

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32621

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790054

研究課題名(和文) 抗生物質に対する耐性メカニズムの分子構造論的研究と創薬への応用

研究課題名(英文) Structural studies on antibiotic-resistance mechanisms and their application to drug design

研究代表者

近藤 次郎 (Kondo, Jiro)

上智大学・理工学部・助教

研究者番号：10546576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：アミノグリコシドは様々な細菌に対して殺菌効果を示す抗生物質であり、細菌リボソームの活性部位Aサイトに結合することでタンパク質合成の正確性を低下させる。これに対して細菌は、リボソームRNAの1408番目のAをGまたは1-methyl-Aに変異させることで薬剤耐性を獲得する。申請者は本研究で、薬剤耐性菌がもつ変異型リボソームRNAの立体構造をX線結晶解析によって明らかにし、薬剤耐性獲得メカニズムを分子レベルで解明した。さらに得られた構造情報を基に、薬剤耐性菌や感染性原虫にも効く新規薬剤のデザインにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Aminoglycosides are broad spectrum antibiotics acting against a variety of Gram-negative and certain Gram-positive bacteria. Aminoglycosides specifically bind to one of the active sites of the bacterial ribosome called the A site, and disturb the fidelity of the decoding process in protein synthesis. Bacteria acquire high-level resistance against aminoglycosides by mutating the position 1408 of the ribosomal RNA A site, from A to G or 1-methyl-A. In the present study, we have performed X-ray analyses of the ribosomal RNA A sites with these antibiotic-resistant mutations and revealed structural bases for the antibiotic resistance conferred by the point mutations. In addition, we have successfully designed and synthesized a new compound with high activity against antibiotic-resistant bacteria and parasitic protozoa.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：薬剤耐性菌 抗生物質 リボソーム X線結晶解析 ドラッグデザイン

### 1. 研究開始当初の背景

リボソームの活性部位 A サイトに存在する RNA 分子スイッチは、そのコンフォメーションを ON/OFF の間で切り替えることで正しいアミノアシル tRNA を選別して取り込み、正確なタンパク質合成を可能にしている。様々な細菌感染症に対して処方されるアミノグリコシド系抗生物質は、バクテリアの RNA 分子スイッチの ON 状態に特異的に結合してスイッチの OFF への切り替えを妨げ、バクテリアが正確なタンパク質合成を行えないようにして殺菌する。しかしそれに対してバクテリアは、主に以下の 2 つの様式で耐性を獲得する。

1. 修飾酵素による抗生物質の不活性化
2. 抗生物質作用点の RNA スwitch の変異

以前に研究代表者らは、耐性獲得様式 1 による問題を克服するために、抗生物質がどのようにバクテリアの RNA 分子スイッチに作用するのかを X 線結晶解析によって詳しく調べ (Kondo *et al.*, 2007 *Biochimie*)、得られた構造情報を基に Structure-Based Drug Design を行い、従来の抗生物質よりも殺菌効果が高く、しかも修飾酵素によって不活性化されにくい新規薬剤の開発に成功した (Kondo *et al.*, 2007 *ChemMedChem* など 3 報)。以上の研究によって、アミノグリコシド系抗生物質に対する耐性菌問題の一端を克服することができた。しかし、研究開始当初は上述の耐性獲得様式 2 による問題が残っていた。

### 2. 研究の目的

研究代表者は本研究で、上述の耐性獲得様式 2 による問題の克服を目指した。

バクテリアは抗生物質の作用点であるリボソーム RNA 分子スイッチの構成塩基を自ら変異させることによって、自身の生命を維持しながら巧妙に薬剤耐性を獲得する。塩基の変異のさせ方としては、染色体レベルの突然変異 (A1408G 変異など: 図 1) や、メチル化酵素による塩基の修飾 (アデニンの 1 位のメチル化による A1408methyl-A 変異など) が報告されている。

耐性菌がもつ A1408 メチル化酵素については、2010 年に入って結晶構造がいくつか報告された (Macmaster *et al.*, 2010 など)。しかし、変異した耐性型 RNA 分子スイッチそのものの結晶構造を調べ、その働きを分子構造的に明らかにしなければ、耐性獲得様式 2 による問題を根本的に克服することはできないと考えた。

そこで研究代表者は、耐性菌がもつ変異型 RNA 分子スイッチの X 線結晶解析を行い、まずは耐性メカニズムと耐性菌の生命維持メカニズムを分子レベルで解明し、得られた構造情報を基にして耐性菌をターゲットとした新規薬剤の設計・開発を進めることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

薬剤耐性菌がもつリボソーム RNA 分子スイッチの配列 (図 1) を導入した比較的小さな RNA モデル分子を設計・合成して実験に用いた。化学合成した RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動と C18 逆相カラムクロマトグラフィーで精製した。RNA の結晶化は、研究代表者らが独自に開発した「塩溶効果を利用した核酸分子結晶化用スクリーニングキット」(近藤&竹中, 2005) を用いて行った。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の構造生物学ビームラインで行った。構造決定は分子置換法および多波長異常分散法を用いて行った。

構造解析によって得られた結晶構造から RNA 分子スイッチ部分を抽出し、これらを Protein Data Bank に登録されているバクテリア・リボソーム全体の結晶構造の中に当てはめて耐性菌リボソームモデルを作成した。さらに、そのモデルのスナップショットを線形補間によって繋ぎ合わせてスムーズに動く動画を編集することで、耐性型 RNA 分子スイッチの動きを観察した。

以上の実験で得られた耐性型 RNA 分子スイッチの立体構造および動的構造変化の情報を基に新規抗生物質の設計を行った。設計した薬剤の化学合成と薬理効果の検討は、研究協力者であるモントリオール大学 (カナダ) の Stephen Hanessian 教授およびテクニオン工科大学 (イスラエル) の Timor Baasov 教授の研究グループと共同で行った。

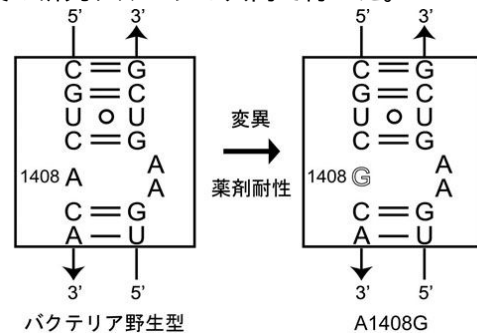


図 1. 野生型と薬剤耐性型スイッチの比較

### 4. 研究成果

#### (1) 薬剤耐性獲得メカニズムの解明 (A1408G 変異をもつ薬剤耐性菌の場合)

まず、臨床現場で最も問題となっている A1408G 変異をもつ薬剤耐性菌を研究対象とした。A1408G 変異型スイッチの ON/OFF 両方の状態の立体構造を解析することに成功した。さらに、断熱モーフィング解析によってスイッチの動的構造変化を観察することにも成功した。

Ring I の 6' 位に  $\text{NH}_3^+$  基をもつアミノグリコシドは、野生型細菌が持つ分子スイッチの A1408 と 2 本の水素結合を介して安定な擬塩基対を形成できるが (図 2) 薬剤耐性菌が持つ変異型分子スイッチの G1408 とは擬塩基

対を形成できないことがわかった。これは、G1408のN1-H、N2-Hとアミノグリコシドの6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基の間で反発が起こるためである。これがA1408G変異による薬剤耐性獲得メカニズムである。また、変異型分子スイッチは野生型スイッチとまったく同じ動き方をすることもわかった。つまり、薬剤耐性菌は自身のRNA分子スイッチの働きを正常に保ったままアミノグリコシドの作用を免れることを明らかにした。

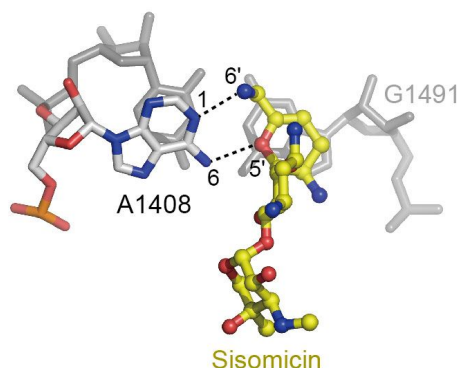


図2. 野生型スイッチのA1408と抗生物質のRing Iとの擬塩基対

#### (2) A1408G変異型分子スイッチに結合する新規薬剤の Structure-Based Design

研究成果(1)に基づいて、A1408G変異型スイッチに結合する新規薬剤の開発を行った。まずアミノグリコシドの中で特に殺菌効果が高いシソマイシンを設計の出発物質として選び、野生型分子スイッチとの複合体の構造を解析した。その結果、シソマイシンの6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基を6'-OH基に置換することでA1408G変異型スイッチにも強く結合しうることがわかった。

次に、設計した新規薬剤 6'-hydroxy sisomicin をモントリオール大学との共同研究で化学合成し、変異型スイッチと共結晶化させて構造を解析したところ、この薬剤が予想通り変異型分子スイッチに強く結合することを確認できた(図3)。さらに、この薬剤が細菌だけでなく感染性原虫に対しても殺傷効果を示すことを明らかにした。

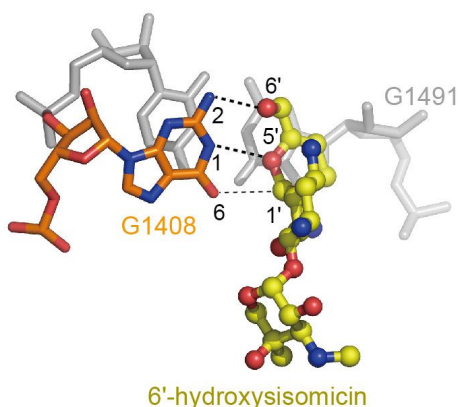


図3. 薬剤耐性型スイッチのG1408と抗生物質のRing Iとの擬塩基対

#### (3) 薬剤耐性獲得メカニズムの解明 (A1408 methyl-A 変異をもつ薬剤耐性菌の場合)

つぎに、A1408methyl-A変異をもつ薬剤耐性菌を研究対象とした。A1408methyl-A変異型スイッチのON/OFF両方の状態の立体構造およびON/OFFスイッチングの動的構造変化を観察することに成功した。

A1408G型薬剤耐性変異の場合と同様に、Ring Iの6'位にNH<sub>3</sub><sup>+</sup>基をもつアミノグリコシドは、野生型細菌が持つ分子スイッチのA1408と安定な擬塩基対を形成できるが、薬剤耐性菌が持つ変異型分子スイッチの1-methyl-A1408とは擬塩基対を形成できないことがわかった。これは、1-methyl-A1408のメチル基とアミノグリコシドの6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基の間で反発が起こるためである。これがA1408methyl-A変異による薬剤耐性獲得メカニズムである。

一方で、G418やパロモマイシンといったRing Iの6'位にOH基をもつ抗生物質は1-methyl-A1408とも擬塩基対を形成することも明らかになり、今後の薬剤設計に有用な情報が得られた。

#### (4) 耐性菌の生命維持メカニズムの解明

上述のA1408GまたはA1408methyl-Aのように、細菌がRNA分子スイッチの1408番目をプリン塩基Aから同じくプリン塩基Gまたは1-methyl-Aに変異させる場合には生命を維持できるが、ピリミジン塩基CやUに変異させると生命を維持できないことが報告されている。そこで、致死型の変異A1408CおよびA1408UをもつRNA分子スイッチの立体構造・動的構造変化を解析し、野生型および薬剤耐性型分子スイッチのそれと比較した。

その結果、薬剤耐性型スイッチ(A1408G、A1408methyl-A)は野生型スイッチと同様のON/OFFスイッチングの動きをするが、致死型スイッチ(A1408C、A1408U)はOFF状態の構造が安定に形成されるためにON状態への構造変化が起こりにくい、つまりはスイッチとしての機能が失われることがわかった。以上のことから、薬剤耐性菌は分子スイッチを巧妙に変異させて、スイッチの働きを正常に保ったまま抗生物質の作用を免れることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Moran Shalev, Jiro Kondo, Dmitry Kopelyanskiy, Charles L. Jaffe, Noam Adir, Timor Baasov. Identification of the molecular attributes required for aminoglycoside activity against *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 2013, 13333-13338. 【査読付】  
DOI: 10.1073/pnas.1307365110

Jiro Kondo, Mai Koganei, Juan Pablo Maiani, Vu Linh Ly, Stephen Hanessian. Crystal structures of a bioactive 6'-hydroxy variant of sisomicin bound to the bacterial and protozoal ribosomal decoding sites. *ChemMedChem*, **8**, 2013, 733-739.【査読付】 DOI: 10.1002/cmdc.201200579

近藤次郎. リボソームの分子進化：A サイト RNA 分子スイッチの動きからの考察. 実験医学増刊号, **31**, 2013, 1011-1017. 【査読なし】

Jiro Kondo, Mai Koganei, Tomoko Kasahara. Crystal structure and specific binding mode of sisomicin to the bacterial ribosomal decoding site. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **3**, 2012, 741-744. 【査読付】 DOI: 10.1021/ml300145y

Jiro Kondo. A structural basis for the antibiotic resistance conferred by an A1408G mutation in 16S rRNA and for the antiprotozoal activity of aminoglycosides. *Angewandte Chemie International Edition*, **51**, 2012, 465-468. 【査読付】 DOI: 10.1002/anie.201106084

〔学会発表〕(計12件)

金澤宏樹、近藤次郎. スترونチウムイオン結合モチーフを持つ特殊な RNA 二重らせんの立体構造. *物構研サイエンスフェスタ2013*, 2014年3月18日~2014年3月19日, つくば国際会議場エポカール(つくば市)

宮崎まい、鉄本環、高橋由紀子、近藤次郎. ヒト・ミトコンドリアリボソーム RNA の結晶多形性と立体構造との相関. 平成25年度日本結晶学会年会, 2013年10月12日~2013年10月13日. 熊本大学(熊本市)

Jiro Kondo, Mai Koganei. Crystal structures of the protozoal cytoplasmic A site in complex with aminoglycosides. *RNA2013 (18th annual meeting of the RNA society)*, 2013年6月11日~2013年6月16日, スイス・ダボス

近藤次郎. X線結晶解析で見る RNA 分子スイッチの「動き」=「働き」. 第63回結晶化学研究会, 2012年12月22日, 東京工業大学(東京都)

Jiro Kondo, Mai Koganei, Tomoko Kasahara, Stephen Hanessian. Towards the structure-based design of antiprotozoal agents: crystal structures of aminoglycosides with an unsaturated sugar ring bound to the ribosomal A sites. *ISNAC2012 (The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry)*, 2012年11月15日~2012年11月17日, 名古屋大学(名古屋市)

近藤次郎. アミノグリコシド系抗生物質に対する薬剤耐性獲得メカニズムの構造基盤. 平成24年度日本結晶学会年会, 2012年10月25日~2012年10月26日, 東北大学(仙台市)

Jiro Kondo. A structural basis for the antibiotic resistance conferred by an A1408G mutation in 16S rRNA. *The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan*, 2012年9月22日~2012年9月24日, 名古屋大学(名古屋市)

近藤次郎. 16S rRNA の A1408G 変異による薬剤耐性獲得の構造基盤. 第14回日本 RNA 学会年会, 2012年7月18日~2012年7月20日, 東北大学(仙台市)

小金井麻衣、笠原朋子、近藤次郎. 細菌リボソーム A サイト-シソマイシン複合体の結晶構造. 第14回日本 RNA 学会年会, 2012年7月18日~2012年7月20日, 東北大学(仙台市)

小金井麻衣、笠原朋子、近藤次郎. 細菌リボソーム A サイト-シソマイシン複合体の X 線結晶解析. 第1回リボソームミーティング, 2012年3月15日~2012年3月16日, 広島大学(東広島市)

近藤次郎. アミノグリコシド系抗生物質に対する耐性獲得メカニズムの構造基盤. 第1回リボソームミーティング, 2012年3月15日~2012年3月16日, 広島大学(東広島市)

Jiro Kondo. Structural basis for antibiotic resistance conferred by an A1408G mutation in 16S rRNA. *ISNAC2011 (The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry)*, 2011年11月9日~2011年11月11日, 北海道大学(札幌市)

〔図書〕(計2件)

Jiro Kondo, Claude Sauter & Benoît Masquida. RNA crystallization. In Roland K. Hartmann, Albrecht Bindereif, Astrid Schon & Eric Westhof (eds.), *Handbook of RNA Biochemistry, second edition*. Wiley VHC, 481-498. (2014).

Jiro Kondo & Eric Westhof. Aminoglycoside antibiotics: structural decoding of inhibitors targeting the ribosomal decoding A site. In Claudio O. Gualerzi, Letizia Brandi, Attilio Fabbretti & Cynthia L. Pon (eds.), *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Wiley VHC, pp. 453-470. (2013).

〔その他〕

（報道記事：計2件）

Biotechdaily - Online bioresearch news -  
（2013年8月20日）“Light shed on  
differential effectiveness of aminoglycosides  
against parasitic protozoa”

化学工業日報（2011年12月12日）「上  
智大 細菌の抗生物質耐性獲得メカニズ  
ム解明 新薬の設計・開発に応用も」

（プレスリリース：計1件）

上智大学プレスリリース（2011年12月5  
日）「細菌のアミノグリコシド系抗生物質  
に対する耐性メカニズムを分子レベルで  
解明～耐性菌が抗生物質を免れる分子メ  
カニズムを世界で初めて明らかに～」

<https://www.sophia.ac.jp/jpn/content/download/22110/.../file/111205press.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 次郎 (Jiro KONDO)

上智大学・理工学部・助教

研究者番号：10546576

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者

Stephen Hanessian

モントリオール大学 教授

Timor Baasov

テクニオン工科大学 教授