

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08341

研究課題名(和文)細菌型チロシンキナーゼを標的とした革新的抗菌薬の開発研究

研究課題名(英文)Development of innovative antibacterial drugs targeting bacterial tyrosine kinases

研究代表者

深澤 秀輔 (Fukazawa, Hidesuke)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・主任研究官

研究者番号：10218878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌には真核生物プロテインキナーゼとは類似性がないチロシンキナーゼが存在する。その機能は明らかでない事も多いが、莢膜多糖の生合成や輸送に重要な役割を果たし、病原性と深く関わっていることから、その阻害剤は新しい抗菌薬になると期待される。本研究では黄色ブドウ球菌のチロシンキナーゼをヒト培養細胞株に発現させ、活性の検出に成功した。触媒サブユニット、調節サブユニットそれぞれに蛍光タンパクタグを付加し、両サブユニットの相互作用の可視化にも成功。相互作用とキナーゼ活性化が強く関連することを明らかにした。種々変異体を作製し、酵素活性、相互作用に重要な部位を特定した。また阻害剤スクリーニング系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌にもチロシンリン酸化酵素は存在し、病原性と深く関わっているが、真核生物のプロテインキナーゼとは類似性がなく、その阻害剤は選択性の高い新しい抗菌薬になることが期待されている。しかし簡便な測定法がなく、阻害剤開発は進んでいない。本研究では黄色ブドウ球菌のチロシンキナーゼをヒト培養細胞株に発現させ、酵素活性の検出と触媒-調節サブユニット間相互作用の可視化に成功した。この方法は従来法よりもはるかに簡便に酵素学的性質の解析や阻害剤探索を行うことが可能であり、新規抗菌物質の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacteria have tyrosine kinases that have no similarities to eukaryotic protein kinases. Although the functions of bacterial tyrosine kinases have not been fully revealed, their inhibitors are expected to become new antibacterial drugs because bacterial tyrosine kinases play essential roles in biosynthesis and transport of capsular polysaccharide and are closely related to pathogenicity. In this study, we successfully expressed active *S. aureus* tyrosine kinase in a human cell line. By fusing fluorescent protein tags to each of the catalytic subunit and regulatory subunit, we succeeded in visualizing the interaction between both subunits and revealed that the interaction and the kinase activation are strongly correlated. Various mutants were prepared, and sites important for enzyme activity and interaction were identified. We also established an inhibitor screening system for bacterial tyrosine kinases.

研究分野：生化学

キーワード：チロシンキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化-脱リン酸化による機能調節は、生物に普遍的かつ重要な機構であり、シグナル伝達や代謝の多くはタンパク質の可逆的リン酸化により制御されている。長い間、真核生物と原核生物のリン酸化システムは異なっていると考えられていた。すなわち、真核生物ではセリン・スレオニンおよびチロシンキナーゼが、原核生物では構造の異なる two-component system のヒスチジンキナーゼがタンパク質のリン酸化を行っていると思われていた。しかしその後セリン・スレオニンキナーゼは原核生物にも広く存在すること、またヒスチジンキナーゼは一部の真核生物にもあることが明らかにされた。チロシンリン酸化だけは多細胞生物にのみに存在する制御機構と考えられてきたが(現在でも一般的にはそう思われている)解析技術の進歩により細菌にもリン酸化チロシンが検出され、そのリン酸化を担うチロシンキナーゼも発見された。

細菌のセリン・スレオニンキナーゼが、いわゆる 11 Hanks motifs を持つ真核生物型であるのに対し、今までに見つかっている細菌のチロシンキナーゼは真核生物のキナーゼとは構造が異なっている。細菌のチロシンキナーゼの全貌はまだ明らかではないが、現在まで最も研究されているのは、BY-kinase(Bacterial tyrosine-kinase)と呼ばれるファミリーである。このファミリーのメンバーは Walker motif 様の配列を持つなど、キナーゼよりもむしろ ATPase に近く、また C 末端近くに自己リン酸化部位であるチロシンクラスターが存在することが特徴であり、真核生物のチロシンキナーゼとは進化的に起源を異にすると推測される。BY-kinase は、さらにグラム陰性菌型とグラム陽性菌型に大きく分類され、グラム陰性菌では、同一タンパク質内にキナーゼ領域と活性調節領域が存在するが、グラム陽性菌では別々のサブユニットに分かれている。細菌におけるチロシンリン酸化の意義は未だ明らかでないことが多いが、BY-kinase は多糖の合成や運搬、莢膜合成に関与していることが報告されている。欠失株の解析から、BY-kinase の阻害剤には、病原性低下、薬剤感受性増強、バイオフィーム形成阻止等の作用が期待される。

結核菌などマイコバクテリウム属には他の細菌のものとは相同性のない "odd tyrosine kinase" が存在し、貪食細胞内での生存・増殖、ひいては病原性の発現に関わっていると考えられている。また最近の phosphoproteome 解析によると、大腸菌のリン酸化チロシン含量は、哺乳動物細胞よりも実は多く、さらに既知 BY-kinase を欠失させてもリン酸化チロシンは残存することから、BY-kinase 以外のまだ未知のチロシンキナーゼが存在することが示唆されている。細菌のチロシンリン酸化については、まだまだ解明すべき事が多く残っている。

2. 研究の目的

抗生物質は 20 世紀最大の発明の 1 つとされ、人類は細菌感染症の恐怖から完全に解放されるものと思われた。しかし使用を開始してすぐに耐性菌が出現、以来耐性菌に対する新しい抗生物質を開発してはまた新しい耐性菌が出現する、といういたちごっこが続いている。近年抗生物質の濫用によりほとんどの薬剤が効かない多剤耐性菌が出現、高齢化や医療の高度化による易感染者の増加もあり、大きな問題となっている。新しい抗菌薬、感染制御薬が強くとめられているが、製薬企業はブロックバスターになることが期待できない抗菌薬の開発研究にはあまり積極的ではない。またほとんどは既存薬の改良であり、完全に新規な作用機序を持つ抗菌薬は、2000 年に 35 年ぶりに承認されたりネゾリドが最後である。つまり約半世紀で 1 つしか出ていない。耐性菌対策は手詰まりの感がある。

我々は細菌型チロシンキナーゼ (bacterial tyrosine kinases; BY-kinases) が新しい薬剤標的となる可能性があると考えている。一般的にはあまり知られていないが、真核生物ほど数は多くないものの、細菌にもチロシンキナーゼが存在する。細菌のチロシンキナーゼの特徴は、真核生物のプロテインキナーゼとは類似性がなく、構造が全く異なることである。そのため、その阻害剤は細菌に選択的に作用する、新規作用機序を持つ抗菌薬となることが期待される。細菌のチロシンキナーゼの機能は多岐にわたり、未だ明らかではないことも多いが、一部は多糖類の生合成、輸送に関与している。現在までの報告から、細菌のチロシンキナーゼを阻害すると、病原性低下、薬剤感受性の増強、バイオフィーム形成の阻害等が期待される。しかし簡便な活性の検出方法、評価系がまだ確立されておらず、細菌型チロシンキナーゼの阻害物質はまだ知られていない。

従来 BY-kinase は、タンパクを大腸菌に発現させて精製を行い、精製した酵素と放射標識 ATP を用いて測定されてきた。このキナーゼアッセイは王道であるが、煩雑であり労力を要し、多数の検体を評価するスクリーニングには適していない。BY-kinase は新しい作用機序を持つ抗菌薬、感染制御薬の有力な標的の一つと考えられているものの、阻害剤開発研究は停滞している。その最大の理由は実用的な活性評価系、阻害剤探索系がないことである。本研究では、まず黄色ブドウ球菌由来のチロシンキナーゼをヒト培養細胞で発現させ、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットによるキナーゼ活性の検出を試みる。キナーゼ活性が確認できれば、付加するタグ、トランスフェクトする DNA 量、培養時間、サンプル処理時間等、cell-based ELISA のための至適条件を検討し、阻害剤評価系を確立して、スクリーニングを実施する。活性物質が得られれば、その作用を解析し、細菌のチロシンキナーゼの阻害剤が新規作用機序を持つ抗菌薬となり得るかを検討する。さらにグラム陰性菌、マイコバクテリウム由来のチロシンキナーゼをクローニングし、同様の検討を行い、細菌型チロシンキナーゼ阻害剤の抗菌薬、抗結核薬としての可能性を追求する。

3. 研究の方法

我々はヒトのチロシンキナーゼの cell-based ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 系を確立し、化合物の活性評価を行っている。この系ではヒト培養細胞株 (HEK293T 細胞) にチロシンキナーゼを一過性に発現させ、試験物質で処理した後、細胞をプレートに固定し、細胞内のリン酸化チロシンレベルを抗ホスホチロシン抗体を用いて測定する。実際に 1500 以上の化合物の種々のチロシンキナーゼに対する阻害活性評価を行った。この系は原理的には全てのチロシンキナーゼに適用可能で、精製キナーゼも外部基質も不要であり、反応条件を酵素毎に検討する必要もなく、多数のチロシンキナーゼに対する阻害剤の影響を同一の条件で評価できる。現在当方では 50 種類以上のヒトチロシンキナーゼの阻害活性評価が可能である。

この cell-based ELISA 系は、細菌のチロシンキナーゼの阻害剤評価系にも応用できるのではないかと考え、黄色ブドウ球菌のチロシンキナーゼとその調節サブユニットをクローニングし、種々のタグを付加して、HEK293T 細胞にトランスフェクトした。黄色ブドウ球菌チロシンキナーゼに対する抗体を作製してタンパクの発現を確認し、抗リン酸化チロシン抗体を用いて細胞内のリン酸化チロシンレベルの変化を観察して、黄色ブドウ球菌のチロシンキナーゼが動物細胞内でもチロシンキナーゼとして機能するかどうかを調べた。キナーゼ活性が確認できたので cell-based ELISA の条件を検討し、阻害剤探索を開始した。種々の変異体を作製し、キナーゼ活性、サブユニット間の相互作用に重要な残基、領域を特定した。

4. 研究成果

黄色ブドウ球菌のゲノムには 2 つの BY-kinase 触媒サブユニット CapB1 と CapB2 と、2 つ調節サブユニット CapA1 と CapA2 が存在する。CapB1 と CapB2 の間には 70%以上の相同性があるが、キナーゼ活性があるのは CapB2 のみで CapB1 はキナーゼとしては不活性であることが報告されている。また CapA2 の方が CapA1 よりも CapB2 活性化能が高いことも報告されている。これら 4 つの遺伝子をクローニングし、CapB2 の全長と CapA1 の活性化領域 (C 末の細胞質部分 29 アミノ酸) を融合させた。CapA1-C 末/CapB2 に様々なタグを付加して HEK293T 細胞に発現させ、抗 CapB2 抗体と抗リン酸化チロシン抗体によるイムノプロット解析を行った。30 種類以上のタグを試した結果、N 末に蛍光タンパクタグを付加すると、HEK293T 細胞内で発現し、チロシンリン酸化されることが判明した。CapB2 の Walker motif 中の ATP 結合リジンを変異させるとリン酸化は消失することから、チロシンリン酸化は HEK293T 細胞のキナーゼではなく、CapB2 自身のキナーゼ活性に由来すると考えられた。

CapA1、CapB2 をそれぞれ全長で、別々の蛍光タンパクを N 末に付加して HEK293T 細胞に発現させると、単独発現では CapA1 は細胞膜、CapB2 は細胞質に局在した。共発現させると CapB2 は膜に移行、CapA1 と局在が一致し、両者の相互作用を可視化することができた。また、CapA1 と共発現させると、キナーゼである CapB2 はタンパク量は変わらなかったが、チロシンリン酸化レベルが上昇した。キナーゼ活性化部位とされる CapA1 の C 末細胞質領域を欠失させると CapB2 は膜移行せず、チロシンリン酸化レベルも上昇しなかったことから、CapB2 は CapA1 の C 末端部分と結合し、活性化されることが確認された。CapA1 全長ではなく、C 末端細胞質の 29 アミノ酸に蛍光タンパクと膜移行シグナルを付加して、CapB2 と共発現させても CapB2 は膜に移行した。この時 CapB2 のキナーゼ活性は著しく上昇し、CapA1 全長との共発現や、CapA1-C 末/CapB2 融合タンパクよりもはるかに強いリン酸化チロシンシグナルが検出された。

つまり、バクテリアにおける BY-kinase 触媒サブユニットと調節サブユニット C 末細胞質領域との相互作用、それに引き続いて起こるキナーゼ活性化の過程を動物細胞で再構成することが可能となった。CapA、CapB の種々の変異体を作製し、相互作用に重要な部位を特定し、両サブユニットの相互作用とキナーゼ活性化が強く相関することを確認した。さらに従来不活性だと思われていた CapB1 にもキナーゼ活性があること、CapA1 のキナーゼ活性化能は実は CapA2 とほぼ同等であることなど、従来の報告とは異なる新しい知見が得られた。

また真核生物チロシンキナーゼは特定の基質の特定のチロシン残基しかリン酸化しないが、黄色ブドウ球菌チロシンキナーゼは基質特異性が低く、通常はリン酸化されない GFP 等の蛍光タンパクもチロシンリン酸化することを見いだした。

本研究は細菌のタンパクをヒト細胞に異種性発現させるため、細菌内での実際の生理的役割を調べるには不向きであるかもしれないが、利点も多い。通常のヒト培養細胞をマイクロタイタープレートに播種し、細菌タンパク質の発現プラスミドをトランスフェクトすることで種々の解析が可能であり、遺伝子を欠失させたり、変異体を発現させた、特別な細菌株または哺乳動物細胞株を樹立する必要はない。ヒト培養細胞は細菌よりはるかに大きく、発現させたタンパクの観察が容易である。蛍光顕微鏡の観察は、BY-kinase サブユニット間相互作用の解析に用いられてきた two-hybrid 法や免疫沈降法より、簡便であり信頼できる。タンパクを精製する必要がないため、多くの変異体を扱うことが可能であり、キナーゼ活性、サブユニット間相互作用に重要な領域の解析には絶大な威力を発揮する。我々は数十種類の変異体を作製し、それらの性質を調べたが、同様のことを従来のように、個々のタンパクを精製して放射標識 ATP を用いて解析することは多大な労力を要し、現実には不可能である。

黄色ブドウ球菌以外にも、肺炎球菌より 1 種、枯草菌より 2 種の触媒サブユニット-調節サブユニットペアをクローニングし、HEK293T 細胞に発現させた。その結果、今までキナーゼ活性が

確認されていなかったタンパクも、実際にキナーゼであることを初めて明らかにできた。意外なことに、異なる細菌由来の触媒サブユニットと調節サブユニットを共発現させても多くの場合、両サブユニットの相互作用とチロシンリン酸化が観察され、BY-kinase 活性化機構はグラム陽性菌間である程度共通していることが示唆された。同一タンパク質内にキナーゼ領域と活性調節領域が存在するグラム陰性菌型の BY-kinase についても、大腸菌の 2 種類のキナーゼの動物細胞での活性発現に成功した。さらに BY-kinase ファミリーとは相同性のない結核菌のチロシンキナーゼのクローニングも行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukazawa, H., Fukuyama, M., Miyazaki, Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression of Active Staphylococcus aureus Tyrosine Kinases in a Human Cell Line.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 411-416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukazawa, H., Fukuyama, M., Miyazaki, Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Reconstitution of Bacterial Tyrosine Kinase-Modulator Interaction in a Human Cell Line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 28-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤 秀輔
2. 発表標題 ヒト培養細胞株を用いた黄色ブドウ菌チロシンキナーゼの解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深澤 秀輔
2. 発表標題 ヒト培養細胞株を用いた細菌型チロシンキナーゼの発現解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----