

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14690

研究課題名(和文) アンサマイシン系抗生物質のHfq過剰発現による細胞分裂阻害の解除機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of recovery from Hfq-induced growth inhibition by ansamycin family antibiotics

研究代表者

高田 綾子 (TAKADA, AYAKO)

東京工業大学・技術部・技術職員

研究者番号：20401565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はRNA代謝反応を標的とした新規薬剤の開発を目的としたものである。RNAシャペロンであるHfqの過剰発現はFtsZの発現を抑制することにより細胞分裂を阻害する。その阻害を解除する薬剤としてアンサマイシン系抗生物質Rifampicinが見出された。Rifampicin以外のアンサマイシン系抗生物質も同様の活性を示し、RifampicinはHfqの発現量を低下させた。Rifampicin耐性rpoB変異の遺伝的背景ではアンサマイシン系抗生物質による細胞分裂阻害は解除されず、アンサマイシン系抗生物質はRNAポリメラーゼを介してHfq過剰発現を抑制し細胞分裂阻害を解除することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop new antibiotics targeting RNA metabolism. We previously reported that overproduction of Hfq, an RNA chaperone, inhibits cell division by suppressing expression of the cell division protein FtsZ. It was found that rifampicin, an ansamycin family antibiotic, recovered growth inhibition caused by Hfq-overproduction. Other ansamycin family antibiotics also recovered growth inhibition. Western blotting analysis showed that expression levels of Hfq were lowered upon rifampicin treatment. In rifampicin-resistant rpoB mutants, ansamycin family antibiotics did not recover growth inhibition. These results suggest that ansamycin family antibiotics recover growth inhibition by decreasing expression levels of Hfq via RNA polymerase.

研究分野：農学

キーワード：抗生物質 RNA代謝 Hfq

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症において、細菌の進化と新しい抗生物質の開発はイタチゴッコが続いている。2010年に既存の薬剤が効かない New Delhi metallo-β-lactamase (NDM-1) 産生多剤耐性菌の感染が日本においても確認され、2013年には NDM-1 と OXA-181 型 Carbapenemase 等を同時に産生する広範囲抗菌薬耐性株が海外より来日した患者から検出された。また、1996年から1997年にかけて発生件数が増加に転じ、「再興感染症」とされている結核においても、多剤耐性結核菌の出現が問題となっている。このような問題に対抗する戦略の一つは、新規標的を有する薬剤の開発であろう。

一方、細菌の遺伝子発現の調節は、mRNAの合成量とタンパク質の合成量がほぼ比例することから、転写レベルでの制御機構について重点的に解析が行われてきた。1998年に Fire らにより線虫の転写後遺伝子サイレンシングに二本鎖 RNA が関与する RNA interference (RNAi) という現象が報告され、small RNA による遺伝子発現制御が注目されることとなった。大腸菌においても2000年に RNAi と同等の現象が報告されたのを契機として、細菌においても RNA の転写から翻訳開始にいたる一連の RNA 代謝反応の重要性が認識されるようになってきた。

2. 研究の目的

我々は、RNA シャペロンである Hfq タンパク質により発現が制御されているタンパク質を見出した (Wachi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999; Takada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999)。Hfq タンパク質の過剰発現は FtsZ タンパク質の合成低下を引き起こし、細胞分裂を阻害する (Takada et al., Genes Cells., 2005)。この分裂阻害を指標としたスクリーニング系を構築し、既知の薬剤を用いて探索を行った結果、Rifampicin が濃度依存的に生育を回復することを見出した (図1)。さらに、土壌分離放線菌の抽出物をスクリーニングしたところ、Streptovaricin C がヒットした。

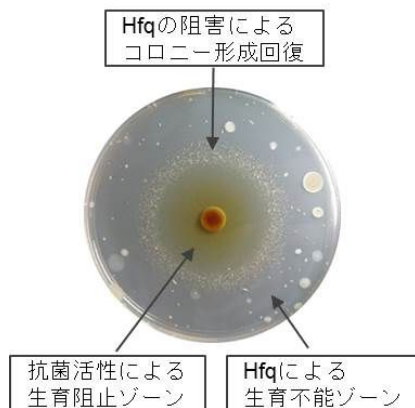


図1 Rifampicin によるコロニー形成回復

これらはともにアンサマイシン系抗生物質であり、RNA ポリメラーゼに直接作用して、RNA 合成の開始反応を阻害する。

そこで、本研究ではアンサマイシン系抗生物質が Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害を解除する機構の解明を目的とした。Hfq タンパク質は病原性に重要な酸耐性機構 Gad システムの発現にも関与しており、本機構の解明は、これまで存在しなかった RNA 代謝反応を標的とした抗菌剤の開発につながる事が期待できる。

3. 研究の方法

Hfq タンパク質は細胞分裂タンパク質 FtsZ の合成低下を引き起こし、細胞分裂を阻害する。この分裂阻害を Rifampicin と Streptovaricin C が解除し、コロニー形成を回復することを見出した。そこで、Rifampicin 以外のアンサマイシン系抗生物質が Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害を解除するか検定を行った。具体的には、Hfq タンパク質の発現を IPTG 誘導可能な菌株 JM109/pHFQ701 を寒天プレートに添加し、寒天上に検定サンプルを染み込ませたる紙を置き、37℃で培養し、サンプルの周辺にコロニー形成が見られるか調べた (図2)。

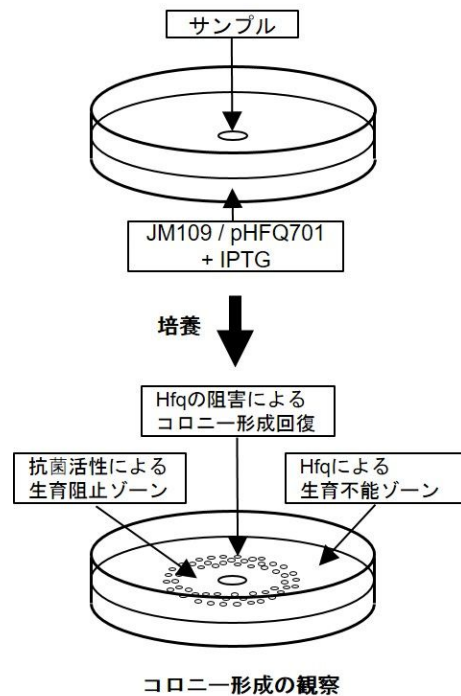


図2 Hfq 阻害剤のスクリーニング

続いて、図2の方法により、非アンサマイシン系の RNA 合成阻害剤について、Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害を解除するか検定した。

また、アンサマイシン系抗生物質による Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害の解除は、Hfq タンパク質の発現を制御している可能性があるため、抗生物質作用時の Hfq および細胞分裂タンパク質 FtsZ の発現状態をウエス

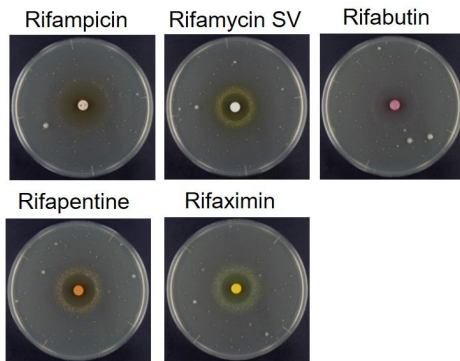
タンプロットングにより確認した。

本スクリーニング系では、アンサマイシン系抗生物質が高頻度でヒットする可能性が考えられたため、RNA ポリメラーゼ サブユニットをコードし Rifampicin に耐性を示す *rpoB* 変異の遺伝的背景において Hfq 過剰発現株を構築し、アンサマイシン系抗生物質を排除できるようにスクリーニング系の改良し、改良したスクリーニング系を用いて土壌分離放線菌サンプルについて探索を行った。

4. 研究成果

Rifampicin 以外のアンサマイシン系抗生物質 (Rifamycin SV, Rifabutin, Rifapentine, Rifaximin) が Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害を解除するか検定した結果、検定した Rifampicin 以外アンサマイシン系抗生物質によりコロニー形成が回復した。一方、非アンサマイシン系の RNA 合成阻害剤 (Actinomycin D, Chlomodomycin A3) はコロニー形成を回復しなかった (図 3)。

A) アンサマイシン系抗生物質



B) 非アンサマイシン系 RNA 合成阻害剤

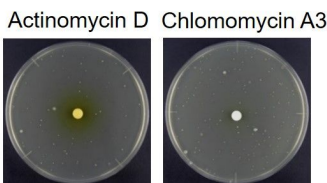


図 3 アンサマイシン系抗生物質によるコロニー形成回復

また、アンサマイシン系抗生物質 (Rifampicin) による Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害の解除は、Hfq タンパク質の発現を制御している可能性がある。抗生物質作用時の Hfq タンパク質および細胞分裂タンパク質 FtsZ の発現状態をウエスタンブロットングにより確認した結果、コロニー形成の回復がみられる濃度において、Hfq タンパク質の発現が減少していた。したがって、アンサマイシン系抗生物質は Hfq タンパク質の発現を抑制することにより、細胞分裂タンパク質 FtsZ の合成を上昇させ、コロニー形成を回復すると考えられた。

アンサマイシン系抗生物質は RNA ポリメラ

ーゼに直接作用して、RNA 合成の開始反応を阻害する。そこで、RNA ポリメラーゼ サブユニットをコードし Rifampicin に耐性を示す *rpoB* 変異の遺伝的背景において Hfq 過剰発現株を構築した。その結果、構築した *rpoB* 変異株においても、Hfq 過剰発現による細胞分裂阻害が引き起こされたが、コロニー形成の回復は見られず、細胞分裂阻害は解除されなかった (図 4)。これより、新たに構築した Rifampicin 耐性の *rpoB* 変異株を用いたスクリーニング系はアンサマイシン系抗生物質を排除できると思われる。

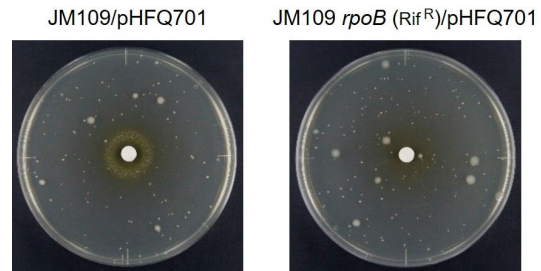


図 4 スクリーニング系における *rpoB* 変異の効果

改良したアッセイ系を用いて、土壌分離放線菌サンプルについて、RNA 代謝阻害剤のスクリーニングを開始したが、これまでのところ新規抗生物質は得られていない。

また、構築した Hfq タンパク質を過剰発現した *rpoB* 変異株において、Hfq タンパク質の発現状態をウエスタン解析により調べた結果、Rifampicin の添加による Hfq タンパク質の量的な変化はみられなかった。したがって、アンサマイシン系抗生物質は RNA ポリメラーゼを介して Hfq 過剰発現を抑制し、細胞分裂阻害を解除することが示唆された。更に、RNA ポリメラーゼ機能と Hfq タンパク質発現量のバランスにより細胞分裂阻害が解除されるという予備的な知見が得られた。このバランスを詳細に解明することにより、RNA 代謝を標的とするより高機能な薬剤の開発が期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Akihiro Matsutani and Ayako Takada, Single-cell isolation and size-sieving for microbial analysis using microenclosure array, Sensor and Materials, Vol.27, No.5, 2015, 383-390, 査読有
<https://doi.org/10.18494/SAM.2015.1100>

Akihiro Matsutani and Ayako Takada, Microchannel-free collection and single-cell isolation of yeast cells in a suspension using liquid standing wave, Jpn. J. Appl. Phys., Vol.55, 2016, 118006-1-4, 査読有

DOI:10.7567/JJAP.55.118006
Xinyue Chen, Rouzu Zhang, Ayako Takada,
Shun Iwatani, Chiemi Oka, Toshitaka
Kitamoto and Susumu Kajiwara, The role
of *Bgl2p* in the transition to
filamentous cells during biofilm
formation by *Candida albicans*, *Mycoses*,
Vol.60, No.2, 2016,96-103, 査読有
DOI:10.1111/myc.12554
Natalia Maria Theresia, Kohei Aida,
Ayako Takada, Noritaka Iwai and Masaaki
Wachi, Effects of EGTA on cell surface
structures of *Corynebacterium
glutamicum*, *Arch. Microbiol.*, Vol.200,
No.2, 2018, 281-289, 査読有
DOI:10.1007/s00203-017-1445-3
Akihiro Matsutani and Ayako Takada,
Celluloid Microenclosure and Microlens
Array Fabricated by SUMP method and XeF₂
Vapor Etching for Microbial Analysis,
Sensors and Materials, Vol.30, No.1,
2018, 149-155, 査読有
<https://doi.org/10.18494/SAM.2018.1729>

〔学会発表〕(計 1 1 件)

松谷 晃宏、高田 綾子、液体定常波を利用
した酵母細胞の流路レス凝集パターン形
成における励振波形の効果、第 76 回応用
物理学会秋季学術講演会、2015 年 9 月 15
日、名古屋国際会議場(愛知)
高田 綾子、和地 正明、Hfq が関わる RNA
代謝を標的とした新規薬剤の探索、第 67
回日本生物工学会大会、2015 年 10 月 28
日、城山観光ホテル(鹿児島)
松谷 晃宏、高田 綾子、タッピングによる
酵母細胞の流路レス凝集パターン形成と
単一細胞分離、第 7 回集積化 MEMS シンポ
ジウム、2015 年 10 月 28 日、朱鷺メッセ
(新潟)
松谷 晃宏、高田 綾子、液体定在波を利用
した微生物細胞の流路レス凝集法におけ
るマイクロ困いアレイを用いた大きさ
による篩い分けと単一分離、第 63 回応用物
理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 21 日、
東京工業大学(東京)
Akihiro Matsutani and Ayako Takada,
Single-cell isolation of *S. Cerevisiae*
using celluloid microenclosure array
formed by the SUMP method, 29th
International Microprocesses and
Nanotechnology Conference (MNC 2016),
2016 年 9 月 10 日、ANA Crowne Plaza Kyoto
(京都)
松谷 晃宏、高田 綾子、スンプ法により形
成したセルロイド製単一細胞分離用プレ
ートによる酵母細胞の分離、第 77 回応用
物理学会秋季学術講演会、2016 年 9 月 14
日、朱鷺メッセ(新潟)
松谷 晃宏、高田 綾子、XeF₂ 気相エッチン

グとスンプ法によるセルロイドマイクロ
レンズアレイの製作、第 64 回応用物理学
会春季学術講演会、2017 年 3 月 15 日、パ
シフィコ横浜(神奈川)
Ayako Takada and Masaaki Wachi, A new
screening system for compounds
targeting HFQ-mediated RNA metabolism,
International Union of Microbiological
Societies 2017, 2017 年 6 月 17 日、Sand
Expo and Convention Centre (Singapore)
松谷 晃宏、高田 綾子、XeF₂ 気相エッチン
グとスンプ法により製作したセルロイド
マイクロレンズによる酵母細胞の捕獲実
験、第 78 回応用物理学会秋季学術講演会、
2017 年 9 月 5 日、福岡国際会議場(福岡)
Akihiro Matsutani and Ayako Takada,
Profile control in Si etching by
two-step etching process using XeF₂
vapor for fabrication of concave
micromirror, The 39th International
Symposium on Dry Process (DPS2017), 2017
年 11 月 17 日、東京工業大学(東京)
高田 綾子、和地 正明、Hfq が関わる RNA
代謝を標的とした新規薬剤の探索、日本農
芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17
日、名城大学(愛知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 綾子 (TAKADA, Ayako)
東京工業大学 技術部・技術専門員
研究者番号: 20401565

(2) 連携研究者

和地 正明 (WACHI, Masaaki)
東京工業大学 生命理工学院・教授
研究者番号: 90192822