

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06555

研究課題名（和文）新規抗結核薬の創薬ターゲットの機能解明および検出キット作製への応用

研究課題名（英文）Application to elucidate the function of targets for novel anti-tuberculosis drugs and to develop detection kits

研究代表者

山下 沢 (YAMASHITA, Taku)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70398246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、薬剤耐性結核菌に対する新規作用機序が期待される2つの化合物（AgeDとHaliA）について、それぞれの標的タンパク質の構造解析を行うことで創薬研究の基盤の構築を試みたものである。このうち、AgeDのターゲットとされているBCG3185cについては結晶化に必要なタンパク質の獲得に成功し、1.8オングストロームの分解能での原子構造解析に成功した。一方、AgeDとの複合体構造を得ることは困難であったため、ドッキングシミュレーションを行い、得られた結果から、AgeDの結合様式を推定するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、現在、社会的に問題となっている薬剤耐性結核菌に対し、新たな創薬基盤となる化合物の作用機序の解明を目指した社会的に意義深い研究である。今回、結核菌に作用することが分かっているAgeDに対し、その標的タンパク質であるBCG3185cの構造を初めて明らかとした点は学術的な意義として極めて大きく、さらに結合様式についてもドッキングシミュレーションによって提唱できたことは、今後の新規抗結核薬の創製に向けた基盤となることが期待でき、本研究領域の発展は公衆衛生的な面において社会的に極めて意義がある。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to establish a foundation for drug discovery by conducting structural analyses of the target proteins of two compounds, AgeD and HaliA, which are expected to exhibit novel mechanisms against drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. We managed to obtain BCG3185c, a target of AgeD, with sufficient amount for crystallization; and achieved a structural analysis at a resolution of 1.8 angstroms. While, obtaining a structure of a complex with AgeD was challenging. Finally, we performed docking simulations with the solved BCG3185c structure and presented the binding mode of AgeD.

研究分野：Biophysics

キーワード：結核菌 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

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が猛威をふるっていた数年間、マスクの着用が常とされていた影響で多くの感染症が減少していた。COVID-19がある一定の収束を見せつつあり、マスクの着用義務が解除されつつあった当時は種々の感染症の再燃が懸念されていた。その中、結核患者については、年間における新たな登録者数が毎年1万人以上を維持し、死亡者数も2千人弱であり、人口10万対の死亡率では1.5以上を継続していた。この結核患者の数および死亡率がある一定レベルを維持している原因と考えられている要因の一つが、多剤耐性結核菌の存在である。結核菌に対する治療薬として従来選択されてきたリファンピシンとイソニアジドの2剤に対する耐性菌は早い段階で報告されていたが、近年では、さらにニューキノロン系抗生剤に対しても耐性を示す超多剤耐性結核菌の存在も報告されており、その治癒率は30%程度とも言われていた。そのため、作用点が従来とは異なる新たな抗結核薬の創製は、社会的ニーズが非常に高い状況であった。このような背景の下、研究協力者である荒井らが同定した海洋海綿由来の Agelasin D（以下、Age-D）と Halicyclamine A（以下、Hali-A）が、結核菌に対する新たな作用機序を示すのではないかと考え、それらの標的分子 BCG3185c と BCG2664 に関する研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多剤耐性菌や超多剤耐性菌に対して新規作用機序で機能する新たな抗結核菌の創製を志向した標的タンパク質の構造や機能解明である。さらには、これまでは作用が見込めなかった休眠期の結核菌に対しても作用する新規抗結核薬の創製も視野に入れている。研究協力者の荒井らが発見した2つの化合物を足がかりとし、Age-Dについては、BCG3185cとの構造解析を踏まえた結合様式の解明を、Hali-Aについては、BCG2664の昆虫細胞を用いた発現方法の確立を目指し、細胞内外での結合に関する相互作用解析を行うことで、双方から得られる知見を集約し、新規作用機序に基づく新たな抗結核薬の創製につながる基礎的研究基盤の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

研究の方法としては、協力者らが微生物学的手法によって発見してきた化合物に対し、主に構造解析学と生物物理学に着目した手法を適用した。具体的には、先行する共同研究において、BCG3185c単独である一定の分解能での構造解析にはすでに成功していたが、より精密な構造さらにはAge-Dとの複合体の構造解析には至っていなかったため、BCG3185cについてはさらなるタンパク質の獲得条件の検討、そしてAge-Dとの共結晶あるいはソーキングによる複合体での結晶化を主な方法とした。また、結合性を評価するため、分子間相互作用解析を行うこととした。さらに、Hali-Aについてはより研究遂行の困難さが予見されていたため、BCG2664のC末端などの欠損変異体を含め、リコンビナントタンパク質を昆虫細胞内で発現させ、相互作用を解析することを主な手法として研究を行なった。

4. 研究成果

Age-DのターゲットとされているBCG3185cについては、結晶化に必要なタンパク質のさらなる獲得や結晶化条件のさらなる精密化に成功し、最終的には1.8Åの高分解能での原子構造解析に成功した。一方、Age-Dとの複合体構造を得るため、Age-Dとの共結晶を試みたものの、タン

パク質の結晶を得ることは厳しく、また CBCG3185c 単独の結晶に Age-D をソーキングする方法についても、最終的に BCG3185c と Age-D との複合体としての結晶を得ることは困難であった。そこで、高分解能で得られた BCG3185c の結晶構造を基に、Age-D の構造を計算によって作成し、2つの構造を用いてドッキングシミュレーションを行い、結合様式を印刷公表するに至った (Takeshita, *et al.*, 2024)。一方、Hali-A の標的とされる BCG2664 については、C 末端を欠損させたものを含め、種々の変異体を検討したものの、結晶化に必要な発現量を得るまでには至れなかった。ただし、発現自体は確認できており、今後、さらに検討を重ねていくことで、相互作用解析を行える準備を整えるところまでは遂行できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshita, K., Sakai, N., Ueno, G., Horie, M., Tsujino, H., Arisawa, M., Yamamoto, M., Arai, M., and Yamashita, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 A large pocket structure surrounding the catalytic center in the BCG protein from Mycobacterium tuberculosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.05.14.591795	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	竹下 浩平 (Takeshita Kohei) (80346808)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・研究員 (82401)	

	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	荒井 雅吉 (Arai Masayoshi)		

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
---------	---------