

審査の結果の要旨

氏名 星野 将人

化膿連鎖球菌はヒトの表皮や咽頭粘膜に存在する常在菌として咽頭炎などの軽微な症状から致死性の症状を引き起こすことが知られている。近年では、薬剤耐性菌の出現が見られ新たな治療薬の開発が望まれている。ヘム鉄獲得機構は化膿連鎖球菌の生存、増殖、感染に重要な役割を果たす病原因子である。細胞表面蛋白質 **Shr** がヒトヘモグロビンと結合する事でヘム鉄獲得が開始され、宿主感染における **Shr** の重要性は、**Shr** 欠損株を用いた研究からも報告されてきた。以上のことから、**Shr** を介するヘム鉄獲得を阻害することは新たな作用機序を有する増殖抑制剤の開発につながると期待できる。しかしながら、本獲得機構におけるヘム輸送の分子メカニズムは解明されていない。化膿連鎖球菌の鉄獲得機構の解明は、新たな抗菌剤の開発やワクチン開発にも応用でき、感染症治療へ貢献すると期待できる。

本論文では、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を最終目的としている。最終目的達成のために、ヘム鉄獲得経路の特性解析を実施し、物理化学的アプローチを駆使した標的蛋白質選択的な阻害化合物の同定を実施している。本論文は 5 章から構成されており、1 章では病原因子としての鉄獲得機構の重要性および物理化学スクリーニング法の現状、研究目的が述べられている。2 章ではヘモグロビンからの鉄獲得機構の特性解析、3 章では標的蛋白質間相互作用の解析とスクリーニング系の構築、4 章では蛋白質間相互作用阻害化合物の同定と機能解析について述べられている。5 章では、2 章、3 章、4 章の研究結果に基づいて、新規抗菌化合物の創製について考察されている。

2 章では、**Shr** を介するヘモグロビンからのヘム鉄獲得機構の分子メカニズムが説明されている。**Shr** のヘモグロビン認識に重要とされる N 末端ドメイン **Shr^{NTD}**、ヘム結合性を有する 2 つの NEAT ドメイン **Shr^{N1}**、**Shr^{N2}**、**Shr** の下流に位置するヘム結合蛋白質 **Shp** を調製し、ヘモグロビンもしくはヘムとの相互作用を熱力学的および速度論的な観点から評価した。**Shr^{NTD}** はヘモグロビンに対する結合解離が速く、親和性も弱いものであった。ヘム獲得に必須とされ

ている Shr^{N1} は予想に反してヘムへの親和性は低く、一方、 Shr^{N2} はヘムに対して非常に強く結合し、その結合速度も非常に速いことが分かった。このことから、 Shr^{NTD} がヘモグロビンと結合した後、ヘモグロビンから遊離したヘムは Shr^{N2} によって迅速に受容される事が示唆された。更に、下流蛋白質である Shp とヘムの親和性は Shr^{N2} と同程度であるが結合解離速度が著しく遅いことが分かり、 Shr^{N2} は受容したヘムをすぐに放出し、下流の Shp が安定な複合体を形成する事が示唆された。以上の結果から、化膿連鎖球菌のヘム鉄獲得機構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単純輸送とは異なるメカニズムであると考えられ、 Shr^{N2} が触媒様の機能を果たし、結合親和性と結合速度の2つの駆動力を制御する事でヘム輸送を可能にする効率の良いシステムであると結論付けられた。

3章では、 Shr^{NTD} とヘモグロビン相互作用の精密解析とスクリーニング系の構築について説明されている。物理化学スクリーニングの標的としてエンタルピー優位な特異的結合を有する Shr^{NTD} とヘモグロビンの相互作用を選択した。 Shr^{NTD} は大腸菌を用いて容易に大量発現精製が可能であったが、更に安定性向上のため、ヘモグロビン認識の最小ドメイン $\text{Shr}^{\text{NTD}}(169-296)$ を新規に同定した。スクリーニングに向けて Shr^{NTD} とヘモグロビンの相互作用を物理的に阻害する評価系と、 Shr^{NTD} もしくはヘモグロビンに対する直接的な結合を評価する系を構築した。

4章では、 Shr^{NTD} とヘモグロビンの相互作用阻害剤の探索と選択した阻害剤の化膿連鎖球菌に対する作用が説明されている。一次評価として東京大学創薬機構所有のフラグメントライブラリーから SPR を用いて Shr^{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に Shr^{NTD} とヘモグロビンの結合阻害活性を有する化合物を選別し、 ITC により熱力学的にも阻害活性を有すること、ヘモグロビンへの直接的な結合は無いことを示した。更に、市販化合物データベースから類縁体探索を行い、**3, 5-dichloro anthranilic hydroxamic acid** が最も強い阻害活性($\text{IC}_{50}=11 \mu\text{M}$)を有していることが明らかとなった。微生物を用いた増殖試験の結果、同化合物は化膿連鎖球菌 **JRS4** 株、**SSI-1** 株に対して濃度依存的に増殖抑制作用を示し、且つ、その作用は病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌には見られないことが分かった。更に、作用メカニズムを解析するため shr 欠損 **JRS4** 株を用いて増殖試験を行ったところ、化合物の増殖抑制作用が減弱することが分かった。以上の結果から、ヘム鉄取込経路を標的として物理化学的スクリーニング手法で同定した化合物は、化膿連鎖球菌選択的な増殖抑制作用を有し、その作用は shr 依存的に起きていると結論付

けられた。

本研究は、他のグラム陽性細菌とは異なる化膿連鎖球菌特有のヘム輸送機構を解明し、ヘム鉄獲得に関する蛋白質間相互作用を標的とした化合物が化膿連鎖球菌選択的に増殖抑制作用を示す事を明らかにした。本研究で得られた知見は、化膿連鎖球菌に対する抗菌剤開発やワクチン開発に応用できるだけでなく、病原性微生物の有する鉄獲得機構の理解を深めるに至った。さらに、本研究のコンセプトは化膿連鎖球菌に限らず他の病原性微生物にも適用可能であることから、感染症治療へ広く貢献するものと期待できる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。