

# 新規抗菌剤の開発を目指した細胞分裂タンパク質 FtsZ の構造研究

藤田純三

Structural Studies Division, MRC Laboratory of Molecular Biology  
Francis Crick Avenue, Cambridge CB2 0QH, UK

井上 豪

大阪大学大学院工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

松村浩由

立命館大学生命科学部 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

## 要旨

FtsZ は細菌の細胞分裂において中心的な役割を果たすタンパク質であるため創薬ターゲットとして注目されている。FtsZ モノマーは重合・解離の調節のために 2 種類のコンフォメーションをとると考えられているが、不活性な変異体を除けば同一種において両方の構造を捉えた例は存在しなかった。本研究では、抗菌剤の開発を見据えた上で黄色ブドウ球菌由来 FtsZ の両方の構造の X 線結晶構造解析を行い、その構造変化機構について提唱した。また、新たに開発された阻害剤との複合体についても構造決定を行い、分子内部の新規な疎水ポケットを同定した。さらに薬剤耐性変異体との複合体の構造に基づき、阻害剤の構造活性相関についても明らかにすることができた。

## 1. はじめに

近年、世界保健機関 (WHO) やアメリカ疾病予防管理センター (CDC) 等が相次いでメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) を含む薬剤耐性菌の増加による世界的な公衆衛生の危機について警告している<sup>1,2)</sup>。新たな抗菌薬の開発が急務となっている中で、新たな創薬ターゲットとして細胞分裂が注目されてきた<sup>3)</sup>。細菌の細胞分裂には 30 種類以上のタンパク質が関与していると言われていた<sup>4)</sup>、その中でも最も重要でありよく研究されてきたタンパク質が FtsZ (Filamenting temperature-sensitive mutant Z) である。FtsZ は GTP 依存的に重合し、フィラメント状構造、さらにはそれらが寄り集まった Z リングと呼ばれるリング状の構造を形成する<sup>5-7)</sup>。FtsZ は GTP 加水分解 (GTPase) 活性を有するが、2 分子間で 1 つの活性部位を形成するため、その活性は重合と関連する<sup>8-10)</sup>。Z リングはその後収縮し細胞を 2 つに分割する<sup>11)</sup>、収縮力の発生機構についてはいまだに議論の余地がある。長らく提唱されてきたのは GTP 加水分解により FtsZ フィラメントが湾曲するモデルである。これは GDP 存在下では曲線型の、GTP 存在下では直線型の FtsZ フィラメントが電子顕微鏡により観察されたという結果に基づいている<sup>12)</sup>。また MD 計算により、結合しているヌクレオチドの違いにより構造変化が起こることでフィラメントの柔軟性が変化するという結果も得られている<sup>13-15)</sup>。ところが最近、Z リ

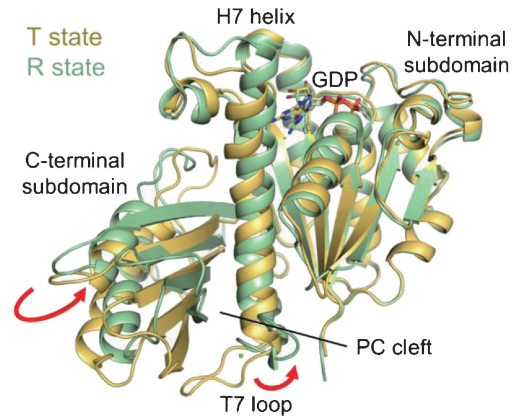
ングは主に複合体形成のための足場として機能し、収縮力はむしろ細胞壁合成系のタンパク質により生み出されるという説も提唱されている<sup>16)</sup>。しかしこの機構においても、FtsZ の重合・解離による正味のフィラメント移動 (トレッドミリング) が GTPase 活性と関連しており、細胞壁合成において重要であることが分かっている<sup>17,18)</sup>。

様々な種に由来する FtsZ の結晶構造が決定されてきたにも関わらず、GTP 加水分解と重合・解離の構造的関連およびその分子機構は完全には解明されていない。その理由として、GTP (またはそのアナログ) と GDP のどちらが結合しているかに関わらず、FtsZ のモノマー構造にはほとんど変化がなかったことが挙げられる<sup>19-21)</sup>。またこれらの結晶中においてはフィラメント様の構造はみられなかった。一方、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 由来 FtsZ (SaFtsZ) は他の種とは異なり結晶中で直線型フィラメント構造をとっており、GTP 加水分解反応における触媒残基近傍のループ (T7 loop) が隣接分子の GDP 結合ポケットに深く入り込んでおり、加水分解に適した構造となっていた<sup>22)</sup>。これらの結果から、SaFtsZ の結晶構造は GTP 存在下において観察された直線型フィラメントに相当する T (Tense) state に、その他の種由来の FtsZ の結晶構造は GDP 存在下において観察された曲線型フィラメントに相当する R (Relaxed) state に対応すると考えられている。しかし、GTP アナログおよび GDP 結合型の SaFtsZ はいずれも T state をとっていた<sup>22,23)</sup>。T7 loop を改変した GDP 結合型 SaFtsZ 変異体の中には R state の

ような結晶構造をとっているものもあるが、これらの変異体は GTPase 活性を失っているため<sup>23)</sup>生体内構造としての妥当性については疑問が残る。このように同一種由来の活性型 FtsZ において T, R state 両方の結晶構造が決定された例はなく、FtsZ のモノマー構造は種ごとに固有であるという可能性を完全に排除することはできていない。しかしながら、GTP 加水分解によりモノマー間でヒンジのような動きが誘起され、フィラメントの湾曲が起こるといったモデルが提唱されていることや<sup>23,24)</sup>、T-R state 間の構造変化が MD 計算により再現可能であることを鑑みると<sup>25)</sup>、FtsZ モノマーにおける T-R state 間の構造変化機構についての興味は尽きないところである。そこで著者らは、X 線結晶構造解析によって活性型 SaFtsZ の R state の構造を決定することで、単一種の FtsZ が両方のコンフォメーションをとりうることを示すと同時に、MD 計算と組み合わせることで T-R state 間の構造変化の機構を原子レベルで明らかにしようと試みた。また SaFtsZ の構造機能相関についての知見は、MRSA に対する抗菌剤を開発していく上で非常に重要な情報になると考えられる。

## 2. FtsZ の構造変化機構

FtsZ は GTPase 加水分解活性を有する球状ドメインと、天然変性領域である C 末端ループから構成されている。球状ドメインはさらに N 末端、C 末端サブドメインとそれらを繋ぐ H7 helix, T7 loop を含む領域に分けられる。今回は先行研究<sup>22)</sup>に倣い、柔軟性の高い部分として知られている N 末端 (1-11) および C 末端ループ (317-390) を削除した SaFtsZ のコンストラクト (12-316) を構築し、大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて大量発現させ、精製、結晶化スクリーニングを行った。その結果、これまでに FtsZ では報告のなかった沈殿剤 pentaerythritol propoxylate 629 (PEP629) を含む結晶化条件において良質な結晶を得ることができた。この結晶から X 線結晶構造解析を行う、すなわち電子密度マップを作成するためには回折強度データと位相情報の両方が必要となる。前者は大型放射光施設 SPring-8 BL44XU におけるデータ収集により実験的に得られたが、後者は別の何らかの手法により得る必要がある。今回は既に SaFtsZ の結晶構造が決定されているため、分子置換法により位相を容易に決定することが可能であった。HKL2000<sup>26)</sup>により処理した回折強度データを用いて Phaser<sup>27)</sup>による分子置換を行った後、Refmac5<sup>28)</sup>による構造精密化と Coot<sup>29)</sup>による手動でのモデル修正を繰り返すことにより SaFtsZ の結晶構造を最高分解能 2.2 Å で決定した。構造精密化は非対称単位と呼ばれる結晶の最小単位内に含まれる原子・分子に対してのみ行えば良く、単位胞あるいは結晶全体の構造は非対称単位に回転や並進等の対象操作を適用すると生成可能である。非対称単位中には 2 分子の SaFtsZ (Chain A, B) が含ま

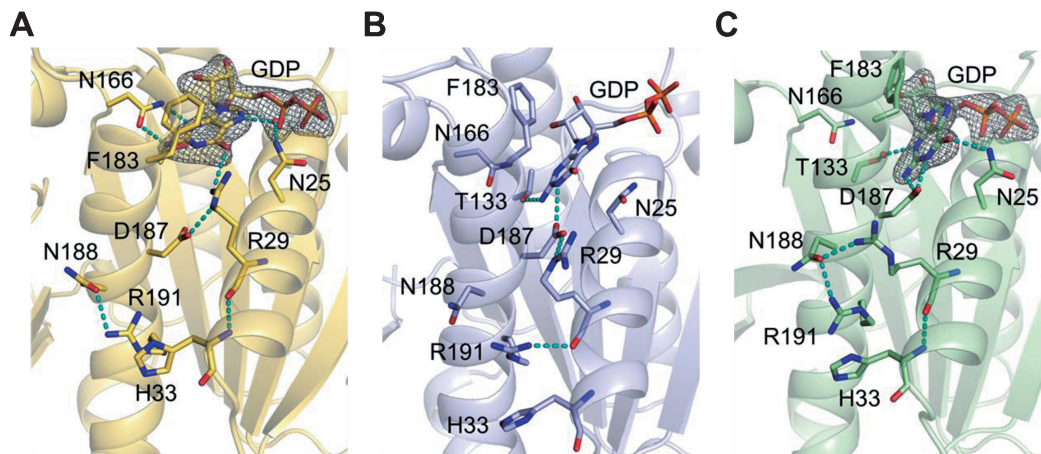


**Fig. 1** (Color online) Structure comparison of SaFtsZ between the T (yellow) and R (green) states. The GDP, the central H7 helix, the inhibitor-binding PC cleft, and the T7 loop are indicated. The rotation of the C-terminal subdomain and the movement of the T7 loop are represented by a red curved arrow.

れていたが、Chain A は既知の SaFtsZ の構造 (e.g. PDB entry: 3VOA)<sup>22)</sup>に、もう一方は他の種由来の FtsZ の構造 (e.g. BsFtsZ, PDB entry: 2RHL)<sup>30)</sup>によく似ていることが分かった。この結果から、Chain A, B はそれぞれ T, R state の構造に相当すると結論付けられるとともに、同一種の野生型 FtsZ は T, R state 両方をとりうることが初めて示された。

決定した T, R state の結晶構造の重ね合わせを **Fig. 1** に示す。N 末端サブドメインは比較的良好に重なっているが、C 末端サブドメインは矢印の方向に回転するような動きをしていることが分かった。この回転は N 末端と C 末端のサブドメイン間に存在する水素結合等の相互作用が失われたことに由来すると考えられる。さらに、この回転により T state において存在していた阻害剤結合部位 (PC cleft) が R state では閉じていた。また、T7 loop 付近にも構造変化がみられた。T state の T7 loop においては既知構造と同様に Ca<sup>2+</sup> イオンがループに結合し、構造を保持していた。これに対し、R state では Ca<sup>2+</sup> イオンの結合はみられず、ループが矢印の方向にフリップしていた。ループの構造は内部に存在する多数の水素結合により安定化されており、短い  $\beta$  ヘアピンのような形状をとっていた。

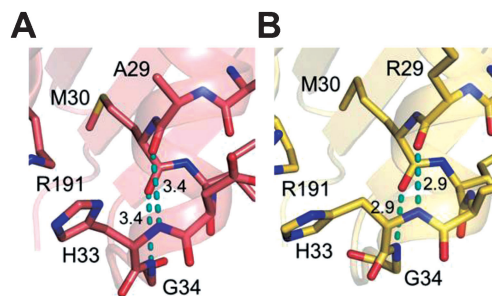
その他に顕著な構造変化が観察された部位として GDP 周辺が挙げられる。T state の GDP 周辺の拡大図を **Fig. 2A** に、R state のそれを **Fig. 2C** に示す。まず、T state と比較して R state では GDP のグアニン環がおおよそ 30° 傾いていた。また、T state では Arg29 が GDP と直接水素結合しているのに対して、R state では Arg29 は分子の外側にフリップし、その代わりに Asp187 が直接 GDP と水素結合していた。さらに、T state では Asn166 が GDP と直接水素結合を形成しているのに対し、R state では Thr133 による水を介した水素結合に変化していた。最後



**Fig. 2** (Color online) Interactions around the GDP and the T7 helix in the T state crystal structure (A), the transient structure generated by PaCS-MD (B), and the R state crystal structure (C). Hydrogen bonds are indicated by cyan dotted lines. Water molecules are shown by red spheres, and  $mF_o-DF_c$  omit maps around the GDP are contoured at  $3.5 \sigma$  as gray meshes in (A) and (C).

に、R state では Phe183 や Asp187 が存在する H7 helix がおよそ 1 ピッチ分上側に移動していた。

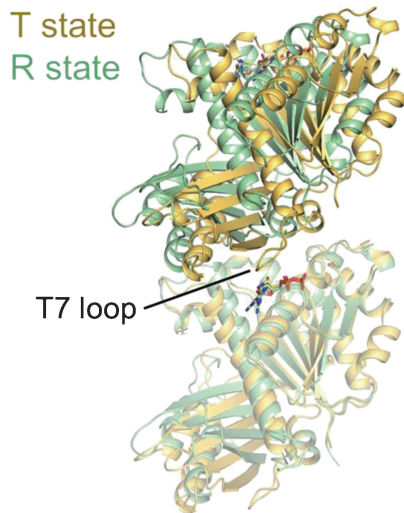
ここで、この構造変化の分子機構について詳しく調べるため MD 計算を行った。実際の計算は筑波大学の原田隆平博士および重田育照教授に全て行って頂いた。今回用いたのは Parallel Cascade Selection MD (PaCS-MD)<sup>31</sup> と呼ばれる手法で、2 種の状態間における構造変化経路を効率的に探索することができる。今回は出発物として T state の結晶構造を、生成物として R state の結晶構造を用いて計算を実行したところ、合計 300 ns の計算により R state に近い構造へと変化させることができた。GDP のグアニン環の傾きや C 末端サブドメインの回転、H7 helix の上下移動に関しては再現できたが、T7 loop のフリップだけは再現することができなかった。また、得られた一連の構造の自由エネルギーを計算したところ、安定な T および R state の間に高エネルギーの中間状態のような構造が存在することが示唆された。この中間状態においては、C 末端サブドメインや H7 helix が T, R state の間の位置に存在していた。中間状態の GDP 周辺の構造に着目してみると (Fig. 2B)、ちょうど GDP と Arg29 の間の水素結合に Asp187 が割り込むような構造をしていることが分かった。また、もう一つ中間状態に特徴的な相互作用としては Arg191 の側鎖と Arg29 の主鎖カルボニルとの間の水素結合が挙げられる。これは T, R いずれの結晶構造においても観察されないため一時的な結合であり、Arg29 を GDP から解離させて R state への構造変化を誘起する役割を果たしていると考えられる。さらに、MD の計算時間に対する残基間距離の変化を調べたところ、まず T state において存在していた Asn166-GDP 間の水素結合が解離し、続いて Arg29 (CO)-Arg191 間の水素結合が形成されるとともに Asp187 に割り込まれるような形で Arg29-GDP 間の



**Fig. 3** (Color online) Close-up views around the Arg29 in the T state crystal structures of R29A mutant (A) and WT (B). Hydrogen bonds are shown by cyan dotted lines. The distances are labeled in Å.

水素結合が解離していた。最後に一時的な Arg29 (CO)-Arg191 間の水素結合は解離し、Arg29 が外側にフリップしていた。以上のようなメカニズムで GDP 周辺の水素結合が組み変わり、T state から R state への構造変化が誘起される可能性が示唆された。

そこで著者らはこのメカニズムにおいて重要な役割を果たすと考えられる Arg29 を Ala に置換した変異体 R29A の X 線結晶構造解析を行い、T, R state 両方の構造をそれぞれ最高分解能 1.7, 1.9 Å で決定した。どちらも先程決定した SaFtsZ 12-316 (以後、野生型と呼ぶ) の全体構造とよく重なったが、T state においては Arg29 (CO)-His33 (NH), Met30 (CO)-Gly34 (NH) 間におけるヘリックス内水素結合距離 (3.4 Å, Fig. 3A) が野生型のそれ (2.9 Å, Fig. 3B) と比較して長くなっており、このヘリックスの C 末端付近の構造が不安定化していることが分かった。また、R state においては C 末端サブドメインが野生型の位置まで回転しきっておらず、T, R state どちらも中途半端な構造となっていた。さらに酵素カップリング



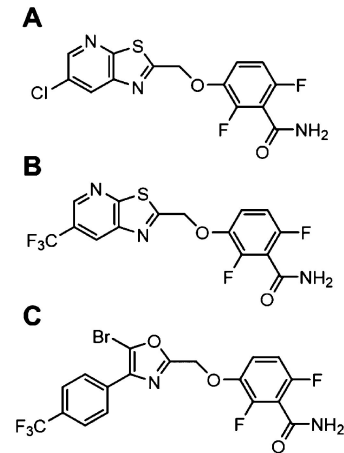
**Fig. 4** (Color online) Superposition of the SaFtsZ dimer composed of the T state (yellow) and the R state (green) based on the lower molecules (shown in semi-transparent). The T7 loop of the upper molecule is deeply inserted into the GDP-bound pocket in the lower molecule only in the T state.

法<sup>32)</sup>により SaFtsZ の GTPase 活性測定を行ったところ、R29A 変異体の活性 ( $(8.5 \pm 0.9) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) は野生型のそれ ( $1.0 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ ) と比較して 1/100 程度であった。この GTPase 活性の低下は正常な T-R 構造変化が阻害されているためであると考えられ、結晶構造および MD 計算により示された Arg29 の重要性を支持する結果となった。

ここまでは FtsZ モノマーの構造変化について述べたが、この変化はフィラメント内における分子間相互作用にも影響を与えている。今回の結晶中では、T state のみからなるフィラメントと R state のみからなるフィラメントが直交し、それぞれの層が交互に重なるようなパッキングをとっていた。T state および R state からなるフィラメント中のダイマー構造をそれぞれ抜き出し、下側の分子を基準とした重ね合わせを **Fig. 4** に示す。T state においては上側の分子の T7 loop が下側の分子の GDP 結合ポケットに入り込んでおり、既知構造と同じく GTP 加水分解に適した構造になっていたが、R state では T7 loop がフリップしたことによりこの相互作用が消失していた。これに伴い、分子間の相互作用面積も  $1168 \text{ \AA}^2$  から  $798 \text{ \AA}^2$  へと減少した。また、T state と R state では上側の分子の相対位置がおよそ  $8 \text{ \AA}$  ずれていることも分かった。これらの結果より、FtsZ は T, R state の構造変化によりモノマー間の相対的な結合様式を変化させ、重合、解離を調節していることが改めて示唆された。

### 3. FtsZ-阻害剤複合体の X 線結晶構造解析

上記の結果から、T, R state 間の構造変化を阻害する化



**Fig. 5** Chemical structures of PC190723 (A), TXA707 (B), and TXA6101 (C).

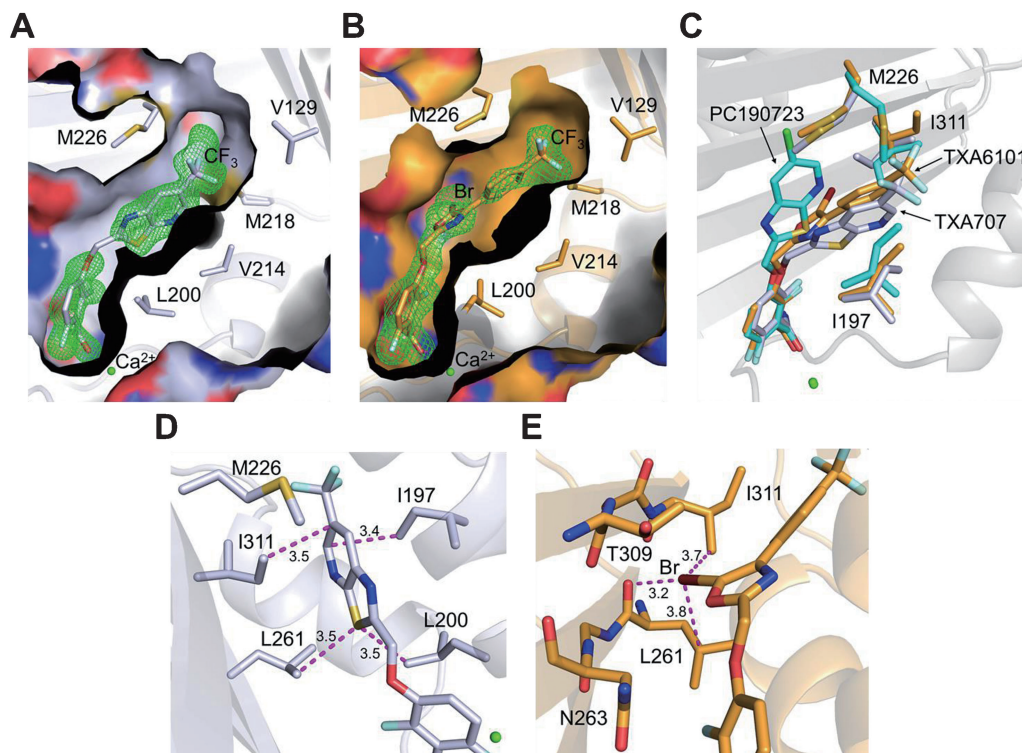
合物は FtsZ のアロステリック阻害剤として有効であると考えられる。このような阻害剤としては PC190723 (**Fig. 5A**) がよく知られており、既に SaFtsZ との複合体の結晶構造も決定されている<sup>22,33)</sup>。この阻害剤は FtsZ のサブドメイン間の PC cleft に結合しており、全体構造を T state に固定すると考えられている。PC190723 は既に市販されているが、薬物動態的な性質があまり好ましくないために臨床的な応用には至っていない。共同研究者である Rutgers Robert Wood Johnson Medical School の Daniel S. Pilch 教授らは PC190723 の構造改変に取り組んでおり、より優れた性質を有するプロドラッグ TXA709 およびその活性代謝物 TXA707 を開発してきた<sup>34,35)</sup>。TXA707 (**Fig. 5B**) は PC190723 の Cl 基を  $\text{CF}_3$  基に置換した化合物であり、これにより生体内での代謝攻撃に対する安定性が向上している。また Pilch 教授らは TXA707 に対して耐性を有する MRSA 株の取得実験も行っており、耐性株の 55% は *ftsZ* 遺伝子に G196S の薬剤耐性変異が生じていることが分かっている<sup>35)</sup>。Gly196 は結晶構造中で PC cleft の近傍に存在する残基の 1 つである。さらにこの耐性株に対しても有効な阻害剤として今回見出されたのが TXA6101 (**Fig. 5C**) である。この化合物は元々別のグループによる大規模な構造活性相関の研究の中で報告されたものであり<sup>36,37)</sup>、TXA707 とは異なる骨格を有するとともにオキサゾール環上に Br 基が付加されている。これらの阻害剤の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) を調べたところ、野生型 FtsZ が発現している MRSA に対しては TXA6101 ( $0.125 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) が TXA707 ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) と比較して 8 倍の阻害能を示した。また、TXA6101 のオキサゾール環上の Br 基を除去した化合物は TXA6101 と比較して 1/32 の阻害能しか示さず ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ )、Br 基の存在は阻害活性にとって非常に重要であることも分かった。また、FtsZ G196S 変異体を発現させた MRSA に対しては、TXA707 は活性を失うのに対

し ( $>64 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), TXA6101は阻害能を保持したままであった ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ )。これらの新たな阻害剤と SaFtsZ の結合様式を解明するため、また阻害剤の化学構造の違いによりなぜこのような薬剤耐性変異体に対する活性の違いが現れるのかを立体構造に基づいて説明するため、野生型 SaFtsZ およびその変異体と阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

まずは第 2 章と同様に野生型 SaFtsZ を調製し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。共結晶化法では結晶が得られなかったため、ソーキング法による複合体結晶の作製を試みた。阻害剤は水系には溶解しにくいいため、100% DMSO に溶解させた高濃度のストック溶液をリザーバー溶液に少量添加した。分子置換法による位相決定後の構造精密化段階においては、いずれの阻害剤存在下においても既知構造と同じくサブドメイン間の PC cleft に新たな電子密度が観察されたが、占有率の低さによる電子密度の不明瞭さが問題であった。解決策としてソーキング溶液中の阻害剤濃度を高くすることが考えられたが、同時にソーキングの際の結晶へのダメージも大きくなりデータへの影響が懸念された。そこで高濃度阻害剤のソーキングにも耐える強固な結晶を作製することを考え

た。結晶化条件付近で沈殿剤濃度および pH を変化させてスクリーニングを行ったところ、低 pH の条件では高 pH の条件と比較して結晶化には時間がかかるが、比較的大きな結晶が得られる傾向にあることが分かった。この低 pH の条件においては 1-2 週間ほどで結晶が得られるが、そこからさらに数か月放置することで結晶内部の溶媒含量を下げた。得られた結晶はソーキング後もひび割れ等の変化は見られず、良質な回折強度データを収集することができた。

今回は野生型 SaFtsZ と TXA707, TXA6101 との複合体の構造をそれぞれ最高分解能 1.3, 2.0 Å で構造決定することができ、それらはいずれも T state をとっていた。結合部位である PC cleft 付近の構造をそれぞれ Fig. 6A, B に示す。どちらの阻害剤も折れ曲がったコンフォメーションをとっており、先端部の CF<sub>3</sub> 基は Val129, Leu200, Val214, Met218 等により形成される分子内部の疎水ポケットに入り込んでいた。これは以前に決定された PC190723 の直線型コンフォメーションとは大きく異なる (Fig. 6C)。ベンズアミド部分の構造は非常によく重なっているが、エーテル結合より先の部分の折れ曲がり方に大きな変化がみられた。この変化に伴って、Ile197, Met226, Ile311 の 3 種類



**Fig. 6** (Color online) Different conformations of FtsZ inhibitors. (A, B) Molecular surface of the binding pocket in TXA707 (A) and TXA6101 (B).  $mF_o - DF_c$  omit maps around the inhibitors are contoured at  $3.0 \sigma$  as green meshes. (C) Structure comparison of the inhibitors. PC190723, TXA707, and TXA6101 are shown in cyan, gray, and orange, respectively. Side chains of Ile197, Met226, and Ile311 in each structure are also shown in the same colors. (D) Interactions around the thiazolopyridine ring of TXA707. (E) Interactions around the bromo group of TXA6101. Van der Waals contacts are shown by magenta dotted lines, and the distances are labeled in A in (D) and (E).

の側鎖も大きく構造変化している様子が観察された。特に Met226は、PC190723結合時と TXA707および TXA6101 結合時には阻害剤との位置関係が逆転していた。PC190723結合時にはこの残基が阻害剤の疎水ポケットへの侵入を妨げていたが、今回の構造ではいずれも Met226 が左側に移動し、疎水ポケットへの道を開くように動いていた。Ile197, Ile311の側鎖は TXA707のチアゾロピリジン環、TXA6101のベンゼン環を挟み込むような位置に存在し、こちらも阻害剤との立体障害を避けつつ疎水ポケットへのアクセスを可能にするような動きをしていた。

TXA707と TXA6101はどちらも折れ曲がった構造をしていたが、その結合様式には違いもみられた。TXA707中のチアゾロピリジン環は Ile197, Ile311およびその下部に位置する Leu200, Leu261の側鎖により両側から挟み込まれるような形で保持されていた (Fig. 6D)。一方、TXA6101ではオキサゾール環上の Br 基が  $\beta$  シートから突き出した Leu261, Asn263, Thr309, Ile311の側鎖からなるポケットに入り込んでおり、この相互作用によりオキサゾール環の配向が変化していた (Fig. 6E)。TXA707では2種類の環が縮環しているのに対し、TXA6101では相当する2種類の環が単結合により連結されているため構造の自由度が高いこともこのような結合様式の変化の一因であると考えられる。また、MIC 測定において TXA6101の Br 基を除去した化合物が阻害活性を失うという結果と合わせて考えると、この Br 基との相互作用は FtsZ と阻害剤との結合力に大きく寄与していると言えるだろう。

続いては薬剤耐性変異と阻害活性の関連について調べることにした。まず SaFtsZ G196S 単体の結晶構造を最高分解能 2.0 Å で決定した。第2章で決定した野生型の T state の構造と比較したところ、全体として大きな構造変化は観察されず、G196S 変異の導入は全体構造に大きな影響は及ぼさないことが確認できた。続いて、SaFtsZ G196S 変異体と TXA6101の複合体の結晶構造を最高分解能 1.7 Å で決定した。PC cleft において阻害剤の明瞭な電子密度が観察され、TXA6101の結合様式については野生型と比較して変化はみられなかった。この G196S-TXA6101の複合体と、野生型-TXA707の複合体の全体構造の重ね合わせを Fig. 7 に示す。Ser196の側鎖の C $\beta$  炭素に対して TXA6101では最も近い原子でも 3.4 Å の距離にあり、立体障害を起こすことなく結合可能であるのに対し、TXA707においてはチアゾール環内の窒素との距離は 3.0 Å であり、立体障害を起こすことが予想された。この原因としては、前述の通り TXA6101は構造の柔軟性が高く、Br 基によりオキサゾール環の配向が固定されているために Ser196による立体障害を回避するような形で SaFtsZ に結合できるということが考えられる。逆に TXA707については柔軟性の低いチアゾロピリジン環と疎水性残基との相互作用により、Ser196との立体障害を避けられないような形の結合様式に固定されてしまうため、G196S 変

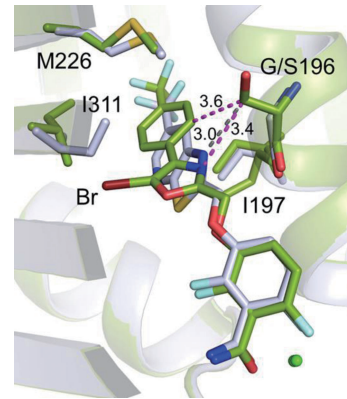


Fig. 7 (Color online) Superposition of G196S-TXA6101 (green) and Wildtype-TXA707 (gray) complex structures. Van der Waals contacts and steric crash are shown by magenta and gray dotted lines, respectively. The distances are labeled in Å.

異体を発現させた MRSA に対する阻害能を失ってしまうのだろう。

#### 4. おわりに

今回は SaFtsZ の T, R state 両方の構造を同一結晶中において決定することにより、MD 計算と組み合わせながらモノマー単位での構造変化のメカニズムについて提唱してきた。しかし、この構造変化が起こるトリガーについて、またこの変化がどのように FtsZ フィラメントの形態変化を引き起こすのかについては十分な情報が得られていない。そのため今後は2分子以上の FtsZ を含むフィラメント系における MD 計算等を行っていく必要があると考えている。さらに、SaFtsZ とその阻害剤との複合体について 2 Å を越えるような高分解能での構造決定に成功したことで、阻害剤構造の柔軟性と薬剤耐性変異の影響との関連性について明らかにすることができた。本研究の結果はこれまでで最大の FtsZ-阻害剤複合体の構造データベースを構築するものであるとともに、新規な分子内部の疎水ポケットの同定等により阻害剤の構造最適化に向けた重要な知見を提供するものでもある。

#### 謝辞

本研究は、元大阪大学工学研究科修士課程学生の前田陽子氏、齋藤有紀氏、大阪大学工学研究科の溝端栄一講師と共同で行ったものである。MD 計算については筑波大学数理解物質化学研究科・計算科学研究センターの原田隆平博士、重田有照教授に行って頂いた。阻害剤の合成および MRSA の生育阻害アッセイについては Rutgers University の Ajit K. Parhi 博士、Edmond J. LaVoie 博士、Rutgers Robert Wood Johnson Medical School の Malvika Kaul 博士、Daniel S. Pilch 教授に行って頂いた。この場

を借りて御礼申し上げる。X線回折データ収集は大型放射光施設 SPring-8 の BL44XU, BL32XU にて行った。これらのビームラインに関わる全てのスタッフの皆様に感謝申し上げます。また本研究は日本学術振興会科研費 15J00589, 24109017, 26102526, 16H00783 の支援を受けて実施した。

#### 参考文献

- 1) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance: World Health Organization, Geneva, Switzerland (2014).
- 2) Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA (2013).
- 3) P. Sass and H. Brötz-Oesterhelt: *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 522 (2013).
- 4) D. P. Haeusser and W. Margolin: *Nature Reviews Microbiology* **14**, 305 (2016).
- 5) D. Bramhill and C. M. Thompson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5813 (1994).
- 6) A. Mukherjee, K. Dai and J. Lutkenhaus: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1053 (1993).
- 7) E. F. Bi and J. Lutkenhaus: *Nature* **354**, 161 (1991).
- 8) D. J. Scheffers, J. G. de Wit, T. den Blaauwen and A. J. M. Driessen: *Biochemistry* **41**, 521 (2002).
- 9) C. Lu, J. Stricker and H. P. Erickson: *BMC Microbiol.* **1**, 7 (2001).
- 10) J. Löwe and L. A. Amos: *Nature* **391**, 203 (1998).
- 11) Q. Sun and W. Margolin: *J. Bacteriol.* **180**, 2050 (1998).
- 12) C. Lu, M. Reedy and H. P. Erickson: *J. Bacteriol.* **182**, 164 (2000).
- 13) K. Natarajan and S. Senapati: *Biochemistry* **52**, 3543 (2013).
- 14) F. Martin-Garcia, E. Salvarelli, J. I. Mendieta-Moreno, M. Vicente, J. Mingorance, J. Mendieta and P. Gomez-Puertas: *FEBS Lett.* **586**, 1236 (2012).
- 15) J. Hsin, A. Gopinathan and K. C. Huang: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9432 (2012).
- 16) J. Xiao and E. D. Goley: *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 90 (2016).
- 17) X. Yang, Z. Lyu, A. Miguel, R. McQuillen, K. C. Huang and J. Xiao: *Science* **355**, 744 (2017).
- 18) A. W. Bisson-Filho, Y. P. Hsu, G. R. Squyres, E. Kuru, F. Wu, C. Jukes, Y. Sun *et al.*: *Science* **355**, 739 (2017).
- 19) M. A. Oliva, D. Trambaiolo and J. Löwe: *J. Mol. Biol.* **373**, 1229 (2007).
- 20) M. A. Oliva, S. C. Cordell and J. Löwe: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1243 (2004).
- 21) A. K. Leung, E. Lucile White, L. J. Ross, R. C. Reynolds, J. A. DeVito and D. W. Borhani: *J. Mol. Biol.* **342**, 953 (2004).
- 22) T. Matsui, J. Yamane, N. Mogi, H. Yamaguchi, H. Takemoto, M. Yao and I. Tanaka: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 1175 (2012).
- 23) T. Matsui, X. Han, J. Yu, M. Yao and I. Tanaka: *J. Biol. Chem.* **289**, 3501 (2014).
- 24) Y. Li, J. Hsin, L. Zhao, Y. Cheng, W. Shang, K. C. Huang, H. W. Wang *et al.*: *Science* **341**, 392 (2013).
- 25) E. Ramirez-Aportela, J. R. Lopez-Blanco, J. M. Andreu and P. Chacon: *Biophys. J.* **107**, 2164 (2014).
- 26) Z. Otwinowski and W. Minor: *Macromolecular Crystallography, Pt A* **276**, 307 (1997).
- 27) A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read: *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658 (2007).
- 28) G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn *et al.*: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355 (2011).
- 29) P. Emsley and K. Cowtan: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126 (2004).
- 30) A. Raymond, S. Lovell, D. Lorimer, J. Walchli, M. Mixon, E. Wallace, K. Thompkins *et al.*: *BMC Biotechnol.* **9**, 37 (2009).
- 31) R. Harada and A. Kitao: *J. Chem. Phys.* **139**, 035103 (2013).
- 32) E. Ingberman and J. Nunnari: *Methods Enzymol.* **404**, 611 (2005).
- 33) C. M. Tan, A. G. Therien, J. Lu, S. H. Lee, A. Caron, C. J. Gill, C. Lebeau-Jacob *et al.*: *Sci. Transl. Med.* **4**, 126ra35 (2012).
- 34) M. Kaul, L. Mark, A. K. Parhi, E. J. LaVoie and D. S. Pilch: *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4290 (2016).
- 35) M. Kaul, L. Mark, Y. Zhang, A. K. Parhi, Y. L. Lyu, J. Pawlak, S. Saravolatz *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4845 (2015).
- 36) N. R. Stokes, N. Baker, J. M. Bennett, P. K. Chauhan, I. Collins, D. T. Davies, M. Gavade *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 353 (2014).
- 37) N. R. Stokes, N. Baker, J. M. Bennett, J. Berry, I. Collins, L. G. Czaplewski, A. Logan *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 317 (2013).

## 著者紹介

**藤田純三**

英国 MRC 分子生物学研究所構造生物学部  
門 ポストドクトラルフェロー

E-mail: jfujita@mrc-lmb.cam.ac.uk

専門：構造生物学

**【略歴】**

2018年3月大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻博士後期課程修了。博士（工学）。同年4月より現職。

**松村浩由**

立命館大学生命科学部 教授

E-mail: h-matsu@fc.ritsumei.ac.jp

専門：構造生物学

**【略歴】**

2000年3月大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻博士後期課程修了。博士（工学）。2000年同工学部助手，2008年同工学研究科准教授，2015年より現職。

**井上 豪**

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻教授

E-mail: inouet@chem.eng.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物化学

**【略歴】**

1994年3月大阪大学大学院工学研究科応用精密化学専攻博士後期課程修了。博士（工学）。1994年同工学部助手，1999年同工学部講師，2002年同工学研究科准教授，2008年より現職。2001-2004 科学技術振興機構さきがけ研究員兼務。

## Structural study of cell division protein FtsZ for the development of a novel antibacterial agent

**Junso FUJITA**

Structural Studies Division, MRC Laboratory of Molecular Biology, Francis Crick Avenue, Cambridge CB2 0QH, UK

**Tsuyoshi INOUE**

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

**Hiroyoshi MATSUMURA**

Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-Higashi, Shiga 525-8577, Japan

**Abstract** FtsZ is a central player in bacterial cell division and an attractive target for the development of antibacterial agents. Although FtsZ monomer has been considered to adopt two conformations for regulating polymerization/dissociation, there was no case in which both structures were determined in a single species except for inactive mutants. In this study, both X-ray crystal structures of FtsZ from *Staphylococcus aureus* were determined in terms of the drug development, and its structural change mechanism was proposed based on the structures. We also determined the structures of FtsZ complexed with newly developed inhibitors, and identified the novel inner hydrophobic pocket. We also clarified structure-activity relationship of the inhibitors based on the structure of the complex with the drug resistant mutant.