

プレスリリース 令和元年9月20日

多剤耐性菌による感染症克服を目指した 新しいタイプの抗菌薬の創出に向けて

学校法人 岩手医科大学

学校法人 昭和大学

国立大学法人 長岡技術科学大学

独立行政法人国立高等専門学校機構 長岡工業高等専門学校

国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構

研究成果のポイント

2050年には多剤耐性菌(AMR)による感染症の死者ががんによる死者を超えると言われています。抗菌薬は、細菌の増殖や生育に必要な酵素やタンパク質の働きや、細胞壁の合成を抑えることで抗菌薬として作用しますが、これらの作用を利用した抗菌薬が効かない細菌が増えてきています。そして、幅広い細菌に有効な抗菌薬は多剤耐性菌の蔓延を加速する恐れがあります。従って、これまでの抗菌薬とは全く異なる仕組みの抗菌薬を開発することが薬剤耐性菌に対する切り札となります。

多剤耐性菌や歯周病菌のうち、糖非発酵グラム陰性細菌(NFGNR)は、糖やでんぶんなどの炭水化物などの炭水化物ではなく、タンパク質やペプチドなどを栄養源とする特徴を有し、その多くは既存の抗菌薬を分解する β ラクタマーゼの産生、抗菌薬が細胞壁の外膜を透過しにくいという性質によって複数の抗菌薬に対して抵抗性を有しています。

本研究では、このNFGNRの持つタンパク質やペプチドを栄養源とする他の細菌にはない仕組みを利用して、NFGNRに対して特異的に作用する抗菌薬の開発を目指しています。

NFGNRは、「ジペプチジルアミノペプチダーゼ(DPP)」という酵素を使って栄養源であるペプチドを分解して細菌内に取り込んでいます。DPPは、ヒトにも存在する酵素ですが、DPPにはいくつか種類があり、微生物にのみ存在する微生物DPP7、微生物DPP11が細菌の増殖や生育にとって重要なことが明らかにされています。

概要

今回、岩手医科大学薬学部の阪本泰光准教授、關谷瑞樹助教、昭和大学薬学部の田中信忠准教授、合田浩明教授、長岡技術科学大学の小笠原涉教授、長岡工業高等専門学校の鈴木義之特命助教、JAXAの山田貢主任研究開発員らの研究グループは、2015年に発表した歯周病菌DPP11の立体構造の解明に続き、DPP11と化合物複合体の立体構造に基づくドッキングシミュレーションによって、歯周病菌の増殖を抑制する化合物を見出しました。また、その化合物は、多剤耐性菌DPP11の働きも阻害し、代表的な微生物である大腸菌の増殖には影響がなく、歯周病菌に強く作用することを明らかにしました。

本研究は、歯周病菌や多剤耐性菌などの糖非発酵性病原菌に対して、これまでにない仕組みで作用するNFGNRに特異的な抗菌薬の開発に結びつくと考えられます。また、その細菌選択性は多剤耐性菌の出現を遅らせ、既存の抗菌薬を使用できる期間の延長にも貢献すると考えられます。

なお、本研究成果は2019年9月19日18時(英国時間10時)に
Scientific Reports(Nature Research)に掲載されました。

<http://www.nature.com/articles/s41598-019-49984-3>

研究背景

歯周病は人類最大の感染症で、歯周病の一種である慢性歯周炎の原因となる細菌である *Porphyromonas gingivalis* は糖やデンプンなどの炭水化物ではなく、タンパク質やペプチドなどを栄養源とする糖非発酵性細菌(NFGNR)の一類です。糖非発酵性細菌は外部からの栄養源であるタンパク質やペプチドを分解し栄養としているため、ペプチドを分解する酵素である「ジペプチジルアミノペプチダーゼ(DPP)」類が細菌の増殖や生育にとって重要です。DPP 類は、微生物からヒトに幅広く存在し、タンパク質やペプチドの分解といった働きだけでなく、血糖の調節など生物の様々な機能にも関与し、そのアミノ酸配列や機能などからいくつかの種類に分けられます。

微生物にのみ存在するファミリーS46 という仲間に属する DPP として微生物 DPP7、微生物 DPP11 が知られ、これらの DPP 類はグラム陰性菌の細胞壁の外膜と内膜の間に存在するペリプラズム内においてオリゴペプチドからジペプチドを産生します。産生されたジペプチドは、内膜に存在する POT(Proton-dependent oligopeptide transporter)によって、アミノ酸単体よりも優先的に細菌内に取り込まれ、栄養素や酵素および生体内器官の原料として用いられます。このことから、微生物 DPP 類は NFGNR の生育に非常に重要な酵素であると考えられます。

研究成果

我々は、歯周病菌由来 DPP11 の立体構造を 2015 年に明らかにしました。

今回の研究では、ある種の低分子化合物と DPP11 との複合体の高分解能構造を利用した *in silico* 阻害剤探索により、歯周病菌由来 DPP11 の働きを妨げ抗菌効果を有する化合物の探索を進め、歯周病菌に対して選択的に作用する抗菌効果を有する化合物 SH-5 並びにその脂溶性類似体 NPPB を見出しました(図 1)。これら 2 つの化合物は、歯周病菌 DPP11(PgDPP11)、多剤耐性菌 DPP11 (SmDPP11) の働きを抑えました(表 1)。また、この 2 つの化合物は歯周病菌の増殖も抑制し、NPPB は $1 \mu\text{M}$ で約 90% も歯周病原菌の増殖を抑える一方、他の代表的な微生物である大腸菌の増殖には影響を与えませんでした。このことから NPPB のような、SH-5 に対する様々な構造修飾された化合物は高い抗菌活性と微生物特異性を有することが示唆されました。

酵素	SH-5		NPPB	
	残活性	Ki(μM)	残活性	Ki(μM)
PgDPP11	62.9	8.45	70.3	15.0
SmDPP11	48.0	24.9	67.7	84.8
PgDPP7	54.4	52.2	159	ND
SmDPP7	72.8	36.6	119	ND

表 1

社会的意義

カルバペネム系や第三世代セフェム系などの広域抗菌薬の使用は、耐性菌の出現を誘導します。病原菌の耐性化を防ぐには、起因菌の特定とその起因菌に有効な狭域抗菌薬の使用が重要です。現在、歯周炎治療に使われているマクロライド系抗菌薬は広域抗菌薬であり、耐性菌の出現が危惧されています。歯周炎治療に用いられる抗菌薬に対する耐性菌の出現は歯周炎だけでなく、他の感染症に対しても治療の選択肢を減少させることとなります。本研究は、慢性歯周炎の原因菌だけでなく、糖非発酵性の病原菌を標的とする新たな作用機序を有する抗菌薬の開発に結びつくことが期待されます。そして、これらの糖非発酵性細菌を対象とする抗菌薬は、2005 年に米国感染症学会により抗菌薬の適正使用を企図して提唱された「de-escalation」という「広域抗菌薬の使用を可能な限り避け、適切な狭域抗菌薬の使用により耐性菌の出現を防ぐ治療」に貢献すると考えられます。

研究の実施体制について

本研究は、岩手医科大学薬学部構造生物薬学分野の阪本泰光准教授を代表とする JAXA の高品質タンパク質結晶生成宇宙実験の一環として行われ、ISS「きぼう」日本実験棟で結晶化することで、結晶品質が大幅に改善しました。

この宇宙実験で得られた結晶を利用して測定された高分解能のデータは、DPP11 と化合物複合体の構造決定とその結合機構の解明、さらにそれらの情報を利用した

in silico 阻害剤探索に大きく貢献しました(図 1)。

具体的には、

(1)高分解能解析により標的酵素の活性部位に結合している低分子化合物のみならず

周囲のイオンや溶媒分子の位置を曖昧なく決定することができ、

(2)それらに基づいて設定したファーマコフォア(*in silico* 探索の手掛かりとなる化学的性質)を利用した *in silico* 探索(図 1)によりヒット化合物 SH-5 を発見し、

(3)標的酵素と SH-5 との複合体結晶についても ISS における結晶化で質の改善に成功し、標的酵素に対する結合様式を実験的に明らかにすることができました(図 2)。

本研究は昭和大学薬学部の田中信忠准教授、合田浩明教授、長岡技術科学大学工学部の小笠原渉教授、長岡工業高等専門学校の鈴木義之特命助教、JAXA 山田貢主任研究開発員らとの共同研究により行われ、科学研究費補助金、武田科学振興財団、私立大学研究ブランディング事業、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム、大阪大学蛋白質研究所共同研究員制度、長井記念薬学研究奨励の支援により行なわれました。

データ収集は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー(つくば)、大型放射光施設の SPring-8(播磨)を利用して行われ、X 線結晶構造解析による立体構造解析にはそれらの利用が不可欠でした。

■ 用語解説

1. 國際宇宙ステーション(ISS)「きぼう」日本実験棟:

地上約 400km 上空に建設された、人類史上最大の宇宙施設である国際宇宙ステーション(ISS)にある日本初の有人実験施設。船内実験室と船外実験プラットフォームの 2 つの実験スペースからなり、微小重力環境や宇宙放射線などを利用した科学実験、宇宙空間を長期間利用する実験や天体観測・地球観測が行われています。

2. ペプチド

アミノ酸とアミノ酸が 2 個から数十個つながった化学物質で、タンパク質の分解過程で作られる他、ホルモン、神経伝達物質、抗菌物質などさまざまな機能を持つ分子として生体内で重要な役割を果たしている。歯周病原因菌はタンパク質を菌体外で分解し、ペプチドを生成し、細胞壁にある DPP がペプチドを分解して栄養源としている。

3. 糖非発酵グラム陰性細菌(NFGNR):

細菌の性質に応じた分類の一つで、デンプンなどの炭水化物、ブドウ糖を分解してエネルギーを得る大腸菌などの細菌は発酵性細菌に分類され、タンパク質やペプチドを分解してエネルギーを得る細菌が糖非発酵グラム陰性細菌に分類されます。本研究で着目している S46 ペプチダーゼを持つ代表的な糖非発酵グラム陰性細菌には、歯周病原因菌の *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* や多剤耐性菌の *Stenotrophomonas maltophilia* などがあります。

4. Å(オングストローム):

100億分の1メートル(10^{-10} m)。最も小さい原子である水素の半径が 1.2 Å。

論文情報

論文名

Fragment-based discovery of the first nonpeptidyl inhibitor of an S46 family peptidase

著者名 阪本泰光¹、鈴木義之^{2,3}、中村彰宏²、渡邊友里江⁴、關谷瑞樹¹、六本木沙織¹、櫛引千里¹、飯塚一平¹、谷修⁵、阪下日登志⁵、伊中浩治⁶、田仲広明⁷、山田貢⁸、大田和敬⁸、本間宣之²、志田洋介²、小笠原渉²、中西真弓¹、野中孝昌¹、合田浩明⁴、田中信忠^{4,9}
(1 岩手医科大学薬学部、2 長岡技術科学大学、3 長岡工業高等専門学校、4 昭和大学薬学部、
5 産業技術総合研究所、6 丸和栄養食品、7 コンフォーカルサイエンス、
8 宇宙航空研究開発機構、9 昭和大学分子分析センター)

雑誌名 Scientific Reports サイエンティフィック リポート (Nature Research)

DOI doi:10.1038/s41598-019-49984-3

<http://www.nature.com/articles/s41598-019-49984-3>

オンライン公表日時 2019年9月19日(木)10時(英国:10時、日本:18時)

問い合わせ先

(研究全般に関するお問い合わせ)

岩手医科大学薬学部構造生物薬学分野 準教授 阪本 泰光 (さかもと やすみつ)
電話 019-651-5111 メール sakamoto@stbio.org
岩手医科大学薬学部機能生化学分野 助教 關谷 瑞樹 (せきや みづき)
電話 019-651-5111 メール sekiyam@iwate-med.ac.jp

昭和大学薬学部/分子分析センター 準教授 田中 信忠 (たなか のぶただ)
電話 03-3784-8063 メール ntanaka@pharm.showa-u.ac.jp

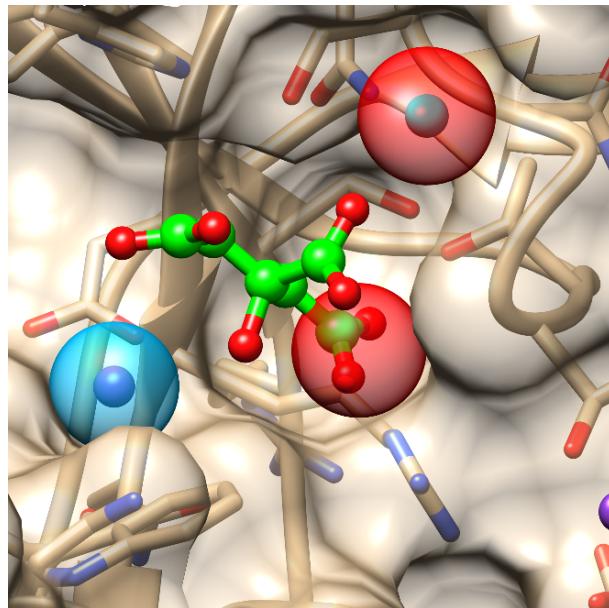
長岡技術科学大学生物資源工学研究室 教授 小笠原 渉（おがさわら わたる）
研究員 中村 彰宏（なかむら あきひろ） 電話 0258-47-9120
メール owataru@vos.nagaokaut.ac.jp(小笠原)s131073@stn.nagaokaut.ac.jp(中村)

長岡工業高等専門学校専攻科 特命助教 鈴木義之（すずき よしゆき）
電話 0258-34-9389 メール yoshis@nagaoka-ct.ac.jp

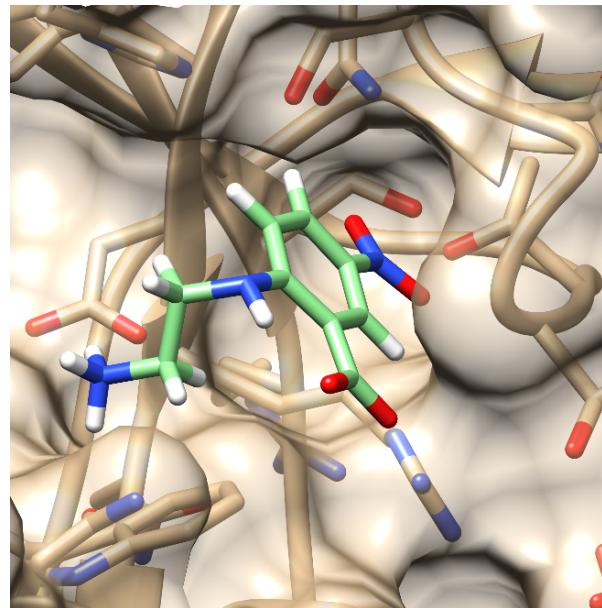
(国際宇宙ステーションを使ったタンパク質結晶生成実験に関するお問い合わせ)



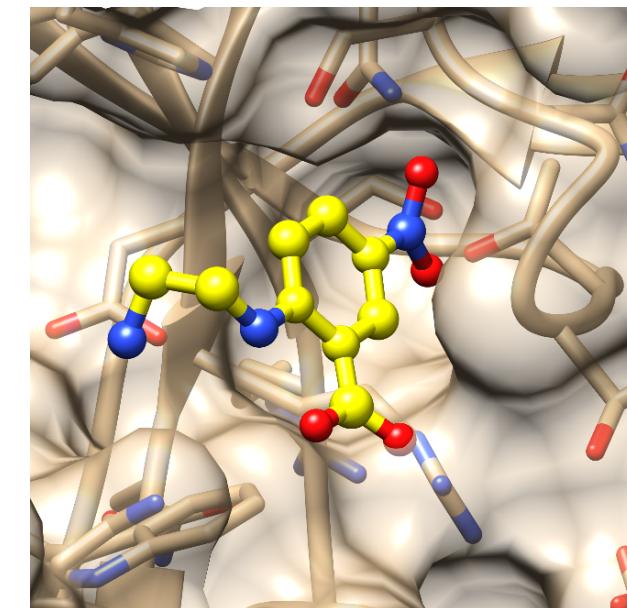
図1 本研究における *In silico* 阻害剤探索の流れ



標的酵素と低分子化合物との複合体の高分解能結晶構造を利用したファーマコフォア設定
(ISS育ちの高品質結晶を利用)



市販化合物データベースを利用した*in silico*阻害剤探索
及び*in silico*結合様式解析



標的酵素とヒット化合物との複合体の結晶構造解析による結合様式の検証
(ISS育ちの高品質結晶を利用)

図2 X線結晶構造解析と*in silico*探索の相補的活用