

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02878

研究課題名（和文）病原因子の分解を誘導する分子標的型新規抗菌剤の開発基盤の構築

研究課題名（英文）New antibiotics development

研究代表者

Kim Minsoo (KIM, MINSOO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50466835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：既存抗生剤とは作用機序が異なり、多剤耐性菌にも効く、病原細菌のみに効果があり、常在菌や宿主（ヒト）には作用しない、全く新規の細菌感染治療薬の創出がアンメット・メディカル・ニーズとして待望されている。本研究では、既存抗生剤とは異なる作用機序で働き、常在菌には作用せず、病原細菌の病原性に特異的なメカニズムを狙った、全く新たなコンセプトでの感染症治療薬の創出を行った。具体的には、「病原因子の病原性を抑制する化合物」を創出し、病原因子の機能抑制による細菌感染症治療薬の基盤構築を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌による感染症は、生命を脅かす危険性があり、アンメット・メディカル・ニーズは極めて高い。本研究で開発される新しい概念の感染症治療薬は、新興・再興感染症に対するグローバルな感染症対策に対して更なる貢献が期待できる。学術的には、遺伝子操作が不可能な病原細菌に対して、本化合物は、病原蛋白質をノックアウトするツールとして利用可能で、病原因子の感染に果たす分子メカニズム解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：There is an unmet medical need for the development of new anti-microbial drugs of bacterial infections that act by a different mechanism of action than existing antibiotics, are effective against multidrug-resistant bacteria, are effective only against pathogenic bacteria, and do not act on commensal bacteria or the host. In this study, we aimed to develop a new concept anti-microbial drug of infectious diseases that is different from existing antibiotics, does not affect commensal bacteria, and is specific to the virulence of pathogenic bacteria. Specifically, we aimed to create “compounds that inhibit the virulence of bacterial virulence factors” and establish for the new therapeutic tools of bacterial infections by inhibiting the function of virulence factors.

研究分野：感染生物学

キーワード：病原細菌 ケミカルバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルモネラ菌や赤痢菌に代表される腸管病原細菌は、飲食物により宿主の体内に侵入し、腸管の粘膜上皮細胞を足場に感染を拡大する(参考文献)。これら病原細菌による腸管感染症の治療は抗生剤に依存しているが、近年、既存の抗生剤に対する多剤耐性菌の増加、ワクチンの不在に加え、抗生剤による副作用が重大な問題になっている(参考文献)。既存の抗生剤は、細菌細胞壁の合成、転写反応に対する阻害剤など、病原細菌にも常在菌にも効き、細菌全般を殺傷する結果、腸内細菌叢を破壊する薬剤が多い。また、破壊された細菌から発現される内・外毒素は溶血性尿毒症などを引き起こして、病態を悪化させ、死亡に至る場合も多い。そのため、(1) 既存抗生剤とは作用機序が異なり、多剤耐性菌にも効く、(2) 病原細菌のみに効果があり、常在菌や宿主(ヒト)には作用しない、全く新規の細菌感染治療薬の創出がアンメット・メディカル・ニーズとして待望されている。

2. 研究の目的

宿主側は炎症反応など、病原体に対する生体防御システムを持つが、腸管病原細菌はその防御システムを無効化するために、III型分泌装置と呼ばれる注入装置により病原因子(=エフェクター)を宿主細胞に分泌する。これらのエフェクターは宿主のシグナル伝達系や感染免疫反応を巧妙に制御し、宿主の生体防御機構を無効化して、感染を成立・拡大する(参考文献)。本研究では、『感染に重要なエフェクターの機能を制御し、病原細菌の病原性低減できる』治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1)ハイスループットスクリーニング法の確立

Differential scanning fluorimetry(DSF)は、蛋白質溶液に蛍光色素を加え、昇温すると蛋白質がアンフォールディングし、内側に存在する疎水性領域が露出させる。その際、蛍光色素が蛋白質の疎水性領域と相互作用をする。その作用を利用して蛍光を検出することで蛋白質のアンフォールディングの際の温度 T_m を検討する。この方法は化合物との相互作用解析に利用される。エフェクター(A)と結合する化合物を調べるために、DSF法を使用した。京都大学医学支援センターが持つ化合物ライブラリー(2438化合物)をスクリーニングに用いた。白色96ウェルPCRプレート(Bio-Rad社)を用い、化合物5 μ L+標的蛋白質10 μ L+蛍光色素5 μ Lを混合した。蛍光色素としてPROTEOSTAT(Enzo Life Science社)を用い、リアルタイムPCR検出システムCFX96(Bio-Rad社)を用いて25~80の範囲で蛍光をモニターした。融解温度(T_m)はCFX Maestroソフトウェア(Bio-Rad社)により算出した。ネガティブコントロール(NC)として、タンパク+蛍光色素を用いた。融解温度の変化(ΔT_m)は、化合物存在下での T_m から化合物なしの標的タンパク質の T_m の平均を引くことによって計算した。 ΔT_m が ± 0.6 変動したものをヒット化合物とした。

(2)結合親和性(分子間相互作用)解析

化合物との親和性を測定する方法として、Microscale Thermophoresis(MST)法を用いた。HISタグをエフェクター(A)に融合した蛋白質を精製し、蛍光標識ラベルをし、MST(Nano Temper社)解析に用いた。ターゲット蛋白質に化合物が結合すると、蛍光スペクトルが変化することを利用し、化合物と蛋白質の結合定数(KD)を算出した。

(3)蛋白質の精製

相互作用解析には、純度の高い蛋白質が必要である。そのために、エフェクター蛋白質は HIS タグ融合蛋白質として BL21 大腸菌に発現させ、cOmplete HIS-Tag Purification Resin ビーズを用いて Roche 社の取り扱い説明書に従い精製した。さらに純度の高い蛋白質を得るために、ゲルろ過クロマトグラフィー (Cytiva 社) を用いて精製を行った。

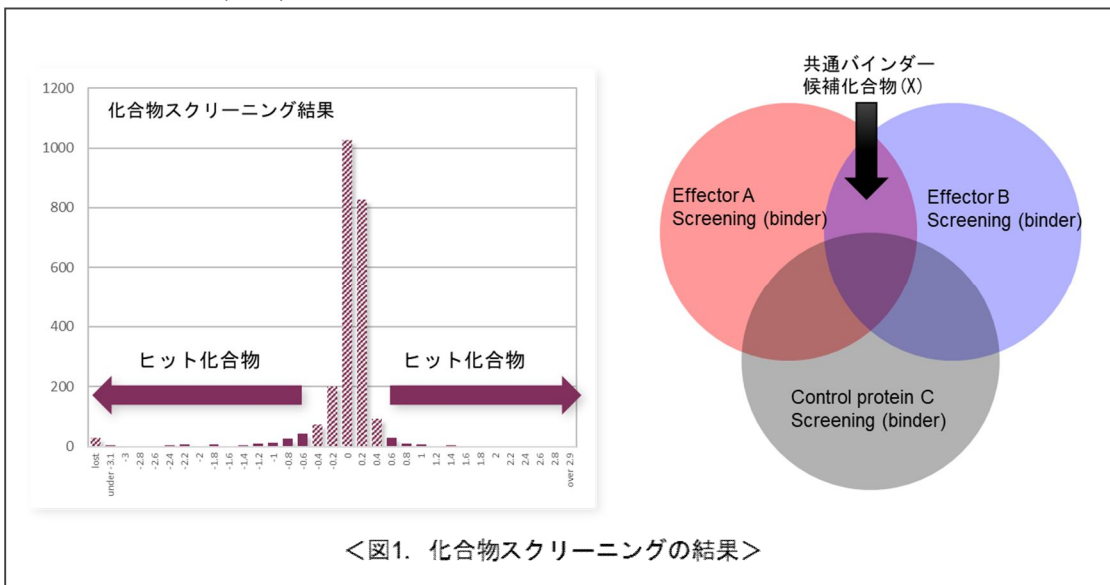
(4)薬効検討(colony forming unit assay: CFU assay)

1x10⁵ 個の MEF 細胞を 24well Plate に撒き、次の日に培養したサルモネラ菌(moi=50)を感染させる。感染一時間後、Gentamycin と Kanamycin 含む killing medium で 3 度 wash をおこない、2 時間おきに、細胞を回収した。回収した細胞は 0.1% TritonX を含む生理食塩水で細胞を溶解して、段階希釈し、LB plate に播種する。37 °C で一晚培養し、次の日生菌数を数える(参考文献)。

4. 研究成果

(1)エフェクター (A) と結合する化合物の同定

病原細菌に共通に存在するエフェクター(A)と結合する化合物を同定するために、化合物ライブラリースクリーニングを行った。エフェクター蛋白質を大腸菌から精製し、エフェクター(A)と化合物との相互作用を検出するスクリーニング系(DSF 法)を確立した。確立したスクリーニング法を用いて、京都大学・医学支援センターの化合物ライブラリー (2438 化合物) に対して、ハイスルットスクリーニングを行った。その結果、178 種類のヒット化合物を得た。スクリーニングで得られたヒット化合物の選択性・特異性を調べるために、他の病原細菌のファミリー分子であるエフェクター (B) やコントロール蛋白質(C)を用いて、同様な実験を行い、結合する化合物を調べた。その結果、エフェクター (A) と (B) 、共通に結合する候補化合物(X)を得ることができた(図 1)。



(2)ヒット化合物の検証

候補化合物とエフェクター (A) との結合力を調べることは、創薬の展開には必要不可欠である。

まず、両者の結合を調べるために、His-tag 融合したエフェクター(A)蛋白質を精製し、マイクロスケール熱泳動システム(MST)を使用し、両者の結合能(KD)を測定した。さらに、化合物(X)に FG ビーズに結合させたビーズを作製し、精製したエフェクター蛋白質(A)と混合することで、両者の直接的な結合を検討した。その結果、両者の結合が確認できた。MST を用いた KD は非常に弱いものであったため、化合物の最適化が必要であると考え、 の実験を行った。

(3)エフェクター(A)と化合物(X)との複合体構造解析

特異性の高いリード化合物の設計及び開発するためには、複合体の立体構造を解き、相互作用の分子基盤を解明する必要がある。そのために、エフェクター(A)の大腸菌での発現系を作製し、大量に蛋白を精製する系を構築した。化合物(X)とエフェクター(A)との2者複合体に対し X 線結晶構造解析を試みた。しかし、化合物が難溶性のため、よい結晶は得られず、現在様々な結晶化条件を検討している。さらに、ドッキングシミュレーションや Alphafold を用いた *in silico* 解析も合わせて行い、得られた構造情報を基に、化合物の最適化を行っている。(水島・山吉教授との共同研究)

(4)細菌感染に対する化合物の薬効検討

上記の でエフェクター(A)と化合物(X)の結合が見られたので、化合物(X)が *in vitro* で細菌の増殖に影響するかと MIC assay を用いて調べた。その結果、化合物(X)は細菌の増殖には直接影響しなかった。次に、細胞に投与実験を行い、細胞内の細菌の増殖について、調べた。HeLa 細胞にサルモネラ菌を感染させ、化合物(X)を投与し、細胞内の生菌数や感染免疫応答を調べることで細菌感染に対する化合物の薬効を検討した。その結果、化合物投与により、細胞内のサルモネラ菌の増殖抑制(<30%)がみられた。

(5)考察

本研究では、『感染に重要なエフェクターの機能の制御が、病原細菌の病原性低減し、感染症治療薬になりうるか』を検討した。エフェクター(A)と結合する化合物(X)を同定し、化合物が細胞内細菌の増殖を抑制することを示した。結合は見られたが、相互作用は弱いとされるため、今後化合物の最適化を行い、より活性の強いものの創出を目指す。さらに、*in vitro*での抗菌活性が見られたため、*in vivo* 感染モデル系を利用し、感染マウスの生存率や免疫応答を調べ、動物個体への感染に対する薬効を検討する準備をしている。以上の結果から、本研究の成果物は新しい抗菌剤として提案できると期待される。

さらに、分子標的としたエフェクター(A)はサルモネラ菌を含む幅広い病原細菌に保存されている分子で、ファミリーの間では類似した機能を持つものが多くある。以上のことから、一つの化合物で、幅広い病原細菌に共通で作用する治療薬に展開できると期待される。

(6)参考文献

Morens DM, et al. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004;430:242-249 DOI: 10.1038/nature02759.

Laxminarayan R, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:1057-1098 DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

Kim M, et al. Bacterial effectors and their functions in the ubiquitin-proteasome system: insight from the modes of substrate recognition. *Cells*. 2014;3:848-864 DOI: 10.3390/cells3030848.

Fuseya Y, et al. The H0IL-1L ligase modulates immune signalling and cell death via monoubiquitination of LUBAC. 2020; 6: 663-673 DOI: 10.1038/s41556-020-0517-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Hiragi Keito, Nishide Akira, Takagi Kenji, Iwai Kazuhiro, Kim Minsoo, Mizushima Tsunehiro | 4. 巻 173 |
| 2. 論文標題 Structural insight into the recognition of the linear ubiquitin assembly complex by Shigella E3 ligase IpaH1.4/2.5 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 317 ~ 326 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac109 | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Nishide Akira, Takagi Kenji, Kim Minsoo, Mizushima Tsunehiro | 4. 巻 - |
| 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 - |
| 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 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 KIM Minsoo and Park SunJoo |
| 2. 発表標題 Real-time, label-free monitoring of polyubiquitin chain formation with ubiquitin ligase |
| 3. 学会等名 International conference Korean Society for Molecular and cell Biology (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 武田美都里、伊藤寛朗、吉澤明彦、KIM Minsoo |
| 2. 発表標題 乳がん患者の組織検体を用いた新規バイオマーカーの探索 |
| 3. 学会等名 第46回日本分生生物学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 腸管出血性大腸菌のNleLユビキチンリガーゼ阻害剤の探索 |
| 2. 発表標題 北畑圭亮、佐藤聡太、西出旭、佐藤裕介、長門石暁、津本浩平、KIM Minsoo |
| 3. 学会等名 第46回日本分生生物学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Legionella steigerwaltii 脱アミド化酵素 CifLs 結晶構造解析 |
| 2. 発表標題 西出 旭, 平木 慶人, 馬場 拓海, Muhammad Hasif Bin Abdul HALIM, KIM Minsoo, 水島 恒裕 |
| 3. 学会等名 第46回日本分生生物学会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|-----------|--|---|----|
| 研究 分担者 | 山吉 麻子 (Yamayoshi Asako) (70380532) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授 (17301) | |
| 研究 分担者 | 水島 恒裕 (Mizushima Tsunehiro) (90362269) | 兵庫県立大学・理学研究科・教授 (24506) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|