

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08001

研究課題名(和文) 型分泌装置阻害剤のケミカルバイオロジー解析と新たな天然物リガンドの発掘

研究課題名(英文) Chemical biology analysis of type III secretion system inhibitors and discovery of novel natural ligands

研究代表者

浅見 行弘 (Asami, Yukihiro)

北里大学・感染制御科学府・特任講師

研究者番号：70391844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：特異的に結合するタンパク質を同定した。一つは結合タンパク質として知られているEF-Tuと結合未知の遺伝子Xであった。タンパク質Xについて、遺伝子欠損株、ベクター相補株、および遺伝子X相補株をそれぞれ作製し、溶血阻害活性およびT3SSを構成する分泌タンパク質であるEspタンパク質群の分泌を検出した。その結果、遺伝子X欠損株で溶血活性は消失した。遺伝子X相補株では溶血活性は部分的に回復した。さらに、遺伝子X欠損株でEspA、B、CおよびDの分泌量は減少した。遺伝子X相補株ではその分泌量の減少が部分的に回復した。したがって、遺伝子XがT3SSの発現に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have identified proteins that selectively bind a T3SS inhibitor, including its known ligand EF-Tu (elongation factor thermo unstable) and protein X encoded by gene X. For this target molecule, three strains were created: a gene X knockout strain, a vector complementary strain, and a gene X complementary strain. Inhibition of hemolysis and secretion of Esp (enterococcal surface protein) family proteins, which are components of the T3SS, were measured in these strains. As a result, hemolysis was found to be inactivated in the gene X knockout strain. This inactivation was partially recovered in the gene X complementary strain. Furthermore, secretion of Esp A, B, C, and D were decreased in the gene X knockout strain. The decrease in secretory levels was partially recovered in the gene X complementary strain. These results indicate that gene X is involved in T3SS expression and also regulates hemolytic activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：型分泌装置 天然物化学

### 1. 研究開始当初の背景

病原性グラム陰性細菌では、型分泌機構により菌体外に様々な毒素タンパク質を分泌、あるいは宿主細胞内にエフェクターと呼ばれる機能性タンパク質を注入することで、宿主の生理機能を攪乱させることが知られている。したがって、従来の化学療法剤のような作用を有する薬剤に加えて、今後は病原体の病原性をコントロールできる薬剤や宿主の免疫力を高める薬剤等を含めた抗病原性細菌薬の研究開発には意義があると考えられている。

サルファ薬やペニシリンの導入以来、現在に至っても化学療法剤に対して耐性を示す病原体の出現が、深刻な問題となっている。また、治療法が未だに確立されていない感染症も多く、新たな化学療法剤が望まれている。一方、近年、病原性細菌をはじめとした病原体の個々の病原性因子の役割がより詳細に解明され、病原性細菌の宿主への付着や侵入などの病原性に関わる遺伝子や、そのメカニズムが徐々に解明されてきており、これらは新規薬剤の標的として期待されている。

したがって、従来の化学療法剤のような作用を有する薬剤に加えて、病原体の病原性をコントロールできる薬剤や宿主の免疫力を高める薬剤等を含めた抗病原性細菌薬の研究開発には意義があると考えられる。そこで、菌の「生存」ではなく「感染過程」に作用して効果を示す薬剤を開発できれば、既存の抗菌薬の持つ問題を克服できると考えてきた。緑膿菌や O-157 などに代表されるグラム陰性病原細菌の「感染過程」で働く

型分泌機構に着目した(図1)。型分泌機構はグラム陰性病原細菌に高度に保存されている病原性因子宿主移行メカニズムであり、これら細菌が宿主に感染し病原性を発現する際に本機構が必須であることが近年明らかにされつつある(Kauppi, AM. et al. *Chem. Biol.* 2003, 10, 241-249.)。

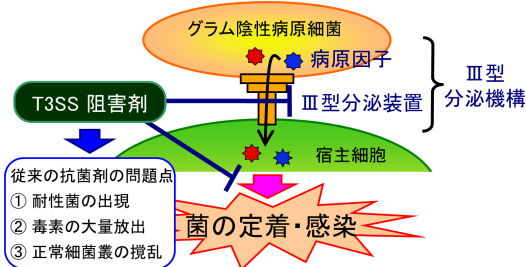


図1. III型分泌装置の活性発現機構とT3SS阻害剤  
グラム陰性病原細菌 III型分泌装置 (以下 T3SS) とは、腸内細菌科 (EPEC、EHEC O-157、サルモネラ菌、赤痢菌 etc.)、ボルデテラ属細菌、植物病原菌などに高度に保存されており、病原菌の宿主への感染過程において病原因子宿主移行装置として機能する。その一方、T3SSは菌の生存に必須ではない。

### 2. 研究の目的

グラム陰性菌 型分泌機構阻害物質 aurodox の標的タンパク質を同定し、型分泌機構の病原性発現を抑制する aurodox (図2) の化学構造部位と標的タンパク質との分子レベルでの相互作用を明らかにする。

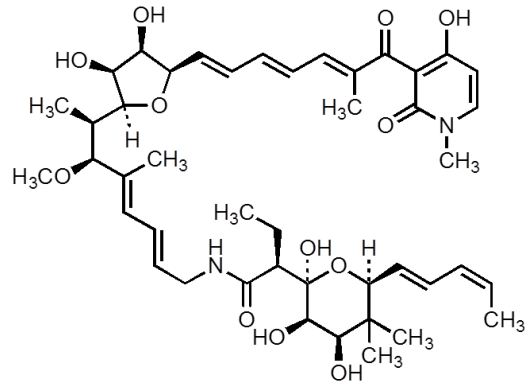


図2. Aurodoxの化学構造

### 3. 研究の方法

Aurodox/agarose-beads 化体を用いて、腸管病原性大腸菌 (以下 EPEC, enteropathogenic *E. coli*) の cell lysate から 型分泌機構阻害に必須な標的タンパク質を同定する。また、標的タンパク質の遺伝子を破壊した EPEC 変異株を作製し、独自の 型分泌機構阻害評価系を基に、型分泌機構の病原性発現に影響を及ぼすことを分子生物学的な実験により検証する。

これらの実験により同定された標的タンパク質について、トランケート体を数種類作製および精製し、aurodox/agarose-beads 化体を用いた競合実験を行い、その結合ドメインを同定する。その後、ピアコア等を用いて aurodox と標的タンパク質の結合定数を算出する。

### 4. 研究成果

標的タンパク質を釣り上げるためのリガンド作製は、叶らによって報告されている光親和型小分子固定化法を改良した開裂型リンカーを導入した agarose-beads を用いた (Kano, N. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2003, 42, 5584-5587. Kano, N. et al. *Bioconj. chem.* 2010, 21, 182-186)。ブルダウン実験により、aurodox 結合タンパク質を検出した。EPEC の cell lysate と aurodox/agarose-beads 化体をローテーターにより各種の条件でインキュベーションし結合条件を最適化した。結合反応後に、SDS-PAGE による分析から特異的な結合タンパク質バンドをクマシーブリリアントブルー染色法により検出した。結合タンパク質群を抽出し、LC-MS/MS およびマスコット解析から標的タンパク質候補群を同定した。現在までに、aurodox/agarose-beads 化体を用いて、特異的に結合する2つのタンパク質の検出に成功した。加えて、平成 27 年度は調製・供給された糸状菌培養物 2,208 サンプルおよび放線菌培養物 1,760 サンプルの合計 3,968 サンプルを用いて、EPEC を検定菌として羊赤血球の溶血阻害活性を指標に 型分泌機構阻害剤の探索を実施した。結果として、

*Streptomyces* sp. K14-0012 株培養物より、guadinomine A および B をそれぞれ単離・構造同定した。

平成 28 年度は特異的に結合するタンパク質について標的分子としての妥当性を検証した。結合タンパク質の一つは既に結合タンパク質として知られている EF-Tu であり、残り一つはタンパク質 X であった（論文未発表のため未記載）。EF-Tu が 型分泌機構の発現に關与しているか否かを検証するために、EF-Tu 阻害剤として知られている pulvomycin の 型分泌機構による溶血阻害活性および抗菌活性を調べた。その結果、 型分泌機構阻害剤である aurodox と比較し、pulvomycin は tetracycline と同様な阻害活性プロファイルを示したことから、EF-Tu 阻害活性が 型分泌機構の機能に關与しないことが示唆された。次に、標的分子候補タンパク質 X について、遺伝子 X 欠損株、ベクター相補株、および遺伝子 X 相補株をそれぞれ作製し、溶血阻害活性および 型分泌機構を構成する分泌タンパク質である Esp タンパク質群の分泌を検出した。その結果、遺伝子 X 欠損株で溶血活性は消失した。遺伝子 X 相補株ではその溶血活性は部分的に回復した。さらに、遺伝子 X 欠損株で EspA, B, C および D の分泌量は減少していた。遺伝子 X 相補株ではその分泌量の減少が部分的に回復した。この結果から、遺伝子 X が 型分泌機構の発現に關与し、溶血活性を制御していることが明らかとなった。

平成 29 年度は、MALDI-TOF/MS 実験において特異的に結合する 2 種類のタンパク質について再解析した。これまでの結果を別方法で検証するために、iTRAQ タンパク質発現・相対定量解析を行った。本解析方法は 2 つのサンプルを用い、片方のサンプルを基準とした時、もう一方のサンプルで“あるタンパク質”が何倍検出されたかを解析する方法である。今回の場合 aurodox の対象として tetracycline を用いた。理由として、aurodox は EF-Tu に作用することにより、タンパク質合成を阻害すると言われている。そのため、近い作用点を持つ tetracycline を用いることで、 型分泌機構に与える阻害活性の違いが浮き彫りになると考えた。それぞれのピーズを既存の方法にそって作製し、サンプルを作製、解析した。それぞれの agarose-beads でおよそ 3,000 個のタンパク質が同定され、tetracycline-beads に比べて aurodox-beads で優先的に同定されているタンパク質 143 種類 ( $p < 0.06$ ) について分類した。これらタンパク質は 10 種類に分類され、EF-Tu、標的タンパク質候補 X が再度検出された。したがって、異なる解析方法を用いてもこれらタンパク質が検出されることがわかった。一つは既に結合タンパク質として知られている EF-Tu であり、残りはタンパク質 X であった。さらに、標的タンパク質 X の溶血活性に必要な機能部位の同定を行った。アミノ酸配列の C 末

端側をいくつかの長さで欠損させた標的タンパク質 X 欠損変異株を作製し、溶血活性が回復する部位の同定をおこなった。その結果、溶血活性に必要なタンパク質 X のドメインを同定した。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

浅見 行弘、微生物二次代謝産物からの抗感染症薬シード化合物の探索、平成 29 年度沖縄県委託事業「成長分野リーディングプロジェクト創出事業」シンポジウム、2017 年 12 月  
浅見 行弘、微生物資源からの抗感染症薬シード化合物の探索、第 64 回日本化学療法学会東日本支部総会第 66 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2017 年 10 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-labP1.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

浅見 行弘 (ASAMI, Yukihiro)  
北里大学北里生命科学研究所・特任講師  
研究者番号：70391844

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )