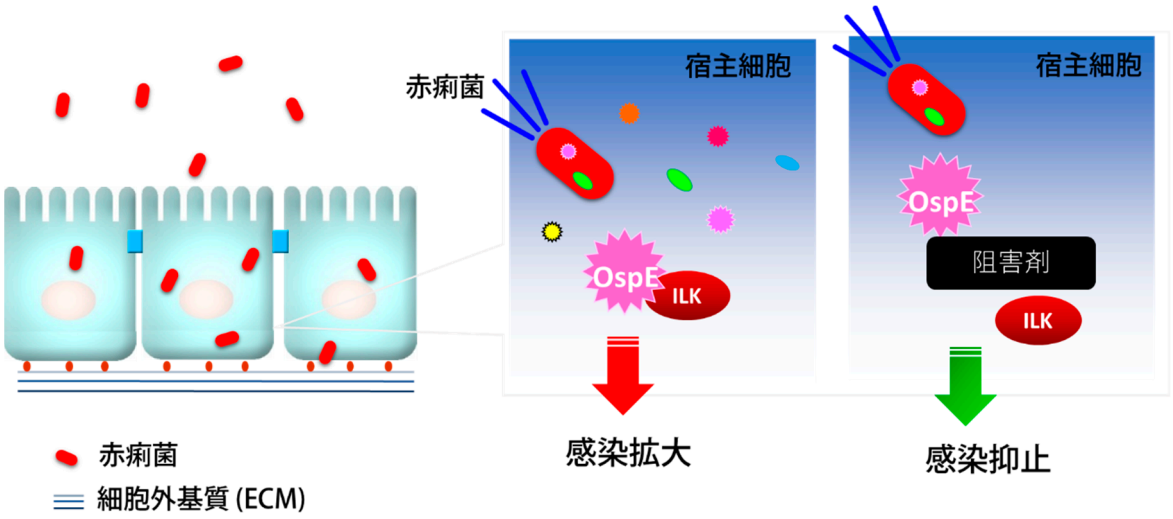
222　新奇抗菌薬を開発するモダリティの創出	金　玟秀

【目的】サルモネラ菌や赤痢菌に代表される腸管病原細菌は、飲食物により宿主の体内に侵入し、腸管の粘膜上皮細胞を足場に感染を拡大する。これら病原細菌による腸管感染症の治療は抗生剤に依存しているが、近年、既存の抗生剤に対する多剤耐性菌の増加、ワクチンの不在に加え、抗生剤による副作用が重大な問題になっている。既存の抗生剤は、細菌細胞壁の合成、転写反応に対する阻害剤など、病原細菌にも常在菌にも効き、細菌全般を殺傷する結果、腸内細菌叢を破壊する薬剤が多い。また、破壊された細菌から出てくる内・外毒素は溶血性尿毒症などを引き起こして、病態を悪化させ、死亡に至る場合も多い。そのため、1. 既存抗生剤とは作用機序が違い、多剤耐性菌にも効く、2. 病原細菌のみに効き、常在菌や宿主（ヒト）には作用しない、全く新奇の細菌感染治療薬が世界的に求められている。そこで、本研究では広範な腸管病原細菌に対しての、既存の抗生物質とは異なる新奇抗菌薬の開発を究極の目的として、病原細菌の病原因子の機能阻害剤の開発を進めた。幅広い腸管病原細菌に保存されている病原因子（OspE）とその宿主相互作用分子 Integrin linked kinase（ILK）に注目し、1. OspE による ILK の制御メカニズムを明らかにし、2. OspE と ILK の結合を制御する新しい化合物の創出を目指す。

【方法】均一系時間分解蛍光エネルギー転移測定法を用いて、OspE と ILK の相互作用を定量的に検出できるアッセイ系を確立した。さらに、OspE と ILK の構造解析のために大腸菌や細胞から蛋白質を精製し、結晶化を行った。

【結果】OspE による ILK の制御メカニズムを解明するために、OspE と ILK の立体構造解析を行った。さらに、均一系時間分解蛍光エネルギー転移測定法を用いて、OspE と ILK の結合を定量的に解析した。

抗生物質に代替となる新しい治療薬の開発へ概略図



222. 新奇抗菌薬を開発するモダリティの創出

金　玟秀

*京都大学 大学院医学研究科 細胞機能制御学

Key words：病原細菌，抗菌薬，分解

緒　言

腸管病原細菌による腸管感染疾患は、開発途上国を中心に毎年 200 万の人命を奪い、依然として大きな脅威となっている［1］。赤痢菌をはじめとする腸管病原細菌の多くは、飲料水や食物により口から我々の体内に侵入し、腸管の粘膜を構成する上皮細胞を足場として感染する。上皮細胞内に侵入した赤痢菌は増殖しながら隣接細胞へ次々に移動することにより感染を拡大し、その結果、激しい炎症性の血性下痢が発症する。病原細菌の感染に対して、宿主側は感染を受けた上皮細胞の除去、細胞死の誘導、炎症反応などを誘導し、病原細菌が周囲の細胞へ感染を拡大することを防いでいる［2］。即ち、これら宿主細胞の反応は「病原体に対する基本的な生体防御システム」として極めて重要な役割を果たしている。

しかしながら、赤痢菌をはじめとする腸管病原細菌は、Ⅲ型分泌装置と呼ばれる特殊なタンパク質の注入装置により一群の病原因子（エフェクター）を宿主細胞へ分泌する（図 1 左）。これらのエフェクターは宿主細胞のアクチン細胞骨格の制御、シグナル伝達のハイジャック、宿主免疫応答の抑制などの機能を持つ。つまり、エフェクターは宿主細胞因子を巧みに利用する菌の戦略の一つとして感染成立に重要な役割を担っている［3］。これら病原細菌は近年、多剤耐性菌による感染症例が増加し、有効なワクチンもいまだ開発されていないため、新たな治療薬の開発が望まれている［4］。我々は、病原細菌のエフェクター分子の感染に果たす役割を明らかにすることは、感染成立メカニズムの解明、さらには、感染を抑制する手法の開発につながると期待している。

我々は、赤痢菌が腸管での感染を拡大するために、そのエフェクターである OspE タンパク質を分泌し、感染した腸管上皮細胞の剥離を阻止するという新たな戦略を用いていることを世界に先がけて発表した［5］。上皮細胞へ侵入した赤痢菌から分泌される OspE は細胞接着を制御している宿主細胞の ILK（Integrin-linked kinase）と特異的に結合することを見出した。ILK は細胞の接着斑に局在し、インテグリンなどさまざまな蛋白質と結合することにより、細胞接着を制御する足場蛋白質として重要な役割をしている。OspE は ILK と細胞接着斑に共局在し、ILK 依存的に接着斑の数を増加させ、細胞接着を強化した。さらに、モルモットを用いた赤痢菌感染実験においては、野生型株比べ、*OspE* 欠損株では、腸管への定着菌数が低下し、上皮細胞の剥離が進んでいた。これらの結果から、OspE は ILK と結合して、細胞の接着を増強することにより、感染した細胞が腸管壁から除去されにくくし、赤痢菌の感染の足場を維持していると考えられた（図 1 右）。さらに OspE は腸管病原性大腸菌、O157 やサルモネラ属菌などの腸管病原細菌にも保存されている。我々は、これらの OspE ホモログはすべて ILK と結合し、接着斑に共局在することを見出した。従って、OspE が ILK 依存的に感染を抑制するメカニズムを解明すると赤痢菌のみならず、OspE ホモログを持つ非常に多くの病原細菌感染に対する治療法の開発にも貢献できると考えられた。しかし、OspE により ILK の機能がどのように制御されているかについて、詳しいメカニズムはわかってない。

そこで本研究では、広範な腸管病原細菌に対しての、既存の抗生物質とは異なる新奇抗菌薬の開発を究極の目的として、1. OspE による ILK の制御メカニズムを明らかにし、2. OspE と ILK の結合を制御する新しい化合物の創出を目指す。

*現在の所属：京都大学 大学院医学研究科 医学教育・国際化推進センター

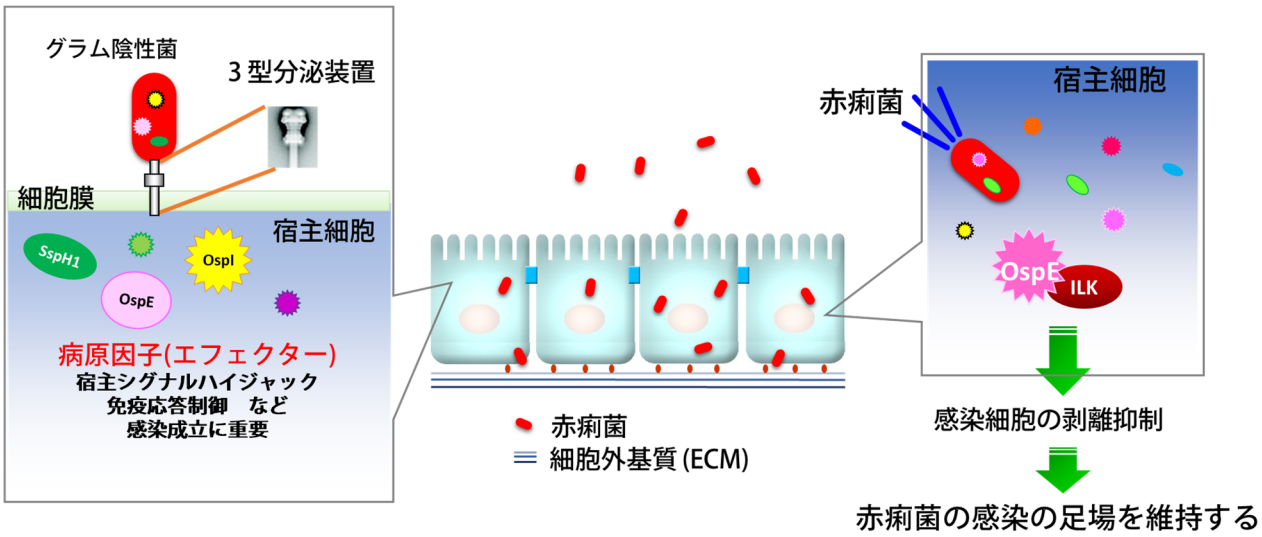


図 1. 病原細菌の感染メカニズム（左）と赤痢菌のエフェクターOspE による感染抑制メカニズム（右）

方　法

1. 構造解析

構造解析に用いる OspE 蛋白質はマルトース結合蛋白質（Maltose Bing Protein：MBP）融合蛋白質として BL21 大腸菌に発現させ、Amylose Resin ビーズを用いて New England Bio Labs 社の取り扱い説明書に従い精製した。簡単に、25 mM Tris-Hcl pH7.5、150 mM NaCl バッファーにより可溶化し、溶出は 25 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、10 mM Maltose バッファーを用いて溶出した。さらに純度の高い蛋白質を得るためにゲル濾過クロマトグラフィー（Superdex75、Cytiva 社）を用いて精製を行った。結晶化スクリーニングは Wizard classic 結晶化解析スクリーニングキット（Rigaku 社）を用いて行った。複数の条件で結晶が得られ、Spring-8 で X－線構造解析を実施した。さらに ILK と OspE の複合体の構造解析のために、バキュロウイルス発現システムを用いて ILK の発現系を構築した。SF9 細胞に ILK、Pinch および HIS-Parvin（IPP complex）の三つの蛋白質を共発現させ、IPP 複合体蛋白質を安定的に発現する系を構築した。複合体の精製は、cOmplete HIS-Tag Purification Resin ビーズを用いて Roche 社の取り扱い説明書に従い精製した。

2. ハイスループットスクリーニング法の確立

均一系時間分解蛍光エネルギー転移測定法（Homogeneous Time Resolved Fluorescence：HTRF）はハイスループットスクリーニング（High throughput screening：HTS）において、生体分子の相互作用や活性の評価に広く応用されている［6］。OspE と ILK の相互作用を調べる HTRF 方法の確立のために、両者の蛋白質の精製を行った。MBP-OspE は上記の構造解析と同様な方法で精製を行い、高純度の蛋白質を得た。ILK 蛋白質は HIS タグ融合蛋白質として BL21 大腸菌に発現させ、cOmplete HIS-Tag Purification Resin ビーズを用いて Roche 社の取り扱い説明書に従い精製した。さらに純度の高い ILK 蛋白質を得るために、イオン交換クロマトグラフィー（HiTRAP、Cytiva 社）を用いて精製を行った。このように精製した蛋白質を用いて、HTRF 測定を行った。反応バッファー（100 mM NaCl、25 mM PO4 buffer、0.1% Tween、0.1% BSA）中に MBP-OspE、HIS-ILK、anti-HIS-Tb 抗体（Cis-bio 社）及び anti-MBP-d2 抗体（Cis-bio 社）を加え、室温で 12 時間反応を行い、エネルギー転移を測定した（ARVO X-5、PerkinElmer 社）。励起光は 340 nm を使用し、試料からの 665 nm および 615 nm の時間分解蛍光を同時に測定した。HTRF アッセイでは、バックグラウンド蛍光の他に、励起光の散乱、カラークエンチングの影響を除去することが問題となっている。これを解決するため、ドナー・アクセプターのペアから生じる 665 nm の長寿命蛍光だけでなく、615 nm の長寿命蛍光を測定し、これを内部リファレンスとして用いて、それらの蛍光強度比を測定値（比率＝1,000×665 nm／620 nm）として使用した。KD は PRISM ソフトを用いて算出した。

結　果

1. OspE による ILK の制御メカニズム解明

OspE による ILK の制御メカニズムを解明するために、OspE と ILK の立体構造解析を行った。まず、OspE と ILK との複合体が取る立体構造の決定するための両者の蛋白質の発現および精製系の構築を行った。OspE と ILK は極めて難溶性のため、蛋白精製が容易ではなかった。そのため、MBP を OspE 蛋白質に融合させ、さまざまな *OspE* の欠損変異体を発現する蛋白質を作製した。その結果、試した変異体の中に、融合蛋白質全体として可溶性になることを見出した（図 2a）。この発現系を用いて、結晶化スクリーニングを行い、結晶を得ることができた（図 2b）。現在、構造解析を行っている。一方、ILK は Pinch および Parvin と複合体（IPP complex）を形成することが知られていたが、近年、ILK は Parvin などの結合分子と共発現させることで安定に発現させられることが報告された［7］。そこで、IPP complex を SF9 細胞に発現させる系を確立し、精製に成功した。OspE は IPP complex の形成を阻害しないことから、ILK は IPP complex として精製し、MBP-OspE を加え、4 者の構造解析を進めている。MBP-OspE の単独の構造が明らかになると、すでに報告されている ILK の部分構造を用いて［7］、構造シミュレーションを行い、OspE と ILK の相互作用を予測することが可能になり、OspE による ILK の制御メカニズムが解明されると考えられる。

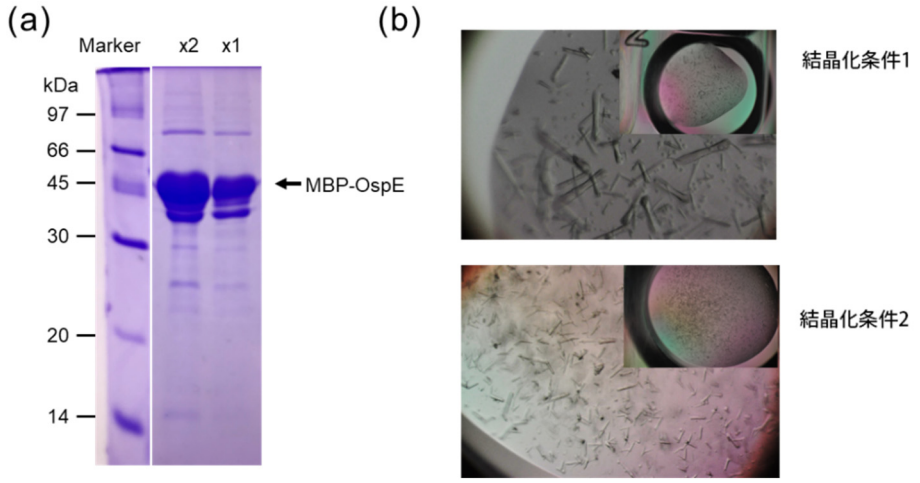


図 2. OspE 蛋白質の構造解析のための条件検討

a）MBP-OspE の発現系の確立。

b）MBP-OspE の結晶化スクリーニング結果。

2. OspE と ILK の結合を制御する新しい化合物の創出

OspE と ILK の結合を阻害する化合物を探索するために、OspE と ILK の結合を定量的に検出できる HTS 法の確立を行った。HTS 法として、OspE と ILK の分子間の相互作用の測定には、均一系時間分解蛍光ネルギー転移測定法（HTRF）を用いた。HTRF 法は、蛍光共鳴エネルギー転移法（FRET）をベースにしている技術で、二つの分子がお互い接近して存在したときに、エネルギードナー（ユロピウムクリプテート）からアクセプターにエネルギーが転移される現象を原理としている（図 3a）［6］。このアッセイは高感度、簡単で制度が高く、迅速で、さらにユーロピウムは蛍光寿命が非常に長い蛍光物質で、通常の蛍光が消失した後でも蛍光強度を測定することができるという利点から HTS にはよく使われている［6］。OspE と ILK の結合を測定する HTRF 方法の開発の概要を図 3b に、図 3c、d に結果の一例を示した。開発した HTRF 法を用いて、MBP-OspE と HIS-ILK との結合を定量的に測定することに成功した（K_D＝0.021～0.029 μM）。さらに OspE による細胞の運動阻害能を測定するアッセイ法も確立した。今後、確立したスクリーニング系を用いて、両者の結合を阻害する化合物ライブラリースクリーニングを進め、得られたヒット化合物と上記の構造情報を基に OspE-ILK 複合体を標的とするより優れたリード化合物の設計を目指す。

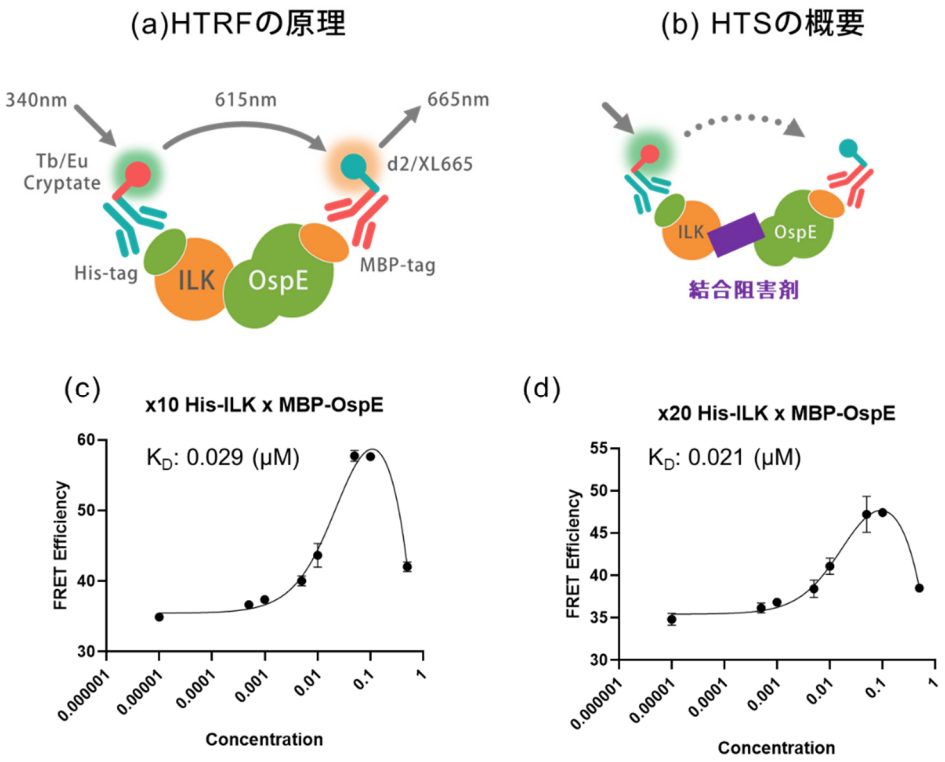


図 3. 化合物ライブラリースクリーニングのための、高効率アッセイ検出法の確立

a）HTFR の原理。

b）OspE と ILK の結合を定量的に測定する HTRF をベースとした HTS 法の概要。

c、d）HTRF 法を用いて測定した MBP-OspE と HIS-ILK の結合定数。

考　察

病原細菌による感染症は多剤耐性菌による感染症例が増加し、既存の抗生剤とは作用機序が異なる新しいコンセプトの治療薬の開発が望まれている。近年、病原細菌のⅢ型分泌装置の分泌を阻害する化合物や膜蛋白質をターゲットにした化合物が抗菌剤として開発されている［8，9］。我々は、抗生物質に代替となる新しい治療薬の構想として、エフェクター分子の機能阻害剤に注目し、エフェクター分子の機能解析および機能阻害剤開発を行った。病原細菌のエフェクターは、常在菌や宿主の蛋白質との相同性が低い。それ故に、エフェクターに対する分子標的型治療薬が得られれば、常在菌や宿主に作用せず、副作用が低い極めて有効な治療薬になると期待される。本研究により、得られる OspE と ILK 複合体の結合阻害剤は、エフェクターの機能阻害剤として OspE を持つ幅広い病原細菌に効く抗菌剤として提案できると期待している。

ILK は細胞接着斑に局在し、多くの接着斑の分子群と結合して、細胞骨格や運動などを制御する。ILK による細胞運動や細胞増殖の制御は発生・分化や癌などの生命現象に関わっていることが知られている［10］。我々の研究結果から OspE は ILK の機能を阻害すると考えられるため、得られた複合体の構造から ILK の機能を制御する薬剤の開発につながると期待される。

共同研究者

本研究は、兵庫県立大学理学研究科生体分子生合成講座の水島恒弘先生との共同研究である。

文 献

1) Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature. 2004 Jul 8;430(6996):242-9. PMID: 15241422 DOI:10.1038/nature02759.

2) Popa CM, Tabuchi M, Valls M. Modification of Bacterial Effector Proteins Inside Eukaryotic Host Cells. Front Cell Infect Microbiol. 2016 Jul 20;6:73. PMID: 27489796 DOI:10.3389/fcimb.2016.00073.

3) Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C. Bacterial interactions with the host epithelium. Cell Host Microbe. 2010 Jul 22;8(1):20-35. PMID: 20638639 DOI:10.1016/j.chom.2010.06.006.

4) Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013 Dec;13(12):1057-98. PMID: 24252483 DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

5) Kim M, Ogawa M, Fujita Y, Yoshikawa Y, Nagai T, Koyama T, Nagai S, Lange A, Fässler R, Sasakawa C. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. Nature. 2009 May 28;459(7246):578-82. PMID: 19489119 DOI: 10.1038/nature07952.

6) Degorce F, Card A, Soh S, Trinquet E, Knapik GP, Xie B. HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. Curr Chem Genomics. 2009 May 28;3:22-32. PMID: 20161833 DOI: 10.2174/1875397300903010022.

7) Fukuda K, Gupta S, Chen K, Wu C, Qin J. The pseudoactive site of ILK is essential for its binding to alpha-Parvin and localization to focal adhesions. Mol Cell. 2009 Dec 11;36(5):819-30. PMID: 20005845 DOI: 10.1016/j.molcel.2009.11.028.

8) Gu L, Zhou S, Zhu L, Liang C, Chen X. Small-Molecule Inhibitors of the Type III Secretion System. Molecules. 2015 Sep 23;20(9):17659-74. PMID: 26404233 DOI: 10.3390/molecules200917659.

9) Luther A, Urfer M, Zahn M, Müller M, Wang SY, Mondal M, Vitale A, Hartmann JB, Sharpe T, Monte FL, Kocherla H, Cline E, Pessi G, Rath P, Modaresi SM, Chiquet P, Stiegeler S, Verbree C, Remus T, Schmitt M, Kolopp C, Westwood MA, Desjonquères N, Brabet E, Hell S, LePoupon K, Vermeulen A, Jaisson R, Rithié V, Upert G, Lederer A, Zbinden P, Wach A, Moehle K, Zerbe K, Locher HH, Bernardini F, Dale GE, Eberl L, Wollscheid B, Hiller S, Robinson JA, Obrecht D. Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. Nature. 2019 Dec;576(7787):452-458. PMID: 31645764 DOI: 10.1038/s41586-019-1665-6.

10) Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jan;7(1):20-31. PMID: 16493410 DOI: 10.1038/nrm1789.