様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号： １２５０１
研究種目： 挑戦的萌芽研究
研究期間： 2013～2014
課題番号： ２５６７０２０８

研究課題名（和文） 次世代型抗感染症薬となるエフェクター機能阻害剤の探索研究

研究課題名（英文） Studies on the next-generation antimicrobial agents by high-through-put screening of small-molecule compounds inhibiting bacterial effector

研究代表者
山本　友子（Tomoko, Yamamoto）

千葉大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：６０１１０３４２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤耐性を克服する次世代型抗感染症薬「菌を殺さずに病原力のみを阻害する薬剤」の創製が強く望まれている。申請者は長年にわたり蓄積してきたサルモネラの感染生物学的研究成果に基づき、病原エフェクターの機能阻害物質が次世代型抗感染症薬の候補になりうると考え本研究に取り組んだ。本研究ではサルモネラエフェクターSlrPのE3リガーゼ活性測定システムを確立し、千葉大学キラリティーライブラリーの化合物について阻害活性を検討した。これまでに阻害物質の同定には至っていないが、本方法を応用して、E3リガーゼ活性を有するエフェクターSspH2の標的蛋白質がマクロファージ細胞質に存在することを明らかすることができた。

研究成果の概要（英文）：Antimicrobial resistance threatens the effective prevention and treatment of bacterial infections. However, the increasing understanding of bacterial pathogenesis has revealed many potential strategies to combat bacteria-mediated diseases. Bacterial effectors are involved in establishing disease processes, but those are not essential for bacterial growth or homeostasis. Thus, effector is expected to be a candidate of therapeutic target, and inhibitors of effectors could potentially reduce virulence without causing bacterial death, thereby avoiding any subsequent development of resistance. In this study, we performed to isolate small-molecule inhibitors of Salmonella effector, SrlP by conducting high-through-put screening by exploiting the library deposited by Chiba University. We have also revealed that the molecule targeted by SspH2 is in the cytoplasm of macrophage cells.

研究分野： 細菌学

キーワード： 抗感染症薬　薬剤耐性　エフェクター　E3リガーゼ　阻害剤

１．研究開始当初の背景

World Health Report 2008（WHO 統計）は、世界の年間死亡数は約 5700 万人であり、その最大の死因は感染症であると報告している。年間約 1000 万人が、肺炎、エイズ、下痢症、結核、マラリア等で死亡している。一方、2011 年の人口動態統計は、日本における肺炎による死亡者数が、がん、心疾患に次いで第 3 位となったと報告している。従って感染症の制御は、我が国においても喫緊の課題と言える。抗菌薬が感染症治療の根幹となってきたことは論を待たないが、抗菌薬の使用は、常に耐性菌の蔓延という問題を生み出してきた。有効な治療薬の全くない超多剤耐性菌の蔓延は、新たな感染症の出現に匹敵するものであり、薬剤耐性の克服は 21 世紀に持ち越された最も重要な医学的課題の一つといえる。このような現状の下で、薬剤耐性を克服した次世代型抗感染症薬の創成が強く望まれている。薬剤耐性菌の蔓延を克服できる理想的な抗感染症薬は「菌を殺さずにその病原力のみを阻害する薬剤」であると考えられるが、近年の細菌感染症研究の著しい進歩とりわけ分子レベルでの最先端研究の進展は、これらの開発を可能にしつつある。

２．研究の目的

薬剤耐性を克服できる理想的な抗感染症薬は菌を殺さずにその病原力のみを阻害する薬剤である。申請者は、長年にわたり蓄積してきたサルモネラの感染生物学的研究成果と最近導入したバイオインフォマティクスの研究成果に基づいて、広範な病原細菌に保存される病原エフェクターの機能阻害物質が次世代型抗感染症薬になりうると考え、本研究を計画した。阻害物質のハイスループットスクリーニングにあたっては、本学の分子構築技術を集結した「千葉大学分子キラリティー研究センター」との連携により、同センターの光学活性化合物ライブラリーを活用する。

３．研究の方法

(1)　SlrP ユビキチンリガーゼ活性測定システムの構築：SlrP の高発現系を作成し、大量精製を行い、測定に使用した。SlrP の基質として Human Thioredoxin を用いた Biotin / Streptoavidin ポリユビキチン化測定法（原理　図１参照）を構築した。

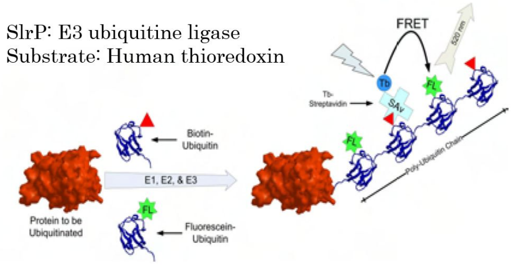

図１　Biotin / Streptoavidin Assay of Polyubiquitination

(2) SlrP 活性阻害化合物の探索：千葉大学キラリティネットワーク研究会より提供された「千葉大学キラリティライブラリー」を用いた。

(3)マクロファージ：RAW264.7 マクロファージ様細胞を用いた。

４．研究成果

(1)エフェクター機能阻害アッセイシステムの構築：研究計画の実施にあたって選んだ標的エフェクター SlrP は、*Salmonella* Pathogenicity Island 1-T3SS により輸送されるサルモネラ病原性に必須な因子であり宿主細胞質内 Thioredoxin（TRX）を標的分子として，E3 ユビキチンリガーゼとして働くことがすでに明らかにされている。そこでエフェクター機能阻害アッセイシステムとして、SlrP による TRX のユビキチン（Ub）化活性測定を用いることが可能と考え、測定法を構築した（図２）。

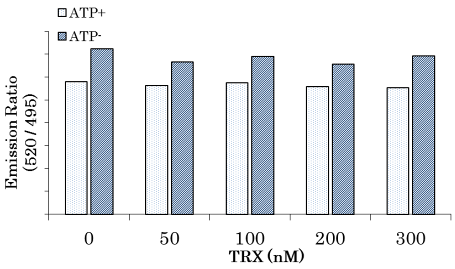

図２　精製 SlrP による TRX の Ub 化活性

(2)　SlrP 活性阻害化合物の探索：本研究で構築したシステムを用いて、千葉大学キラリティライブラリーの中から 57 種類の化合物について最終濃度 10nM を添加して阻害活性を検討した（図３）。現在のところヒット化合物は得られていない。今後もスクリーニングを実施していく。

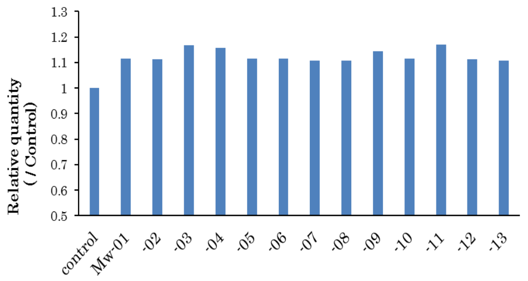

図３ キラリティライブラリーを用いた SlrP 阻害剤探索例

(3)エフェクターSspH2 の宿主内標的分子：SlrP と同じサルモネラ E3 リガーゼである SspH1、SspH2 についても同様のアッセイ系を構築した。SspH2 についてはこれまで基質が報告されていないことから、RAW264.7 細胞の細胞質を使ってアッセイを行ったところ、TR-FRET 値の上昇が見られた（図４）。更に、ビオチン化ユビキチンと SspH2 により RAW264.7 細胞質のユビキチン化を行い、ストレプトアビジンビーズを用いて濃縮したところ、150kDa 付近にユビキチン化タンパク質が検出された。この結果は SspH2 の標的分子がマクロファージ細胞質に存在することを強く示唆している（図５）。

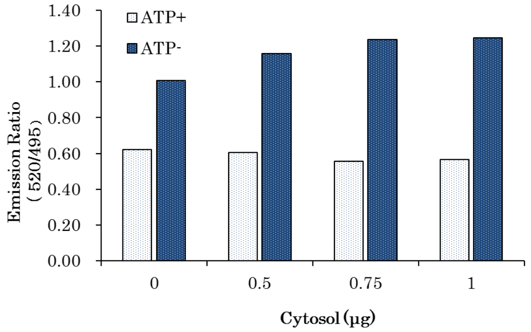

図４　精製 SspH2 による活性測定

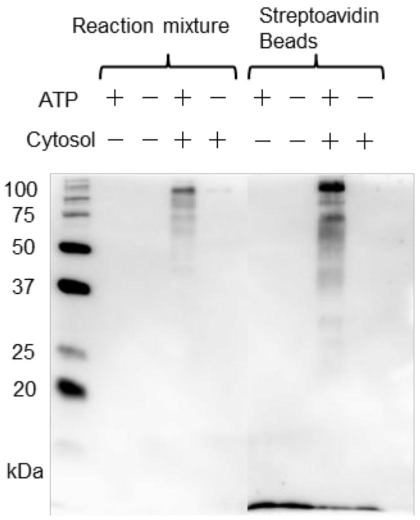

図５　SspH2 によりユビキチン化されたタンパク質の検出

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 15 件）

(1) Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Molecular characterization of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates in Japan. J. Atimicrob. Chemother.70(3):658-63 (2015) doi: 10.1093/jac/dku443. （査読有）

(2) Matsui H, Fukiya S, Kodama-Akaboshi C, Eguchi M, Yamamoto T. Mouse models for assessing the cross-protective efficacy of oral non-typhoidal *Salmonella* vaccine candidates harbouring in-frame deletions of the ATP-dependent protease lon and other genes. J Med Microbiol. 64:295-302 (2015) doi: 10.1099/jmm.0.000014. （査読有）

(3) Sato Y, Takaya A, Mouslim C, Hughes K.T., Yamamoto T. FliT selectively enhances proteolysis of FlhC subunit in $FlhD_4C_2$ complex by an ATP-dependent protease ClpXP. J. Biol. Chem. 289(47):33001-11 (2014) doi: 10.1074/jbc.M114.593749. （査読有）

(4) Takeuchi M, Niimi T, Matsumoto M, Orita M, Yokota H, Yamamoto T. Discovery of a novel nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) inhibitor via in silico screening. Biol. Pharm. 37:31-36 (2014) （査読有）

(5) Etoh Y, Hirai S, Ichihara S, Maeda E, Yokoyama E, Sera N, Horikawa K, Yamamoto T. Evolutionary model of the divergence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 lineage I/II

clades reconstructed from high resolution melting and Shiga-like toxin 2 analyses. Infect Genet Evol. 24:140-145(2014) doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.013.（査読有）

(6) Hirai S, Yokoyama E, Etoh Y, Seto J, Ichihara S, Suzuki Y, Maeda E, Sera N, Horikawa K, Yamamoto T. Analysis of the population genetics of clades of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7/H- isolated in three areas in Japan. J Appl Microbiol. 17:1191-1197 (2014) doi: 10.1111/jam.12604.（査読有）

(7) **山本友子．サルモネラの病原性．臨床と微生物**41:84-89（2014）（査読無）

(8) **山本友子．特集・細菌の進化から考える抗菌薬耐性－マクロライド耐性．化学療法の領域**30： 44－54（2014）（査読無）

(9) **高屋明子、山本友子．サルモネラ感染症のメカニズム．感染症内科**2(4):395-403（2014）（査読無）

(10) **高屋明子、山本友子**.（2014）**サルモネラマクロファージ感染におけるカスパーゼ-8活性制御．感染・炎症・免疫** 44(3):53-64.（査読無）

(11) Takaya A, Sato Y, Shoji T, Yamamoto T. Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by RlmA^{II} methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin susceptible. Antimicoriol agents Chemother. 57:3789-3796 (2013) doi: 10.1128/ AAC. 00164-13. （査読有）

(12) Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, Yamamoto T, Kamiya S.　Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. Microbiology. 159:1379-89(2013) doi: 10.1099/mic.0.066597-0.（査読有）

(13) Hirai S, Yokoyama E, Yamamoto T. Linkage disequilibrium of the IS629 insertion among different clades of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7/H-strains. Infection, Genetics and Evolution. 18:94-9(2013) doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.006.（査読有）

(14) Yamamoto T. Studies on the molecular mechanism of *Salmonella* infection. Antibiotics and Chemotherapy 29: 473-483 (2013) （査読無）

(15) Takaya A. Regulation of *Salmonella* pathogenesis by effectors of *Salmonella* pathogenicity island 1 and 2. Antibiotics and Chemotherapy 29: 62-71(2013) （査読無）

〔学会発表〕（計 13 件）

(1) **高屋 明子．サルモネラ** RNA **シャペロンによるマクロファージ応答遺伝子発現制御．第** 88 **回日本細菌学会総会** 2015 **年** 3 **月** 26 **日～**28 **日、岐阜**

(2) **高屋 明子．グラム陽性菌の内因性ｒＲＮＡ修飾と薬剤耐性．感染症研究グローバルネットワークフォーラム**2014 2014 **年** 11 **月** 15 **日、千葉**

(3) **山本　友子．臨床由来コアグラーゼ陰性ブドウ球菌のリネゾリド耐性機構．第** 43 **回薬剤耐性菌研究会** 2014 **年** 10 **月** 31 **日～**11 **月** 1 **日、石川**

(4) **佐藤 慶治.マルチオミクス解析によるサルモネラエフェクター予測と分泌制御様式の理解．第** 96 **回日本細菌学会関東支部総会**　2014 **年** 10 **月** 30 **日～**31 **日、東京**

(5) Takaya A．Genetical Assessment of Linezolid Resistance Mechanisms in *Staphylococcus capitis* Isolated Clinically. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014 **年** 9 **月** 5 **日～**9 **日** Washington DC, USA

(6) **日野浩介．サルモネラ感染による骨髄免疫細胞の傷害．第８回細菌学若手コロッセウム** 2014 **年** 8 **月** 6 **日～**8 **月** 8 **日、ニセコ**

(7) **高屋 明子**.The function and regulation of *Salmonella* pathogenicity islands 1and 2 in host cells. **第** 87 **回日本細菌学会総会(招待講演)** 2014 **年** 3 **月** 26 **日～**28 **日、東京**

(8) **佐藤 慶治**. FliT enhances the ClpXP -catalyzed degradation of master regulator $FlhD_4C_2$ in *Salmonella*．**第** 87 **回日本細菌学会総会**　2014 **年** 3 **月** 26 **日～**28 **日、東京**

(9) **庄司竜麻．肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する** rRNA **段階的修飾．第** 87 **回日本細菌学会総会**　2014 **年** 3 **月** 26 **日～**28 **日、東京**

(10) **木村旭．リネゾリド長期投与におけるリネゾリド耐性** Coagulase-negative *Staphylococccus* **の出現と耐性化機構．第** 96 **回日本細菌学会関東支部総会** 2013 **年** 10 **月** 31-11 **月** 1 **日、東京**

(11) **小田倉香織．サルモネラ** FliT **による** ClpXP **プロテアーゼ依存的** FlhC **分解促進機構．第** 96 **回日本細菌学会関東支部総会**　2013 **年** 10 **月** 31-11 **月** 1 **日、東京**

(12) 松井 優里．サルモネラ新規エフェクター STM1239 の同定. 第 96 回日本細菌学会関東支部総会　2013 年 10 月 31-11 月 1 日、東京

(13) Takaya A. FliT fine-tunes the flagellar biogenesis by enhancing the ClpXP -catalyzed degradation of master regulator $FlhD_4C_2$. EMBO workshop on AAA+ proteins: from mechanism and disease to targets. 15-19 September, 2013, Neuss, Germany

〔図書〕（計 2 件）

(1) 藤井暢弘, 山本友子 他 みてわかる薬学 図解 微生物学・感染症・化学療法　南山堂（2014）494（121-167）

(2) 荒川宜親, 神谷茂, 柳雄介, 山本友子他 病原微生物学　基礎と臨床　東京化学同人（2014）294（38-59）

〔その他〕

千葉大学大学院薬学研究院微生物薬品化学研究室ホームページ
http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/

６．研究組織

(1)研究代表者
山本　友子（YAMAMOTO, Tomoko）
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：６０１１０３４２

(2)研究分担者
高屋　明子（TAKAYA, Akiko）
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：８０３３４２１７

(3)研究分担者
佐藤　慶治（SATO, Yoshiharu）
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：００５５４５８６