

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460143

研究課題名(和文) 肺アスペルギルス症の治療薬開発を目指した病原因子エラスターゼの阻害物質の探索

研究課題名(英文) Search of inhibitor for the pathogenesis factor elastase. Aiming at therapeutic drug development of pulmonary aspergillosis

研究代表者

小森 由美子 (Komori, Yumiko)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：60162070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：アスペルギルス属真菌が産生するエラスターゼは、肺組織主要構成成分のエラスチンやコラーゲン、血中フィブリノーゲン等を分解する病原因子とされる。本研究では、アスペルギルス属由来エラスターゼインヒビターを肺アスペルギルス症治療薬開発のシーズとして利用することを目的とし、アスペルギルス7菌種から単離したエラスターゼの特性、ヒト由来培養細胞に対する病原性の比較を行うとともに、エラスターゼインヒビターの病原性抑制効果について検討した。その結果、*A. fumigatus*と*A. flavus*が産生するインヒビターは自身のエラスターゼのみならず、他菌種由来のエラスターゼに対しても強い効果を示すことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Elastolytic proteinase produced by *Aspergillus* species is regarded as one of the pathogenesis factor, and hydrolyze elastin and collagen exist in lung tissues, and blood coagulation factor fibrinogen. In this study, it was intended to use elastase inhibitor derived from *Aspergillus* fungus as seeds of the pulmonary aspergillosis therapeutic drug development. Elastolytic proteinases isolated from culture filtrate of seven *Aspergillus* strains were characterized and compared their cytotoxicity on cultivated human cells. Elastase inhibitors were also purified and examined their pathogenic depression effects. As a result, it was confirmed that the inhibitor which *A. fumigatus* and *A. flavus* produced showed a strong effect for not only the elastolytic proteinases of oneself but also the elastolytic proteinases derived from other strains.

研究分野：微生物学

キーワード：アスペルギルス エラスターゼ エラスターゼインヒビター 肺アスペルギルス症

## 1. 研究開始当初の背景

医療の高度化に伴い増加している易感染患者においては、健常人では問題とならない弱毒性の環境常在菌が致命的な感染症を引き起こす場合がある。そのひとつに真菌による肺アスペルギルス症があり、既存の抗真菌薬を用いた治療では完治が困難な場合も多い。また新規の抗真菌薬も上市されつつあるが、肺真菌症においては宿主自身の好中球が産生するエラスターゼや各種サイトカインによる組織障害も症状の悪化に関与していると考えられており、抗真菌薬に加えてウリナスタチンなどの酵素阻害剤の併用が試みられている。しかしながら、現在使用されている酵素阻害剤の作用は限定的であり、新たな治療薬の開発が望まれている。

我々はアスペルギルス属真菌の産生するエラスターゼの病原性や構造を検討してきたが、その過程で一部の菌株が培養条件を変えると低分子ペプチド性のエラスターゼ・インヒビターを産生することを見出した<sup>1-3)</sup>。これまでに単離したインヒビターとして *A. fumigatus* 由来の AFUEI、*A. flavus* 由来の AFLEI などがあり、*A. oryzae*、*A. nidulans* の一部の菌株もエラスターゼ・インヒビターを産生する可能性があることが示唆されているが、各々の分子量や構造は異なっており、またそれらのエラスターゼに対する阻害機構、阻害活性の強さなどについては解明されていない点が多い。これらのインヒビターは、今までに全く報告されていない新規物質であるか、一部真菌のゲノム解析においては「機能不明タンパク質」と分類されていた物質であり、本研究を進めて治療薬開発につながる試みは、重篤な肺アスペルギルス症治療に対する新たな切り口として期待される。

## 2. 研究の目的

致命的な日和見感染症の肺アスペルギルス症における重要な病原因子エラスターゼは、*A. fumigatus* など病原性が強い数種類のアスペルギルス属真菌において産生されることが確認されている。興味深いことにこれらの菌種の一部は、培養条件を変えると自身のエラスターゼ活性を阻害するエラスターゼ・インヒビターを産生する。そこで本研究ではこのエラスターゼ・インヒビターの単離、構造決定を行うとともに、阻害機構やエラスターゼの組織障害性の抑制効果を詳細に検証し、重篤な肺アスペルギルス症治療薬としての応用の可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

アスペルギルス属の各種菌株を用い、エラスターゼとエラスターゼ・インヒビター産生能のスクリーニングを実施し、目的に合致する菌株を選択して大量培養、精製を行う。単離したエラスターゼの病原性とインヒビターの阻害効果について、生化学的手法で検

討するとともに、培養細胞によるアッセイ系を確立して測定する。また、エラスターゼ・インヒビターの構造決定を行い、その阻害機構を検討する。

(1) アスペルギルス属真菌におけるエラスターゼとエラスターゼ・インヒビター産生能のスクリーニング

連携病院より分与されたアスペルギルス症患者からの臨床分離株、および市販の菌株を、既に確立しているエラスチン含有 Yeast carbon base (YCB) 培地を使用する方法で培養し、エラスターゼ産生能のスクリーニングを行う。また菌株を YCB-casamino acid 培地で培養してエラスターゼ・インヒビター産生能のスクリーニングを行う。検討の結果、各々の産生性が高い菌株を選択するとともに、最も適切な培養条件を設定する。

(2) エラスターゼの単離精製と諸性質の生化学的・生理学的検討

選択したエラスターゼ産生株を大量培養し、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC 等によりエラスターゼを単離・精製する。

分子量等エラスターゼの生化学的諸性質を確認の上、生体由来タンパク質に対する作用を測定する

(3) エラスターゼ・インヒビターの単離精製と諸性質、阻害機構の検討

選択したエラスターゼ・インヒビター産生株を培養し、各種クロマトグラフィー、HPLC 等によりインヒビターを単離・精製する。

真菌エラスターゼに対する阻害作用について酵素アッセイ法による検討を行う。

インヒビターの阻害様式について、(2) で精製したエラスターゼを用いて検討する。

これまでの検討によりインヒビターは分子量数千のペプチドであることが明らかとなっているため、MALDI/TOF-MS、Protein sequencer を使用して構造決定を行う。

(4) 培養細胞を用いた組織傷害性の検討

真菌エラスターゼは予備試験で血管内皮細胞傷害性を示したことから、培養細胞(ヒト血管内皮細胞、ヒト気管支上皮細胞)を用い、エラスターゼの傷害性およびそれに対するエラスターゼ・インヒビターの抑制効果を検討する。

## 4. 研究成果

(1) アスペルギルス属真菌におけるエラスターゼとエラスターゼ・インヒビター産生能のスクリーニング、および性質

エラスターゼ: *A. nidulans*、*A. ustus*、*A. oryzae*、*A. ochraceus*、*A. versicolor* の培養上清からエラスターゼを単離・精製し、す

に報告している *A. fumigatus*, *A. flavus* 由来エラスターゼ (AFUE, AFLE) と諸性質を比較した。分子量はいずれも 30~40 kDa であったが、病原性が強いとされる *A. fumigatus*, *A. flavus* 由来酵素 (AFUE, AFLE) が塩基性タンパク質であるのに対し、他のエラスターゼは酸性~中性タンパク質であった。また合成基質に対するタンパク量当たりの比活性も、病原性が指摘されている菌種由来酵素の方が高く、一般に病原菌としては認識されていない *A. oryzae*, *A. ochraceus* 由来エラスターゼは低い値を示した。各エラスターゼの合成基質に対する親和性 ( $K_m$ ) には大きな違いは見られなかったが、酵素の代謝回転効率 ( $k_{cat}$ ) は AFUE, AFLE が最も高く、*A. oryzae*, *A. ochraceus* 由来酵素では  $k_{cat}$  がそれらの 10 分の 1 程度であった。

また生体由来タンパク質 (フィブリノーゲン、コラーゲン) に対しても、AFUE, AFLE では特に強い分解作用がみられた。

エラスターゼ・インヒビター: *A. fumigatus* や *A. flavus* と同様、*A. ochraceus*, *A. oryzae* もインヒビター活性があるペプチドを産生することが明らかとなったが、その分子量や構造は *A. fumigatus* および *A. flavus* が産生するインヒビター AFUEI (mol. wt.: 7525.8) とは異なっていた。*A. oryzae* 由来エラスターゼ・インヒビターの部分一次構造および遺伝子配列から、新規なエラスターゼ・インヒビター Asoryzin (mol. wt.: 3604.6) の構造決定を行った。

(2) アスペルギルス属真菌由来エラスターゼの培養細胞に対する傷害作用

血管内皮細胞傷害性: ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) を用いて検討した結果、HUVEC に対する傷害作用 ( $EC_{50}$ ) は、AFUE, AFLE と *A. nidulans*, *A. ustus* エラスターゼで 2.0~4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であったが、他のエラスターゼの傷害作用は非常に弱かった。HPAEC は AFUE, AFLE に対してより感受性を示し、 $EC_{50}$  は 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下であったが、他のエラスターゼの  $EC_{50}$  は 5.0~8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、肺における各菌種の病原性の強さと一致する結果となった。

気管支上皮細胞: 肺微小気管支上皮細胞 (HSAEC) に対する傷害作用はいずれのエラスターゼでも観察され、その  $EC_{50}$  は AFUE, AFLE が 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度、他は 2.0~7.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。一方、気管支上皮細胞 (HBTEC) に対する傷害作用は、いずれのエラスターゼも非常に弱かった。

肺胞上皮細胞: 肺胞上皮細胞 (HPAEpiC) に対しては、AFUE, AFLE が最も強い傷害性を示し、そのほかの酵素では *A. nidulans* と *A. versicolor* エラスターゼに弱い作用が認められた。

以上の結果から、病原性が強いとされる

*A. fumigatus*, *A. flavus* 由来エラスターゼは、肺の血管内皮細胞、肺胞上皮細胞、微小気管支上皮細胞を傷害することで、肺組織に病変をつくると推測された。またエラスターゼの病原性が培養細胞に対する細胞傷害性と関連していたことから、菌種や菌株の病原性を、培養細胞を用いて検討することが可能であると考えられた。

(3) エラスターゼ・インヒビターの酵素活性および細胞傷害性抑制効果の検討

AFUEI 遺伝子を *A. oryzae* に導入してインヒビターを産生させ、精製した組換え AFUEI を用いて検討を行った。  
酵素活性阻害効果: 各菌株由来エラスターゼ 1 モルに対し、AFUEI のモル比を変化させて活性を測定した。いずれの酵素に対しても、AFUEI は 0.5~1 モルで活性をほぼ阻害したが、さらにモル比を減少させた場合、 $k_{cat}$  が大きいエラスターゼでは十分な阻害効果が得られなかったのに対し、 $k_{cat}$  が小さいエラスターゼでは AFUEI のモル比を 10 分 1 にしても酵素活性が阻害された。またインヒビターの阻害様式は、非拮抗阻害であると考えられた。フィブリノーゲンに対するエラスターゼの作用も、AFUEI 存在下では分解作用が阻害された。  
細胞傷害性抑制効果: 各菌株由来エラスターゼ 1 モルに対し AFUEI を等モル混和して HPAEC に作用させたところ、全てのエラスターゼの細胞傷害性が消失したが、AFUEI のモル比を低下させると、 $k_{cat}$  が大きいエラスターゼでは細胞傷害性が認められた。以上の結果から、アスペルギルス属真菌感染症においては、エラスターゼが肺の細胞や組織を傷害するとともに、血液凝固系のフィブリノーゲンを分解して出血傾向を亢進させることで病原性を示すと考えられ、酵素の特性 ( $pI$ ,  $k_{cat}$  など) が病原性の強さに関係することが示唆された。アスペルギルス属真菌由来エラスターゼ・インヒビターは、確認したすべてのアスペルギルス属菌種由来エラスターゼを阻害し、その作用は治療薬として現在承認されている既存のプロテアーゼ・インヒビターより強力であったことから、新たな治療薬開発のシーズとして検討を進める価値があると考えられた。

<引用文献>

- 1) Okumura Y., Matsui T., Ogawa K., Uchiya K., Nikai T., Biochemical properties and primary structure of elastase inhibitor AFUEI from *Aspergillus fumigatus*, *J. Med. Micro.*, 57 巻, 2008, 803-808
- 2) Okumura Y., Ogawa K., Uchiya K., Komori Y., Nonogaki T., Nikai T., Biological properties of elastase inhibitor, AFLEI from *Aspergillus flavus*, *Jpn. J. Med. Mycol.*, 49 巻,

2008, 87-93

- 3) Yamashita N., Komori Y., Okumura Y., Uchiya K., Matsui T., Nishimura A., Ogawa K., Nikai T., High-yields heterologous production of the novel *Aspergillus fumigatus* elastase inhibitor AFUEI in *Aspergillus oryzae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 112 巻, 2011, 114-117

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 4 件)

Yumiko Komori, Yoshiyuki Okumura, Kazuhito Kamiya, Kenji Ogawa, Toshiaki Nikai, Characterization of elastolytic protease, Asnase from *Aspergillus nidulans* and its cytotoxicity on human endothelial and epithelial cells, *Int. J. Biochem. Res. Rev.*, 査読有, 12(2)巻, 2016, 1-8

DOI: 10.9734/IJBCRR/2016/26206

小森 由美子, 二改 俊章, アスペルギルス属真菌による肺疾患の治療薬開発を目指した病原因子阻害物質の探索とその病原性抑制効果の検討, *名城大学総合研究所紀要*, 査読無, 18 巻, 2013, 69-71

Yoshiyuki Okumura, Makoto Suzukawa, Kei-ichi Uchiya, Kenji Ogawa, Yumiko Komori, Nobuo Yamashita, Toshiaki Nikai, Characterization and identification of partial amino acid sequence of a novel elastase inhibitor, asnidin from *Aspergillus nidulans*, *Med. Mycol. J.*, 査読有, 54 巻, 2013, 279-284  
Mayuko Sakuma, Katsumi Imada, Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya, Nobuo Yamashita, Kenji Ogawa, Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai, Michio Honma, Toshiaki Nikai, X-ray structure analysis and characterization of AFUEI, an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 288 巻, 2013, 17451-17459

### [学会発表](計 12 件)

小森 由美子, 奥村 欣由, 岡本 古都, 山下 伸雄, 二改 俊章, *Aspergillus fumigatus* 由来エラスターゼインヒビター-AFUEI の病原性抑制作用, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 24 日, 大阪国際交流センター(大阪)

小森 由美子, 岡本 古都, 浅井 郁美, 奥村 欣由, 小川 賢二, 二改 俊章, 各種 *Aspergillus* 属真菌由来エラスターゼの性質と細胞傷害作用を指標とした病原性の比較, 第 52 回日本細菌学会中部支部総会, 2015 年 10 月 24 日, 名古屋市立大学(名古屋)

奥村 欣由, 山下 伸雄, 打矢 恵一, 平松 穂

乃花, 小森 由美子, 安島 優果, 浅井 郁美, 小川 賢二, 明石 貴裕, 二改 俊章, *Aspergillus oryzae* 由来エラスターゼインヒビター"Asoryzin"の精製とその性質, 第 9 回アスペルギルス研究会, 2015 年 9 月 5 日, 日本赤十字社医療センター(東京)

小森 由美子, 岡本 古都, 奥村 欣由, 山下 伸雄, 明石 貴裕, 小川 賢二, 二改 俊章, 各種 *Aspergillus* 属真菌由来エラスターゼの病原性に関する検討, および組換えエラスターゼインヒビター(AFUEI)の阻害効果, 第 9 回アスペルギルス研究会, 2015 年 9 月 5 日, 日本赤十字社医療センター(東京)

岡本 古都, 奥村 欣由, 山下 伸雄, 二改 俊章, 小森 由美子, *Aspergillus* 属真菌由来の病原因子, エラスターゼに対する組換えエラスターゼインヒビター(AFUEI)の阻害効果, 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会, 平成 27 年 7 月 4 日, 名古屋市立大学(名古屋)

小森 由美子, 奥村 欣由, 二改 俊章, *Aspergillus* 属の真菌が産生するエラスターゼのヒト由来培養細胞に対する作用, 第 88 回日本細菌学会総会, 平成 27 年 3 月 26 日, 長良川国際会議場(岐阜)

山下 伸雄, 平松 穂乃花, 奥村 欣由, 小森 由美子, 打矢 恵一, 明石 貴裕, 小川 賢二, 二改 俊章, 麹菌 *A. oryzae* のエラスターゼインヒビター様タンパク質, 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 平成 26 年 11 月 16 日, 東北大学(仙台)

小森 由美子, 奥村 欣由, 二改 俊章, *Aspergillus fumigatus* および *Aspergillus flavus* の産生するエラスターゼのヒト由来培養細胞に対する作用, 第 87 回日本細菌学会総会, 平成 26 年 3 月 26 日, タワーホール船堀(東京)

Mayuko Sakuma, Katsumi Imada, Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya, Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai, Toshiaki Nikai, Michio Honma, Structural similarity of AFUEI, an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, and the potato I family inhibitors from plants, 第 51 回日本生物物理学会年会, 平成 25 年 10 月 30 日, 京都大学(京都)

小栗 拓也, 小森 由美子, 奥村 欣由, 小川 賢二, 二改 俊章, *Aspergillus ustus* の産生するエラスターゼ, Asusutase のヒト培養細胞に対する障害作用, 第 50 回日本細菌学会中部支部総会, 平成 25 年 10 月 19 日, ホテル竹島(蒲郡)

小栗 拓也, 小森 由美子, 奥村 欣由, 小川 賢二, 二改 俊章, ヒト培養細胞に対する *Aspergillus ustus* の産生するエラスターゼ Asusutase の障害作用, 第 7 回アスペルギルス研究会, 平成 25 年 8 月 28 日,

日本赤十字社医療センター（東京）  
Mayuko Sakuma, Katsumi Imada,  
Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya,  
Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai,  
Michio Homma, Toshiaki Nikai, X-ray  
structure analysis of AFUEI, an  
elastase inhibitor from *Aspergillus  
fumigatus*, 4th International  
Symposium on Diffraction Structural  
Biology、平成 25 年 5 月 28 日、名古屋市  
中小企業振興会館（名古屋）

〔図書〕（計 1 件）

二改 俊章、奥村 欣由、小森 由美子、肺  
アスペルギルス症と急性肺傷害に対する  
治療薬の開発を目指して、医薬ジャーナル  
社、化学療法の領域、30 巻、2014、  
2098-2105

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小森 由美子 (KOMORI, Yumiko)  
名城大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60162070

### (2)研究分担者

二改 俊章 (NIKAI, Toshiaki)  
名城大学・薬学部・教授  
研究者番号：80103266