

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15128

研究課題名(和文) 難治性慢性感染症治療薬となるAnti-persister 化合物の探索研究

研究課題名(英文) Identification and development of anti-persister compounds as a new class of antibiotics to treat chronic infection

研究代表者

山本 友子 (Yamamoto, Tomoko)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任教授

研究者番号：60110342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、感染症の難治化・慢性化をもたらす抗菌薬抵抗のdormant cellに作用する治療薬の創生を目指して、候補化合物の探索を行った。原理は、ClpPがdormant cellの増殖再開に関与することを示した我々の研究成果に基づいており、ClpP活性化化合物を探索し、ヒット化合物について抗菌活性を評価した。候補化合物のひとつACP1bは、排出ポンプ阻害剤との併用により、緑膿菌を含む多種の細菌に抗菌活性を示した。本結果は、ClpP活性化物質がdormant cellに作用して抗菌活性を発揮しうることを示唆しており、難治性慢性感染症治療薬の開発に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Chronic infection is often difficult to treat, even when caused by a pathogen that is not resistant to antibiotics. In most cases, chronic infections are accompanied by dormant persisters. In this study, we aim to identify anti-persister compounds toward a goal of development of antibiotics for chronic infection. Our previous studies on ClpXP protease allowed us to hypothesize that the dysregulation of proteolysis by activation of ClpP core in the absence of the regulatory ClpX may corrupt physiology of dormant persisters. We conducted high-through-put screening of compounds with activity provoking ClpP by exploiting the chemical libraries. We have found that one of the hit-compounds, ACP1b with originally no anti-bacterial activity can kill a variety of bacteria including an opportunistic pathogen *P. aeruginosa*, in combination with an inhibitor of bacterial efflux-pump. This study will provide innovative perspectives on developing a new class of antibiotics to treat chronic infection.

研究分野：細菌学

キーワード：難治性感染症薬 anti-persister ClpP

1. 研究開始当初の背景

World Health Report は、世界の年間死亡数は約 5700 万人 (2008 年統計) その最大の死因は感染症であると報告している。日本では、肺炎による死亡者数が、がん、心疾患に次いで第 3 位となった (2011 年の人口動態統計)。感染症の制御は、地球規模で対応すべき喫緊の課題となっている。日本を含む先進国での感染症の特徴のひとつは、医療の高度化に伴う慢性化・難治化の進行である。この現象には、様々な因子が関連しているが、とりわけ抗菌薬による化学療法が功を奏しない事態は最も深刻である。抗菌薬で慢性感染菌を排除できない根本的な理由は、細菌が慢性感染部位で代謝を止めて休眠状態をとっていることにある。すなわち、既存の多くの抗菌薬は、増殖中の細菌の代謝に作用して菌を死滅させるが、休眠中の細菌 (dormant cell あるいは persister と呼ばれる) は、代謝を止めているがゆえに抗菌作用から逃れ、持続的な感染を可能にしている。従って難治性慢性感染症の治療には、休眠状態の菌の増殖を再開させ、既存の抗菌薬への感受性を誘導する薬剤 (Anti-persister drug) の開発が不可欠と考えられる。本研究では、難治性慢性感染症治療法の創成を目指して、治療薬のシードとなる Anti-persister 化合物の探索・同定を企図した。

本研究の着想は、申請者らの長年にわたる ClpP に関する研究成果に基づいている。ClpP は多くの細菌に高度に保存された重要な ATP-dependent Protease である。我々はこれまで、ClpP が細菌の多様な機能タンパク質を特異的に認識・分解することにより、細菌の生育に重要な役割を果たすことを報告してきた。中でも本課題に関連する重要な発見は、飢餓状態で一旦増殖を停止した細菌が、栄養を得て増殖を再開するために ClpP によるタンパク分解が重要となることである (Fig.1) この事実は、ClpP 活性化物質が dormant cell を抗菌薬感受性の増殖細胞に転換させる可能性を示唆している。

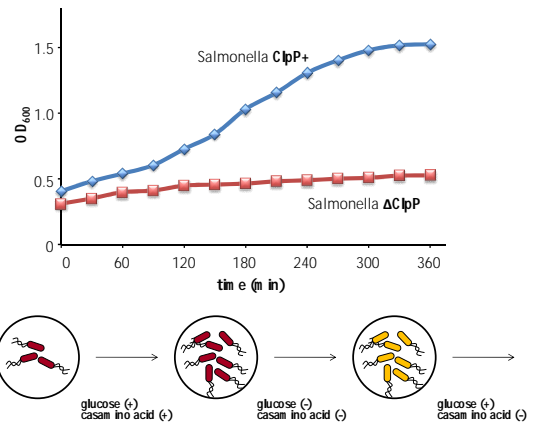


Fig.1 ClpP is responsible for restarting growth of glucose-starved cells.

2. 研究の目的

本研究では、上記の事実に基づき、ClpP 活性化物質の中から、dormant cell の増殖を再開させて抗菌活性を發揮する薬剤、あるいは既存の抗菌薬の有効性を高める薬剤のシードとなる Anti-persister 化合物を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *in vitro* ClpP プロテアーゼ活性測定システムの構築: ClpP 高発現大腸菌を用いて、ClpP の大量精製を行った。ClpXP の特異的基質タンパク質として用いる GFP-SsrA を高発現大腸菌より分離し精製した。ClpP の非特異的基質として FTC-casein を用いた。
- (2) ClpP 活性化化合物の探索: 「千葉大学分子キラリティ研究センター」より提供された化合物ライブラリを対象に、ClpP 活性化物質の探索を行った。
- (3) 抗菌活性の測定: 候補となった化合物の 2 段階系列希釈液を用い、定法に基づき MIC (最小発育阻止濃度) を測定した。

4. 研究成果

- (1) *in vitro* ClpP プロテアーゼ活性測定システムの構築: ClpP の高発現系を構築し、これを用いて大量精製に成功した。ClpP の活性を、特異的基質 SsrA の分解活性で確認した。SsrA は、シャペロン ClpX により特異的に認識された後、ClpP プロテアーゼドメインに輸送さ

れて分解される (Fig.2)

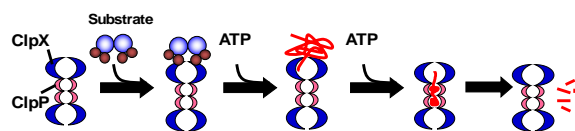


Fig. 2. Schematic presentation of recognition and degradation of specific substrate by ClpP protease with ClpX Chaperones. ClpP is a cylindrical serine protease, which can form complexes with the ATPase chaperone, ClpX. The chaperones bind to target proteins, unfold them, and thread them into the ClpP proteolytic chamber. In the absence of the chaperones, ClpP alone can efficiently degrade small peptides of up to about 30 amino acids.

蛍光タンパク質 GFP を融合させた SsrA の ClpXP による分解反応 (蛍光の消失) は時間に依存して進行したことから、ClpP は活性体として精製されたと結論付けた (Fig.3)

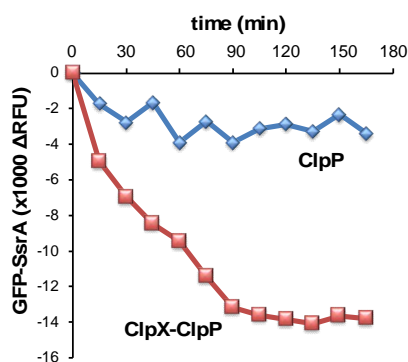


Fig. 3. Specific degradation of GFP-SsrA by ClpP protease in the presence of ClpX chaperone

ClpP は、ClpX ATPase 非存在下では非特異的基質 casein を分解することができる。あらかじめ FTC で標識した FTC-casein を基質、精製した ClpP 標品を用いて、ClpP 活性化化合物のスクリーニング系を構築した。

(2)ClpP 活性化化合物の探索：構築した in vitro ClpP プロテアーゼ活性測定法を用い、「千葉大学分子キラリティ研究センター」より提供された化合物ライブラリーについて ClpP 活性化物質のスクリーニングを行ったが、用いたライブラリーの中からは顕著な活性を示すものは見出せなかった。

(3)カナダ Toronto 大学 Houry 教授との ClpXP に関する共同研究過程で見出された ACP1b は、ClpP による FTC-casein の分解を濃度および時間依存的に増加させた (Fig. 4)

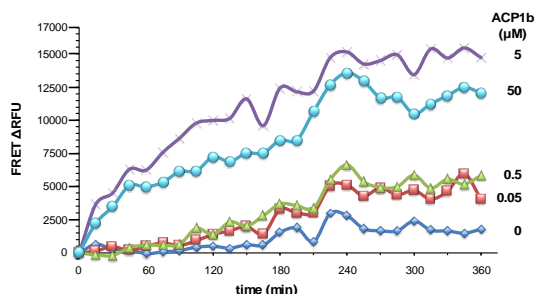


Fig. 4. Degradation of FTC-casein by ClpP protease in the presence of different amounts of ACP1b

(4) ACP1b の抗菌活性および排出ポンプ阻害剤併用効果：黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する ACP1b の MIC (最小発育阻止濃度) は、ともに >128mg/L であり、抗菌活性は認められなかった。

多くの抗菌薬がグラム陰性菌に作用しない要因として、RND 型排出ポンプの存在が知られている。本研究では RND 型排出ポンプ構成因子である AcrB を欠損させることにより大腸菌は ACP1b に感受性 (MIC, < 1mg/L) となることを見出した。さらに、RND 型排出ポンプ阻害剤 PA N との併用により、ACP1b は大腸菌に抗菌活性を示すことを見出した。すなわち MIC は、ACP1b 単独では >128mg/L であったのに対し、併用により < 1mg/L に低下した。又、ACP1b はポンプ阻害剤との併用により、病原性大腸菌 O157、サルモネラ、さらに各種の抗菌薬に耐性な日和見感染菌の緑膿菌にも抗菌活性を示すことが明らかとなった。

本研究の結果は、ClpP 活性化化合物が、新たな作用機構に基づく抗菌薬の候補となる可能性を示唆しており、難治性慢性感染症治療薬の開発に大きく貢献するものである。

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 10 件)

1. Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Naito S, Takaya A, Yamamoto T, Ishiwada N. Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan. *J Infect Chemother.* 23(4):218-223(2017). peer reviewed. doi: 10.1016/j.jiac.2016.12.012.
2. 山本友子 薬剤耐性の分子遺伝学から感染生物学へ(1)薬剤耐性とトランスポゾンの研究 **化学療法領域** 33(1) 112-118 (2017) 査読無
3. 山本友子 薬剤耐性の分子遺伝学から感染生物学へ(2)分子シャペロンとAAA⁺プロテアーゼの研究 **化学療法領域** 33(2) 283-290 (2017) 査読無
4. 山本友子 薬剤耐性の分子遺伝学から感染生物学へ(3) サルモネラの病原戦略と感染生物学 **化学療法領域** 33(3) 447-454 (2017) 査読無
5. Ishiwada N, Takaya A, Kimura A, Watanabe M, Hino M, Ochiai H, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient. *J infect chemother.* 22,187-190 (2016) peer reviewed. doi:10.1016/j.jiac.2015.10.004
6. Shoji T, Takaya A, Sato Y, Kimura S, Suzuki T, Yamamoto T. RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by methyltransferase RlmA in 23S rRNA in *Streptococcus pneumoniae*; interplay between two rRNA methylations responsible for telithromycin susceptibility. *Nucleic Acids Research* 43(18):8964-72(2015) peer reviewed. doi: 10.1093/nar/gkv609
7. Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Molecular characterization of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates in Japan. *J. Atimicrob. Chemother.* 70(3): 658-63 (2015). peer reviewed. doi: 10.1093/jac/dku443.
8. Matsui H, Fukiya S, Kodama-Akaboshi C, Eguchi M, Yamamoto T. Mouse models for assessing the cross-protective efficacy of oral non-typhoidal *Salmonella* vaccine candidates harbouring in-frame deletions of the ATP-dependent protease lon and other genes. *J Med Microbiol.* 64:295-302 (2015). peer reviewed. doi: 10.1099/jmm.0.000014.
9. Hirai S, Yokoyama E, Etoh Y, Seto J, Ichihara S, Suzuki Y, Maeda E, Sera N, Horikawa K, Sato S, Yamamoto T. Putative classification of clades of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 using an IS-printing system. *Lett Appl Microbiol.* 61:267-273 (2015). peer reviewed. doi: 10.1111/lam.12448.
10. Takeuchi M, Yamamoto T. Apoptosis induced by NAD depletion is inhibited by KN-93 in a CaMKII-independent manner. *Exp Cell Res.* 335:62-67(2015). peer reviewed. doi: 10.1016/j.yexcr. 2015.05. 019.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Yamamoto T and Takaya A. Functional Dissection of Salmonella SPI2 injectisome. The OIST International Workshop on Bacterial Flagella, Injectisome and Type III Secretion System, 22th Annual Flagella Meeting, 2017年2月28日~3月5日, OIST(沖縄県・国頭郡)(招待講演)
2. 高屋 明子, 山崎 禅, Christian Maenne, 川島 博人, 常世田 好司, 山本 友子. サルモネラ菌体外成分による骨髄内IgG分泌プラズマ細胞障害. 第90回細菌学会総会、2017年3月19日~3月21日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
3. Kimura N, Yamamoto T, Kawashima H, Takaya A. RNA chaperons CspC and CspE regulate mRNAs induced in *Salmonella* surviving in macrophages after phagocytosis.

- 5th ASM Conference on *Salmonella*. Aug 29-Sep 1, 2016 (Potsdam Germany)
4. Takaya A, Manne C, Yamasaki Y, Kawashima H, Yamamoto T, Tokoyoda K. Reduction of Bone Marrow Immunoglobulin G-secreting Plasma Cells by *Salmonella* Infection. 5th ASM Conference on *Salmonella*. Aug 29-Sep 1, 2016 (Potsdam Germany).
5. 今村 亮俊, 高屋 明子, 今町 直登, 掛田 実穂, 渡辺 千尋, 佐藤 亜以子, 鈴木 穰, 山本 友子, 秋光 信佳 Functional analysis of long noncoding RNAs induced by *Salmonella* infection 第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日～25 日、大阪国際交流センター（大阪府・大阪市）
6. 山崎 禅, 高屋 明子, Christian Maenne, 常世田 好司, 山本 友子 サルモネラ感染による骨髄 B 系列細胞の傷害 第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日～25 日、大阪国際交流センター（大阪府・大阪市）
7. 福岡 弥生, 山本友子, 秋光信佳：非コード RNA を含めた病原体感染時のヒト宿主トランスクリプトーム解析．第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日～4 日 神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）
8. 木村 尚人, 高屋 明子, 山本 友子：RNA シャペロンによるサルモネラのマクロファージ殺菌機構適応メカニズム 第 98 回日本細菌学会関東支部総会 2015 年 10 月 29 日～30 日、東京歯科大学（東京都・千代田区）
9. 木村 旭, 高屋 明子, 石和田 稔彦, 山本 友子：臨床分離メチシリン耐性 Coagulase-negative *Staphylococcus* におけるリネゾリド耐性化機構 第 98 回日本細菌学会関東支部総会 2015 年 10 月 29 日～30 日、東京歯科大学（東京都・千代田区）
10. 高屋明子, 庄司竜麻, 山本友子：肺炎球菌 23S rRNA のメチル化とテリスロマイシン感受性．第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15 日～17 日、ホテルライフオー ト札幌（北海道・札幌市）
- 〔その他〕
ホームページ等
千葉大学真菌医学研究センターHP
http://www.pf.chiba-u.jp/research/scientists_list/yamamot.html
- 6．研究組織
(1)研究代表者
山本 友子 (YAMAMOTO Tomoko)
千葉大学・真菌医学研究センター・特任教授
研究者番号：60110342
- (2)研究分担者
高屋 明子 (TAKAYA Akiko)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：80334217