

# 論文の内容の要旨

論文題目 鉄獲得機構を標的とした化膿連鎖球菌に対する新規抗菌剤の開発

氏名 星野 将人

化膿レンサ球菌は Group A *Streptococcus*; GAS と呼ばれるグラム陽性菌で、日常遭遇する最も病原性の高い細菌の一種である。咽頭炎などの軽い症状から壊死性筋膜炎などの致死性の症状も呈し、世界中で年間 50 万人以上の死者を出している。近年では、耐性菌の出現も見られ新たな治療薬の開発が望まれている。鉄(イオン)は生物の生存と増殖に不可欠な栄養素であり、 $10^{-18}$  M と極度に遊離鉄濃度が制限された生体内でも増殖し得る病原菌類は、宿主からの巧妙な鉄獲得機構を発達させた。化膿レンサ球菌においては、宿主ヘモグロビンから表面蛋白質 Shr (Streptococcal Hemoprotein Receptor) がヘムを獲得し、同じく表面受容体である Shp から HtsABC トランスポーターへと輸送される取り込み経路が存在する。ゼブラフィッシュ及びマウスでの感染実験において *shr* 欠損株の病原性が減弱する事から、感染プロセスにおける Shr の重要性が提唱されている。従って、これらの経路を阻害するような化合物は、新たな作用機序を有する抗菌剤となり得ると考えた。しかしながら、本輸送機構における最初の受容体である Shr が担う役割は不明な点が多い。本研究では、鉄獲得機構を標的とした化膿レンサ球菌選択的な新規抗菌剤の開発を目的として、Shr/Shp を介するヘモグロビンからの鉄獲得機構の物理化学的な解明、及び Shr とヘモグロビンの結合阻害能を有する低分子化合物の同定を行った。

第二章では、Shr/Shp を介するヘモグロビンからの鉄獲得機構の物理化学的な解析を実施した。Shr の構成単位であるヘム結合性を有する 2 つの NEAT (NEAr-Transporter) ドメイン Shr<sup>N1</sup>, Shr<sup>N2</sup>, 及び下流蛋白質 Shp とヘムとの結合を熱力学的、速度論的に解析したところ、ヘム獲得に必須とされている Shr<sup>N1</sup> の解離定数は Shr<sup>N2</sup> の約 70 倍も低く、Shp は Shr<sup>N2</sup> と同程度であ

った( $\text{Shr}^{\text{N1}} : K_{\text{D}}=22 \mu\text{M}$ ,  $\text{Shr}^{\text{N2}} : K_{\text{D}}=1.6 \text{nM}$ ,  $\text{Shp} : K_{\text{D}}=1.6 \text{nM}$ ). 更に, 結合解離速度定数は  $\text{Shr}^{\text{N2}}$  ( $k'_{\text{hemin}} = 290 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )は  $\text{Shp}$  ( $k'_{\text{hemin}} = 20 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )よりも 10 倍以上大きく,  $\text{Shr}^{\text{N2}}$  のヘム結合部位はアクセシビリティが高いことが示された. 以上の結果から, 我々は  $\text{Shr}^{\text{N1}}$  がヘムを獲得すると, 即座に  $\text{Shr}^{\text{N2}}$  にヘムを受け渡し, 継続的にヘムを獲得するため  $\text{Shr}^{\text{N2}}$  はすぐにヘムを放出し, 下流の  $\text{Shp}$  が安定な複合体を形成する, という輸送機構を提案した. すなわち, ヘモグロビンから  $\text{Shr}$  を介した  $\text{Shp}$  へのヘム輸送の駆動力は, 他のグラム陽性菌で報告されている親和性の違いによるものだけではなく, 親和性と結合速度の二つの因子に制御されており,  $\text{Shr}$  内のそれぞれのドメインが異なる役割をする事で, 少ない受容体で効率良くヘムを獲得することを可能にしていると結論付けた.

第三章では,  $\text{Shr}$  のヘモグロビン結合を担う N 末端ドメイン  $\text{Shr}^{\text{NTD}}$  の物理化学的な解析とスクリーニング系の構築を実施した. 第二章より, ヘモグロビンからの鉄獲得の開始反応は  $\text{Shr}^{\text{NTD}}$  とヘモグロビンの結合である事が示唆されたため, 表面プラズモン共鳴 (SPR), 等温滴定量熱量測定 (ITC) を用いて  $\text{Shr}^{\text{NTD}}$  とヘモグロビン相互作用の精密解析を実施した. その結果, 結合解離速度は速く, 解離定数は  $14 \mu\text{M}$  と弱いものの, エンタルピー優位な結合であり, 結合に際して発熱を示す特異的な結合であることを示した. また, ヘモグロビン認識の最小単位として  $\text{Shr}(169-296)$  を新規に同定し, 安定性の向上を図った. これらの知見を元に, 鉄獲得経路の阻害のために  $\text{Shr}^{\text{NTD}}$  とヘモグロビンの蛋白質間相互作用 (PPI) を阻害する化合物を探索するスクリーニング系を構築した.

第四章では, 複数のライブラリーから第三章で構築した系を用いて阻害化合物を取得し, その化合物が化膿連鎖球菌に対して選択的に増殖抑制作用を有する事を示した. 一次評価として, PPI フォーカスライブラリーから反射型干渉分光法 (OctetRed™) を用いて  $\text{Shr}^{\text{NTD}}$  とヒト一酸化炭素化ヘモグロビンの結合を阻害する化合物, もしくは, フラグメントライブラリーから SPR を用いて  $\text{Shr}^{\text{NTD}}$  に直接結合する化合物を選別した. 二次評価として, SPR を用い

て濃度依存的な結合阻害活性を有する化合物を選別し、50%阻害濃度  $IC_{50}$  が 1-50  $\mu\text{M}$  となる 14 化合物を獲得した。更に、市販化合物データベースから類縁体探索を行い、クエリ化合物に対して同等以上の結合阻害活性を示す 3 種類の類似化合物を獲得した。それらのうち 1 つの化合物は濃度依存的に GAS JRS4 株, SSI-1 株に対して増殖抑制作用を示し、且つ、その作用は化膿連鎖球菌選択的に現れる事を示した。作用機序解明のため JRS4\_ *shr* 欠損株を作製し、増殖抑制試験を実施した結果、JRS4\_ *shr* 欠損株では化合物の増殖抑制作用が大幅に減弱した。ヘモグロビン非含有培地でも同様に化合物の作用が減弱する事から、化合物の増殖抑制作用は *shr* およびヘモグロビンの存在に応じて作用している事が示唆された。

以上、本研究により、化膿レンサ球菌の有する、他のグラム陽性細菌とは異なる、新たなヘム輸送機構を明らかにし、更に、蛋白質間相互作用を標的とした物理化学的な化合物探索から同定した化合物が化膿レンサ球菌選択的に増殖抑制作用を有する事を示した。本化合物は、病原性因子として鉄獲得経路を標的とした初めての連鎖球菌選択的な増殖抑制剤であり、今後、連鎖球菌の鉄取込経路の機能解明、新規抗菌剤開発に役立つ事を期待したい。