



Title	Structural and functional analysis of cell division proteins from methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> for drug development
Author(s)	藤田, 純三
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69548
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名(藤田 純三)	
論文題名	Structural and functional analysis of cell division proteins from methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> for drug development (創薬を志向したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来細胞分裂タンパク質の構造-機能相関解析)
論文内容の要旨	

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は多剤耐性を示し、院内感染の原因菌として問題視されてきた。この耐性を克服することのできる薬剤開発の試みが様々な研究グループによりなされる中で、有力なターゲットとして浮上してきたのが細胞分裂である。細菌の細胞分裂においては、FtsZとFtsAという2種類のタンパク質が中心的な役割を果たす。FtsZはGTP加水分解活性を有し、GTP依存的に重合してプロトフィラメントと呼ばれる短いフィラメント状構造、さらにはそれらが多数会合したZリングと呼ばれるリング状の構造を形成する。このZリングはGTPの加水分解と協調して収縮し、細胞を2つに分割する役割を担っている。収縮メカニズムの詳細は不明であるが、GTP加水分解に伴うFtsZモノマーのコンフォメーション変化に由来するプロトフィラメントの湾曲が関与していると考えられている。FtsAはFtsZを細胞膜に繋ぎ止める役割を果たすタンパク質である。FtsZ, FtsAは多くの細菌において生存に必須であることから、これらのタンパク質を標的とした創薬研究が盛んに行われてきた。本研究の目的は、黄色ブドウ球菌由来FtsZ (SaFtsZ), FtsA (SaFtsA) についてX線結晶構造解析を中心とした構造的、機能的解析を行うことで、細胞分裂の中心的なメカニズムを明らかにすること、および新たな薬剤開発のための構造的な基盤を確立することである。

第1章ではSaFtsZの新たなコンフォメーションの立体構造を決定し、従来の構造との比較によりモノマー単位における構造変化の一連のメカニズムについて提案した。新たなコンフォメーションにおいてはGTP加水分解活性残基を有するループの構造が大きく変化しており、隣接分子との相互作用面積を大幅に減少させていることが明らかになった。また共同研究者によるMD計算に基づき、2種類のコンフォメーション間における構造変化の中間状態の構造を予測するとともに、残基レベルにおける構造変化機構を提案した。さらに変異体の結晶構造決定およびGTP加水分解活性測定によりこの構造変化機構において中心的な役割を果たす残基の重要性を確認した。今後はこのモノマー単位での構造変化とフィラメントの形状変化との関連について調べていく必要がある。

第2章ではFtsZ-阻害剤複合体のX線結晶構造解析を行い、共同研究者らによって開発された新たなクラスの阻害剤は従来のものとは異なるBent型のコンフォメーションでFtsZに結合することを明らかにした。最高で1.3 Åという高分解能での構造決定によって結合距離の正確な議論が可能となり、阻害実験の結果と合わせてBent型を安定化している相互作用を同定することができた。また、今回新たに同定された分子内部の疎水ポケットは、FtsZ阻害剤の構造最適化を行っていく上で非常に重要なものである。さらに、MRSAに頻繁にみられる薬剤耐性変異体とそれに結合可能な阻害剤との複合体についても構造決定を行い、阻害剤の立体構造の柔軟性が立体障害を乗り越える鍵であることを見出した。

第3章ではFtsZフィラメントの高速AFMによる観察を行い、SaFtsZフィラメントの生成および解離過程を可視化することに成功した。どちらの過程においてもフィラメント同士の相互作用が重要な役割を果たしていることが分かった。また阻害剤の存在下では曲線型のフィラメントからなるコイル状構造が多数生成していく様子がみられた。阻害剤の存在下ではFtsZがT stateに固定され、隣接分子との相互作用が固定されることが原因であると考えられる。今後は、より有効な阻害剤の設計のためにFtsZの離合集散の分子機構をさらに詳細な形で明らかにしていく必要があると思われる。

第4章ではSaFtsAの結晶構造解析を行い、その構造を分解能2.2 Åで決定した。既知の超好熱菌由来FtsAの構造と比較して、SaFtsAは結晶中でねじれたフィラメント状のパッキングをとっており、また隣接分子との相互作用部位の構造的柔軟性が高いことが分かった。さらにSaFtsZとSaFtsAの相互作用アッセイを行い、SaFtsZのC末端に存在するアルギニンクラスターが相互作用に重要な役割を果たしていることを見出した。

以上、本著者はSaFtsZ, SaFtsAの立体構造を決定し、細胞分裂における機能発現のメカニズムの一端を明らかにした。また本研究により得られたSaFtsZと種々の阻害剤複合体の構造情報は、MRSAに対する阻害剤開発において多くの重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(藤田純三)	
論文審査担当者	(職) 氏名
	主査 教授 井上 豪
	副査 教授 桑畠 進
	副査 教授 櫻井 英博
	副査 教授 林 高史
	副査 教授 南方 聖司
	副査 教授 今中 信人
	副査 教授 宇山 浩
	副査 教授 町田 憲一
	副査 教授 能木 雅也
	副査 教授 古澤 孝弘

論文審査の結果の要旨

本論文は主に X 線結晶構造解析を用いて、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の細胞分裂に関連するタンパク質 FtsZ, FtsA の構造と機能の相関について調べることでそのメカニズムについて明らかにすることを研究目的としたものである。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌が主に院内感染の原因菌として問題視されている現状を鑑みるに、これに対する新たな抗菌剤開発のための有用な構造的知見を得ることも目的としており、本研究の重要性も大きい。

本論文は 4 章から構成されている。第 1 章では FtsZ の X 線結晶構造解析からその機能発現の分子機構について明らかにするとともに、共同研究者による分子動力学計算の結果を踏まえて中間状態の構造を提案している。変異体実験の結果も提唱された分子機構を支持している。結晶構造解析と分子動力学計算を相補的に組み合わせて議論を一段深めることに成功している。

第 2 章では共同研究者らにより開発された新たな FtsZ 阻害剤に焦点を当て、複数の阻害剤と FtsZ との複合体の X 線結晶構造解析を行っている。各阻害剤が持つ細菌の生育阻害能力と FtsZ への結合様式、薬剤耐性変異との関連について構造的な観点から説明している。従来の阻害剤複合体構造には見られなかった疎水ポケットも今後構造最適化の上で重要なになると考えられる。

第 3 章では高速原子間力顕微鏡を用いてフィラメント状の FtsZ を可視化している。FtsZ はフィラメント状態で機能を果たす動的なタンパク質であると考えられているため、その機能について詳細に調べる上でイメージング手法は欠かせない。特に高速 AFM は高い走査速度を有し、短時間に大量の画像取得が可能となるため、本研究の目的と非常に合致している。本論文では FtsZ の機能を調節している GTP, GDP の濃度を変化させることでフィラメントの重合および解離過程の可視化に成功している。特に解離過程はこれまでに捉えることが難しいとされていたが、実験条件の改良によりこれを達成することができた。また阻害剤存在下におけるフィラメントの形状変化についても議論されており、学術、応用どちらの観点からも大変興味深い結果である。

第 4 章では FtsA の X 線結晶構造解析を行っている。既知構造との比較によりメチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来のものに特徴的な構造について論じている。さらに FtsZ との相互作用解析により、新たな FtsZ-FtsA 間の相互作用に必須となる領域を同定することに成功している。FtsA との相互作用は細胞分裂に必須の要素であると考えられているため、この結果は新たな創薬ターゲットについての知見を与える重要なものであると言える。

以上のように、本論文はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来の細胞分裂タンパク質 FtsZ, FtsA について、X 線結晶構造解析および高速分子間力顕微鏡を中心とした解析に基づき、その構造と機能の関連について新たな知見を与えるものであると判断した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。