

多剤耐性菌及び歯周病菌感染症の治療を目指した新たな作用機序による抗菌薬の開発

阪本泰光¹, 日高興士², 石原 司³, 中村彰宏⁴, 鈴木義之⁴,
關谷瑞樹¹, 六本木沙織⁵, 小笠原 渉⁴, 田中信忠⁶

¹岩手医科大学薬学部 〒028-3694 岩手県紫波郡矢巾町医大通 1-1-1

²神戸大学大学院保健学研究科 〒654-0142 兵庫県神戸市須磨区友が丘 7-10-2

³産業技術総合研究所 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

⁴長岡技術科学大学工学部 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1

⁵岩手医科大学医学部 〒028-3694 岩手県紫波郡矢巾町医大通 1-1-1

⁶北里大学薬学部 〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1

要旨

糖非発酵性グラム陰性細菌 (NFGNR) である一部の歯周病菌や多剤耐性菌は、タンパク質やペプチドを栄養源としており、アミノ酸の取り込みおよび代謝経路は、これらの細菌に特異的な抗菌薬の理想的な標的であると考えられる。そして、その標的分子としては、ペプチド分解酵素、ペプチドトランスポーターおよびアミノ酸代謝の最終段階に関わるリン酸トランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼなどが挙げられる¹⁾。我々は、一部の NFGNR に特有なペプチド分解酵素である S46 DPP の結晶構造を2014年に決定した²⁾。そして、S46 DPP と各種ペプチドや化合物との複合体構造に基づいて得られたジペプチド N 末端と S1 サブサイトの相互作用情報に基づいて、インシリコスクリーニングと化合物設計と合成、阻害活性および抗菌評価のサイクルを回し、S46 DPP を特異的に阻害し、歯周病菌に対して抗菌効果を有する化合物を見出した³⁾。さらに、2021年には S2 サブサイトにおける新たな基質選択性を分子レベルで解明し、より選択性の高い化合物の合理的な開発を可能とする知見を得た⁴⁾。本稿では、これまでに取り組んできた S46 DPP の立体構造に基づく薬剤分子設計 (SBDD) に関する成果と今後について取り上げる。

1. 抗菌薬開発とその現状

世界初の化学療法薬として1910年にパウル・エールリヒと秦佐八郎によりサルバルサン、1929年にはアレクサンダー・フレミングによりペニシリン、1932年にはゲルハルト・ドーマクによりサルファ剤 (プロントシル) が開発され、人類は感染症に対する武器を手に入れ、1940年代以降は、劇的に細菌感染症による死亡が減少した⁵⁾。一方で、近年の抗菌薬の不適切な使用は、耐性菌の出現までの期間を短くし、抗菌薬の利用可能な期間を短くする一因となっている。このような製品寿命の短縮によって開発コストの回収が困難となり多くの企業が抗菌薬開発から撤退した。1970年代のカルバペネムの開発以降は抗菌薬の標的として利用できる新たな作用機序は殆ど見いだされず、既存の作用機序を標的とする抗菌薬の誘導体の開発が中心となっている⁶⁾。一方で、2000年以降、耐性菌が発展途上国を中心に問題となり、抗菌薬の適正利用に加えて、既存の作用機序に拠らない新規抗菌薬の開発の重要性が増している。2010年には米国感染症学会が2020年までに新規抗菌薬を10個開発することを目指す“The 10×’20 Initiative”を提言し、その後の法整備により産官学が成果を上

げつつある。また、2015年に WHO は、2050年には薬剤耐性菌 (AMR) による死者が年間1000万人を超えると警告し、新規作用機序による抗菌薬の開発を提言し、日本も AMR アクションプランを策定した。一般に病原性の高い細菌にはグラム陰性菌が多く、グラム陽性細菌の細胞壁は、厚いペプチドグリカンおよび内膜からなる単純な構造であるのに対して、グラム陰性細菌の細胞壁は、外膜、ペプチドグリカンおよび内膜からなり、外膜の薬剤透過性は低い。加えて、主にポーリン変異による透過阻害、排出ポンプによる排出、そしてβラクタマーゼによる不活化により、薬剤耐性を有するグラム陰性病原菌が広がりつつある。このうち、細胞壁の透過阻害に対して、2019年に承認されたシオノギのセフィデロコルは、細菌の鉄取り込み機構を利用して、“トロイの木馬”のように薬剤が外膜を透過することで薬剤耐性菌に対して効果を発揮する⁷⁾。現時点で、セフィデロコルは、世界保健機関 (WHO) が示した最優先で対処すべき菌種の全てに有効な対応ができる唯一の薬剤であるが、その作用機序は既存のセファロsporin 抗菌薬と同じペニシリン結合タンパク質 (PBP) への結合による細胞壁合成阻害であることから、PBP の変異により効果が低下する可能性もあり、新規作用機序によ

る抗菌薬の開発を続ける必要がある。

2. 糖非発酵グラム陰性細菌への着目

グラム陰性細菌の中でも、炭水化物および糖ではなく、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌 (NFGNR) は、歯周炎や人工呼吸器肺炎、敗血症などを引き起こし、複数の抗菌薬に耐性を示すことから治療が困難である。NFGNR は細菌外部から栄養源であるペプチドをペリプラズムへと取り込み⁸⁾、ペリプラズムに局在するジペプチド産生酵素 (DPP) 等がジペプチド・トリペプチドに分解し、内膜のペプチドトランスポーターがアミノ酸単体ではなく、ジペプチドおよびトリペプチドを選択的に輸送し栄養源としている⁹⁾。そして、アミノ酸への分解と代謝においては、ジペプチダーゼ、リン酸トランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼがエネルギー産生に必須な酵素として知られている¹⁰⁾。タンパク質分解酵素は MEROPS と呼ばれるデータベースでアミノ酸配列や触媒ドメインなどの特徴によって大まかに Clan (クラン) に分類され、さらに、ホモログと思われるものは Family (ファミリー)、サブファミリーへと分類される¹¹⁾。そして、ファミリー S46 の DPP (dipeptidyl aminopeptidase) が見出されるまでは、ペプチド最終分解系における主要な酵素は、S9 ファミリーのペプチド分解酵素 POP (Prolyl oligopeptidase), PTP (Prolyl tripeptidyl peptidase) および DPP4 であると考えられていた¹²⁾。歯周病菌や一部の多剤耐性菌では、ペリプラズムに局在するペプチド分解酵素であるファミリー S9 の POP, PTP および DPP4 に加えてファミリー S46 の DPP7 と DPP11 がペプチド最終分解系に関わっていることが明らかにされた¹³⁾。ファミリー S9 の DPP は、ペプチド N 末端側から 2 番目のプロリンまたはアラニンを認識し、3 番目のアミノ酸とのペプチド結合を切断するエキソ型酵素で、ヒトを含む高等生物にも存在する。また、2014年には、プロリンとアラニンに加えて疎水性アミノ酸も認識するが、他の DPP に比べて活性が低い DPP5 が歯周病菌から発見された¹⁴⁾。POP (PTP) はペプチド N 末端側から 3 番目あるいはそれ以上のプロリンまたはアラニンを認識し、その次のアミノ酸とのペプチド結合を切断する。S9 の DPP は、微生物だけでなく、高等生物にも広く存在し、ヒト DPP4 はインスリン分泌を促す消化管ホルモンを分解することから、DPP4 阻害薬は糖尿病治療薬として用いられている。また、ヒト DPP4 と類似の構造を有するヒト DPP8, DPP9 は DPP4 阻害薬と結合し、脱毛、皮膚炎、血小板減少、脾臓肥大などの副作用を起こすことが報告されており、副作用低減を意図した、DPP4 に対して選択性の高い糖尿病治療薬も開発されている¹⁵⁾。

一方、ファミリー S46 の DPP は、281 種の細菌 (MEROPS, 2022 1/1 現在) に存在するが、高等生物には

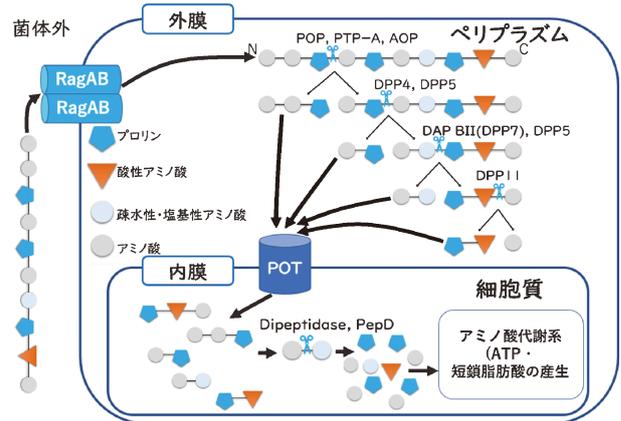


Fig. 1 (Color online) Peptide uptake mechanism in NFGNR. RagAB: Outer membrane peptide importer⁸⁾ POT: proton-dependent oligopeptide transporter¹⁶⁾ PepD: Aminoacyl-histidine dipeptidase

ない¹¹⁾。ファミリー S46 の DPP は、共同研究者の小笠原博士らが発見したジペプチド高生産菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* (Pm) から疎水性・塩基性アミノ酸に特異的な DPP として見出された DAP BII (PmDPP7) が最初で、その後、2001年に慢性歯周炎起因菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) から DAP BII と同様の基質特異性を有する PgDPP7 が見出され、これら、基質特異性の異なる複数の DPP が、糖非発酵グラム陰性細菌におけるエネルギー源の取り込みを担っていることが示唆された⁹⁾。(Fig. 1)

2009年には PgDPP7, PTP (POP) の遺伝子欠失株で実際に増殖が抑制されることが示された¹⁷⁾。そして、根尖性歯周炎関連菌 *Porphyromonas endodontalis* (Pe) から歯周炎の炎症を引き起こす短鎖脂肪酸の生成に関与すると考えられる酸性アミノ酸に特異的な DPP11 が発見された¹⁸⁾。このように S46 DPP は疎水性・塩基性アミノ酸に特異性のある DPP7, 酸性アミノ酸に特異性のある DPP11 の二つのタイプに分けられる。

3. S46 DPP の結晶構造解析

我々は *Pseudoxanthomonas mexicana* のジペプチド産生能に着目し、酵素工学への応用を目指して S46 DPP の結晶構造解析研究に着手したが、PgDPP7⁹⁾, PeDPP11, PgDPP11¹⁹⁾ といった歯周病菌由来の S46 DPP が発見され、我々も Pm の類縁菌である多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm) などの糖非発酵グラム陰性細菌が Clan PA S46 の DPP を持つことを見出し、S46 DPP を抗菌薬の標的分子とする SBDD 研究へと大きく転換した。

S46 DPP は、既知の DPP とアミノ酸配列相同性、基質認識の類似性はなく、全く新規の DPP であると考えられ、エンド型酵素であるキモトリプシン様のセリンプロテアーゼ (Clan PA) であることが予想されたが、アミノ酸

タイプ	ファミリー	切断様式	構造
I	S1, 3, 7, 30, 31, 32, 39	エンド型	N 触媒ユニット C H57 D102 S195
II	S6, 29	エンド型	N 触媒ユニット C H73 D101 S207
III	S55, 64	エンド型	N 触媒ユニット C H465 D545 S640
IV	S46	エキソ型	N 触媒ユニット C H86 D224 S657

Fig. 2 Typing of peptidase families from clan PA by peptidase unit position.

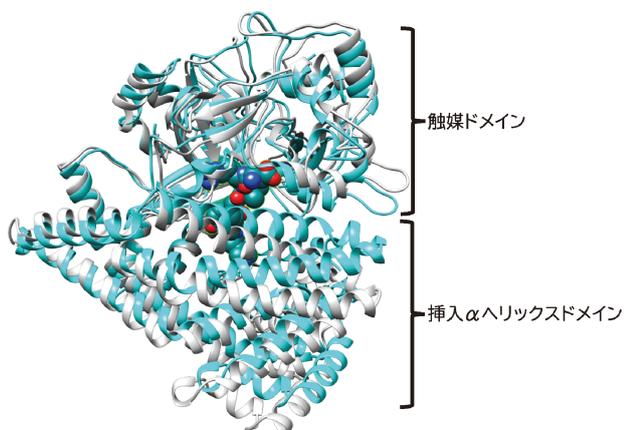


Fig. 3 (Color online) Crystal Structure of DAPBII (bacterial DPP7). Comparison of the subunit structure of peptide-free DAP BII (white) and that of hexapeptide (sphere model)-bound inactivating DAP BII (cyan).

残基数は約720残基とキモトリプシンの約3倍の大きさである理由とエキソ活性を有する理由は不明であった²⁰⁾。(Fig. 2)

DAP BII の結晶構造解析により、アミノ酸配列上、キモトリプシン様のドメイン中間に位置する挿入αヘリックスドメインが触媒ドメインの基質結合部分に覆いかぶさり、完全に閉じた構造となることで、基質の大きさが制限され、さらに、αヘリックスドメイン中の N330 が基質 N 末端の認識とジペプチド単位での切断機構に関与していることを解明した²⁾。また、アポ体では、基質の入口が開いていたが、ペプチド複合体では、挿入αヘリックスドメインが完全に触媒ドメインを覆い、閉じていた。(Fig. 3)

4. DAP BII および SmDPP7 に対する阻害剤の開発

DAP BII が疎水性・塩基性アミノ酸に特異性を有することから、P1 位に疎水性・塩基性のアミノ酸を持つ各種

ペプチドとの複合体の解析を進めた。

その結果、野生型 DAP BII とオリゴペプチドである Angiotensin II (アミノ酸配列: DRVYIHPF) との共結晶から Val-Tyr との複合体構造を得た。このことは、DAP BII による Angiotensin II の分解生成物である Asp-Arg, Val-Tyr, Ile-His, Pro-Phe のうち Val-Tyr の結合が最も強いことを示唆していた。そして、生化学的にも Val-Tyr が阻害活性 (IC₅₀ 0.5 mM, K_i 0.41 mM) を示すことを2014年に明らかにした。ジペプチド骨格を有する化合物は、2型糖尿病薬の標的分子である DPP4 阻害薬として実用化されている。我々は、S46 DPP においても、ジペ

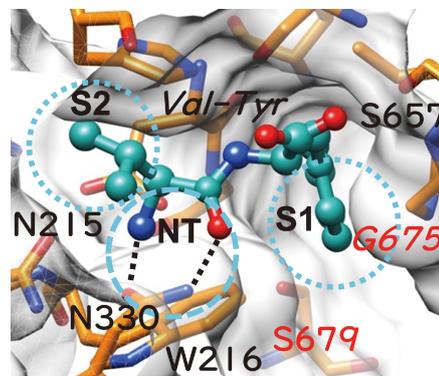


Fig. 4 (Color online) Crystal structure of Val-Tyr bound DAP BII. S1 subsite and S2 subsite are shown as dotted circle. The interaction (shown as long dotted line: NT) between the side chain of N330 in the helical domain and N-terminus of the Val-Tyr dipeptide.

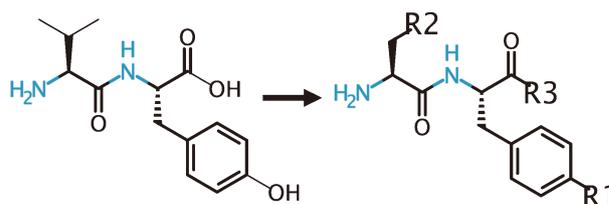


Fig. 5 Compound design strategy. Val-Tyr dipeptide (Left), Designed compound (Right)

プチド骨格を有する化合物が、その阻害剤となり、抗菌薬として作用すると推測した。その頃、国際学会でペプチド誘導体合成の専門家である日高興士博士と知り合い、微生物 DPP7 に対するジペプチド誘導体の開発に着手することができた。阻害剤開発の方針として、主に S1 サブサイトおよび S2 サブサイト及びペプチドアミノ末端認識 (NT) の推定ファーマコフォアを活用することとした。

(Fig. 4)

N330 との相互作用を維持するジペプチドを基本とし、R1, R2, R3 を様々な官能基に変えた化合物 100 種以上を設計・合成し、SmDPP7 に対する生化学的評価を実施した。

(Fig. 5)

その結果、最も阻害活性が高い化合物の SmDPP7 に対する IC₅₀ は数 μM で、歯周病菌に対する抗菌効果を有することを確認した。これらの化合物の中には SmDPP7 と PgDPP7 の両方に阻害効果を示す化合物がある一方で、SmDPP7 に対する残存 DPP 活性が 8.5%、PgDPP7 に対しては 59.9% と SmDPP7 に選択的な阻害効果を示す化合物があった²¹⁾。

5. DPP11 に対する阻害剤の開発

PgDPP11 とジペプチドとの複合体構造の解析を目指していたが、ジペプチドとの複合体構造を得ることはできなかった。しかしながら結晶化溶液に含まれていたカリウムイオンとクエン酸の結合した PgDPP11 の構造を 1.5 Å 分解能という高分解能で決定できた (PDB ID 6JTB)。この構造は、JAXA との共同研究により、国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟でカウンターディフュージョン法²²⁾により結晶化した結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー BL-17A で測定して得られた。これまでに英国、ドイツの複数のグループも PgDPP11 の結晶構造を報告しているが、2022/2 時点でも 6JTB の結晶構造が最も高分解能である。(Table 1)

カリウムイオンは、W219 とのカチオン- π 相互作用が推定され、クエン酸は、S1 サブサイトの底部にある R673 と

結合し、ジペプチドにおける Asp や Glu の側鎖との塩橋形成を模していることが示唆された。(Fig. 6, Fig. 7A)

そして、この 2 つの相互作用に加えて、クエン酸の中央のカルボキシ基に結合した水分子を考慮した 3D ファーマコフォアを設定し、ナミキ商事の提供する 400 万化合物のライブラリを用いて、第 1 段階のバーチャルスクリー

Table 1 Comparisons of crystallographic statistics between PgDPP11 structures. Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

PDB ID	6JTB (JP: Space)	5SDD (UK)	5JWF (DE)
Space Group	<i>C</i> 2 2 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Beamline	PF BL-17A	DLS I04-1	ESRF BM14
Detector	Pilatus 6M	Pilatus 6M	MAR CCD 225
Resolution (Å)	50-1.5 (1.53-1.50)	92-1.84 (1.99-1.84)	92-2.2 (2.32-2.2)
Completeness (%)	99.9(98.3)	96(76.9)	99.7(99.4)
<i>R</i> _{merge}	0.049(0.674)	—	0.091(1.224)
<i>CC</i> _{half}	0.999(0.688)	0.999(0.708)	—
Redundancy	6.5(4.4)	6.5(5.3)	5.6(5.4)
<i>I</i> / σ	17.7(2.1)	—	12.3(0.6)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.1702/0.1942	0.2412/0.2636	0.2077/0.2595

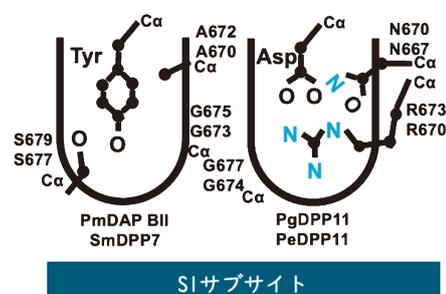


Fig. 6 Schematic diagrams of the S1 subsites of S46 peptidases. The P1 specificities are as follows: DPP11: negatively charged; DAP BII (PmDPP7): aromatic (non-specific).

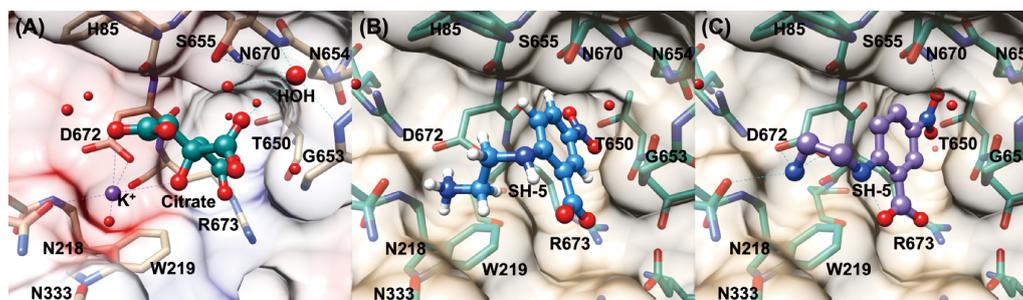


Fig. 7 (Color online) Three-dimensional structures of the complex of PgDPP11.

(A) The binding mode of citrate ion in the S1 subsite of PgDPP11.

(B) SH-5 docking model of PgDPP11. (C) Crystal structure of SH-5 bound PgDPP11.

ニングを実施し、14676化合物に絞り込んだ。さらに、ドッキングベースで第2段階のバーチャルスクリーニングを実施し、120化合物に絞り込み、構造類似性及び入手性の点から13化合物に絞り込み、生化学的評価を実施し、PgDPP11に対するIC₅₀が約1 mMであるSH-5を見出し (Fig. 7B), 結晶構造も決定した (Fig. 7C)。また、PgDPP11を標的分子として探索したにも関わらず、SH-5は、PgDPP11やSmDPP11だけでなく、基質特異性の異なるPgDPP7, SmDPP7も阻害することがわかった。

そして、このSH-5の類似体として容易に入手できたNPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) に対して、S46 DPP に対する生化学的評価を実施したところ、DPP11のみを選択的に阻害することがわかった。(Fig. 8)

さらに、大腸菌および歯周病菌に対する抗菌活性を評価したところ、SH-5は1 mMで68%, NPPBは0.1 mMで99%の歯周病菌の増殖を抑制したが、大腸菌 (*E. coli*) の増

殖は抑制しなかった。(Fig. 9)

この結果は、NPPBの作用機序が、NFGNRと大腸菌の両方に効果のある約50年前に発見された天然由来ジペプチド様化合物ネガマイシン²³⁾とは異なる作用機序であることを示していると思われる。

6. S2 サブサイトの特異性

これまで、S46 DPPの基質認識はS1サブサイトにのみ着目していた。S1サブサイトでの基質特異性が異なるDPP7とDPP11の両方を同時に阻害することができる化合物は、高い抗菌効果の実現を期待できる。S1サブサイトの静電ポテンシャルは両者で大きく異なることから、S1サブサイトの特徴を利用する化合物はDPP7もしくはDPP11のどちらかを阻害する化合物となる可能性が高い。従って、S2サブサイトの特徴を利用できる化合物を見出すために、S2サブサイトの基質特異性を生化学的に評価した⁴⁾。SmDPP7に対してP2位のアミノ酸を変えたXaa-TyrジペプチドによるTyr-Tyr-MCA 蛍光基質の阻害活性を評価した。その結果、およそ50%以下の阻害活性をもつP2位のアミノ酸を阻害活性の強い順に並べると、Phe, Leu, Tyr, Asn, Met, Val, Argの順となった。(Table 2)

これらの結果から、P2位にAsnがある場合にはSm, Pgの両方に対して、Tyrがある場合には、Smに対して、Trpがある場合にはPgに対して標的選択性があることが推測され、薬剤設計に活用可能なS2サブサイトのファーマコフォアを規定できる可能性が示唆された。(Fig. 10)

そして、これらのジペプチドの結晶構造解析から、水分子を介した水素結合がS2サブサイトにおける基質選択性へ関与することが示唆された。そして、P2位のAsnの認識においては、複数の水分子を介した水素結合ネットワークの形成を確認することができた。(Fig. 11)

また、ITC (Isothermal Titration Calorimeter) による

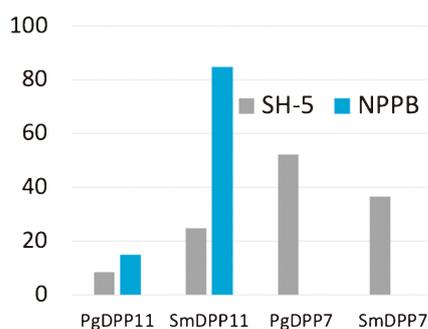


Fig. 8 Inhibitory effects of SH-5 and NPPB against S46 DPPs. Leu-Asp-MCA (4-methylcoumaryl-7-amide) and Met-Leu-MCA as the substrates for DPP11s and DPP7s respectively. Residual activities (100% activity=activity without inhibitor) were measured under the conditions where the concentrations of inhibitor and synthetic substrate were 100 μ M.

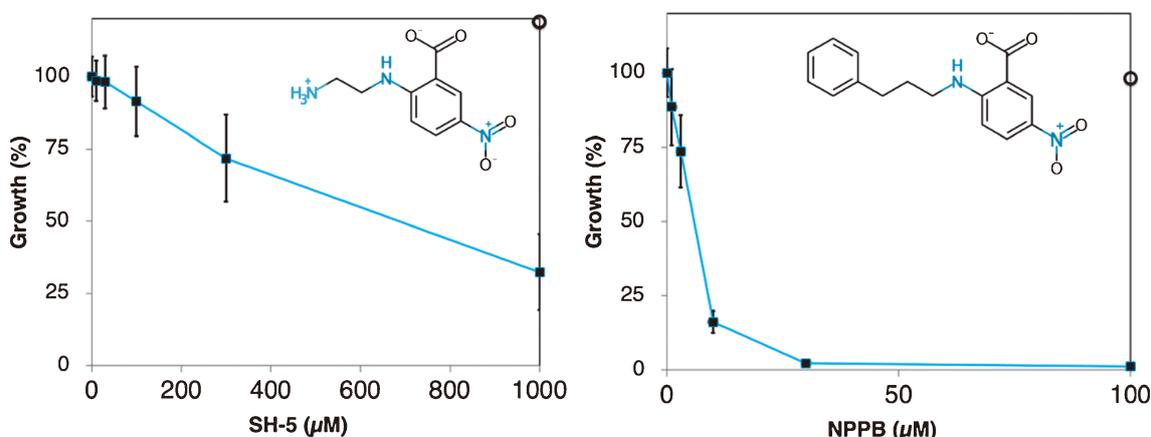
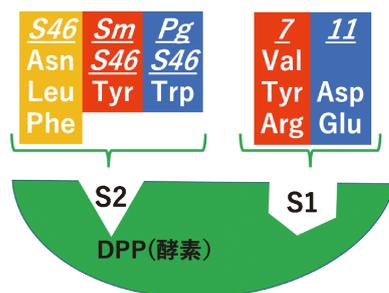
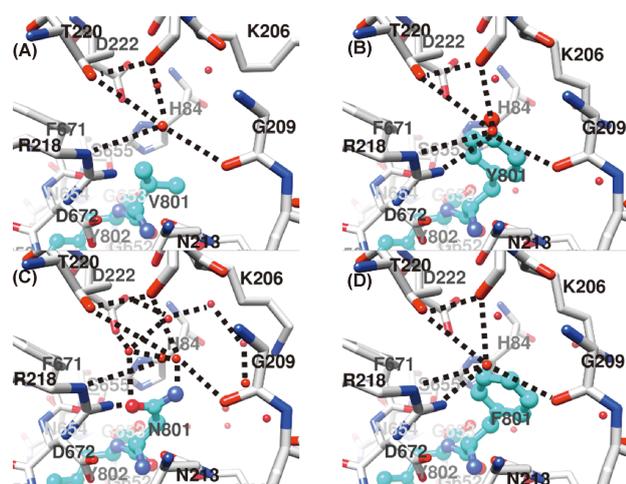


Fig. 9 Biological evaluations of the antigrowth activity of SH-5 (Left) and the lipophilic analog NPPB (Right) against the *P. gingivalis* strain W83 (closed squares) and *E. coli* strain K12 (open circles). The chemical structure of each compound is shown in the box.

Table 2 (Color online) Inhibition constants (K_i (μ M)) of Xaa-Tyr/Xaa-Asp dipeptides against the hydrolytic activities on synthetic substrates of S46 peptidases.

Dipeptide	Asn-Tyr	Arg-Tyr	Tyr-Tyr	Met-Tyr	Val-Tyr	Trp-Tyr	Leu-Tyr	Phe-Tyr
SmDPP7	7.80	-	7.66	11.2	55.2	-	2.39	1.27
SmDPP11	61.9	23.2	5.66	-	-	6.27	5.68	7.01
Dipeptide	Asn-Asp	Arg-Asp	Tyr-Asp	Met-Asp	Val-Asp	Trp-Asp	Leu-Asp	Phe-Asp
PgDPP7	210	-	-	-	-	30.6	61.0	150
PgDPP11	4.06	-	-	-	-	1.36	3.35	5.11

**Fig. 10** (Color online) Substrate specificity in S1 subsite and S2 subsite of S46 DPPs.**Fig. 11** (Color online) The S2 subsite of SmDPP7/dipeptide complexes.

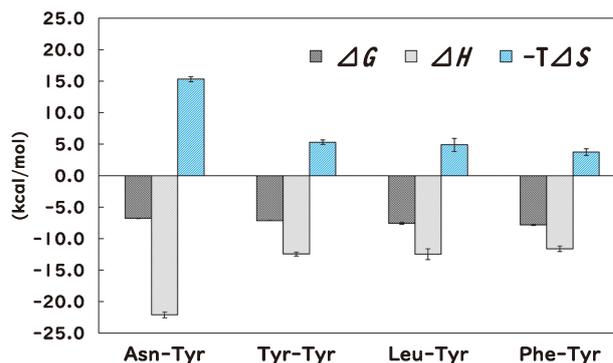
(A) Val-Tyr (7DKC) (B) Tyr-Tyr (7DKB) (C) Asn-Tyr (7DKD) (D) Phe-Tyr (7DKE)

The parentheses after the dipeptide indicate the PDB ID.

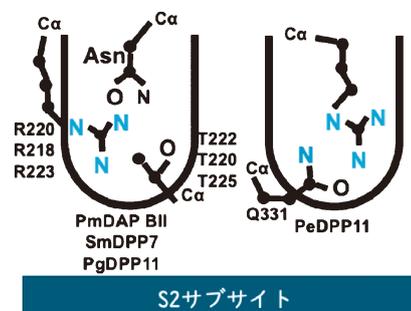
測定で、Asn-Tyrのエントルピー変化 ΔH の絶対値が他のジペプチドと比べて明らかに大きい点は、P2位のAsn認識における水素結合ネットワークの寄与が大きい点とも矛盾しない。(Fig. 12)

また、長崎大のグループによるPgDPP11に対するジペプチドの K_i は、Leu-Aspで0.056, Arg-Aspで0.086, PeDPP11に対しては、それぞれ0.059, 0.172 mMであった。

S2ポケットに存在するアミノ酸を比較すると、Smで

**Fig. 12** Thermodynamic parameters of dipeptide binding of SmDPP7.

Gibbs free energy (ΔG) and entropy energy (ΔS) were calculated according to the equation, $\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d$ ($K_a = 1/K_d$, association constants), $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

**Fig. 13** Schematic diagrams of the S2 subsites of S46 peptidases.

はAsnであるアミノ酸がPg及びPeでは、それぞれAla, Glnであり、長崎大のPeDPP11とArg-Asp複合体の構造からは、GlnとP2位のArgが相互作用している可能性が示唆された²⁴⁾。(Fig. 13, Table 3)

現時点で、PgDPP11とジペプチドの複合体構造を得られていないが、これはS2サブサイトにおいて、他のDPPではAsnやGlnである残基が、PgDPP11ではAlaであることで、S2サブサイトでの結合が弱くなっているためかもしれない。しかしながら、PeDPP11よりも、PgDPP11へのArg-Aspの阻害のほうが若干であるが強く、矛盾している点もある。

Table 3 The catalytic and substrate-recognition residues of S46 peptidases.

	Catalytic Residues	N-terminal recogniton	S1 pocket	S2 pocket
PmDAP BII	H86, D224, S657	N215, W216, N330, D673	D651, I652, G655, A672, G675, S679	F209, G211, R220, T222, N329, F673
SmDPP7	H84, D222, S655	N213, W213, N328, D672	D649, I650, G652, A670, G673, S677	F207, G209, R218, T220, N327, F671
PgDPP11	H85, D227, S655	N218, W219, N333, D672	H649, T650, G653, N670, R673, G677	F212, A214, R223, T225, A329, F671,
PeDPP11	H85, D226, S652	N217, W218, N332, D669	H646, T647, G650, N667, R670, G674	F211, S213, R222, T224, Q331, F668

7. 今後の展望と課題

これまでに、S46 DPP の S1 サブサイトの認識機構、S2 サブサイトにおける新たな基質選択性を酵素学的、構造生物学的、物理化学的に明らかにしてきた。

そして、カチオン- π 相互作用、水素結合などの選択性の高い相互作用を有する化合物を見出すことが期待できる S1 サブサイトと S2 サブサイトの両方のファーマコフォアを利用することで、エンタルピーの寄与が大きく選択性の高いフラグメント化合物を見出すことができつつある。これは、特異的な結合を有する化合物から、 ΔS の大きい疎水相互作用を有する化合物へと展開する点で FBDD (Fragment Based Drug Design) 創薬において理想的な展開だと考えられる。今後、生物学的指標と併せて評価し、開発サイクルを回すことで抗菌化合物の創出を目指す。

S46 DPP の構造生物研究においては、化合物およびタンパク質と水分子との相互作用を議論できる分解能での結晶構造解析を実現するために、微小重力環境での結晶化が大きな役割を果たしている。また、産総研の石原司博士との共同研究では、石原博士と榊中村超硬が開発した医薬候補化合物自動探索装置を用いて、これまでに得られた PgDPP11 と化合物の複合体の相互作用情報に基づいて、新規化合物を自動設計・合成し、初期構造から約 20 倍の薬理活性を有する化合物を合成することに成功している。今後、S46 DPP に共通するあるいは種で異なる S2 サブサイトの構造に基づいて、より活性の高い化合物を創出する予定である。

米国は、AMR アクションプランに先駆けて、新規抗菌薬開発インセンティブ付与法 (GAIN 法 (The Generating Antibiotic Incentives Now Act of 2011)) を制定、2013 年に施行し、感染症治療薬への 5 年の特許延長、承認審査の迅速化などのインセンティブによって新規抗菌薬開発が進みつつある。しかしながら、抗菌薬の適正使用による使用量制限は、研究開発費用の回収を困難としている。AMED による創薬支援は企業への導出を前提としているため、抗菌薬開発に向けた支援を受けることは非常に難し

い。このような状況を打開するためには、政府によるアカデミア・企業の双方への基礎研究から創薬に向けた、近視眼的でなく、製品の販売量や採算性とは独立した積極的な支援が必要である。

アメリカ国立アレルギー・感染症研究所は、CSGID (Center for Structural Genomics of Infectious Diseases) 及び SSGCID (Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease) という感染症に関わる標的分子の網羅的な構造生物研究コンソーシアムに対して支援し、これまでに 2200 以上の構造解析を実施している。COVID-19 を始めとして、様々な感染症は世界的な脅威となる恐れがある。我々もアカデミアとして来る感染症の脅威に立ち向かうべく努力していきたい。

謝辞

本研究は、科研費 (25462872, 16H04902, 16K8322, 19H02876, 21K06071)、創薬等先端技術線基盤プラットフォーム事業 (JP18am0101083, JP18am0101072, JP18am0101071, JP19am0101071, JP20am0101071, JP21am0101071) 支援番号 0026、大阪大学蛋白質研究所共同研究員制度 (超分子構造解析学研究室, CR1405, CR1505, CR1605, CR1705, CR1805, CR1905, CR2005)、高エネルギー加速器研究機構 PF (2011G090, 2013G138, 2017G162) と SPring-8 (2013A6822, 2013B6822, 2014A6924, 2014B6924, 2015A6521, 2015B6521, 2016B6620, 2017A6721, 2017B6721, 2018AA6818, 2018B6818, 2019A6917, 2019B6917)、武田科学振興財団薬学系研究助成、私立大学研究ブランディング事業 (H29-A3, 岩手医科大学血管病プロジェクト) の支援及び国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構が実施している「きぼう」利用高品質タンパク質結晶生成実験を利用して行ったものである。また、ロシア連邦宇宙局との協力によりプログレス/ソユーズ宇宙船を利用している。宇宙実験でのタンパク質結晶生成技術の一部は、ヨーロッパ宇宙機関とスペインのグラナダ大学が共同で開発したものである。

用語

 α ヘリックス

タンパク質の二次構造の一つで、ペプチド鎖がアミノ酸 3.6残基ごとに1回転するらせん構造のこと。

IC₅₀

50%あるいは半数阻害濃度といい、化合物が生化学的あるいは生物学的作用の半数を阻害する濃度で、この値が低いほど化合物の阻害活性が高い。

K_i

結合阻害定数のことで、酵素と化合物の親和性を示す。この値が低いほど化合物の阻害活性が高い。

3D ファーマコフォア

特に立体的な関係を加味したファーマコフォアのこと。ファーマコフォアは標的分子が化合物を認識するための相互作用に必要な官能基やその位置関係といった特徴を表す。

参考文献

- 1) T. K. Nemoto and Y. Ohara-Nemoto: *Mol. Oral Microbiol.* **36**, 145 (2021).
- 2) Y. Sakamoto *et al.*: *Sci. Rep.* **4**, 4977 (2014).
- 3) Y. Sakamoto *et al.*: *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* **36**, 1 (2019).
- 4) A. Nakamura *et al.*: *Sci. Rep.* **11**, 1 (2021).
- 5) 厚生省: 平成10年人口動態月報 (1999).
- 6) H. Keiji: *Japanese J. Chemother.* **68**, 499 (2020).
- 7) G. Morgan, Y. Yamano, K. Tone, M. Kinoshita, T. Sawada and T. Nagata: *Nature* **586**, no. 7830 (2020).
- 8) M. Madej *et al.*: *Nat. Microbiol.* **5**, 1016 (2020).
- 9) A. Banbula *et al.*: *J. Biol. Chem.* **276**, 6299 (2001).
- 10) Y. Yoshida, M. Sato, T. Nonaka, Y. Hasegawa and Y. Kezuka: *J. Oral Microbiol.* **11**, no. 1 (2019).
- 11) N. D. Rawlings, A. J. Barrett and R. Finn: *Nucleic Acids Res.* **44**, D343 (2016).
- 12) K. Ito, Y. Nakajima, N. Tanaka and T. Yoshimoto:

Seikagaku. **81**, 5 (2009).

- 13) Y. Ohara-Nemoto *et al.*: *J. Biol. Chem.* **286**, 38115 (2011).
- 14) Y. Ohara-Nemoto *et al.*: *J. Biol. Chem.* **289**, 5436 (2014).
- 15) K. Takeuchi, T. Fujita and S. Hiroi: *Folia Pharmacol. Jpn.* **137**, 43 (2010).
- 16) Y. Ohara-Nemoto, M. T. Sarwar, Y. Shimoyama, T. Kobayakawa and T. K. Nemoto: *FEMS Microbiol. Lett.* **367**, no. 24 (2020).
- 17) H. Oda, K. Saiki, M. Tonosaki, A. Yajima and K. Konishi: *J. Periodontal Res.* **44**, 362 (2009).
- 18) Y. Ohara-Nemoto *et al.*: *J. Biol. Chem.* **286**, 38115 (2011).
- 19) S. M. A. Rouf, Y. Ohara-Nemoto, T. Hoshino, T. Fujiwara, T. Ono and T. K. Nemoto: *Biochimie* **95**, 824 (2013).
- 20) Y. Suzuki, Y. Sakamoto, N. Tanaka, H. Okada, Y. Morikawa and W. Ogasawara: *Sci. Rep.* **4**, 4292 (2015).
- 21) K. Hidaka *et al.*: *Pept. Sci.* **2020**, 95 (2021).
- 22) H. Tanaka, S. Takahashi, M. Koga, B. Yan, N. Furubayashi, M. Kamo, K. Inaka: *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* **36**, 360107 (2019).
- 23) M. Hamada, T. Takeuchi, S. Kondo, Y. Ikeda and H. Naganawa: *J. Antibiot. (Tokyo)*. **23**, 170 (1970).
- 24) G. A. Bezerra *et al.*: *Sci. Rep.* **7**, 2848 (2017).

著者紹介



阪本 泰光

岩手医科大学薬学部 准教授

E-mail: sakamoto@stbio.org

専門: 構造生物学

【略歴】

2002年長岡技術科学大学大学院工学研究科単位取得退学, 同年昭和大学保健医療学部・助手, 2005年博士(薬学)昭和大学。2007年昭和大学保健医療学部講師, 2008年岩手医科大学薬学部助手, 2009年同助教を経て, 2017年より現職, Space BD 株式会社 ライフサイエンス事業アドバイザー, さいたま市立大宮北高等学校スーパーサイエンスハイスクール運営指導委員。

Development of inhibitors with a novel mechanism of action targeting S46 DPPs in nonfermenting pathogens

Yasumitsu SAKAMOTO¹, Koushi HIDAKA², Tsukasa ISHIHARA³,
Akihiro NAKAMURA⁴, Yoshiyuki SUZUKI⁵, Mizuki SEKIYA¹, Saori ROPPOINGI⁵,
Wataru OGASAWARA⁴, Nobutada TANAKA⁶

¹School of Pharmacy, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba, Iwate 028-3694 Japan

²Graduate School of Health Sciences, Kobe University, 7-10-2 Tomogaoka, Suma-ku, Kobe, 654-0142 Japan

³Biomedical Research Institute, Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566 Japan

⁴Department of Science of Technology Innovation, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188 Japan

⁵School of Medicine, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba, Iwate 028-3694 Japan

⁶School of Pharmacy, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641 Japan

Abstract Some periodontal pathogens and multidrug-resistant bacteria, which are non-fermenting gram-negative rods (NFGNRs) utilize protein or peptide as an energy source. Therefore, these uptakes and metabolize pathways are ideal targets for development of antimicrobials to these bacteria. Most of these NFGNR species are known to be resistant to many antibiotics. The target molecules include peptidases, peptide transporters and phosphate transacetylase and acetate kinases involved in the final step of amino acid metabolism. We successfully determined the first crystal structure of a family S46 DPP in 2014, which is a specific Dipeptidyl amino peptidase (DPP) in some NFGNRs. We conducted a cycle of *in silico* screening, docking studies, compound design and synthesis, evaluation of inhibitory activity and antibacterial effect to develop compounds that specifically inhibit S46 DPPs and have antimicrobial activity against periodontal bacteria based on the interaction information from the complex structures of S46 DPPs with various peptides and compounds. As a result, we found the compounds that specifically inhibit S46 DPPs and have antimicrobial activity against periodontal bacteria. In addition, a new mode of substrate selectivity at the S2 subsite was elucidated in 2021, which provides insights for the rational development of compounds with high specificity. In this article, we will discuss the results and prospects of our structural biology research on S46 DPPs.