

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	地域の保健衛生に貢献できる CDI 治療への構造生物学的アプローチ				
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・助教	氏名	菱木 麻美
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目	<i>Clostridioides difficile</i> 由来のスライディングクランプの立体構造解析
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【背景】<i>Clostridioides difficile</i> (ディフィシル) 感染症 (CDI) は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、重篤になれば中毒性巨大結腸、腸閉塞、消化管穿孔により死に至る場合もある。欧米では CDI に対する関心は高く、政府主導で調査および感染対策が行われているが、日本では欧米と比較して CDI への関心が低いと言われている。CDI 治療薬としてはバンコマイシンやメトロニダゾールが用いられてきたが、感受性の低下や再発が問題となっており、再発に有効な治療及び再発を起こしにくい治療が求められている。近年、ディフィシルの RNA 合成を阻害するフェダキソマイシンも標準治療薬として推奨されているが、RNA 合成酵素の変異による薬剤耐性が報告されている。また、重大な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に基づく CDI 治療戦略の開発が必要である。CDI は医療機関や高齢者施設などにおけるアウトブレイクが危惧されており、地域の保健衛生において喫緊の課題である。</p> <p>【研究の目的】本研究はディフィシル由来のスライディングクランプ (CdDnaN) を対象とした構造生物学的研究である。スライディングクランプは全ての生物で保存された DNA 複製・修復に関わるタンパク質である。スライディングクランプは二本鎖 DNA に結合し、複製酵素や修復酵素の足場として働き、それら酵素の活性を促進する。スライディングクランプは細菌の増殖や生存に深く関わっており、そのため抗菌薬開発の標的として期待されている。本研究では、CdDnaN の立体構造及び複製酵素・修復酵素との相互作用メカニズムを X 線結晶構造解析によって明らかにすることで、新たな CDI 治療戦略の開発に資する構造科学的知見を得ることを目的とする。</p> <p>【成果】(1) 組換えタンパク質の調製法の確立：CdDnaN の遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌発現系を用いた大量発現系を構築した。IPTG 誘導により大腸菌内に CdDnaN を発現させ、陰イオン交換カラム、疎水カラム、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて、高純度な CdDnaN を調製した。(2) X 線結晶構造解析：高純度に精製した CdDnaN を用いて結晶化スクリーニングを実施し、結晶化条件の最適化を行ったところ、X 線結晶構造解析可能な結晶を得ることに成功した。つくば放射光施設フォトンファクトリーにおいて X 線回折強度データを収集し、2.13 Å 分解能で CdDnaN の立体構造を決定した。大腸菌由来の DnaN と構造比較を行った結果、タンパク質間相互作用に関わるポケットの構造に違いが見られた。</p> <p>【今後の展望】複製酵素・修復酵素との複合体構造の構造解析によって相互作用メカニズムを解明し、CDI 治療戦略の開発に資する構造基盤を得る。</p>