

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2026年 5月 21日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 行彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 東北大学大学院医工学研究科

職 名 准教授

氏 名 村山和隆 

【提出書類】

(1)研究実施概要報告書(本紙)

添付書類(A4版3枚以内):研究状況を示す写真等の資料

(2)収支報告書

添付書類:助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合:支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

(1)テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

薬剤耐性の克服を目指した多分子標的薬の AI 創薬基盤の開発

(2)本研究の期間

(西暦) 2025年4月～2026年3月

(3)本研究の目的

感染症による災害は、生命だけでなく社会、経済、文化にまで大きな被害をもたらす。ヒトが健康で快適な人生を過ごすためには、感染症に対する脆弱性を克服し強く靱な社会を構築する必要がある。感染症の原因となる微生物は、一旦、ワクチンや治療薬といった対抗手段が開発されても、それらの対抗策に対して耐性を獲得してしまう。実際に、新型コロナウイルスのワクチンや治療薬に耐性を獲得したウイルス株が報告されている。すなわち、感染症に対する強靱性を持続的に発揮する社会の構築には、薬剤耐性の克服が必須となる。現在、薬剤耐性出現を抑えるために複数の治療薬を併用する多剤耐性療法が導入されている。しかし、その効果は十分ではなく、薬剤耐性を獲得した細菌やウイルスが出現している。申請者は過去の研究で、単剤で極めて薬剤耐性を生じにくい抗菌化合物（化合物 A）の発見に成功した。更に、人工知能（AI）技術を用いたタンパク-化合物間結合予測システム（Diffdock）と酵素阻害実験から、化合物 A が細菌内の CUPIN タンパクの 1 つである Cap5F を阻害することを明らかにした。他方、CUPIN タンパクは細菌内に複数存在し、共通構造を有しているため化合物 A が Cap5F 以外の CUPIN タンパクも標的とする多分子標的医薬である可能性が示唆されている。本研究は、化合物 A が複数タンパクを標的とした多分子標的医薬であることを明らかにし、「薬剤耐性を生じにくい」という化合物特性と「多分子標的」の相関解明を目的とする。

(4)本研究の概要

申請者等は過去に、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) や腸球菌 (*E. faecium*) を用いた新規抗菌薬探索実験を行った。実際に抗菌活性を示した化合物に対して、試験管内耐性誘導実験 (図 1a) を行った結果、臨床で使用されている抗菌薬 (ST 合剤) に対して 14 日で薬剤耐性を獲得する細菌が 90 日以上も薬剤耐性を獲得出来ない抗菌化合物 (化合物 A) の同定に成功した。通常、薬剤耐性の出現抑制には、複数薬剤の併用が効果的であるが、単剤で薬剤耐性が生じない抗菌薬は極めて稀である。人工知能 (AI) を用いた化合物-タンパク結合予測ツール (Diffdock) を利用した結合予測と酵素阻害実験の結果から、化合物 A が細菌の壁合成に関わる CUPIN タンパクの一種である Cap5F を標的にしていることが明らかとなった。また、化合物 A は Cap5F の活性中心に存在する CUPIN ドメインへの結合が示唆された。CUPIN ドメインに結合する化合物は、構造上の特徴が知られており、窒素原子や酸素原子により活性中心の 2 価金属イオンに配位結合する (図 1b)。化合物 A も、この構造的な特徴を有しており金属配位による結合が予測されている。一方で、CUPIN ドメインは CUPIN タンパクの共通構造として知られていることから、化合物 A は Cap5F 以外の CUPIN タンパクへの結合が示唆されている。単剤で複数のタンパクを阻害する化合物は多分子標的医薬 (multi-target drug) と呼ばれており、近年、抗がん剤やアルツハイマーの治療薬開発分野で注目されている。本研究は、化合物 A が複数タンパクを標的とした多分子標的医薬であることを明らかにし、「薬剤耐性を生じにくい」という化合物特性と「多分子標的」の相関解明を目的とする。

研究の実施は下記の 4 つの項目に沿って進める。

①化合物 A の新規標的タンパクの *in silico* 探索: AI 技術の発展によりタンパク質の構造予測の精度は飛躍的に向上した。2024 年のノーベル賞受賞者等が開発した AlphaFold2 は、アミノ酸配列の実から正確なタンパク三次元構造を予測できる。既に、全ゲノム配列が明らかな生物種の全タンパク構造を予測し、データベース化した AlphaFold data base (AFDB) も公開されており、結晶構造解析などによって三次元構造が解明されていないタンパク質の高精度な三次元予測構造が利用できる。本研究では、*S. aureus* 由来 CUPIN タンパクの三次元構造を AFDB から網羅的に取得し、Diffdock を用いて化合物 A との結合を予測する (図 2)。網羅的な予測にかかる人的・時間的コストを削減するために、AFDB からの構造データ取得と結合予測を自動化する。

②同定した新規標的タンパクと化合物 A の結合評価: 予測された全てのタンパクについて発現・精製するためには膨大な時間と労力を有するため、① 予測結果のスコア、② 細菌の増殖に対する重要度が高い CUPIN タンパクから優先的に発現・精製し、化合物 A との結合を評価する。タンパク発現は、大腸菌発現系を用いる。本研究では結合試験の他に結晶構造解析を行うため、タンパク質を簡便かつ大量に得られる大腸菌発現系を選択した。結合評価には Biacore や differential scanning fluorimetry (DSF) を使用する予定である (図 2)。

③結晶構造解析による結合様式の解明: 化合物 A との結合が確認できた CUPIN タンパクに関して、化合物 A-CUPIN タンパク複合体を結晶化し、X 線結晶構造解析によって三次元構造を明らかにする (図 3)。結晶化にはハンギング・ドロップ法とシッティング法の 2 種類を用いる。また、結晶に X 線を照射する X 線回折実験は、兵庫県にある大型放射光施設 SPring-8 を利用する (利用申請は採択済み)。X 線回折結果から複合体構造を解明する。得られた三次元構造を基に、化合物と CUPIN タンパクの相互作用様式を明らかにする。

④「薬剤耐性を生じにくい」という化合物特性と「多分子標的」の相関解析: 化合物 A が結合した CUPIN タンパクの内、既に機能が明らかなタンパクに関しては、そのタンパクが細菌内でどのような代謝経路に関与しているかを調べ、Cap5F が関与する代謝経路との関連を調べる。また、共同研究者である東北大学 林宏典 博士が試験管内耐性誘導の継続を分担し、耐性菌が得られた場合、異なる化合物 A 濃度で培養した細菌のゲノムを解析し、どのような変異がどのような順番で蓄積したかを調べる。林 博士とは、5 年以上の共同研究実績があり協力体制は万全である。また、薬剤耐性菌の全ゲノム配列解析は企業に委託する予定である。

(5)本研究の内容及び成果

本研究は当初設定した4つの項目に沿って進められた。それぞれの項目について以下に成果を報告する。

①化合物 A の新規標的タンパクの *in silico* 探索： 研究期間中に、化合物 A が Cap5F 以外の標的タンパクに結合することを実証する。また、特定の化合物に対し結合するタンパクの網羅的探索を自動化するシステムを構築する。

In silico スクリーニングとしては、構造データベース(AlphaFold Structure Database)の約 3000 の予測構造のそれぞれに対し、化合物 A を用いてドッキング(DiffDock)を実行した。ドッキングの結果はすべての構造に対しスコアが与えられるため、まずはスコアを基準として上位より並べた。しかしながら、ドッキングモデルの中には明らかに不合理な構造を示すものも含まれるため、スコアに沿って主観での判断も加えつつ選択を進めた。この結果、CapF より優良(化合物の結合として確からしい)と判断できる構造として14構造を抽出した。本項目については一部主観を交えた点について、自動化のためのさらなる改良が必要であるが、おおむね当初の目標を達したと言える。

②同定した新規標的タンパクと化合物 A の結合評価： 結合評価に用いるタンパクの大量発現・精製法を確立する。結合評価により標的タンパク-化合物 A 間の親和性を定量評価し、複数の標的タンパクの中から、主たる標的タンパクを特定する。

上記①において選択したタンパク質のうち上位5種類のタンパク質についてクローニングを行ない、発現ベクターを構築した。引き続き、発現精製を進めたが最終的に発現精製に成功したものは2つとなった。スクリーニングは網羅的に行っているため、実際の発現精製では一部実験に不向きなタンパク質が含まれることは予想されたため、まずは調製に成功した2種類のタンパク質について実験を進めるとともに、さらに下位の候補について拡張を計画している。2種類のタンパク質についてはDSFによる評価を行った。その結果、両方のタンパク質について化合物の共存による変性温度の低下がみられ、化合物とタンパク質との何らかの相互作用が示唆された。

③結晶構造解析による結合様式の解明： 化合物 A と標的タンパクからなる複合体の三次元構造を解明し、その相互作用様式を明らかにする。各標的タンパクと化合物 A の結合様式および親和性評価の結果を基に、より最適な化合物を *in silico* 上で設計する。

調製されたタンパク質については複合体としてその結合様式を明らかにすることを目指し、現在結晶化を進めているところである。現在のところまだ目的の結晶を得ることはできていない。引き続き結晶化を進める。

④「薬剤耐性を生じにくい」という化合物特性と「多分子標的」の相関解析： 過去の文献や相同性解析を基に、同定した各標的タンパクが果たす細菌内での役割を明らかにし、化合物 A の抗菌活性機序を解明し、化合物 A が細菌内で複数の代謝経路を同時に阻害することを証明する。化合物 A に対する薬剤耐性菌が得られた場合、全ゲノム配列解析により細菌がどのような変異を獲得したかを明らかにする。

現在実験が進められている2種類のタンパク質は代謝や生体機能の調節に重要な役割を持つことが予想されるタンパク質である。そのため、それらのタンパク質の阻害は菌の生育にとって大きな障害となると考えられる。また現状 CapF と合わせ3種類のタンパクであるが、これらの間には特に密接な関連が無い場合、化合物 A による阻害はそれぞれの経路で独立に働き得る。各タンパク質に対する結合は現状としてはとりわけ大きいものとは考えられないが、それぞれが同時に阻害されるとすれば、当初考えた通りの”多分子標的薬”として機能することは十分期待できる。

(6)本研究の考察

本研究は、現代医療における最大の懸念事項の一つである薬剤耐性(AMR)問題に対し、「単剤による多分子標的(multi-target)」という革新的概念を導入し、その有効性とメカニズムを学術的・技術的に裏付けることを目的とした。研究の出発点となった抗菌化合物 A は、既存の ST 合剤が 14 日で耐性を生じさせるのに対し、90 日以上もの長期間にわたり耐性菌の出現を許さないという極めて特異な性質を有している。この「耐性を生じにくい」という特性が、単一のタンパク質阻害ではなく、細菌内の複数の必須タンパク質を同時に標的とすることに起因するという仮説に基づき、本研究を実施した。

多分子標的メカニズムと耐性克服の論理的整合性:本研究の *in silico* 探索において、AlphaFold Structure Database (AFDB) から取得した約 3000 の予測構造に対しドッキングシミュレーションを行った結果、Cap5F 以外にも合理的な結合様式を示す 14 の候補構造を抽出した。特筆すべきは、実際に発現精製に成功した 2 種類のタンパク質において、DSF (差分走査蛍光定量法) 評価により化合物 A の共存下で変性温度(T_m 値)の低下が確認された点である。通常、阻害剤の結合はタンパク質を熱的に安定化させ T_m 値を上昇させることが多いが、本研究で見られた「 T_m 値の低下」は、化合物 A が標的タンパク質の立体構造自体を「不安定化」させている可能性を強く示唆している。現在同定されている Cap5F を含む 3 種類の標的タンパク質は、細菌内で互いに独立した代謝経路や生体機能調節に関与していると予測される。複数の独立した経路を同時に阻害することは、細菌が単一の遺伝子変異によって薬剤から逃れることを困難にする。この多点同時攻撃の仕組みこそが、多剤併用療法と同様の効果を単剤で実現し、長期にわたる耐性抑制を可能にしている本質的な機序であると考察される。

AI 駆動型創薬基盤の優位性と拡張性:本研究で構築した、AFDB と Diffdock を連携させた自動探索システムは、本アプローチにおける我々独自の視点を提示したものと考えている。従来の創薬が「特定の標的に対して多数の化合物」を当てるものであるのに対し、本システムは「特定の化合物に対して全タンパク質」を当てるという逆転の発想に基づいている。これにより、化合物の主作用のみならず、副作用の原因となるオフターゲットへの結合や、本研究のような多分子標的能を迅速かつ網羅的に予測することが可能となった。このシステムは、新たな AI ツールの開発に応じて容易にアップデートできる柔軟性を備えており、感染症分野に留まらず、がんや生活習慣病など、複雑な発症機序を持つ疾患に対する次世代の多分子標的医薬開発において、強力なプラットフォームになると期待される。

今後の課題と社会への貢献:一部の標的候補において、発現精製や結晶化が難航しており、原子レベルでの相互作用解明は今後の継続課題である。放射光での X 線回折実験等を通じて複合体構造を解明できれば、不安定化を誘発する合理的な分子設計が可能となる。結論として、本研究はこれまで副作用の懸念からネガティブ視されかねなかった多分子標的能を、AMR 克服のための「積極的な価値」へと転換させた。本研究成果は、将来のパンデミックへの備えや健康寿命の延伸に寄与することが期待される。

(7)共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

東北大学災害科学国際研究所・助教・林宏典

(8)本研究の成果の公表先

2025年2月、蛋白質科学若手交流会、Inhibitor interaction analysis of CapF from *S. aureus*

2026年9月、生物工学会(予定)

2026年11月、日本結晶学会(予定)

[注]この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。