

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10082

研究課題名(和文) ストレプトコッカスのバイオフィーム形成阻害剤開発に向けた研究

研究課題名(英文) Development of anti-biofilm drugs for streptococcal infection

研究代表者

矢野 貴人 (YANO, Takato)

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：40239827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトコッカス属細菌は口腔内の常在菌であるが、血中に入るとバイオフィーム形成による慢性・難治性感染症を引き起こす。ストレプトコッカス属細菌においてバイオフィーム形成の開始シグナルの産生と細胞外への輸送に関与するタンパク質がComAである。
ストレプトコッカス属細菌の全長ComAタンパク質をコムギ胚芽抽出物を用いたin vitro膜タンパク質発現系により合成した。得られた全長ComAタンパク質のペプチダーゼ活性とATPase活性の測定とそれらの共役を、各々の基質と阻害剤を用いて解析した。また、ペプチダーゼ阻害剤による全長タンパク質に対する阻害活性と細菌のバイオフィーム形成阻害活性を比較した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレプトコッカス属細菌は口腔内の常在菌であるが、血中に侵入すると人工弁・弁膜症患者において感染性心内膜炎を引き起こす。これはバイオフィームによる慢性・難治性感染症の典型例であり、抗生物質による治療は不可能で外科的な弁置換術が必要となる。
ストレプトコッカス属細菌においてバイオフィーム形成の開始シグナルの産生と細胞外への輸送に関与するタンパク質がComAである。したがって、ComAタンパク質はストレプトコッカス属細菌のバイオフィーム形成阻害剤のターゲットとして最適である。本研究はその阻害剤開発を目指したComAタンパク質の解析の第一歩となるものである。

研究成果の概要(英文)：The genus *Streptococcus* is a member of commensal bacteria in oral cavity. However, once in the blood stream, it causes chronic infection by the formation of biofilm, which is resistant to treatments, such as antibiotics. The signal molecule for the initiation of biofilm formation in *Streptococcus* is generated and exported by a membrane protein, ComA. ComA is a multidomain protein comprising peptidase, nucleotide-binding, and transmembrane domains.
The full-length ComA protein was synthesized by wheat-germ in vitro expression system, and the protein could be partially purified by repeated liposome precipitation. The full-length ComA protein thus obtained was confirmed to be enzymatically active, and the cooperation between the peptidase and ATPase activities was analyzed. Further, the IC50 values for the full-length ComA and the peptidase domain and the EC50 value for the biofilm formation of *S. mutans* were compared.

研究分野：生化学

キーワード：バイオフィーム ストレプトコッカス クオラムセンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔内ストレプトコッカス属細菌が形成するバイオフィルムの重要性

口腔内細菌が形成するバイオフィルムは、デンタルプラークとしてう蝕や歯周病の原因となるだけでなく、高齢者の誤嚥性肺炎や糖尿病等の慢性疾患を引き起こすことが知られている。中でもストレプトコッカス属細菌は、特にアジア地域において感染性心内膜炎の起因菌としての頻度が高い。この感染性心内膜炎は、細菌が弁膜表面に固着し、抗生物質や免疫に対して抵抗性を示す、典型的なバイオフィルムによる慢性・難治性感染症である。

(2) バイオフィルムと細菌の Quorum-Sensing System (QSS)

このバイオフィルムの形成開始シグナルとして働いているのが、QSS と呼ばれる細菌の細胞間情報伝達機構である。グラム陽性菌の QSS シグナル分子はペプチドであり、ストレプトコッカス属細菌の QSS シグナル産生・分泌に関与するのが ComA である。分泌されたシグナルは、周囲の同種細菌の受容体に結合し、さまざまな遺伝子の発現をコントロールする。

(3) ComA は ABC トランスポーター・ファミリーの一員である

通常の ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターは、膜貫通ドメイン (TMD) とヌクレオチド結合ドメイン (NBD) とから成るが、ComA はそれに加えてペプチダーゼドメイン (PEP) をもっている (図 1)。

つまり、ComA タンパク質はシグナル前駆体である ComC ペプチドを切断するとともに、生じたシグナル分子を ATP 分解のエネルギーを利用して細胞外に分泌するという bi-functional な酵素・輸送タンパク質である。

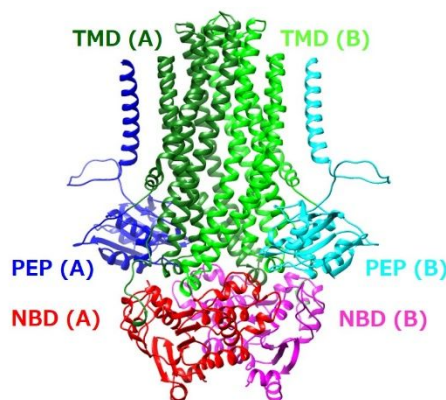


図1 Alpha Fold2 による *S. mutans* の ComA 全長タンパク質構造予想図

(4) ComA はストレプトコッカスのバイオフィルム形成阻害剤の最適なターゲットである

グラム陽性細菌の QSS シグナルペプチドは同属であっても、種間 (あるいは株間) での多様性が大きく、シグナル - 受容体相互作用の阻害剤は細菌種ごとに開発しなくてはならない。それに対して、ComA の PEP の基質認識機構はすべてのストレプトコッカス属細菌で共通であることを研究代表者らは明らかにしてきた。したがって、単一の PEP 阻害剤が多くのストレプトコッカス属細菌の PEP を阻害できると考えられる。また、研究代表者らは ComA の各ドメインの機能・構造の解析を行い、それらの知見をもとに、シグナル産生とバイオフィルム形成を阻害する化合物を得ている。この PEP 阻害剤はミュータンス菌のバイオフィルム形成は阻害するが、細菌の増殖には影響を及ぼさない (殺菌・静菌作用は示さない) ことを確認している。

2. 研究の目的

(1) 本研究は口腔内バイオフィルムの形成阻害剤の開発に向けた、ストレプトコッカス属細菌におけるバイオフィルム形成開始シグナルの産生酵素 ComA に関する研究である。

(2) グラム陽性菌の QSS シグナル産生に関与するタンパク質を精製し、機能・構造の解析に成功した例は、世界的にみても研究代表者らの研究が最初である。

(3) 研究代表者らは PEP 阻害活性を有する低分子化合物を大規模スクリーニングにより見出し、この阻害剤が様々なストレプトコッカス属細菌由来の PEP を阻害し、バイオフィルム形成を抑制することを示した。

(4) ComA の構造・機能相関を解明し、さらに有望なバイオフィルム形成阻害薬の開発を進めていくためには、ComA の全長タンパク質を用いた解析・スクリーニングが不可欠である。

(5) ComA の構造・機能相関に関して最も興味深い点は、PEP による前駆体ペプチドの切断、NBD による ATP の加水分解、TMD の構造変化に伴うシグナルペプチドの細胞外への輸送という 3 つの過程が共役しているということである。その共役メカニズムの解明には、これまでのドメインご

との解析ではなく、全長タンパク質を用いた解析が不可欠である。また、より有効な ComA 阻害剤の探索には、PEP ドメイン単独ではなく、全長タンパク質を用いたスクリーニングが必要である。

3. 研究の方法

(1) ComA 発現系の確立

膜タンパク質である ComA は発現が困難である可能性が高いので、2つの手法を試みた。

Streptococcus mutans 由来の全長 ComA の in vivo 発現系の構築

大腸菌ではなく、本来の宿主である *S. mutans* をタンパク質発現の宿主として用いた。*S. mutans* のゲノム DNA からプロモーター領域を含む comA 遺伝子の全長を PCR 増幅し、ストレプトコッカスと大腸菌のシャトルベクター pSET1 にクローニングした。その際、宿主ゲノム由来の ComA からの分離を可能にし、精製を容易にするために C 末端に His-tag を付けた。*S. mutans* を pSET1-comA で形質転換し、発現条件を検討した。

S. mutans 由来全長 ComA のコムギ胚芽 in vitro 発現系の構築

同様 C 末端に His-tag を付した *S. mutans* 由来 comA 遺伝子の全長を pEU-E01-MCS ベクターにクローニングした。このベクターを用いてコムギ胚芽抽出物による膜タンパク質の無細胞タンパク質合成システム (ProteoLiposome PLUS Expression Kit (セルフリーサイエンス)) を用いて、*S. mutans* の全長 ComA のリポソームへの発現を検討した。

(2) ComA プロテオリポソームの機能解析

PEP のペプチダーゼ活性と NBD の ATPase 活性の共役の解析

ATP の存在・非存在下で ComA のペプチダーゼ活性を測定し比較する。また、ATP S を用いて同様の実験を行った。

PEP の基質である ComC の存在・非存在下で、ComA の ATPase 活性を測定し比較した。また、PEP 活性の触媒基であるシステイン残基を置換した ComA や PEP 阻害剤を用いて同様の実験を行った。

(3) ComA プロテオリポソームに対する阻害剤の効果

S. mutans PEP に対して開発した Compound1 の類縁化合物 24 種類のうち ComA ペプチダーゼドメインに対して有意な阻害 (IC_{50} 値が 200 μ M 以下) を示した 4 化合物について *S. mutans* のバイオフィーム阻害実験ならびに ComA プロテオリポソームのペプチダーゼ活性阻害実験を行った。

4. 研究成果

(1) ComA 発現系の確立

Streptococcus mutans 由来の全長 ComA の in vivo 発現系の構築

pSET1-comA で形質転換した *S. mutans* を大量培養 (4 L 以上) 後、集菌したものを超音波破碎し超遠心機で膜画分を回収した。そして、この画分を使って TALON カラムによる精製を実施した。培養条件ならびに精製時に ComA タンパク質の可溶化に使用する非イオン性界面活性剤を中心に諸条件の検討を行ったが十分な量のタンパク質 (μ g オーダー) が得られず、この方法による発現は断念した。

S. mutans 由来全長 ComA のコムギ胚芽 in vitro 発現系の構築

小スケール (240 μ L) の発現系にて μ g オーダーの *S. mutans* 由来全長 ComA が得られた。この方法では膜タンパク質をプロテオリポソームとして発現できるため、遠心操作を繰り返す事で簡易精製が可能である。発現した *S. mutans* ComA プロテオリポソームは PEP のペプチダーゼ活性 (人工基質 tComCAFC の切断により確認) および NBD の ATPase 活性の両方を示した。また、100 \times CMC 濃度の *n*-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) で ComA プロテオリポソームを可溶化してもペプチダーゼ活性に変化がないことから、リポソーム上でほとんどの ComA が PEP と NBD を外側にに向けて挿入されていると考えられた。

(2) *S. mutans* ComA プロテオリポソームの機能解析

ComA プロテオリポソームに 2 mM ATP, 2 mM ATP-10 mM MgCl₂, 2 mM ATP-10 mM MgCl₂, 1 or 5 mM ATP S を各々共存させた反応系でペプチダーゼ活性を非共存下のものと比較した。これらの化合物はいずれも NBD との相互作用が期待されるが ComA プロテオリポソームのペプチダーゼ活性への影響は認められなかった。

ComA プロテオリポソームに 15 μ M or 75 μ M *S. cristatus* ComC (CComC) を各々共存させた反応系で NBD の ATPase 活性を非共存下のものと比較した。CComC は単離発現した *S. mutans* ComA ペプチダーゼドメインの良い基質であるが NBD の ATPase 活性への影響は認められなかった。

これらの実験結果から PEP のペプチダーゼ活性と NBD の ATPase 活性の共役を観察するには ComC の QSS シグナルペプチド領域と ComA 各ドメインの相互作用を考慮に入れるべきであると考えた。

(では QSS シグナルペプチド部分のない人工基質を PEP の基質とし、 では QSS シグナルペプチド部分が本来のパートナーと異なったものを用いていた。)そこで、新たに天然の ComA-ComC のペアで実験系を構築することにした。現在 ComC の大腸菌リコンビナントタンパク質の量産が可能な *S. pneumoniae* の ComA プロテオリポソームを作製するところまで研究が進んでいる。

(3) ComA プロテオリポソームに対する阻害剤の効果

選別した Compound 1 の類縁化合物 4 化合物について *S. mutans* のバイオフィルム形成阻害実験を行ったところ、Compound 1 と同様に PEP に対する阻害活性 (IC₅₀ 値) よりも、*S. mutans* のバイオフィルム形成阻害活性 (EC₅₀ 値) の方が小さくなる傾向が見られた。続いてこれら 4 化合物の ComA プロテオリポソームに対するペプチダーゼ活性阻害を試験したところ、いずれの化合物の IC₅₀ 値も単離発現した PEP に対する阻害活性 (IC₅₀ 値) よりも、むしろ *S. mutans* のバイオフィルム形成阻害活性 (EC₅₀ 値) に近い値を示した (表 1)。以上の結果から ComA 全長タンパク質では PEP と比較して Compound 1 の類縁化合物の阻害効果が強められていることが明らかとなった。この結果から ComA の全長タンパク質を対象とした阻害剤開発の必要性が窺われた。

表 1 Compound 1 の類縁化合物の阻害活性

化合物	PEP に対する阻害活性 (IC ₅₀ μ M)	ComA 全長に対する阻害 活性 (IC ₅₀ μ M)	<i>S. mutans</i> のバイオフィルム 形成阻害活性 (EC ₅₀ μ M)
Compound 1	38	-	5
類縁化合物 1	190	26	40
類縁化合物 2	220	36	60
類縁化合物 3	130	20	22
類縁化合物 4	160	11	21

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	福井 健二 (FUKUI Kenji) (00466038)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	
研究分担者	石井 誠志 (ISHII Seiji) (10247851)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

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