



京都大学
KYOTO UNIVERSITY



筑波大学
University of Tsukuba

パセリ油の不飽和脂肪酸が黄色ブドウ球菌の病原因子を 阻害するメカニズムを解明

1. 発表者：

北所 健悟(京都工芸繊維大学分子化学系 准教授)
神谷 重樹(大阪公立大学大学院生活科学研究科 生活科学専攻 教授)
奥野 友紀子(京都大学大学院医学研究科 医学研究支援センター 特定准教授)
引間 孝明(理化学研究所放射光科学研究センター利用システム開発研究部門 研究員(研究当時))
山本 雅貴(理化学研究所放射光科学研究センター利用システム開発研究部門 部門長)
広川 貴次(筑波大学医学医療系 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆黄色ブドウ球菌^{*1}の病原因子「リパーゼ (SAL)」とパセリ油の主成分であるペトロセリン酸(PSA)の複合体の立体構造を世界で初めて解明した。
- ◆不飽和脂肪酸^{*2}PSA の SAL への IC₅₀^{*3} 値が 3.4 μM と非常に強いことを明らかとするとともに、不飽和脂肪酸の二重結合が酵素の活性部位に結合することを見出した。
- ◆PSA のような SAL 阻害剤は、既存の抗菌薬の効かない MRSA 感染症^{*4}や、黄色ブドウ球菌により引き起こされるアトピー性皮膚炎などの治療薬になることが期待できる。またヒトのリパーゼへの阻害の可能性も示唆されることから、抗肥満薬への適応も期待される。

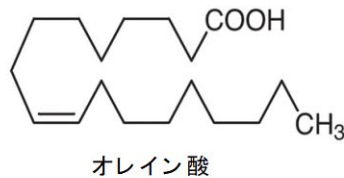
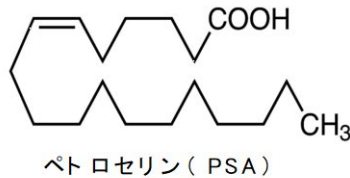
3. 発表概要：

京都工芸繊維大学分子化学系の北所健悟准教授らの研究グループは、大阪公立大学大学院生活科学研究科の神谷重樹教授、京都大学大学院医学研究科医学研究支援センターの奥野友紀子特定准教授、理化学研究所放射光科学研究センター利用システム開発研究部門の引間孝明研究員、山本雅貴部門長、筑波大学医療医学系の広川貴次教授らとの共同研究により、黄色ブドウ球菌が産生する病原因子の1つである「リパーゼ(SAL)」とパセリから抽出される不飽和脂肪酸のペトロセリン酸(PSA)との複合体の立体構造をX線構造解析^{*5}の方法を用いて、世界で初めて解明しました。

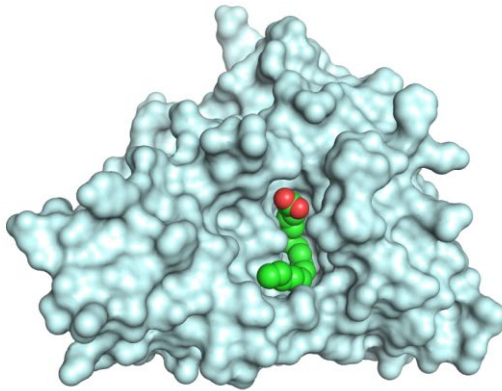
不飽和脂肪酸「PSA」が既存の SAL 阻害剤と同等のレベルで SAL の活性を阻害することを発見しました。更に、SAL と PSA との複合体の構造を原子レベルで解析することによって、PSA による阻害のメカニズムを解明することに成功しました。

本研究成果は、構造情報を元にした SAL に対する薬剤の理論的な開発に役立つと考えられ、より有効性が高く副作用の少ない治療薬の探索・設計が可能になると期待されます。特に、SAL が黄色ブドウ球菌の増殖に関与していることから既存の抗菌薬の効かない MRSA 感染症や、黄色ブドウ球菌によって引き起

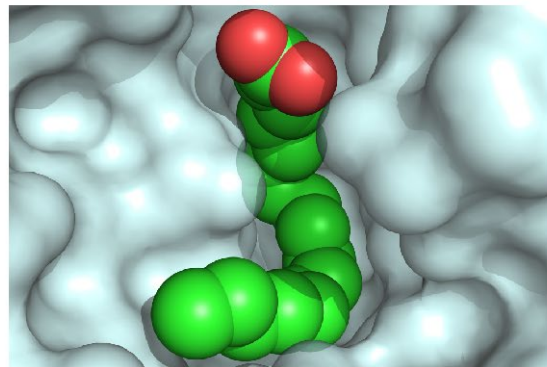
こされるアトピー性皮膚炎などの治療薬の発展が期待されます。また不飽和脂肪酸による酵素の阻害メカニズムが解明されたことから、PSA によるトリパーゼへの阻害の可能性と抗肥満薬への適応の可能性が示唆されました。なお、本研究成果は、2024年5月16日付けで「FEBS OpenBio」のオンライン版 (<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/2211-5463.13808>) に掲載されました。



ペトロセリン酸 (PSA) と
オレイン酸の構造式の比較



SALの全体構造 (緑がPSA)



PSA分子の結合様式 (SALのポケットにピッタリ結合)

4. 発表内容：

研究の背景

● 研究の背景・先行研究における問題点

世界中の病院において、既存の抗菌薬が効かない細菌である「スーパーバグ」が確認され、その流行が危惧されています。MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) はスーパーバグの代表例で、各種の抗菌薬に抵抗性を示すため、MRSA 感染症という院内感染が問題となっています。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; 以下、SA 菌) は、化膿した傷口や皮膚表面に存在する常在菌で、けがの傷口から体内に侵入し、多くの病原因子を産生して種々の病気を引き起こします。多種多様な細菌が存在する皮膚表

面で SA 菌が異常に増えると、アトピー性皮膚炎が発症することがわかっています。SA 菌が産生する病原因子の1つである「リパーゼ (SAL)」は SA 菌の増殖と相関があり、免疫応答由来の殺菌効果を持つ脂質を分解し、菌の生存率を向上させて生体防御を破壊することがわかっています。このことから SAL 阻害薬は抗 MRSA 薬の標的のみならずアトピー性皮膚炎の薬として注目されています。

また健康ブームで度々注目されるオレイン酸やリノール酸、EPA などの不飽和脂肪酸が人体にどのような影響を与えているかなどの分子レベルでのメカニズムの解明はよくわかっていません。

そこで本研究では、より高い効果を持つ副作用の少ない新しい薬の探索・設計に貢献するため、これまで大



京都大学
KYOTO UNIVERSITY



筑波大学
University of Tsukuba

型放射光施設「SPring-8」の強い放射光を用いた X 線構造解析の経験を活かし、SAL と阻害剤である不飽和脂肪酸との複合体の立体構造の解明を試みました。

研究内容

● 研究内容（具体的な手法等詳細）

研究を始めるにあたり SAL の立体構造については、すでに研究グループで決定しておりました。韓国の研究グループが SAL に対する PSA (図) の阻害があることを発表していたことから、研究グループは、PSA という不飽和脂肪酸が SAL に対して、 $3.2 \mu\text{M}$ という IC_{50} 値で阻害することを決定しました。PSA の阻害活性は、研究グループがすでに発表した抗肥満薬オルリスタット^{※6}と同等の強い阻害活性を持つことがわかりました。

本研究では、SAL にこの PSA 分子が結合した複合体の立体構造を、X 線結晶構造解析の手法を用いて原子レベルで解明するため、まず大腸菌での SAL の大量生産系を構築しました。純度の高い SAL を精製し、SAL 単体の結晶と PSA と共に共結晶化した結晶を作成しました。X 線回折実験およびデータ収集は、大型放射光施設「SPring-8」のビームライン BL41XU ならびに BL44XU で行いました。また詳しい阻害メカニズムを検証するために、SAL の活性触媒残基である S116A 変異体を作成し、活性の無い不活型の SAL-S116A 変異体と PSA の複合体の構造についても同様の方法で実験を行いました。

PSA 分子は SAL の活性部位である「鍵穴」に対して、「鍵」分子としてぴったりはまり込んでいることがわかりました(図)。また PSA は芋虫のような細長い分子で、SAL の触媒残基である 116 番目のセリン残基の酸素原子と PSA の二重結合を形成する炭素原子が共有結合していました。この芋虫のようなアルキル鎖が活性部位のポケットに疎水性相互作用する形で存在していることがわかりました。不活型変異体である S116A-SAL は活性触媒のセリン残基をもたないにも関わらず PSA が活性部位に結合していました。セリン酵素によくみられるオキシアニオンホール^{※7}と呼ばれるプラス電荷の穴の部分に二重結合が位置して、二重結合の電子が穴に収まる形で構造が安定化されていました。これらの結合様式によって、PSA は SAL に対して高い選択的親和性を示すことが示唆されました。この成果によって、ドラッグデザインによる薬剤開発を進めるための基礎的知見が確立しました。不飽和脂肪酸の二重結合の位置が酵素阻害においてはとても重要であることがわかりました。オレイン酸では SAL を阻害しないのは、オレイン酸とペトロセリン酸の二重結合の位置が全く異なるからであって(図)、酵素の阻害に二重結合の位置が重要であることがわかりました。

今後の展開

PSA と SAL の相互作用から、薬のデザインのための構造基盤が構築されました。MRSA はほとんどの抗菌薬に耐性があり、新生児や老人などの免疫力の弱い患者を死に至らしめることがわかっています。MRSA に対する抗菌薬以外の薬の探求は重要で、SAL の阻害剤は、MRSA 感染症への新規な作用機序の薬として期待されます。本研究の結果は、SAL を標的として MRSA や皮膚病などの疾患に対して、その構造情報を基にした創薬 (Structure based drug design) も可能にすると期待できます。また PSA は天然から取れるパセリ油の主成分であることから、パセリ油のアトピー性皮膚炎への効果や、抗肥満作用も期待できると考えられます。



京都大学
KYOTO UNIVERSITY



筑波大学
University of Tsukuba

5. 発表雑誌：

【雑誌名】 FEBS OpenBio

【論文タイトル】 Crystal structure of *Staphylococcus aureus* lipase complex with unsaturated petroselinic acid

【著者】 Kengo Kitadokoro (北所健悟), Shigeki Kamitani (神谷重樹), Yukiko Okuno (奥野友紀子), Takaaki Hikima (引間孝明), Masaki Yamamoto (山本雅貴), Takatsugu Hirokawa (広川貴次)

【DOI 番号】 10.1002/2211-5463.13808

アブストラクト URL : <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/2211-5463.13808>

6. 用語解説：

(注1) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; SA 菌)

ヒトの鼻腔などに存在する常在菌で、化膿した傷口の膿の部分に多く存在し、感染症の原因となる多くの毒素タンパク質や酵素などの病原因子を産生します。病原性が強い菌で、基礎疾患のある人など、免疫力の低下した患者に対して、肺炎、敗血症、髄膜炎、関節炎などの重篤な感染症を引き起こします。

(注2) 不飽和脂肪酸

カルボン酸を末端に持つアルキル基のうち、分子内に二重結合を持つものの総称です。オリーブオイルに含まれるオレイン酸が有名ですが、健康に良いとされているそのメカニズムは不明な点が多いです。

(注3) IC₅₀ 値 (half maximal (50%) inhibitory concentration ; 50%阻害濃度または半数阻害濃度)

化合物の生化学的な阻害作用の有効度合いを示す値です。数値が低いほど阻害が有効であることを表します。数値として示した濃度で薬物が、標的とする酵素の半数の働きを阻害できることを示しています。

(注4) MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 感染症

メチシリンなどのペニシリン剤やβラクタム剤など多くの抗生物質が効かない耐性を持った黄色ブドウ球菌によって引き起こされた感染症で、幼児や高齢者など免疫力が低下した患者が感染すると、多くの種類の抗菌薬が効かないために、治療が進まずに重症化し、死に至るケースがあります。

(注5) X線構造解析

タンパク質の立体構造を決定する手法で、ターゲットとなるタンパク質を結晶化し、大型放射光施設「SPring-8(スプリングエイト)」などの強いビームを使って、X線照射して得られた回折データから、タンパク質の原子レベルでの立体構造を解析します。

(注6) オルリスタット

抗肥満薬として大正製薬から Alli として発売された治療薬で、ヒトの脂肪分解酵素である胃や膵臓のリパーゼを不活性化し、脂肪吸収を阻害する効果があります。

(注7) オキシアニオンホール

セリンプロテアーゼなどの加水分解酵素によく見られる窒素などプラス電荷を持った原子によって構成された構造上のポケットのことで、酸素原子などマイナスの電荷を持つ原子を捉えて反応過程を安定化する働きがある穴のこと。今回では二重結合にある電子がこの穴に入ることによって構造を安定化していました。