

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「異物排出輸送の構造的基盤解明と阻
害剤の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成31年3月

研究代表者：山口明人
(大阪大学産業科学研究所、特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

薬剤耐性菌(AMR)問題は世界的に大きくクローズアップされてきており、AMR に関するグローバルアクションプランが作成されるに至っている。なかでも、多剤耐性腸内細菌(CRE)や多剤耐性緑膿菌(MDRP)などのグラム陰性多剤耐性菌には、臨床的に有効な薬剤がないことは大きな問題である。これらグラム陰性多剤耐性の大きな原因は RND 型と呼ばれる外膜チャネルと共役した多剤排出ポンプの高発現である。多剤排出ポンプ阻害剤が多剤耐性菌問題の解決に有効であることは世界的に注目され、ランダムスクリーニングにより阻害剤が報告されているが臨床的に使えるものではなく、大変難しい創薬標的と言える。

私たちのグループは世界に先駆けて多剤排出タンパクの構造決定に成功し、多剤排出機構の概要を解明した(*Nature* 2002, 2006, 2011)。本プロジェクトはその実績の上に立ち、多剤排出機構の詳細解明のためのさらなる構造解明と、構造を元にした多剤排出ポンプ広域阻害剤の創薬を目指して開始した。

本プロジェクト開始早々の成果として、大腸菌多剤排出ポンプ AcrB ならびに緑膿菌多剤排出ポンプ MexB とこれらの狭域阻害剤 ABI-PP との結合構造決定に成功し、SBDD のための基礎を確立した(*Nature* 2013)。次に、ABI-PP を出発物質として、緑膿菌のもう一つの主要排出ポンプで ABI-PP が阻害できない MexY も阻害する広域阻害剤を SBDD によって創薬することを目指した。100 種類以上の有機合成展開の結果、有力な広域阻害剤 H31 とその関連化合物を得た。H31 は臨床分離多剤耐性緑膿菌株ライブラリに対しても、既知抗菌薬との併用で抗菌力を復活させる大きな効果のあることが確かめられ、臨床薬開発に向けて大手製薬会社との共同研究体制を確立した。

多剤排出ポンプは、外膜チャネル及びアダプタータンパクとの複合体として機能する。しかし、複合体は極めて不安定である。本プロジェクトでは AcrB-AcrA リンカータンパクを作成し、TolC との間で S-S 架橋により結合を安定化させる部位特異変異導入を行って、複合体の結晶構造解析を試みた。その過程で、英国の研究室よりクライオ電顕を用いた AcrAB-TolC3 者複合体構造が報告された。結果はそれまで考えられていた AcrA:B:TolC 3:3:3 構造ではなく、6:3:3 構造で、AcrB と TolC の中間に AcrA による tube 構造があるというものだった。これは、これまでの多くの研究室から出された分子生物学的知見とは整合性がない。私たちは AcrA-AcrB 1:1 リンカータンパクが活性を持つことを見だし、cryo 電顕による構造に疑義を投じた(*J. Bacteriol.* 2015)。TolC とリンカータンパクの複合体を得るのに大変手間取ったが、ようやく電顕像で 3 者複合体が観察される段階に至り、報告書作成には間に合わなかったが、研究終了までには 3 者複合体結晶を作成して構造決定するべく全力を尽くす。

多剤排出ポンプの基質結合構造決定は大変難しいが、本プロジェクト開始後、大分子量化合物 LMNG との結合構造を決定した。予想に反し、これまで小分子量基質の結合領域と推定していた遠位結合ポケットに結合していた。多剤認識の分子メカニズムの全貌が徐々に解明されつつある。また、多剤認識に寄与するものとして私たちは複数の基質輸送チャネルの存在を指摘していたが、本プロジェクトではじめて、それぞれのチャネルの使い分けに関する証拠を発見した。薬剤の排出はプロトン輸送と共役した能動輸送で、両者の輸送部位は約 50 Å 離れた遠隔共役である。そのコンホメーション共役の途中に、 α ヘリックスとランダムコイルを交互変換することで長さを変え、サブドメインの相対運動を可能にする蝶番の存在とその柔軟性を明らかにした(*Frontiers in Microbiology* 2017)。多剤を認識する上で 2 つのマルチサイト結合ポケットと 3 つのエントランス・パスを持つことが大きく貢献している。しかし、これまで複数のエントランスがどのように使い分けられているかについては全く知見がなかった。私たちは初めて、特定のエントランスを通る薬剤とその透過機構を明らかにした(*Nature Communications* 2018)。

タンパク質動態解析により、AcrB と TolC の水平方向の運動性を解析した。TolC は膜に固定されており、AcrB は水平方向に拡散運動していた。TolC 欠損株では AcrB の運動が速くなることから、両者は結合解離を繰り返していることがわかる。予想と違っていたのは、低分子量の基質および阻害剤を加えても AcrB の運動性に変化がなかった。基質を結合して初めて複合体形成すると

いう機構ではないと思われる。この結果は、cryo 電顕研究者からの、基質無しで AcrB3 量体に 3 回対称がある状態でも TolC との複合体が存在するという知見とも一致する。基質の結合は複合体形成には無関係で、TolC チャンネルの開閉にだけ関与しているということになる。

追加研究の中で、異物排出タンパクの進化についても研究し、重要な事実が明らかになった。進化により異物認識スペクトルの拡大は一切見られず、進化で獲得したのは、当該生物の生育に貢献する特定の化合物の排出能の強化であった。これは、異物の認識は、特異的な認識を伴わない認識であり、排出基質の選択は複数の基質取り入れ口へ到達できる化合物の物理化学的性質のみに依存すること、入口に到達した基質は基質輸送チャンネルとポケットの蠕動運動により、特定の基質結合を伴わない **occluded form** として排出輸送されることを示唆している。これまでに特定されたマルチサイト結合は、特定の基質に対する強化された排出輸送を反映しているものと解釈される。異物の認識は、生物発生当初から組み込まれた細胞膜の能動的透過障壁の一部である。

富士フィルムとの広域阻害薬開発共同研究では、新たな MexY 特異的化合物と、MexBY 両方とも阻害する化合物が見つかり、それらを元に構造展開して阻害活性を高めてきている。CREST 研究終了後も、本研究の共同研究者であった西野邦彦教授が新たな代表者となり、富士フィルムに加えて、クライオ電顕を構造決定に取り入れるため、阪大蛋白研中川研究室も加わって、新たな異物排出阻害剤共同研究契約を 2019 年度から締結することになった。

本研究により、鍵と鍵穴の関係と言われる酵素-基質関係への大きな挑戦としての多剤排出の分子機構解明に向けて前進した。広域阻害剤については、臨床薬開発に向けた共同研究体制を構築することができ、本プログラム終了後も研究続行できる目処が付いた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 多剤排出ポンプとその阻害剤の結合構造決定:大腸菌 AcrB 及び緑膿菌 MexB と狭域阻害剤 ABI-PP との結合構造を決定し *Nature* 誌に報告した(2013)。部位特異変異導入と組み合わせ、ABI-PP がもう一つの緑膿菌主要排出タンパク MexY を阻害できない構造的原因を明らかにした。これは RND 型多剤排出ポンプ阻害剤結合構造として初めてであり、阻害剤の SBDD による創薬を初めて可能にする成果である。

2. 多剤認識・排出機構の解明:2 つのマルチサイト結合ポケットの使い分けは、これまで分子量によるものと考えられてきたが、大分子量基質(LMNG)が遠位ポケットに結合することを示し、分子量ではなく、分子の形に依存することを解明した。3 つのエントランスの使い分けについては、はじめて特定のエントランスのみを使う化合物群を同定し、その特徴と輸送機構を解明した(*Nature Communications* 2018)。また、遠隔コンホメーション共役の途中に、構造変化の伝達を可能にする柔軟なヒンジ構造を発見し、その運動を可視化した(*Frontiers in Microbiology* 2017)。

3. 3 者複合体構造決定に向けた AcrAB リンカータンパク構築と TolC との S-S 架橋による複合体安定化: 結晶解析による 3 者複合体構造決定一歩手前まで近づいた。残る 1 年で、結晶構造解析まで全力を挙げて取り組む。この過程で、AcrA-AcrB 1:1 リンカータンパクに排出活性があることが証明され、cryo 電顕で報告された AcrA:AcrB:TolC 構造が果たして活性構造かどうか疑問を提出した。cryo 電顕には画像を選別する段階で一定の恣意性があり、客観的構造かどうかには結晶構造の知見がやはり必要である。

4. AcrAB-TolC3 者複合体のタンパク質動態解析:FDAP 解析により、TolC はペプチドグリカンに固定され、AcrB はこれと解離会合を繰り返しつつ水平拡散運動していることが明らかになった。定説と異なり、複合体形成に基質結合は無関係で、複合体形成されたときに基質が結合していればその時点で TolC チャンネルが開いて基質が排出されるというメカニズムが明らかになった。cryo 電顕で報告されていることと合わせて考えると、基質の結合は複合体形成にではなく、TolC チャンネルの開閉の引き金になると推定される。

5. 異物排出輸送体の進化について新たな知見:進化的に古いAcrBと新しいAcrBを比較することにより、進化により異物排出スペクトルが拡大した事実はなく、進化により獲得されたのは特定の異物に対する強化された排出能であるということがわかった。異物の認識は「認識しない」で排出すること。異物が複数の入口に到達できる物理的性質にのみ依存して選別しているとの仮説が考えられる。これは、タンパク質の鍵と鍵穴の関係という基質認識原理に対するまさに大きな挑戦である。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 基質結合構造に基づくSBDDと有機合成展開の結果、有力な広域阻害剤H31を得、臨床阻害薬創薬に向けた、製薬会社との共同研究体制の確立:狭域阻害薬ABI-PPの構造を出発点とし、ABI-PPとMexBとの結合構造、MexYのホモロジー構造を元に設計展開し、100種類以上の合成展開の結果、広域阻害剤H31を得た(特願2015-238703)。これを元に製薬会社と臨床薬開発のための共同研究を行っている。多剤排出ポンプ阻害剤だけでなく、広く抗菌薬全体としてもまだSBDDにより創出された臨床薬は無い、先駆的な研究である。

2. MexY基質結合部位構造決定に向けての前進:これまでにMexY単独阻害剤は報告されていない。私たちのSBDDでも、MexY構造が未決定であることが大きな障害であった。本研究でMexY構造を決定したが、不活性な単量体であり、TolCドッキングドメインが崩壊していた。このため、ドッキングドメインのみをMexBで置換した活性なキメラ体を構築し、残る1年でMexY基質結合領域決定に全力を挙げる。これが決まれば、広域阻害剤SBDDのための大きな武器となる。

3. 多剤排出タンパクの内在的基質及び生理的役割の解明:細菌細胞間情報伝達物質エンテロバクチンの排出に関係するRND型排出ポンプを特定。また、バイオフィーム形成にも多剤排出ポンプが関与することを解明した。これらの知見は、RND型排出ポンプの活性コントロールによって、菌の病原性を低下させたり、新たな感染治療法を創出したり、腸内細菌叢をコントロールすることにもつながる有用な知見と言える。

§2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①「構造・排出輸送研究」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
山口 明人	大阪大学産業科学研究所	特任教授	H24.10～
中島 良介	同上	助教	H24.10～H25.3
同上	同上	特任准教授	H25.4～
櫻井 啓介	同上	特任助教	H24.10～H25.3
同上	同上	特任助教	H25.4～H30.3
西野 邦彦	同上	教授	H24.10～
韓 珍珉	同上	技術員	H24.10～H30.3
北川 公恵	同上	技術員	H24.10～H30.3
Martijn Zwama	同上	D1～3	H27.4～H30.3
林 克彦	同上	M1～D3	H24.10～H29.3
同上	同上	CREST 研究員	H29.4～H29.5
中尾 香	同上	B4	H29.4～
山崎 聖司	同上	D1～3	H24.10～H27.3

山崎 優	同上	M2	H24.10～H25.3
五十嵐 綾	同上	技術員	H27.2～H27.4
松本 崇	株式会社リガク	研究員	H24.10～H30.3

研究項目

- ・異物排出輸送の構造的基盤解明と阻害剤の開発

②「有機合成研究」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
加藤 修雄	大阪大学産業科学研究所	教授	H24.10～H29.3
同上	同上	特任教授	H29.4～
樋口 雄介	同上	助教	H25.10～H29.3
同上	同上	同上	H29.4～
新田 孟	同上	助教	H24.10～H27.3
同上	同上	特任研究員	H27.4～H29.3
同上	同上	特任研究員	H29.10～(予定)
井上 雄太	同上	M1～M2	H24.10～H26.3
同上	同上	D1	H26.4～H27.3
同上	同上	D2～D3 学振特別研究員	H27.4～H29.3
福岡 宇紘	同上	技術補佐員	H25.4～H25.7
古澤 秀明	同上	技術員	H25.4～H27.3
阿字地 佳納子	同上	技術補佐員	H29.4～H29.7

研究項目

- ・異物排出タンパクに対する広域阻害剤の分子設計および化学合成

③「タンパク質動態解析」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
松田 知己	大阪大学産業科学研究所	准教授	H24.10～H30.3
永井 健治	同上	教授	H24.10～H30.3
新井 由之	同上	助教	H24.10～H29.7
吉田 邦人	同上	特任研究員	H25.4～H30.3

研究項目

- ・異物排出タンパク質及び排出薬剤の動態解析

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

- ・大阪大学創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業
- ・東京大学創薬オープンイノベーションセンター
- ・国内製薬企業との共同研究契約の締結(平成 28 年 5 月 25 日)
- ・国際共同研究

香港大学 生物科学学院(多剤耐性緑膿菌分離株、大腸菌分離株の解析)

- フランス国立農学研究所(サルモネラ薬剤耐性株の解析)
- 国内共同研究
 - 日本薬科大学 薬学部(多剤耐性アシネトバクターの解析)
 - 愛知学院大学 薬学部(多剤耐性緑膿菌トランスポーターの解析)
 - 東京大学大学院 工学系研究科(トランスポーター排出活性の一分子解析)