

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 感染制御学研究室
職・氏名 准教授・宮本 勝城

研究テーマ：

次世代型感染症治療薬の開発

研究期間：

2018年4月1日～2020年3月31日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 宮本 勝城（大阪薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者 福永 理己郎（大阪薬科大学・薬学部・教授）
研究分担者 井上 晴嗣（大阪薬科大学・薬学部・教授）
研究分担者 友尾 幸司（大阪薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者 尹 康子（大阪薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者 箕浦 克彦（大阪薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者 佐藤 卓史（大阪薬科大学・薬学部・准教授）
研究分担者 藤井 忍（大阪薬科大学・薬学部・講師）
研究分担者 土屋 孝弘（大阪薬科大学・薬学部・講師）
研究分担者 藤井 俊裕（大阪薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究機関>

なし

研究目的：

近年、大腸菌 O-157 を病原体とする出血性大腸炎をはじめとする新興感染症、結核などの再興感染症、病院やデイケアセンター内などでの日和見感染症、さらには医療現場での抗菌薬の濫用が原因とも考えられる多剤耐性菌の発生など多くの問題から、新たな作用機作を有する新規抗菌薬の開発が待ち望まれている。今日使用されている抗菌薬の多くは、タンパク質や細胞壁等の生合成を阻害することにより細菌を殺滅する。当研究プロジェクトでは、細菌を殺滅するのではなく、宿主生体内での増殖を抑制する次世代型の新規な抗菌薬を開発することを目的としており、耐性化を低減し、かつ既存の抗菌薬との併用を可能とするものである。すなわち、細菌の増殖機構を阻害するアプローチとして、シデロフォアなどの鉄輸送系の解明およびその機能阻害剤の探索を通して、従来の抗菌薬創製に関わるアプローチとは異なる、新規な作用機作を有する細菌感染症治療薬を開発することを目的としている。

Vibrio vulnificus は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して、全身性の感染症を引

き起こす細菌である。一般に、鉄はほとんどの生物の生存と増殖に不可欠な元素であるが、宿主生体内において病原菌が自由に利用できる遊離鉄は極めて少ない。したがって、宿主生体内で増殖し得る病原菌は、何らかの巧妙な鉄獲得系を保持しているはずである。そこで、我々は臨床分離株 *V. vulnificus* M2799 株の鉄獲得系タンパク質を網羅的に明らかにする目的で、プロテオーム解析を行った。次に、鉄欠乏下で発現量が増大するタンパク質群のうち、本菌株の産生するシデロフォアである *vulnibactin* を介する鉄取り込み機構に関与するタンパク質の遺伝子欠失株を作製した。すなわち、イソコリスミ酸合成酵素(ICS)、 Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体を基質とする鉄還元酵素(VuuB)、 Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体の外膜レセプター(VuuA)、および Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体のペリプラズム結合タンパク質(FatB)の欠失株を作製した。これらの欠失株の鉄欠乏下における増殖能について検討したところ、ICS および VuuA 遺伝子欠失株では増殖が顕著に抑制されたが、VuuB および FatB 遺伝子欠失株においては遅いながらも増殖が確認された。以上の結果から、VuuB および FatB にはそれぞれ代替タンパク質が存在することが示唆され、さらなる解析によって、FatB の代替タンパク質として、ハイドロキサメート型シデロフォア鉄錯体のペリプラズム結合タンパク質 VatD が機能すること、VuuB の代替タンパク質として、ハイドロキサメート型シデロフォア鉄錯体の還元酵素である IutB が機能することを明らかにした。今回、VuuB および IutB に着目して高発現系を構築し、それらの諸性質について検討した。

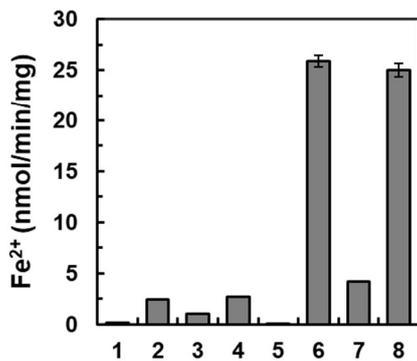
研究内容および研究成果：

V. vulnificus M2799 株の *vuuB* 遺伝子を pProEX HTa に連結して大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入し、VuuB を His タグ融合タンパク質として高発現させた。一方、*iutB* 遺伝子は pET21b(+)に連結し、C 末端 His タグ融合タンパク質として高発現させた。得られた VuuB および IutB を用いて鉄(III)還元酵素活性を測定した。鉄(III)還元酵素は NADH、NADPH または還元型グルタチオン(GSH)を電子供与体とし、 Fe^{3+} を電子受容体とする還元反応を触媒する。そこで、鉄キレート化合物として鉄(III)ニトリロ三酢酸(FeNTA)を用いて補酵素要求性について検討した。その結果、VuuB は NADH を電子供与体、FAD を補酵素として FeNTA を還元し、その効果は $10 \mu\text{M}$ FAD および $20 \mu\text{M}$ NADH 存在下において最も高い比活性($25.89 \pm 0.54 \text{ nmol/min/mg protein}$)を示した (図 1)。以上の結果から、VuuB は NADH を電子供与体とする鉄(III)還元酵素(Ferric-Chelate Reductase (NAD(P)H), EC 1.16.1.7/10)に帰属し、FAD を補酵素とすることが明らかとなった。IutB についても検討した結果、IutB は NADH、NADPH および GSH を電子供与体として FeNTA を還元し、その効果は $100 \mu\text{M}$ GSH および $100 \mu\text{M}$ NADPH 存在下において最も高い比活性($14.24 \pm 0.11 \text{ nmol/min/mg protein}$)を示した (図 1)。次に、両酵素の至適 pH および至適温度について検討した結果、VuuB は pH 7.0 および 37°C 、IutB は pH 8.5 および 45°C であった。さらに、鉄キレート化合物群に対する鉄還元活性を測定した結果、VuuB および IutB は鉄キレート化合物の FeNTA をはじめとし、 Fe-citrate および FeEDTA に対して、さらには FeCl_3 にも鉄(III)還元活性を示した。また、ハイドロキサメート型シデロフォアとして *aerobactin* および *desferrioxamine B*、カテコール型シデロフォアとして *enterobactin*、*vibriobactin* および *vulnibactin* を用いて反応特異性について検討した結果、VuuB は Fe^{3+} -*aerobactin* 錯体、 Fe^{3+} -*vibriobactin* 錯体および Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体に対して鉄(III)還元活性(1.73 ± 0.01 、 0.97 ± 0.11 、 $1.72 \pm 0.01 \text{ nmol/min/mg protein}$)を示し、IutB は Fe^{3+} -*aerobactin* 錯体、*ferrioxamine B* 錯体、 Fe^{3+} -*vibriobactin* 錯体および Fe^{3+} -*vulnibactin* 錯体に対して還元活性(6.83 ± 1.12 、 1.44 ± 0.39 、 1.10 ± 0.86 、 $2.32 \pm 0.70 \text{ nmol/min/mg protein}$)を示した (図 2)。

最後に、M2799 株における *vuuB* および *iutB* 遺伝子の発現量について検討した結果、17:2 であることが明らかとなった。

VuuB

	1	2	3	4	5	6	7	8
NADH	-	+	-	+	-	+	-	+
NADPH	-	-	+	+	-	-	+	+
FAD	-	-	-	-	+	+	+	+



IutB

	1	2	3	4	5	6
NADH	-	+	-	-	+	-
NADPH	-	-	+	-	-	+
GSH	-	-	-	+	+	+

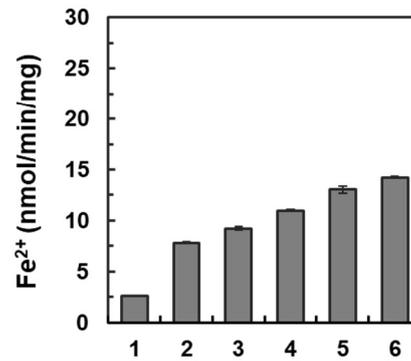
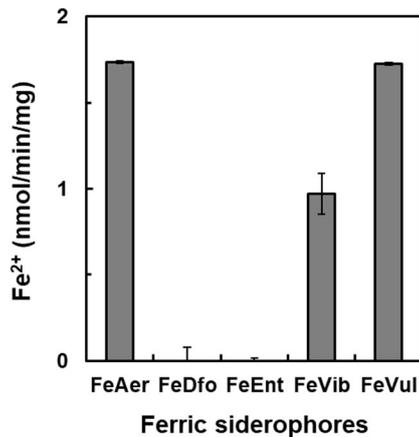


図1. VuuBおよびIutBの電子供与体の探索

VuuB



IutB

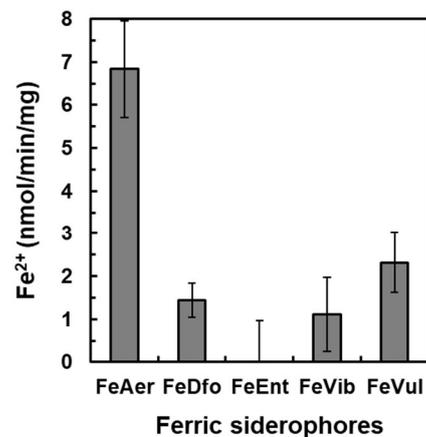


図2. VuuBおよびIutBのシデロフォア鉄錯体に対する鉄還元酵素活性

成果発表：

<原著論文>

- Hiroaki Kawano, Katsushiro Miyamoto, Megumi Yasunobe, Masahiro Murata, Eri Yamahata, Ryo Yamaguchi, Yuta Miyaki, Takahiro Tsuchiya, Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Hiroshi Tsujibo. Identification of the heme acquisition system in *Vibrio vulnificus* M2799. *Microb Pathog* **117**:100-108 (2018).
- Tomotaka Tanabe, Ayaka Isshiki, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Shigeo Yamamoto, Tatsuya Funahashi. Transcriptional regulation of the ferric aerobactin receptor gene by a GntR-like repressor IutR in *Vibrio*

furnissii.

FEMS Microbiol Lett **365**: fny220 (2018).

- Naoko Okai, Katsushiro Miyamoto, Koji Tomoo, Takahiro Tsuchiya, Jun Komano, Tomotaka Tanabe, Tatsuya Funahashi, Hiroshi Tsujibo.
VuuB and IutB reduce ferric-vulnibactin in *Vibrio vulnificus* M2799.
Biometals doi: 10.1007/s10534-020-00241-5 (2020).

<学会発表>

- 宮本勝城、河野広朗、岡井直子、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕。
Vibrio vulnificus M2799 株の鉄獲得機構の解明。
第 42 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 金沢 (2018 年 9 月)。
- 柏原愛唯、腕野陽子、小豆畑浩志、内田絢子、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕。
Vibrio vulnificus の致死性毒素 RtxA1 毒素の解析。
第 30 回微生物シンポジウム 千葉 (2018 年 8 月)。
- 清水宏太郎、橋本香緒梨、小山佑輔、大塚佳奈、土屋孝弘、宮本勝城、良原栄策、辻坊 裕。
Bam 複合体を標的とした多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* に対する新規抗菌物質の開発。
第 30 回微生物シンポジウム 千葉 (2018 年 8 月)。
- Katsushiro Miyamoto, Yusuke Sakamoto, Yuka Muroga, Yuhi Yagi, Saki Sugawa, Takahiro Tsuchiya, Hiroshi Tsujibo.
Analysis of the novel proteins involved in the chitinolytic system of *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7.
14th ICCS & 12th APCCS, Osaka (Aug. 2018).
- 岡井直子、宮本勝城、土屋孝弘、田邊知孝、舟橋達也、辻坊 裕。
Vibrio vulnificus M2799 株の鉄還元酵素 VuuB の諸性質。
日本薬学会第 139 年会 千葉 (2019 年 3 月)。
- 桑原寿奈、西脇広裕、森垣柁哉、佐伯龍斗、土屋孝弘、宮本勝城、辻坊 裕。
Vibrio vulnificus の致死性毒素 RtxA1 毒素の解析。
第 92 回日本細菌学会総会、札幌 (2019 年 4 月)。
- 谷口菜優、中村光希、蓮井良美、丸山奈緒子、土屋孝弘、宮本勝城、良原栄策、辻坊 裕。
Bam 複合体を標的とした多剤耐性アシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発。
第 92 回日本細菌学会総会、札幌 (2019 年 4 月)。
- 土屋孝弘、谷口菜優、中村光希、蓮井良美、丸山奈緒子、宮本勝城、良原栄策、駒野 淳。
多剤耐性アシネトバクターに対する新規抗菌物質の開発。
第 31 回微生物シンポジウム 京都 (2019 年 8 月)。

<その他>

- なし