

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380061

研究課題名（和文） 環状ペプチドクォルモンの生合成酵素および受容体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 biosynthetic enzyme and receptor of cyclic peptide quorum

研究代表者

中山 二郎 (NAKAYAMA JIRO)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40217930

研究成果の概要（和文）：多くのグラム陽性病原細菌は、環状ペプチドを自己誘導因子（クォルモン）とするクオラムセンシング（QS）により、病原因子の発現を巧みにコントロールして宿主の感染を効率よく成立させている。本研究では QS 阻害剤を、天然物のスクリーニングおよび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分子創製し、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的としている。天然物のスクリーニング研究においては、まず、ブドウ球菌の *agr* クオラムセンシング系をモニターするアッセイ系と腸球菌の *fsr* クオラムセンシング系をモニターするアッセイ系を併用したハイスクリーン系を構築し、約 1000 の放線菌およびカビの粗抽出物をスクリーニングし、計 3 株の粗抽出物が有効的に両菌のクオラムセンシングを阻害することを見出した。ペプチドデザイン合成においては、独自のリバースアラニンスクリーニング法という独自のペプチドアンタゴニストの分子デザイン法により、100 nM で腸球菌のクオラムセンシングを遮断する ZBzl-YAA5911 を得ることに成功した。ZBzl-YAA5911 は、ウサギ眼内炎モデル実験において、腸球菌の硝子体から水晶体への移行を有意に阻害し、*in vivo* における有効性が実証された。ZBzl-YAA5911 は病原菌の増殖には影響を与えず、その病原因子の発現のみを抑制する抗生物質とはことなる作用機作を有し、新しいタイプの抗感染症化学療法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Quorum sensing with thiolactone or lactone peptide as an autoinducer is common among a number of Gram-positive bacteria and controls the expression of virulence in some pathogens, e.g., staphylococci, enterococci and listeria. In this context, the validity of anti-pathogenic agents targeting this type of quorum sensing has been proposed. In this study, to aim inhibitors targeting the cyclic peptide-mediated quorum sensing in Gram-positive bacteria, we have been employing two approaches, that are random screening of microbial secondary metabolites and drug design of peptide antagonists. For the screening, we have established an efficient screening system using an gelatinase assay of *Enterococcus faecalis*. Thus far, we have tested more than a thousand extracts of fungi and actinomycetes and more than a hundred natural and synthetic compounds and found several compounds to efficiently inhibit either or both staphylococci *agr* and enterococci *fsr* quorum sensing systems. For the design of peptide antagonist, we took our original approach, called reverse alanine scanning, during which more potent antagonists were led step by step from receptor-binding scaffold that is [Ala<sup>4,5,6,8,9,11</sup>]-Z-GBAP (GBAP is an autoinducing lactone peptide of *E. faecalis* *fsr* system). In consequence, 5th, 9th and 11th residues in GBAP were found to be antagonist pharmacophore and with this information, we have eventually created a potent antagonist, named ZBzl-YAA5911 ( $IC_{80} = 0.1 \mu M$ ). To elucidate the availability of ZBzl-YAA5911 as an anti-infective agent, the efficacy of this peptide for endophthalmitis was assessed with an aphakic rabbit endophthalmitis model. As a result, ZBzl-YAA5911 suppressed the translocation of *E. faecalis* from the aqueous humor into the vitreous cavity more than one order magnitude and also significantly reduced the retinal damage of animals, suggesting that ZBzi-YAA5911 would be useful as anti-pathogenic agent to attenuate virulence expression more than eliminate the opportunistic pathogen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物制御学、クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

クオラムセンシング (QS) は細菌界で多々見られる菌密度依存的制御機構で、近年の細菌学において大変注目されている現象である。それは、同種菌の菌密度が高くなった時に、同種菌細胞間で化学シグナル“クオラム”を分泌しあいながらコンセンサスを取り、特定の遺伝子発現をタイミングを合わせてオンにし、集団行動を開始するというものである。病原細菌では、病原因子の発現やバイオフィルムの形成などを、QSにより巧みに制御している。院内感染菌などは、時にはこの集団性を巧みに利用し、抗生物質の包囲網をも打ち破る。QS 阻害剤は、このような細菌のコミュニケーションネットワークをブロックし、猛威を振るう細菌を沈静化させる作用が期待され、ポスト抗生物質として注目されている。

申請者は、環状ペプチドをクオラムとするグラム陽性細菌の QS に興味を持ち、基礎から応用まで研究を長年にわたり続けており、本助成研究開始時には、以下の研究成果を挙げていた。

- 1) 腸球菌の病原因子であるゼラチナーゼの発現制御を行う QS の環状ペプチドクオラムである GBAP(gelatinase biosynthesis-activating peptide)を発見し、世界に先駆けて構造解析に成功した (Mol.Microbiol.,2001)。また GBAP の化学合成にも成功した (Biosci.Biotechnol.Biochem., 2001)。
- 2) 未知の環状ペプチドクオラムを LC/MS により検出するシステムを確立

し、乳酸桿菌やリステリア菌の培養液中に、環状ペプチドクオラムが存在することを示し、さらにそれらの構造決定に成功した (J.Bacteriol.,2005; ASM3<sup>rd</sup> Conf. Cell-Cell Communication in Bacteria, 2007)。

- 3) GBAP の生合成機構に関して研究を進め、前駆体ペプチド(FsrD)からのプロセシングと環化が FsrB と命名されたタンパク質のシステインプロテアーゼ様の作用により行われていることを示した (J. Bacteriol., 2006)。
  - 4) 腸球菌の QS を標的とした阻害剤のスクリーニングを行い、放線菌の二次代謝産物であるシアマイシンおよび糸状菌の二次代謝産物である ambuic acid に QS 阻害活性があることを見出した。シアマイシンは GBAP のシグナル伝達ユニットである二成分制御系(FsrC-FsrA)、ambuic acid は GBAP の生合成酵素 FsrB を標的とすることを明らかにした。ambuic acid は他のグラム陽性細菌の環状ペプチドの生合成も阻害し、グラム陽性細菌の QS を広く阻害することも見出している (J.Bacteriol.,2007; Mol. Membr. Biol.2008; Antimicrob. Agent Chemother., 2009)。
  - 5) GBAP の構造活性相関研究を行い、受容体との結合に必須な Phe-7 と環状部分のコンフォーメーションの維持に必須な Trp-10 の2残基の芳香族アミノ酸残基の重要性を見出した (J. Bacteriol., 2009)。
- 以上の研究成果から、①多くのグラム陽

性細菌が環状ペプチドを用いた QS 制御系を有していること、②スクリーニングによりこれらの QS を標的とする阻害剤を見出せること、が判明し、さらに③環状ペプチドホルモンの詳細な生合成の分子機構および環状ペプチドホルモンの詳細な受容認識の分子機構が解明されるつつあった。本助成研究では、それらの研究を背景に、QS 阻害剤の創製研究をさらに標的分子指向に展開させる、つまり、環状ペプチドホルモンの生合成酵素および受容体を標的とした阻害剤分子創製研究に発展させることを目標としたものである。

## 2. 研究の目的

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。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る戦略で分子創製し、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た。

## 3. 研究の方法

(1) 天然物化合物を対象とした QS 阻害剤のスクリーニング

まず、QS 阻害剤を効率よくハイスループットにスクリーニングができるアッセイ系を確立した。Agr クオラムセンシング系により発現誘導される RNA III のプロモーター配下に二つのレポーター（ルシフェラーゼと GFP）の遺伝子を挿入し、黄色ブドウ球菌に形質導入した株を本アッセイ系に用いることにした。このレポーター株の利用により、化学発光と蛍光による二つの検出系を有効的に利用できるハイスループットスクリーニングが可能となった。さらに、広くグラム陽性細菌の QS を標的とできる阻

害剤をスクリーニングするために、二次スクリーニングとして、従来の、腸球菌の *fsr* クオラムセンシング系により発現誘導されるゼラチナーゼの活性を指標としたアッセイを組み合わせた。以上のアッセイ系により、約 1000 の放線菌あるいは糸状菌の培養抽出物とさらには約 100 の化合物の QS 阻害活性を調べた。

(2) GBAP アンタゴニストのドラッグデザイン

これまでの GBAP 構造活性相関解析により GBAP ring 領域中に存在する Phe7 および Trp10 は受容体との結合に必須であることが示されている。この結果を踏まえ、我々はまず、GBAP ring 領域中で結合に必須でない残基全てを Ala に変換した [Ala<sup>4,5,6,8,9,11</sup>]Z-GBAP を推定受容体結合スキキャフォールドとして化学合成した。このペプチドのゼラチナーゼ生産阻害活性を評価した結果、腸球菌のゼラチナーゼ発現を微弱ながら阻害したことから、合成されたペプチドは受容体結合型アンタゴニストの基本骨格となり得ることが示された。次に、このペプチドを基に各アミノ酸残基を1つずつ GBAP に近づけていくことでアンタゴニスト活性を段階的に向上させる、独自の阻害剤設計戦略「リバースアラニンスキャン」を行った。

## 4. 研究成果

(1) 天然物化合物を対象とした QS 阻害剤のスクリーニング

2 株の放線菌ブタノール抽出物および 1 株の糸状菌抽出物が有効的にブドウ球菌の *agr* および腸球菌の *fsr* の両クオラムセンシング系を有効的に阻害することを見出した。さらに、逆相 HPLC を中心に用いる精製により、それぞれの抽出物から単一のピークで活性を示すフラクションを得ることに成功した。

(2) GBAP アンタゴニストのドラッグデザイン

アンタゴニストスキキャフォールド [Ala<sup>4,5,6,8,9,11</sup>]Z-GBAP (25%阻害) からリバースアラニンスキャンにより、[Ala<sup>4,5,6,9,11</sup>]Z-GBAP (27%阻害) → [Ala<sup>5,6,9,11</sup>]Z-GBAP (44%阻害) → [Ala<sup>5,9,11</sup>]Z-GBAP (57%阻害) と段階的に阻

害活性を向上させることに成功した（カウコ内は野生株培養液に各ペプチドを 100  $\mu$ M 添加した際のゼラチナーゼ生産阻害活性）。次に、[Ala<sup>5,9,11</sup>]Z-GBAP 配列中、5 番目残基を種々のアミノ酸に置換することで阻害活性の向上を試みた。その結果、非常に強い阻害活性（IC<sub>80</sub> = 100 nM）を示す [Tyr(Bzl)<sup>5</sup>,Ala<sup>9,11</sup>]Z-GBAP (ZBzl-YAA5911 と命名)を獲得することができた。最後に、このペプチドの生体内での QS 阻害作用を調べるため、愛媛大学鈴木崇助教協力の下、ZBzl-YAA5911 が及ぼすウサギ眼内炎モデルへの影響を調べた。この感染モデルは白内障手術によって引き起こされる眼内炎を模したものであり、腸球菌が生産するゼラチナーゼによって病態は進行する。結果的として ZBzl-YAA5911 は眼内炎モデルにおいて腸球菌の前眼房から硝子体への侵入を有意に阻害し、また網膜機能の低下を有意に抑えた。このことから ZBzl-YAA5911 は生体内においても QS 阻害を示すことが明らかとなった。

以上、我々は腸球菌の QS 阻害剤創製を目指し、GBAP アンタゴニストのデザインを試みた。まず我々は独自の阻害剤設計戦略であるリバースアラニンスキャンを行う事で、受容体バインディングスキファールドのもつ阻害活性を段階的に高めることに成功した。今回、このような結果が得られたのは、ペプチドの立体構造が徐々に GBAP に近づくことで受容体との親和性が向上したためであると考えられる。次に我々はここで得られたペプチドの 5 番目残基にさらなる修飾を加えたところ、100 nM という非常に低濃度でも 80%（コントロール群との比較）のゼラチナーゼ生産阻害活性を示すアンタゴニスト ZBzl-YAA5911 の獲得に成功した。また、このペプチドはウサギ眼内炎モデルにおいても QS 阻害作用を示し、それによって病状の悪化を防ぐ効果があることが証明された。以上の事から今回得られた ZBzl-YAA5911 は QS を標的とする抗感染症剤として有効であることが示された。今後、得られたペプチドにさらなる修飾を加えることでより強いアンタゴニストの獲得が可能であると期待される。

近年、薬剤耐性菌の出現、あるいはそれらによる院内感染が医療の現場で大きな問題となっている。抗生物質耐性菌の出現を

抑えるにはその使用量を減少させることが有効であると考えられており、このことから QS 阻害剤開発への期待は高まっている。本研究で QS 阻害剤によって腸球菌の感染を抑えることが可能であると示されたことから、さらなる研究が進むことで将来的には殺菌作用を示さず、毒性遺伝子発現のみ抑える薬剤が開発されることが考えられる。

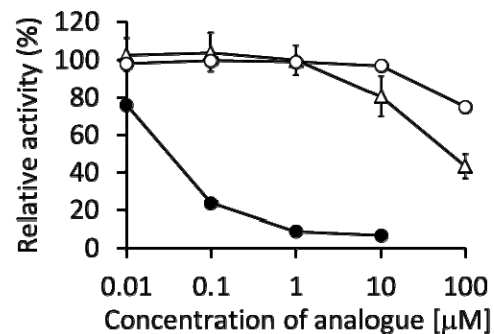


図 1. Effects of various concentrations of GBAP derivatives on gelatinase production by *E. faecalis* OG1RF. The wild type strain, *E. faecalis* OG1RF, was grown for 5 h in the presence of different concentrations of [Ala4,5,6,8,9,11]Z-GBAP (opened circle), [Ala5,9,11]Z-GBAP (triangle) and ZBzl-YAA5911 (closed circle), and then gelatinase activity at A540 in the culture supernatant were determined. The data are averages  $\pm$  standard deviations of duplicate determinations.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① S. G. Patching, S. Edara, P. Ma, J. Nakayama, R. Hussain, G. Siligardi, M. K. Phillips-Jones “Interactions of the intact FsrC membrane histidine kinase with its pheromone ligand GBAP revealed through synchrotron radiation circular dichroism” *Biochim. Biophys. Acta* 1818(7):1595-1602 (2012).
- ② N. Teixeira, S. Santos, P. Marujo, R. Yokohata, V. Iyer, J. Nakayama, L. E. Hancock, P. Serror, M de Fátima Silva Lopes “Incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* is due to

- shutting off the ability to respond to the GBAP quorum-sensing signal“ Microbiology. 158(2):519-528 (2012).
- ③ P. Ma, K. Nishiguchi, H. M. Yuille., L. M. Davis, J. Nakayama, M. K. Phillips-Jones “Anti-HIV siamycin I directly inhibits autophosphorylation activity of the bacterial FsrC quorum sensor and other ATP-dependent enzyme activities” FEBS Lett, 585: 2660-2664 (2011).
  - ④ S. Horita, Y. Yamanaka, A. Yamamura, A. Okada, J. Nakayama, K. Nagata, M. Tanokura “Crystallization and preliminary X-ray analysis of a putative sensor histidine kinase domain: the C-terminal domain of HksP4 from Aquifex aeolicus VF5” Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 67:803-807 (2011).
  - ⑤ Nishiguchi, K., Nagata, K., Tanokura, M., Sonomoto, K., Nakayama, J. “Structure-activity relationship of gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis*” J. Bacteriol. 191(2): 641-650 (2009).
  - ⑥ Nakayama, J., Uemura, Y., Nishiguchi, K., Yoshimura, N., Igarashi, Y., Sonomoto, K. “Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in gram-positive bacteria” Antimicrob. Agents Chemother. 53(2): 580-586 (2009).
  - ⑦ 中山二郎 “細菌の世界における細胞間ケミカルコミュニケーションとその分子メカニズム” 腸内細菌学雑誌、Vol. 25, pp.221-234 (2011).
  - ⑧ 佐藤まみ、中山二郎 “グラム陽性細菌のクオラムセンシング研究の最前線” 日本乳酸菌学会誌、21(2), 95-106 (2010).
  - ④ 佐藤まみ、中山二郎、西口賢三、園元謙二 “リバーサアラニンスキャン法による腸球菌のクオラムセンシングによる腸球菌のクオラムセンシング自己誘導因子 GBAP’ のアンタゴニスト創製” 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 28 日, 東京都世田谷区東京大学駒場キャンパス.
  - ⑤ 山中陽介、片山秀和、山村明裕、堀田彰一郎、早川江、西口賢三、佐藤まみ、園元謙二、中山二郎、永田宏次、田之倉優 “腸球菌のクオラムセンシング自己誘導因子 GBAP’ のチオラクトン誘導体の合成とその受容体 FsrC との相互作用解析” 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 28 日, 東京都世田谷区東京大学駒場キャンパス.
  - ⑥ 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” 5th International Peptide Symposium, 2010 年 12 月 9 日, 京都府京都国際会館.
  - ⑦ Jiro Nakayama, Kenji Sonomoto “Development of inhibitors targeting fsr quorum sensing system of *Enterococcus faecalis*” 3rd ASM Conference on Enterococci, 2010 年 8 月 1 日, 米国オレゴン州ポートランド.
  - ⑧ 横畑綾治、佐藤まみ、西口賢三、園元謙二、中山二郎 “リバーサアラニンスキャン法に基づいた腸球菌のクオラムセンシングによる腸球菌のクオラムセンシング自己誘導因子 GBAP’ のアンタゴニスト創製” 日本農芸化学会 2011 年度大会. 2011 年 3 月 26 日, 京都府京都女子大学.
  - ⑨ 横畑綾治、佐藤まみ、西口賢三、園元謙二、鈴木崇、中山二郎 “リバーサアラニンスキャン法による腸球菌のクオラムセンシング阻害剤 ZBzl-YAA5911 の創製” 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学.
  - ⑩ Jiro Nakayama “Discovery and Development of Inhibitors Targeting Cyclic Peptide-mediated Quorum Sensing in Gram-positive Pathogens” 4th ASM conference on cell-cell communication in bacteria” 2011 年 11 月 8 日, 米国マイアミ.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 佐藤まみ、西口賢三、園元謙二、中山二郎 “腸球菌のクオラムセンシングを制御する環状ペプチド GBAP の構造活性相関解析” 第 16 回日本生物工学会九州支部大会, 2009 年 12 月 5 日, 福岡県飯塚市九州工業大学.
- ② 中山二郎 “グラム陽性細菌のクオラムセンシング研究の最前線” 2009 年度日本乳酸菌学会秋期セミナー, 2009 年 11 月 27 日, 東京都世田谷区東京農業大学.
- ③ Jiro Nakayama “Development of inhibitors targeting cyclic peptide-mediated quorum sensing of gram-positive bacteria” 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 30 日, 東京都世田谷区東京大学駒場キャンパス.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

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

ml

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