

SNI 結合分子の探索と溶血性連鎖球菌特異的抗生剤の開発

研究代表者： 藤井 豊（医学部・教授）、浅原 雅浩（教育地域科学部・准教授）

共同研究者： 田中 幸枝（医学部・助教）、浦崎 芳正（医学部・講師）

概 要	
	SNI (Streptococcus NADase Inhibitor) は、溶連菌毒素である NADase と共発現することで病原菌自身の保全を図っている。そのため、SNI の機能阻害剤 (SNII) の開発を目指し、多様な生物資源から、SNI 機能阻害物質の探索を行った。そのアッセイ系として、NADase/SNI 複合体からの NADase の復活活性を指標として用いた。その結果、カビ、キノコ、植物および動物などの抽出成分に、NADase の復活活性を示す有効な成分の存在が判った。キノコ抽出成分では、分子量約 2,000 の化合物が、NADase/SNI 複合体からの NADase の復活に有効であることが解った。一方、カビ抽出成分には強い NADase 阻害活性が認められた。
関連キーワード	NADase、SNI、阻害剤、活性化、溶連菌

研究の背景および目的

【背景】 A 群 β 溶血性連鎖球菌 (Group A β -hemolytic *Streptococcus pyogenes*: GAS) は、小児に多く見られる上気道感染症 (扁桃腺炎、咽頭炎) を引き起こす病原菌である。その病原機構は、菌体内で産生された溶血毒素ストレプトリジン O (SLO) を分泌し、宿主細胞膜に蛋白質が通り抜けられる細孔を開けて、酵素蛋白 NADase を送り込み、宿主細胞内の補酵素 NAD⁺ を分解枯渇してエネルギー産生をブロックすることで細胞に大きな障害を与えるというものである。

SLO 遺伝子 (*slo*) の上流には、NADase 遺伝子 (*nga*) がある。SLO はそのプロモーターからポリシストロニックに転写され、NADase と同時に翻訳される。このことから、SLO は単に宿主細胞に細孔を開ける溶血毒素ではなく、NADase を宿主細胞内に輸送するシステムとして機能していると考えられるようになった (BBA 1681:134, 2005)。また、SLO と NADase の間に機能不明な第 3 の遺伝子が 1 つある。これら 3 つの遺伝子がオペロンを形成しているのにはそれなりの理由があると考え検討したところ、その第 3 遺伝子産物が NADase と 1:1 で強力に結合し、NADase 活性を

完全に阻害することを明らかにした。この阻害蛋白質を Streptococcal NADase Inhibitor (SNI) と命名した (JBC 281:9181, 2006)。溶連菌自身を NADase の酵素活性から防御するための巧みな仕組みがそこにあった (日経産業新聞 H18/7/18) (特願 2005-254512、特許 4270466)。NADase は分泌蛋白質で、N 末端シグナルペプチドが付いて発現されるが、それでも完全な酵素活性を示す。この仕組みを逆にとり、菌体内の SNI の機能を阻害する薬物 (SNI-Inhibitor=SNII) または SNI による封じ込められた NADase 活性を復活させる薬物を投与すれば、NADase の活性を菌体内で封じ込めることができず、自身の NAD⁺ を分解枯渇してしまうに違いない。従って、この原理を応用すれば、病原性溶連菌の新しい抗生剤の開発が可能になる。

【目的】 NADase/SNI 複合体からの NADase の復活活性を指標として、SNI の機能を阻止する物質をカビ、キノコ、動植物抽出物やタンパク質分解酵素阻害剤など合成物および天然物からスクリーニングし、その化合物を SNI 阻害剤 (SNI Inhibitor:SNII) として、溶血性連鎖球菌に特異的な抗生剤の開発を目指す。

研究の内容および成果

【研究内容・成果・考察】 NADase/SNI 複合体からの NADase 復活活性を有する天然物スクリーニング

カビ (オアカビとシロカビ) 2 種、キノコ 28 種、植物 5 種の他、lysozyme とタンパク質分解酵素阻害剤 (ロシュ、complete、EDTA-free、Protease

Inhibitor Cocktail) の NADase/SNI 複合体からの NADase 復活活性をスクリーニングした (図 1、図 2)。SNI 結合型 NADase には、非常に弱いながらも活性がある。いろいろな化合物を添加して、NADase 活性の増強復活が認められれば、結果的に SNI 機能の阻害を意味するが、その効果が SNI

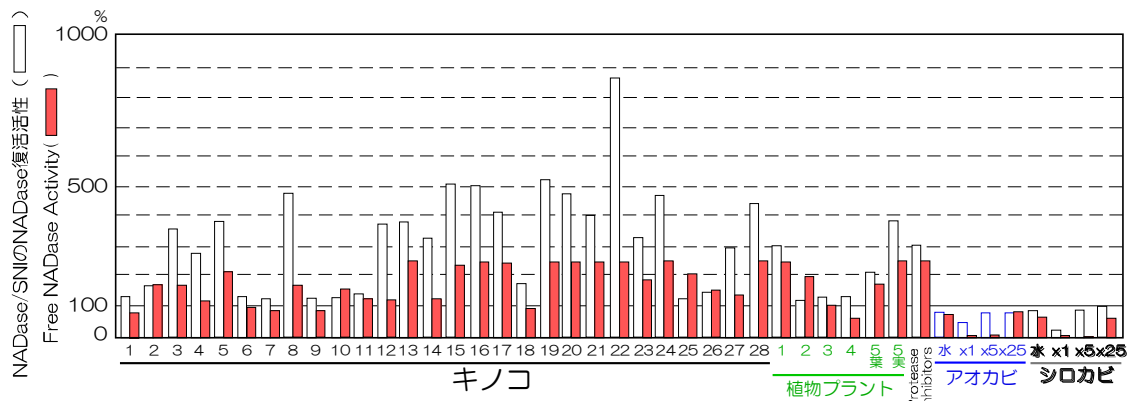


図1 キノコ、植物プラントおよびカビ抽出エキスとタンパク質分解酵素阻害剤によるフリー-NADase および SNI 結合型 NADase 活性に及ぼす影響。

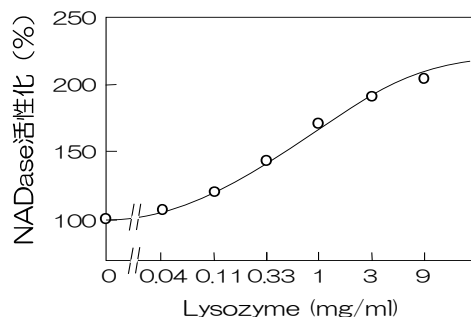


図2 Lysozyme による NADase の活性化

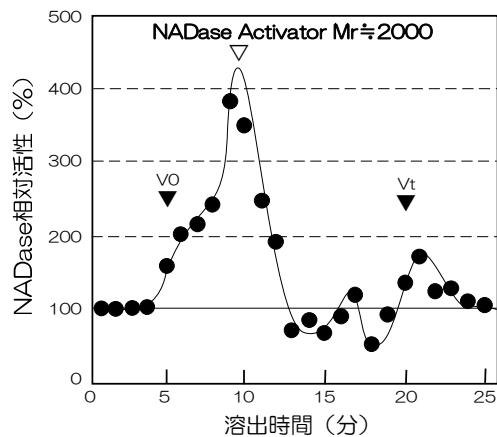


図3 キノコ22成分のスーパーデックスペプチドカラムによりゲル濾過分析
0.1M Na-phosphate, pH7.4

に直接的か間接的かを判断する目的で、SNI フリーの NADase 活性に与える影響をコントロールとした。

乾燥したキノコおよび植物の水抽出エキスは、殆どの場合、SNI 結合型 NADase の増強復活活性が認められ、中には 10 倍ほどの活性化を引起す例が認められた。しかし、すべてのケースで、フリーの NADase も活性化している。動物由来では、卵白由来の lysozyme 水溶液（生化学工業、6 回再結晶）に同じく NADase の活性化がみられた（図 2）。以前の研究で、溶菌に使用した lysozyme が NADase/SNI 複合体と一緒に精製されてきたことから、lysozyme の効果を検討した。

他方、大変面白いことにタンパク質分解酵素阻害剤（セリンおよびチオールプロテアーゼ阻害剤：アンチパイン、ベスタチン、キモスタチン、E64、ロイペプチン、ペプスタチン等のカクテル）にも SNI 結合型 NADase の増強復活活性が認められたことである。しかしながら、これも NADase を直接活性化することによるものと思われた。

最も SNI 結合型 NADase の増強復活活性が認められたキノコ 22 の成分をさらにスーパーデックスペプチドカラムによりゲル濾過分析した（図 3）。分子量 2000 の位置に強い NADase の活性化因子 Activator が溶出してきた。さらに低分子側には、弱いながらも阻害因子が溶出している。

一方、カビ抽出エキスには強い阻害因子 inhibitor が存在している。抗生剤としての用途より、すでに菌体外に分泌された NADase をブロックする用途としての価値がある。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」「特記事項」なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- ① H23～25 年度科研費・基盤研究 (C)、分担 (研究代表者：田中幸枝)、「多剤耐性菌出現リスクを回避するための溶血性連鎖球菌専用抗生

剤の開発」

- ② 富山大学和漢医薬学研究所・H24 年度共同研究探査プロジェクト・代表：藤井豊、分担：田中幸枝、「A 群溶血性連鎖球菌咽頭炎治療薬の和漢医薬探査研究プロジェクト」