

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02084

研究課題名(和文)ヘム鉄獲得システムを阻害する人工金属蛋白による緑膿菌の新規殺菌法開発

研究課題名(英文)Development of a novel sterilization method of *Pseudomonas aeruginosa* by artificial heme acquisition proteins that inhibit its heme acquisition

研究代表者

庄司 長三 (Shoji, Osami)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：90379587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：強い薬剤抵抗性を持ち、多剤耐性化しやすく、院内感染の主要な原因菌となっている緑膿菌が鉄欠乏状態で分泌するヘム鉄獲得蛋白質HasAに、ガリウムフタロシアニン捕捉させた人工金属蛋白質を開発した。人工金属蛋白質を緑膿菌に作用させると、10分間の赤色光を照射するだけで99.999%以上の緑膿菌を光殺菌できる、既存の抗生物質とは作用機序が異なる新規殺菌手法である。多剤耐性緑膿菌も殺菌できることを確認するとともに、緑膿菌のみを高選択的に殺菌可能な手法であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑膿菌はヒトに日和見感染する病原菌であり、高い薬剤抵抗性や薬剤耐性化しやすい性質から、既存の抗生物質が効かない薬剤耐性緑膿菌が多く発生している。世界保健機関(WHO)は最も危険な薬剤耐性菌の1種としてカルバペネム系抗生物質に耐性化した緑膿菌をあげており、従来の抗菌薬とは作用機序が異なり耐性化されにくい、緑膿菌感染症の新たな治療法開発が強く望まれている。本研究では、日和見感染菌の緑膿菌を標的とし、合成金属錯体を内包させた人工金属蛋白質を構築し、従来の抗菌薬とは全く異なる作用機序の緑膿菌高選択的な光殺菌法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Pseudomonas aeruginosa, one of the more notorious opportunistic human pathogens, which has been classed with the highest priority level of "critical" by the World Health Organization (WHO). We demonstrated that bacterial heme transport systems can be exploited for the delivery of antimicrobials to the intracellular space of target bacteria with high specificity. We demonstrated that, analogous to heme uptake, HasA can specifically traffic an antimicrobial, gallium phthalocyanine (GaPc), into the intracellular space of Pseudomonas aeruginosa the interaction of HasA with its outer membrane receptor HasR. HasA enables water-insoluble GaPc to be mistakenly acquired by Pseudomonas aeruginosa, permitting its sterilization (>99.99%) by irradiation with near-infrared (NIR) light, irrespective of antibiotic resistance. This specific route of antimicrobial transport enables the efficient sterilization of P. aeruginosa, including its multidrug-resistant strains (MDRP).

研究分野：生物無機化学

キーワード：ヘム獲得蛋白質 緑膿菌 ポルフィリン フタロシアニン 光殺菌 増感剤 多剤耐性菌 結晶 構造解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は、日和見感染を引き起こすグラム陰性菌で、強い薬剤抵抗性を持ち、多剤耐性化しやすく、院内感染の主要な原因菌となっている。発症率が極めて高く（白人の乳児の2~3千人に1人）、呼吸困難や細菌感染症により成人に達するまでに多くの患者が亡くなる常染色体劣勢遺伝の「嚢胞性線維症」では、緑膿菌の呼吸器感染治療が特に重要となっている。緑膿菌は、鉄欠乏状態になるとヘム獲得蛋白質(HasA)を分泌し、鉄源としてのヘムを宿主から獲得するシステムを作動させる。HasAは、菌体外でヘモグロビンなどのヘム蛋白質からヘムを獲得し、緑膿菌外膜の特異的受容体のHasRにヘムを受け渡す役割を持つ。HasAを介するヘム獲得を阻害することができれば、緑膿菌の鉄獲得経路の一つを遮断することができる。また、HasAに合成金属錯体を取り込ませて緑膿菌にヘムとは異なる金属錯体を積極的にとりこませることにより、緑膿菌を殺菌できると考えられる。例えば、光照射によって一重項酸素を発生させる金属錯体を取り込ませることで、緑膿菌を選択的に死滅させることも可能となる。また、金属錯体に抗菌薬を連結して、「トロイの木馬」の手法によって緑膿菌に抗菌薬を取り込ませることができれば、鉄獲得の遮断との相乗効果が期待できる。これまで、ヘム以外の金属錯体を取り込ませたHasAを利用する緑膿菌の殺菌を視野に入れた研究を進め、HasAがヘムとは構造の異なる骨格の合成金属錯体と複合体を形成することを、結晶構造解析により明らかにするとともに、鉄フタロシアニンや鉄ジフェニルポルフィリンとその誘導体を取り込ませたHasAを作用させるとヘムの獲得が阻害されることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

日和見感染を引き起こす緑膿菌をはじめとするグラム陰性菌の鉄獲得システムは、その作用機序の理解および鉄獲得阻害による殺菌への応用を視野に入れた研究が報告されているが、ヘムとは構造が大きく異なる合成金属錯体とヘム獲得蛋白との相互作用や取り込みに関しては我々の研究成果以外にはほとんど報告がない。本研究では、合成金属錯体を取り込ませたHasAによるヘム鉄獲得阻害、光照射殺菌、そして抗菌薬修飾を組み合わせることによる緑膿菌殺菌システムを開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

大腸菌を宿主とする蛋白質の過剰発現系によって、ヘム獲得蛋白質(HasA)を発現し、各種カラムクロマトグラフィーによって精製し、単離した。結晶化には、さらにイオン交換クロマトグラフィーによって高度に精製した蛋白質を用いた。X線結晶構造解析は、SPring-8のビームラインBL26B1/B2によって行った。緑膿菌の増殖阻害は、緑膿菌培養液の濁度測定によって評価し、合成金属錯体を取り込ませたHasAとヘムを取り込ませた通常のHasAを同時に加えることにより、ヘム獲得阻害との関連を調べた。緑膿菌の光殺菌は、人工金属酵素を作用させたあとに、緑膿菌に対して赤色光を照射し、照射後の菌体をプレートに塗布して培養し、コロニー形成数より殺菌率を算出した。合成金属錯体の取り込みは、蛍光顕微鏡観察によって、緑膿菌に取り込まれた合成金属錯体の蛍光により評価した。緑膿菌の生死判定は、SYTO-9(全細胞染色)とPropidium Iodide(死菌のみ染色)により二重染色した緑膿菌の蛍光顕微鏡観察でも行い、蛍光が緑色から橙色に変化した場合に、近赤外光の照射によって緑膿菌が死滅していると判断した。緑膿菌によるガリウムフタロシアニンの取り込みの機構を詳しく調べるため、蛍光分子のフルオレセインを化学修飾したHasA(FL-HasA)を作成した。FL-HasAは、ガリウムフタロシアニンが内包されている場合、FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)によりフルオレセインの蛍光が消光するように設計し、ガリウムフタロシアニンを内包したFL-HasA(FL-GaPc-HasA)を緑膿菌に直接作用させることにより、HasRを介してガリウムフタロシアニンが緑膿菌に取り込まれる様子をガリウムフタロシアニンの放出に伴うフルオレセインの蛍光回復として検出した。

4. 研究成果

HasAがヘムとは構造の異なる骨格の合成金属錯体と複合体を形成することを、結晶構造解析により明らかにするとともに、鉄フタロシアニンや鉄ジフェニルポルフィリンとその誘導体を取り込ませた「偽のHasA」を作用させるとヘムの獲得が阻害されることを明らかにした。合成金属錯体を内包させた「偽のHasA」を用いて、緑膿菌のヘム獲得を阻害する新たな緑膿菌の増殖抑制法を確立したが、緑膿菌の増殖を一時的に止める静菌的な効果のみを發揮し、殺菌的な作用はない。鉄フタロシアニンの代わりに非消光性のガリウムフタロシアニンをHasAと複合化して、鉄欠乏状態で培養した緑膿菌の培養液に添加したのち、可視光(680nm)を照射することにより緑膿菌を殺菌できることを見出した。10分間の可視光照射で99.999%の緑膿菌を殺菌できることを確認した。蛍光顕微鏡観察により、ガリウムフタロシアニンが緑膿菌に取り込まれていることを確認した。菌体内に取り込まれたガリウムフタロシアニンが可視光照射により励起され、一重項酸素が生成し緑膿菌を死に至らしめたと考察している。多剤耐性緑膿菌も同様に殺菌できることを確認している。フタロシアニンは生体由来組織への影響が最も少ない650nm-700nmに非常に強い吸収を持つ理想的な光増感剤であり、肺がん、食道がん、子宮頸がんを治療する光線力学療法における第二世代の光増感剤としてその利用が検討されており、肺や食道に感染し

ている難治性の多剤耐性緑膿菌の殺菌法として有効と考えられる。また、殺菌が非常に難しいバイオフィルムを形成した緑膿菌であっても高効率に殺菌することができることも明らかにした。緑膿菌外膜の特異的受容体の HasR を欠損させた緑膿菌に HasA - ガリウムフタロシアニン複合体を作用させたのち、蛍光顕微鏡によりガリウムフタロシアニンの蛍光を観察すると、標準株の緑膿菌のみ蛍光が観測され、HasR を欠損させた緑膿菌では、蛍光は観測できなかった。また、HasR を持たない大腸菌とセラチア菌は光殺菌されないことを確認しており、HasA - ガリウムフタロシアニン複合体を用いる殺菌手法は、緑膿菌のみを高選択的に殺菌可能な手法であることを明らかにした。

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 Y. Shisaka, Y. Iwai, S. Yamada, H. Uehara, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, J. K. Stanfield, K. Ogawa, Y. Watanabe, O. Shoji	4. 巻 14(7)
2. 論文標題 Hijacking the Heme Acquisition System of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> for the Delivery of Phthalocyanine as an Antimicrobial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1637-1642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.9b00373	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 E. Sakakibara, Y. Shisaka, H. Onoda, D. Koga, N. Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji	4. 巻 9(32)
2. 論文標題 Highly malleable haem-binding site of the haemoprotein HasA permits stable accommodation of bulky tetraphenylporphycenes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 18697-18702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9RA02872B	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28件（うち招待講演 1件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Y. Shisaka, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji
2. 発表標題 Specific Photosterilization of <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> Exploiting Its Heme Acquisition System
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 E. Sakakibara, Y. Shisaka, D. Koga, X. Xu, T. Ono, Y. Hisaeda, H. Sugimoto, Y. Watanabe, O. Shoji
2. 発表標題 Construction of Hemoprotein HasA Incorporating Bulky Metal Complexes
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 四坂勇磨、岩井佑介、山田志歩、菅舎武彦、杉本宏、城宜嗣、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 緑膿菌のヘム獲得機構を標的とする薬剤輸送システムの開発
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 四坂勇磨、菅舎武彦、杉本宏、城宜嗣、小川和也、荘司長三
2. 発表標題 合成金属錯体による緑膿菌のヘム獲得蛋白質HasAの機能化
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 四坂勇磨、杉本宏、荘司長三
2. 発表標題 合成ポルフィリンを内包させたヘム蛋白質の超高分解能X線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会 令和元年(2019年)度年会および会員総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 四坂勇磨、荘司長三
2. 発表標題 「トロイの木馬的」戦略による緑膿菌の高選択的光殺菌
3. 学会等名 第54回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、古賀大貴、徐寧、小野利和、久枝良雄、杉本宏、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 新規反応場構築を指向した金属錯体と蛋白質の複合化
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、古賀大貴、徐寧、小野利和、久枝良雄、杉本宏、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 高い金属錯体を捕捉したヘム蛋白質 (HasA) の創製
3. 学会等名 錯体化学会第69回討論会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、古賀大貴、徐寧、小野利和、久枝良雄、杉本宏、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 新規機能の創造を指向したヘム蛋白質 (HasA) と高い金属錯体の複合化
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会(2020)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 上田我竜、四坂勇磨、榊原えりか、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 ポルフィリンオリゴマーへの配位を利用したヘム獲得タンパク質HasAの多量体構築
3. 学会等名 第32回生物無機化学夏季セミナー
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 上田我竜、四坂勇磨、榊原えりか、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 ポルフィリンオリゴマーを基盤としたヘム獲得タンパク質 HasAの多量体構築
3. 学会等名 錯体化学会第69回討論会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 上田我竜、四坂勇磨、榊原えりか、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 ヘム蛋白質HasAのメソ置換ポルフィリン補足能を利用したHasA多量体構築
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 上田我竜、四坂勇磨、榊原えりか、荘司長三
2. 発表標題 剛直なポルフィリンオリゴマーによるヘム獲得タンパク質HasAの多量化
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会(2020)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 O. Shoji, Y. Shisaka, H. Uehara, T. Nishimura, Y. Miyake, H. Shinokubo, H. Sugimoto, Y. Shiroe, Y. Watanabe
2. 発表標題 Heme Acquisition Protein HasA with 5,15-Diphenylporphyrin and Its Derivatives as an Artificial Prosthetic Group
3. 学会等名 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 O. Shoji, H. Uehara, Y. Shisaka, T. Nishimura, Y. Miyake, H. Shinokubo, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe
2 . 発表標題 Heme Acquisition Protein HasA with Metal-Phthalocyanine and 5,15-DiphenylporphyrinDerivatives as an Artificial Prosthetic Group
3 . 学会等名 Tenth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10) (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Y. Shisaka, Y. Iwai, S.Yamada, T. Tosha, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji
2 . 発表標題 Selective Sterilization of Pseudomonas aeruginosa Utilizing Phthalocyanine Captured by the Heme-Acquisition Protein HasA
3 . 学会等名 Tenth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 M. Otake, Y. Shisaka, S. Yamada, O. Shoji, Y. Watanabe
2 . 発表標題 PHOTO-STERILIZATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN BIOFILM UTILIZING ITS HEME ACQUISITION SYSTEM
3 . 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 E. Sakakiara, Y. Shisaka, O. Shoji, H. Sugimoto, Y. Watanabe
2 . 発表標題 Incorporation of Synthetic Metal Complexes into Heme Acquisition Proteins of Pseudomonas aeruginosa
3 . 学会等名 Tenth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 O. Shoji, Y. Shisaka, H. Uehara, S. Yamada, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Nishimura, H. Shinokubo, Y. Miyake, Y. Watanabe
2. 発表標題 Heme Acquisition Protein HasA with Synthetic Metal Complexes as an Artificial Prosthetic Group
3. 学会等名 The 68th Conference of Japan Society of Coordination Chemistry
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Shisaka, Y. Iwai, S. Yamada, T. Tosya, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji
2. 発表標題 Selective Sterilization of Pseudomonas aeruginosa Utilizing its extracellular heme acquisition protein with gallium-phthalocyanine
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 四坂勇磨、岩井佑介、山田志歩、當舎武彦、杉本宏、城宜嗣、渡辺芳人、莊司長三
2. 発表標題 緑膿菌が分泌するヘム蛋白質HasAを利用した緑膿菌選択的な殺菌手法の開発
3. 学会等名 第8回『企業と博士人材の交流会』
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四坂勇磨、岩井佑介、山田志歩、當舎武彦、杉本宏、城宜嗣、渡辺芳人、莊司長三
2. 発表標題 緑膿菌が分泌するヘム蛋白質HasA を活用した緑膿菌選択的な殺菌
3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大竹 美保、四坂 勇磨、山田 志歩、荘司 長三、渡辺 芳人
2. 発表標題 ヘム獲得系を用いたバイオフィルム形成緑膿菌の光線力学的殺菌
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大竹 美保、四坂 勇磨、山田 志歩、荘司 長三、渡辺 芳人
2. 発表標題 ヘム獲得蛋白質を用いたバイオフィルム形成緑膿菌の光線力学的殺菌
3. 学会等名 第18回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、古賀大貴、徐寧、小野利和、久枝良雄、杉本宏、渡辺芳人、荘司長三
2. 発表標題 高い金属錯体と蛋白質の新規複合体の創出
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、古賀大貴、小野利和、久枝良雄、杉本宏、荘司長三、渡辺芳人
2. 発表標題 高い置換基を有するポルフィセン錯体とヘム蛋白質の複合化
3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、荘司長三、杉本宏、渡辺芳人
2. 発表標題 高い金属錯体と蛋白質の新規複合体の創出
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第30回サマースクール
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榊原えりか、四坂勇磨、荘司長三、杉本宏、渡辺芳人
2. 発表標題 緑膿菌のヘム蛋白質による金属錯体の捕捉
3. 学会等名 第18回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 四坂勇磨、荘司長三	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社協和企画	5. 総ページ数 4
3. 書名 感染症	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------