

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
平成30年3月20日現在

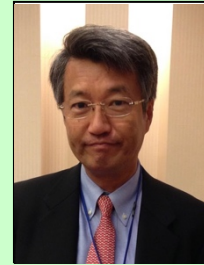
治療効果を指向した新規抗菌薬の創出

Platform for the identification of novel therapeutically
effective antimicrobial agents

課題番号：15H05783

関水 和久 (SEKIMIZU KAZUHISA)

帝京大学・医真菌研究センター・教授



研究の概要

黄色ブドウ球菌のマウス感染モデルでの経時的、及び複数の臓器における網羅的な遺伝子発現解析に成功し菌の宿主環境下における振る舞いを明らかにできた。また、カイク感染モデルを用いた探索も含めて、新たに13の新規病原性発揮に必要な遺伝子を同定した。さらに、それらの生理活性を明らかにし、活性阻害化合物のアッセイ系を確立した。

研究分野：環境・衛生系薬学

キーワード：微生物・感染症学、病原性

1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性菌の蔓延が世界規模の課題となっている。WHOの推計では、対策がなされない場合、2050年には多剤耐性菌による感染による死者数が全世界で年間5000万人になるという推計がされており、医療経済上も大きな負担になることが予想されるなど喫緊の問題となっている。そこで、新規作用機序を有する抗菌薬の開発が必要とされているが、近年、新規抗菌薬の発見確率の低下や標的の枯渇などの理由により、新しいメカニズムを示す新規抗菌薬の上市は皆無である。従って、新たな創薬理論に基づく、多剤耐性菌に有効な感染症治療薬の開発法の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、病原体の宿主環境下における遺伝子発現の振る舞いを明らかにし、病原性発揮に関わる遺伝子群を同定する。同定された病原性に関わる因子の病原性発揮機構を包括的に理解し、また病原性の制御機構についても明らかにする。さらに、これらの宿主環境下での増殖に必要な因子を標的とした、新規抗菌薬開発法の確立を目指す。

3. 研究の方法

宿主環境下での細菌の振る舞いを明らかにするために、我々が確立した宿主臓器からの黄色ブドウ球菌の濃縮法を利用し、次

世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。時間的、臓器間での遺伝子の振る舞いから、発現変動する遺伝子群の生化学的、遺伝学的な解析から発現制御機構を解析する。また、それら発現上昇する遺伝子の中から病原性に関与する遺伝子の同定を行う。また、カイクを用いた網羅的な病原性遺伝子の同定も実施し、新規病原性因子を明らかにする。さらに、それらのうち病原性への寄与が高く、菌種間で保存性が高い因子について病原性発揮に関わる生理機構を明らかにし、確立した酵素活性測定法を用いて病原性発揮に必要な因子を標的とした阻害薬の探索を行い、治療効果を示すか否か評価する。

4. これまでの成果

(1) 宿主環境下の病原体の網羅的遺伝子発現解析と病原性遺伝子の発現制御機構

黄色ブドウ球菌に感染した宿主の臓器からの黄色ブドウ球菌を濃縮法を改良し、より高感度な遺伝子発現解析手法を確立した。感染後6, 24, 48時間の経時的、及び、3つの臓器間における、黄色ブドウ球菌の網羅的な遺伝子発現解析に成功した。同一菌種で経時的かつ複数の臓器間で、網羅的かつ高精度な遺伝子発現解析に成功したのは本研究が初めてである。この解析から、感染初期と後期では、発現上昇する遺伝子の機能が異なっており、同機能の遺伝子間でも発現パターンに違いがあることがわかった。例えば、感染初期では嫌気呼吸系や大部分の鉄取り込み系は減少するか発現量が

変化しないが、これらは感染後期で発現上昇することがわかった。一方、溶血毒素やロイコトキシンなどの外毒素は感染初期から後期まで高いままで維持されていた。これらの結果は、宿主環境の変化に応じた遺伝子発現応答が起こっていること、宿主に対する攻撃は常に起こっていることを示唆している。また従来の報告では、感染状況下では鉄が不足するため、鉄の取り込みが感染に重要であることと考えられていたが、本結果はその仮説を支持せず、我々が得ている特定の鉄獲得系の欠損が病原性発揮に必要なという実験結果を説明する。また、転写因子 Fur によって制御されている3つの鉄取り込み系のシステムのうち、2つは Fur の発現パターンと一致するが、1つは全く逆の挙動を示したことから、これまで知られていない制御システムの存在が示唆される。さらに、本研究において初めて機能性 RNA(ncRNA)の、宿主環境下における振る舞いを解析した。これまで病原性に関わることが知られている RNA III 遺伝子は臓器間で発現量に差が認められた。さらに、本研究では真菌感染においても同様の宿主環境下での網羅的な遺伝子発現解析手法を確立できた。

(2) 病原性遺伝子の探索

(1)の解析において宿主環境下において臓器間で共通して発現上昇した黄色ブドウ球菌の遺伝子のうち、病原性への寄与が知られていない 30 遺伝子について破壊株を樹立し、マウスモデルにおける殺傷性を検討した。その結果、新規機能性 RNA 遺伝子1つを含む、8つの遺伝子破壊株が野生型株と比較し病原性が低下することをみいだした。また、カイコ細菌感染モデルにおいて病原性が低下した株を探索し、564 遺伝子破壊株から、新たに 17 遺伝子が再現よく病原性発揮に必要なことを見いだした。そのうち6株についてマウスモデルでの病原性を検討したところ、5株の病原性が低下していることを見いだした。従って、本研究において新たに 13 の病原性に関わる遺伝子を見いだしたことになる。さらに、真菌についても一部の遺伝子について病原性の探索を実施したところ、1つの遺伝子破壊株の病原性が低下していることを見いだした。

(3) 病原性発揮機構の解明

黄色ブドウ球菌の病原性に関わる2つの遺伝子について、その遺伝子機能を解析した。その結果、1つはヌクレオシド二リン酸を分解する活性を有しており、もう1つは糖の修飾代謝に関わるものであった。また、阻害薬探索のための酵素活性測定を確立した。さらに、幅広い菌種で保存されて

おり、マウスへの病原性への寄与が高い機能未知遺伝子を複数見いだしており、現在その生理活性を解析している。真菌については *in silico* で阻害薬探索を行い複数の候補化合物を得ている。

5. 今後の計画

網羅的な病原性因子の探索を早期に完了させる。すでに確立した構成活性のアッセイ系、及び、病原性への寄与が高く菌種間で保存性が高い遺伝子産物について、病原性発揮機構を明らかにするとともに、活性測定系を確立し、阻害活性物質の探索を実施する。さらに、これまでに得られている網羅的遺伝子発現解析結果を元に、病原性遺伝子のネットワークの解明を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Pharmacokinetic parameters explain the therapeutic activity of antimicrobial agents in a silkworm infection model, Paudel A, Panthee S, Urai M, Hamamoto H, Ohwada T*, Sekimizu K*: *Sci Rep*, 8, 1578, 2018

2. An invertebrate infection model for evaluating anti-fungal agents against dermatophytosis, Ishii M, Matusmoto Y, Yamada T, Abe S, Sekimizu K*: *Sci Rep*, 7, 12289, 2017

3. A Novel Spiro-Heterocyclic Compound Identified by the Silkworm Infection Model Inhibits Transcription in *Staphylococcus aureus*, Paudel A, Hamamoto H, Panthee S, Kaneko K, Matsunaga S, Kanai M, Suzuki Y, Sekimizu K*: *Front Microbiol*, 8, 712, 2017

4. Novel Nucleoside Diphosphatase Contributes to *Staphylococcus aureus* Virulence, Imae K, Saito Y, Kizaki H, Ryuno H, Mao H, Miyashita A, Suzuki Y, Sekimizu K, Kaito C*: *J Biol Chem*, 291, 18608-18619, 2016

5. 16S rRNA methyltransferase KsgA contributes to oxidative stress resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*, Kiyama T, Kizaki H, Ryuno H, Sekimizu K, Kaito C*: *Biochimie*, 2015

その他、論文 33 報、著書 13 報、総説 9 報、国際会議 (招待講演) 5 件、学会発表 (招待講演) 14 件、国際学会発表 5 件、国内学会発表 28 件 (うち学会発表優秀賞 2 件)

ホームページ等

医真菌研究センターホームページ

https://www.teikyo-u.ac.jp/affiliate/laboratory/fungal_center/