

令和元年6月14日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07299

研究課題名(和文)呼吸鎖シトクロムbd型オキシダーゼの新規結晶構造に基づく抗菌薬のデザイン

研究課題名(英文) Drug design based on a novel crystal structure of cytochrome bd oxidase in the respiratory chain.

研究代表者

坂本 順司 (Sakamoto, Junshi)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：80175364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物は呼吸によって活力を得ている。吸い込んだ酸素の力で食物の有機物を酸化(穏やかな燃焼)する反応を行う分子装置を呼吸鎖酸化酵素と呼ぶ。ヒトや家畜で働くヘム銅型酸化酵素は1995年以来精密な立体構造が解かれ詳しく研究されてきた。本研究では、多くの微生物で働くシトクロムbd型酸化酵素の原子レベルの精密構造を、ドイツの研究所との共同で世界で初めて解き、本研究期間に学術論文として公表した。また、その3つのヘムの酸化還元電位に関する新たな知見を得た。さらに、この新たな構造に基づき、in silicoシミュレーションによる新規抗菌薬の候補化合物を絞り込む段階に達した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で精密な分子構造の解明に成功したシトクロムbd型酸化酵素は、従来から解明されていたヘム銅型酸化酵素とは異なり、ヒトや家畜には存在せず、結核菌やジフテリア菌、MRSAを含む黄色ブドウ球菌など多くの病原菌の生存や毒性に関与している。これらの病原菌では、従来の医薬品が効かない耐性菌の発生が、先進国と発展途上国の両方で大きな問題となっている。今回の精密構造に基づき、新しい阻害剤を設計したり探索したりすることにより、これまでより作用が強かったり耐性を回避できる新タイプの抗感染症薬を創出できる道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：Many organisms obtain energy from respiration. The molecular apparatuses to oxidize (mildly burn) organic compound in food with absorbed oxygen are called respiratory oxidases. There are two main types of oxidases. One is the heme-copper oxidase, which operates in human and animal bodies, and whose precise structure was solved in 1995 and has been investigated extensively. The other is cytochrome oxidase, which works in most prokaryotes including many pathogens, but not in eukaryotes. Within the period of this study, we published the first atomic structure of cytochrome oxidase in the world, under collaboration with a group in Germany. Since the revealed stereo-structure is totally different from that of heme-copper oxidase, it is a promising basis to design a new type of anti-bacterial drugs to overcome infectious diseases without adverse effects to humans and animals.

研究分野：生体エネルギー学

キーワード：呼吸鎖 シトクロム 好熱性細菌 アミノ酸生産菌 グラム陽性菌 生体エネルギー変換 電子伝達系 コリネバクテリウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素呼吸において O_2 を利用する分子レベルの実体は、呼吸鎖電子伝達系の末端で働く酸化酵素(オキシダーゼ)である。呼吸鎖のおもな酸化酵素には2つのグループがある。1つはヘム-銅酸化酵素であり、もう1つはシトクロムbd型酸化酵素である(Sakamoto J and Sone N (2004) *Biochemical and molecular features of terminal oxidases*. In: Zannoni D (ed) *Respiration in Archaea and Bacteria*, vol.1: Diversity of prokaryotic electron transport carriers (series: *Advances in Photosynthesis & Respiration*, Vol. 15), pp. 87-113, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands; Sone N, Hägerhäll C and Sakamoto J (2004) *Aerobic respiration in the Gram-positive bacteria*. In: Zannoni D (ed) *Respiration in Archaea and Bacteria*. vol.2: Respiratory chains in selected bacterial model systems (series: *Advances in Photosynthesis & Respiration*, Vol. 16), pp. 35-62, Springer, The Netherlands)。

このうちヘム-銅酸化酵素には、ヒトのミトコンドリアで働くシトクロムc酸化酵素が含まれるため、極めて詳細に研究されている。原子レベルの立体構造も、真核生物と原核生物にまたがる多くの種の酵素についてすでに解明されている。分子進化的に分類されるA1, A2, B, Cの4サブファミリーすべてで結晶構造が解かれている。これに対し、シトクロムbd型キノール酸化酵素は、真核生物には存在しないものの、その分布は細菌と古細菌にまたがり、発酵生産に使われる有用菌から感染症の原因となる病原菌まで広く分布している。微生物界では、ヘム-銅酸化酵素に匹敵するほど普遍性の高い酸化酵素である。しかも、ヘム-銅酸化酵素と分子進化上の類縁性がまったく認められない、隔絶した独自のグループである。

シトクロムbdの研究は、遺伝子組換えの技術がそろっている大腸菌の酵素にかなり集中してきた。世界の有数の研究室が、幾多の人的・金銭的リソースを投入して、この大腸菌酵素の研究にたずさわってきた。にもかかわらず、その大腸菌酵素を含め、シトクロムbdの原子レベルの立体構造は、ごく最近までどれ1つ解かれていなかった。

しかし今や申請者は、我々自身が発見・同定した好熱性グラム陽性菌のシトクロムbdについて研究する中で、ドイツのHarmut Michel教授と共同研究した結果、X線結晶構造解析によって原子レベルの立体構造を解くことに成功した(p3に図)。現段階(本申請書の学内締切時点)では、座標データのPDB登録を終え(ただしまだ非公開)、Science誌への投稿を準備中である。

申請者はこれまでシトクロムbdに限らず、ミトコンドリアとは異なるタイプの呼吸鎖酵素を微生物からいくつも発見し、生化学的・分子生物学的に研究してきた(Sakamoto J et al. (1997) *J. Biochem.* 122, 764-771, Sakamoto J et al. (2001) *Microbiology*. 147, 2865-2871 など)。その中にグラム陽性菌のシトクロムbd型メナキノール酸化酵素がある(Sakamoto J et al. (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* 143, 151-158)。これは、研究が先行した大腸菌(Kita K et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3375-3381)を代表とするプロテオバクテリア以外では、初めての報告だった。それまで、細胞膜画分の酸化還元差スペクトルなどから、好アルカリ菌など他のグラム陽性菌でも存在が示唆はされていたが、酵素の実体として明確に同定したのは我々が最初である。まずは好熱性バシラス科細菌で見いだしたが、その後工業的にも重要なコリネ型アミノ酸生産菌でも同定し(Kusumoto K et al. (2000) *Arch. Microbiol.* 173, 390-397)、またサブユニット構成や機能の詳細な解析も行なった(Sakamoto J et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 147-158)。

2. 研究の目的

酸化リン酸化に働く酵素の研究は、ミトコンドリアに存在するタイプに集中した結果、複合体I~V まですべての酵素の結晶構造がすでに解かれた。ミトコンドリア型酵素に匹敵するほど重要な原核生物に特有な呼吸鎖末端酵素であるシトクロムbd 型オキシダーゼの研究は遅れていた。申請者は最近、ドイツの研究者との共同研究でその結晶構造を世界で初めて解明し公表できる手前までたどり着いた。本研究では、この画期的な成果を厳格な審査を経て学術論文として発表した上で、各種アミノ酸置換ミュータントを作成し反応の分子メカニズムを解明するとともに、病原菌の「息の根を止める」新タイプの分子標的抗菌薬の候補群を *in silico* モデリング手法とウェットの検証実験とでデザインする。

3. 研究の方法

新しく解明した好熱菌シトクロムbd 型酵素の結晶構造に立脚し、次の3系列の研究を進めた。A) ヘムリガンドやポルフィリン環周辺のアミノ酸残基および電子とプロトンの通路を構成するアミノ酸残基を置換したミュータント酵素を作成し、反応の分子メカニズムを明らかにする。B) もう1つのグラム陽性菌であるアミノ酸生産菌のシトクロムbd の結晶構造も解く。C) 上記2つの代表的グラム陽性菌の結晶構造に基づくホモロジーモデリング手法によって、幅広い病原菌のシトクロムbd の構造を推定する。さらに *in silico* ドッキング手法により、化合物データベースから阻害剤候補を探索し、分子標的抗菌薬をデザインする。

4. 研究成果

上述のA) については、バチルス科好熱性細菌 *Geobacillus thermodenitrificans* K1041株のシトクロムbd型メナキノールオキシダーゼの結晶構造を解明し、原子レベルの精密構造を本研究期間に学術論文として公表するに至った。ヘムb560、ヘムb595、ヘムdに対する計5つのリガンドと、水素イオン透過路の候補2本を構成する複数のアミノ酸残基などを、解明した原子レベルの立体構造の中で同定あるいは推定し、それらの部位特異的変異体遺伝子を設計した。この設計に基づき、PCRの増幅DNA断片をシャトルベクターに挿入して大腸菌で増やした。これをエレクトロポレーション法で本来の菌を宿主として導入し、変異酵素発現を試みる段階に至っている。一方、その同じbd型オキシダーゼの精製標品をについて分光電気化学的測定を行い、3つのヘムの酸化還元電位についてユニークな特徴を見いだすことができた。B) については、アミノ酸生産 *Corynebacterium glutamicum* のやはりbd型オキシダーゼを精製し、同じくドイツの研究協力者の研究所への空輸を継続した。単独での結晶化の他に、各種阻害剤や基質メナキノールおよびその類似物質との共結晶も試みている上、関連するいくつかの物理化学的測定も、当該研究所内および研究所外ヨーロッパ内の別大学で行っている。C) については、上述の立体構造に基づくホモロジーモデリングで他のグラム陽性病原菌のbd型オキシダーゼの構造モデルを構築した。これら好熱菌と病原菌の構造に対して、*in silico* シミュレーションによる候補化合物の絞り込む段階に達した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Safarian S, Rajendran C, Müller H, Preu J, Langer JD, Ovchinnikov S, Hirose T, Kusumoto T, Sakamoto J, Michel H. (2016) Structure of a bd oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases. *Science*. 査読有、352(6285):583-586. doi: 10.1126/science.aaf2477.

〔学会発表〕(計 12件)

1. 平川可純, 石橋航, 楠本朋一郎, 坂本順司, 安永卓生(2018)アミノ酸産生菌における呼吸鎖化還元酵素の拡張型超複合体構造解析, 第60回日本顕微鏡学会九州支部集会・学術講演会

2. 中垣沙也香、広瀬太一朗、吉田 宰、坂本順司 (2017) 呼吸鎖シトクロム *bd* オキシダーゼの多様性：グラム陽性菌内部でさえ大きい」日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会
3. Junshi Sakamoto, Tsukasa Yoshida, Taichiro Hirose, Tomoichirou Kusumoto. (2016) Cytochrome *bd*-type quinol oxidases: structural variety even within the Gram-positive bacteria. 19th European Bioenergetics Conference (EBEC) at Riva del Garda, Italy.
4. Schara Safarian, Chitra Rajendran, Hannelore Müller, Julia Preu, Julian D. Langer, Sergey Ovchinnikov, Taichiro Hirose, Tomoichirou Kusumoto, Junshi Sakamoto, Hartmut Michel (2016) The Cytochrome *bd* Oxidases Possess a Unique Protein Structure and an Unexpected Heme Group Arrangement. 19th European Bioenergetics Conference (EBEC) at Riva del Garda, Italy.
5. 坂本順司 (2016) 微生物呼吸鎖の多様性とシトクロム *bd* 型酸化酵素の最初の立体構造, 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
6. 坂本順司 (2016) 細菌の好氣的代謝の多様性と微好気型オキシダーゼの最初の立体構造, 第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会
7. Junshi Sakamoto (2016) The first atomic structure of cytochrome *bd*-type respiratory oxidase". The 4th International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS4)
8. 西村真理、椎葉千尋、楠本朋一郎、坂本順司 (2016) アミノ酸生産菌の拡張型呼吸鎖超複合体の精製と性格付け, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会
9. 吉田 宰、楠本 朋一郎、坂本 順司 (2016) アミノ酸性菌の呼吸鎖シトクロム *bd* 型キノール酸化酵素の精製法改良と、好熱菌酵素の結晶構造に基づく構造推定, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会
10. 岸川史歩、椎葉千尋、楠本朋一郎、坂本順司 (2016) アミノ酸生産菌の拡張型呼吸鎖超複合体の分子構成と酵素活性の特徴, 第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会
11. 中垣沙也香、坂本順司 (2016) グラム陽性好熱菌シトクロム *bd* 型酸化酵素の活性と精製法改良, 第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会
12. 下牧瀬拓郎、馬場弘樹、角崎丈司、青木俊介、坂本順司 (2016) シトクロム *bd* 型呼吸鎖酵素の新規立体構造に基づく抗菌薬の探索, 日本生体エネルギー研究会第 42 回討論会

〔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：
 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：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：ハルトムート=ミヘル

ローマ字氏名：Hartmut Michel

研究協力者氏名：シャーラ=サファリアン

ローマ字氏名：Schara Safarian

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、研究者個人に帰属されます。