

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	多剤耐性化の克服を目指した薬剤排出トランスポーターの構造機能解析
研究機関・ 部局・職名	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
氏名	村上 聡

1. 当該年度の研究目的

①. 緑膿菌や、インフルエンザ菌など病原性最近由来の多剤排出トランスポーターの高分解能構造解析  
現在のところ多剤排出トランスポーターのうち詳細な立体構造が明らかなものは、極めて限定的である。より多くの知見を集積させ、それらを統合的に取り扱い、計算科学や、合理的薬剤設計を行う必要生がある。病原菌の耐性克服を目指し研究を行ううえでターゲットとするタンパク質構造は計算上のモデルでなく、そのものの高分解能の構造が必要であり、それを得ることを目的とする。  
さらに基質特異性が異なる大腸菌由来トランスポーターの立体構造解析も行い、それらの構造比較により、基質選択性についての構造基盤を明らかにする。

②. 既知の阻害剤候補を基にした化合物ライブラリーを利用した阻害剤の合理的検索と、複合体構造解析  
これまで文献的には、ジペプチド誘導体とクロロプロマジン系の化合物がこの系の多剤排出トランスポーターの阻害剤になり得ると報告がある。(報告がなされたということは、製薬業界には既に望みが薄いということ。)これらが、どのようなメカニズムで阻害剤の可能性たり得たかという事の本質は明らかにされておらず、多剤排出トランスポーターのどこにどのように結合するかも分かっていない。我々は、それを構造学的に明らかにし、さらに、化合物の構造に基づいて化合物と類似構造をもち、さらなる阻害活性が期待できる候補化合物の検索を計算機科学的手法により行う。さらにそれらを化合物ライブラリーから取得し、それが菌体の増殖に及ぼす影響を調べると共に、阻害剤候補化合物との結合を実験的に求め、さらには、その化合物と多剤排出トランスポーターとの共結晶構造解析を行うなどして、結晶構造と構造計算を合わせたシミュレーションとの相乗的なサイクルを回すことにより、トランスポーター阻害剤の合理的阻害剤設計を目指す。

2. 研究の実施状況

① 病原菌由来、あるいは基質特異性の異なるホモログの構造解析を進めてきた。  
 今年度の目覚ましい成果のひとつとして、当初計画の新奇薬剤排出トランスポーターの結晶化成功をあげる。これは(研究の激しい競合故に詳細に述べることが出来ないが)ある種の病原菌由来のもので、これまで構造が知られておらず、新しい構造学的知見が得られることが期待できる。既に複数種の結晶を得ており、その内のひとつからは最高 2.5 Å までの反射を得ている。現在位相計算をはじめとする構造解析中であり、最先端・次世代研究プログラムの終了までには構造解析完了が十分狙えるところにこぎ着けた。

他に、本研究で中心的に扱ってきた種類の薬剤排出トランスポーターでも、新奇薬剤結合型のものについて、結晶構造を既に解析完了し、生化学データの取得も完了し、現在論文を執筆中である。また、大腸菌多剤排出トランスポーターAcrB については、21 世紀になり開発された新薬であるリネゾリドとの結合型の結晶構造解析を明らかにした。また、基質特異性の異なるホモログについても解析が進行中であり、幾らかの成果が期間中に出ることがようやく大いに期待できる。

② トランスポーターの阻害剤設計については、1 つは、基質輸送に関する透過経路計算についてである。薬剤開発に必要な知見である疎水性の度合いを示す LogP などのパラメーターの違いにより排出される際の経路が違うことなどを見だし、当研究室で解析した生化学データと合わせて論文発表した(JACS 論文受理済み・出版待ち)。これは、細胞膜からどのようにして基質がトランスポーターに吸い込まれるのか? という基礎的な機構解明にも繋がる重要な知見である。また、化合物ライブラリーを利用したリガンドベース薬剤デザインによる阻害剤検索であるが、現在 2 次スクリーニングが進行中でありこちらも期待が集まっている。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 5 件
計 7 件	<p>Shigeru Sugiyama, Noriko Shimizu, Gen Sasaki, Mika Hirose, Yoshinori Takahashi, Mihoko Maruyama, Hiroyoshi Matsumura, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue and Yusuke Mori                  A Novel Approach for Protein Crystallization by a Synthetic Hydrogel with Thermo reversible Gelation Polymer  <i>Cryst. Growth Des.</i> 2013, 13, 1899-1904</p> <p>Satoshi Nakayama, Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Masateru Kurata, Mihoko Maruyama, Shigeru Sugiyama, Yusuke Aoki, Yoshinori Takahashi, Masashi Yoshimura, Seiichiro Nakabayashi, Hiroaki Adachi, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami and Yusuke Mori.                  Effect of Gel-Solution Interface on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein.  <i>Cryst. Growth Des.</i> (2013, 13, 1491-1496</p> <p>杉山成、廣瀬未果、佐崎元、安達宏昭、高野和文、村上聡、松村浩由、丸山美帆子、井上豪、森勇介                  固相ハイドロゲル中でのタンパク質結晶化  <i>日本結晶学会誌</i> 2012, 54, 300-303</p> <p>Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiro Hosokawa, Ryota Murai, Gen Sasaki, Tomoya Kitatani, Hiroaki Adachi, Tsuyoshi Inoue, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Seiichiro Nakabayashi, Yusuke Mori and Hiroshi Masuhara                  Spatially Precise, Soft Microseeding of Single Protein Crystals by Femtosecond Laser Ablation.  <i>Cryst. Growth Des.</i> 2012, 12, 4334-4339</p>

様式19 別紙1

	<p>Mihoko Maruyama, Hisato Kawahara, Gen Sazaki, Syou Maki, Yoshinori Takahashi, Hiroshi Y. Yoshikawa, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Satoshi Murakami, and Yusuke Mori Effects of a Forced Solution Flow on the Step Advancement on {110} Faces of Tetragonal Lysozyme Crystals: Direct Visualization of Individual Steps under a Forced Solution Flow. <b>Cryst. Groth Des.</b> 2012, 12, 2856–2863</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <p>Xin-Qiu Yao, Nobuhiro Kimura, Satoshi Murakami, and Shoji Takada. Drug uptake pathways of multidrug transporter AcrB studied by molecular simulations and site-directed mutagenesis experiments. <b>J.Am.Chem.Soc.</b> 2013, <i>in press</i></p> <p>Li-Wei Hung · Heung-Bok Kim · Satoshi Murakami · Goutam Gupta · Chang-Yub Kim · Thomas C. Terwilliger Crystal Structure of AcrB Complexed with Linezolid at 3.5Å Resolution. <b>J. Struct. Funct. Genomics.</b> 2013, <i>in press</i></p>
<p>会議発表</p> <p>計 9 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <p>Satoshi Murakami, Structure and Dynamics of the Drug Efflux Transporter, AcrB, Hannover (Germany), 11.May 2012, Medizinische Hochschule Hannover.</p> <p>Satoshi Murakami, Structure and Dynamics of the Drug Efflux Transporter, AcrB, DESY, Hamburg (Germany), 15. May, 2012, DESY Workshop, Instrumentation and methods development for synchrotron-based biomedical research.</p> <p>Satoshi Murakami, Structure and Dynamics of the Multi-drug Efflux Transporter, Cagliari (Italy), 24-25 Sep.2012, University of Cagliari.</p> <p>村上聡、2012 ノーベル化学賞解説講演会「膜たんぱくとしての GPCR の構造」、東京、10 月日本化学会主催 CSJ 化学フェスタ、2012 年 10 月 14 日～17 日、公益社団法人日本化学会</p> <p>Satoshi Murakami, Structure and Dynamics of the Multi-drug Efflux Transporter, Adelaide (Australia), 2-6 Dec.2012, Adelaide Protein Group.</p> <p>村上聡、創薬ターゲットとしてのタンパク質の構造・機能解析の新展開 「膜タンパク質の精製結晶化と構造解析」、東京、2012 年 12 月 15 日、公益社団法人日本薬学会</p> <p>Satoshi Murakami, Structure and Dynamics of the Multi-drug Efflux Transporter, 幕張、2013 年 3 月 18 日～20 日、日本細菌学会</p> <p>Gordon Research Conference on Multi-drug Efflux systems, Satoshi Murakami, Difference between the <math>\beta</math>-lactam selectivity of the multidrug transporters AcrB and AcrD resides in the proximal binding pocket., Ventura (CA, USA), 17~22, Mar, 2013, GRC(Gordon Research Conference)</p> <p>一般向け 計 1 件 「クスリが効かない!?病原菌の生き残り戦略」 2012 年 8 月 31 日 東京工業大学大岡山キャンパス(東工大蔵前会館 ロイヤルブルーホール) 高校生・一般向け公開講演会 参加者 51 名</p>
<p>図書</p> <p>計 1 件</p>	<p>村上聡 フォトサイエンス生物図録、2012, 1 頁(総ページ数 264 ページ)、数研出版</p>

様式19 別紙1

<p>産業財産権 出願・取得状 況  計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>所属する東工大・生命理工学研究科のホームページ上で、発表論文や研究内容について公開している。  <a href="http://www.xtal.bio.titech.ac.jp/top-j.html">http://www.xtal.bio.titech.ac.jp/top-j.html</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>「クスリが効かない!?病原菌の生き残り戦略」 2012年8月31日  東京工業大学大岡山キャンパス(東工大蔵前会館 ロイヤルブルーホール) 高校生・一般向け公開講演会  参加者 51名</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前年 度迄の累計)
直接経費	122,000,000	64,165,000	37,450,000	20,385,000	0
間接経費	36,600,000	19,249,500	11,235,000	6,115,500	0
合計	158,600,000	83,414,500	48,685,000	26,500,500	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度合 計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	9,856,051	37,450,000	5,650	47,311,701	46,803,289	508,412	0
間接経費	0	11,235,000	0	11,235,000	11,235,000	0	0
合計	9,856,051	48,685,000	5,650	58,546,701	58,038,289	508,412	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	29,135,596	研究に不可欠な機器類と試薬などの購入
旅費	3,146,141	学会出席、放射光施設での結晶の回折強度実験
謝金・人件費等	10,103,149	技術補佐員(3名)の雇用
その他	4,418,403	学会参加費、実験機器修理・保守等
直接経費計	46,803,289	
間接経費計	11,235,000	
合計	58,038,289	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
超低温フリーザー +貯蔵ラック	MDF193AT	1	966,000	966,000	2012/9/28	東京工業大学
ClassII安全キャビ ネット	サーモフィッ シヤー1355/パッ ケージ	1	1,155,000	1,155,000	2012/10/16	東京工業大学
純水製造装置	Milli-Q Integral proteome	1	2,736,300	2,736,300	2012/10/18	東京工業大学
CO2インキュベ ーター+スタックブル キット+架台	HERAcell150i	1	855,750	855,750	2012/10/25	東京工業大学
タンパク質結晶化 自動観察装置	RockImager27	1	11,193,000	11,193,000	2013/2/1	東京工業大学
ワークステーショ ン・電子計算機	HP・HPZ820/CT	1	552,930	552,930	2013/3/18	東京工業大学