

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19552

研究課題名(和文) 分子間インタラクションに基づく細菌種に特異的な創薬基盤の開発

研究課題名(英文) Development of species-specific anti-bacterial therapeutic agents based on molecular interaction

研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, ICHIRO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70294113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：多彩な疾患を引き起こす重要な病原体であるA群レンサ球菌は、ヘム獲得システムに関与するタンパク質をコードするsia遺伝子クラスターを保有している。鉄獲得は、本菌の病原性発揮に重要であるが、有効なヘム転移の分子機構は解明されていないままである。本研究ではヘムとレンサ球菌ヘムタンパク質受容体(Shr)およびレンサ球菌ヘム結合蛋白質(Shp)の各ドメインとの間の相互作用の解析を行った。本研究で明らかとなった速度論的および熱力学的分析は、この系内での効果的なヘム移動が親和性に基づく移動だけでなく結合駆動力の差によっても達成されることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの細菌感染の最も効果的かつ世界的に使用されている抗菌剤は、天然にある抗生物質を基本として修飾を加えたものや完全に合成された化学物質が使用されている。そのほとんどは、細菌が共通して保持する基本代謝の阻害活性に基づいているため菌種への特異性は低く、また耐性が獲得された場合には奏功しなくなる。本研究では、菌種に特異的な分子と生体側の分子との相互作用の阻害活性を持つ分子をスクリーニングできる大規模かつ効率的なin vitroのスクリーニング系を構築して、創薬シーズ基盤を構築することに挑戦的研究としての意義がある。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pyogenes, an important pathogen that causes a wide range of diseases, possesses the sia gene cluster, which encodes proteins involved in the heme acquisition system. Although this system was previously described, the molecular mechanism of effective heme transfer remains to be elucidated. Here, we have characterized the interactions between heme and each domain of Streptococcal hemoprotein receptor (Shr) and Streptococcal heme-binding protein (Shp). Our kinetic and thermodynamic analyses suggested that effective heme transfer within this system is achieved not only by affinity-based transfer but also by the difference of the binding driving force. The biophysical characterization of the above-mentioned interaction will lead to an indication for the selection of the target for a chemical screening of inhibitors as novel antibacterial agents based on biophysical approaches.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 鉄獲得系 Shr ヘム鉄

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感染症は人類の驚異であり続け、その根絶は人類の悲願である。科学技術の発展と公衆衛生の向上は、我々に感染症を克服し得たかの錯覚を与えた。しかし、現実的には新興・再興感染症が次々に出現し人類の健康を脅かしている。細菌感染症に対しては多様な抗菌薬が開発されて頻用されているが、多剤耐性菌の出現により臨床の現場を悩ませている。またワクチンの開発も行われているが、制御可能な細菌感染症はごくわずかである。そのため、細菌感染症分野は新たな観点からの制御法が望まれているものの抗菌剤を超える薬剤の開発は進んでいない。申請者らは、これまで多くの病原性細菌の比較ゲノム解析から特定の菌種にのみ存在する機能性遺伝子の解析や、宿主タンパク質と細菌構造物の立体構造解析を基盤とする相互作用の解析を行ってきた。その中でレンサ球菌の表層タンパク質の1つである鉄トランスポーターと、宿主ヘモグロビンの結合阻害活性を持つ低分子化合物のスクリーニングにより、レンサ球菌属のみ完全に増殖を阻害できる化合物を得ることができた。この分子は既知の抗菌剤とは構造が異なる新規な分子であり、他種のグラム陽性菌やグラム陰性菌では全く阻害活性を示さなかった。その結果から「特定の菌種にのみ増殖阻害活性を持つ阻害剤」の開発が可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに蓄積されたゲノム情報、細菌種特異的な生活環や代謝経路に着目し、その菌の生育に必須である特定の分子(タンパク質)と生体分子の相互作用を阻害する物質のスクリーニングによる創薬基盤の開発という新たなアプローチから、全く新しい細菌感染を制御する薬剤の開発を目的とする。これまでの細菌感染の最も効果的かつ世界的に使用されている抗菌剤は、天然にある抗生物質を基本として修飾を加えたものや完全に合成された化学物質が使用されている。そのほとんどは、細菌が共通して保持する基本代謝の阻害活性に基づいているため菌種への特異性は低く、また耐性が獲得された場合には奏功しなくなる。ワクチンについては特定の抗原分子をターゲットとするため特異性は高く、トキシドワクチン(三種混合ワクチン)のように成功したものがあるが、抗原性の高い菌体表層分子をターゲットとした場合には、抗原そのもののバリエーションと自然選択圧による変異によって奏功しない例もある。また近年、生体内の常在細菌叢が正常な健康体の維持に必須であることが明らかとなっており、抗菌剤の投与は、病原性細菌を殺滅するだけでなく、常在細菌叢を攪乱する可能性は否定できない。そこで、菌種が進化の過程で獲得してきた生存戦略上で必須と考えられる分子の構造解析や機能解析から、菌種に特異的な分子と生体側の分子との相互作用の阻害活性を持つ分子をスクリーニングできる大規模かつ効率的な *in vitro* のスクリーニング系を構築して、さらに菌体側についても効率的なターゲット遺伝子破壊・変異株の構築による機能評価、*in vivo* の動物実験系を用いた阻害活性解析・毒性解析までも含めた創薬シーズ基盤を構築することに挑戦的研究としての意義がある。

### 3. 研究の方法

これまで細菌感染に対する治療薬は、その多くは、抗菌剤の探索やワクチンの作成に主眼が置かれていたため、それに替わる薬剤の開発は、現在までのところその糸口はない。そのため、本研究では、細菌感染制御が可能な分子標的薬の創薬基盤を開発するため以下の項目で研究を進める。

#### A. ゲノム情報を利用したターゲット分子の選定

主なターゲットとしては、これまで申請者らが機能解析を行ってきた鉄トランスポーターだけでなく、細菌の生育に必須である微量金属トランスポーターを対象とする。このような遺伝子は、各細菌種が進化の過程で独自に進化したものが多いことから、菌種特異的な創薬ターゲットとして適している。

B. 候補分子の構造解析・機能解析と相互作用をする宿主分子との分子間相互作用の解析  
低分子化合物については、東京大学創薬オープンイノベーションセンターから提供を受け用いる。用いる低分子化合物は、細菌側因子と直接結合するライブラリーと、タンパク質~タンパク質間の相互作用に干渉することが予測される PPI(Protein-Protein focused)ライブラリーの双方を用いる。低分子化合物のライブラリースクリーニングは、主に表面プラズモン共鳴(SRP)を用いたスクリーニングを用いる。ScFV は、ファージディスプレイライブラリーを用いて、パニング法によりファージライブラリーを濃縮していくが、3回パニングを行った後に、NGS を用いてライブラリーのシーケンスを行い量的に濃縮されている配列、およびモチーフ配列の類似性から候補 ScFV を選択する。細菌の金属トランスポーターでは、結合する金属イオンを SRP で解析することは出来ないため、ITC を用いて競合マルチインジェクションを用いて、競合物質を低分子化合物ライブラリーから解析を行う。

C. 候補分子と宿主分子の相互作用を阻害する低分子化合物や ScFV による分子間相互作用の阻害物質の選定

- D. 上記 C で得られた競合阻害物候補に複数の候補物質が得られた場合には、その共通する構造(リード化合物)から側鎖を変更した化合物を作成して、さらに上記 C-1), 2), 3) と同様の方法を用いて最も阻害効果が認められる化合物を作成して評価を行う。また、細菌側因子については、遺伝子破壊株を作成して、親株での増殖阻害効果を比較することで、*in vivo* での活性評価を行う。
- E. 候補分子増殖阻害実験による阻害物質の確定  
上記 C で得られた競合阻害物候補に複数の候補物質が得られた場合には、その共通する構造(リード化合物)から側鎖を変更した化合物を作成して、さらに上記 C-1), 2), 3) と同様の方法を用いて最も阻害効果が認められる化合物を作成して評価を行う。また、細菌側因子については、遺伝子破壊株を作成して、親株での増殖阻害効果を比較することで、*in vivo* での活性評価を行う。
- F. *in vivo*(マウス感染系)を用いた生体内での阻害効果や、阻害物質に対する毒性評価  
上記 D で得られた候補化合物については、細胞培養系を用いた毒性評価や、マウス投与による毒性評価を行った後に、マウスでの LD<sub>50</sub> の減弱効果、投与する細菌数による効果などを評価することで、候補分子を決定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ShrNTD とヘモグロビンの間の相互作用の熱力学的および速度論的解析

ヘモグロビンから Shr のヘム獲得機構を解明するために、Shr とヘモグロビンの相互作用を調べた。これまでの研究から、ShrNTD はヘモグロビンに直接結合することが示されているため、ShrNTD を組換えタンパク質として調製し、ShrNTD とヘモグロビンの相互作用を生物物理学的に解析を行った。まず、SPR によってこの相互作用を特徴付けるパラメータを決定した。装置の検出限界を超える過度に速い会合および/または解離速度のために速度論のパラメータを決定することができなかつたので、最大応答を平衡に適合させることによって解離定数(KD)を評価した。得られた値(KKD=14.0 μM)は、ShrNTD がヘモグロビンに弱く結合することを示した。次に、ITC を用いた熱力学的解析により相互作用を明らかとなった。ITC 分析から得られた解離定数は 6.7 μM であり、これは SPR 分析から得られたものと同等の値である。熱力学的パラメータ結合エンタルピーは -7.8 kcal/mol であり、結合エントロピーは 1.1 kcal/mol であり、結合がエンタルピーの変化によって促進されたことを示した。さらに、ITC の結果は、ShrNTD とヘモグロビンとの間の相互作用の化学量論が 1.9:1 であることを示し、これは、ShrNTD の 2 つの分子がヘモグロビン四量体に結合することを示している。我々はまた、ヘモグロビンからヘムを取得するのに十分であると示唆される NTD の隣に NEAT1 ドメインを含む構築物である ShrNTDN1 を調製し、ITC により ShrNTDN1 とヘモグロビンの間の相互作用も評価した。結果は、相互作用に関する解離定数、化学量論、および熱力学的パラメータが ShrNTD のそれらと類似していることを示し、N1 ドメインがヘモグロビンへの直接結合に寄与しないことを意味している。

##### (2) ヘム結合の速度論的および熱力学的分析

まず、ストップフロー分光法を用いて、ヘム結合後の吸光度のピークシフトに基づいて、Shr または Shp の各ドメインとヘムとの間の相互作用の速度論のパラメータを調べた。ヘム結合後の吸光度の典型的な変化から、1 μM ヘムと 8 μM ShrN1 の混合物に続く吸光度の変化から計算した、ShrN1 のヘムへの結合についての擬似一次速度定数  $k_{obs}$  は 0.00085 /s であった。速度定数は、メトヘモグロビンからアポ Shr へのヘム転移のそれよりもかなり小さく 0.027 /s であった。さらに、ShrN2 および Shp についてのヘムへの結合速度定数は、ヘム結合モデル式に基づいて、アポタンパク質の濃度に対する観察された速度定数のプロットから計算した(表 1)。ヘムに対する ShrN2 の量は、Shp のその 10 倍以上大きかった。現在のモデルはヘム基が Shr から Shp へ移動することを示唆しているので、これらの結果は効果的なヘム移動を促進する追加の分子機構の存在を意味する。さらに、Shr から Shp へのヘムの移動の基礎となる分子機構を IT を用いてヘムと Shr / Shp タンパク質の各ドメイン間の相互作用の熱力学的パラメータを熱力学的に解析した。ShrN1 とヘムの結合親和性が、ShrN2 や Shp よりも著しく低いことが明らかとなった。ShrN1 がヘモグロビンからヘム分子を獲得するための必須ドメインであると示唆されてきたが、ShrN1 がヘム獲得に寄与する分子機構はヘムへの親和性に基づくとは考えにくい。さらに、ITC の結果は、ShrN2 および Shp に対するヘムの結合親和性がほぼ同一であることを示した。黄色ブドウ球菌の Isd システムの比較可能な部分で観察されるように、ヘムへの結合親和性のヘム転移経路に沿った漸進的な増加が効果的なヘム転移を促進するようになるが、別のメカニズムが A 群レンサ球菌におけるヘム獲得機構であると考えられる。また、ITC の結果から相互作用の熱力学的パラメータを計算した。ShrN2 へのヘムの結合後のエンタルピーおよびエントロピーの両方の変化は有利であったが、Shp へのヘムの結合は、好ましいエンタルピー変化によって促進され、異なる結合を反映する好ましくないエントロピー変化によって阻害され、これは効果的なヘムの移動に寄与するかもしれないメカニズムであると考えられた。最後に、各ヘム結合後の熱容量の変化を計算したところ、ShrN2 へのヘムの結合に続

く変化は、 $-0.40 \text{ kcal/mol/K}$ であり、これは Shp の  $-0.24 \text{ kcal/mol/K}$  よりも大きかった。これらの結果から、ヘムと Shr / Shp の各ドメイン間の相互作用を生物物理学的に特徴付けた。Shp および Shr の各 NEAT ドメインが異なるヘム結合プロファイルを有することを明らかとした。ShrN1 は低い親和性でヘムに結合するのに対して、ShrN2 は下流の受容体 Shp のそれに匹敵する親和性でヘムに結合する。この動的なメカニズムは、親和性主導のヘム転移機構を採用する黄色ブドウ球菌の Isd システムとは異なることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Masato Hoshino, Makoto Nakakido, Satoru Nagatoishi, Chihiro Aikawa, Ichiro Nakagawa, Kouhei Tsumoto. Biophysical characterization of the interaction between heme and proteins responsible for heme transfer in *Streptococcus pyogenes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017 493: 1109-1114, 2017. 10.1016/j.bbrc.2017.09.055
2. T. Nozawa, A. Minowa-Nozawa, C. Aikawa, I. Nakagawa. “The STX6-VTI1B-VAMP3 complex facilitates xenophagy by regulating the fusion between recycling endosomes and autophagosomes”. Autophagy, 13:57-69, 2017.
3. Nakajima S, Aikawa C, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, Toh H, Nakagawa I. “Bcl-xL Affects Group A *Streptococcus*-Induced Autophagy Directly, by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes, and Indirectly, by Inhibiting Bacterial Internalization via Interaction with Beclin 1-UVRAG”. PLoS One. 2017 Jan 13;12(1):e0170138. doi: 10.1371/journal.pone.0170138. eCollection 2017
4. Atsuko Minowa-Nozawa, Takashi Nozawa, Keiko Okamoto-Furuta, Haruyasu Kohda, Ichiro Nakagawa. Rab35 GTPase recruits NDP52 to autophagy targets. EMBO J. (2017) 36, 2790-2807.
5. Nozawa, T., Aikawa, C., Minowa-Nozawa, A., Nakagawa, I. The intracellular microbial sensor NLRP4 directs Rho-actin signaling to facilitate Group A *Streptococcus*-containing autophagosome-like vacuole formation. Autophagy. 13(11):1841-1854. 2017. 10.1080/15548627.2017.1358343
6. Koji Nakajima, Takashi Nozawa, Atsuko Minowa-Nozawa, Hirotaka Toh, Shunsuke Yamada, Chihiro Aikawa, Ichiro Nakagawa. RAB30 regulates phosphatidylinositol 4-kinase beta-dependent autophagy against Group A *Streptococcus*. Autophagy, doi: 10.1080/15548627.2018.1532260, 2018.
7. Ching-Yu Lin, Takashi Nozawa, Atsuko Minowa-Nozawa, Hirotaka Toh, Ichiro Nakagawa. LAMTOR2/p14 is required for the TAX1BP1-mediated xenophagy. Cell. Microbiol. Doi: 10.1111/cmi.12981. 2018.
8. Kenta Funahashi, Takahiko Shiba, Takayasu Watanabe, Keiko Muramoto, Yasuo Takeuchi, Takuya Ogawa, Yuichi Izumi, Tsutomu Sekizaki, Ichiro Nakagawa, Keiji Moriyama. Functional dysbiosis within dental plaque microbiota in cleft lip and/or palate patient. Eur. J. Orth. In press 2018.

### 〔学会発表〕(計 10 件)

1. 中川一路 細菌感染とオートファジー 第90回日本細菌学会総会、2017年3月、仙台
2. 藤博貴, 相川知宏, 中島慎太郎, 野澤孝志, 野澤敦子, 中川一路 *Streptococcus pyogenes* NADglycohydrolase as negative regulator for internalization into HeLa cells 第90回日本細菌学会総会、2017年3月、仙台
3. 中島慎太郎, 相川知宏, 野澤孝志, 野澤敦子, 藤博貴, 中川一路 Bcl-xL regulates Group A *Streptococcus* internalization to host cell and autophagosome-lysosome fusion 第90回日本細菌学会総会、2017年3月、仙台
4. Ching-Yu Lin, 野澤孝志, 中川一路 p14 is required for the TAX1BP1-mediated xenophagy against Group A *Streptococcus* 第49回レンサ球菌研究会、2017年、新潟
5. 古田紀之, 野澤孝志, 中川一路 A群レンサ球菌における菌体表層糖鎖は選択的オートファジーの標的となる 第70回日本細菌学会関西支部会、2017年、大阪
6. 野澤孝志, 相川知宏, 野澤敦子, 中川一路 細胞内病原体センサー NLRP4 は Rho-アクチン制御を介して A群レンサ球菌に対するオートファジーを誘導する 第91回日本細菌学会総会、2018年 福岡
7. 藤博貴, 相川知宏, 中島慎太郎, 野澤孝志, 野澤敦子, 中川一路 Analysis of Group A *Streptococcus* NAD-glycohydrolase as a regulator for uptake into HeLa cells 第91回日本細菌学会総会、2018年 福岡
8. 相川知宏, 中島慎太郎, 野澤孝志, 野澤敦子, 藤博貴, 中川一路 NLRX1 inhibits the Group A *Streptococcus* invasion into host epithelial cells 第91回日本細菌学会総会、

2018年 福岡

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：津本浩平

ローマ字氏名：TSUMOTO KOHEI

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院工学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：90271866

研究分担者氏名：長門石 暁

ローマ字氏名：NAGATOISHI AKIRA

所属研究機関名：東京大学

部局名：医科学研究所

職名：特任准教授

研究者番号(8桁)：30550248

研究分担者氏名：相川知宏

ローマ字氏名：AIKAWA CHIHIRO

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70725499

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。