

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	ディフィシル菌の DNA 複製系を標的とした 感染症治療に資する構造生物学的研究				
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 DNA クランプと 誤りがちな DNA ポリメラーゼとの相互作用解析
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【背景】 <i>Clostridioides difficile</i> 感染症 (CDI) はグラム陽性細菌 <i>Clostridioides difficile</i> (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の治療薬開発が求められる。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。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。細菌の DNA 合成酵素は足場タンパク質であるスライディングクランプ (DnaN) と結合し、DNA 合成を行う。したがって、DNA 合成酵素と DnaN との相互作用メカニズムを解明することで、新たな CDI 治療薬開発に資する知見が得られると期待できる。【目的】 本研究では、ディフィシル由来の DnaN、薬剤耐性の原因となる誤りがちな DNA 合成酵素 (Pol-IV) に着目し、DnaN の X 線結晶構造解析に基づき、DnaN と Pol-IV との相互作用解析を行った。【結果】 代表者らは X 線結晶構造解析によりディフィシル DnaN の立体構造を 2.13 Å 分解能で決定した。これまでに構造が解明されているグラム陽性及び陰性細菌由来 DnaN との構造を比較したところ、DNA 合成酵素の結合部位と予測されるポケットの形状に違いが見られた。報告されている大腸菌 DnaN と DNA 合成酵素ペプチドとの複合体構造に基づき、ディフィシル DnaN と DNA 合成酵素との結合モデルを作製したところ、ディフィシル DnaN は大腸菌由来 DnaN とは異なる相互作用様式で DNA 合成酵素と結合する可能性が考えられた。また、ディフィシル Pol-IV の組換えタンパク質を調製し、プルダウンアッセイにより DnaN との相互作用を調べたところ、Pol-IV の C 末端領域 (345-365) で DnaN と相互作用することが示された (Hishiki <i>et al.</i>, <i>J. Biochem.</i>, 2023)。一般に、QxxLF が DnaN 結合モチーフとして知られているが、ディフィシル Pol-IV は保存された結合モチーフを持たない。そこで、Pol-IV の C 末端領域の Leu356 及び Phe357 に着目し、部位特異的変異を導入した Pol-IV の C 末端領域を用いて相互作用を調べた。その結果、L356A 変異体では相互作用が大きく減弱したが、F357A では野生型と同等な結合能を保持していた。したがって、Pol-IV の Leu356 が DnaN との相互作用に重要であり、既知の結合モチーフとは異なる機序で結合すると考えられる。</p>