

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04728

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーによる細胞内寄生菌生存・増殖戦略の解析

研究課題名(英文)High-throughput screening for chemical compounds which restrict intracellular bacteria

研究代表者

永井 宏樹 (Nagai, Hiroki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80222173

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)：病原菌レジオネラは、ヒトに感染すると肺の細胞の中で増殖し、重篤な肺炎を引き起こします。本研究では、レジオネラの宿主細胞中での増殖を特異的に阻害する化合物の探索を行い、30種弱の候補化合物を得ることができました。候補化合物のなかには、これまで病原体の増殖に関与すると知られていなかった、宿主細胞内のプロセスを阻害するものがありました。これらの成果は、新たな作用機序の抗菌剤の開発につながるものです。

研究成果の概要(英文)：Legionella pneumophila is a causative bacterium of a severe form of pneumonia known as legionellosis. We conducted high-throughput screening for chemical compounds which specifically impair Legionella growth within host cells. Some of the compounds we have identified appear to target host cellular pathways which have never been implicated in intracellular survival and replication of microorganisms.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 化合物ライブラリ 細胞内寄生

1. 研究開始当初の背景

一般に、真核細胞に貪食された微生物は、ファゴソーム成熟の進行にともない、リソソーム融合を経て分解系で排除される。また近年、真核生物が普遍的に持つオートファジーが、選択的に真核細胞内へ侵入した微生物を排除する働きを持つことが明らかになってきた。宿主細胞はこれら微生物の分子パターン(PAMPs)を認識し自然免疫応答を誘導することにより、宿主細胞自身もつ殺菌能を活性化したり、サイトカイン放出により他の免疫細胞を制御したり、あるいは自分自身の細胞死を誘導する。細胞内寄生性の微生物はこれらに代表される宿主側の感染免疫に抗して、細胞内生存・増殖を可能にするニッチを形成する必要がある。

我々が主として研究している細胞内寄生性病源菌レジオネラは、自然界では広く土壌・淡水環境中に分布するグラム陰性桿菌である。汚染された温泉水を吸引するなどして一旦レジオネラが人間の肺胞へ到達すると、肺胞マクロファージに感染・増殖し最終的に致死性の肺炎(レジオネラ症)を引き起こす。レジオネラは自身が持つ IV 型分泌装置により宿主細胞内へ輸送される、300 超という膨大な数のエフェクタータンパク質を用いて、細胞内生存・増殖を可能にしている。しかしながらエフェクタータンパク質、およびそれが標的とする宿主細胞内プロセスには高度の冗長性があると考えられ、コンベンショナルな遺伝学・逆遺伝学的手法などによるレジオネラの生存・増殖戦略の還元論的解析には一定の限界がある。

近年、ケミカルバイオロジーと呼ばれる手法が脚光を浴びている。ここでは系に加える化合物に対する応答を表現形ととらえ、しばしばトランスクリプトームなどのオミクス解析と組み合わせられた表現形解析が展開される。これまでの研究により、我々は GFP, mCherry などの蛍光タンパク質遺伝子や発光細菌 *Photorhabdus luminescens* の *lux* オペロン(Coers et al. *Cell. Microbiol.* 2006)を組み込んだレジオネラを利用することにより、宿主細胞中のレジオネラ生存・増殖能を、蛍光・発光の経時的モニタリングにより極めて簡便に計測する系を構築している。特に *lux* オペロン組み込みによる化学発光系は、一般によく利用されているルシファラーゼを利用したレポーター系と大きく異なり、計測時に基質ルシフェリンを投入する必要がなく、高感度かつ低バックグラウンドであることから、ハイスループットスクリーニングに好適である。我々は、この化学発光レジオネラを利用することにより、レジオネラの宿主細胞内増殖を特異的に阻害する化合物を、効率よく簡便にスクリーンできると考えた。このような化合物が同定できれば、その標的と

なる細胞内プロセスを解析することにより、宿主細胞内生存・増殖に必要なメカニズムを明らかにすることができる。

2. 研究の目的

レジオネラを始めとする細胞内寄生菌の生存・増殖戦略を明らかにし、また新規作用機序を持つ抗菌剤のリード化合物同定を目的とし、以下の研究を遂行する。

- (1) 化学発光レジオネラを利用したハイスループットスクリーニング系により、マクロファージ内レジオネラ増殖を阻害する化合物の大規模化合物ライブラリからのスクリーニングを行う。
- (2) これまでのパイロットスクリーニングによるものも含め、スクリーニングにより得られた候補化合物について、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) レジオネラの宿主細胞内増殖を阻害する化合物の一次スクリーニング
lux オペロンによる化学発光系は、一般によく利用されているルシファラーゼを利用したレポーター系と大きく異なり、計測時に基質ルシフェリンを投入する必要がないため、実際のスクリーニングは非常に簡単である。96 穴フォーマットで提供を受けた化合物ライブラリを、発光測定用白色不透明 96 穴プレートにリプレートしたマウスマクロファージに加える。発光レジオネラを MOI=1 で感染させ、その後 37 度で共培養する。感染一時間後から一定時間ごとに、プレートリーダーにより発光(RLU)を測定する。コントロールである DMSO 添加群に比べ感染 48-72 時間後の RLU 値が有意に減弱するものを候補化合物とする。
- (2) 候補化合物の 2 次スクリーニング
上記 1 により得られた候補化合物は、コンベンショナルな抗生物質のように細菌の細胞外増殖を阻害するものや、マクロファージを傷害することにより結果として細胞内増殖の阻害が観察されるものを含んでいる。一次スクリーニングにより得られた候補化合物について、AYE 液体培地中でのレジオネラ増殖能、および CytoTox-Glo 細胞毒性試験などにより、目的外の化合物を除外する。これらのアッセイはいずれも 96 穴フォーマットにおいて迅速に実施できる
- (3) 候補化合物の作用機序の解析
以上のスクリーニングにより得られたレジオネラの宿主細胞内増殖を阻害するが、レジオネラの単独増殖・宿主細胞の

生存を阻害しない化合物について、レジオネラ以外の細胞内寄生菌への効果も考慮しつつ、その作用機序の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 化合物ライブラリのスクリーニング

研究期間前に概念実証研究として行ったスクリーニングより、1種の候補化合物(グループA)を得ていた。これに加え、本研究期間内に、研究代表者が平成28年度まで所属していた大阪大学の産学連携本部から提供を受けた大規模化合物ライブラリ Enamine PDR subset 2000、および生理活性物質ライブラリ LOPAC1280、のスクリーニングを行った。1, 2次スクリーニングの結果として、前者から3種(グループB)、後者から24種(グループC)の候補化合物を得ることができた。

(2) グループA化合物の作用機序の解析

この化合物は、我々がスクリーニングに利用した *Legionella pneumophila* 以外のレジオネラ属菌だけでなく、細胞内寄生菌サルモネラや細胞内寄生性原虫であるトキソプラズマの細胞内増殖を抑制するという点で、非常に興味深いものであった。この化合物の真核細胞に対する作用について検討を行った結果、古くから知られている一群の疎水性アミンと同様に、細胞内のコレステロール輸送を阻害することを見出した。一般的にこの現象は、NPC1 コレステロール輸送経路の阻害によるものと理解されているのであるが、NPC1 をロックダウンした細胞中でのレジオネラ、サルモネラの増殖には阻害がみられなかったため、グループA化合物によるレジオネラ、サルモネラの宿主細胞内増殖阻害は、コレステロール輸送系阻害以外の原因によるものと考えられた。

(3) グループB化合物の作用機序の解析

3種のグループB化合物はいずれも宿主細胞への傷害活性は認められなかったが、液体培地中におけるレジオネラ単独増殖能のスクリーニングにおいて、若干の阻害活性を示していた。うち1種については、単独増殖の阻害活性では、宿主細胞内増殖の阻害の程度を説明できないと考えられたため、より詳細な検討のため試験管スケールでの培養実験を試みた。しかしながら期待に反して、同じ薬剤濃度であるにもかかわらず、培地中増殖が完全に阻害されたため、この化合物を含めて3種とも、コンベンショナルな抗菌活性を有するため、その結果として細胞内増殖を阻害しているものと考えられた。なお、これら3種の化合物は、既知の抗菌剤とは全く異なる骨格を持っていた。

(4) グループC化合物の作用機序の解析

グループC化合物のスクリーニング元である LOPAC1280 は、生理活性が既知の化合物のライブラリであるため、生理活性により候補化合物を分類した。候補として得られた24種の化合物のなかには、グループA化合物と同じ作用機序を持つと予測されるものが4種、Wortmannin など宿主細胞のPI3キナーゼの阻害剤と考えられるものが2種含まれており、これまでの知見と一致した。これらに加えて、予測していなかった細胞内経路の阻害剤が複数得られたことは、既知の生理活性物質ライブラリのスクリーニングにより、レジオネラ細胞内増殖に必要な宿主細胞内経路について、新たな知見が得られることを示している。今後の研究により、今回の研究により明らかとなった細胞内経路の役割について明らかにしていきたい。

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7件)

1. Hubert Hilbi, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori and Craig R. Roy, Subversion of Host Membrane Dynamics by the *Legionella* Dot/Icm Type IV Secretion System. **Current Topics in Microbiology and Immunology** **413**, 2018 in press, 10.1007/978-3-319-75241-9_9 (査読有)
2. Kubori Tomoko, Kitao Tomoe, Ando Hiroki, Nagai Hiroki, LotA, a *Legionella* deubiquitinase, has dual catalytic activity and contributes to intracellular Growth, **Cell. Microbiol.**, e12840 ~ e12840, 2018, 10.1111/cmi.12840 (査読有)
3. Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Isolation of the Dot/Icm Type IV Secretion System Core Complex from *Legionella pneumophila* for Negative Stain Electron Microscopy Studies, **Bio-protocol**, e2229, 2017, 10.21769/BioProtoc.2229 (査読有)
4. Kubori Tomoko, Bui Xuan T., Hubber Andree, Nagai Hiroki, Legionella RavZ Plays a Role in Preventing Ubiquitin Recruitment to Bacteria-Containing Vacuoles, **Frontiers Cell. Infection Microbiol.**, **7**, 384, 2017, 10.3389/fcimb.2017.00384 (査読有)
5. Hubber A, Kubori T, Coban C, Matsuzawa T, Ogawa M, Kawabata T, Yoshimori T, Nagai H, Bacterial secretion system skews the fate of *Legionella*-containing vacuoles towards LC3-associated phagocytosis.

- Sci. Rep.**, **7**, 44795, 2017,
10.1038/srep44795 (査読有)
6. Kubori T, Nagai H. The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. **Curr Opin Microbiol** **29**, 22-29, 2016, 10.1016/j.mib.2015.10.001 (査読有)
 7. Kuroda T, Kubori T, Thanh Bui X, Hyakutake A, Uchida Y, Imada K, Nagai H. Molecular and structural analysis of *Legionella* DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. **Sci Rep** **5**, 10912, 2015.
10.1038/srep10912 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Hiroki Nagai, T4BSS: a pivotal tool to establish intracellular lifestyle of bacteria, 5th International Symposium of the Collaborative Research Centre 766 (SFB766): The Bacterial Cell Envelope, May 15-17, 2017, Universität Tübingen, Germany(招待講演) (国際学会)
2. Hiroki Nagai, T4BSS: a pivotal tool to establish intracellular lifestyle of bacteria, T4SS 2016, Dec 8-11, 2016, Schloss Hirschberg, Germany(招待講演) (国際学会)
3. 永井宏樹, レジオネラの分泌装置とエフェクターから紐解く感染細胞内での卓越した宿主細胞支配機構、第 31 回日本微生物生態学会大会、2016 年 10 月 25 日、日本大学藤沢キャンパス (招待講演)
4. Hiroki Nagai and Tomoko Kubori, Type IVB Secretion System as an Essential Tool for Intracellular Life, 2016 年 05 月 13 日, 第 13 回韓日国際微生物学シンポジウム, Gyeongju, Korea (招待講演) (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学におけるホームページ

<http://nagai lab.biken.osaka-u.ac.jp/>

岐阜大学におけるホームページは現在整備中であるが、以下の URL で旧版を公開している。

<https://sites.google.com/site/nagai labj p/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

永井 宏樹 (NAGAI, Hiroki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 80222173