

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380050

研究課題名(和文) グラム陽性細菌のクオラムセンシングを標的とした抗感染症剤の開発

研究課題名(英文) Development of antipathogenic agents targeting quorum sensing of Gram-positive bacteria

研究代表者

中山 二郎 (Nakayama, Jiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40217930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸球菌やブドウ球菌等のグラム陽性菌は、環状ペプチドを自己誘導因子(AIP)とするクオラムセンシング(QS)により、病原因子の発現を調節しており、これらのQSの阻害剤(QSI)はポスト抗生物質として期待される。本研究では、微生物の二次代謝産物を対象とした大規模スクリーニングを行い、新規のAvellanin Cを含む環状ペプチド群がAIPに対するアンタゴニスト活性を示し、グラム陽性菌の病原性発現を抑制することを見出した。また、ウェルシュ菌のAIPの構造を基に、AIPアンタゴニストのドラッグデザインを行い、サブマイクロモラーレベルでウェルシュ菌のトキシンの発現を抑制するペプチドの創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Quorum sensing mediated by cyclic peptide as an autoinducer (AIP) commonly controls the expression of virulence in pathogenic Gram-positive bacteria such as staphylococci, enterococci and clostridia. In this study, we performed screening and drug design of quorum sensing inhibitors (QSI). Consequently, we found that a number of cyclic peptides of microbial secondary metabolites, e.g., WS9326A and Avellanin C, showed antagonistic activity against AIP at micromolar concentrations and attenuated virulences of Gram-positive pathogens. Further, we succeeded in designing of QSI peptides based on the structure of AIP of *Clostridium perfringens*, which attenuated the expression of theta toxin gene at submicromolar concentrations

研究分野：分子微生物学・生物有機化学

キーワード：クオラムセンシング グラム陽性細菌 日和見感染 抗感染症剤 ペプチドデザイン 阻害剤開発 ク  
ホルモン アンタゴニスト

## 1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌"MRSA"やバンコマイシン耐性腸球菌"VRE"の病院内あるいは環境中での蔓延が深刻な社会問題となっている現在、耐性菌を誘導し難い新奇な作用機作を有する抗感染症剤の開発研究は重要な研究課題である。

クオラムセンシング(QS)は、多くの病原菌に共通に見られる、病原因子発現の自己制御機構で、同種菌の菌密度がある閾値を超えたときに、病原因子の遺伝子発現をオンにしたりオフにしたりして、効率よく宿主に感染するための機構である。

QS 阻害剤(QSI)は、細菌に対し、生死の選択圧を課すことなく、病原性の発現を遮断する効果が期待され、従来の抗生物質とは異なり、耐性菌の出現を助長しない新しいタイプの抗感染症剤(ポスト抗生物質)として注目されている。

グラム陽性細菌の QS では、環状ペプチドを自己誘導因子(AIP)として種々病原因子を菌密度依存的に制御している場合が多い。腸球菌では宿主のゼラチンやコラーゲンを分解するゼラチナーゼの発現を、GBAP (J. Nakayama et al., Mol.Microbiol.,2001)と呼ばれる環状ペプチドにより自己誘導し、宿主組織への感染侵入を優位に展開する( *fsr* 制御系)。例えば、術後の眼内炎においては、このゼラチナーゼ生産性腸球菌の感染が失明リスクを伴う(T. Suzuki et al., J. Cataract. Refract. Surg., 2008)。ブドウ球菌、ウェルシュ菌においても、同様に環状ペプチドホルモンがヘモリシンやその他種々病原因子の発現を自己誘導し、感染を優位に成立させると同時に、宿主に対するダメージを蓄積している( *agr* 制御系)。

中山らは、これらのグラム陽性病原細菌の環状ペプチドを AIP とするクオラムセンシングの阻害剤を開発し、抗感染症剤として利用することを着想した。これまでに、GBAP のシグナル伝達に関わる二成分制御系を阻害するシアマイシン(J.Bacteriol.,2007; FEMS lett., 2011)、および GBAP の生合成を阻害する Ambuic acid (Antimicrob. Agent Chemother., 2009)を見出している。Ambuic acid は腸球菌のみならず、他の環状ペプチドを AIP とするブドウ球菌やリステリア菌の QS も阻害した。そして、これらの初期スクリーニングの成功が、本助成研究で富山県立大学の五十嵐教授らのスクリーニングソースを用いての大規模スクリーニングを決断させた。

一方、阻害剤の開発は GBAP の構造活性相関研究 (J.Bacteriol., 2009)を基盤としたドラッグデザインからも行っている。特に、申請者独自に考案したりバースアラニンスクラン法(Peptide Science 2010)により、アラニンスクランでは得ることのできなかつた AIP アンタゴニストの創製に成功した。この方法は、他のグラム陽性細菌の AIP アンタゴニス

ト創製にも利用可能である。本研究では、由来からガス壊疽菌として脅威の感染症菌として恐れられ、また近年では食中毒菌としても頻繁に問題となるウェルシュ菌の毒素生産をコントロールする QS の AIP アンタゴニスト創製に、この構造活性相関研究を基盤としたペプチドデザイン法を導入し挑戦することにした。

### <引用文献>

- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M., and Nagasawa, H. (2001) Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*, Mol. Microbiol. 41, 145-154.
- Suzuki, T., Wada, T., Kozai, S., Ike, Y., Gilmore, M. S., and Ohashi, Y. (2008) Contribution of secreted proteases to the pathogenesis of postoperative *Enterococcus faecalis* endophthalmitis, J. Cataract Refract. Surg. 34, 1776-1784.
- Nakayama, J., Tanaka, E., Kariyama, R., Nagata, K., Nishiguchi, K., Mitsuhashi, R., Uemura, Y., Tanokura, M., Kumon, H., and Sonomoto, K. (2007) Siamycin attenuates *fsr* quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*, J. Bacteriol. 189, 1358-1365.
- Nakayama, J., Uemura, Y., Nishiguchi, K., Yoshimura, N., Igarashi, Y., and Sonomoto, K. (2009) Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in gram-positive bacteria, Antimicrob. Agents Chemother. 53, 580-586.
- Nishiguchi, K., Nagata, K., Tanokura, M., Sonomoto, K., and Nakayama, J. (2009) Structure-activity relationship of gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis*, J. Bacteriol. 191, 641-650.
- Ryoji Yokohata, Mami Sato, Kenzo Nishiguchi, Kenji Sonomoto, Jiro Nakayama " Antagonist design of gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis* based on reverse alanine scanning " Peptide Science, 47, 2010.

## 2. 研究の目的

QS をターゲットとした抗感染症薬の開発研究は、グラム陰性菌を中心に国内外で盛んに行われている。しかしグラム陽性菌を対象とした研究はそれほど多くない。本助成研究

では、天然物のスクリーニングとペプチドデザイン合成の2つのアプローチを組み合わせた戦略で QSI 分子を発掘し、グラム陽性病原細菌の病原性発現を効率的に抑制する新しいタイプの抗感染症剤を創出することを目標としている。

病原菌を死滅させるのではなく、その病原性の発現を止める作用が期待される QS 阻害剤は、近年問題となる、薬剤耐性菌の出現を助長することなく、また、生体内あるいは環境の優良な微生物フローラを破壊することなく、感染症を予防あるいは治療できる薬剤として期待される。

### 3. 研究の方法

#### [1] 天然物・化合物ライブラリーからの QS 阻害剤のハイスループットスクリーニング

ここでは、独自に構築した QS 阻害剤のハイスループットにスクリーニング系を用いた(発表論文)。このスクリーニング系は2段階で構築されている。1段階目は、黄色ブドウ球菌の *agr* QS 系で発現誘導される RNA III のプロモーター配下に2つのレポーター(ルシフェラーゼと GFP)遺伝子を挿入したレポーター株を利用した。被験サンプル存在下で本レポーター株を培養し、ルシフェラーゼによる化学発光と GFP による蛍光を測定し、QSI 活性を評価した。2段階目は、従来の腸球菌の *fsr* QS 制御下にあるゼラチナーゼ活性を指標とした QSI アッセイを行った。以上のアッセイ系により、放線菌培養液、糸状菌培養液、植物抽出物のハイスループットスクリーニングを行った。

以上2つの QS 系に対し、阻害活性を示した培養液は、逆相系カートリッジカラムと逆相系 HPLC を中心に精製した。精製物は、サントリー生物有機化学研究所の山垣亮博士に hybrid FT-MS (Apex-Q 94e instrument, Bruker Daltonik)による精密質量分析を依頼した。そして得られた分子式データを、Science Finder のデータベースで化合物検索した。

#### [2] QS 阻害剤の作用機作の解析

FITC (fluorescein 4-isothiocyanate)を N 末端にラベルした GBAP を合成した。具体的には、直鎖状ペプチド FITC-aca-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Ser(tBu)-Pro-Asn(Trt)-Ile-Phe-Gly-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Met (aca: 6-amino hexanoic acid, Trt: trytyl, tBu: t-butyl, Boc: t-butoxycarbonyl) を F-moc 固相合成法で化学合成した後、脱水反応によりラク톤を形成させ環化させ調製した。

受容体 FsrC を高発現する細菌は、西口らが構築した nisin 誘導型プロモーター下 *fsr* 遺伝子を挿入したプラスミドを *L. lactis* に組み込んだものを用いた。この FsrC 発現株を FsrC 誘導条件下で培養し、菌体と FITC-GBAP(200 nM)と QS 阻害剤をインキ

ュベートした後、菌体を洗浄し、菌体の蛍光を測定した。阻害剤濃度は 20  $\mu$ M から 200  $\mu$ M まで変化させた。

#### [3] WS9326B の ex vivo 試験

QS 阻害剤存在下で黄色ブドウ球菌培養し、培養液上清をろ過した後、ヒト角膜表皮細胞 (HCECs)に加え培養した。6時間培養後、細胞生存率を LDH アッセイで評価した。

#### [4] AIP アンタゴニストの創製

Zbzl-YAA5911 の立体構造のシミュレーションは、GBAP の NMR で決定された3次元構造を基に、構造シミュレーションソフトウェア MOE を用いて、エネルギー最小化 (AMBER99)により行った。

ウェルシュ菌の QS 阻害ペプチドは、N 末端を Z (benzyloxycarbonyl) 基により保護した直鎖ペプチドを分子内脱水環化し、環状チオラクトンペプチドを合成した。

ウェルシュ菌の QS 阻害活性の評価は、QS 阻害剤存在下でウェルシュ菌野生株 strain 13 を培養した後、total RNA を菌体より抽出し、逆転写定量 PCR により  $\theta$  毒素遺伝子 (*pfoA*)を定量し、コントロールと転写量を比較することで行った。

### 4. 研究成果

#### [1] 天然物・化合物ライブラリーからの QS 阻害剤のハイスループットスクリーニング

研究分担者・五十嵐博士の放線菌カルチャーコレクション、糸状菌カルチャーコレクション、植物抽出物ライブラリー、をソースとして 1000 サンプルを超える大規模スクリーニングを行った。その結果、からは、既知化合物の WS9326A, WS9326B, Cochnmicin がマイクロモラーオーダーで腸球菌の *fsr* QS 系と黄色ブドウ球菌の *agr* QS 系を阻害することを見出した。WS9326A はさらにウェルシュ菌の VirSR QS 系に対しても阻害活性を示した。においては、希少糸状菌 *Hamigera ingelheimensis* より新規化合物 Avellanin C が発見された(発表論文)。Avellanin C は黄色ブドウ球菌の *agr* QS 系を  $IC_{50} = 4.4 \mu$ M で阻害した。興味深いことに、の3化合物との Avellanin C はすべて環状ペプチドであった。AIP 分子との構造類似性から、これらの環状ペプチドは AIP のアンタゴニストとして機能している可能性が示唆された。

#### [2] QS 阻害剤の作用機作の解析

[1]の研究で得られた WS9326A の阻害作用機構を解析した。まず、腸球菌のオートインデューサー GBAP を蛍光標識したものを用いて GBAP の受容体 FsrC を高発現した腸球菌細胞に対して競合実験を行ったところ、WS9326A および WS9326B は GBAP の FsrC に対し結合を競合的阻害することが示され、両者とも GBAP の受容体アンタゴニス

トであることが示された。

### [ 3 ] WS9326B の ex vivo 試験

黄色ブドウ球菌は角膜炎の原因菌である。Agr QS 系で制御される毒素群が炎症の原因と言われている。そこで WS9326B (10  $\mu$ M) を黄色ブドウ球菌に作用させ、その培養液を用いてヒト角膜細胞に対する毒性を試験した。その結果、WS9326B によりブドウ球菌の細胞毒性が強く抑制されることが示された。

### [ 4 ] ドラッグデザインによる AIP アンタゴニストの創製

我々が開発して、そのクオラムセンシング阻害剤としての有効性が in vitro および in vivo にて確認されている腸球菌の自己誘導因子 GBAP のアンタゴニスト ZBzl-YAA5911 の立体構造のコンピューターシミュレーションを行った。その結果、5 残基目の側鎖に導入したフェニル基が 10 残基目のトリプトファン側鎖と  $\pi$ - $\pi$  相互作用をして、環のコンフォメーションの安定化に寄与し、この安定化が ZBzl-YAA5911 の強いアンタゴニスト活性に寄与している可能性が示唆された。本結果は、ACS Chem. Biol. に発表している ( 発表論文 ) 。

また、ガス壊疽病の原因菌であるウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* のクオラムセンシングペプチドのアンタゴニスト創製に着手した。環を形成する 4 つのアミノ酸を一つずつアラニンに置換して、その AIP 活性 (  $\theta$  毒素遺伝子の誘導活性 ) を評価し、各残基の機能重要性を評価する、アラニンスクリーンを行った。その結果、3 残基目のトリプトファンと 4 残基目のフェニルアラニンが AIP 活性に必須であることが示された。そこで、この情報を基に、2 つの強力なアンタゴニストペプチド Z-cyclo(CAWFT) と cyclo(CLFWT) をデザインし、化学合成して、QSI 活性を調べた。その結果、Z-cyclo(CAWFT) と cyclo(CLFWT) は *C. perfringens* 13 株の  $\theta$  毒素遺伝子の発現を  $IC_{50} = 0.32 \mu$ M と  $IC_{50} = 0.44 \mu$ M で阻害した。本発見の内容については国内 ( 2014-211962 ) および国際特許 ( PCT/JP2015/53145 ) を出願している。

以上の結果は、両者との AIP の環状部分の 2 つの芳香族アミノ酸が AIP 活性に重要であることを共通して示している。他の細菌の AIP にも芳香族アミノ酸が高度に保存されており、本研究で得られた二つの構造活性相関データは、他のグラム陽性細菌の QSI ペプチドのドラッグデザインにも参照できるものと期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

Desouky, S. E., K. Nishiguchi, T. Zendo, Y. Igarashi, P. Williams, K. Sonomoto, and J. Nakayama. 2013. High-throughput

screening of inhibitors targeting Agr/Fsr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Biosci Biotechnol Biochem 77:923-927. 査読有  
Nakayama, J., R. Yokohata, M. Sato, T. Suzuki, T. Matsufuji, K. Nishiguchi, T. Kawai, Y. Yamanaka, K. Nagata, M. Tanokura, and K. Sonomoto. 2013. Development of a peptide antagonist against fsr quorum sensing of *Enterococcus faecalis*. ACS Chem Biol 8:804-811. 査読有  
Phillips-Jones, M. K., S. G. Patching, S. Edara, J. Nakayama, R. Hussain, and G. Siligardi. 2013. Interactions of the intact FsrC membrane histidine kinase with the tricyclic peptide inhibitor siamycin I revealed through synchrotron radiation circular dichroism. Phys Chem Chem Phys 15:444-447. 査読有  
Teixeira, N., S. Varahan, M. J. Gorman, K. L. Palmer, A. Zaidman-Remy, R. Yokohata, J. Nakayama, L. E. Hancock, A. Jacinto, M. S. Gilmore, and M. de Fatima Silva Lopes. 2013. Drosophila host model reveals new *Enterococcus faecalis* quorum-sensing associated virulence factors. PLoS One 8:e64740. 査読有  
Igarashi, Y., F. Gohda, T. Kadoshima, T. Fukuda, T. Hanafusa, A. Shojima, J. Nakayama, G. F. Bills, and S. Peterson. 2015. Avellanin C, an inhibitor of quorum-sensing signaling in *Staphylococcus aureus*, from *Hamigera ingelheimensis*. J Antibiot (Tokyo) in press, 2015.. 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 10 件 )

松藤貴久, 横畑綾治, 園元謙二, 中山二郎 “腸球菌のクオラムセンシング阻害剤 YAA5911 の誘導體化と活性評価” 第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012 年 06 月 30 日、福岡県北九州。

北川はるか, 横畑綾治, 佐土原理江, 園元謙二, 中山二郎 “腸球菌における Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone (GBAP) の生合成機構解析” 第 19 回九州支部大分大会、2012 年 06 月 30 日、大分県別府大学。

中山二郎, 横畑綾治, 松藤貴久, 鈴木崇, 永田宏次, 園元謙二 “腸球菌のクオラムセンシング阻害剤 ZBzl-YAA5911 の創製とその抗感染症剤としての効果検証” 第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、福岡県福岡市。

庄島あかね, 園元謙二, 中山二郎, 松藤貴久 “グラム陽性日和見感染菌のクオラムセンシング阻害剤のスクリーニングと構造解析” 第 50 回化学関連合同支部九州大会、2013 年 07 月 06 日、福岡県北九州。

松藤貴久, 園元謙二, 中山二郎, Said E

Desouky “微生物二次代謝産物を対象としたグラム陽性病原細菌のクオラムセンシング阻害物質の探索” 第 20 回生物工学会九州支部佐賀大会, 2013 年 12 月 07 日, 佐賀県佐賀大学 .

門嶋泰斗, 郷田史也, 花房知朗, 松藤貴久, 中山二郎, 五十嵐康弘“Hamigera 属系状菌が生産するクオラムセンシング阻害物質に関する研究”日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 03 月 29 日, 東京都明治大学 .

庄島あかね, 園元謙二, 中山二郎, Said E Desouky, 大久保謙一”放線菌の生産する環状デプシペプチドによるクオラムセンシング阻害活性” 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 03 月 29 日, 東京都明治大学 .

Ravindra Pal Singh, Kaori Ohtani, Ryoji Yokohata, Kenji Sonomoto, Toru Shimizu, Jiro Nakayama “Identification of autoinducing peptide of *Clostridium perfringens* and development of its inhibitors” 5th AMS conference on cell-cell communication in bacteria, 2014 年 10 月 19 日, 米国テキサス州サンアントニオ . 庄島あかね, 松藤貴久, Said E. Desouky, 大久保謙一, Ravindra Pal Singh, 清水徹, 大谷郁, 五十嵐康弘, 園元謙二, 中山二郎“放線菌の生産する環状デプシペプチドによるクオラムセンシング阻害作用機構の解明”第 21 回日本生物工学会九州支部熊本大会, 2014 年 12 月 6 日, 熊本県熊本大学 .

河野通生, 大谷郁, Ravindra Pal Singh, 石橋直樹, 園元謙二, 清水徹, 中山二郎 “ウェルシュ菌における内在性クオラムクエンチング誘導物質の精製”第 21 回日本生物工学会九州支部熊本大会, 2014 年 12 月 6 日, 熊本県熊本大学 .

〔図書〕(計 2 件)

Gianfranco Donelli, Akane Shojima, Jiro Nakayama et al., Springer, *Microbial Biofilms - Methods Mol Biol*, 2014, 377.

Vipin Chandra Kalia, Singh R. P, J. Nakayama et al., Springer, *Quorum sensing vs Quorum quenching: A battle with no end in sight*, 2014, 391.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: クロストリジウム属の菌の毒素産生抑制活性を有するペプチド

発明者: 清水徹、大谷郁、中山二郎、松藤貴久、シン ラビンドラ パル、大久保謙一、神川美樹、高橋志達、岡健太郎

権利者: 高橋志達、岡健太郎

種類: 特許

番号: 2014-211962

出願年月日: 2014 年 10 月 16 日

国内外の別: 国内

名称: クロストリジウム属の菌の毒素産生抑制活性を有するペプチド

発明者: 清水徹、大谷郁、中山二郎、松藤貴久、シン ラビンドラ パル、大久保謙一、神川美樹、高橋志達、岡健太郎

権利者: 高橋志達、岡健太郎

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/53145

出願年月日: 2015 年 2 月 4 日

国内外の別: 外国

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/microbt/QS.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 二郎 (NAKAYAMA, Jiro)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 40217930

### (2) 研究分担者

永田 宏次 (NAGATA, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 30280788

五十嵐 康弘 (IGARASHI, Yasuhiro)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号: 20285159

鈴木 崇 (SUZUKI, Takashi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70398048

清水 徹 (SHIMIZU, Tohru)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 80235655

大谷 郁 (OHTANI, Kaori)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号: 30377410