

平成 21年 5月 16日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2007
 課題番号：19380053
 研究課題名（和文）グラム陽性細菌のクォーラムセンシングを標的とした新規抗菌剤の開発と応用
 研究課題名（英文）Development and application of novel inhibitor targeting quorum sensing of gram-positive bacteria

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

研究成果の概要：グラム陽性病原細菌の多くは、環状ペプチドを自己誘導因子“クォルモン”とする菌密度依存的制御機構（クォーラムセンシング：QS）により病原性の発現を制御している。本研究では、グラム陽性細菌の抗感染症剤の開発を目指したQS阻害剤の創製研究を行った。その結果、既知の糸状菌二次代謝産物 ambuic acid が、腸球菌、ブドウ球菌、リステリア菌の環状ペプチドクォルモンの生合成を $10 \mu\text{M}$ レベルで阻害し、腸球菌においては病原因子であるゼラチナーゼの生産、ブドウ球菌においては病原因子であるヘモリシンの生産を阻害することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

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：腸球菌、クォーラムセンシング、スクリーニング、阻害剤、ゼラチナーゼ、病原因子、抗感染症剤、ポスト抗生物質

1. 研究開始当初の背景

(1) クォーラムセンシング (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、同種菌体間で化学シグナル“クォルモン”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、この 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。

(2) 申請者はこれまでに、腸球菌の病原因子の一つであるゼラチナーゼの発現が、環状ペプチド GBAP(gelatinase biosynthesis-activating peptide)をクォルモンとして利用する QS によりコントロールされていることを発見した (J. Nakayama, Y. Cao et al., 2001, Mol. Microbiol.)。後に、海外の多くの研究者がこの腸球菌の QS (*fsr* 制御系と呼ばれる) に注目し、*fsr* 制御系がゼラチナーゼの発現制御だけでなく、バイオフィルムの形成などの腸球菌の病原性と関連する他の表現型も制御しているという事実も明らかにしている。一方、申請者らは、GBAP の生合成機構に関して研究を進め、GBAP の前駆体(FsrD)からのプロセッシングと環化が、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. Nakayama, S. Chen et al., 2006, J. Bacteriol.)。FsrB のホモログは、ブドウ球菌、リステリア菌、クロストリジウム菌、セレウス菌、乳酸桿菌などの他のグラム陽性菌のゲノムにもコードされている。このことは、腸球菌と同様のプロセッシング・環化機構により生合成される環状ペプチドクォルモンが他のグラム陽性菌においても幅広く利用されていることを示唆している。実際に、申請者らはオランダのグループとの共同研究により、乳酸桿菌 *Lactobacillus plantarum* において同様の環状ペプチドクォルモンによる QS が行われており、バイオフィルムの形成が制御されていることを明らかにしている(M. Sturme, J. Nakayama et al., 2005, J. Bacteriol.)。

(3) プロテアーゼをターゲットとした薬剤開発は抗 HIV 剤の開発に見られるように多くの成功例がある。天然物から有用なプロテアーゼ阻害物質がスクリーニングされた例は多く、また、プロテアーゼの分子機構からドラッグデザインにより優れたプロテアーゼ阻害剤を創製した成功例も多い。FsrB は新しいタイプのシステインプロテアーゼと推測されているが、これまでの成功例に倣えば、FsrB 阻害剤を発掘あるいは創製することも可能であると考えている。上記のように、腸球菌のみならず、他のグラム陽性細菌も FsrB と同じ分子機構により環状ペプチドクォルモンを

生成していると予想されており、FsrB 阻害剤を基盤に環状ペプチドクォルモンの生合成阻害剤を創製することができれば、グラム陽性病原細菌に幅広く効果を示す QS 阻害型の抗感染症剤の開発につながると期待される。

2. 研究の目的

(1) クォーラムセンシング (菌密度依存的遺伝子発現制御機構) は近年の細菌学において大変注目されている細菌界で広く見られる現象である。特に、病原性細菌の病原因子発現がこのクォーラムセンシングにより制御されている例が多く報告されていることから、クォーラムセンシングはポスト抗生物質薬剤開発のターゲットの一つとして注目されている。

申請者はこれまでに、日和見感染菌である腸球菌の病原因子の一つであるゼラチナーゼの発現がクォーラムセンシングにより制御されていることを発見し、さらにその詳細な分子機構を明らかにしてきた。その分子機構は、個々の腸球菌細胞が GBAP(Gelatinase biosynthesis-activating peptide)というゼラチナーゼ遺伝子の発現を誘導する環状ペプチドを菌体外に分泌し、菌密度の上昇とともに菌体外の GBAP 濃度を上昇させ、菌密度がある一定以上になった段階でゼラチナーゼ遺伝子発現を誘導するというものである。

本研究では、(1) FsrB による GBAP の生合成、(2) FsrC による GBAP のシグナリング、この2つを阻害のターゲットポイントとするクォーラムセンシング阻害剤を天然物からのスクリーニングおよびドラッグデザインにより開発し、新しいタイプの抗細菌剤を創製することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 分子生物学・生化学・構造生物学的アプローチにより FsrB の酵素触媒部位の分子構造および、FsrB による GBAP 前駆体(FsrD)のプロセッシングおよび環化の分子機構の詳細を解析した。

(2) 食中毒菌であるリステリア菌に関しては、クォルモンの構造が明らかになっていないので、環状ペプチドクォルモンの構造決定を行った。

(3) 糸状菌の二次代謝産物を対象に FsrB

を標的とした GBAP 生合成阻害剤のスクリーニングを行った。

(4) GBAP の化学合成アナログを用いた構造活性相関研究と FsrC の部位特異的変異導入実験により FsrC による GBAP の分子認識機構を分子構造レベルで解析する。

4. 研究成果

(1) GBAP 生合成酵素 FsrB の機能解析

FsrB が Cys-80 と His-73 を触媒残基とするシステインプロテアーゼ様作用により、GBAP 前駆体ペプチドである FsrD をプロセッシングすることはすでに当研究グループで明らかにしていたが、ここではさらに、FsrB が FsrD における GBAP の C 末端のプロセッシングと環化に関与していることを明らかにした。N 末端側のプロセッシングには別の酵素が関与していることを示唆している。

(2) リステリア菌の環状ペプチドホルモンの構造決定

Listeria innocua ATCC 33090 および *Listeria monocytogenes* EGD-e の培養液上清を分析し、両者とも図 1 のような環状ペプチド LisD698 を生産していることを明らかにした。

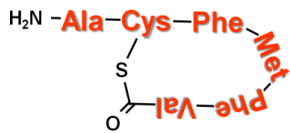


図 1. リステリア菌の環状ペプチドホルモン LisD698 の構造

(3) 糸状菌二次代謝産物からの環状ペプチドホルモン生合成阻害剤の探索

FsrB を標的とする QS 阻害物質として、既知の糸状菌二次代謝産物 ambuic acid が腸球菌の QS を 10 μ M レベルで阻害することを見出した (図 2)。Ambuic acid は、FsrB による GBAP 前駆体(FsrD)のプロセッシングを阻害し、その結果、GBAP の生産が阻害され、QS が阻害されていることが判明した。また Ambuic acid は、同様に黄色ブドウ球菌の QS シグナルである AIP やリステリア菌の QS シグナルである LsrD の生合成も阻害し、ブドウ球菌においては QS により誘導されるヘモリシンの生産も抑制することが示された (図 3)。今後、本物質をリード化合物としてより活性の高い分子を育種す

ることで、抗感染症剤として有効利用可能な化合物の作出ができると期待される。

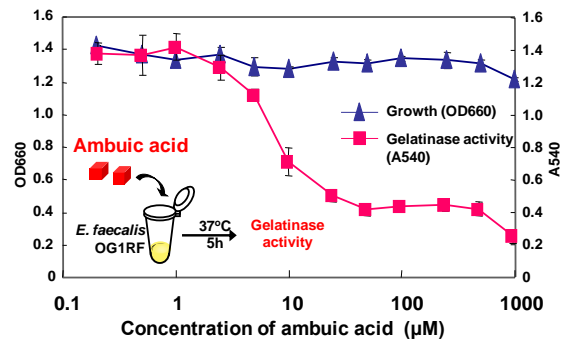


図 2. Ambuic acid による腸球菌におけるゼラチナーゼ生産の阻害

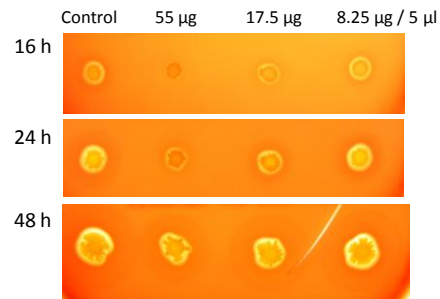


図 3. Ambuic acid による *Staphylococcus aureus* のヘモリシン生産の阻害。55 μ g において 24 h まで菌の増殖には大きな影響を与えず、ヘモリシン生産 (コロニー周辺の透明な領域がヘモリシン活性を示す) を顕著に阻害している。

(4) GBAP の受容体 FsrC の分子認識機構の解析

GBAP の 7 残基目の Phe が受容体 FsrC との結合に、10 残基目の Trp が GBAP の立体構造維持に重要であることを見出した (図 4)。また FsrC の Tyr-112 がシグナル伝達に重要な役割を果たしていることも見出した。今後、これらの構造機能情報を基に GBAP アンタゴニストを創製していきけるものと考えている。

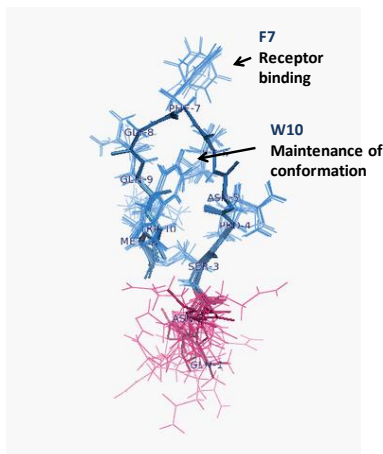


図4. GBAPの立体構造。青色が環状部分で安定した立体配座を形成している。赤色がテール領域で大きく揺らいでいることがわかる。受容体結合に重要な F7 は環の外側に配向している。一方 W10 の側鎖は環の内側に半分埋まるような形で配向しており環構造の安定化に寄与している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

- ① 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). 査読有
- ② 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). 査読有
- ③ Nakayama, J., E. Tanaka, R. Kariyama, K. Nagata, K. Nishiguchi, R. Mitsuhashi, Y. Uemura, M. Tanokura, H. Kumon, K. Sonomoto "Siamycin attenuates fsr quorum sensing mediated by gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*" *J. Bacteriol.*, 189(4), 1358-1365 (2007). 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 中山 二郎、西口 賢三、永田 宏次、田中 笑美、上村 結美、吉村 憲人、五十嵐 康弘、園元 謙二 "グラム陽性菌のクオラムセンシング阻害剤の開発と展望" 2009年日本農芸化学会大会シンポジウム(福岡) 2009年3月28日
- ② K. Nishiguchi, J. Nakayama, K. Nagata, M. Tanokura, K. Sonomoto "Two aromatic amino acid residues of GBAP are involved in

the receptor binding in *Enterococcus faecalis* quorum sensing" ASM conference in cell-cell communication in Bacteria (Austin, Texas, USA) 2007年10月7日-10日

- ③ J. Nakayama, N. Sujaku, K. Nishiguchi, T. Zendo, K. Sonomoto "Detection and structural elucidation of putative autoinducing peptides encoded by *agr*-like gene clusters of gram-positive bacteria" ASM conference in cell-cell communication in Bacteria (Austin, Texas, USA) 2007年10月7日-10日
- ④ 吉村 憲人, 西口 賢三, 上村 結美, 中山 二郎, 園元 謙二 "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 in vitro における生合成系の構築" 第45回化学関連支部合同九州大会(北九州) 2008年7月5日(学生賞)
- ⑤ 中山 二郎 "グラム陽性菌の環状ペプチドをオートインデューサーとするクオラムセンシングの阻害剤開発" 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム(神戸) 2008年12月11日

[図書]

- ① 中山二郎、吉田明弘 "バイオフィルムの基礎と制御" NTS, 第2章第4節 2008年

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

(3) 連携研究者

なし