

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790107  
研究課題名 (和文) 三型分泌機構阻害剤の開発

研究課題名 (英文) Development of Type III secretion system inhibitors

## 研究代表者

岩月 正人 (IWATSUKI MASATO)  
北里大学・北里生命科学研究所・研究員  
研究者番号：70353464

研究成果の概要 (和文) : グラム陰性病原性細菌の三型分泌機構を阻害する物質を独自の評価系 (腸管病原性大腸菌 EPEC を使用) を用いて微生物代謝産物より探索し、放線菌 2 株の培養液よりそれぞれ aurodox および新規ペプチド化合物を取得した。このうち aurodox が三型分泌機構に関連するタンパク質 (Tir、EspB、Map および EspF) の発現を特異的に阻害することを見出した。また aurodox は TTSS 関連タンパク質の正の転写調節因子 *ler* の転写を有意に抑制していることも見出した。さらに aurodox は *in vivo* 実験においても TTSS を阻害することで腸管へ付着、炎症の惹起を抑制することで細菌を感染させたマウスに対して治療効果を示した。

研究成果の概要 (英文) : As a part of screening by the assay utilizing TTSS-induced hemolysis in enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), we have screened 20,250 microbial extracts and found that the extracts of the strain *Streptomyces* sp. K06-0806 and KK-88 showed potent TTSS inhibitory activity. After the fermentation and purification of the active compound, linear polyketides, aurodox and KK-88 compound, novel peptide, were isolated as TTSS inhibitors from the culture broths of K06-0806 and KK-88, respectively.

The SDS-PAGE study showed that aurodox inhibited the expression of TTSS-related proteins, Tir, EspB, Map and EspF without the inhibition of EPEC viability and the expression of the house-keeping protein, GroEL. The RT-PCR study of the genus of LEE (locus of enterocyte effacement) showed that aurodox reduced the transcription of many T3SS-related genes such as *ler* (LEE-encoded regulator), *eae* (LEE2: Type III apparatus), *espA*, *espD*, *espB*, *espF* (LEE4) and *tir* (LEE5) without reducing T3SS-nonrelated genes such as *rrsB*, one of 16S rRNA gene. Aurodox significantly reduced the transcription of *ler*, a gene of positive regulator of LEE, even at 0.5 µg/mL. This result suggests the specific inhibition of aurodox against the expression of T3SS-related proteins is caused by the inhibition of transcription of *ler*.

*In vivo* study was carried out using C3H/HeJ mice infected by *Citrobacter rodentium*. Orally administrated aurodox caused murine survival with the repression of bacterial colonization in the intestinal mucosa. Therefore, aurodox is suggested to reduce the bacterial pathogenesis by the inhibition of T3SS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬科学

キーワード：生物活性物質、三型分泌機構

1. 研究開始当初の背景

(1) 三型分泌機構（以下 TTSS）はグラム陰性病原細菌に高度に保存されている病原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(Anna KM. Chem Biol 10: 241-249 (2003))。

(2) これまでに TTSS 阻害剤として天然化合物 1 種、合成化合物 4 種が報告されているが、いずれも活性の強さ (IC50 が  $\mu\text{M}$  オーダー) が十分ではない、正常細菌の鞭毛などにも影響を及ぼすなどの問題により実用化に至っていない (Gauthier A. Antimicrob Agents Chemother 49: 4101-4109 (2005)他)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では TTSS 阻害物質を天然物資源より探索し、新たなメカニズムの抗細菌薬を開発することを目的としている。そのために TTSS 阻害活性を示す物質を天然物資源、主に微生物代謝産物より探索する。本研究で目的としている三型分泌機構を標的とした抗細菌薬は従来の抗菌薬と異なり菌を殺さずに病態の進行を抑制できると考えられる。そのため従来の抗菌薬の持つ「耐性菌の出現」、「毒素の大量放出」、「正常細菌叢の攪乱」などの問題を克服できると予想される。

3. 研究の方法

(1) 独自に開発したアッセイ系 (Abe. A., Jpn J Antibiot., 55, 331-336 (2002)) を用いて天然物資源、主に微生物代謝産物をスクリーニングした。本検定系は腸管病原性大腸菌、緑膿菌および百日咳菌を検定菌として用い、TTSS に依存した赤血球の溶血反応阻害を指

標とした簡便な系である。すなわち微生物代謝産物を含む天然物資源をマイクロプレートにまき、次いで各菌の前培養液および赤血球液を添加し 37°C、1.5 時間インキュベートすることで TTSS に依存した溶血反応を進行させ、次いで吸光度を測定することで添加サンプルの溶血阻害活性を算出した。この際、抗菌活性により見かけ上溶血阻害活性を示すサンプルを除外するため各菌に対する抗菌活性も測定した。

(2) スクリーニングで選択されたサンプルについて TTSS 阻害活性を指標に精製を行い、取得した阻害物質について各種機器分析により構造決定を行った。

(3) 取得した TTSS 阻害物質について生化学的手法を用いた作用機序の解析を行った。

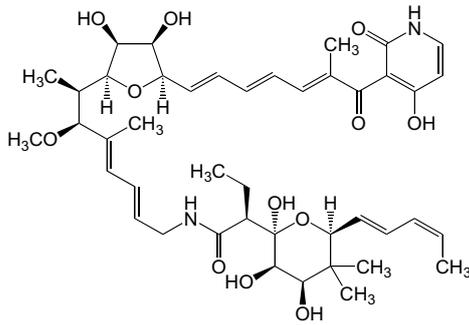
(4) 取得した TTSS 阻害物質のうち有望な物質については感染モデル動物を用いて *in vivo* の評価も行った。

4. 研究成果

(1) 既に確立済みの評価系で微生物の培養液など約 20,250 サンプルをスクリーニングした結果、バングラディッシュ土壌由来放線菌 K06-0804 株および KK-88 株の培養液に本活性を見出した。

(2) まず *Streptomyces* sp. K06-0804 株培養液の精製を行った結果、TTSS 阻害物質として aurodox (Gullo, V. P. et al., J. Antibiot., 35, 1705-1707 (1982)) を単離同定した(また、別の放線菌培養液から aurodox の類縁物質である factumycin を活性物質として単離同定した)。Aurodox は TTSS に依存した溶血

反応を選択的に抑制(溶血阻害活性:  $IC_{50}=1.2 \mu\text{g/mL}$ , 抗菌活性:  $IC_{50}=40 \mu\text{g/mL}$ , 選択性 32 倍)した。



Aurodox

Fig. 1. Aurodox の構造

続いて *Streptomyces* sp. KK-88 株培養液の精製を行った結果、TTSS 阻害物質としてペプチド性の新規物質 KK-88 物質を単離した。KK-88 物質は TTSS に依存した溶血反応を選択的に抑制(溶血阻害活性:  $IC_{50}=7 \mu\text{g/mL}$ , 抗菌活性:  $IC_{50}=35 \mu\text{g/mL}$ , 選択性 5 倍)した。

(3)Aurodox の作用点を明らかにするために SDS-PAGE および Western Blotting による解析を行った結果、aurodox が三型分泌機構に関連する病原性タンパク質の発現を特異的に阻害することが明らかとなった (Fig. 2)。さらに Real-Time PCR を用いて病原性遺伝子の転写量を調べた結果、aurodox は三型分泌機構関連の遺伝子領域(LEE 領域)を調節する regulator である *ler* の転写量を有意に抑制していた。この結果は aurodox が三型分泌機構の転写に関与する何らかの因子に影響を及ぼして阻害活性を示すことが示唆している。

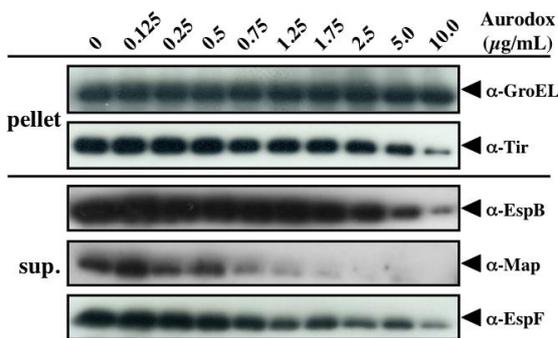


Fig. 2. Aurodox の TTSS 関連タンパク質の発現に対する影響

(4) Aurodox は *Citrobacter rodentium* を用

いた C3H/HeJ マウスの感染実験系において菌の腸管への付着を抑えることで高い治療効果を示した (Fig. 3)。これまで数例の三型分泌機構阻害剤の報告があるが *in vivo* で治療効果が報告されている物質は本研究で見出した aurodox が初めてであった。

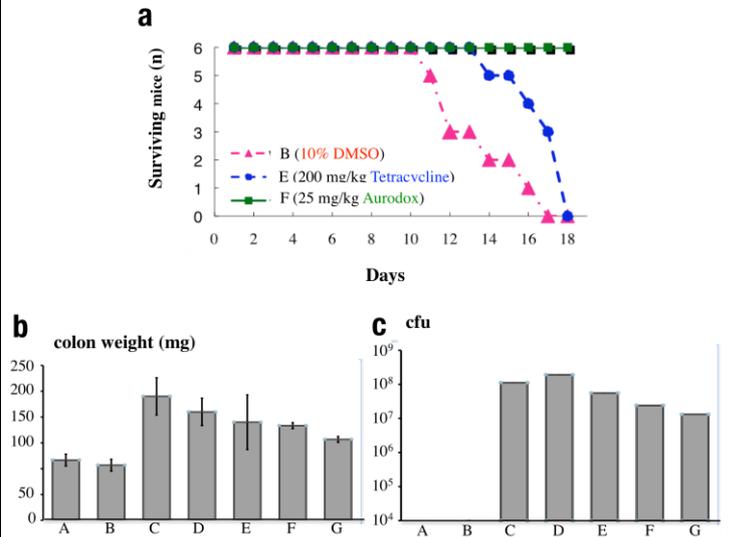


Fig. 3. Aurodox の *in vivo* における治療効果

(a) CR-WT 感染マウスの生存曲線、(b) CR-WT による大腸内の出血に対する薬剤の影響 (矢印: 大腸内の出血)、(c) 菌の定着により引き起こされる大腸重量の増加に対する薬剤の影響、(d) 大腸への定着菌数に対する薬剤の影響  
[A 群: 非感染、B 群: CR-  $\Delta$ espB、C 群: CR-WT + 10% DMSO 水溶液、D 群: CR-WT + 100 mg/kg tetracycline、E 群: CR-WT + 200 mg/kg tetracycline、F 群: CR-WT + 25 mg/kg aurodox、G 群: CR-WT + 100 mg/kg aurodox]

(5) また放線菌 K01-0509 株より既已取得していた新規 TTSS 阻害物質 guadinomine 類についても biotin 誘導体を調製して標的タンパク質の探索を行ったが現在のところ候補となるタンパク質の同定には至っていない。

## 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 9 件)

- ① 岩月正人、内田龍児、吉島瞳、宇井英明、塩見和朗、松本厚子、高橋洋子、阿部章夫、供田洋、大村智、Guadinomines, Type III secretion system inhibitors,

- produced by *Streptomyces* sp. K01-0509. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties., J. Antibiot., 査読有、61巻、2008、222-229
- ② 岩月正人、内田龍児、吉島瞳、宇井英明、塩見和朗、Yong-Pil Kim、廣瀬友靖、阿部章夫、供田洋、大村智、Guadinomines, Type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509. II. Physico-chemical properties and structure elucidation., J. Antibiot., 査読有、61巻、2008、230-236.
- ③ 廣瀬友靖、砂塚敏明、土屋智史、田中利和、小嶋康裕、森龍真、岩月正人、大村智、Total synthesis and determination of the absolute configuration of guadinomines B and C2, Chemistry., 査読有、14巻、2008、8220-8238.
- ④ 石山亜紀、乙黒一彦、岩月正人、生田目幸、西原明希、野中健一、木下雄太、高橋洋子、増間碌郎、塩見和朗、山田陽城、大村智、*In vitro* and *in vivo* antitrypanosomal activities of three peptide antibiotics: leucinostatin A and B, alamethicin I and tsuchimycin., J. Antibiot., 査読有、62巻、2009、303-308.
- ⑤ Jiaoyang Jiang, Charles N. Tstzlaff, 高松智、岩月正人、小松護、池田治生、David E.Cane、Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: A biochemical Baeyer-Villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree., Biochemistry., 査読有、48巻、2009、6431-6440.
- ⑥ 岩月正人、小泉幸夫、合田浩明、広野修一、供田洋、大村智、Lys17 in the 'lasso' peptide lariatin A is responsible for anti-mycobacterial activity. Bioorg. Med. Chem. Lett., 査読有、19巻、2009、2888-2890.
- ⑦ 内田龍児、岩月正人、Yong-Pil Kim、大手聡、大村智、供田洋、Nosokomycin, new antibiotics discovered in an *in vivo*-mimic infection model using silkworm larvae. I: Fermentation, isolation and biological properties, J. Antibiot., 査読有、63巻、2010、151-155.
- ⑧ 内田龍児、岩月正人、Yong-Pil Kim、大手聡、大村智、供田洋、Nosokomycin, new antibiotics discovered in an *in vivo*-mimic infection model using silkworm larvae. II: Structure elucidation, J. Antibiot., 査読有、63巻、2010、156-162.
- ⑨ 岩月正人、木下雄太、新妻恵、橋田純子、森美穂子、石山亜紀、生田目幸、西原明希、野中健一、増間碌郎、乙黒一彦、山田陽城、塩見和朗、大村智、Anti-trypanosomal peptibiotics, trichosporins B-VIIa and B-VIII, produced by *Trichoderma polysporum* FKI-4452. J. Antibiot., 査読有、63巻、2010、in press.

[学会発表] (計5件)

- ① "Guadinomines, Type III secretion system inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509", Natural products discovery and production II: 岩月正人、供田洋、宇井英明、塩見和朗、Kim Yong-Pil、松本厚子、高橋洋子、阿部章夫、廣瀬友靖、砂塚敏明、大村智、Whistler, British Columbia, Canada, June 22-26 (2008)
- ② "Aurodox 類は病原細菌の III 型分泌機構を特異的に阻害する"、第 51 回天然有機化合物討論会: 岩月正人、木村恭大、塩見和朗、松本厚子、高橋洋子、永井武、渡辺峰雄、永松環奈、阿部章夫、大村智、愛知県名古屋、October 7-9 (2009)
- ③ "病原細菌の III 型分泌装置阻害物質の探索"、第 6 回北里化学シンポジウム: 岩月正人、木村恭大、塩見和朗、松本厚子、高橋洋子、永井武、渡辺峰雄、永松環奈、阿部章夫、大村智、神奈川県相模原市、December 9 (2009)
- ④ "糸状菌 FKI-4410 株の生産する抗マラリア原虫活性物質に関する研究"、第 130 回日本薬学会年会: 岩月正人、高田昌平、森美穂子、塩見和朗、野中健一、増間碌郎、石山亜紀、生田目幸、塚島明希、乙黒一彦、大村智、岡山県岡山市、March 28-30 (2010)

〔図書〕(計0件)  
特になし。

〔産業財産権〕  
○出願状況(計3件)

名称：マラリア原虫類の感染治療剤  
発明者：大村智、乙黒一彦、岩月正人、塩見  
和朗、増間碌郎  
権利者：学校法人北里研究所  
種類：特許  
番号：特願 2009-240229  
出願年月日：21年10月19日  
国内外の別：国内

名称：新規 Spoxazomycin A 物質  
発明者：大村智、高橋洋子、乙黒一彦、稲橋  
佑起、岩月正人、松本厚子  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2010-046159  
出願年月日：22年3月3日  
国内外の別：国内

名称：新規 FKI-4429 物質及びその製造法  
発明者：大村智、岩月正人、増間碌郎、野中  
健一、山本剛、花木秀明  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2010-052838  
出願年月日：22年3月10日  
国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
なし
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
なし