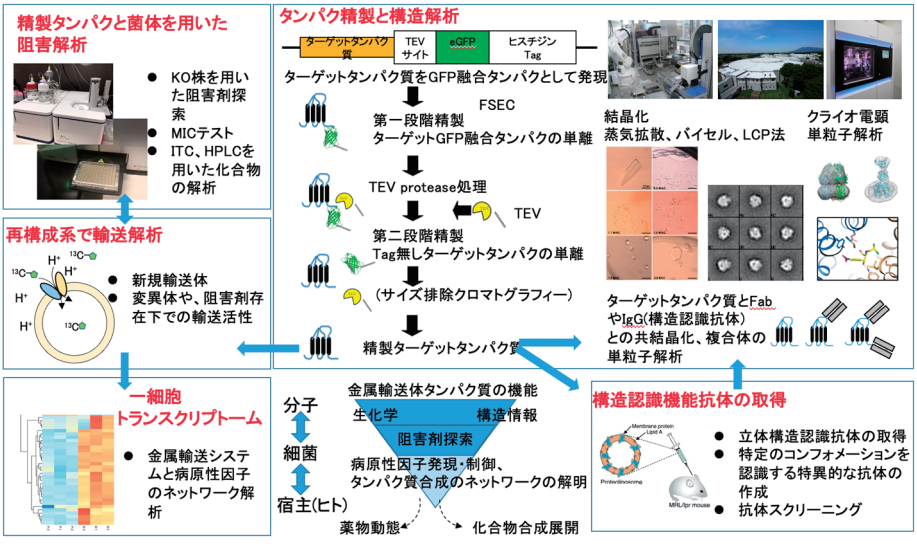
37　金属輸送体を標的とした感染症防御ストラテジーの開拓	田辺　幹雄

【目的】薬剤耐性を持つ細菌が引き起こす感染症への対策として、1）新規抗菌薬、2）病原因子／毒素の抑制剤、3）ワクチンの開発が挙げられる。この 3 つの要素を同時に開発していくことを最終的な目標とする。本研究では特に肺炎の起因菌となる肺炎球菌や黄色ブドウ球菌をモデルに、菌の生育と病原性因子獲得の両方に重要な膜タンパク質群である金属イオン輸送体とその輸送システムに焦点を当て、これらの新規阻害剤を探索／発見し、活性を阻害することで感染細菌の病原性を抑え弱毒化する。精製タンパク質をベースに生化学と構造情報を利用し、小分子もしくは機能阻害抗体から、細胞レベルでの現象の解明と病原菌への感染予防を目指す。

【方法】本研究は以下に示す 6 つのマイルストーンを達成することを目標とした。1) *Streptococcus* 属、*Staphylococcus* 属より、その生育に重要な影響を及ぼすことが示唆されており、かつ病原性を低下させる候補となる様々な膜輸送ファミリーに属する膜タンパク質を選定した。その中でも特に 5 つのタンパク質を標的として研究を開始した。今回まずターゲットとして選んだ膜タンパク質は、1）鉄の排出輸送体（P 型 ATPase）、2）新規で機能未知のタンパク質（ABC transporter）、3）鉄イオン取り込みタンパク質（ABC transporter）、4）シデロフォア輸送体（MFS transporter）、5）鉄の取り込みに重要なエンテロバクチン合成にも関わる薬剤排出トランスポーター（MFS transporter）である。これら標的タンパク質を大腸菌に発現し、精製し、活性測定を行った。既に阻害剤の開発が進んでいるタンパク質に関しては、入手可能なものはそれらを入手し活性測定を行った。また標的タンパク質と阻害剤の立体構造解析のために、結晶化やクライオ電顕単粒子解析法を用いて構造解析を開始した。

【結果】ターゲットとしたタンパク質に関してはどれも粗精製することができたが、安定性が低いタンパク質に関しては研究の進行を保留し、再度良質なタンパク質を得るための条件を探索している。その中で ATPase の活性測定や、輸送活性を測定し、さらに構造解析に適したものが得られたと考えられたものは KEK 構造生物学研究センターが有す結晶化ロボットや 200 kV クライオ電顕を用いてスクリーニング、また高分解の取得のため 300 kV の電顕を用いて単粒子解析を開始した。うち 2）の ABC 輸送体に関しては、現在 4Å を超える分解能が得られ、構造予測プログラム Alphafold2 と組み合わせて解析することで構造モデルの構築に成功した。現在進行形で解析を引き続き行っている。5）鉄の取り込みに重要なエンテロバクチン合成に関わる薬剤排出トランスポーターに関しては、同定されている阻害剤と一緒に現在抗体取得に向けて進行している。これらのトランスポーターの阻害により菌の毒性が妨げられるかまでは、本期間内には達成することができなかったが、引き続きその解析を続ける予定である。

本研究で用いた実験手法とワークフロー



37. 金属輸送体を標的とした感染症防御ストラテジーの開拓

田辺　幹雄

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター

Key words : 膜タンパク質，トランスポーター，構造解析，金属輸送

緒　言

下気道感染症は世界規模で常に死因の上位に位置付けられ、肺炎は日本でも今日まで過去数十年に渡り、常時上位5 位以内の死亡原因として挙げられてきた。起因菌である肺炎球菌、インフルエンザ菌他黄色ブドウ球菌、緑膿菌等は薬剤耐性株が蔓延しておりその治療は困難を極める。我々はこれまで薬剤排出トランスポーターの分子メカニズムを明らかにしようと試みてきたが、その取り扱いと効率的な阻害の難しさから、これらを阻害するだけでなく同時に菌本来の生理機能に働きかける阻害が必要であることを考えてきた。一般に薬剤耐性を持つ細菌が引き起こす感染症への対策として、1）新規抗菌薬、2）病原因子／毒素の抑制剤、3）ワクチンの開発が挙げられる。この 3 つの要素を同時に開発していくことを目標とし、特に肺炎の起因菌となる肺炎球菌や黄色ブドウ球菌をモデルとし、菌の生育と病原性因子獲得の両方に重要な膜タンパク質群である金属イオン輸送体とその輸送システムに焦点を当て、これらの新規阻害剤を探索／発見し、活性を阻害することで感染細菌の病原性を抑え弱毒化する。タンパク質の生化学と構造情報を利用し、小分子もしくは機能阻害抗体から、細胞レベルでの現象の解明と病原菌への感染予防を目指す。これらをこれまでの薬剤排出トランスポーターの分子メカニズムの解明を目指す研究と組み合わせ、将来的に感染症に対抗するストラテジーを構築したいと考えた。

方　法

1.　標的膜タンパク質の選定

まず *Streptococcus* 属、*Staphylococcus* 属より、その生育に重要な影響を及ぼすことが示唆されており、かつ病原性を低下させる候補となる様々なファミリーの膜タンパク質を選定し、特に 5 つのタンパク質を標的として設定した。まずターゲットとして選んだ膜タンパク質は、1）PmtA - 鉄の排出輸送体（P 型 ATPase）、2）新規で機能未知のタンパク質（ABC transporter）、3）SiaFGH - 鉄イオン取り込みタンパク質（ABC transporter）、4）EntS - シデロフォア輸送体（MFS transporter）、5）NorA - 鉄の取り込みに重要なエンテロバクチン合成にも関わる薬剤排出トランスポーター（MFS transporter）である。これら標的タンパク質を大腸菌に発現し、精製し、活性測定を行った。

2.　標的膜タンパク質の発現と精製

これら遺伝子を合成し、ホストとなる大腸菌での発現のためコドンを最適化した。これら遺伝子を pWaldo-e ベクターに挿入し、C 末端に GFP をつけて大腸菌に組換えタンパク質として発現させた。この手法では上流の膜タンパク質がフォールドした場合のみに、GFP が発光するため、効率的なタンパク発現や精製のプロトコールの最適化スクリーングに有効である［1］。GFP のさらに下流に付与した His-Tag を用いてターゲットタンパク質-GFP の融合タンパク質とし、一次精製まで行い、その後 TEV プロテアーゼで GFP を切断し、目的タンパク質のみをさらなるゲル濾過カラム、イオン交換カラムを用いて最終精製を行った。

3.　精製タンパク質の活性測定と再構成実験

活性の測定について、P-type ATPase、ABC transporter に関しては ATPase 活性を測定した。MFS transporter に関しては、リポソームに精製した膜タンパク質を再構成し、ΔpH による膜輸送活性を測定した。既に阻害剤の開発が進んでいるタンパク質に関して、可能なものはそれらを入手しその活性測定を行った。

4.　標的膜タンパク質の結晶化とクライオ電顕単粒子解析

高エネ機構構造生物学研究センター（KEK-SBRC）が有する、全自動の結晶化ロボットと観察システムを利用して膜タンパク質に特化した Lipidic cubic phase 法を用いて結晶化を行った。得られたタンパク質結晶は KEK 内の放射光施設 Photon Factory のタンパク質結晶用ビームライン BL-1A においてスクリーニングを行った。界面活性剤もしくはナノディスクに再構成された精製タンパク質に関しては、クライオ電顕を用いた単粒子解析も行った。KEK-SBRC が有する加速電圧 200 kV の Talos や 12 月に導入された 300 kV Titan また、東京大学の Titan を用いてデータ測定を行った。得られたデータは Relion4.0 を用いて解析を行った。得られたマップへのモデル構築は Alphafold2 を用いてモデルを簡易構築し、実際に実験データと照らし合わせて解析を行っている。

5.　標的膜タンパク質の構造認識抗体の取得に向けて

また抗体の作製に関しては共同研究者である京都大学野村博士に依頼し、現在適切に立体構造を認識できる抗体であるかのスクリーニングを開始している。

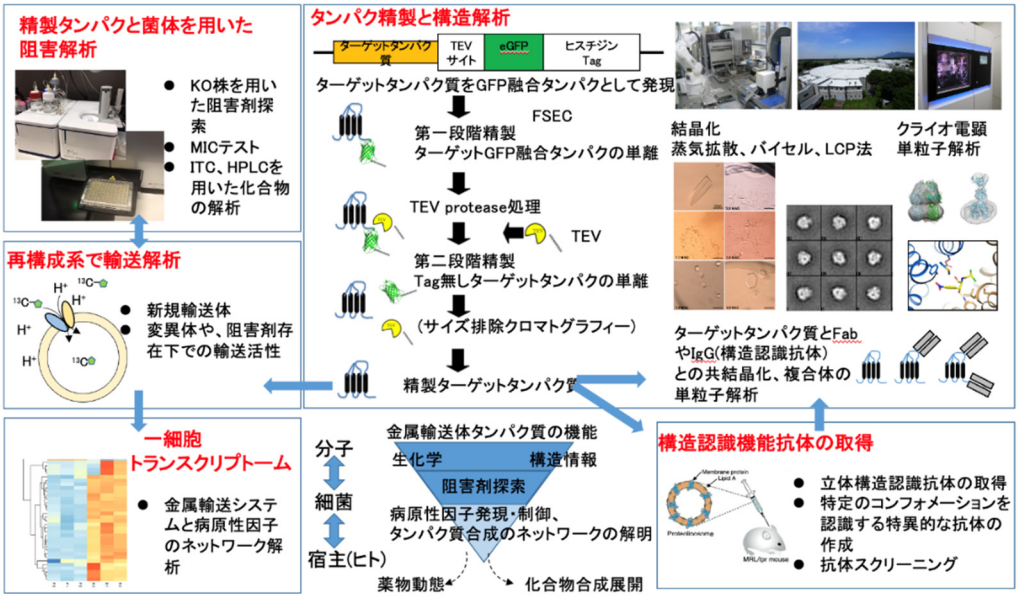


図 1.　本研究で用いた実験手法とワークフロー

結果および考察

1.　ターゲット膜タンパク質の精製と構造解析

1）NorA

これまで *S.aureus* 由来の NorA は薬剤耐性に影響を及ぼすタンパクとして研究がされてきたが、精製タンパク質を得ることが非常に困難で 2022 年に NorA-Fab の複合体構造が決定されるまで [2]、精製タンパク質を用いて行われた解析はほぼ皆無であった。我々も NorA の安定な精製タンパク質の取得に苦労していたが、イタリア、ペルージャ大学ステファーノ=サバティーニ教授より彼らが開発を進めている NorA の阻害剤の供与を受け、その共構造を解析すると同時に本研究に用いることとした。これまで NorA 単独では安定的なタンパク質を生成できなかったが、阻害剤存在下では、図 2 に示すように、ゲル濾過カラムを用いた最終精製でも凝集や沈澱することなく精製できた。現在この試料を

リポソームに再構成し、抗体作製のための予備実験を行い［3］、マウスへの免疫、ハイブリドーマの調製に向けて準備している。

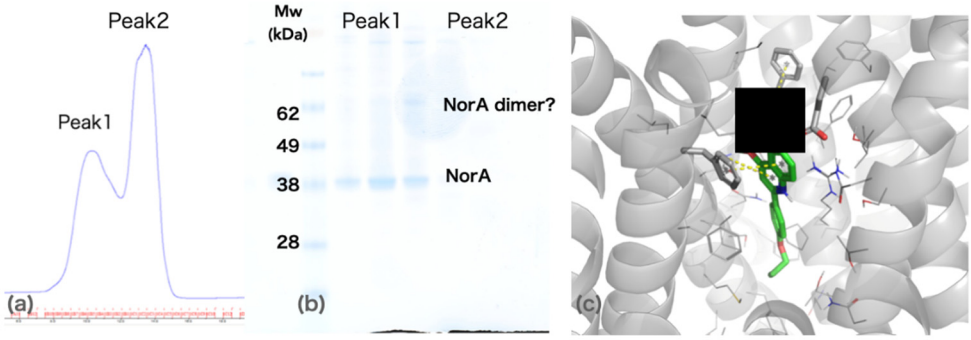


図 2. *S. aureus* 由来 NorA の精製と阻害剤のモデリング

a） ゲル濾過カラムを用いた阻害剤下で NorA を精製した。

b） ゲル濾過カラムサンプルの SDS-PAGE ゲル。Peak1 が NorA-阻害剤の複合体に相当した。

c） MD シミュレーションでの阻害剤の結合様式のモデリング。基質結合ポケットに形成されたπ電子のスタッキングによって阻害剤が安定して結合している可能性が示唆された。阻害剤の構造は一部非公開の情報を含むため、構造式の一部を黒枠で示した。

2）PmtA

2 価鉄のトランスポーターとして同定されて、酸化ストレスの抑制と共に病原因子の発現に影響を与えることが知られてきたが［4］、これまで精製タンパク質を用いて、その分子メカニズムを検討された論文の報告はされていない。そこで我々はまず精製し、構造解析を行い、その阻害剤の獲得を目標とした。NorA と同様の方法で PmtA の精製に成功し、結晶化、クライオ電顕による単粒子解析を行った。結晶化は KEK-SBRC が有す全自動結晶化観察システムを用いた［5］。金属イオンに依存した ATPase 活性を測定すると、Fe^{2+}存在下で最も ATP を分解したのに対し、Mn^{2+}、Mg^{2+}も輸送する可能性が出てきた。界面活性剤中では分子量が小さくクライオ電顕単粒子解析法では十分な分解能の構造解析ができなかったが、PmtA-nanodisc（濃度 3.8 mg/ml）のクライオ電顕データを 4 月最終週に 200 kV 電顕を用いて取得したところ改善が見られたため、今後の解析の進展が望まれる。残念ながら結晶化では 10Å程度の回折像しか得られなかったため、引き続きクライオ電顕での解析を中心に進める。

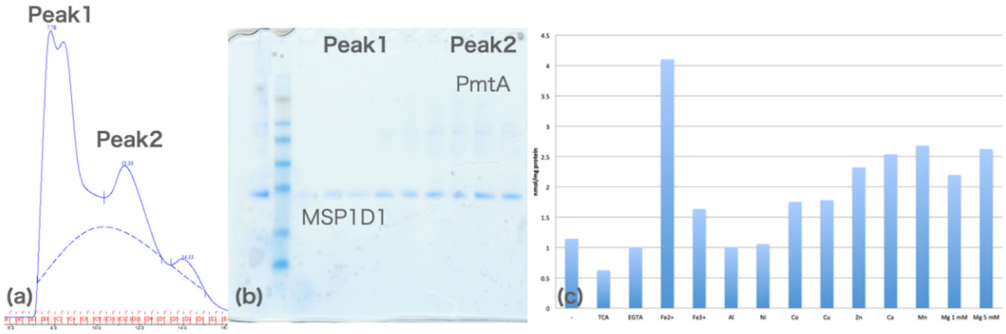


図 3. *S. pyogenes* 由来 PmtA-nanodisc（MSP1D1）の精製

a） ゲル濾過カラムを用いた PmtA-Nanodisc（MSP1D1）を精製した。

b） ゲル濾過カラムサンプルの SDS-PAGE ゲル。Peak2 が、PmtA が MSP1D1 に再構成されていると考えられる。

c） 金属イオンに依存した ATPase 活性の測定。Fe^{2+}に加え Mn^{2+}、Mg^{2+}も基質となる可能性がある。

3）新規 ABC 輸送体

本トランスポーターは鉄イオン輸送トランスポーターのホモログとして候補に加えたが、これまで、肺炎球菌由来においてその本来の基質等が詳細に研究されたという報告は過去にない新規の ABC transporter である。そこで我々はまず精製し、構造解析を行うと同時に、構造解析を行いその役割を調べると同時に阻害剤の獲得を目標とした。ヘテロダイマーを形成することが考えられていたため A サブユニットと B サブユニットをタンデムに並べ発現させた。その結果この ABC transporter の精製に成功し、クライオ電顕による単粒子解析を行った。東京大学電顕施設に設営された Titan Krios において約 7,000 枚のマイクログラフを撮影し、そこから Relion を主に用いて画像処理解析を行った。現在のところ解析途中ではあるが、3.5Åでの分解能に達し、モデルも 90%以上のアミノ酸配列を同定、構築できた。

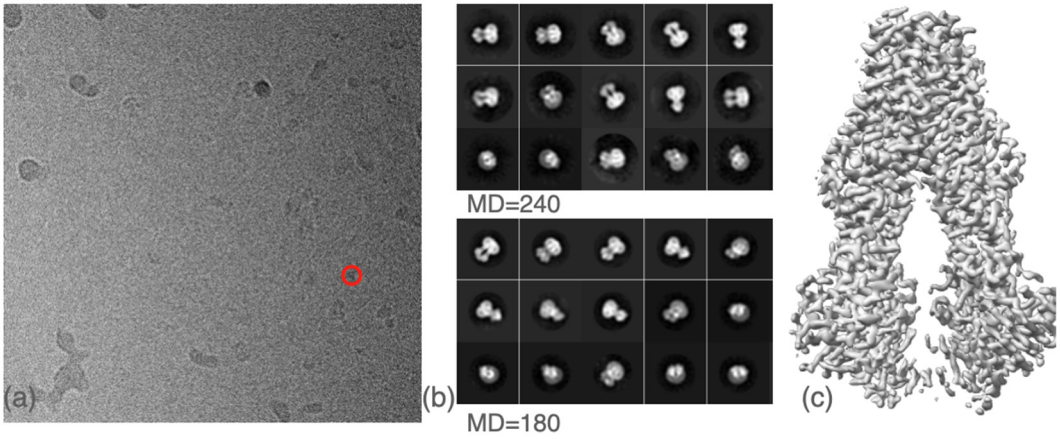


図 4. 新規 ABC 輸送体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析

a）加速電圧 300 kV（Titan-Krios）で撮影した電顕マイクログラフ（円は 100Å）。

b）異なるマスクサイズ（MD）での 2 次元平均像。

c）3.5Åまで改善された 3 次元マップ。

4）SiaFGH, EntS

界面活性剤である DDM を用いて、精製には成功したがタンパク質の安定性に乏しく、今後の変異導入や、適切な条件（特に可溶化条件等の精製条件）を検討することで、改善できる可能性はある（結果についての Figure は割愛する）。

目標としていた遺伝子解析、トランスクリプトーム解析までは本期間中に開始することができなかった。今後、現在進行中の構造解析を行うと共に、解析を進めていく予定である。

考　察

5 つの膜タンパク質を本テーマ推進のための候補タンパクとして選定した。その結果、最初に定めた 5 つのターゲットのうち 3 つについては十分構造解析、もしくは阻害剤の効果を検討できるタンパク質が質、量ともに得ることができた。ただしその中では問題もあるものも存在する、例えば NorA においては阻害剤なしには精製できないため、通常の基質の輸送活性を測定するのが難しい。また ABC トランスポーターについても本来の基質が何であるのか、現在も不明であるため機能の阻害が本当の意味で生理学的な機能を阻害しているのか判断できないことにある。今後は脱オーファン化といった研究も進めていくことが必須であると考えている。今後構造解析をさらに進めると同時に阻害剤取得のためのスクリーニングも徐々に開始しており、分子メカニズムからの輸送体の解明と細菌内への影響に関する研究を進めていく所存である。

共同研究者・謝辞

筑波大学医学研究系の広川貴次教授、京都大学の野村紀通准教授、ペルージャ大学のステファーノ=サバティーニ教授が共同研究者である。大阪大学産業科学研究所の西野邦彦教授、田口厚志助教、および高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉センター長、守屋俊夫特任准教授、稲葉理美博士、加藤康子技術員ほか本研究をサポートしてくれた方々に深くお礼申し上げます。また本研究を支援いただいた上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Drew D, Lerch M, Kunji E, Slotboom DJ, de Gier JW. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. Nat Methods. 2006 Apr;3(4):303-13. PMID: 16554836 DOI: 10.1038/nmeth0406-303

2） Brawley DN, Sauer DB, Li J, Zheng X, Koide A, Jedhe GS, Suwatthee T, Song J, Liu Z, Arora PS, Koide S, Torres VJ, Wang DN, Traaseth NJ. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from Staphylococcus aureus. Nat Chem Biol. 2022 Jul;18(7):706-712. doi: 10.1038/s41589-022-00994-9. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361990

3） Jaenecke F, Nakada-Nakura Y, Nagarathinam K, Ogasawara S, Liu K, Hotta Y, Iwata S, Nomura N, Tanabe M. Generation of Conformation-Specific Antibody Fragments for Crystallization of the Multidrug Resistance Transporter MdfA. Methods Mol Biol. 2018;1700:97-109. doi: 10.1007/978-1-4939-7454-2_7. PMID: 29177828

4） Turner AG, Ong CY, Djoko KY, West NP, Davies MR, McEwan AG, Walker MJ. The PerR-Regulated P1B-4-Type ATPase (PmtA) Acts as a Ferrous Iron Efflux Pump in Streptococcus pyogenes. Infect Immun. 2017 May 23;85(6):e00140-17. doi: 10.1128/IAI.00140-17. Print 2017 Jun. PMID: 28373352

5） Kato R, Hiraki M, Yamada Y, Tanabe M, Senda T. A fully automated crystallization apparatus for small protein quantities. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 2021 Jan 1;77(Pt 1):29-36. doi: 10.1107/S2053230X20015514. Epub 2021 Jan 1. PMID: 33439153