

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590147

研究課題名(和文)多剤耐性菌出現リスクを回避するための溶血性連鎖球菌専用抗生剤の開発

研究課題名(英文)Development of anti-Group A streptococcus antibiotics having effect of limiting the emergence of multi-drug resistance.

研究代表者

田中 幸枝(Tanaka, Yukie)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：10197486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：A群 溶血性連鎖球菌はNADaseを宿主に輸送し病原性を示すが、菌体内ではSNIとの複合体が活性を中和している。この中和阻害により菌自身に毒素活性が発現されるのでSNIは抗菌剤として恰好の標的となる。最近、SNI-NADaseの相互作用領域を示す結晶構造解析データが示された。我々はそれを基にNADase-SNIの中和を阻害すべくdominant negative変異体(DNM)を作製し新規SNI阻害剤の開発を目指した。しかし、作製したDNMではSNI阻害効果が低く、弱いNADase毒性の発現にとどまった。SNIの機能を完全に抑制し強い毒素活性の発現のためには更なるDNMの改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：The virulence of *S. pyogenes* is enhanced by toxins like NADase. *S. pyogenes* additionally express the SNI, which forms an inhibitory complex with NADase. SNI is a target for the development of novel antimicrobials functioning by blocking the bacterium's self-immunity to the NADase toxin. Recent study has shown the crystal structure of NADase-SNI complex to understand the physical basis for NADase inhibition by SNI. We have exploited the conformational information required SNI to bind to NADase to develop novel SNI inhibitors that block immunity of *S. pyogenes* to NADase and unleash the toxicity of NADase. We have explored the release of NADase toxicity by expressing dominant negative mutants of NADase. Some dominant negative mutants partially inhibited SNI function, resulting in unleashing the weak toxicity of NADase. These results suggest that we should understand more physical basis, particularly in the interaction of NADase-SNI, to improve dominant negative mutants of NADase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物感染症学 溶血性連鎖球菌 NADase SNI

1. 研究開始当初の背景

A 群 β 溶血性連鎖球菌 (Group A β -hemolytic Streptococcus : GAS) は、経気道あるいは接触性にヒト-ヒト感染する。最も一般的には学童期にみられる咽頭炎であるが、蜂巣炎などの化膿性疾患や敗血症、外毒素性の猩紅熱、続発症と呼ばれる急性糸球体腎炎やリウマチ熱などがあり病像は多彩である。また軟部組織壊死を伴い、敗血症性ショックを来す劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (レンサ球菌性毒素性ショック症候群) は経過が速くかつ重篤な病態である。このように GAS 感染症は多彩な疾患が存在すること、劇的な経過をたどる場合があること、などの理由から既存の抗生剤を上回る効果的な治療薬の開発が切望されていた。

2. 研究の目的

現在 GAS 感染症は、広域スペクトルを示す抗生剤で治療されているが、近年耐性菌が散見されるようになり薬剤耐性対策が急務となっている。本研究では、GAS が持つ特有の分泌毒素 NADase を標的とする GAS 特異的抗生剤の作出によって耐性菌出現頻度が低い長期使用可能な薬剤の開発を試みた。NADase は、GAS のもう一つの分泌毒素である SLO (Streptolysin O) の働きによって宿主細胞内に輸送され宿主細胞の NAD⁺ を分解して細胞傷害を誘導する。これに対して、GAS 自身は菌体内に発現する抗毒素 SNI (Streptococcal NADase Inhibitor) と複合体を形成するため NADase 活性が抑制され細胞傷害を免れる。そのため、毒素 NADase-抗毒素 SNI の複合体形成を解消してやれば、NADase 活性が発現し GAS 自身の自殺が誘導され目的が達成できると考えた。

3. 研究の方法

(1) ① SNI decoy による野生型 SNI と NADase の相互作用の阻害, ② NADase decoy による野生型 SNI と NADase の相互作用の阻害 を行うため、それぞれの N 末端, 中央領域, C 末端および活性領域の欠失あるいは点置換変異体を計画した。

(2) 計画 (1) 進行中に NADase の X 線構造解析データ (Craig L. Smith et al. Structure 19, 192-202, 2011) が発表され、NADase 活性を中和するための抗毒素 SNI との相互作用に重要なアミノ酸が推定された。その相互作用には SNI の持つ 2 箇所のループ領域の 8 個のアミノ酸が重要であり、さらにそれらと相互作用するのは NADase 上の 11 個のアミノ酸であることを推定された。そこで、SNI-NADase 間相互作用に重要と推定されたアミノ酸あるいはそれらの近傍のアミノ酸に欠失および点置換 (主にアラニン置換) を施し、dominant negative 効果によって SNI の抗毒素作用に影響を与えることが期待される dominant negative 変異体の作製を行った。

(3) 多様な生物資源から SNI の機能阻害物質のスクリーニングを、NADase 活性の発現を指標に行った。

(4) 多様な生薬由来化合物から NADase 活性阻害物質のスクリーニングを、NADase 活性の阻害を指標に行った。

4. 研究成果

(1) 研究方法 (1) で計画した SNI の抗毒素作用の抑制が期待される SNI decoy および NADase decoy を作製し、それぞれ NADase 活性の発現を指標にその効果を調べた。

① SNI decoy の結果は、1) SNI の N 末端を欠失させた変異体のいくつかはその導入によって僅かな NADase 活性の

発現すなわち野生型 SNI の抗毒素作用の抑制がみられた。この抑制が競合阻害に依存することを確認するために変異体と NADase の相互作用を免疫沈降/ウェスタンブロット法を用いて調べたところ、抑制程度に 관련된相互作用が確認された。2) SNI の N 末端, 中央領域, C 末端のそれぞれに点置換を施した変異体には期待した NADase 活性の発現すなわち抗毒素作用の抑制はみられなかった。変異体と NADase の相互作用も抑制と同様にみられなかった。3) SNI の中央領域および C 末端の欠失変異体の多くは易分解性のためその発現が困難であり抗毒素作用への効果を調べることはできなかった。

次に, ② NADase decoy の結果は, 1) NADase の N 末端, 中央領域, C 末端の欠失変異体のいずれにも抗毒素作用の抑制はみられなかった。変異体と NADase の相互作用も抑制と同様にみられなかった。2) NADase の中央領域の点置換変異体には NADase 活性の発現を有意に上昇させるものがいくつか存在した。変異体と SNI の相互作用を確認したところ, 予想に反して 관련된相互作用は全く認められなかった。そこで, NADase 変異体自身の毒素活性を調べたところ, 野生型 NADase と同等の毒素活性を有していた。すなわち消失させた毒素活性が中央領域への変異の導入より復帰し, NADase 活性の発現の上昇が起こったと考えられた。decoy として使用するには適当でないと考えられた。

以上の研究成果 (1) の結果から, SNI N 末端欠失変異体は decoy 機能によって SNI の抗毒素作用を抑制させられると考えられた。しかし, 野生型 SNI と比較して NADase との相互作用効率が低いいため抗毒素作用の抑制が弱く, 相互作用効率

を高める改良が必要と考えられた。一方, 毒素活性を失った NADase 変異体による抗毒素活性の抑制は, SNI を捕獲できたとしても変異体自身の毒素活性の問題で実験が困難であることが明らかになった。

(2) 研究成果 (1) から, 目的の変異体を得るためには NADase との相互作用の効率を増やすことが重要であると考えられた。そこで, 研究方法 (2) に記載したように Craig L. Smith et al が推定した NADase-SNI の相互作用に重要なアミノ酸の情報を参考に, SNI の抗毒素活性を抑制すると期待される dominant negative NADase 変異体 (DNM) を考案した。相互作用には SNI の 2 箇所ループ領域の 8 個のアミノ酸が重要であるので, まずそれぞれのアミノ酸を点置換した変異体を作製し, 変異体グループ 1 (DNM1) と命名した。

① DNM1 の結果は, 1) C 末端側のループのアミノ酸の点置換変異体のいくつかはその導入によって, 弱い有意な NADase 活性の発現すなわち野生型 SNI の抗毒素作用の抑制がみられた。これら変異体の NADase との相互作用を調べたところ, 抑制に 관련된有意な相互作用が確認された。2) N 末端側のループのアミノ酸の点置換変異体には期待した NADase 活性の発現すなわち抗毒素作用の抑制は認められなかった。変異体と NADase の相互作用も抑制と同様に認められなかった。3) 1), 2) 以外の点置換変異体は易分解性のためその発現が困難であり抗毒素作用への効果を調べることはできなかった。

上記①の結果から, 弱い抗毒素効果を示した dominant negative NADase 変異体グループ 1 (DNM1) は, 野生型 SNI の

NADase との相互作用を置換し SNI の抗毒素作用を抑制すると考えられた。しかし、置換効率が低くトータルとして弱い抑制効果しか示さず抗菌活性を示すには不十分であった。これは相互作用に重要なアミノ酸に変異を施した変異体は野生型と比較して相互作用効率が低下するため、競合阻害効果が優勢にならないと考えられた。そこで、相互作用を低下させず抗毒素作用を抑制できる新たな dominant negative NADase 変異体の作製を試みた。相互作用を低下させないように相互作用領域外にのみ変異を施し抗毒素作用の抑制効果を検討した。

② しかし、再び抑制効果の弱い変異体グループ (DNM2 group) しか得られなかった。作用機序を調べたところ、前述の変異体 (DNM1 group) と同様に変異体 NADase による SNI の相互作用効率が低く弱い抗菌作用しか認められなかった。

この結果から、予想された領域以外にも相互作用に関与する領域が存在することが推定された。すなわち、SNI の機能を完全に抑制するための dominant negative NADase 変異体の作製は、Craig L. Smith らの報告 (Structure 19, 192-202, 2011) に加えてさらなる考慮が必要であると考えられた。

(3) 多様な生物資源から NADase 活性の発現を指標に SNI の機能阻害剤の探索を行った。その結果、カビ、キノコなどの抽出物に、NADase の抗毒素作用の抑制効果が認められた。特にキノコ抽出物の分子量 2000 の化合物に効果が特定できたので、天然物からの探索も有効である可能性が示された。

(4) 生薬由来の化合物の NADase 阻害活性を表 1 にまとめ、図 1 に示した。Baicalein (13), (-)-Epigallocatechin Gallate(39), Bufalin(20), Honokiol(60), Sennoside A(89), Alisol B(4), Sennoside B(90), Magnolol(70) および Alkannin(5)等は、終濃度 0.05mM でそれぞれ 100, 100, 92, 89, 87, 86, 85, 83 および 81 と 80%以上の強い阻害作用が確認された。

フラボン類やカテキン類などポリフェノール化合物に強力な NADase 阻害活性が認められた。

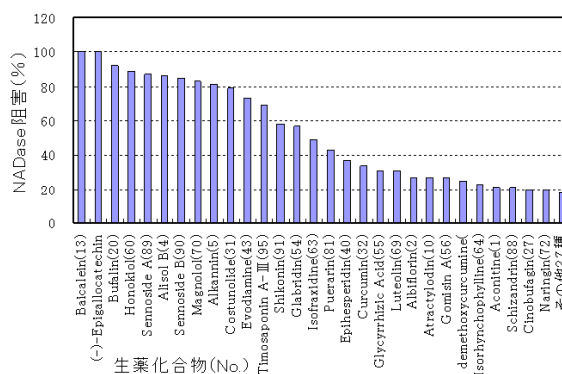


図1 生薬化合物の NADase 阻害活性
生薬化合物終濃度 0.05mM での NADase 阻害 (%) で示した。左から 2 番目の Epigallocatechin Gallate のリスト No. は 39、右から 6 番目の demethoxycurcumin のリスト No. は 35 である。

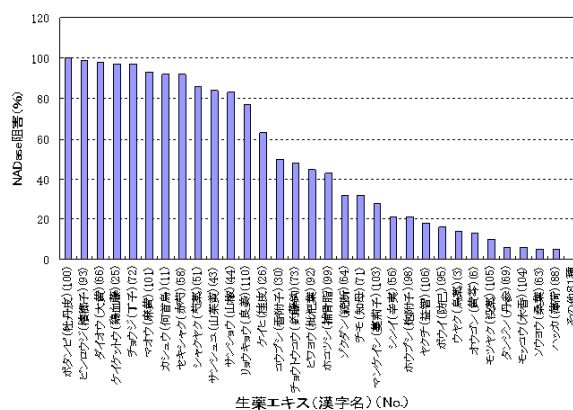


図2 生薬エキスの NADase 阻害活性
生薬エキス終濃度 0.05mg/ml での NADase 阻害 (%) で示した。

No	生薬化合物名	阻害%	No	生薬化合物名	阻害%	No	生薬化合物名	阻害%
1	Aconitine	21	33	Dehydrocoalydine Nitrate	0	66	(Z)-Ligustrin (0.1mg/ml)	NE
2	Aflatoxin	27	34	Dehydrocostusolone	6	66	Limonene	2
3	Allol A	0	36	demethoxycurcumin	26	67	Liquiritin	15
4	Allol B	86	36	Dihydrocapsaicin	18	68	Loxarin	7
5	Aloxonin	31	37	Dimethylcapsaicin	0	69	Lytholol	31
6	Amesain	15	38	Elautheroside B	7	70	Mastolol	83
7	Arbutin	14	39	Epigallocatechin Gallate	100	71	Mesconifline	12
8	Atractylodes IV	0	41	Ephedrine	31	72	Narasin	23
9	Atractylodes III	0	41	Ergosterol	0	73	Nosakenin	0
10	Atractylodin	27	42	beta-Eudesmol	0	74	Osthole	12
11	Atractoside A	7	43	Esculetin	73	75	Oxymatine	0
12	Aloubin	7	44	(E)-Ferulic Acid	0	76	Paeoniflorin	0
13	Baicalin	100	46	Ginsenoside	0	77	Paeonol	0
14	Baicalin	3	46	Ginsenoside A	6	78	Palmitic Chloride	0
15	Barbaloin	11	47	Genthiopicroside	3	79	Parilaldehyde	0
16	Benzoifmesaconine HCl	11	48	[6]-Gingerol	13	80	Phenaparin A	0
17	Berberine Chloride	0	49	Ginsenoside-Fc1	0	81	Puerarin	42
18	Berberin	0	50	Ginsenoside-Fc	0	82	Rhynchophylline	0
19	Bisdemethoxycurcumin	0	51	Ginsenoside-Fd	0	83	Rosmarinic Acid	2
20	Burfiain	92	52	Ginsenoside-Fg	1	84	Saikosaponin a	0
21	Burfiain	0	53	Ginsenoside-Fh1	10	85	Saikosaponin b2	0
22	Capsarinin	-	54	Glabridin	57	86	Saikosaponin c	0
23	(E)-Capsaicin	12	55	Glycyrrhizic Acid	31	87	Saikosaponin d	0
24	Catholol	0	56	Gomisin A	27	88	Schradarin	21
25	(E)-Chlorogenic Acid	7	57	Gomisin N	0	89	Senecioide A	87
26	(E)-Dynamic Acid	10	58	Heptenin	0	90	Senecioide B	85
27	Cinobufalin	20	59	Hericidin	15	91	Shikonin	52
28	Cinobufalin	10	60	Honokiol	89	92	(E)-Shocai	0
29	Dopamine Chloride	8	61	Hypocoonifline	0	93	Sinomenine	0
30	Doryline	62	62	Icariin	94	94	Spermatamine	0
31	Osthonolide	79	63	Isoflavindin	49	95	Timosaponin A-II	69
32	Curcumin	34	64	Isothychophylline	22	96	Wogonin	5

表1 生薬化合物のNADase阻害活性
生薬化合物終濃度0.05mMでのNADase阻害 (%)で示した。

No	生薬名	阻害%	No	生薬名	阻害%	No	生薬名	阻害%
1	イソクサノク(葛根)	0	39	サツキ(山椒)	0	77	アサギ(山椒)	0
2	カニンナ(葛根)	0	40	サツキ(山椒)	0	78	アサギ(山椒)	0
3	ウヤク(葛根)	14	41	サツキ(山椒)	0	79	トウモロコシ(葛根)	0
4	エゾクサノク(葛根)	0	42	サツキ(山椒)	0	80	トウモロコシ(葛根)	0
5	オウゴン(葛根)	0	43	サツキ(山椒)	0	81	トウモロコシ(葛根)	0
6	オウゴン(葛根)	13	44	サツキ(山椒)	83	82	トウモロコシ(葛根)	0
7	オウゴン(葛根)	0	45	サツキ(山椒)	0	83	ニクシユク(葛根)	0
8	オウゴン(葛根)	0	46	サツキ(山椒)	0	84	ニクシユク(葛根)	0
9	オウゴン(葛根)	0	47	サツキ(山椒)	0	85	ハクモク(葛根)	0
10	オウゴン(葛根)	0	48	サツキ(山椒)	0	86	ハクモク(葛根)	0
11	オウゴン(葛根)	86	49	サツキ(山椒)	0	87	ハクモク(葛根)	0
12	カニンナ(葛根)	0	50	サツキ(山椒)	0	88	ハクモク(葛根)	5
13	カニンナ(葛根)	0	51	サツキ(山椒)	86	89	ハクモク(葛根)	0
14	カニンナ(葛根)	0	52	サツキ(山椒)	0	90	ハクモク(葛根)	0
15	カニンナ(葛根)	0	53	サツキ(山椒)	0	91	ハクモク(葛根)	0
16	カニンナ(葛根)	0	54	サツキ(山椒)	0	92	ハクモク(葛根)	46
17	カニンナ(葛根)	0	55	サツキ(山椒)	0	93	ハクモク(葛根)	99
18	カニンナ(葛根)	0	56	サツキ(山椒)	21	94	ハクモク(葛根)	0
19	カニンナ(葛根)	0	57	サツキ(山椒)	0	95	ハクモク(葛根)	16
20	カニンナ(葛根)	0	58	サツキ(山椒)	92	96	ハクモク(葛根)	0
21	カニンナ(葛根)	0	59	サツキ(山椒)	0	97	ハクモク(葛根)	0
22	カニンナ(葛根)	0	60	サツキ(山椒)	0	98	ハクモク(葛根)	21
23	カニンナ(葛根)	0	61	サツキ(山椒)	0	99	ハクモク(葛根)	43
24	カニンナ(葛根)	0	62	サツキ(山椒)	0	100	ハクモク(葛根)	100
25	カニンナ(葛根)	97	63	サツキ(山椒)	5	101	ハクモク(葛根)	93
26	カニンナ(葛根)	63	64	サツキ(山椒)	32	102	ハクモク(葛根)	0
27	カニンナ(葛根)	0	65	サツキ(山椒)	0	103	ハクモク(葛根)	28
28	カニンナ(葛根)	0	66	サツキ(山椒)	98	104	ハクモク(葛根)	6
29	カニンナ(葛根)	0	67	サツキ(山椒)	0	105	ハクモク(葛根)	10
30	カニンナ(葛根)	0	68	サツキ(山椒)	0	106	ハクモク(葛根)	18
31	カニンナ(葛根)	0	69	サツキ(山椒)	6	107	ハクモク(葛根)	0
32	カニンナ(葛根)	0	70	サツキ(山椒)	0	108	ハクモク(葛根)	0
33	カニンナ(葛根)	0	71	サツキ(山椒)	32	109	ハクモク(葛根)	0
34	カニンナ(葛根)	0	72	サツキ(山椒)	97	110	ハクモク(葛根)	77
35	カニンナ(葛根)	0	73	サツキ(山椒)	48	111	ハクモク(葛根)	0
36	カニンナ(葛根)	0	74	サツキ(山椒)	0	112	ハクモク(葛根)	0
37	カニンナ(葛根)	0	75	サツキ(山椒)	0			
38	カニンナ(葛根)	0	76	サツキ(山椒)	0			

表2 生薬エキスのNADase阻害活性
生薬エキス終濃度0.05mg/mlでのNADase阻害 (%)で示した。

5. 主な発表論文等

〔その他〕(計 2件)

(1) 平成14年度 福井大学生命科学複合研究教育センター「学部間共同研究」成果報告書「SNI 結合分子の探索と溶血性連鎖球菌特異的抗生剤の開発」藤井豊・浅原雅浩・田中幸枝・浦崎芳正

(2) 富山大学和漢医薬学研究所・H24年度共同研究探査プロジェクト・成果報告書「A群溶血性連鎖球菌咽頭炎治療薬の和漢医薬探査研究プロジェクト」：藤井豊・田中幸枝

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 幸枝 (TANAKA, Yukie)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：10197486

(2) 研究分担者

藤井 豊 (FUJII, Yutaka)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：80211522