

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658073

研究課題名(和文)RNA代謝を標的とする新規薬剤の探索

研究課題名(英文)Screening for novel antibiotics targeting RNA metabolism

研究代表者

高田 綾子 (TAKADA, Ayako)

東京工業大学・技術部・技術職員

研究者番号：20401565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：細菌感染症の化学療法において多剤耐性菌の出現は重大な問題となっている。このような問題に対抗するため、本研究では、Hfqタンパク質の過剰発現による細胞分裂阻害を指標とした新規スクリーニング系を構築した。土壌分離菌のライブラリーを用いて探索を行った結果、Hfq過剰発現株のコロニー形成を回復させるサンプルを27サンプル見出した。特に活性の強かった2サンプルについてLC-MS解析などにより構造を決定した結果、RavidomycinおよびStreptovaricin Cと同定された。本研究により得られた薬剤は、細菌(病原菌)の増殖やストレス応答、病原因子の発現などを抑制することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the chemotherapy of bacterial infectious diseases, the emergence of multidrug-resistant strains is becoming a serious problem. One of the strategies to overcome this problem is to develop new antibiotics with a new molecular target. The Hfq protein is known as an RNA chaperone. We previously reported that overproduction of Hfq inhibits cell division by suppressing expression of the cell division protein FtsZ. In this study, we developed a novel screening system for inhibitors of Hfq-mediated RNA metabolism. *Escherichia coli* strain carrying the IPTG-inducible *hfq* gene was used in the assay. We assayed culture broths of actinomycetes isolated from soil samples. Recovery of colony formation was observed for 27 samples. It was found that ravidomycin, an inhibitor of RNA synthesis, and streptovaricin C, an inhibitor of RNA polymerase, were active compounds. These results showed that RNA polymerase inhibitors somehow suppressed Hfq-mediated growth inhibition.

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：RNA代謝 抗生物質 Hfq

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の化学療法において多剤耐性菌の出現は重大な問題となっている。2010年に日本でも感染が確認された既存の薬剤が効かない New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) 産生多剤耐性菌のニュースは記憶に新しいところである。このような問題に対抗するための様々な戦略が検討されているが、その一つは新規標的を有する薬剤を開発することである。

一方、遺伝子発現の調節は、mRNA の合成量とタンパク質の合成量がほぼ比例することから、転写レベルでの制御機構について重点的に解析が行われてきた。1998年に Fire により線虫の転写後遺伝子サイレンシングに二本鎖 RNA が関与する RNA interference (RNAi) という現象が報告され、small RNA による遺伝子発現制御が注目されることとなった。大腸菌においても 2000年に RNAi と同等の現象が報告されたのを契機として、非翻訳低分子 RNA が関与する転写後の mRNA レベルでの分解、プロセッシングによる遺伝子発現制御の報告が増加しており、遺伝子発現における RNA 代謝の重要性が明らかとなった。

2. 研究の目的

我々は RNA シャペロンである Hfq タンパク質により発現が制御されているタンパク質を見いだした (Wachi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999; Takada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999)。そのメカニズムを解析する過程で、細胞内では RNase E による *ftsZ* mRNA 前駆体のプロセッシングと Hfq による前駆体 mRNA の翻訳阻害のバランスにより、細胞分裂タンパク質 FtsZ の合成量が調節されているというモデルを提唱した (Takada et al., Genes Cells., 2005)。さらに、病原性に重要な酸耐性機構 Gad システムの発現にも Hfq が関与していることを見出している (Takada et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007)。

そこで本研究は、Hfq の関わる RNA 代謝を標的とした新規スクリーニング系を構築し、細菌の細胞分裂や病原性を抑制する新規薬剤の発見を目指した。本研究により得られた薬剤は、細菌 (病原菌) の増殖やストレス応答、病原因子の発現などを抑制することが期待でき、このような RNA 代謝反応を標的とした探索はこれまで全く行われていないため、新規化合物が得られる可能性が高い。

3. 研究の方法

我々は Hfq タンパク質の過剰発現が FtsZ タンパク質の合成低下を引き起こし、細胞分裂を阻害することを見出し (Takada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999)、細胞内では RNase E と Hfq により細胞分裂タンパク質 FtsZ の合成量が調節されているというモデルを提唱した (Takada et al., Genes

Cells., 2005、図 1)。

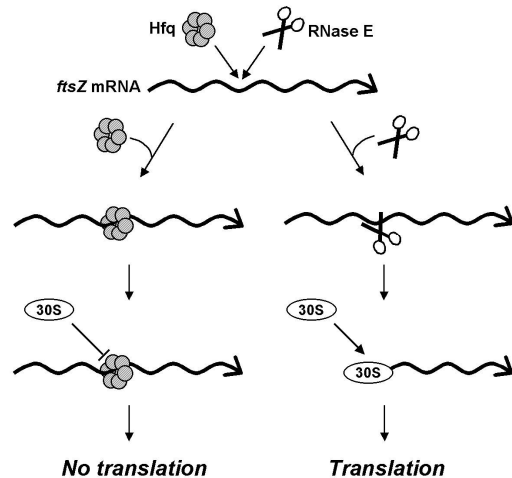


図 1 Hfq と RNase E による *ftsZ* 遺伝子発現制御モデル

そこで、この分裂阻害を指標としたスクリーニング系を構築した。具体的には、Hfq の発現が IPTG 誘導可能な菌株 JM109/pHFQ701 を含んだ寒天プレート上に、サンプル溶液を浸み込ませたペーパーディスク (8 mm) を置き、30 で培養した。この条件ではコロニー形成はできないが、薬剤により Hfq の発現が抑制されるもしくは Hfq の機能が抑制されると、ペーパーディスクの周辺にコロニー形成が見られるはずである。(図 2)。

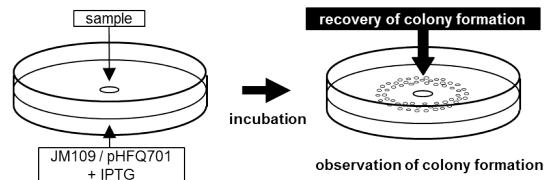


図 2 Hfq 阻害剤のスクリーニング

まずは、構築されたスクリーニング系を用いて、既知の抗生物質について検定を行い、スクリーニング系の有効性を確認した。続いて、検定サンプルは用いて探索を行った。検定サンプルは、連携研究者が所有するケミカルライブラリーおよびこれまでに収集した土壌分離菌のライブラリーより調製した。本スクリーニング系により、Hfq タンパク質の発現を抑制する化合物や Hfq の機能を抑える化合物が見出されてくると考えられる。

ペーパーディスクの周辺にコロニー形成が見られたサンプルについては、LC-MS 解析により構造を決定した。

4. 研究成果

Hfq タンパク質の過剰発現は FtsZ タンパク

質の合成低下を引き起こし、細胞分裂を阻害する。この分裂阻害を指標にし、Hfq の関わる RNA 代謝を標的とした新規スクリーニング系を構築し、まず、既知の薬剤を用いて探索を行った。その結果、DNA 合成阻害剤や、タンパク質合成阻害剤、細胞壁合成阻害剤は効果を示さず、RNA 合成阻害剤である Rifampicin が濃度依存的に生育を回復することを見出した(図3)。コロニー形成を回復する Rifampicin の濃度を調べた結果、大腸菌に対する MIC は 20 $\mu\text{g/ml}$ だが、コロニー形成の回復は 5 $\mu\text{g/ml}$ で観察された。これにより、本スクリーニング系が有効であることが示された。

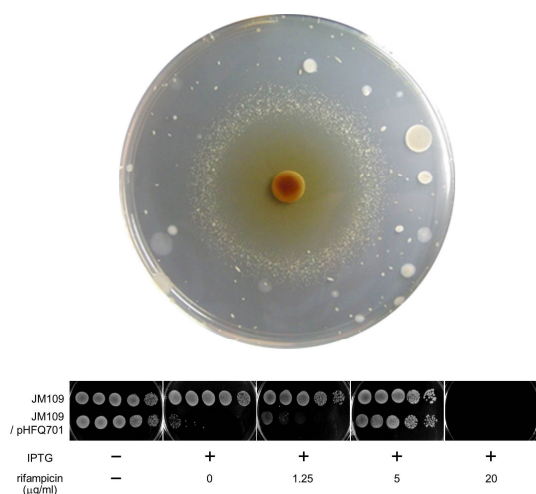


図3 Rifampicin によるコロニー形成回復

続いて、連携研究者がこれまでに収集した土壌分離菌のライブラリーを用いて、培養サンプルを直接プレートに置く方法で探索を行った。その結果、Hfq 過剰発現株のコロニー形成を回復させるサンプルを 27 サンプル見出した。また、抗菌検定の標準菌としたコリネ型細菌の生育は阻害せず、菌株 JM109/pHFQ701 の生育を阻害するサンプルを見出した。これらのサンプルはグラム陽性菌には作用せず、グラム陰性菌に作用することが期待され、新規薬剤となる可能性がある。本スクリーニング系ではそのような化合物も探索できることが示された。コロニー形成を回復させる 27 サンプルのうち強い活性を示した 2 サンプル (No.394、No.554) について、液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) により解析した結果、Ravidomycin および Streptovaricin C と同定された (図4)。Ravidomycin はアミノ糖を含むアリール C-グリコシド系抗生物質であり DNA にインターカレートすることにより RNA 合成を阻害する。また、Streptovaricin C は RNA polymerase を阻害する抗生物質である。本スクリーニング系では、既知の RNA 合成阻害剤である Rifampicin が活性を示しており、本結果はこ

れに合致し、本スクリーニング系の有効性がさらに示された。

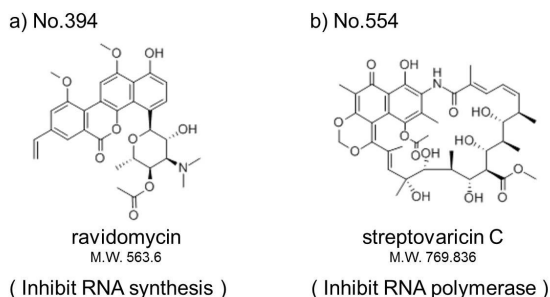


図4 構造解析結果

本研究により見出された薬剤は、Hfq タンパク質の発現を抑制する、もしくは Hfq の機能を抑える化合物であると考えられる。いくつかの病原菌において、Hfq ホモログが病原性の発現に関与することが報告されている。本研究により得られた薬剤は、細菌(病原菌)の増殖やストレス応答、病原因子の発現などを抑制することが期待でき、細菌の遺伝子発現制御機構の新たな側面が明らかになることが期待できる。また、このような RNA 代謝反応を標的とした薬剤の探索はこれまで全く行われておらず、新規化合物が得られる可能性が高い。近年の多剤耐性菌に対抗できるような薬剤開発のためのリード化合物となることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Yamashita C., Hashimoto K., Kumagai K., Takada A., Kawasaki H. and Wachi M., L-Glutamate Secretion by the N-Terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCg11221 Mechanosensitive Channel, Biosci. Biotech. Biochem., 査読有, Vol.77, No.5, 2013, pp1008-1013
DOI: 10.1271/bbb.120988

Matsutani, A., and Takada, A., Fabrication of Silicon Microchannel for Transport of Bacterial Cells by Ar/F₂ Vapor Etching Process, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol.52, 2013, 47001-47004
DOI: 10.7567/JJAP.52.047001

Matsutani, A., and Takada, A., Microfabrication of Si and GaAs by Plasma Etching Process Using Bacterial Cells as an Etching Mask Material, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vo.51, 2012, 87001-87004
DOI: 10.1143/JJAP.51.087001

〔学会発表〕(計13件)

松谷 晃宏、高田 綾子、InP 基板上に製作したマイクロ困いを用いた出芽酵母の培養、化学とマイクロ・ナノシステム学会第28回研究会、2013年12月6日、イーグレひめじ(姫路)

松谷 晃宏、高田 綾子、マイクロ牧場アレイを用いた出芽酵母の培養、第74回応用物理学会秋季学術講演会、2013年9月16日、同志社大学(京都)

松谷 晃宏、高田 綾子、Ar/F₂ 気相エッチングにより製作した Si マイクロ流路を用いた大腸菌細胞の輸送、第4回集積化 MEMS 技術研究ワークショップ、2013年7月26日、大阪府立大学(大阪)

Ayako Takada, Masaaki Wachi、Screening for inhibitors of Hfq-mediated RNA metabolism, 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM-2013)、2013年6月26日、Cancun Convention Center(メキシコ)

松谷 晃宏、高田 綾子、マイクロピラー構造を用いた大腸菌と酵母の単一細胞分離とサイズ分離、第60回応用物理学会春季学術講演会、2013年3月27日、神奈川工科大学(神奈川)

高田 綾子、和地 正明、RNA 代謝を標的とする新規薬剤の探索、日本農芸化学会2013年度大会。2013年3月25日、東北大学(宮城)

Akihiro Matsutani、Ayako Takada、Single-Cell Isolation and Sizing of Microorganisms by Microenclosure Array with Multipillar Structure, MNC 2012, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference、2012年11月1日、神戸メリケンパークオリエンタルホテル(兵庫)

Akihiro Matsutani、Ayako Takada、Microfabrication of Single-Cell Isolation Structure On Vertical Cavity Surface Emitting Laser Wafer、Proceedings of the 29th Sensor Symposium on Sensors, Micromachines, and Applied Systems, 2012 Annual Conference of Sensors and Micromachines Society of IEEJ、2012年10月23日、北九州国際会議場(福岡)

松谷 晃宏、高田 綾子、半導体プロセスを用いた細胞サイズ分離用マイクロピラー構造の製作、第73回応用物理学会学術講演会、2012年9月12日、愛媛大学(愛媛)

松谷 晃宏、高田 綾子、Ar/F₂ 気相エッチングによる細菌細胞輸送用 Si マイクロ流路の形成、第59回応用物理学関係連合講演会、2012年3月18日、早稲田大学(東京)

松谷 晃宏、高田 綾子、低圧プラズマプロセスによる細菌細胞の分解と細菌細胞

を用いた半導体のドライエッチング、2011年度電気学会研究会 プラズマ/パルスパワー合同研究会、2011年12月15日、東京工業大学(神奈川)

松谷 晃宏、高田 綾子、Ar/F₂ 気相エッチングとプラズマエッチングによる Si マイクロ流路構造の形成、Plasma Conference 2011、2011年11月23日、石川県立音楽堂(石川)

松谷 晃宏、高田 綾子、O₂およびCl₂を用いた大腸菌のプラズマエッチング、第72回応用物理学会学術講演会、2011年9月2日、山形大学(山形)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 綾子 (TAKADA, Ayako)
東京工業大学 技術部・技術専門員
研究者番号：20401565

(2) 連携研究者

和地 正明 (WACHI, Masaaki)
東京工業大学 大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号：90192822