

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07484

研究課題名(和文) 非共有結合性阻害剤の探索を目的としたペニシリン認識酵素のX線結晶解析

研究課題名(英文) X-ray crystallographic analysis of penicillin-recognizing enzyme for the search of non-covalent inhibitors

研究代表者

額賀 路嘉 (NUKAGA, Michiyoshi)

城西国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20251150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗生物質耐性は医療上の大きな問題である。本研究では特にβ-ラクタム系薬耐性に着目し、MRSA由来のPBP2a(ペニシリン結合タンパク質)とBurkholderia multivorans由来、PenAカルバペネマーゼを対象にし、X線結晶解析と分子動力学計算を中心とした研究を行った。MRSAのPBP2aは既知のセフトロリン複合体の知見をもとに結晶化条件を見直し、アロステリック阻害剤の可能性について検討した。PenAカルバペネマーゼについては、その変異酵素を作成し、立体構造とその動きを予想することによってカルバペネム耐性や阻害剤耐性に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質耐性菌は世界的な問題で、新しい抗菌剤の開発は急務である。本研究では、最後の切り札的に利用されているカルバペネム系薬耐性の主要因であるカルバペネマーゼの保存性アミノ酸R220とE166の変異酵素の研究を通して、PenAカルバペネマーゼの反応機構におけるタンパク質の動きの重要性を示すとともに、これまで一般的だったツールとしてのE166の問題点を提唱することができた。MRSAのPBP2aの研究では、アロステリック阻害剤の可能性を示した。完了していない部分が多いのではあるが、今後、研究を完成させ発表していきたい。

研究成果の概要(英文)：Antibiotic resistance is a major medical problem. In this study, we focused on β-lactam resistance and investigated PBP2a (penicillin-binding protein) from MRSA and PenA carbapenemase from Burkholderia multivorans, mainly by X-ray crystallographic analysis and molecular dynamics calculations.

For the MRSA-derived PBP2a, the crystallisation conditions have been investigated on the basis of the known ceftaroline complex (PDB:3ZG0) and the possibility of allosteric inhibitors was explored. For PenA carbapenemase, a mutant enzyme was generated and the 3D structure and its motion predicted, providing insight into carbapenem resistance and inhibitor resistance.

研究分野：構造生物学

キーワード：β-ラクタマーゼ ペニシリン結合タンパク質 抗生物質 X線結晶解析 分子動力学計算 耐性菌 抗菌薬

※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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗生物質耐性菌は世界中で増え続け、かつ新しいタイプが生まれており医療上大きな問題になっている。本研究の対象のひとつである MRSA はただ 1 種の PBP2a 遺伝子により、ほぼ全ての β -ラクタム剤が無効化させられてしまう。SA, 黄色ブドウ球菌は健常者も常在菌として保有しており、日和見感染などで大きな問題となっている。研究開始当初 MRSA に有効な抗菌薬はバンコマイシンなど多くはなかったが第五世代セフェムのセフトロリンがメチシリン耐性の主要因であるペニシリン結合タンパク質 2a(PBP2a)に対してアロステリック阻害剤として働くことが示され、MRSA にも有効な β -ラクタム剤が生み出せる可能性もしくは、PBP2a に対するアロステリック阻害剤創出の可能性が期待された。

本研究のもうひとつのテーマは、近年、世界的に大きな話題となっている CRE (カルバペネム耐性腸内細菌科細菌)、緑膿菌やバクテロイデス属細菌群に代表される環境細菌のカルバペネマーゼによるカルバペネム系薬 β -ラクタム剤耐性菌の出現である。最後の切り札(Last Resort)的に利用されているカルバペネム系薬が全く効かないこれらの耐性菌は他の抗生物質耐性遺伝子も保有することが多く、さらに拡張し、有効な抗生物質が無いスーパーバグと呼ばれる最強の耐性菌を生み出す可能性が高い。カルバペネマーゼにはクラス A セリン β -ラクタマーゼから生まれたタイプとクラス B 金属 β -ラクタマーゼが含まれる。研究開始当初にはこれらに有効な β -ラクタマーゼ阻害剤は臨床利用されていなかった。これらの耐性菌と戦うためには新たな抗生物質の開発が急務である。その一方、その基礎、応用研究は不十分と言わざるを得ない。国内ではほぼ、医療機関のサーベイランスによる現状把握が中心である。多くの病院で感染症対策チームが組織され、抗生物質の乱用は防がれるようになってきたが、近未来にスーパーバグが出現することはほぼ確実であろう。こういった理由から、新規抗菌薬の創薬が期待されており、本研究のような耐性菌の基礎研究を題材にした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MRSA の PBP2a とカルバペネマーゼの酵素反応機構を理解し、その阻害剤を探索することにある。その結果は、医療上の問題解決、創薬上のアイデアを生み出すと期待している。また、これまでのペニシリン結合タンパク質阻害剤、あるいは β -ラクタマーゼ阻害剤のほぼ全ては、活性中心セリン残基に共有結合でつながるタイプの阻害剤で、いわば Slow Substrate の性質を持っていた。このタイプの阻害剤は、ターゲットの側のアミノ酸置換などによって短期で対応された耐性菌が出現してしまう。そのため、Slow Substrate ではないメカニズムの阻害剤が期待される。そこで、第五世代セフェムのセフトロリンが PBP2a のアロステリック活性化剤・阻害剤としての性質をもつことに着目して非共有結合性阻害剤を得たいという希望の元、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) PBP2a 発現系構築

MRSA 由来の PBP2a 遺伝子は *Staphylococcus aureus* Mu50/ATC700699 由来のアミノ酸配列から人工合成を行い、これを pET50b(+)ベクターに挿入した。同様に、pET48b(+)ベクターに導入した PenA およびその変異体遺伝子、及び *PenR_{EBD}* 遺伝子は共同研究者の Papp-Wallace 博士から供与された。

(2) タンパク質精製

それぞれの発現ベクターを *Escherichia coli* BL21DE3 株に導入、9 L の培養液と抗生物質を用いて 30℃で後期対数増殖期まで培養、過濃度 0.5 mM の IPTG を添加することで誘導を行い、その後、26℃もしくは 30℃で 12 時間から 16 時間の培養を行った後、菌体を回収、破碎し、粗酵素抽出液とした。これに対し、イオン交換、Ni アフィニティ、ゲル濾過などの各種クロマトグラフィーを行った。それぞれのタンパク質の純度が SDS-PAGE 電気泳動により 99%以上となるよう精製ステップを繰り返し、高純度の精製タンパク質を得た。

(3) X線結晶解析

今回はそれぞれのタンパク質の野生型の構造が既知であったので、結晶化条件は、野生型タンパク質の条件を参考に、pH、沈殿剤、添加物、クライオプロテクトANTなどの最適化を行った。得られた結晶は液体窒素にて凍結し、データ収集はつくば、高エネルギー加速器研究機構、フロンファクトリーの主に BL17A にて行った。XDS, ccp4 を利用して指数付け、スケーリングを経て最終回折データとした。初期位相は野生型タンパク質をサーチモデルとした分子置換法で行い、精密化を行った。初期位相決定以降は Phenix を用いた。

(4) 分子動力学計算

分子科学研究所、情報科学センターの共同利用を申請し、Amber20 および 22 を利用して分子動力学計算を行った。

4. 研究成果

(1) PenA, R220A 変異酵素の構造解析

Arg220 はクラス A β -ラクタマーゼに保存されており、活性中心ポケットの外側に位置するアミノ酸である。基質は阻害剤の結合する活性中心ポケットを構築するのではないこのアミノ酸を Ala に置換した変異酵素の活性中心ポケットの構造は変化がないのにも関わらず、その β -ラクタマーゼの活性は k_{cat}/K_m を指標として野生型の 1/400 倍程度に活性が低下する。また、各種 β -ラクタマーゼ阻害剤の親和性が軒並み低下していた。この現象を解明するために、Amber20 を用いた分子動力学計算を行った。

その結果、R220A 変異は、220 位周辺ではなく遠く離れた場所 (T254 や T227 周辺) の運動性に大きく影響を及ぼしていることが明らかとなった。また逆に変異により安定化される領域も存在した。一般に、阻害剤の阻害活性などを議論する際、基質や阻害剤との直接の相互作用をするアミノ酸が論点になる場合が多い。この結果は、構造を安定化させるという目的でキーとなるアミノ酸が存在することを示し、また、それが阻害剤への耐性化へ寄与することを示した。

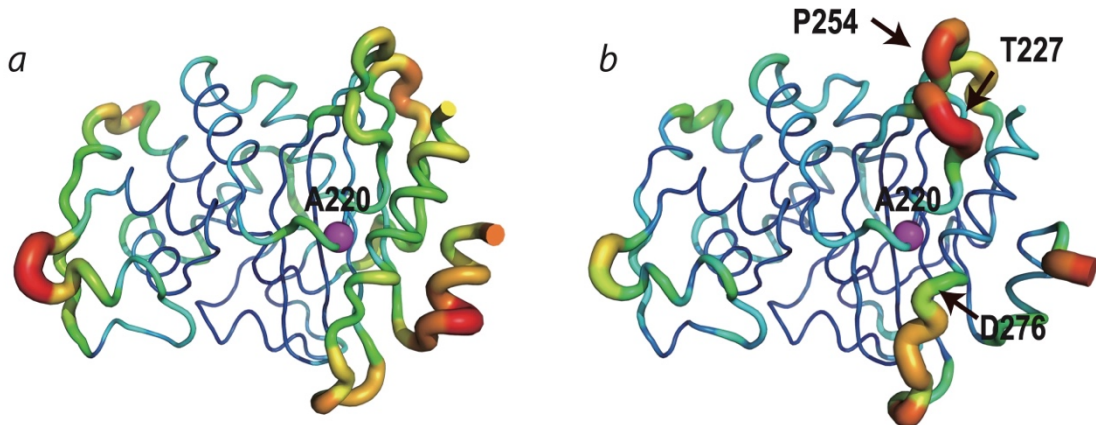


図 1: 野生型(a)と R220A(b)変異体の B-factor の比較: 分子動力学計算によって、算出された B-factor を色と太さで示した。太い (赤) ほど、B-factor が大きいつまり動きが大きいことを示す。細 (青) は動きが小さいことを示す。

(2) PenA, E166A 及び E166D 変異酵素の X 線結晶構造解析

全てのクラス A β -ラクタマーゼに保存されている Glu166 は触媒残基である。脱アシル化水の酸素原子を引き抜き、その求核性を上げ、脱アシル化を進行させるのに必須のアミノ酸残基である。これを、他のアミノ酸に置換した変異酵素は、本来、脱アシル化により反応が終了してしまうような良好基質であっても、アシル中間体で反応を止めることができ、その構造解析が多く行われている。

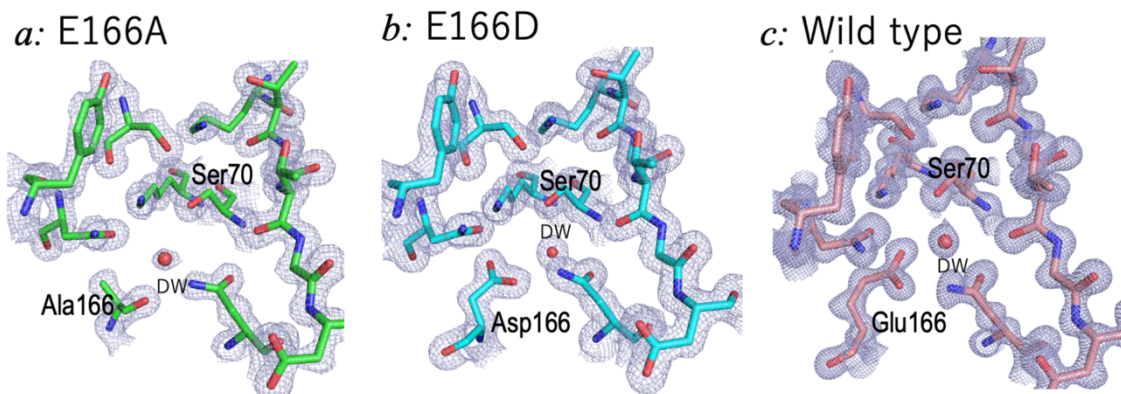
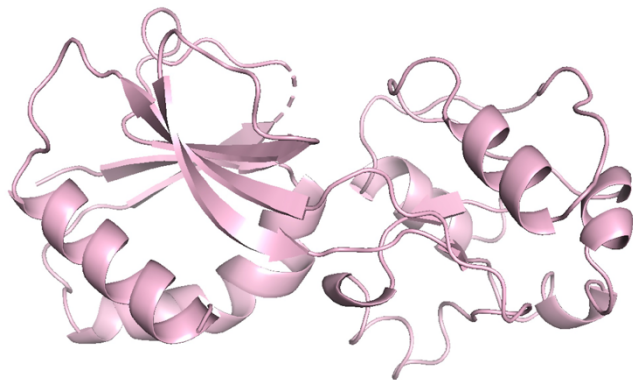


図 2 PenA β -ラクタマーゼの E166A, E166D 及び野生型の活性中心構造。分子モデルに加えて 1.2σ の $2fo-fc$ マップを示した。DW とある脱アシル化水は 3 つの構造すべてに確認できるものの、E166A 変異体ではマップのピークが小さく 1.5σ レベルで見えなくなるほどであった。

本研究では、PenA クラス A カルバペネマーゼの E166A 及び、E166D 変異酵素の約 1.2-1.4 Å 分解能での X 線結晶解析を行った。その結果、E166D では野生型とほぼ同様の脱アシル化水 (図 2) が観察されたが、E166A ではそのピークが弱くなっており、占有度が小さくなっていると予想さ

れた。

同変異酵素とイミペネムの複合体の X 線結晶構造解析も行っている。こちらに関しては、1 度完成とし、PDB 登録寸前の状態にしたが、電子密度の解釈とイミペネムアシル中間体の構造を変更したため、現在、分子動力学計算のやり直しを行っている。紆余曲折があったが、E166A と E166D のイミペネムアシル中間体の構造は、オキシアニオンホールを形成、非形成また、五員環部分の二重結合位置の変化など、大きく異なる構造をとっていた。つまり、Glu166 変異は、脱アシル化水の求核性上昇のみならず、カルバペネム系薬の異性化にも寄与していることが示された。これまでの 166 位変異体の解釈にも関わる重要な知見が得られたと考えている。



(3) PenA 調節タンパク質, PenR エフェクタードメインの構造解析

図 3: PenREBD タンパク質の 1.4 Å 分解能の X 線結晶構造 (リボンモデル)

(1) で扱っていた PenA クラス A カルバペネマーゼは *Burkholderia multivorans* の染色体上に遺伝子が存在する。その発現は β -ラクタム剤存在下で誘導される。その鍵となるのは DNA 結合タンパク質である PenR である。このタンパク質は染色体性のクラス C β -ラクタマーゼを持つ菌種に

広く存在している。*B. multivorans* では、AmpC クラス C β -ラクタマーゼのみならず、クラス A カルバペネマーゼの発現に関与することから、カルバペネマーゼの影響を低下させる薬剤のターゲットになりうると考えられる。そのため、このタンパク質の X 線結晶解析を行った。

PenR 全体から DNA 結合領域を除いた約 300 アミノ酸からなる部分を PenREBD として遺伝子を合成、1.4 Å 分解能の X 線結晶構造解析を行った。C2 空間群に属する単量体の構造モデルを得た。他菌種の AmpR の解析により、本タンパク質は二量体もしくは四量体で働くことが示唆されており、今後、エフェクター分子や DNA と結合した構造解析を進めていきたい。また、PenR 阻害剤のスクリーニングを行っており、候補化合物があり、詳細を調べたいと考えている。

(4) クラス B カルバペネマーゼ阻害剤の探索

IMP-1 クラス B カルバペネマーゼを対象にスクリーニングにより得られた化合物の X 線結晶解析を行った。

(5) MRSA 由来 PBP2a の研究

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA はメチシリンのみならず、ほぼ全ての β -ラクタム剤及び他のタイプの抗菌薬も無効である場合が多い征圧困難な耐性菌である。特効薬のバンコマイシンにも耐性を上げつつある菌株も出現している。第五世代セフェムのセフトロリンは耐性の主要因である PBP2a の活性部位を阻害するだけではなく、そのために、別なアロステリック部位に結合することが知られている。すなわち、非共有結合性の阻害剤と共有結合性の阻害剤の 2 つの顔をもっている。セフトロリンを超えるアロステリック阻害剤を探すために PBP2a の X 線結晶解析を試みた。条件の最適化により図 4a のような結晶が得られ 1.8-2.0 分解能の構造解析が可能となった。また、図 4b に示したようにセフトロリンのアロステリック部位への結合は主に疎水性相互作用が安定化要因となっていた。更に強固な結合を求め、セフトロリンに似た構造を持つリード化合物の探索を行っている。OpenEye 社の ROCS を用いた化合物探索を行っている。

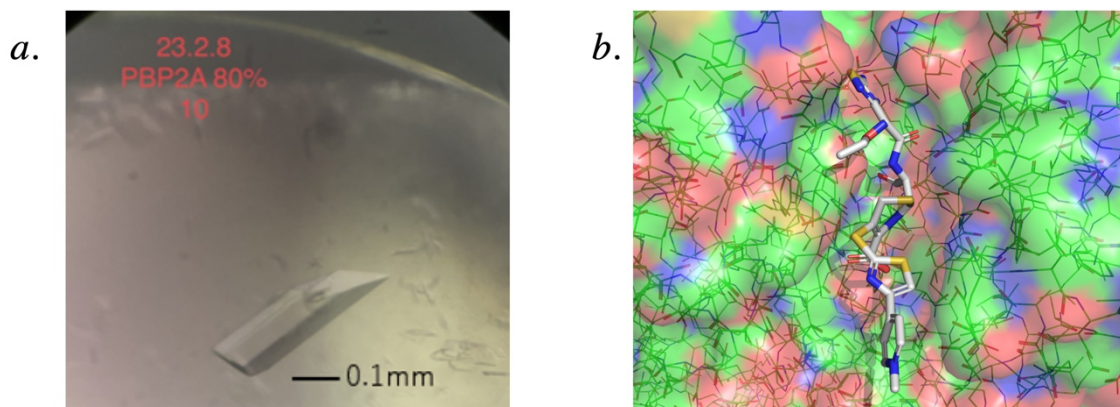


図 4: MRSA 由来 PBP2a の a: 条件最適化された結晶、b: PDB:3ZG0 のアロステリック部位に結合したセフトロリン分子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nukaga M, Yoon MJ, Taracilia MA, Hoshino T, Becka SA, Zeiser ET, Johnson JR, Papp-Wallace KM	4. 巻 7
2. 論文標題 Assessing the Potency of β -Lactamase Inhibitors with Diverse Inactivation Mechanisms against the PenA1 Carbapenemase from <i>Burkholderia multivorans</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 826-837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsinfecdis.0c00682.	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 Kamo T, Kuroda K, Kondo S, Hayashi U, Fudo S, Yoneda T, Takaya A, Nukaga M, Hoshino T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Identification of the Inhibitory Compounds for Metallo- β -lactamases and Structural Analysis of the Binding Modes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 1179-1183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-00611. PMID: 34853284.	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 Kamo,T, Kuroda K, Nimura S, Guo Y, Kondo S, Nukaga M, & Hoshino T	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of Inhibitory Compounds for Metallo-beta-lactamase through Computational Design and Crystallographic Analysis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1278-1286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.4c00069	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Nukaga, S. A. Becka, E. T. Zeiser, J. J. LiPuma, K. M. Papp-Wallace	
2. 発表標題 Characterizing the resistance mechanisms present in an unusually, highly multi-drug resistant isolate of <i>Burkholderia multivorans</i> (ASM Microbe online, ePoster)	
3. 学会等名 ASM Microbe online, ePoster (国際学会)	
4. 発表年 2020年	

1. 発表者名 渋谷 明日香, 坂本 翔, 星野 忠次, Maria F Mojica, 額賀 路嘉
2. 発表標題 Burkholderia multivorans由来の薬剤耐性因子PenRのX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	パップワレット クリスチーナ (Papp Wallet Kriszina)		
	星野 忠次 (Hoshino Chuji) (90257220)	千葉大学・薬学研究院・准教授 (12501)	

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			
米国	Louis Stokes Cleveland VAMC	Case Western Reserve University		