

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580177

研究課題名(和文)オボトランスフェリンおよびそのドメインを利用した病原体への新規薬物送達戦略の開発

研究課題名(英文)Novel anti-infection Drug-delivery strategy by using ovotransferrin and its domains

研究代表者

イブラヒム ヒッシュムラドワ (IBRAHIM, HISHAM RADWAN)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：90274836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：OTfとサルファ系抗生物質が相互作用してコンプレックスが形成され、サルファ系抗生物質の難水溶性が改善されたことが確認できた。また、サルファ系抗生物質とOTfのコンプレックスは、OTfや抗生物質を単独で用いるよりも、様々な病原菌に対して強い抗菌活性を示した。さらに、OTfは、細菌やヒト細胞の表面に存在するトランスフェリンレセプターに対して、選択的に結合することが明らかにされている。したがって、OTfは、サルファ系抗生物質を細菌または感染された細胞へと運ぶ「キャリア」として、特異的な新規薬物送達戦略の開発に期待ができる。

研究成果の概要(英文)：The results demonstrate that ovotransferrin (OTf) binds different insoluble sulfa antibiotics and for complex in which these hydrophobic antibiotics become totally water soluble. The antibiotic-off complexes showed potent antimicrobial activity against several pathogens or either Gram-positive or Gram-negative strains. Strikingly, the complexes were able to reach and kill pathogens intracellularly infecting human colon cells (HCT-116), and the mechanism was found to be mediated through endocytosis via a transferrin receptor found at the surface of human cells. The finding herald a fascinating opportunity with potential application of OTf as drug carrier for the treatment of infectious diseases.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品生化学 Drug-delivery Anti-infection Transferrin receptor Ovotransferrin Antimicrobia

1. 研究開始当初の背景

耐性菌を生じさせないための独特の活性を持った新規抗菌剤を開発することが早急に求められている。フェノール化合物は強い抗菌作用を有していることから抗菌剤として非常に魅力的な物質であり、抗菌、抗ウイルスなどの生物学的活性が知られており、魅力的な天然の防腐剤として多くの研究がなされている。しかし、フェノール系の抗生物質は、細菌膜による細胞内への侵入阻害や水に難溶性であること、安定性が低いこと、そして高濃度になると強い副作用を示すことなどから薬剤として用いることへの制限が多くある。そのため、それらの薬剤の難水溶性を改善する戦略と特異的なデリバリーシステムの開発が求められている。オボトランスフェリン(OTf)は、卵白に含まれる金属結合タンパク質であり、鉄結合によって細菌の代謝に必要な鉄を奪うことで抗菌活性を示す。以前の研究によって N ロープには抗菌性ペプチド(N クリングルドメイン)が存在していることを明らかにした。

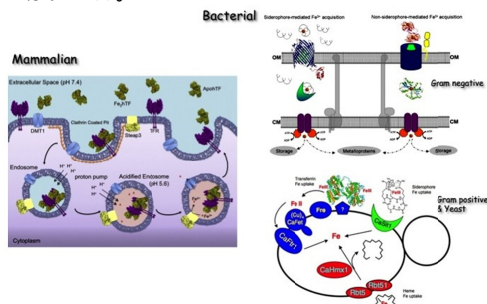


Fig. 1. Mammalian and bacterial transferrin receptors specific for OTf.

2. 研究の目的

哺乳細胞及び病原菌の表面にはトランスフェリン受容体があり、特に病原菌及び癌細胞に多量の鉄を要するので重要である。鉄を結合したトランスフェリンがこの受容体に結合すると、エンドサイトーシスにより被覆小胞に包まれて細胞内に輸送される (Fig. 1)。受容体はトランスフェリンを結合したまま細胞表面に再輸送 (エクソサイトーシス) され、次の取り込みに備える。本研究ではオボトランスフェリンをキャリアーとして、サルファ系抗生物質とのコンプレックスを形成し、病原菌及び感染した細胞の表面には、トランスフェリン受容体が正常細胞より多く出現しているので、オボトランスフェリンのドメインを薬剤のリガンドとして用いると、病原菌又は感染された細胞まで運搬することが可能となり、新規薬物送達戦略の開発へつながるものと期待できる。本研究では、様々なフェノール系の抗生物質 (Fig. 2) とオボトランスフェリンの複合体を調整し、抗生物質の水溶性の改善、新たなドラッグデリバリーシステムの開発を目的とした。

3. 研究の方法

-抗生物質 (abc) と OTf コンプレックスの調整

オボトランスフェリン、サルファベンズアミド (SBM)、スルファメトキサゾール (SMZ) または

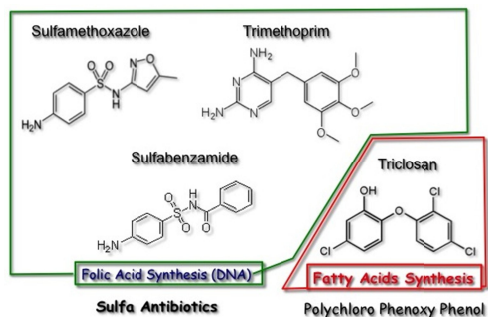


Fig. 2. Synthetic antibiotics that target unique intracellular pathways, used in this study.

トリクロサン (TCS) とのコンプレックスの調製を行った。オボトランスフェリンに対する抗生物質のモル比が 15, 30, 60 になるよう、両試薬を混合した。それを pH9.0 のアルカリ条件下で 24 時間振盪培養した後、凍結乾燥した。それぞれの名称を abc-OTf15、abc-OTf30、abc-OTf60。コントロールとしてネイティブオボトランスフェリン (OTf) と抗生物質を加えていない abc-OTf0 を用意した (Fig. 3)。

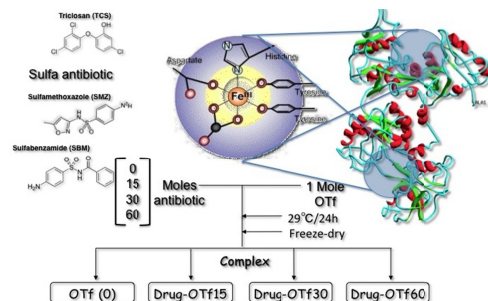


Fig. 3. Complexation of OTf with sulfa antibiotics or triclosan, by loading into the iron-binding pocket.

コンプレックスの水溶性を調べるために 500nm の波長で紫外吸収を測定した。トリプトファン蛍光スペクトルは、Na-リン酸バッファー (pH 7.4) 中にコンプレックス (OTf に基づく濃度) あるいは、SBM 単独 (それぞれ複合体中の含有量と等しい濃度) を含んでいる溶液で記録した。グラム陽性菌 (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*)、グラム陰性菌 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria mucosa*) 及び薬剤耐性菌として *Salmonella enteritidis* (WT) 又は  $\Delta TolC$  mutants *Salmonella enteritidis* (*TolC* knockout) に対する抗菌活性を検証した。

-感染細胞における殺菌活性

コンプレックスの細胞内細菌への有効性を検証した。ヒト結腸ガン細胞 (HCT-116) を 96well プレートでコンフルエントになるまで培養した。マッコイ 5A 液体培地に細菌数が  $10^4 \sim 10^5$  CFU/ml となるようにし、この菌液を 96well プレートで培養した HCT-116 に加え、37 2 時間で  $CO_2$  インキュベータにて培養した。感染後、200  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを用いて細胞外の細菌を殺菌した。ゲンタマイシン処理後、コンプレックスを加え 37 2 時間  $CO_2$  インキュベータ

にて培養した。細菌数をカウントするため、感染細胞は1%Triton X-100で破壊され、滅菌済みの生理食塩水で $10^{-1}$ ~ $10^{-4}$ 希釈した。この希釈された溶液をニュートリント寒天培地上へスポットし、コロニーカウントを行った。

HCT-116の細胞内に細菌が存在するかを観察するため、*E. coli*を蛍光標識させた。*E. coli*は細胞洗浄したものを使用し、蛍光ラベル化剤としてDansyl chloride (DNSC)を用いた。DNSCはジメチルホルムアミドに溶かし、OD<sub>600</sub>が約1.0の菌液1mlに対してDNSCを50 $\mu$ l加えた。その後37 $^{\circ}$ C 30分間、震盪培養し*E. coli*に蛍光標識をした。蛍光標識された*E. coli*は感染細胞における殺菌活性と同様に感染させた後、落射蛍光顕微鏡AX80(OLYMPUS)にて観察した。

#### 4. 研究成果

抗生物質の難水溶性の改善抗生物質単独およびOTfとのコンプレックスの溶解性を調べた。抗生物質は水表面に浮遊し溶けないまま残っているが、OTfとのコンプレックスは完全に水に溶けていた(Fig. 4)。このことからコンプレックスを形成することで難水溶性が改善されたことが確認できた。

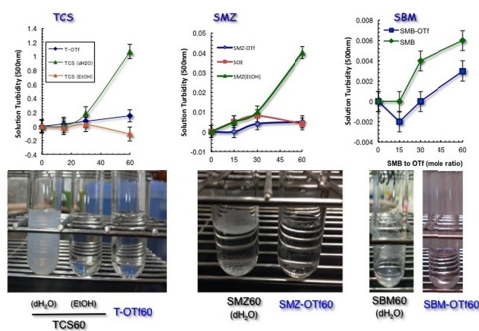


Fig. 4. Hydrophobic antibiotics turn soluble through complexation with OTf.

抗生物質とOTfの相互作用の結合部位を示すためにトリプトファン蛍光分析を行った。このトリプトファン蛍光分析はインドール側鎖に強く影響し、タンパク質やタンパク質複合体の構造変化を調べるのに非常に都合のよい分析方法である。結果はOTfとのコンプレックスの最大波長( $\lambda_{max}$ )がOTf単独よりも短く(Blue shift)になった。これはOTfのトリプトファン残基が疎水的になり、抗生物質がトリプトファン残基に作用したことを示す。これによりOTfと

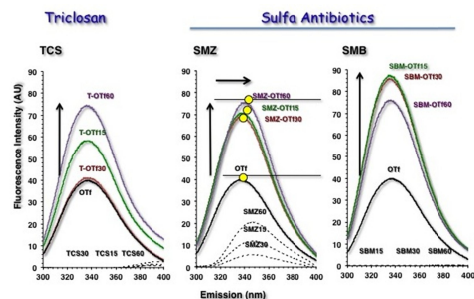


Fig. 5. Tryptophan fluorescence of antibiotics-OTf complexes.

のコンプレックスの形成が確認できた(Fig. 5)。

#### -コンプレックスの抗菌活性

OTfとのコンプレックスの抗菌活性は、4種類のグラム陽性菌および、3種類のグラム陰性菌に対してCFU法を用いて測定した。グラム陽性菌において、*Staph. epidermidis*、*Staph. aureus*および*L. monocytogenes*でOTf単独と抗生物質単独のみよりも、抗生物質-OTfの方が強い抗菌活性を示した。*P. aeruginosa*においては、抗生物質-OTf60がOTfと抗生物質60よりも濃度依存的に抗菌活性を示していた。特にブドウ球菌である*Staphylococcus*属に対し、抗生物質-OTfは抗菌活性が濃度依存的であり、OTfに対する抗生物質のモル比が上がるにつれ、抗菌活性も強くなっている(Fig. 6~9)。次に、3種類のグラム陰性菌(*E. coli*、*N. mucosa*、*Sal. typhimurium*)に対して、OTfと各抗生物質単独よりもOTfとのコンプレックスに強い抗菌活性が示された。このことは、低濃度でも抗菌剤として使えることを意味し、OTfにより抗生物質の副作用の問題を克服できる可能性がある。

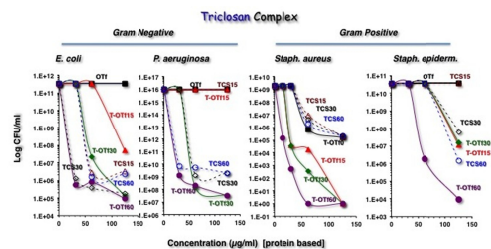


Fig. 6. Antimicrobial activity of triclosan-OTf (TCS-OTf) complexes.

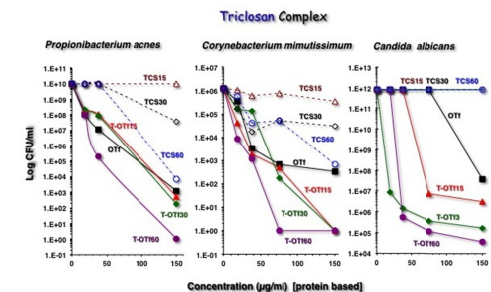


Fig. 7. Antimicrobial activity of triclosan-OTf (TCS-OTf) complexes.

薬剤耐性菌は多剤排出ポンプを持っており、そのおかげで細菌は薬剤から生き延びることができる。特にサルモネラ菌にはTolCという多剤排出ポンプが存在する。本研究では野生種(WT)またはTolCをノックアウト(TolC<sup>-</sup>)した*Salmonella enteritidis*を用いて、薬剤耐性菌に対する抗菌活性を行った。その結果、TolCノックアウトのサルモネラ菌ではOTf単独と各抗生物質とのコンプレックスに抗菌活性が示されて

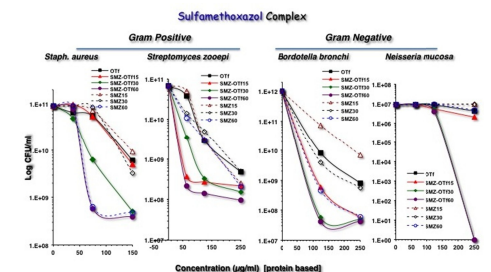
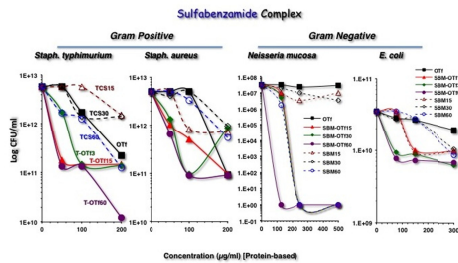


Fig. 8. Antimicrobial activity of



sulfamethoxazol-OTf (SMZ-OTf) complexes.

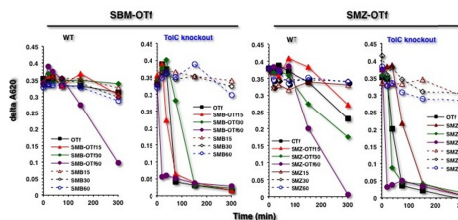
おり、一方野生種では抗生物質-OTf 60 のみ、濃度依存的に強い抗菌活性が示された(Fig. 10)。このことから、サルファ剤は OTf とのコンプレックス形成により、薬剤耐性菌に対して抗菌活性を持つ事が判明した。



**Fig. 9.** Antimicrobial activity of sulfabenzamide-OTf (SBM-OTf) complexes.

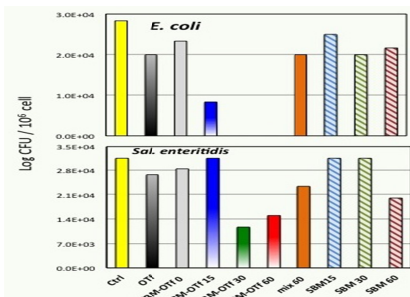
### -ヒト結腸細胞内の細菌に対する SBM-OTf の殺菌活性

HCT-116 の細胞内に感染した菌に対して、サルファ剤-OTf コンプレックスが殺菌活性を示すか検証した。この実験では *E. coli*、*Sal. typhimurium*、*Staph. aureus*、*P. acnes* を用いた。いずれの細菌において、OTf 単独と SBM 単独よりもコンプレックスに殺菌活性が示され、特にグラム陰性菌である *E. coli* および *Sal. typhimurium* に対して、コンプレックスにより強い効果が示された(Fig. 11)。蛍光標識をした *E. coli* に感染させた細胞におけるコンプレックスの殺菌活性では、OTf 単体と抗生物質単体では蛍光標識 *E. coli* が確認できたが、SBM-OTf を処理した感染細胞では見られなかった(Fig. 12)。これらの結果から、サルファ剤 と OTf のコンプレックスはヒトの細胞内に入り、殺菌活性を持つ事が判明した。



**Fig. 10.** OTf delivers sulfa drugs to *Salmonella enteritidis* through the multidrug resistance efflux pump TolC.

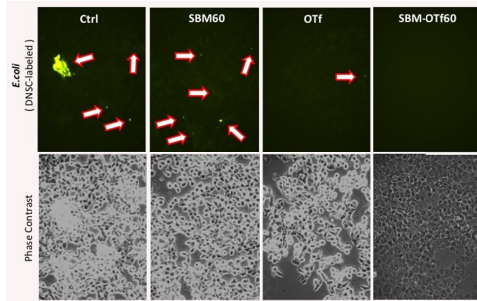
### -SMZ-OTf コンプレックスの抗感染作用



**Fig. 11.** OTf delivers SBM to intracellular *E. coli* or *Sal. enteritidis* infecting HCT-116 cells.

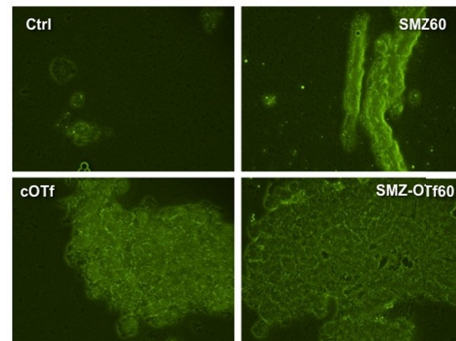
ヒトの細胞内に感染した細菌に対するコンプレ

ックスの有効性を検証した。結果は、スルファメトキサゾール単体を添加したものでは、細胞内に蛍光はほとんど見られないが、SMZ-OTf コンプレックスを添加したものでは、細胞内の細菌が死滅し、緑色の蛍光を発していた。また、

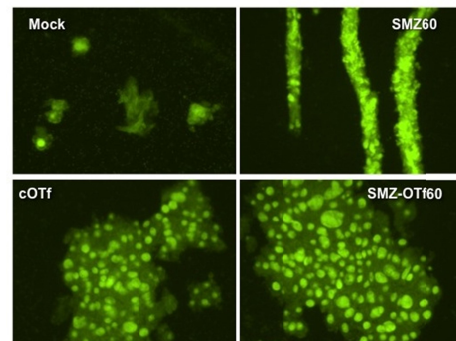


**Fig. 12.** OTf delivers SBM to intracellular *E. coli* infecting HCT-116 cells.

スルファメトキサゾール単体を添加したものでは、HCT-116 細胞が棒状に変形しており、さらに細胞膜が破壊していることも観察された(Fig.13 and 14)。これは、スルファメトキサゾールに細胞毒性があること、そして *L. monocytogenes* がヒトの細胞を破壊するほど感染力が強いことが考えられる。したがって、SMZ-OTf コンプレックスは、*L. monocytogenes* のような細胞内への感染する細菌に対しても、抗菌効果が強いことが確認できた。



**Fig. 13.** Anti-infective action of SMZ-OTf against intracellular *Listeria monocytogenes* in human colon epithelial cells (HCT116). Bacteria was treated with acridine orange before infecting HCT116 to visualize intracellular bacteria.



**Fig. 14.** Anti-infective action of SMZ-OTf against intracellular *Listeria monocytogenes* in human colon epithelial cells (HCT116). Infected HCT116 was treated with acridine orange with ethidium bromide to visualize vital mitochondria.

以上の結果より、OTf とサルファ系抗生物質が相互作用してコンプレックスが形成され、サルファ系抗生物質の難水溶性が改善されたことが確認できた。また、サルファ系抗生物質と OTf のコンプレックスは、OTf や抗生物質を単独で用いるよりも、様々な病原菌に対して強い抗菌活性を示した。さらに、OTf は、細菌やヒト細胞の表面に存在するトランスフェリンレセプターに対して、選択的に結合することが明らかにされている。したがって、OTf は、サルファ系抗生物質を細菌または感染された細胞へと運ぶ「キャリア」として、特異的な新規薬物送達戦略の開発に期待ができる。

## 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 6 件)

- (1) Ibrahim H.R.; Tatsumoto S.; Ono H.; Raspoet R.; Van Immerseel F. "Ovotransferrin as novel antibiotic-targeting molecule with potent antimicrobial action" *Intl. J. Mol. Sci.* In press (2014). (査読 有)
- (2) Ibrahim H.R.; Hozono A.; Fukami M.; Shaban M.A.; Miyata T. "Expression of ovotransferrin enhances tolerance of yeast cells toward oxidative stress" *J. Agri. Food Chem.*, 61 (26), pp 6358-6365 (2013). (査読 有)
- (3) Ibrahim, H.R., "Anti-infective drugs: why should we pay attention?" *Outlook on Developing Drugs*. Open Access 1-2 (2012). (査読 無)
- (4) Myint, S.L., Kinoshita, K., Shimogiri, T., Ibrahim, H.R., Tsusaki, T., Tanoue, T., Kawabe, K., Maeda, Y. and Okamoto, S. "Effect of polymorphism in egg white lysozyme on muramidase and antibacterial activities as well as hatchability in the Japanese quail (*Coturnix japonica*)" *J. Anim. Sci. (JAS)*, 90 (6), 1747-1755 (2012). (査読 有)
- (5) Ibrahim, H.R., Imazato, K. and Ono, H. "Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration" *J. Agri. Food Chem.* 59 (18), 10336-10345 (2011). (査読 有)
- (6) Hoq, M.I. and Ibrahim, H.R.\*. "Potent antimicrobial action of triclosan-lysozyme complex against skin pathogens mediated through drug-targeted delivery mechanism" *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, 130-137 (2011). (査読 有)
- (3) Ibrahim, H.R.; Ono, H.; Kubo, T. "Novel Antibiotics Drug-delivery Strategy by Utilizing Lysozyme as Targeting Molecule" in the **5<sup>th</sup> International Symposium** on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE 2013). Ghent, Belgium (June 2013). **Invited Oral**
- (4) Hamasaki, K. and Ibrahim, H.R. "Unique Antimicrobial Peptides from Lysozyme with Potent Anti-inflammatory Activities" in the **The 5<sup>th</sup> International Symposium** on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE 2013). Aula, Ghent, Belgium (June 2013). Poster
- (5) Ibrahim, H.R. "Novel Biopeptides from Lysozyme with Therapeutic Potential for Infectious and Inflammatory Diseases" in the **14<sup>th</sup> International Conference** of Functional Foods and Bioactive Compounds in the Management of Chronic Inflammation. University of California Los Angeles (UCLA), Los Angeles, USA (August 2013). Oral
- (6) Ibrahim, H.R. "Potential Therapeutic Bio-peptides from Beneath the Shell of Egg" in the 3<sup>rd</sup> **BanffEgg 2012 Forum** "Innovations in Egg Utilization Research and Development" Banff, Alberta, Canada (March 2012). **Invited Oral**
- (7) Ibrahim, H.R. "Therapeutic Potential of Novel Bioactive Peptides from Honey" in the 103<sup>rd</sup> **AOCS Conference**, Long Beach, California, USA (April 2012). **Invited Oral**
- (8) イブラヒム ヒッサム "感染症と戦う卵白由来の機能性ペプチド"- "機能性食品用ペプチド" 研究会、大阪国際会議場、大阪、日本 (August 2012). 招待講演
- (9) Ibrahim, H.R. "Ovotransferrin and its Peptides Confer in vivo Resistance to Oxidative Stress" in the 102<sup>nd</sup> AOCS Conference- "Health Aspects of Food Proteins and Peptides" *Symposium*, Cincinnati, Ohio, USA (May 2011). **Invited Oral**
- (10) イブラヒム ヒッサム "治療薬として卵白ペプチドの新しいポテンシャル"- "食品の流通システムと食品に関する最新の科学" 研究会、日本大学、藤沢、日本 (October 2011). 招待講演

[その他]

ホームページ等

<http://chem.agri.kagoshima-u.ac.jp/~hishamri/>

## 6 . 研究組織

- (1) 研究代表者: イブラヒム ヒッサムラドワン (IBRAHIM HISHAM RADWAN)  
鹿児島大学 農学部 教授

研究者番号 : 90274836

[学会発表](計 10 件)

- (1) Ibrahim, H.R. "Decoding the Functional Roles of Polypeptides in Egg Albumen: New Therapeutic Hope" in the "**International Workshop** on MDR efflux pumps and Salmonella Infection". Ghent, Belgium (March 2013). **Invited Oral**
- (2) Ibrahim, H.R. "Novel Therapeutic Potential of Egg Ovotransferrin" in the 104<sup>th</sup> **AOCS Conference**, Montreal, Quebec, Canada (April 2013). **Invited Oral**