

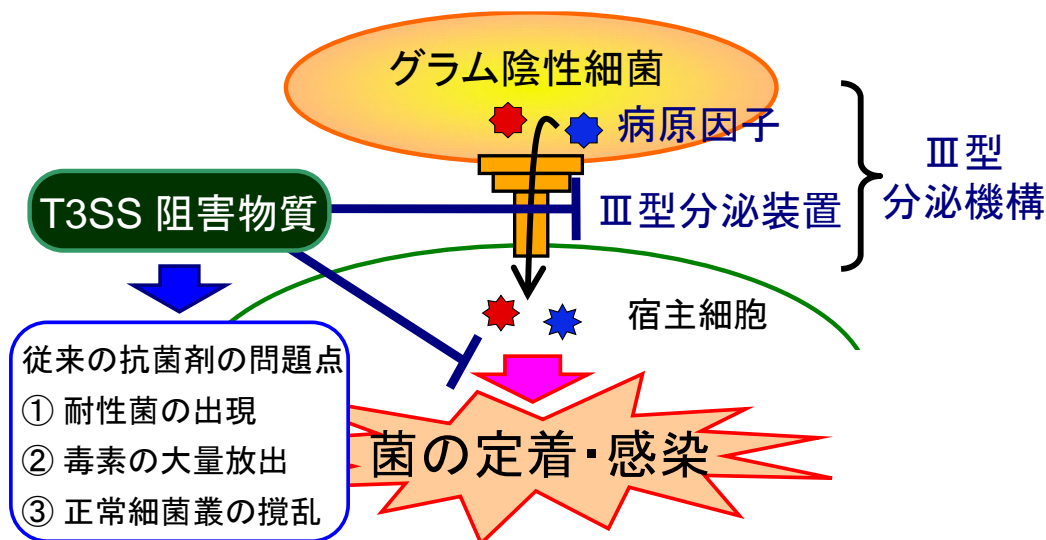
III型分泌装置阻害剤 aurodox の作用標的を PurA と同定

北里大学大村智記念研究所の大村智特別荣誉教授、浅見行弘教授、阿部章夫教授、渡邊善洋特任助教、君嶋葵講師、薬学部の羽田健講師らと、東北大学大学院薬学研究科の岩濑好治教授、星薬科大学薬学部・医薬品化学研究所の叶直樹教授らの研究チームは、グラム陰性病原性細菌に高度に保存されている III 型分泌装置 (T3SS) ^{※1} の阻害剤である aurodox ^{※2} の作用標的の同定に関する研究を行った。この研究では、aurodox がアデニロコハク酸合成酵素 (PurA) ^{※3} に結合し、T3SS からの分泌タンパク質の産生を抑制することを明らかにした。また、*in vitro* および *in vivo* 実験の両方で、*purA* を破壊した細菌の病原性が著しく低下したことなどから、aurodox の作用標的を PurA と同定した。今回の発見は、T3SS の機能における PurA の重要性を示唆するとともに、aurodox の創薬シードとしての可能性と、抗感染症薬やワクチン開発の標的としての PurA の新たな道を開くものである。

本研究成果は 2024 年 4 月 19 日に学術誌 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* に公開された。

研究の背景

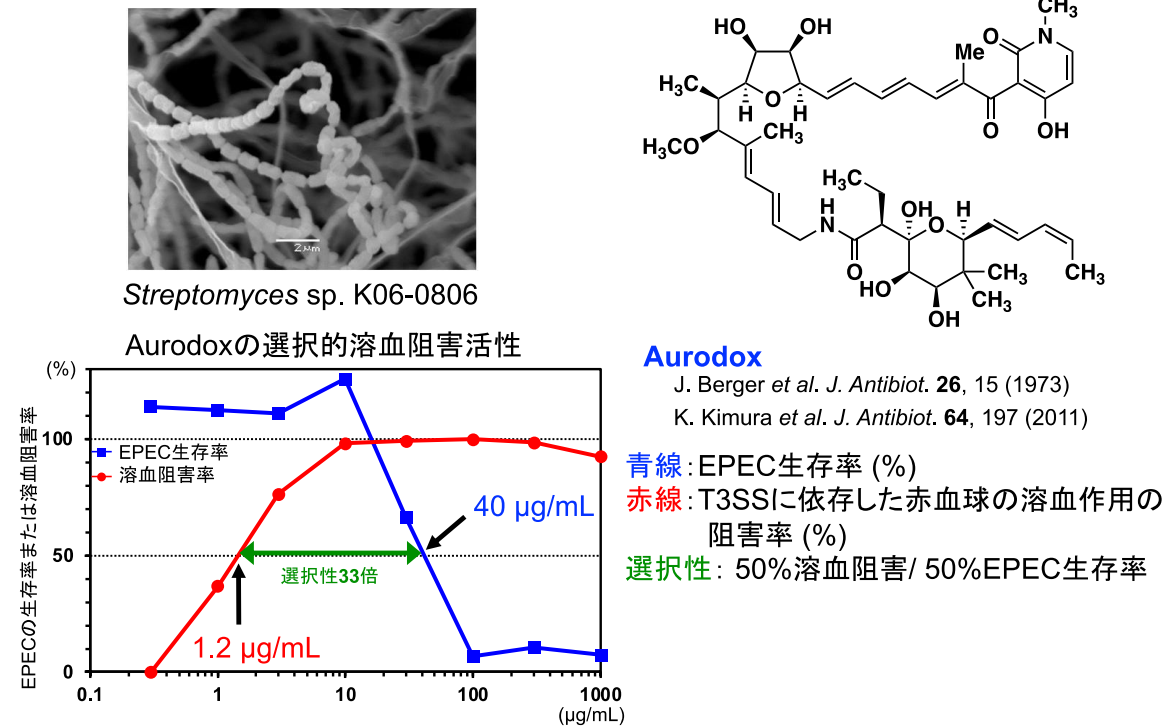
薬剤耐性 (Antimicrobial resistance: AMR) は、人類の健康にとって最大の脅威のひとつである。AMR の出現と新薬開発の間の絶えることのない戦いは、従来の抗菌薬によるアプローチが続く限り、止めることは極めて困難である。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌などの多剤耐性グラム陰性菌は、ほとんどのメロペネムやカルバペネム系抗菌薬および広域スペクトルを有する β-ラクタム薬に対しても耐性を持つことが知られており、その感染症の治療は困難である。この問題を克服するために、本研究チームは、多くのグラム陰性病原性細菌に高度に保存されている III 型分泌装置 (Type III secretion system: T3SS) に着目した。T3SS は、病原因子を宿主細胞への注入を担っている病原細菌の装置 (仕組み) であり、細菌の病原性発揮には必要不可欠であるが、生存には必須ではないことが知られている。したがって、T3SS 阻害剤は、治療抵抗性株に対する進化的選択圧を劇的に減少させる革新的な抗感染症薬となりうる。(図 1)



【図 1】 T3SS とその阻害剤の概略

このコンセプトに基づき、本研究グループは独自のスクリーニング系を用いて、ポリケチド系天然化合物である aurodox を T3SS 阻害剤として同定した。Aurodox は、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*: EPEC) の生育を阻害する濃度よりも 33 倍低い濃度で T3SS に依存した赤血球の溶血作用を阻害した (図 2)。

放線菌 *Streptomyces* sp. K06-0806 の生産する aurodox は T3SS 選択的阻害剤



【図 2】 T3SS 選択的阻害剤 aurodox

また、T3SS を保有する *Citrobacter rodentium* (CR) ^{※4} 感染マウスモデルを用いた *in vivo* 感染実験において、aurodox を経口投与したマウスは致死的な感染症に罹患しても生存することを明らかにし、微生物由来の aurodox が T3SS 阻害を介して治療効果を発揮することを世界で初めて *in vivo* で実証した。

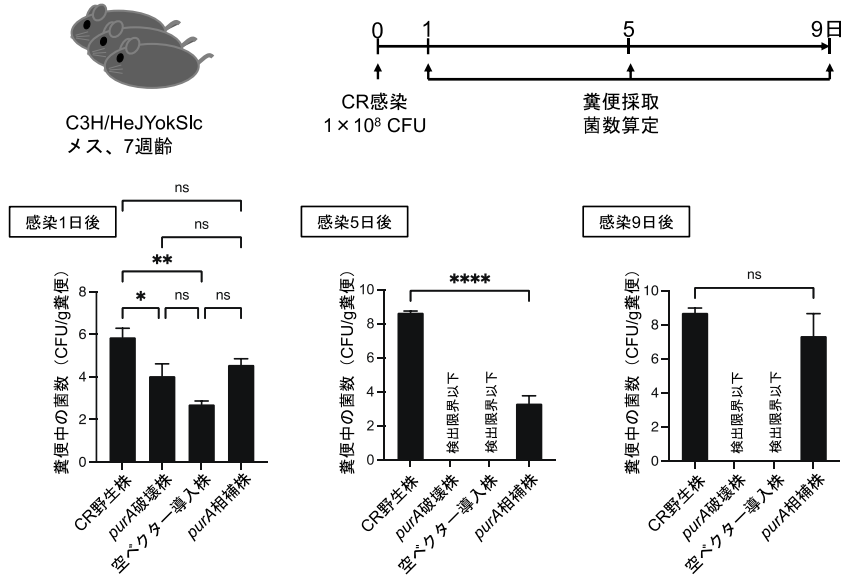
このように、aurodox は新しい抗感染症薬として期待されていたが、aurodox の作用標的は不明なままであった。

研究の成果

本研究チームはまず、aurodox を固定化した開裂型・光親和型低分子固定化アガロースビーズ (cleavable photoactivatable linker-coated agarose beads) ^{※5} を用いて aurodox 結合タンパク質を探索した。その結果、既知の因子に加えて、新たにアデニロコハク酸合成酵素 (PurA) を同定した。また、ビオチン化 aurodox プローブを設計・合成し、PurA と aurodox の直接的結合を検証した結果、aurodox が PurA に対して強く結合すること ($K_D = 6.5 \times 10^{-7}$ M) を見出した。

次に、CR マウス感染モデルを用いた *in vivo* 試験を行った。purA を破壊した CR 株を感染させたマウスでは、感染 5 日目および 9 日目に糞便より CR は検出されず、マウス腸内への菌の定着が CR 野生株と比較して著しく低減された一方、purA 相補株においては菌の定着が部分的に回復することを示した (図 3)。

Citrobacter rodentium (CR) のマウス感染実験の結果1



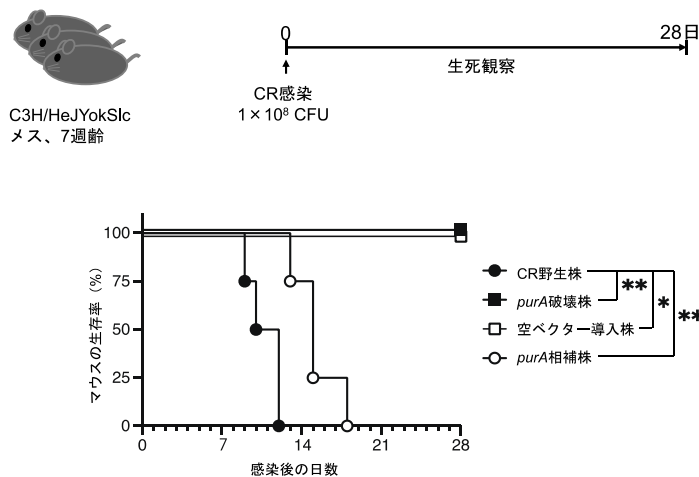
*purA*破壊株はマウスに対する菌の定着が親株よりも有意に低下

【図3】 CR マウス感染モデルを用いた *purA* 破壊株、相補株の CR 糞便検出評価

CR 野生株、*purA* 破壊株、空ベクター導入株、*purA* 相補株を感染させたマウスにおいて感染 1 日後、5 日後、9 日後に糞便中の CR の菌数を評価した。

また *purA* 破壊株を感染させたマウスは、観察期間である感染後 28 日まで全て生存したのに対し、野生株、*purA* 相補株を感染させたマウスは、それぞれ 12 日目、18 日目までに全て死亡した (図 4)。以上の結果より、PurA は T3SS を制御することで細菌の病原性に関与することが示された。さらにサルモネラにおいても *purA* 破壊株で病原性が著しく低下したことから、PurA が T3SS を有する細菌の病原性発現に普遍的に関わっている可能性、および aurodox が T3SS を有する病原細菌に対する新たな抗感染症薬となる可能性を示した。

Citrobacter rodentium のマウス感染実験の結果2



*purA*破壊株はマウスに対する病原性が親株よりも有意に低下

【図4】 CR マウス感染モデルを用いた *purA* 破壊株、相補株のマウス生存への影響

CR 野生株、*purA* 破壊株、空ベクター導入株、*purA* 相補株を感染させたマウスにおいて生死観察を 28 日間行った。

今後の展望

今回の発見は、T3SS の機能における PurA の重要性を示唆するとともに、aurodox の創薬シードとしての可能性と、抗感染症薬やワクチン開発の標的としての PurA の新たな道を開くものである。

用語解説

- ※1) **III型分泌装置 (T3SS)** : 腸内細菌科細菌 (腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌、サルモネラ属細菌、赤痢菌など)、ボルデテラ属細菌、植物病原菌などに高度に保存されており、病原菌の宿主への感染過程においてエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主に移行させるタンパク質複合体。T3SS は菌の生存に必須ではないことが知られている。
- ※2) **Aurodox** : 放線菌 *streptomyces sp.* が生産するポリケチド系抗生物質。細菌の翻訳伸長因子 EF-Tu に結合し作用することが知られていた。今回、我々は、aurodox が PurA にも結合し、細菌の T3SS を阻害することを新たに見出した。
- ※3) **アデニロコハク酸合成酵素 (PurA)** : イノシン酸 (IMP) からアデノシンモノリン酸 (AMP) の合成を行う際の間体であるアデニロコハク酸を合成する 1 次代謝酵素。プリンヌクレオチドの生産に参与している。様々な生物に保存されている。
- ※4) ***Citrobacter rodentium* (CR)** : T3SS を有するグラム陰性細菌。齧歯類に感染する。
- ※5) **開裂型・光親和型低分子固定化アガロースビーズ** : 365 nm の光照射で発生する高反応性中間体を利用して、低分子化合物を固定化できるアフィニティー樹脂担体。リンカー分子中にジスルフィド結合を有しており、標的タンパク質と共有結合を形成する化合物の標的同一性に特に有効である。

論文情報

掲載誌 : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*

論文名 : PurA is the main target of aurodox, a type III secretion system inhibitor

著者 : 渡邊善洋、羽田健、君嶋葵、桑江朝臣、須賀拓弥、鈴木貴大、岩渕好治、本庄雅子、本間颯太、岩月正人、松井秀仁、花木秀明、叶直樹、阿部章夫、浅見行弘、大村智

DOI : 10.1073/pnas.2322363121

問い合わせ先

《研究に関すること》

- ・北里大学大村智記念研究所
教授 浅見行弘
e-mail : yasami@lisci.kitasato-u.ac.jp
- ・北里大学大村智記念研究所
特任助教 渡邊善洋
e-mail : yosiwata@lisci.kitasato-u.ac.jp

《取材に関すること》

学校法人北里研究所 総務部広報課
〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1
TEL : 03-5791-6422
e-mail : kohoh@kitasato-u.ac.jp

