

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15750

研究課題名(和文)細菌が分布する病原タンパク質を分子標的とした新規抗菌薬開発

研究課題名(英文)Development of novel antimicrobial drugs targeting pathogen effectors

研究代表者

西出 旭(Nishide, Akira)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：80807652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：感染時に病原性細菌から宿主細胞へと分泌されるタンパク質Xはユビキチンリガーゼ活性を持ち宿主タンパク質を分解へと誘導することで、宿主免疫系を妨げる。本研究は、タンパク質Xへ結合を示した化合物の機能解析・評価することで、タンパク質X阻害剤を見出し、新規の抗菌薬の創出することが最終目標である。

試験管外の阻害活性測定を行った結果、200以上ある候補化合物からタンパク質Xの活性を阻害する化合物2種を絞り込むことができた。さらに、培養細胞を用いた阻害活性の測定で、うち1種がタンパク質Xを阻害することを確認することができた。また、培養細胞内を用いた薬剤の評価系を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、続々と出現する耐性菌は抗菌薬に耐性を持ち、さらに類似の構造や作用機構の抗菌薬に対しても耐性を持つ。その一方で、既存の抗菌薬の作用機構は大きくわけて4種のみで遠くない未来、あらゆる抗菌薬の効かない耐性菌の出現が危ぶまれている。こういった背景から、新規の作用機構を持つ抗菌薬の開発が強く求められている。

本研究の結果、候補化合物の中から細胞内外で標的であるタンパク質Xのユビキチンリガーゼ活性を阻害する化合物を見出した。病原性細菌が分泌するタンパク質を標的にした薬剤はこれまでに存在せず、今後、見出した化合物についてさらなる評価・最適化を行うことで、新規抗菌薬となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pathogens secrete protein X, are ubiquitin ligase into host cells during infection. Protein X induce host proteins to proteasomal degradation and disrupt host cell immune response. The goal is discover protein X inhibitor as the novel antimicrobial drugs by evaluating the inhibition activity of candidates that bind to protein X.

As the results of in vitro inhibition assay, we confirmed protein X inhibition in two compounds of more than 200 candidates. Furthermore, we observed that one of two compounds inhibited protein X by measuring the inhibition activities in culture cells. In addition, we establish compound quantitative evaluating method with using that cells. Identified compound is required further evaluation and optimization, but has potential to become a new antimicrobial drug.

研究分野：応用生物化学

キーワード：ユビキチン エフェクター 病原細菌 抗菌薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は、基質タンパク質へユビキチンを修飾することで、基質の活性や安定性の制御を行う、翻訳後修飾の一つであり、タンパク質分解や DNA 修復、免疫応答など様々な細胞機能へ深く関与している。

幅広い病原性細菌が保存しているタンパク質 X は、基質タンパク質へユビキチンを修飾するユビキチンリガーゼ活性を持つ。タンパク質 X は感染時に、III 型分泌装置を介して、細菌から宿主細胞質へと直接分泌される。送り込まれたタンパク質 X は宿主の免疫応答に関与するタンパク質へユビキチンを修飾することで、標的である基質タンパク質の分解を誘導する。その結果、宿主免疫応答が抑制され、病原性細菌は定着・感染を成功させる。

感染性腸炎は、全世界で年間 800 万人の命を奪う、看過することのできない疾患の一つである。さらに近年、抗菌薬の効かない耐性菌や、複数の抗菌薬へ耐性を獲得した多剤耐性菌の出現が社会問題になっており、これら耐性菌へ有効な抗菌薬の開発は急務である。そこで、事前に実施したタンパク質 X に対する化合物スクリーニングで得られた候補化合物を、生化学的、構造生物学的手法を用い、タンパク質 X を分子標的とした新規抗菌薬の創出を目指した。

2. 研究の目的

新規抗菌薬の標的分子として病原性細菌に保存されるタンパク質 X に着目し、タンパク質 X に対する結合の有無を評価する化合物スクリーニングを事前に実施し、サルモネラ菌に保存されたタンパク質 X に対して 107 種類、赤痢菌に保存されたタンパク質は 264 種類を候補化合物として同定した。中でも 102 種類の化合物はサルモネラ菌、赤痢菌両者に保存されたタンパク質 X に対して結合する結果を示していた。これら候補化合物の開発に必要な知見は十分ではなく、タンパク質 X に対する結合親和性や、阻害活性の有無、立体構造をはじめとする相互作用様式などは明らかでなかった。そこで、本研究では、これら候補化合物を生化学的、構造生物学的手法を用いて機能解析を行うことで、候補化合物を最適化しタンパク質 X 阻害剤の開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 化合物とタンパク質 X の相互作用解析および阻害活性測定

候補化合物とタンパク質 X との相互作用解析および、タンパク質 X に対する阻害活性実験を行うことで、候補化合物のタンパク質 X に対する結合親和性および阻害活性を定量的、定性的に評価する。

相互作用解析は BLI 法で解析を行う。阻害活性測定はこれまでに、*in vitro*において、タンパク質 X をはじめとするユビキチンリガーゼが自身へユビキチンを付加することで高分子量化したユビキチンのバンドが観察されていることが知られている。これを利用し、候補化合物を添加しタンパク質 X の *in vitro* ユビキチンリガーゼ活性測定実験を行い阻害活性の評価を行う。

(2) 化合物 タンパク質 X 複合体立体構造の解明

候補化合物のタンパク質 X に対する、結合能、阻害活性を改良に必要な高分解能の構造情報を獲得するために、候補化合物 タンパク質 X の結晶を調製し、X 線結晶構造解析を行う。

(3) 化合物の最適化および阻害剤活性測定

(1) (2) の結果から、候補化合物の化学構造を改良・最適化を行い、よりタンパク質 X と結合し、活性を阻害する、タンパク質 X 阻害剤を設計・調整する計画である。更に、改良した化合物を (1) で実施した相互作用解析、阻害活性測定に加えて細胞実験を行うことで、細胞内での阻害活性をも明らかにする。

4. 研究成果

(1) 化合物とタンパク質 X の相互作用解析および阻害活性測定

候補化合物を絞り込むために、事前に実施したタンパク質 X に対する結合スクリーニングで良好な結果を示していた 9 種類の化合物について *in vitro* ユビキチンリガーゼ活性測定実験を用いてタンパク質 X に対する阻害活性の評価を行った。タンパク質 X を特異的に認識、阻害する化合物を選定するために、病原性細菌に由来するタンパク質 X だけではなく、ヒト由来のユビキチンリガーゼでも阻害活性測定実験を行った。その結果、ヒトユビキチンリガーゼを阻害せずタンパク質 X を特異的、濃度依存的に阻害する化合物 2 種類を同定することができた (図 1)。以降、これら 2 種類の候補化合物を化合物 A、化合物 B と呼称する。図中のバンドはユビキチンを示しており、タンパク質 X のユビキチンリガーゼ活性に比例して高分子量側 (図中上部) へと伸

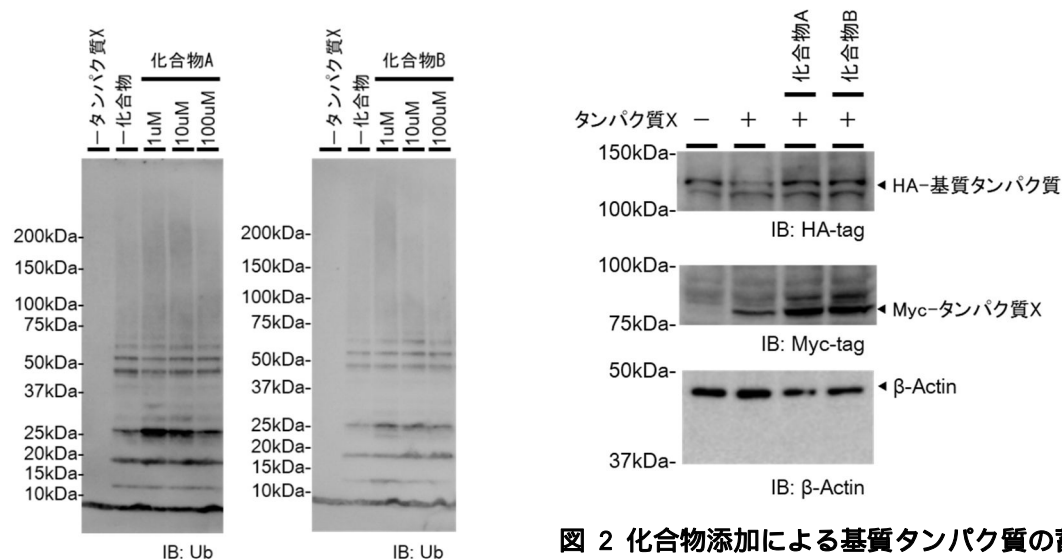


図 2 化合物添加による基質タンパク質の蓄積

図 2 in vitro コピキチン活性測定実験による化合物阻害能の検証

展する。化合物 A および B を添加したレーンではコピキチンの高分子量側への伸展が抑えられており、また濃度依存的に抑制していることから、これら化合物が in vitro でタンパク質 X のコピキチンリガーゼ活性を阻害していることを示している。

in vitro 阻害活性実験を通してタンパク質 X を特異的に阻害した 2 種類の候補化合物について、定量的に結合親和性を評価するために相互作用解析を行った。BLI 法を用いた相互作用実験では専用チップへタンパク質 X を固定する必要があるが、ビオチン標識したサルモネラ菌および赤痢菌由来のタンパク質 X を用いたが、低分子化合物を検出するために十分なタンパク質 X を固定することができず、候補化合物とタンパク質 X の結合を観察することはできなかった。代替の解析手法として、結合時に発生する熱量を測定することで定量的な相互作用解析を行うことができる ITC 法で解析を行った。その結果、化合物 A で発熱現象を観察することができた。しかしながら、化合物溶液の溶媒中に含まれる DMSO の水和に起因する発熱が大きく結合定数を算出するまでには至らなかった。

(2) 化合物 タンパク質 X 複合体立体構造の解明

候補化合物 タンパク質 X の X 線結晶構造解析を行うために必要な複合体結晶を獲得するために、(1) で絞り込んだ 2 種類の化合物と、大腸菌発現系で得られ高純度に精製したサルモネラ菌または赤痢菌由来のタンパク質 X とを混合し、結晶化条件のスクリーニングを実施した。しかしながら、報告書作成時点で結晶は得られていない。また、化合物とタンパク質 X 混和時にタンパク質 X に由来すると考えられる白色沈殿が生じ、化合物とタンパク質 X を結晶改善に結合させることが困難であると予測された。そこで、タンパク質 X 単独結晶をあらかじめ調整し、その結晶を化合物溶液へ浸漬することで、複合体結晶を得ようと考え、タンパク質 X 単独の結晶条件のスクリーニングを行った。その結果、サルモネラ菌由来タンパク質 X の微小結晶を得ることができたが、化合物の浸漬に十分な大きさではなく、構造解析に十分な回折像を得ることはできなかった。

(3) 化合物の最適化および阻害剤活性測定

候補化合物が細胞内でタンパク質 X を阻害できるかどうかを明らかにするために、赤痢菌由来のタンパク質 X およびその基質タンパク質を一過的に発現させたヒト培養細胞 HEK293T 細胞へ(1)で同定した化合物 A および B を投与し、基質タンパク質の細胞内発現量を観測した(図 2)。タンパク質 X は基質タンパク質を分解へと誘導するため、化合物がタンパク質 X の活性を阻害したとき、基質タンパク質はコピキチン化および分解を受けず、細胞内の発現量が上昇することが期待される。実験の結果、化合物 A および B の両方で濃度依存的に基質タンパク質を示すバンド強度の増加を確認することができた。これは基質タンパク質の蓄積を示唆しており、しいては、両化合物がタンパク質 X の活性を培養細胞内でも確かに抑制していると考えられる。

さらに、この実験で用いた培養細胞を利用し、基質タンパク質の活性化により引き起こされる特定遺伝子の転写活性を Luciferase Reporter Assay を用いることで、候補化合物のタンパク質 X 阻害活性を定量的に評価できる実験系を樹立し、これを用いて、化合物 A および B の阻害活性を測定した。(図 3)。その結果、化合物 A でのみ化合物を処理していない条件よりも転写活

性能の上昇が見られた。これは、図 2 で示した実験と同様に、化合物 A がタンパク質 X の活性を阻害した結果、基質タンパク質が分解を免れ、転写活性が向上したと考えられる。

申請時の計画では培養細胞を用いた阻害活性測定実験系の樹立の他、(1)(2)の実験で得られた知見を元に化合物の最適化を行う計画であったが、複合体立体構造を決定することができず、最適化を行うことができなかった。しかしながら、培養細胞を用いた実験系は(1)で難航していた定性的、定量的な実験を補完する結果となり、通してタンパク質 X を *in vitro* および細胞内で特異的に阻害する化合物 A を見出すことができた。

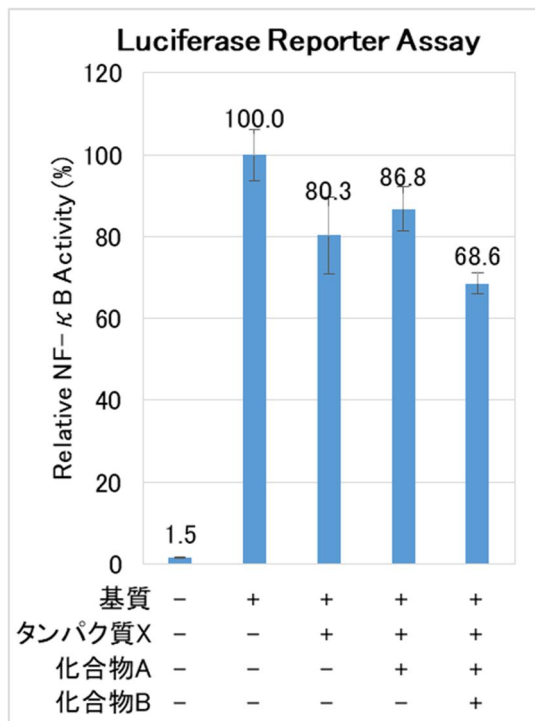


図 3 ルシフェースレポーター実験による化合物阻害能の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishide Akira, Takagi Kenji, Kim Minsoo, Mizushima Tsunehiro	4. 巻 なし
2. 論文標題 Active site structure of the Shigella flexneri effector OspI	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.02.15.480433	査読の有無 無
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 西出 旭、KIM MINSOO	4. 巻 92
2. 論文標題 病原細菌によるユビキチン修飾系攪乱の分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 75-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920075	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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

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
---------	---------