

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15443

研究課題名（和文）呼吸鎖酵素の新規アロステリック調節機構の証明と抗菌剤開発への展開

研究課題名（英文）Identifying antibiotics using the conserved allostery from respiratory complex

研究代表者

西田 優也（Nishida, Yuya）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：10793440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、次々と新しい薬剤耐性病原菌が発生している。その対策として、新規なメカニズムによる抗生物質の開発が強く求められているが、その研究の過程ではヒトへの副作用が問題となる。本研究では、呼吸鎖複合体というヒトにも保存されたタンパク質でありながら、病原菌特異的な阻害剤を合理的に探索する方法を発見し、最終的には、薬剤耐性淋菌に対して殺菌作用を持つ特異的抗菌薬の発見に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、病原菌では創薬標的として期待が高い呼吸鎖酵素を標的としており、その成果は、学術的のみならず、医療や産業への展開が期待できる。さらに、髄膜炎菌/淋菌酵素でも特異的な阻害剤を発見し、これが薬剤耐性淋菌に対して殺菌作用を持つことを示したことは、申請者の仮説を実証する内容である。以上の結果を論文としてまとめ発表した（Nishida et al. Nature commun., 2022）。

研究成果の概要（英文）：In recent years, there has been a rapid emergence of drug-resistant pathogens. As a countermeasure, the development of antibiotics with new mechanisms is strongly demanded. However, the issue of adverse effects on humans has become a concern. In this study, we developed a rational method to identify pathogen-specific inhibitors that target the respiratory chain complex, which is conserved in humans. Finally, we demonstrated the antimicrobial effect against a clinically isolated super-resistant gonococci.

研究分野：タンパク質機能構造解析

キーワード：シトクロムc酸化酵素 呼吸鎖 薬剤耐性菌 抗菌薬 アロステリック阻害剤 クライオ電子顕微鏡 X線結晶構造解析

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 創薬対象となるヘムタンパク質に対する新規抗菌剤開発の可能性  
病原菌の薬剤耐性(AMR)は世界保健の重要課題であり、その対策として新規メカニズムによる抗菌薬の開発は必須である(図 1)。近年、新たな抗菌薬の標的として呼吸鎖酵素が注目されている (MBio., 2014;8:e00272-17-11)。しかし、多くは基質競合阻害であり、交叉反応によるヒトへの重篤な副作用が問題となっている (Commun. Biol., 2020;3:1-10)。つまり、創薬標的となるような重要な生理機構はヒトにも保存されており、抗菌薬開発ではヒトへの副作用がボトルネックとなる。

(2) 薬理学におけるアロステリックな活性調節部位の優位性と課題  
酵素の活性部位の構造は基質の形に制限されるため、基質が同じ酵素は類似する基質結合部位を持つが、アロステリックな活性調節部位は酵素により異なる。このため、基質競合阻害による薬剤とは異なり、アロステリックな反応機構による薬剤は特異性が高く副作用が少ないことが期待される。しかし同時に、その研究は系統的なアプローチが困難となり、標的タンパク質個々の探索を必要とする。また、多数のタンパク質の立体構造が決定され、計算生物科学的技術が発達してきたにも関わらず、未だアロステリックな活性調節部位の発見やその機構解明は非常に困難であり、創薬手段としては実用的ではなかった (Suel et al., Nat. Struct. Biol. 2003、Lu et al., J. Med. Chem. 2019)。

(3) 呼吸鎖で働くヘムタンパク質の新規アロステリックな活性調節部位の発見  
シトクロム c 酸化酵素 (CcO: cytochrome c oxidase) はミトコンドリア内膜の呼吸鎖で働くヘムタンパク質 (ヘム構造によって鉄原子を維持するタンパク質) である。CcO は、「シトクロム c から供与された電子による酸素の還元」と「ミトコンドリア膜外へのプロトン輸送」を共役する。この反応で形成される膜内外のプロトン濃度勾配は ATP 合成酵素の駆動力となる。  
1930 年台の David Keilin による CcO の同定以降、X 線結晶構造解析や分子動力学計算などを含む多岐に渡る研究手法によりその反応機構の理解は進んできた (Yoshikawa et al., Chem. Rev. 2015、Sharma et al., PNAS. 2017)。しかし、CcO の活性を自在に調節する方法は未だ存在せず、創薬展開可能なアロステリック部位や活性調節化合物は見つかっていなかった。申請者は、これまでに独自の de novo スクリーニングにより CcO の新規アロステリック阻害剤を発見してきた。さらに CcO と新規阻害剤の複合体構造の決定に成功することで、CcO の新規なアロステリックな活性調節部位を発見した。続いて、この活性調節部位を形成するヘム周囲の立体配座が、アミノ酸配列の相同性が低い他のヘムタンパク質においても見出される事実を新たに発見し、“ヘムタンパク質に普遍的なアロステリックな活性調節機構が存在する”という仮説から本研究立案に至った。

### 2. 研究の目的

“申請者が mtCcO で見出したアロステリックな活性調節部位は、アミノ酸配列や機能は異なる他のヘムタンパク質においても普遍的に保たれている”という仮説に基づき、ランダムスクリーニングとは異なる合理的な手法でバクテリアのヘムタンパク質阻害剤を探索する。これによって、“ヘムタンパク質に普遍的なアロステリックな活性調節部位の存在”を証明し、これを利用したヘムタンパク質を標的とする新規抗菌剤を開発する。

### 3. 研究の方法

基質や機能が異なるヘムタンパク質である大腸菌ユビキノール酸化酵素 (Eco UqO) とナイセリア菌一酸化窒素還元酵素 (Nme qNOR) を対象に以下の研究を行った。

(1) バクテリア酵素特異的な阻害化合物の探索  
mtCcO の新規アロステリック阻害剤を query として in silico 化合物構造展開を行い、申請者が仮定する“ヘムタンパク質に普遍的なアロステリックな活性調節部位”に結合することが期待できる自作のカスタム化合物ライブラリを作製した。Eco UqO、並びに、Nme qNOR を単離精製し、その化合物ライブラリをスクリーニングすることで、バクテリア酵素特異的な阻害化合物の探索をおこなった。

(2) バクテリア酵素と阻害剤との複合体構造解析

阻害剤結合部位を検証すること、および、構造的に機能調節機構を解明するために、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって Eco UqO、および Nme qNOR と阻害剤との複合体構造の決定を目指した。

(3) 変異体解析、並びに、分光学的手法による反応調節機構の解明

阻害剤による阻害効果の原理を解明するために、変異体解析、並びに、stopped-flow 分光測定による反応速度論解析をおこなった。

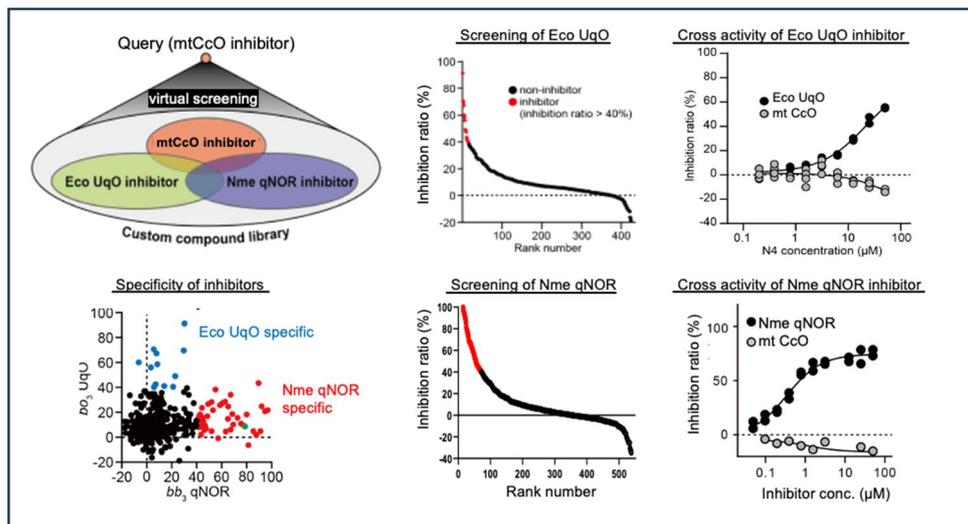
(4) 抗菌剤への応用

得られた阻害剤を用いて、大腸菌、および、淋菌や薬剤耐性淋菌への抗菌薬としての効果を調べた。並行して、ヒト細胞への影響を調べることで、ヒトへの副作用の検証をおこなった。

4. 研究成果

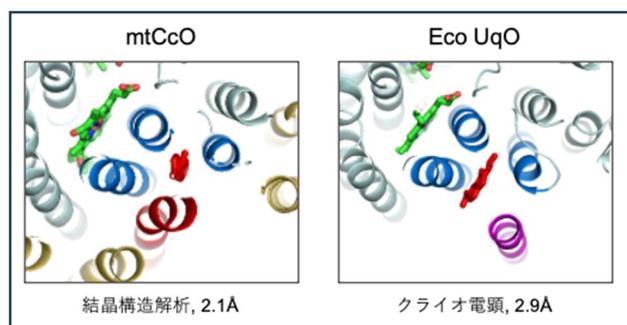
(1) バクテリア酵素特異的な阻害化合物の発見

mtCcO 阻害剤を基にしたカスタム化合物ライブラリに対するスクリーニングの結果、Eco UqO、Nme qNOR いずれにも複数の阻害剤が得られ、Eco UqO では IC<sub>50</sub> 10 μM、Nme qNOR では IC<sub>50</sub> 1 μM 以下の阻害効果を示した。さらに、各酵素に対するクロス反応性を調べたところ、仮説通り、mtCcO だけでなく、他のバクテリア酵素にも作用しない、各々に特異的な阻害剤の発見に至った。



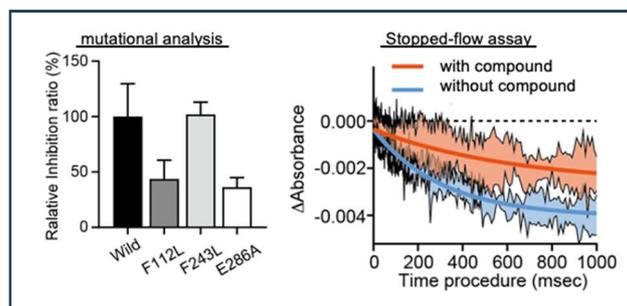
(2) バクテリア酵素と阻害剤との複合体構造決定

得られた Eco UqO 特異的な阻害剤 N4 と Nme qNOR 阻害剤 Q275 を用いて、それぞれの酵素との複合体構造の決定を試みた。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析の結果、Eco UqO では 2.9 Å の分解能で (PDB 7XMD)、Nme qNOR では 1.9 Å の分解能で (unpublished) 複合体構造を決定した。これによって、いずれにおいても阻害剤結合部位は、mtCcO のアロステリック部位と同じ位置であることを証明した。



(3) 新規阻害機構の解明

mtCcO、Eco UqO、Nme qNOR はそれぞれ異なる基質や構造を保つが、本研究で発見した阻害剤による効果が本当に保存されたものであるかどうかを調べた。mtCcO では阻害剤の結合が酸素パスを狭窄する結果が示されていたため、Eco UqO の酸素パスにアミノ酸変異を導入し、阻害剤効果への影響を調べたところ、変異の導入により阻害剤の効果が減弱するものが得



られた。また、mtCc0 と同様の stopped-flow 実験でも binuclear center への酸素の結合が遅延する結果が得られた。これにより、バクテリア酵素にも mtCc0 と同様のアロステリック機構が保存されていることを示した。

#### (4) 薬剤耐性菌にも有効な特異的抗菌薬の発見

最後に、Nme qNOR 特異的なアロステリック阻害剤である Q275 がリン菌そのものに抗菌活性をもつかどうかを調べた。ここでは、野生型のリン菌と、スーパー耐性淋菌としての感染拡大が始まっているセフトリアキソン耐性株を用いた。結果として、Q275 は野生株、薬剤耐性株両方に抗菌作用を示しました。加えて、この効果は一酸化窒素条件下でのみ見られたことから、この殺菌効果がまさしく NOR を標的としており、ノンスペシフィックな効果ではないことも示した。また、Q275 は mtCc0 を阻害しないが、ヒト細胞の呼吸には影響を与えず、また、ヒト細胞の増殖にも影響がないことも示した。

	<u>Growth inhibition</u>		
	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Q275		Ceftriaxone
	Control	NO condition	
WHO_F (WT)	>8	0.064	<0.002
FC428 (AMR)	>8	0.125	0.5

## 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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishida Yuya, Yashirogi Shohei, Nagao Takemasa, Takahashi Yusuke, Qaqorh Tasneem, Yazawa Issei, Katayama Toru, Kioka Hidetaka, Matsui Tsubasa S, Saito Shigeyoshi, Masumura Yuki, Tsukamoto Osamu, Kato Hisakazu, Ueda Hiromichi, Yamaguchi Osamu, Yashiro Kenta, Yamazaki Satoru, Takashima Seiji, Shintani Yasunori	4. 巻 22
2. 論文標題 AMPK regulates cell shape of cardiomyocytes by modulating turnover of microtubules through CLIP170	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	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） 10.15252/embr.202050949	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 Nishida Yuya et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allosteric site from mitochondrial heme-copper oxidases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34771-y	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 Kato Masaru, Sano Ryoya, Yoshida Narumi, Iwafuji Masatoshi, Nishiyama Yoshito, Oka Sayuki, Shinzawa-Itoh Kyoko, Nishida Yuya, Shintani Yasunori, Yagi Ichizo	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Interfacial Interactions on Electrocatalytic Activity of Cytochrome <i>c</i> Oxidase in Biomimetic Lipid Membranes on Gold Electrodes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 9165 ~ 9170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcllett.2c01765	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西田優也
2. 発表標題 Conserved allosteric site in heme-copper oxidases
3. 学会等名 Chem-Bio Informatics Society Annual Meeting 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田優也
2. 発表標題 A novel allostery in cytochrome c oxidase
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田優也
2. 発表標題 呼吸鎖複合体 IV で見出された新規アロステリック活性調節機構
3. 学会等名 第47回 生体分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Nishida, Yasunori Shintani
2. 発表標題 呼吸鎖複合体 IV のコア構造に注目した病原菌特異的抗菌薬の探索
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第48回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Nishida, Yasunori Shintani
2. 発表標題 Conserved allostery in heme-copper oxidases can generate pathogen-specific antibiotics 3.学会等名
3. 学会等名 Cell Symposia: Multifaceted Mitochondria (CMIT2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Nishida, Yasunori Shintani
2. 発表標題 Evolutionally conserved allostery in heme-copper oxidases can generate pathogen-specific antibiotics
3. 学会等名 21st European Bioenergetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

呼吸鎖酵素に隠された阻害機構の解明 病原菌特異的な新規抗菌薬の合理的創出を目指して <a href="https://www.ncvc.go.jp/pr/release/pr_35763/">https://www.ncvc.go.jp/pr/release/pr_35763/</a>
--

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

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