

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19570109
 研究課題名 (和文) インフルエンザ菌由来ペニシリン結合タンパク質構造による新抗生物質の開発
 研究課題名 (英文) Crystal structures of penicillin binding proteins from *Haemophilus influenzae*
 研究代表者 朴 三用 (Park Sam-Yong)
 横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授
 研究者番号：20291932

研究成果の概要：

細菌の細胞壁は、浸透圧や外界からの物理的損傷から自身を守り、成長や分裂時には盛んに合成される組織の1つである。ペニシリンを代表とする β -ラクタム系抗生物質は、もっとも古くから使用されてきた1つであり、主にグラム陰性菌に対して非常に有効で、現在も、最も多く使用されている抗菌剤である。本研究の目的は、インフルエンザ菌由来のPBPの立体構造を解明し、新たなインフルエンザ菌の新抗生剤開発を行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌、肺炎連鎖球菌やインフルエンザ菌の耐性菌は、ペニシリン系抗生薬に対する感受性が低下し、様々な耐性菌が出現している。このような問題を解決するために新たな抗生物質の開発が望まれている。本研究では、インフルエンザ菌の耐性菌由来のPBPタンパク質の立体構造を解明とその立体構造情報から有効な抗生剤を開発する事を目指す。インフルエンザ菌の耐性菌 (b-lactamase negative ABPC resistant *H. influenzae*: BLNAR) は、ペニシリン結合性

タンパク質 (Penicillin Binding Protein; PBPs) に変異を引き起し、従来のペニシリン系抗生薬だけでなく、セフェム (cephem) 系抗生薬の感受性も低下している。インフルエンザ菌はパスツレラ科のグラム陰性菌で、呼吸器感染や耳鼻咽喉科領域感染を引き起し、肺炎、菌血症、髄膜炎の原因となり、ヒトの上気道に常在菌として生息している。インフルエンザ菌由来 PBPs は7種類が存在し、細胞壁の分解 (PBP4)、成熟 (PBP5-6) などに関わっている。

インフルエンザ菌の耐性菌 (b-lactamase negative ABPC resistant *H. influenzae*: BLNAR) は、ペニシリン結合性タンパク質 (Penicillin Binding Protein; PBP) に変異を引き起し、従来のペニシリン系抗菌薬だけでなく、セフェム (cephem) 系抗菌薬の感受性も低下している。このような視点から、新たな抗生剤の開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザ菌の耐性菌由来の PBP タンパク質の立体構造を解明とその立体構造情報から有効な抗生剤を開発する事を旨とする事が研究目的である。

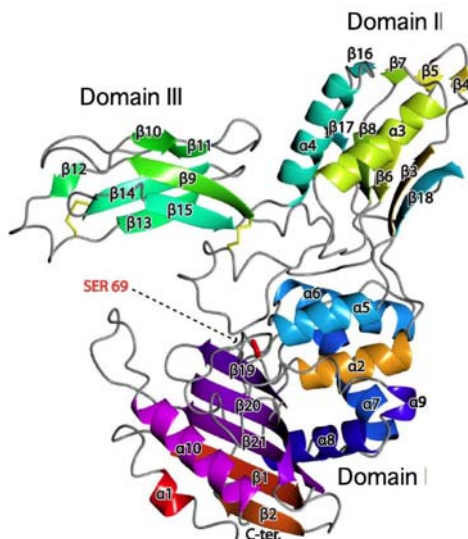
3. 研究の方法

インフルエンザ菌から、PBP (Penicillin Binding Protein) 4, 5 の遺伝子を取り、タンパク質の発現、精製、結晶化、タンパク質の立体構造解析を行った。

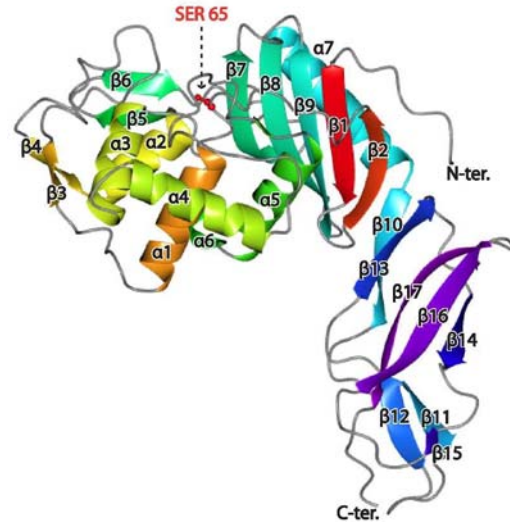
4. 研究成果

PBP4 と PBP5 タンパク質の単結晶作製に成功し分解能 1.6Å と 1.9Å でそれぞれ立体構造決定に成功した。これらの構造情報から、新たな抗生剤を設計、合成を行い、抗菌作用の確認を行い有効である事を確認した。その後、更なる化合物の最適化を行い以下の2つの化合物の設計に成功し、国内での特許出願する事が出来た。

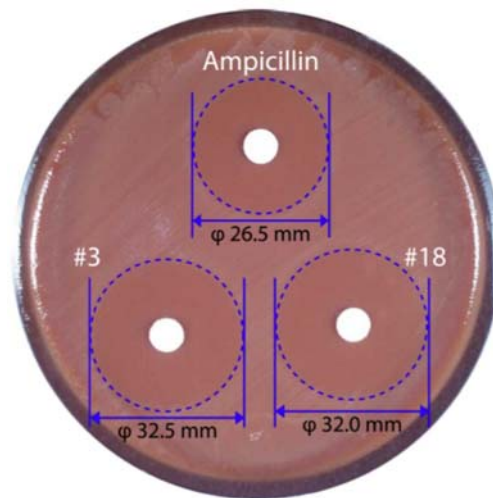
PBP4 の構造 (以下の図) は、3つのドメインからなり、活性部位である Ser69 はドメイン I に存在しており、ここに阻害剤であるペニシリンなどが結合する。



また、PBP5 の立体構造は、以下の示したように、



L字型をしており、7本の α -ヘリックスと17本の β -シートからなっている。また、活性部位は、Ser65 で上に示した図のところで、D-Ala-D-Ala が結合する所であり、電荷には正電荷を持った環境である。このような二つの構造を基に、新たな抗生剤の設計を行い、インフルエンザ菌を使い、抗菌作用を行った。



その結果を上にした。まず、従来の ampicillin と比べて、開発された #3 と #18 の化合物は、ampicillin より、抗菌作用範囲広く示しており、有効な化合物である事を示している。この研究成果を特許申請をしている。

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 6 件)

1. Izumi A, Rea D, Adachi T, Unzai S, Park SY, Roper DI, Tame JR. Structure and mechanism of HpcG, a hydratase in the

- homoprotocatechuate degradation pathway of Escherichia coli. J Mol Biol. 2007 Jul 27;370(5):899-911
2. Heddle JG, Okajima T, Scott DJ, Akashi S, Park SY, Tame JR. Dynamic allostery in the ring protein TRAP. J Mol Biol. 2007 Aug 3;371(1):154-67.
 3. Chatake T, Shibayama N, Park SY, Kurihara K, Tamada T, Tanaka I, Niimura N, Kuroki R, Morimoto Y. Protonation States of Buried Histidine Residues in Human Deoxyhemoglobin Revealed by Neutron Crystallography. J Am Chem Soc. 2007 Dec 5;129(48):14840-1.
 4. Ozaki S, Kawakami H, Nakamura K, Fujikawa N, Kagawa W, Park SY, Yokoyama S, Kurumizaka H, Katayama T. A Common Mechanism for the ATP-DnaA-dependent Formation of Open Complexes at the Replication Origin. J Biol Chem. 2008 Mar 28;283(13):8351-62.
 5. Hiraki T, Shibayama N, Akashi S, Park SY. Crystal structures of the clock protein EA4 from the silkworm Bombyx mori. J Mol Biol. 2008 Mar 28;377(3):630-5.
 6. Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JR, Park SY. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. Nature. 2008 Aug 28;454(7208):1127-31.

[学会発表] (計 8 件)

1. Heddle JG, Akashi S, Park SY, Tame JR: Dynamic allostery in the ring protein TRAP. Biophysics of ligand binding to drug targets. Workshop, Ilkirch, Strasbourg, 14-16 May, France, 2007.
2. Park SY, JRH Tame: Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from Escherichia coli. Biophysics of ligand binding to drug targets. Workshop, Ilkirch, Strasbourg, 14-16 May, France, 2007.
3. Park SY, JRH Tame: Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from Escherichia coli. 24th European Crystallographic Meeting. Marrakech, Morocco, 2007.
4. Park SY, H. Hiraki, N. Shibayama,

S. Akashi; Crystal structure of the clock protein EA4 from the silkworm bombyx mori. 2nd

International conference on protein science, Cairns Australia, 22-26 June 2008.

5. Takeshi Yokoyama, Satoru Unzai, Park SY, Jeremy Tame: Haemoglobin as a drug target, The 40th crystallographic meeting at Erice, Italy, 2008. 5. 29-6. 8
6. Park SY, T. Hiraki, N. Shibayama, S. Akashi: Crystal structures of the clock protein EA4 from the silkworm bombyx mori, The Joint 4th AOHUPO (Asian Oceania Human Proteome Organisation and 2nd PRICPS (Pacific Rim International Conference on Protein Science, Cairns, Australia, 2008. 6. 22-26
7. Park SY, Toshiyuki Chatake, Naoya Shibayama, Yukiko Morimoto: Protonation states of buried histidine residues in human deoxyhemoglobin revealed by neutron crystallography, XVth International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins, Aarhus, Denmark, 2008. 8. 17-21
8. Satoko Akashi, Masahiro Watanabe, Jonathan GHeddle, Satoru Unzai, Park SY, Jeremy R. H. Tame: Studies of protein-protein and protein-RNA complexes by mass spectrometry, IUCr 第 21 回国際結晶学連合会議, 大阪, 2008. 8. 23-31

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規抗生剤の開発

発明者: 朴 三用

権利者: 横浜市立大学

種類: 新規抗生剤の開発

番号: 特願 2008-213424

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 三用 (Park Sam-Yong)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号: 20291932

(2)研究分担者

Jeremy Tame

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・教授

研究者番号: 00336588

雲財 悟 (Unzai Satoru)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・助教

研究者番号: 60336592

(3)連携研究者

なし