

【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原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る結晶化ロボットや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

