられたため、ニッケルを用いない精製方法を新たに確立するために数ヶ月を要した。結果として、BCG3185c の立体構造の決定を再度行い、鉄を含む金属タンパク質であることを含め、その構造を明らかにした。一方、『3. 研究の方法』の(2)でも触れたように、Agelazine D と BCG3185c との結合型の構造を明らかにするため、複合体とした後に結晶化を試みるなど、結合型の結晶構造解析を試みたものの、Agelazine D の難水溶性なども障害となり、その結晶化には至らなかった。そこで、アミノ酸の変異導入による結合性への影響の検討も同時に進行することとした(申請時の当初の計画通りに進まないときの対応にも記載済)。一方で、従来の抗菌薬であるストレプトマイシンなどと結合部位が異なる可能性が荒井らによって論文内で示されていたため、コンピュータを用いたドッキングシミュレーションによって Agelazine D と BCG3185c との結合について検討した。その結果、複素環を有する Agelazine D の結合に影響を及ぼし得る 2 カ所の芳香族アミノ酸に着目し、まずは各々をアラニンに置換した二種の変異体を作製することとした。変異導入ベクターの調製には成功したが、研究期間を終えたため、変異体発現用の結核菌株の作製および評価という

段階までは至っていない。
先の『3. 研究の方法』でも示した通り、シリーズ探索についてはその継続が難しい状況であったため、研究協力者である荒井に候補となる別の化合物が存在するかを確認したところ、Agelasine D と同様、海綿から抽出された Halicyclamine A も抗結核作用を示すこと、またその標的タンパク質として新たに BCG2664 のクローニングに成功したとの報告を受けた。そこで、BCG3185c と並行し、2つのアプローチによる新規抗結核薬の創製へと繋がるのと観点から、共同研究者である竹下らに本タンパク質の単離精製を新たに依頼し、その高純度での獲得に成功した。研究期間の終了に伴い、現時点では両タンパク質に関する詳細な機能や、本構造解析研究から得られた情報による新たな結核菌薬の創製には至っていないものの、その一端の解明に成功したことは、作用機序の異なる新たな抗結核薬の創製への一助となれたと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

竹下 浩平、山本旭麻、中川敦史、山下 汎
『新規抗結核ターゲットである BCG タンパク質の X 線結晶構造解析』
第 17 回日本蛋白質科学会年会(2017 年 6 月、仙台)

〔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：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 汎 (YAMASHITA, Taku)
武庫川女子大学薬学部・准教授
研究者番号：70398246

(2) 研究分担者

故・宇野 公之 (UNO, Tadayuki)
前・大阪大学大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00183020

辻野 博文 (TSUJINO, Hirofumi)
大阪大学大学院薬学研究科・教授
研究者番号：10707144

(3) 連携研究者

竹下 浩平 (TAKESHITA, Kohei)
大阪大学 たんぱく質研究所・招へい教員
研究者番号：80345808

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)
大阪大学薬学部・特任教授
研究者番号：80311231