

## 研究成果概要

## 1. 研究課題

和文
細菌の自死機構を標的とした次世代型抗菌薬の開発
英文
Development of New Antimicrobial Agents Targeting Bacterial Suicide Mechanism

## 2. 申請者名(代表研究者)

氏名 常田 聡	ローマ字表記 Satoshi Tsuneda
所属大学・機関名 早稲田大学	英訳表記 Waseda University
研究科専攻名・部課名等 先進理工学部 生命医科学科	英訳表記 Department of Life Science and Medical Bioscience
役職名 教授	英訳表記 Professor

## 3. 共同研究者 (下段 英訳表記)

氏名	所属機関名・研究科等名・役職
(氏名) 野田 尚宏	産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 バイオアナリティカル研究グループ グループ長
(英訳表記) Naohiro Noda	(英訳表記) Group Leader, Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

## 4.研究目的、成果、今後の見通し

## 【研究目的】

抗菌薬は 20 世紀最大の発明とされている。目に見えない細菌による感染症はかつて死に直結する最も恐ろしい病気であったが、ペニシリンの発見以降、人類は次々と新しい抗菌薬を開発することで様々な細菌感染症を克服してきた。しかしながら、皮肉なことに抗菌薬の多用は耐性菌を生むことに繋がり、感染症治療の切り札となる抗菌薬は徐々に減少している。人類が再度感染症の脅威に曝される今、耐性化が起こりにくい新規な抗菌薬の探索が急がれる。従来の抗菌薬は細菌の増殖・生命活動維持に必須とされる生体分子を標的としていた。これに対して申請者は、細菌自身が元々持っている自死機構を利用することで、耐性化が起こりにくい新規な抗菌薬を開発できるのではないかと考えた。細菌に広く保存された MazE/MazF 複合体は、様々の環境ストレスに応答して毒性タンパク質である MazF と抗毒性タンパク質である MazE の結合が外れ、遊離した MazF が RNA を配列特異的に切断することで細胞死を誘導する。本研究では、MazF と MazE の結合を攪乱する化合物を次世代型抗菌薬としてスクリーニングし、その性能を検証することを目的とする。

## 【成果】

## 1) MazF タンパク質/MazE タンパク質の取得および機能解析

敗血症や髄膜炎等の原因菌として知られている  $\beta$  溶血レンサ球菌 (*Streptococcus agalactiae*) についてゲノム解析を行い、染色体上に新規の MazE/MazF 複合体、MazE-GBS/MazF-GBS を特定した。両タンパク質を形質転換体より回収してカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。人工的に合成した 1000–2000 nt の RNA を MazF-GBS に切断させ、電気泳動を用いて確認したところ、MazF-GBS の濃度依存的な RNA 切断が見られた。また、MazF-GBS を MazE-GBS と反応させてから同様の切断実験を行うと、MazE-GBS の濃度依存的に RNA の切断が抑制された。これらの結果から、MazE-GBS/MazF-GBS が一對の MazE/MazF 複合体として機能することが明らかとなった。

次に、MazF-GBS が認識する RNA 配列を特定すべく、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。人工的に合成した配列既知の基質 RNA を MazF-GBS に切断させた後、切断箇所である 5' 末端にバーコード配列として短鎖 RNA を付加してシーケンシングを行った。これによりバーコード配列を含むリードのみを元の基質 RNA 配列と照らし合わせた際にカバレッジが最も上昇した塩基を MazF-GBS の切断箇所として特定できる。さらに、その切断箇所の周辺塩基において有意に出現頻度が高い配列を解析することで、MazF-GBS の切断配列候補を選定した。その結果、MazF-GBS が特定の RNA 配列を特異的に認識し、切断することが明らかとなった。

一方、食中毒の原因菌として知られているサルモネラ菌 (*Salmonella enterica*) についてもゲノム解析を行い、染色体上に新規の MazE/MazF 複合体、MazE-SEA/MazF-SEA を特定した。MazF-SEA について形質転換体を作製したが、その生育が困難であったことや、mazF-SEA 遺伝子に変異が入りやすかったことから、タンパク質の取得はできなかった。ただし、MazF-SEA は細菌の生育に非常に深刻なダメージを与える MazF であることが明らかとなり、強い抗菌薬として利用できる可能性が示唆された。

## 2) MazE/MazF 複合体の結合を攪乱する化合物の探索および機能評価

申請者が独自に開発した蛍光核酸プローブを用いた手法により、*S. agalactiae* に由来する MazE-GBS/MazF-GBS 複合体の結合を攪乱する化合物の探索を行った。MazF-GBS の認識配列を含むオリゴヌクレオチドの両末端に 6-carboxyfluorescein、3' 末端に black hole quencher-1 を修飾したプローブを設計した。通常時、プローブは修飾した基質の蛍光共鳴エネルギー移動により蛍光が抑制されているが、プローブが切断されると、2 つの基質の距離が離れることにより蛍光強度が上昇する。実際に、本プローブに MazF-GBS を加えて反応させると経時的な蛍光強度の上昇が確認された。また、MazF-GBS を MazE-GBS と反応させてから同様の実験を行った場合には、それが抑制された。これらの結果より、本実験が MazE-GBS/MazF-GBS の結合の有無を確認するスクリーニング系として機能することが示唆された。

そこで、市販の化合物ライブラリーから 12 種類の化合物を選択してスクリーニングを行った。対象の化合物、MazF-GBS、MazE-GBS を共に反応させ、プローブを加えた時の経時的な蛍光強度の変化を測定した。残念ながら、これらの化合物の中から MazE-GBS/MazF-GBS の結合を有意に阻害するものを特定することはできなかった。しかし、一般的な薬剤スクリーニングでは数万〜数十万種類の化合物の中から有効な化合物を探索するので、本研究も今後大規模なスクリーニングを行うことで新規な抗菌薬候補を見つけることが可能であると期待される。また、より高純度の MazE/MazF タンパク質の取得や、タンパク質と化合物の濃度比の最適化等を通して、さらに効率の良いスクリーニングを目指すことが可能である。

### 【今後の見通し】

本研究の最大の成果は、MazE/MazF 複合体を新規な抗菌薬の標的として提案し、MazE/MazF タンパク質の取得からその機能解析、抗菌薬候補化合物のスクリーニングまで、一連の研究スキームを確立できたことにある。MazE/MazF 複合体は細菌自身が元々持っている自死機構であるため、それを利用した抗菌薬は耐性化が起こりにくいと考えられ、現在の耐性菌問題を打破する可能性を秘めている。本研究はその MazE/MazF 複合体を標的とする抗菌薬開発の第一歩を踏み出したと言える。

本研究では、敗血症や髄膜炎等の原因菌として知られている  $\beta$  溶血レンサ球菌 (*S. agalactiae*) をモデルに、MazE-GBS/MazF-GBS を特定し、タンパク質を取得した。また、MazF-GBS が特異的に切断する RNA 配列を特定し、それをもとに MazE-GBS/MazF-GBS の結合の有無を確認するプローブを設計、MazE-GBS/MazF-GBS の結合を攪乱する化合物の探索を行った。一方、食中毒の原因菌として知られているサルモネラ菌 (*S. enterica*) については、その染色体上に、細胞毒性が非常に高い MazE-SEA/MazF-SEA を特定した。

今後は、*S. agalactiae* に由来する MazE-GBS/MazF-GBS 複合体について、より大規模な化合物ライブラリーからスクリーニングを行うことで、抗菌薬候補となる化合物を特定する。また、スクリーニングによって得られた化合物が実際に *S. agalactiae* の増殖を阻害するかどうかを培養液に化合物を添加した比増殖試験により評価する。同時に、*S. enterica* をはじめとする様々な病原細菌に、本研究のスキームを当てはめ、それらの細菌が引き起こす感染症の治療技術の開発に貢献したい。