

研究課題	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の耐性因子の立体構造解析 ー立体構造を高分解能で解明し、新薬の設計を目指す基礎研究ー
キーワード	①薬剤耐性、②耐性菌、③立体構造解析

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	シブヤ アスカ 渋谷 明日香
配付時の所属先・職位等 (令和6年4月1日現在)	城西国際大学 薬学部・助教
現在の所属先・職位等	城西国際大学 薬学部・助教
プロフィール	学生時代、X線結晶構造解析を通して構造生物学を学び、キネシタンパク質 CENP-E モータードメインについて、異なる結晶構造2種類の構造決定を行いました。博士取得後、弊学に助教として着任し、本研究を遂行しています。

1. 研究の概要

本研究は、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）が産生するペニシリン結合タンパク質 PBP2aとその阻害剤に着目し、X線結晶構造解析・分子動力学シミュレーション・表面プラズモン共鳴法（SPR）を組み合わせ、阻害メカニズムの理解と新規阻害剤候補の探索を行うものである。

本研究の第一の特色は、X線結晶構造解析において1.5 Åを超える超高分解能を達成してきた実績を持つ研究グループから助言を受けながら、研究を遂行している点である。11種類のβ-ラクタマーゼの構造を解析し、水素原子の配置やアミノ酸残基の荷電状態まで検討してきた高品質な構造解析技術をベースとした研究を遂行している。

第二の特色は、分子動力学（MD）シミュレーションを積極的に取り入れている点である。Amberを用いた計算に向け、阻害剤セフトロリンのパラメータをGaussianで作成し、既存のPBP2a・セフトロリン複合体構造を用いて、タンパク質の柔軟性や阻害剤結合に伴う動的変化の解析を進めている。なお、本研究における計算は、日本・岡崎の計算科学研究センターにて実施した。（課題番号：24-IMS-C254）

第三の特色は、SPR法によるタンパク質-リガンド相互作用の評価である。先行研究により、MRSA由来PBP2aは阻害剤セフトロリンにより酵素活性を阻害されることが明らかになっているが、ピアコアなどを用いた結合親和性の定量的解析は、十分には報告されていない。この実験結果を駆使し、構造的なパラメータと合わせて解析予定である。

さらに本研究は、米国および国内の研究グループと連携し、構造解析、計算化学、臨床細菌学といった異なる分野の専門家と議論を重ねながら進めている。特に、米国の抗菌薬研究の第一人者である教授からは、阻害剤候補や遺伝子組換え体の提供を受けており、計算化学の専門家とも協力して仮想スクリーニングなどの展開も視野に入れている。このように本研究は、多角的な手法と国際的な研究体制を駆使し、PBP2a阻害に関する新たな知見の創出と、創薬応用に向けた基盤構築を目指している。

2. 研究の動機、目的

・動機

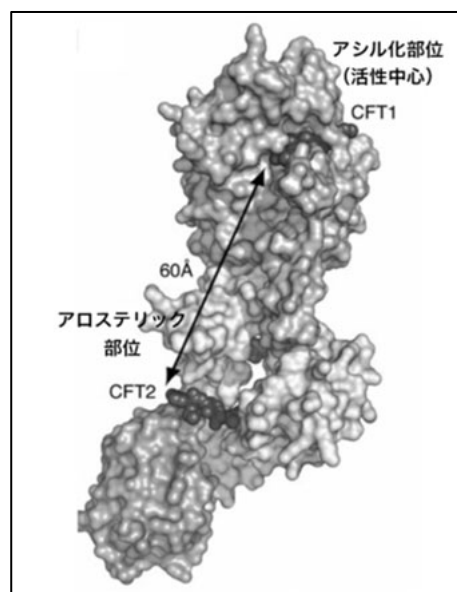
近年、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）などの多剤耐性菌が世界的に増加しており、新たな抗菌剤の開発が急務となっている。MRSA に対しては第五世代セフェム系薬やリネゾリドが有効とされるが、今後さらに強い耐性菌が出現する懸念がある。医療従事者による抗生物質の適正使用の推進が行われるようになったが、依然として耐性菌の克服には至っていない。

β -ラクタム剤は、細菌の細胞壁合成に関わるペニシリン結合タンパク質（PBP）を標的とするが、MRSA は通常の PBP の代わりに、薬剤との結合力が低い PBP2a を発現し、耐性を示す。一方、 β -ラクタム剤の一種であり第五世代セフェムであるセフトロリンは PBP2a のアロステリック部位と活性部位の両方に結合し（Fishovitz J. *et al.*, *IUBMB Life*, 66, 8, 572-577, 2014）、その構造を変化させることで阻害効果を発揮する（図 1）。本研究ではこの機構をさらに発展させ、PBP2a のアロステリック部位と活性部位にそれぞれ異なる薬剤を選択的に作用させるという新たなアプローチを提案したい。具体的には、アロステリック部位にはセフトロリンに代わる新規阻害剤、活性部位には β -ラクタム系抗菌薬を結合させ、PBP2a の機能を二重に制御することを目指す。このような「作用部位ごとに役割を分担させた阻害戦略」は単一薬剤による阻害に比べて、結合の選択性や持続性の向上が期待される。しかし、現在 MRSA 由来 PBP2a のアロステリック部位に選択的に結合する阻害剤は開発されておらず、本研究ではこの部位を標的とした新規分子の設計・探索にも挑戦したいと考えている。

・目的

そこで本研究では、**MRSA 由来 PBP2a とセフトロリン複合体構造を用いて、これらの相互作用を解明することを目指す。**この結果が MRSA 由来 PBP2a のアロステリック部位に対する新規阻害剤の開発に繋がり、さらに医療従事者が耐性菌の拡大を抑制するよう抗菌剤の適正な使用を推進することで、耐性菌を克服できると考える。

図 1：MRSA 由来 PBP2a と阻害剤セフトロリン 2 分子（CFT1, 2）複合体の結晶構造。日本蛋白質構造データバンク（PDBe）に 3ZG0（PDB ID）として登録されている。PBP2a の活性中心とアロステリック部位は 60 Å 離れているが、セフトロリンはこれらに 1 分子ずつ結合している。この結合様式により、PBP2a の働きを 2 段階で制御することが可能になると考えられている。



3. 研究の結果

本研究では、MRSA由来のPBP2aとセフトロリンの複合体に関する構造および相互作用解析を目的として、以下の2項目から研究を進めている。

A: MRSA由来PBP2a・阻害剤セフトロリン複合体を用いた分子動力学計算による構造解析

B: SPR法を用いた、PBP2aと阻害剤の親和性評価による機能評価

A項目について、既に決定された結晶構造よりもさらに高分解能の結晶構造解析の実施も検討したが、実験的困難さを鑑み、まず既存構造を用いた分子動力学シミュレーション (MD計算) を行った。PBP2a・セフトロリン複合体の既存の構造情報 (PDB ID: 3ZG0) を活用し、AmberによるMD計算を開始した。構造の安定性について初期的な知見が得られつつある。あわせて、低分子であるセフトロリンに適切な力場パラメータを与えるため、Gaussianを用いた量子化学計算を並行して進めている。また、本研究でMD計算を行う際、岡崎にある計算科学研究センター (課題番号: 24-IMS-C254) のスーパーコンピュータを活用した。

一方、B項目に該当する親和性評価については、精製したPBP2aに対して、Biacore X100を用いてアビジン-ビオチン相互作用を利用した親和性評価を行った。PBP2a溶液のビオチン化に対する応答が得られた。一方で、ビオチン化したPBP2aに対し、 $27\ \mu\text{M}$ 、 $2.7\ \mu\text{M}$ 、 $0.27\ \mu\text{M}$ の3濃度でセフトロリンを添加したが、現時点では明確な結合応答は観察されていない。今後はより高濃度の阻害剤との相互作用について評価を行う必要があり、阻害剤濃度や界面条件の最適化により、さらなる検討を進めていく予定である。

以上により、A. 構造解析とB. 機能評価の両面で着実な進展が見られており、今後の論文化や次段階の阻害剤探索に向けた基盤構築が順調に進んでいる。

4. 研究者としてのこれからの展望

学生時代は主に X 線結晶構造解析を中心に研究を進めてきましたが、今回の研究を通じて、分子動力学シミュレーションや表面プラズモン共鳴法など、新たな技術を学ぶことができました。今後もさまざまな技術を身につけることで、新薬の開発に貢献する研究だけでなく、生命の本質に迫るような基礎研究に、構造生物学の観点から取り組んでいきたいという夢があります。将来的には自分の研究室を持ち、一つのテーマを学生とともに、学生のアイデアも大切にしながら、じっくりと深めていけたらと考えています。

5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

研究は必ずしも思い通りに進まないことが多い中で、本奨励金をいただいたことは、大きな励みとなりました。贈呈式にもご招待いただき、贈呈書を手渡しで頂戴したことは、研究者として歩んでいく自信につながる出来事でした。また、贈呈式では多くの若手研究者や女性研究者の方々と交流する機会を得ることができました。コロナの影響もあり、同世代の研究者と研究について直接語り合える場はこれまで多くなかったため、大変貴重で、心から嬉しく感じました。

本研究では自分にとって新しい技術を扱う場面が多く、技術者に助言を頂きながら一つずつ習得していったことは、研究者としての大きな成長につながったと感じています。本研究を

今後も発展させ、深刻な問題である薬剤耐性菌の克服に貢献できることを期待しています。

この貴重な経験を糧に、自分のテーマに真摯に取り組みながら、より本質的かつ社会に貢献できる研究を目指し、精進してまいります。この度は、誠にありがとうございました。

