



重合化するタンパク質に作用する化合物の新たな評価方法の開発に成功 —神経変性疾患の新規治療薬を発見する手法としても期待—

研究成果のポイント

- ・ 新規抗菌薬の創薬のため、細菌の増殖に必須なタンパク質の重合を阻害する化合物の発見を目的とした。
- ・ コンピューターバーチャルスクリーニングと分光学的手法により、約 21 万種類の化合物ライブラリーから 6 種類の化合物に絞り込んだ。その中の 1 つの化合物は実際に抗菌活性を有することが確認された。
- ・ 本研究は、神経細胞内のタンパク質重合が原因となる神経変性疾患に対する新規治療薬を発見するための手法としても期待される。

研究成果の概要

細菌の細胞分裂には FtsZ^{注1} タンパク質が活性化し重合することが必要です。つまり、FtsZ タンパク質の重合を阻害する化合物は、新規の抗菌薬^{注2}になることが期待されます。そこで私たちは FtsZ タンパク質の重合阻害化合物を見つけるため、コンピューターシミュレーションによるバーチャルスクリーニングと蛍光相互相関分光法 (FCCS)^{注3}を用いた化合物スクリーニング法を確立しました。確立されたスクリーニング方法を用いることで、約 21 万種類の化合物ライブラリーから FtsZ タンパク質の重合阻害化合物の候補を 71 種類まで絞り込みました。そしてそのうち、特にタンパク質の活性阻害を示す 6 つの化合物を調べたところ、実際に 1 種類の化合物が黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を持つことが確認されました。

本研究は、文部科学省 先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム補助金により実施されました。また、本研究で行ったバーチャルスクリーニングは、北海道大学アカデミッククラウド^{注4}を利用し、東京大学創薬機構の化合物ライブラリー^{注5}を使用してスクリーニングを行いました。

論文発表の概要

研究論文名 : Screening for FtsZ dimerization inhibitors using fluorescence cross-correlation spectroscopy and surface resonance plasmon analysis (FtsZ タンパク質二量体化の阻害化合物を発見するための蛍光相互相関分光法と表面プラズモン共鳴法を組み合わせたスクリーニング法の開発)

著者 : 三國新太郎¹, 児玉耕太², 佐々木章³, 巻 秀樹⁴, 小平尚輝⁴, 棟朝雅晴⁵, 前仲勝実⁶, 金城政孝¹

¹ 北海道大学大学院先端生命科学研究院, ² 北海道大学創成研究機構, ³ 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, ⁴ 塩野義製薬株式会社コア疾患創薬研究所, ⁵ 北海道大学情報基盤センター, ⁶ 北海道大学大学院薬学研究院

公表雑誌 : PLOS ONE

公表日 : 日本時間 (現地時間) 2015 年 7 月 9 日 (木) 午前 3 時 (米国東部時間 2015 年 7 月 8 日 (水) 午後 2 時)

研究成果の概要

(背景)

抗菌薬は感染症の原因となる細菌の増殖を抑える薬で、医療の場面でも欠かせない薬の一つです。一度は耳にしたことがあると思いますが、「ペニシリン」という抗菌薬は 19 世紀の初めにアオカビから単離された世界で最も有名な抗菌薬の一つです。ペニシリンは細菌の細胞壁の合成を阻害することで細菌の増殖を抑える薬です。この抗菌薬の普及により、これまで怪我をした時の細菌の感染により命を落としていた多くの方が救われました。しかし、抗菌薬の普及は同時に「耐性菌」による問題を生むことになりました。そこで、次にペニシリン耐性菌に対抗すべく、新しい抗菌薬が作り出されましたが、すぐにその耐性菌が生まれています。つまり、これまでの抗菌薬の作用とは異なる分子機構で細菌の増殖を抑える化合物を見つけ出すことが重要です。

そこで、私たちは細菌の分裂に必須なタンパク質である FtsZ タンパク質に注目しました。細胞分裂時に FtsZ タンパク質は単量体から二量体、多量体を経て、細胞膜内側につながれた繊維状の環状構造を細胞の中央部分に作ります (図 1A)。最終的に、この繊維が収縮することで、細胞はくびれるように分裂します (図 1B)。

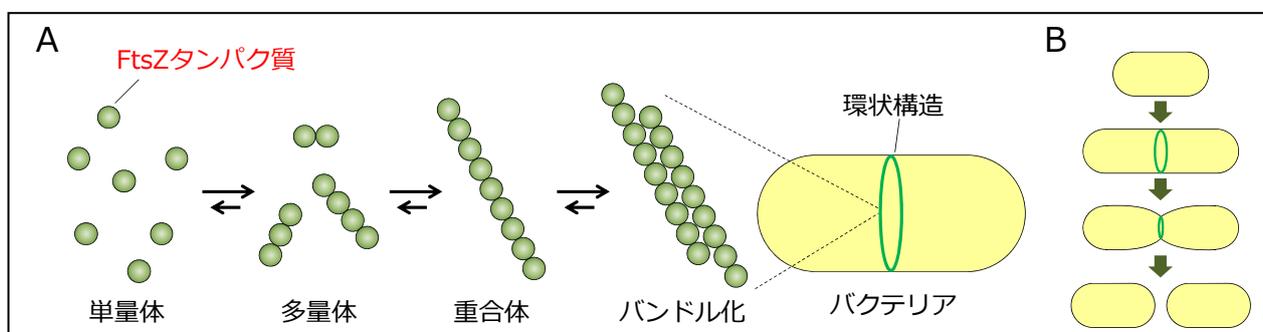


図 1 : FtsZ タンパク質の重合体化(A)と細胞分裂(B)

したがって、この FtsZ タンパク質が二量体、多量体になることを阻害することができれば、細菌は分裂できなくなり、増殖できなくなります。つまり、FtsZ タンパク質の二量体化を阻害する化合物

は新しい抗菌薬の「種」になり得ます。

(研究手法)

本研究では新しい抗菌薬の「種」になる化合物を見つけるために、modeFRONTIER™ と AutoDock を組み合わせたコンピューターシミュレーションによるバーチャルスクリーニングと蛍光相互相関分光法 (Fluorescence cross-correlation spectroscopy, 以下 FCCS) を用いた化合物スクリーニング法を確立しました。FCCS とは 2 色の蛍光を観察することで、分子の動きや分子間相互作用を定量化できる蛍光イメージング手法の一つです。私たちは FCCS を用いて、正確に分子間相互作用を検出するために FtsZ タンパク質を半分に分割し、ノーベル賞を受賞した下村脩先生が発見した蛍光タンパク質 2 種類と融合体 (FtsZ-N 末端-緑色蛍光タンパク質と FtsZ-C 末端-赤色蛍光タンパク質) として合成しました。そして、これらのタンパク質は GTP (グアノシン三リン酸)^{注6} 存在下で再現性良く二量体化することが FCCS 測定から確認されました (補足図)。

(研究成果)

次にこれらの FtsZ タンパク質の二量体化を阻害する化合物を探すためにバーチャルスクリーニングを行いました。まず、X 線構造解析から得られていた FtsZ の立体構造をもとに、コンピューターシミュレーションで FtsZ に結合できそうな化合物を約 21 万種類の東京大学創薬機構化合物ライブラリーから絞り込み、495 種類の化合物を選出しました。そして、1 次スクリーニングとしてその 495 種類の化合物の二量体化阻害効果を FCCS により検定しました。その結果、495 種類の化合物のうち、有意に FtsZ タンパク質の二量体化を阻害する化合物が 28 種類見つかりました。さらにこの 28 種類の化合物に似た構造を持つ化合物を、コンピューターを用いた類似構造検索により化合物ライブラリーから選び出し、888 種類が候補として選出されました。そして、FCCS による 2 次スクリーニングを行い、最終的に 888 種類の化合物のうち、有意に FtsZ タンパク質の二量体化を阻害する化合物が 71 種類見つかりました (図 2)。

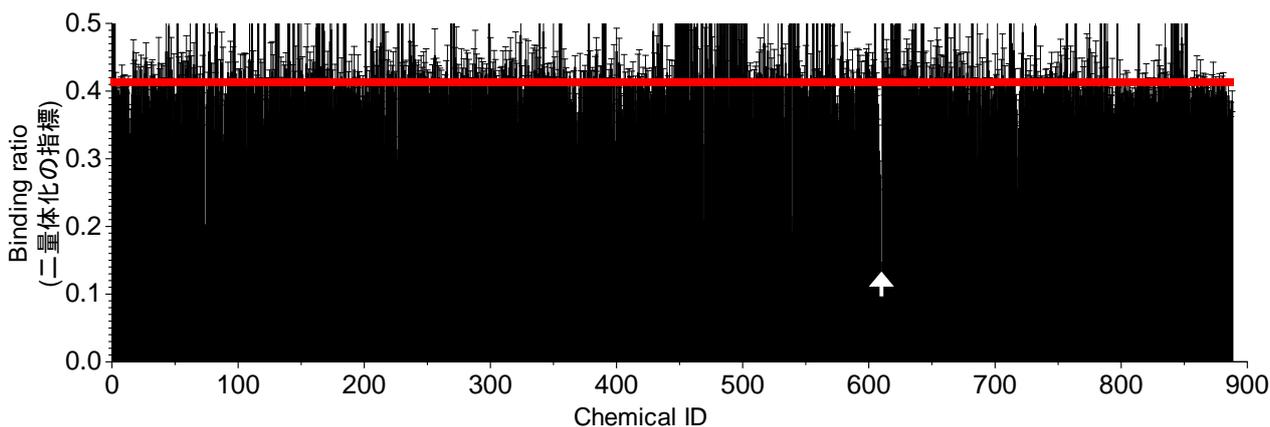


図 2: 2 次 FCCS スクリーニングの結果。横軸は化合物番号 (888 種類)、縦軸は FtsZ の二量体化の指標を示す。つまり、この図では 888 本の棒グラフが並んでいる (黒く塗りつぶしているわけではない)。棒グラフが低ければ低いほど FtsZ の二量体化阻害効果が高い化合物であることを示す。最も阻害効果が高かった化合物は白矢印で示されている。

71 種類の化合物のうち、二量体化阻害効果が高かった 6 種類の化合物について、表面プラズモン

共鳴法 (Surface plasmon resonance : SPR) ^{注7} を用いて、化合物と FtsZ タンパク質間の特異的な相互作用を確認しました。また、この 6 種類について、抗菌作用を確かめたところ、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA, 一般的に多剤耐性を示す黄色ブドウ球菌) を含む黄色ブドウ球菌に対し、抗菌作用を持つ化合物が最終的に 1 種類見つかりました。

(今後への期待)

黄色ブドウ球菌は種々の抗菌薬に対する耐性を獲得しやすい性質があり、多剤耐性菌 (MRSA) として院内感染拡大の原因となっています。今回見つかった化合物はあくまで新しい抗菌薬の「種」であり、実際の薬として用いるにはさらなる研究開発が必要ですが、多剤耐性菌に対して反撃の糸口となる化合物であると期待しています。

また、私たちが開発した方法はこれまで定量的なスクリーニングが難しかった「多量体を形成するタンパク質」に対して応用可能です。すなわち、神経細胞内で発生するタンパク質の凝集体 (多量体) が原因で生じる神経変性疾患、たとえばアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬の発見にも役立っていくと期待されます。

お問い合わせ先

北海道大学 未来創薬・医療イノベーション推進室 [広報担当：和田]

TEL : 011-706-7798 FAX : 011-706-7799 E-mail : innovation@cris.hokudai.ac.jp

ホームページ : <http://www.cris.hokudai.ac.jp/cris/innovahome/index.html>

【用語解説】

注 1) FtsZ (filamenting temperature-sensitive mutant Z) : 動物細胞におけるチューブリンと相同性をもつタンパク質。初めて原核生物細胞の骨格タンパク質として発見された。GTP 依存的に重合体を形成し、他のタンパク質と協働して細胞分裂時に収縮環を形成する。

注 2) 抗菌薬 : 細菌の育成 (増殖) を阻害する作用、あるいは殺菌作用を持つ薬の総称。古くは抗生物質と同義であった (抗生物質 = 抗菌薬)。しかし、最近では「抗生物質」とは抗菌作用だけでなく、抗真菌、抗寄生虫、抗ウイルス、抗ガン作用を持つ化合物全体を指すようになった。従って、抗菌薬は抗生物質の一部となる。

注 3) 蛍光相互相関分光法 (Fluorescence cross-correlation spectroscopy, FCCS) : 共焦点光学系によって形成された微小な焦点領域を蛍光分子が出入りすることで生じる蛍光強度のゆらぎから、蛍光標識された生体分子などの「動き」と「数」、それに基づいたダイナミックな「分子間相互作用」を単一分子レベルで検出できる手法として蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy : FCS) があり、それを 2 色の蛍光に拡張した方法が FCCS である。それぞれの蛍光標識された生体分子について「動き」と「数」の情報が得られるだけでなく、それぞれの蛍光同士の相互相関を解析することで、直接的に分子間相互作用を定量化できる。

注 4) 北海道大学アカデミッククラウド : インターネットを介した計算機の集合体、仮想的な計算機。総理論演算性能 43TFLOPS, 2,000 以上の仮想計算機を構成可能な、国内最大規模の学術計算機システム。本研究では、その一部 (120 コア) を用いてバーチャルスクリーニングを行った。

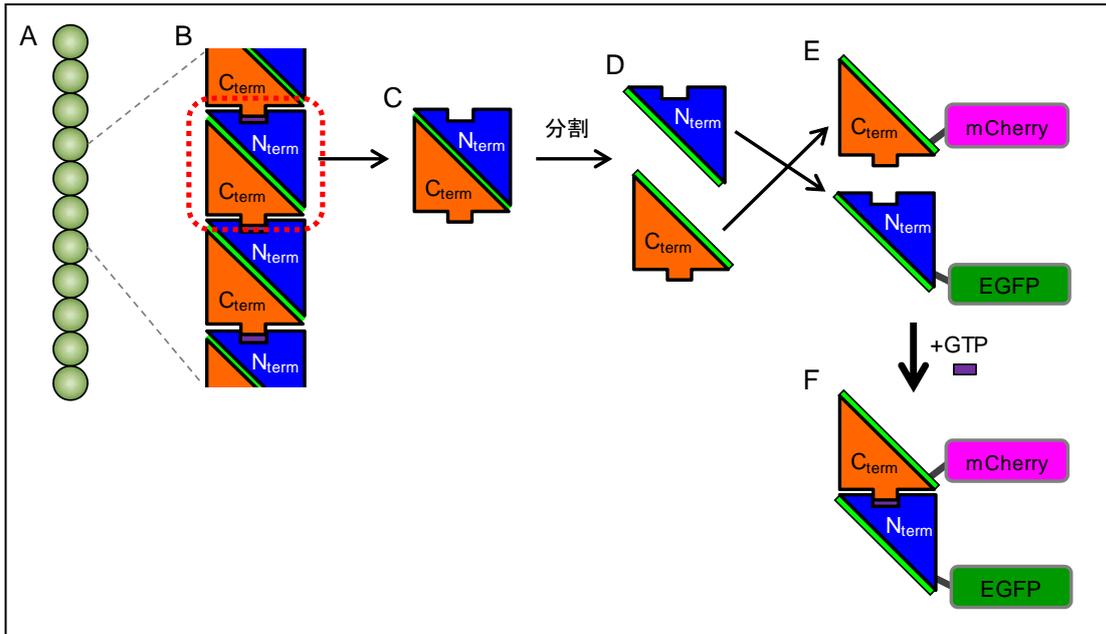
注 5) 東京大学創薬機構化合物ライブラリー : 文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業で構築された 20 万超の大規模な化学物質、化合物のコレクション。また化合物データベース

も提供しており、本研究ではその両方を活用してバーチャルスクリーニングと実際のスクリーニングを行った。

注6) GTP (グアノシン三リン酸) : 主として細胞内シグナル伝達やタンパク質の機能の調節に用いられる生体内成分。

注7) 表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance, SPR) : 金属薄膜上に生じる表面プラズモン波との共鳴現象を利用して、金属薄膜上の分子の質量変化を測定する方法。

補足図 : FtsZ タンパク質の分割と蛍光タンパク質との融合。



FtsZ タンパク質の重合体 (A) は FtsZ タンパク質の N 末端 (N_{term}) が別の FtsZ タンパク質の C 末端 (C_{term}) に GTP を介して数珠つなぎのように形成されている (B)。この状態だと精度よく化合物スクリーニングができないため、FtsZ タンパク質 (C) を N 末端と C 末端に分割し (D)、それぞれを緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) との融合体として合成した (E)。これらの分割体 FtsZ は GTP (グアノシン三リン酸) 存在下で相互作用することが FCCS で確認された (F)。