

「ユビキチンリガーゼを利用した病原細菌タンパク質分解誘導剤の開発」

兵庫県立大学大学院理学研究科

水島 恒裕

1 研究の背景と目的

病原細菌による感染症は、多剤耐性菌の症例が増加し、有効なワクチンも限られていることから大きな問題となっている。また、既存抗生剤には腸内細菌叢の破壊等の問題もあり、既存抗生剤とは作用機序が異なる細菌感染治療薬の開発が求められている。しかし薬を飲み続ける必要がある慢性疾患とは異なり、治療が短期間で終わる急性感染症用の薬の開発は活発ではなく、新たな抗菌剤の開発は重要な課題である。

ユビキチン化修飾は細胞内の多様な生命現象の制御に関わる翻訳後修飾であり、ユビキチンリガーゼ(E3)は標的タンパク質を特異的にユビキチン化することで、タンパク質分解へと導く機能を持つ。Proteolysis targeting chimera (PROTAC) 技術は、E3 とがん等の原因分子を、それぞれに特異的に結合する化合物とリンカーを介して連結し、標的タンパク質を人為的ユビキチン化により排除する創薬モダリティである。

病原細菌は感染の際に宿主細胞内に病原因子(エフェクター)を分泌し、宿主の防御応答を阻害している。また、病原細菌自身はユビキチン経路を持たないが、宿主のユビキチンやユビキチン経路の酵素を利用して、防御応答に関わる宿主タンパク質をユビキチン化する E3 活性を持ったエフェクターが存在しており、宿主タンパク質をユビキチン化することにより、プロテアソームによる特異的タンパク質分解経路へと導いている。病原細菌で報告されている E3 には Novel E3 ubiquitin ligase (NEL)型や病原細菌の HECT 型 E3 があり、これらは共に、真核生物の E3 とは異なる構造をとっている。

我々はこれまでに、哺乳類には存在しない病原細菌に特異的な NEL 型 E3 である赤痢菌 IpaH1.4 とサルモネラ菌 SspH2 を用いた化合物スクリーニングを行い、両分子に共通に結合する化合物を見出している。さらに、IpaH1.4 NEL ドメイン(2.45Å 分解能) (図 1)、SspH2 (2.2Å 分解能)の単独状態の結晶構造解析に成功している。そこ

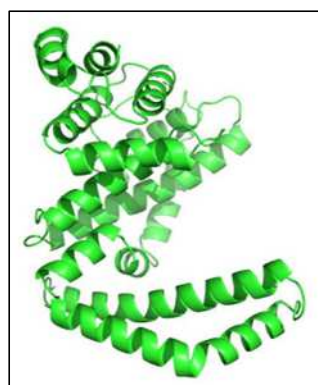


図 1. IpaH1.4 NEL の結晶構造

で、本研究では PROTAC 技術を用い、病原因子を病原細菌 E3 と連結することでユビキチン化し、分解により除去する抗菌剤の開発を目指し、病原細菌 E3 と特異的結合化合物の複合体構造解析と化合物の最適化による、新規抗菌剤開発のための基盤構築を目的とした (図 2)。PROTAC 技術を用いた病原因子の特異的分解による抗菌剤の開発は新規な概念であり、標的とする病原細菌 E3 はヒトの E3 と相同性を持たず、感染細胞でのみ機能を果たすことから標的外の

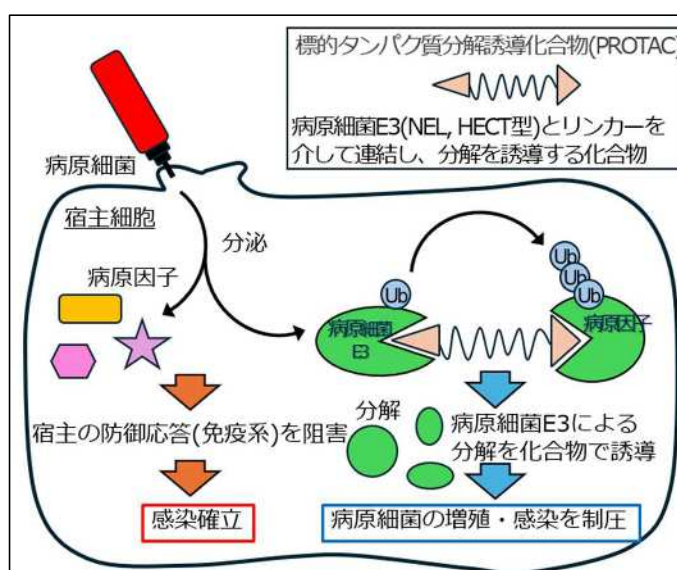


図 2. 研究目的

作用や副作用が低い。さらに、既存薬とは作用機序が異なることから既存抗生剤の効かない多剤耐性菌にも効果を持ち、標的とする病原因子として細菌の増殖に直接関係しないものを選択することで、耐性菌の発生を抑制する効果も期待できる。

2 研究方法・研究内容

病原細菌の NEL 型や HECT 型 E3 は耐性菌の出現が問題となっている緑膿菌等、さまざまな病原細菌に存在しており、哺乳類の E3 とは異なる構造をとる。そこで、本研究では新規抗菌剤開発の基盤とするため、(1)~(3)の項目で研究を行った。

(1) 赤痢およびサルモネラ菌 NEL 型 E3 と特異的結合化合物(CompA)の複合体構造解析

IpaH1.4 と SspH2 に共通に結合する特異的結合化合物(CompA)を用い、IpaH1.4 NEL ドメイン、SspH2 との複合体結晶化を行ったが、化合物が難水溶性であるため、溶媒に用いた DMSO により結晶の崩壊が起こり X 線回折データの収集が困難であった。そこで、CompA に PROTAC として使用する際に病原因子と連結するために用いるリンカーを付加することで水溶性を高めた化合物(CompA₁)を用いて、ソーキングと共結晶化により複合体の結晶化、構造解析を目指した。また、固相ゲル中で作製した結晶は、結晶の機械的強度が高まり、高濃度の有機溶媒等でのソーキングが可能になることから、固相ゲル中で IpaH1.4 NEL、SspH2 の結晶を作製し、CompA または CompA₁ をソーキングした結晶を用い、大型放射光施設 SPring-8 の BL44XU を使用して X 線回折実験を行い、IpaH1.4 NEL ドメイン、SspH2 と CompA₁ の複合体構造解析を行った。

(2) 多剤耐性菌 NEL 型 E3 の構造解析

多剤耐性菌の NEL ドメインは IpaH1.4 NEL との類似性が低く、化合物が共通に使用できるかどうか不明である。そこで、*Pseudomonas* 由来 NEL タンパク質と *Citrobacter* 由来 NEL タンパク質の NEL ドメインの配列を人工合成することにより、大腸菌発現系を構築し、培養、精製、結晶化を行った。

(3) 病原細菌 HECT 型 E3 の構造解析と特異的結合化合物の探索

病原性大腸菌やサルモネラ菌は真核生物の HECT 型 E3 とは大きく構造の異なる病原細菌 HECT 型 E3 を持つ。病原細菌 HECT 型 E3 を標的とした PROTAC 化合物を開発するため、病原性大腸菌において、新規に見出した HECT ドメインを持つタンパク質を用い、発現領域の異なる複数の大腸菌発現系を構築し、精製、結晶化を行った。さらに、精製したタンパク質を用いて化合物スクリーニングを行った。

3 研究成果

(1) 赤痢およびサルモネラ菌 NEL 型 E3 と特異的結合化合物(CompA)の複合体構造解析

・サルモネラ菌 SspH2(アミノ酸残基番号 166-783)- CompA₁ 複合体

SspH2 (166-783) と CompA₁ の複合体結晶化、X 線回折実験は大腸菌発現系を用いて培養、精製したタンパク質を使用して行った。複合体結晶は 0.2 mM CompA₁ の条件で共結晶化により作製したものと、ゲル中で作製したアポ状態の結晶を CompA₁ 溶液にソーキングしたものを準備した。これらの複合体結晶を用いて SPring-8 BL44XU で X 線回折実験を行った結果の一部を表 1、図 3 に示す。高濃度の化合物を用いた共結晶化では、結晶が得られなかったため、共結晶化で得られた結晶を短時間ソーキン

グして解析した。しかし、この結晶からは、化合物の可能性のある電子密度は観測されなかった。また、化合物濃度 4mM~10mM でソーキングした結晶を用いた解析からは、アポ状態の結晶では見られなかった電子密度が観測された。しかし、これらの電子密度は使用した化合物より小さく、観測された位置もそれぞれの条件で異なっていた。そのため、化合物の結合した複合体モデルを構築することはできなかった (図 3)。

表 1. SspH- CompA₁ 複合体構造解析の条件

	空間群	格子定数	CompA ₁ 濃度 (共結晶化)	CompA ₁ 濃度 (ソーキング)	分解能
1	C2	a=114Å,b=102Å,c=159Å β=104°	0.2 mM	4 mM	3.9 Å
2	C2	a=114Å,b=102Å,c=159Å β=104°		4 mM	3.5 Å
3	P1	a=76Å,b=77Å,c=158Å α=60°,β=95°,γ=97°		10 mM	3.3 Å
4	P2 ₁	a=76Å,b=167Å,c=77Å β=99.6°		4 mM	2.7 Å

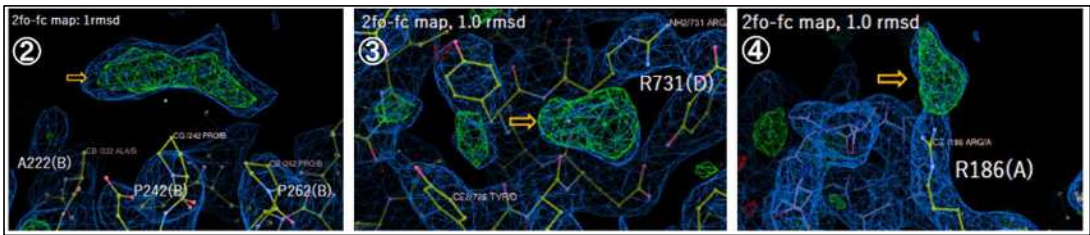


図 3. SspH2- CompA₁ 複合体構造解析で観測された電子密度

・赤痢菌 IpaH1.4 NEL (アミノ酸残基番号 271-582)- CompA₁ 複合体

SspH2 と同様に、IpaH1.4 NEL (271-582)は大腸菌発現系を用いて培養、精製したタンパク質を使用し、共結晶化とゲル中で作製したアポ状態の結晶を CompA₁ 溶液にソーキングすることにより準備した。X 線回折実験は SPring-8 BL44XU で行い、表 2、図 4 に示す結果を得た。解析したデータ中にアポ状態の結晶では見られなかった電子密度が観測されたが、SspH2 の場合と同様に、これらの電子密度は使用した化合物より小さく、それぞれの観測された位置も異なっていた。そのため、化合物の結合した複合体モデルを構築することはできなかった (表 2、図 4)。

表 2. IpaH1.4 NEL- CompA₁ 複合体構造解析の条件

	空間群	格子定数	CompA ₁ 濃度 (共結晶化)	CompA ₁ 濃度 (ソーキング)	分解能
1	I222	a=159Å,b=201Å,c=206Å		5 mM	3.5 Å
2	P4 ₂ 2	a=129Å,b=129Å,c=180Å		4 mM	3.0 Å
3	P4 ₂ 2	a=124Å,b=124Å,c=64Å		5 mM	2.45 Å

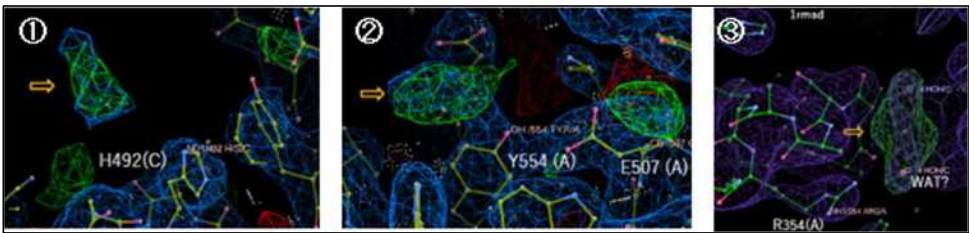


図 4. IpaH1.4 NEL- CompA₁ 複合体構造解析で観測された電子密度

(2) 多剤耐性菌 NEL 型 E3 の構造解析

Pseudomonas 由来 NEL タンパク質と *Citrobacter* 由来 NEL タンパク質の NEL ドメインの大腸菌発現系を構築し、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。その結果、*Citrobacter* 由来 NEL ドメインは溶液状態で単量体と二量体の両方の状態をとることが示された (図 5)。精製した *Pseudomonas*

NEL タンパク質と *Citrobacter* NEL ドメインそれぞれを濃縮し、複数の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件の探索を行ったが、結晶は得られていない。

(3) 病原細菌 HECT 型 E3 の構造解析と特異的結合化合物の探索

サルモネラ菌 HECT 型 E3 の SopA は N 末側に β ヘリックスを持ち、C 末側に病原細菌 HECT ドメインを持つ。病原性大腸菌で新規に見出した HECT ドメインを持つタンパク質

(SopA 様タンパク質: SopA-L) も同様のドメインを持つことから、SopA で結晶構造が報告されている領域(SopA-L Δ N: 170~790、SopA-L HECT C-lobe: 612~790)の大腸菌発現系を構築し、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。SopA-L Δ N、SopA-L HECT C-lobe は結晶化条件スクリーニングの結果、共に結晶が得られた (図 6)。それぞれの結晶を用いて X 線回折実験を行った結果、SopA-L Δ N は構造解析可能なデータを収集することができなかったのに対し、SopA-L HECT C-lobe 結晶からは、分解能 2.8Å のデータを収集し、分子置換法により立体構造を決定した (図 6)。SopA-L HECT C-lobe の構造はサルモネラ菌 SopA HECT C-lobe とよく似ており、root mean square deviation(RMSD)値は 0.85 Å であった。

SopA-L HECT C-lobe の結晶構造解析に成功したことから、Thermal shift assay により特異的に結合する化合物の探索を行った。その結果、13 種類の化合物が SopA-L HECT C-lobe に優位に結合していることを示す結果が得られた。今後はこれらの化合物を用いた病原細菌 HECT 型 E3 の活性に対する影響の解析や SopA-L HECT C-lobe との複合体結晶化を進める計画である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

感染症は常に主要な死亡原因の一つであり、薬剤耐性菌の問題を克服することは重要な課題である。また、病原細菌の病原性を消失することで感染を抑制する抗菌薬として、病原細菌の定着阻害剤、T3SS の分泌阻害剤、抗体等が開発されている。しかし、これら薬剤は病原因子の機能を阻害するため、高濃度かつ長期間の投与が必要であり、薬剤耐性菌出現のリスクがある。このため本研究では、多様な病原細菌に共通して存在する NEL 型や病原細菌 HECT 型 E3 を標的として、PROTAC 技術を用いた病原因子の特異的分解による抗菌剤の開発を目的として、NEL 型 E3 と化合物の複合体構造解析を行うと共に、病原細菌 HECT 型 E3 の構造解析と特異的に結合する化合物の探索に成功した。これらの研究成果は新規作用機序を持った抗菌薬開発のための基盤になるものと考えられる。

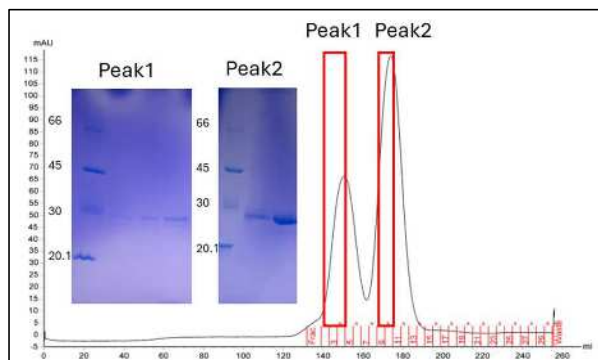


図 5. *Citrobacter* NEL ドメインのゲルろ過(右)と SDS-PAGE (左) の結果

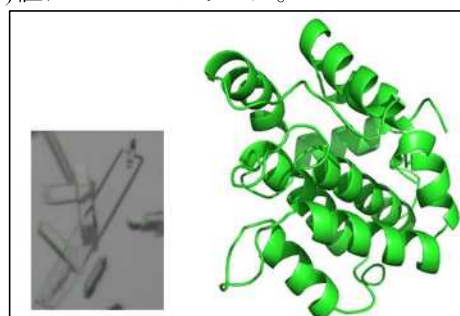


図 6. SopA-L HECT C-lobe の結晶 (左)と 結晶構造 (右)