

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	DNA複製に着目したディフィシル感染症治療の構造生物学的新展開				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
	研究分担者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目	ディフィシル由来スライディングクランプと誤りがちな DNA 合成酵素との相互作用の構造基盤
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【背景】 <i>Clostridioides difficile</i> (ディフィシル) 感染症 (CDI) はディフィシルが腸管内で毒素を産生し、腸炎や下痢症を引き起こす消化管感染症であり、重篤になれば死に至る。欧米では CDI に対する関心は高く、政府主導で対策が行われているが、日本では欧米と比較して CDI への関心が低い。CDI 治療薬であるバンコマイシンやメトロニダゾールは薬剤感受性の低下や再発が問題となっている。近年、ディフィシルの RNA 合成を阻害するフィダキソマイシンも標準治療薬として推奨されるが、副作用としてアナフィラキシーが指摘されており、既存薬とは異なる機序に基づく CDI 治療薬の開発が求められている。医療機関や高齢者施設では CDI の感染拡大が危惧されており、対策は喫緊の課題である。近年、抗菌薬開発の標的として細菌の DNA 合成が注目されている。DNA 合成は細菌の生存に必須な機能であるだけでなく、誤りがちな DNA 合成によって細菌は薬剤耐性を獲得する。したがって、ディフィシルの DNA 合成に着目し、タンパク質の立体構造と分子間相互作用のメカニズムを原子分解能で解明することで、菌の増殖を阻害する化合物の設計が可能になり、さらには既存薬と異なる機序を持つ新たな CDI 治療薬の開発に繋がると期待できる。【目的】 DNA 合成酵素の足場として働く「スライディングクランプ (DnaN)」、突然変異すなわち薬剤耐性の原因である「誤りがちな DNA 合成酵素 (DinB)」を研究対象とする。それらの複合体構造を決定し、DnaN の足場機能及び DinB の DNA 合成能を阻害する構造基盤を得る。DnaN 及び DinB は何れもヒトホモログとの相同性は極めて低い。したがって、本研究によりディフィシル特異的な分子間相互作用の構造基盤が得られ、ディフィシル選択的でヒトへの影響が少ない治療の道が拓かれると期待できる。【結果】 ディフィシル DnaN と DinB ペプチドとの複合体の結晶化に成功した。つくば Photon Factory BL-17A の放射光を用いて、得られた結晶の X 線回折強度データを収集し、X 線結晶構造解析により DnaN-DinB ペプチド複合体の結晶構造を 2.41 Å 分解能で決定した。一般に、DnaN に結合するタンパク質はクランプ結合モチーフ (CBM) と呼ばれるアミノ酸配列を有し、CBM を介して DnaN に結合することが知られている。ディフィシル DinB も CBM と推定される配列を有する。X 線結晶構造解析の結果、ディフィシル DinB の CBM は既知の CBM とは異なる相互作用で DnaN と結合していた。また、DinB の C 末端側の領域はヘリックス構造を形成しており、結合への関与が予想された。そこで DinB の部位特異的変異体を調製し、プルダウンアッセイによる相互作用解析を行った。その結果、DinB が DnaN と結合するには、CBM だけでなく C 末端側のヘリックス構造も重要であることが明らかとなり、新奇な相互作用メカニズムを解明できた。</p>