

研 究 報 告 書

「汎特異的相互作用を基盤とする多剤耐性機構の動的立体構造解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研 究 者: 竹内 恒

1. 研究のねらい

本研究では、化合物に対する最も基本的かつ普遍的な防御機能であり、病原性バクテリアや癌による獲得が医療分野において大きな問題となっている「多剤耐性」が、どのような分子機構により引き起こされるのかを、溶液 NMR 法を中心とする「動的立体構造解析」を確立することで解明し、以下のような成果を確立することを目指した。

- ・汎特異的相互作用を基盤とする多剤耐性転写因子の転写制御機構の解明
- ・化合物に対する最も基本的かつ普遍的な細胞防御機構としての多剤耐性の理解
- ・“静的な”立体構造解析技術と相補的な、動的立体構造解析技術の確立
- ・汎特異的相互作用を基盤としてタンパク質・細胞機能が発現する分子機構の解明

X線結晶構造解析をはじめとする精緻な立体構造解析技術の普及により、特定の対象に対する特異的相互作用に基づくタンパク質・細胞機能については、構造生物学的理解が進んだ。しかしながら、一見類似性の無い対象群との結合により特定のタンパク質機能が誘起される「汎特異的相互作用を基盤としたタンパク質・細胞機能」については、その重要性が認識されているにもかかわらず構造生物学的理解が遅れている。その主たる原因は、動的な性質を持つ汎特異的相互作用を扱う解析基盤の欠如にある。本研究は、多剤耐性転写因子が様々な薬剤との汎特異的相互作用を介して多剤排出トランスポーターの転写を亢進する分子機構を、NMRを用いた動的構造解析を通じて提示し、これを生化学的実験により検証することで、解析基盤としての「動的立体構造解析技術の確立」を行った。本研究の遂行により「汎特異的相互作用を基盤とするタンパク質・細胞機能の発現」を解明する革新的な成果と、関連する研究領域への大きな波及効果が期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

溶液 NMR 法を用いた多剤耐性転写因子 LmrR の動的構造解析を通じ、LmrR の薬剤結合部位が、薬剤非結合状態において開・閉構造の間の幅広い動的構造平衡下にあること、また各種薬剤添加に伴って、構造平衡が閉構造の方に傾くことを見出した。また、LmrR は、結合する薬剤に応じて異なる構造平衡に移行することで、多剤結合を達成していた。また本機構を、構造平衡を傾けるような変異体を作成することで、分子論的にも証明した。さらに、薬剤非結合時には薬剤結合部位とは離れた疎水コアで、メチル側鎖の運動が亢進された。このことは、LmrR が薬剤結合にともない構造エントロピーを稼ぎ、高親和性結合と汎特異的結合を両立することを示している。

また多剤結合にともなう転写制御を明らかにするため、多剤耐性トランスポーターLmrCD のオペレーター領域において LmrR の特異的結合領域を同定した。NMR 滴定実験により、LmrR-DNA 結合の量論比を検討したところ、1 分子の DNA 二重鎖に対し、2 分子の LmrR 2 量体が結合していた。このユニークな結合量比を、ITC、ゲル濾過、超遠心解析により検証・証明した。また DNA を LmrR に添加したところ、DNA 結合時には、化合物とは逆に、構造平衡が傾いた。よって、薬剤は DNA 結合に不利な構造平衡を誘起することで、LmrR の転写制御活性を制御していると考えた。本機構は、閉・開構造に平衡が傾いた変異体の DNA 結合強度を、WT と比較することで証明した。さらに、LmrR と非特異的 DNA との結合実験を行った結果、LmrR がランダムな配列と結合することが明らかとなった。この非特異的結合を考慮すると、*in vivo* で見られる定常的な多剤耐性トランスポーターの発現と薬剤添加に伴う発現誘導プロファイルがよく再現された。よって、非特異的 DNA 吸着の存在により LmrR の効果的な転写制御が達成されることが見出された。

以上のように、本件研究では溶液 NMR 法を中心とする動的立体構造解析により、汎特異的相互作用を基盤としてタンパク質・細胞機能が発現する分子機構を解明することで、化合物に対する最も基本的かつ普遍的な細胞防御機構としての多剤耐性の理解を進めることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ1: 動的立体構造解析に基づく汎特異的多剤・高親和結合の理解(原著論文1)

本研究では、PadR-like ファミリーに属する MDTR であり、*L. lactis* の主要な多剤耐性機構を担う LmrR を題材に、LmrR が様々な薬剤を汎特異的かつ高親和に認識する分子機構を明らかにするため、溶液 NMR 法を用いた動的立体構造解析を行った。

まず薬剤非結合状態における LmrR の NMR 緩和測定を行った結果、C ヘリックスが μs - ns 時間スケールの運動性を有することが明らかとなった。メチル基シグナルに関しても基質結合部位のシグナル強度が弱い傾向にあり、主鎖の運動を直接反映する Ala のメチル基オーダーパラメーター(S^2)を算出すると、C ヘリックスに存在する Ala-92, Ala-108 の S^2 が小さく、C ヘリックスの構造的柔軟性が示唆された。

X線結晶構造によって明らかになった各種構造を比較すると、各構造の由来する結晶型は異なるものの、Cヘリックスには付け根をヒンジとして上下に可動域が存在した。Cヘリックスが上向きの時には薬剤結合部位は閉じる方向に、Cヘリックスが下向きの時には薬剤結合部位は開く。興味深いことに、X線結晶構造におけるCヘリックスのコンフォメーションとIle-62の χ^2 角が相関し、Cヘリックスが上向きの時には、Ile-62の χ^2 角がgauche-となっており、メチル基は上を向いていた。逆にCヘリックスが下向きの構造の時には、メチル基が押し下げられIle-62の χ^2 角がtrans構造をとることが明らかとなった。

一方 ^{13}C HMQC スペクトル中でIle-62の δ^1 シグナルは ^{13}C 方向に広幅化しており、またその S^2 は他に比べて小さかった。Ileの δ^1 シグナルの ^{13}C 化学シフトは、 χ^2 角を反映することが知られているが、薬剤非結合状態におけるIle-62 δ^1 の ^{13}C 化学シフトからその χ^2 はtrans/gauche-がほぼ等しく存在する状態にあった。よって、Cヘリックスは非結合状態において上・下向きの間での構造平衡下にあり、両者間のエネルギー差がほとんど存在しないことが示された。また測定温度を変化させるとIle-62 δ^1 の ^{13}C 化学シフトは他の残基と比べて大きく変化し、Cヘリックスの構造平衡の存在がさらに支持された。

次に LmrR に結合する各種薬剤を飽和量添加し、Ile-62 $\delta 1$ の ^{13}C 化学シフト変化を解析した。その結果、薬剤結合に伴い Ile-62 $\delta 1$ の ^{13}C 化学シフトはすべて高磁場シフトし、薬剤結合が C ヘリックスの構造平衡を上向き(閉方向)に傾けることが分かった。また Ile-62 $\delta 1$ の ^{13}C 化学シフトの温度依存性を見ると、非結合状態においては 11.5 ~ 12 ppm からの幅広い分布がみられたのに対して、化合物添加時には、非結合状態を超えない範囲で構造平衡が上向きに移行した。このことは LmrR が非結合状態において広く浅い自由エネルギー平面を有する一方、各種薬剤結合時には一定の運動性を保ちながら異なる度合いで上向き閉方向へ構造平衡を傾けることを示している。すなわち LmrR は非結合状態で既に存在する構造平衡から、一部の平衡が薬剤に応じて安定化される、構造選択機構により多剤結合を達成していることが強く示唆された(図1)。

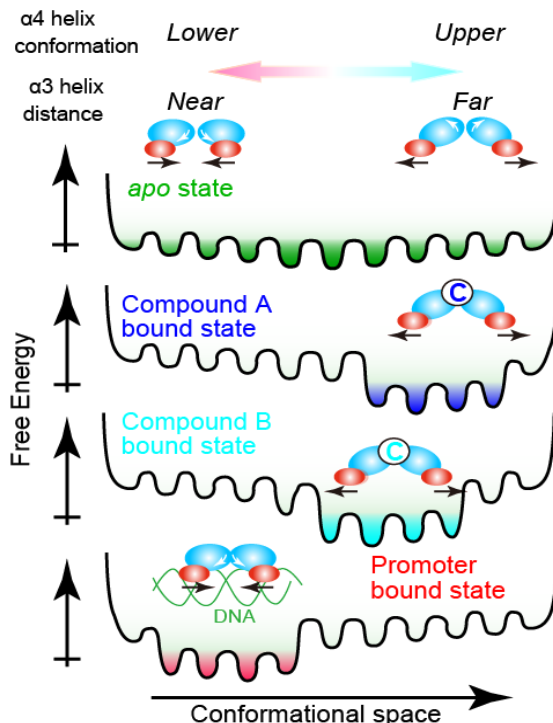


図1: 動的構造解析により明らかとなった構造選択機構による多剤結合と転写制御機構

そこで、さらに次に C ヘリックスの接触面を中心に変異体を 65 種作成し、開閉(上下)の構造平衡に摂動を与えることで、先天的な動的構造平衡の多剤結合における重要性を検証した。その結果、開閉両方向に平衡が傾いた変異体を得ることに成功した。これらの中から閉状態にバイアスされた変異体 G85A, 開状態にバイアスされた変異体 Q12A を選択し、これらに対する薬剤結合を WT と比較した。その結果、両変異体ともに WT に比べて結合定数が低下していることが確認された。また WT と比較すると、薬剤が好む閉構造に傾いた G85A よりも、薬剤が好まない開構造に傾いた Q12A 変異体の方が、薬剤結合をより大きく低下させた。低下の度合いは、Rho6G に対してよりも、Ethidium, Daunomycin に対して顕著であり、構造平衡にバイアスがかかると多剤結合に支障をきたすことが分かり、構造選択機構による多剤認識が証明された。

また非結合状態では、薬剤結合サイトから離れた疎水コアに存在するメチル基は ps-ns の速い運動性が抑制されていたが、薬剤結合によりそのような部位での運動性が増大し、負の構造エントロピー変化を示すことで、2~10 倍程度結合定数を増強させていた。運動性の増大は C ヘリックスの構造平衡が上向きに傾くことで、その直下にある疎水コアが緩むことにより達成されていると考えられ、実際上向きに構造平衡を傾ける変異体においては、疎水コア内での NOE の観測効率が減少した。すなわち LmrR は薬剤結合にともなって疎水コアにおける速い運動性を増大させることによりエントロピー的に高親和性結合を実現していた。

研究テーマ2:「汎特異的」多剤結合による転写制御機構の解明(原著論文4)

LmrR の結合領域は DNA フットプリンティング法などで大まかに決定されているが、構造解

析を行うためにはこれを 30 bp 程度に絞り込む必要がある。そのため、配列を重複させた DNA 断片を複数合成し、それらと LmrR との結合を SPR 法により解析し、33 bp の結合領域を同定した。NMR タイトレーション実験により LmrR-DNA 結合のストイキオメトリーを検討したところ、1 分子の DNA 二重鎖に対して 2 個の LmrR 2 量体が結合していることが明らかとなった。実際、LmrR の構造変化を鋭敏に反映する Ile-62 のシグナルは 4 個に分裂しており、上記量論比が成立していると考えられた。このユニークな結合量比は、ITC、ゲル濾過、超遠心解析により検証・証明した。

DNA 結合は、Ile-62 $\delta 1$ に対して化合物とは逆向きの化学シフト変化を誘起した。このことは、薬剤結合が $\alpha 4$ ヘリックスの構造平衡を上向き閉方向に変化させる一方、DNA 結合は $\alpha 4$ ヘリックスの構造平衡を下向き開方向に変化させることを示している。C ヘリックスの向きは DNA ヘリックス間の距離を規定する。すなわち、C ヘリックスが上向きの時には DNA 結合ヘリックス間の距離は長く、下向きの時は短くなっており、薬剤結合に伴い、DNA 結合状態よりも C ヘリックスが上向きになることは、DNA 結合ヘリックス間の距離が増大することを意味している。よって、薬剤結合に伴い DNA 溝間の距離と DNA 結合ヘリックス間の距離が合わなくなることで LmrR の特異的サイトに対する結合が減少すると考えられる。実際、WT と比較すると、薬剤が好む上向き構造に傾いた変異体は、DNA に対する結合を大きく低下させた。低下の度合いは、構造平衡が上向きに傾くほど低下していたことから、構造平衡により特異的 DNA 結合サイトに対する結合が制御されていることが証明された(図1)。

さらに、薬剤添加にともなう RFV の添加により LmrR の DNA に対する結合強度は 85 nM から 350 nM へ約 1/4 に低下することが明らかとなった。一方、L.lactis における LmrR 濃度を半定量 WBI により検定したところ、細胞内濃度が 3.6 μ M と判明した。このことは、薬剤結合にともなう結合強度の低下は LmrR の細胞内濃度に対して十分でなく、薬剤が結合しても LmrR は解離しないことを示している。そこで、薬剤結合はゲノム DNA 上での LmrR の局在を変化させると考え、非特異的 DNA の調製と結合実験を行った。その結果、平均 47 μ M の親和性で LmrR がランダムな配列と結合することが明らかとなった。プロモーターへの実効的な結合強度は非特異的 DNA 吸着の分だけ低下するため、LmrCD プロモーターへの実効的な結合強度: K_{eff} は 3.1 μ M となり、薬剤結合状態では 1/4 に低下すると考えると、*in vivo* で見られる定常的な多剤耐性トランスポーターの発現と薬剤添加に伴う発現誘導プロファイルと合致した。よって、非特異的 DNA 吸着の存在により LmrR の効果的な転写制御が達成されたと結論付けた。

以上、NMR を用いた緩和解析、温度依存性解析、変異体解析などから LmrR は柔軟な構造選択機構により多剤認識を達成することが明らかとなった。またその際、遠位における運動性が増大し、構造エントロピーのロスを回避し高親和性を実現していた。さらに、薬剤・DNA 結合は相反する構造平衡を誘起し、このことが薬剤による転写制御の基盤になっていると考えられた。またその際非特異的な DNA 吸着が LmrR の薬剤応答性を最大化するように積極的に寄与していたこのような動的分子機構はタンパク質の動的平衡をありのままに解析できる溶液 NMR により初めて明らかとなったものであり、タンパク質の機能発現における運動性および構造エントロピーの重要性を示すものである。

3. 今後の展開

これまでに PadR-like family 多剤耐性転写因子 LmrR に加えて、その他のファミリー 2 種の代表として QacR (TetR Family, 44 kDa), BmrR (MerR Family, 66 kDa) の低コスト発現・精製法および Ile メチル基シグナルの帰属を確立している。そこで、多剤耐性転写因子群が汎特異的な薬剤結合を転写制御に変換する分子機構を横断的に理解することを目指す。これらの多剤耐性転写因子は分子構造が全く異なっており、異なる機構により多剤・高親和結合および転写制御を行っていると考えられる。これらを横断的に解析することで、化合物に対する最も基本的かつ普遍的な細胞防御機構としての多剤耐性のより深い理解に繋げる。

また本研究を通じて、多剤耐性タンパク質が、非特異的に多様な薬剤と結合する様式を理解することで、これを反面教師としてより特異的な薬剤を設計する方法を開発することが可能になると考えている。このことと関連して、既に本課題で開発した運動性解析を応用し、結合時の局所運動性を定量的に解析し、運動性を抑制する様にリガンドの構造を改変することで、エンタルピー的に結合親和性を改善し、特異性を上昇させる方法を開発した(原著論文3, 5)。またその社会実装を行う一環として、JST が主導する SciFos (Science for Society) に参加し、製薬企業 6 社を訪問し、動的構造創薬の推進について意見を交換させていただいた。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況: 本研究では多剤耐性が「汎特異的な相互作用」を基盤として発現する分子機構を、溶液 NMR 法を中心とする動的立体構造解析の確立により解明し、以下のような成果を確立することを目指した。

- ・汎特異的相互作用を基盤とする多剤耐性転写因子の転写制御機構の解明
- ・化合物に対する最も基本的かつ普遍的な細胞防御機構としての多剤耐性の理解
- ・“静的な”立体構造解析技術と相補的な、動的立体構造解析技術の確立
- ・汎特異的相互作用を基盤としてタンパク質・細胞機能が発現する分子機構の解明

本研究においては、その一種である LmrR の動的構造解析を進めることで、そのすべてについて、十分に目標を達成できたと考えている。また、現在その一般性の検証や概念の展開を行うため、その他の多剤耐性転写因子を含めた横断的な解析を行っており、今後さらなる研究の展開が期待できる。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況): 本研究は申請者が主体的に進めたが、本研究で開発した動的構造解析技術を動的構造創薬へと展開することで、グループ全体としての活動の活性化にも繋がった。また研究費は研究の推進はもちろんのこと、冷媒の購入費用に充てることで、NMR 装置の維持・管理にも活用させていただいた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む):

本研究は、タンパク質が本来持つ運動性に着目し、汎特異的結合を基盤として、多剤耐性転写因子が機能を発揮する仕組みの一端を解明した。このことにより、結合の非特異性の持つ

機能的意義を、明快かつ一定の一般性を持って示すことができたと考えている。なお、細胞内は、様々なタンパク質が高濃度で存在する密集環境であり、特異的結合と非特異的結合が常に共存する。よって、本研究は、タンパク質が細胞の中で機能する仕組みを理解するためにも不可欠である。また本件研究により、原核生物の多剤耐性転写因子は、少なくとも複数あるファミリーごとに汎特異的結合と高親和性を両立する仕組みが異なっていることが示唆されている。よって、今後多剤耐性転写因子群を横断的に解析することで、新たな方法論と学術的概念のさらなる創造が期待される。また本研究は、多剤耐性転写因子群の動的構造と機能の関係を明らかにすることで、病原体やがんの多剤耐性機構を理解するだけでなく、多剤耐性を抑制する阻害分子を見出すことや、動的構造創薬の創出にも繋がる。よって、本研究が切り開く方法論と概念により、新たな創薬化学の展開も期待され、本研究の学術的、社会的な意義は大きい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

多剤耐性転写因子 LmrR 及びその変異体を用いた NMR による動的構造解析により、薬剤結合部位の開・閉構造の動的構造平衡や多剤結合機構を始め、多くの構造知見を明らかにした。また、LmrCD のオペレーター領域での LmrR の特異的結合領域を同定し、LmrR が2量体として結合することを種々の測定により証明すると共に、薬剤結合や DNA 結合による LmrR の転写制御機構と多剤耐性の分子機構を明らかにした。更に、別ファミリーに属する多剤耐性転写因子 QacR や BmrR についても同様なアプローチにより研究を進め、「汎特異的相互作用」による多剤・高親和性結合と転写制御の概念に関する理解を深掘りした。本研究の最大の成果としては、従来の静的な立体構造をベースとした創薬研究では明示的に取り扱われなかった(取り扱えなかった)標的蛋白質の複合体形成時の動的特性を加味した「動的構造創薬」を提唱するための基盤情報を提示したことであり、特筆すべき成果と言える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takeuchi K, Tokunaga Y, Imai M, Takahashi H, Shimada I. Dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor LmrR. *Sci Rep*, (2014), 4, 6922.
2. Takeuchi K, Arthanari H, Imai M, Wagner G, Shimada I. Nitrogen-detected TROSY yields comparable sensitivity to proton-detected TROSY for non-deuterated, large proteins under physiological salt conditions. *J Biomol NMR*, (2016), 64, 143–151,
3. *Mizukoshi Y, *Takeuchi K, Arutaki M, Tokunaga Y, Takizawa T, Hanzawa H, Shimada I, (*equal contribution). Improvement of affinity and thermodynamic properties of weak-affinity ligands by NMR-based evaluation of local dynamics and surface complementarity in the bound state, *Angew Chem Int Ed*, (2016), 55, 14606–14609,

- | |
|---|
| 4. Takeuchi K, Imai M, Shimada I. Dynamic equilibrium on DNA defines transcriptional regulation of a multidrug binding transcriptional repressor, LmrR. Sci Rep. (2017), 7, 267, |
| 5. Tokunaga Y, Takeuchi K, Shimada I, Forbidden coherence transfer of ^{19}F nuclei to quantitatively measure the dynamics of a CF ₃ -containing ligand in receptor-bound states. Molecules (2017), 22, 1492, |

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 竹内 恒 (産総研), 徳永 裕二(JBiC), 嶋田 一夫 (産総研)

発明の名称: NMR を用いた薬剤のスクリーニング方法

出 願 人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

出 願 日: 2015 年 8 月 21 日

出 願 番 号: 特願 2015-163548

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演: Entropy-driven dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor LmrR; The 4th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR – February 2015; RIKEN Yokohama, Yokohama, Japan

招待講演: Dynamic transcriptional regulation of a multidrug transcriptional repressor, LmrR.; The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR – August 2016; RIKEN Yokohama, Yokohama, Japan

招待講演: Dynamic multidrug recognition and transcriptional regulation by a multidrug resistant transcriptional repressor, LmrR.; 7th Asia Pacific NMR Symposium.– February 2017 IISc Bangalore, Bangalore, India

招待講演: Multidrug recognition and transcriptional regulation of a multidrug transcriptional repressor LmrR; The Naito Conference–September 2016. Sapporo, Hokkaido, Japan

受賞: 持田記念医学薬学振興財団 平成 29 年度研究助成金