

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06455

研究課題名(和文)新規抗生物質の標的分子探索を目指した病原菌の情報伝達経路プロテオームデータの創出

研究課題名(英文)Generating proteomic data on signalling pathways in pathogenic bacteria for the discovery of new antibiotic target molecules.

研究代表者

木下 恵美子(Kinoshita, Emiko)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：40379912

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):近年,病原菌の薬剤耐性,病原性の発現,増殖力の増強などに関わる情報伝達経路を構成するヒスチジンキナーゼ(HK)の阻害剤の開発が国内外で進められている。本研究では「フォスタグ」を用いたHKのリン酸解析技術を利用し,HKによるシグナル活性化と外部環境因子との関連を網羅的に解析したデータを蓄積し,阻害剤などの新規抗生物質の標的分子が浮かび上がるようになることを目的とした。病原性大腸菌や赤痢菌で病原性の発現に関わるとされるHKであるEvgSや,薬剤耐性に関わるHKなど数種類のHKが常に発現するように再現した擬似的な大腸菌を作成し,その発現に伴うトランスクリプトーム変化を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性病原細菌は世界的脅威であり,それらの増殖,病原性,薬剤耐性遺伝子の発現にかかわる細菌独特のタンパク質は,既存の薬剤とは全く異なる作用点を持つ薬剤耐性菌にも有効な次世代型抗菌薬として期待され,開発が望まれている。しかし,それらのタンパク質の機能を俯瞰できるプロテオームデータはまだ揃っていない。それらの機能に迫るデータを蓄積することは,新しい抗菌薬の作用点の発見,開発に役立つ。

研究成果の概要(英文):In recent years, the development of inhibitors of histidine kinase (HK), which constitutes a signalling pathway involved in drug resistance, virulence development and growth potency of pathogenic bacteria, has been pursued in Japan and abroad. The aim of this study was to accumulate data on the comprehensive analysis of the relationship between signal activation by HK and external environmental factors using the 'Fostag' technique for analysing HK phosphorylation, so that the target molecules of novel antibiotics such as inhibitors can emerge. We created pseudo-E. coli in which several types of HKs, such as EvgS, which is considered to be involved in the development of virulence in pathogenic E. coli and dysenteriae, and HKs involved in drug resistance, were constantly expressed, and examined the transcriptome changes associated with the expression of these HKs.

研究分野：薬学

キーワード：ヒスチジンキナーゼ 2成分伝達系 レスポンスレギュレーター リン酸化 Phos-tag 阻害剤 抗生物質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、病原菌の環境適応、薬剤耐性などに関わる2成分情報伝達経路を構成するタンパク質であるヒスチジinkinナーゼを標的とした新規抗生物質の探索が国内外で進められている。また、その情報伝達経路に含まれる一連のタンパク質群もまた抗生物質の新規標的となり得ることが多くの研究者によって示唆されている。これからの抗生物質の開発では、耐性菌の問題を解決するため、新たな作用点を標的とすることが重要であり、2成分情報伝達経路を構成するタンパク質と、それに関連する他のタンパク質など、標的分子を探索していく必要がある。

2成分情報伝達経路は、細胞膜に存在するセンサーであるヒスチジinkinナーゼ(HK)と転写調節因子として働くレスポンスレギュレータ(RR)から構成されている。ヒスチジinkinナーゼ(HK)は外部の環境シグナルに応答して自己のヒスチジンをリン酸化し、そのリン酸基をRRのアスパラギン酸へ転移する。リン酸化RRは標的遺伝子に結合して、それらの遺伝子の発現を制御している。しかし、化学的に不安定なヒスチジンやアスパラギン酸のリン酸化を介するこの情報機構については、質量分析によるリン酸化解析が適用できず、真核生物のように情報伝達ネットワークを俯瞰するようなプロテオームデータがないので、できるだけ早く多くのデータを蓄積していくことが大切である。

申請者は、リン酸基を特異的に捕捉する分子、「Phos-tag」を利用したリン酸基親和性電気泳動法(Phos-tag電気泳動法)を開発し、それを用いて、不安定なリン酸化ヒスチジンやリン酸化アスパラギン酸を含むタンパク質のリン酸化状態の解析を可能にしてきた。その解析方法を細菌のHKやRRの機能解析に応用してきた経緯がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが独自に開発したリン酸基捕捉分子「フォスタグ」を用いた不安定リン酸化タンパク質の解析技術を利用し、細菌のシグナル活性化と外部環境因子との関連を解析する。そして、種々の環境因子や薬剤の暴露により活性化される経路を網羅的にプロファイリングする。そのようにして蓄積したデータから分子間相互作用や情報伝達機構のクロストークなどが明らかになり、機能未知の分子の働きや情報伝達ネットワークが浮上するデータを蓄積し、新規抗生物質の標的分子の発見を目的とする。

## 3. 研究の方法

院内感染では、黄色ブドウ球菌、腸球菌、緑膿菌、大腸菌などによる重篤な症状が問題視され、それらが多剤耐性であることも問題である。特に病原菌の薬剤耐性獲得や病原性に関わる2成分情報伝達分子のHKとRRのペアがいくつか報告されている。

本研究では、増殖、病原性、薬剤耐性遺伝子の発現に関わる2成分情報伝達経路のHKとRRを再現した擬似的な大腸菌を作成し、その擬似的経路はどのような因子によって活性化し、どのような遺伝子が活性化するのか、などを解析した。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌の情報伝達経路を大腸菌タンパク質発現システムにおいて再現  
病原性大腸菌と赤痢菌において病原性の発現に関わると報告されているHKとRRの

ペアである EvgS/EvgA を選び、それらの遺伝子をクローニングした。EvgS と EvgA は、互いに異なる複製開始点を持つ 2 種類の発現プラスミドにそれぞれサブクローニングした。そのペアを汎用的な大腸菌のタンパク質発現システムを用いて、同時に形質転換することで 2 種類のタンパク質を大腸菌で共発現させることを検討した（図 1）。2 種類の発現ベクターの組み合わせは 8 通りを検討したところ、そのうち 3 つの組み合わせ（pTf16/pET21a(+), pGro7/pET21a(+), pKJE7/pET21a(+)) で共発現に成功した（図 2）。今後、EvgS/A のほか増殖、病原性、薬剤耐性遺伝子の発現に関わることが報告された 2 成分情報伝達経路の HK と RR について同様の疑似大腸菌を作成し、Phos-tag 電気泳動法を用いて、様々な外部環境因子と HK/RR の活性化（リン酸化）に関するデータをとっていきたいと考えている。

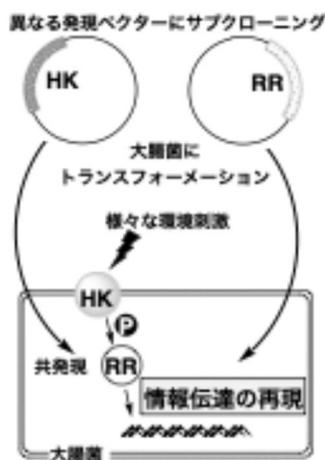


図 1 .

HK/RR の共発現と情報伝達経路の再現

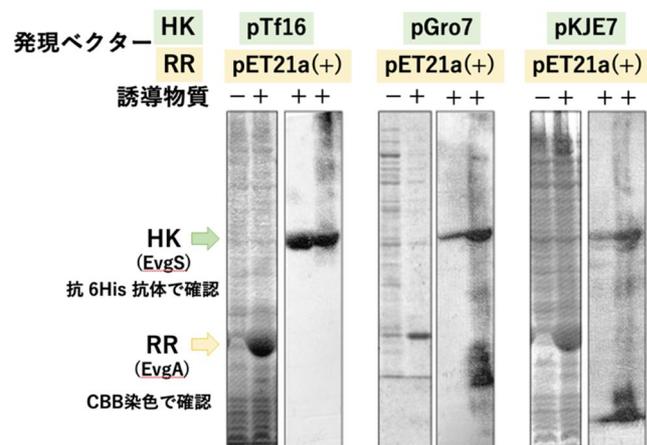


図 2 .

HK/RR の共発現可能な発現ベクター 3 つの組み合わせと発現したタンパク質の電気泳動による確認

## ( 2 ) EvgS 発現によって発現が変動する大腸菌の遺伝子の解析

EvgS/EvgA は、大腸菌と赤痢菌に特有で、この系は、通常環境の PH 変化に対応し、酸耐性関連遺伝子の発現を制御するとされているほか、薬剤や熱に対する耐性にも関与するとされる。また、他の 2 成分伝達系と関わり合って浸透圧ストレスの耐性にも関与する。さらに、近年の研究で、赤痢菌の病原性の発現への関与が報告された。しかし、EvgS/EvgA には未知の点も多いことから、大腸菌において EvgS が活性化したときに発現が変動する遺伝子を RNA シークエンスの手法で調べた。

構成的に活性な EvgS を大腸菌 W3110 株に形質転換し、トータル RNA を抽出、次世代シークエンサで発現遺伝子を解読、コントロールの大腸菌との発現差異を解析した（実験の流れ、図 3）。

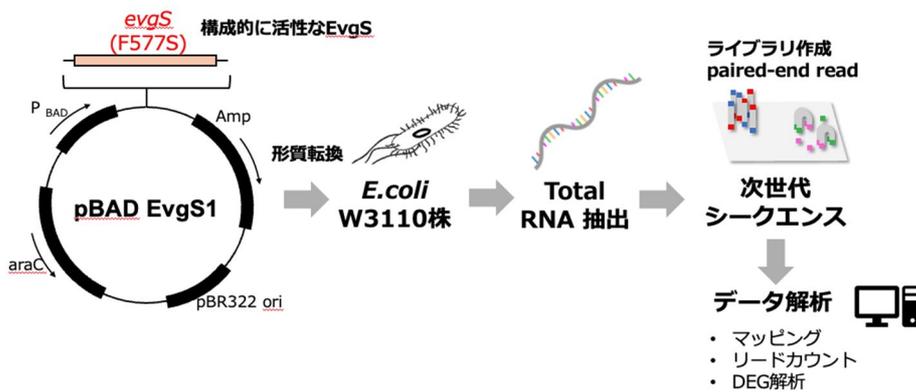


図3 RNA シーケンスによる発現差異解析の流れ

発現が上昇した遺伝子上位 10 を表 1 に示した。ペプチドグリカン代謝関連、リゾチーム C 阻害剤、GDP-フコース合成系など、細胞壁の代謝に関連する遺伝子の転写上昇が見られたことから、EvgS が細胞壁に影響を及ぼすことが考察された。

表 1 EvgS 発現によって発現が上昇した遺伝子

Gene	タンパク質	Gene	タンパク質
1 <i>evgS</i>	ヒスチジンキナーゼ	6 <i>osmB</i>	浸透圧ストレス耐性
2 -	不明	7 <i>rlhA_2</i>	23S rRNA修飾関連酵素
3 <i>ygeA</i>	ペプチドグリカン代謝	8 -	不明
4 <i>ivy</i>	リゾチームC阻害剤	9 <i>galP</i>	ガラクトーストランスポーター
5 -	不明	10 <i>gmd</i>	GDP-フコース合成系

発現が減少した遺伝子上位 10 を表 2 に示した。リンゴ酸脱炭酸酵素、シュウ酸脱炭酸酵素、モリブデントランスポーター、薬物排出、ペリプラズムデヒドロゲナーゼ、酸耐性関連とその制御因子などの発現が低下していた。色をつけたものは EvgS/EvgA の酸耐性獲得に関連する遺伝子群との関連が報告されているものだった。上位 10 以外にもその遺伝子群との関連があるものが含まれた。

表 2 EvgS 発現によって発現が減少した遺伝子

Gene	タンパク質	Gene	タンパク質
1 <i>dmlA</i>	リンゴ酸脱炭酸酵素	7 <i>gadE</i>	制御因子
2 <i>yfdE</i>	シュウ酸脱炭酸酵素	8 <i>hyaB</i>	ペリプラズムヒドロゲナーゼ
3 <i>modA</i>	モリブデントランスポーター	9 <i>ydeP</i>	酸耐性関連遺伝子
4 <i>ydeO</i>	制御因子	10 -	不明
5 <i>mdtE</i>	薬物排出遺伝子	<i>gadABC</i>	グルタミン酸依存性酸耐性関連
6 <i>oxc</i>	シュウ酸脱炭酸酵素	<i>mdtF</i>	薬剤排出遺伝子

今後、EvgS/A のほか増殖、病原性、薬剤耐性遺伝子の発現に関わることが報告された 2 成分情報伝達経路の HK と RR について同様の解析を進めたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kinoshita-Kikuta, E., Ino, Y., Kimura, Y., Akiyama, T., Kinoshita, E., Koike, T.	4. 巻 66
2. 論文標題 Use of Escherichia coli expression system for analyzing kinase motifs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 13-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2198/jelectroph.66.13	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 Ichimaru, Y., Kato, K., Nakatani, R., Augiura, K., Mizutani, H., Kinoshita-Kikuta E., Koike, T., Jin, W., Imai, M., Kurosaki, H.	4. 巻 147
2. 論文標題 Characterization of zinc(II) complex of 1,4,7,10-tetraazacyclodecane and deprotonated 5-fluorouracil (FU) in crystalline/solution states and evaluation of anticancer activity: approach for improving the anticancer activity of FU.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inorg. Chem. Comm.	6. 最初と最後の頁 110221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.inoche.2022.110221	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 木下恵美子, 木下英司, 小池透	4. 巻 66
2. 論文標題 さまざまなタンパク質合成系で作成した Src ファミリーチロシンキナーゼのリン酸化状態と活性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 71-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2198/electroph.66.71	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 Kinoshita-Kikuta E., Yoshimoto M., Yano M., Kinoshita E., Koike T	4. 巻 70
2. 論文標題 An assay of human tyrosine protein kinase activities by using an Escherichia coli protein-expression system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 209-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/btn-2020-0154	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 Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Suga M., Higashida M., Yamane Y., Nakamura T., Koike T	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of phosphorylation status and kinase activity of Src family kinases expressed in cell-based and cell-free protein expression systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11101448	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 Kinoshita-Kikuta E., Ichimaru Y., Yamano Y., Kato K., Kurosaki H., Kinoshita E., Koike T	4. 巻 94
2. 論文標題 Characterization of the Binding of Adenosine-5' -monophosphate to a u-Type Alkoxide-linked Dinuclear Zinc(II) Complex in Crystal and Solution State	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jap.	6. 最初と最後の頁 2670-2677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202100216	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 Ino Y., Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Akiyama T., Nakai Y., Ryo A., Hirano H., Koike T., Kimura Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of four phosphopeptide enrichment strategies for mass spectrometry-based proteomic analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 e2100216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202100216	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 Ichimaru, Y., Kato, K., Jin W., Sugiura K., Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Kurosaki H., Koike T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Crystal structure of bis{1,3-bis[bis(pyridine-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato-dizinc(II)}-orthophosphate tirs(percholate) octahydrate, [Phos-tag]2-P043-)(C104-)8H2O.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 X-ray Struct. Anal.	6. 最初と最後の頁 87-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/xraystruct.37.87	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 Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Kinoshita E	4. 巻 252
2. 論文標題 Recent advances in the Phos-tag technique focused on the analysis of phosphoproteins in a bacterial two-component system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Proteomics	6. 最初と最後の頁 10429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2021.104429	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 Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T	4. 巻 252
2. 論文標題 History of Phos-tag technology for phosphoproteomics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Proteomics	6. 最初と最後の頁 104432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2021.104432	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下恵美子、木下英司、小池透
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系で作成したSrcファミリーチロシンキナーゼのリン酸化状態と活性
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下恵美子、木下英司、小池透
2. 発表標題 E. coli タンパク質共発現系を利用したチロシンキナーゼアッセイ
3. 学会等名 62回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下恵美子、木下英司、小池透
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系で作成したSrcファミリーチロシンキナーゼのリン酸化状態と活性
3. 学会等名 94回 日本生化学会 2021,11/3-5
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下恵美子、木下英司、小池透
2. 発表標題 E. coli タンパク質共発現系を利用したチロシンキナーゼアッセイ
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸田志乃、木下恵美子、木下英司、小池透
2. 発表標題 新規ヒスチジンキナーゼ阻害剤スクリーニングのためのイムノドットプロットアッセイ
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本萌々香、矢野万莉奈、木下恵美子、木下英司、小池透
2. 発表標題 大腸菌の共発現システムを利用したABLチロシンキナーゼアッセイ
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Phos-tag SDS-PAGE データ集  
<http://phostag.hiroshima-u.ac.jp>

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