

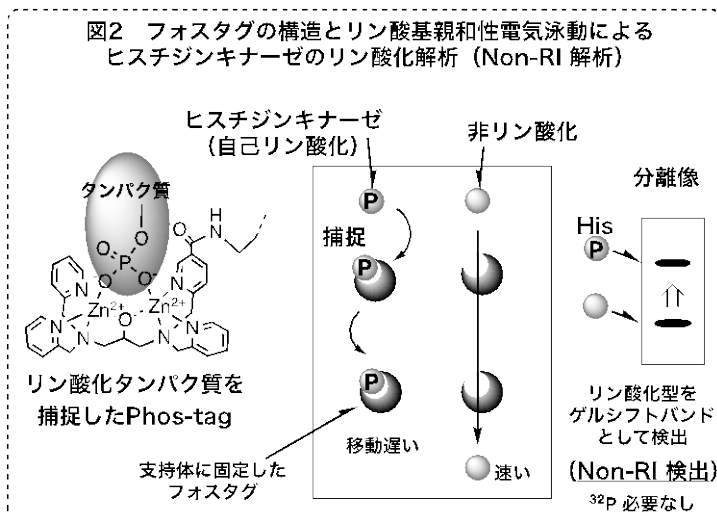
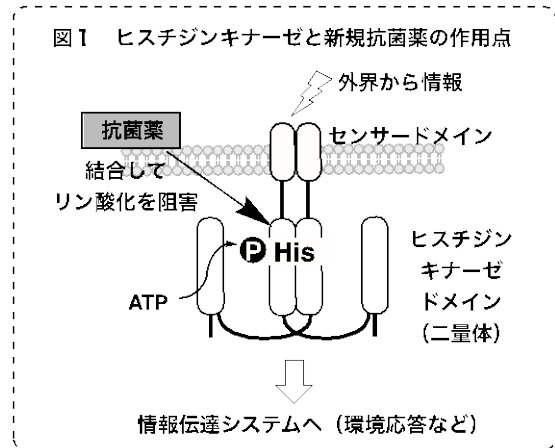
2019年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

「次世代感染症治療に繋がる抗菌薬探索用の高速スクリーニングシステムの開発・実用化」

[広島大学 ・ 准教授] [木下 英司]

1. はじめに

感染症の治療は、医療において重要な課題である。抗生物質の開発により感染症を克服できるかと考えられたが、それは薬剤耐性菌の出現や院内感染という応酬と新たな抗生物質の開発を繰り返すきっかけとなった。抗生物質の開発においては、作用点を既存のものと全く異なる箇所を設定することが重要で、それにより耐性菌の出現を回避する効果が期待できる。近年、細菌特有の2成分情報伝達分子であるヒスチジinkinナーゼの自己リン酸化を特異的に阻害し、増殖やバイオフィルム形成等を抑制する新規抗菌薬が研究代表者の共同研究グループによって見出され(Eguchi Y. et al, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011:55,1475), このキナーゼを標的とした阻害剤の開発が開始されている(図1)。



研究代表者らは、自らが開発したリン酸基を特異的に捕捉する分子、フォスタグによるリン酸基親和性電気泳動(フォスタグ電気泳動)法を考案し、加水分解されやすく短寿命なため検出が困難であったタンパク質のヒスチジンリン酸化を定量的に可視化することに成功した(図2)。抗体の作製や質量分析が困難なヒスチジinkinナーゼのリン酸化解析にとって、本手法は電気泳動装置さえあれば放射性同位元素(^{32}P)を使用せずに簡便にアッセイができる有用性

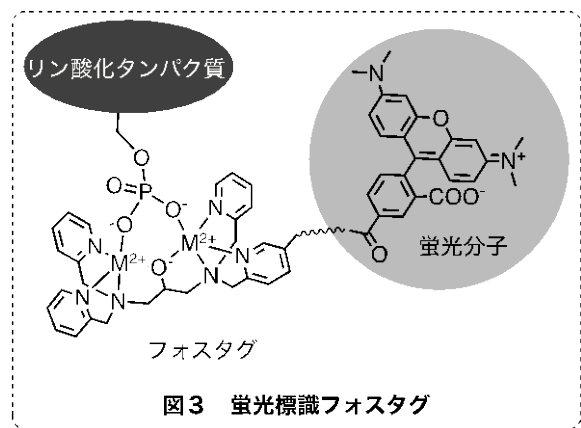
から、細菌の情報伝達経路、特に、ヒスチジinkinナーゼの研究者に大いに利用されるようになった。

従来の作用点とは全く異なるヒスチジinkinナーゼを標的とした阻害剤が薬剤耐性菌に対する新規抗菌薬になると期待される。よって、本キナーゼの自己リン酸化反応を可視化できる、迅速で安定的な定量分析用デバイスの創出は急務である。しかし、ヒスチジンのリン酸結合の脆弱性から、精確なリン酸化検出はこれまで困難とされていた。この困難を克服するのが、フォスタグ技術を基盤とした検出法である。本手法にスループット性能を付加させることで、極めて有用な阻害剤プロファイリング法へと発展させることができると考えている。

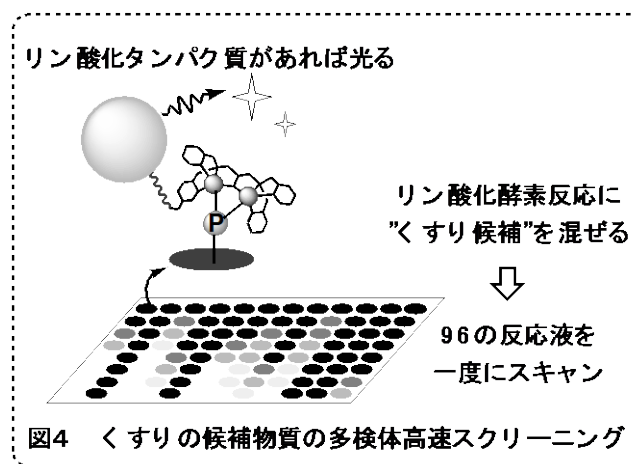
2.概要

がん細胞などの増殖を引き起こすタンパク質キナーゼの働きを阻害する医薬品は、近年のがん治療薬の主流である。感染症治療薬についても、病原菌特有のタンパク質キナーゼ(ヒスチジinkinナーゼ)阻害薬が、次世代の抗生物質として注目されつつある。しかし、病原菌のヒスチジinkinナーゼは化学的に不安定で短寿命なリン酸化タンパク質を生成する性質があり、阻害薬としての候補化合物を検証する方法が限られていた(放射性同位元素の ^{32}P を使用する方法のみ)。本研究では、そのような不安定なリン酸化タンパク質を高感度に定量分析するための蛍光標識型分子デバイス(蛍光分子を結合させたフォスタグ)を創出する。さらには、それを応用することで、病原菌特有のヒスチジinkinナーゼ阻害薬を探索すべく多検体処理能力に秀でた高速スクリーニングシステムを開発し、実用化することを最終目標とする。

本研究の基盤となるシーズ技術は、研究代表者らがこれまでに独自に開発したリン酸基を特異的に捕捉する分子「フォスタグ」である。このフォスタグは中性の水溶液中でリン酸化タンパク質に結合し、酸やアルカリで加水分解されやすい化学的に不安定なリン酸基(ヒスチジンに付加したリン酸基)も簡便に検出できるため、これまでに病原菌特有のヒスチジinkinナーゼの解析法(フォスタグ電気泳動法、参照図2)を開発した実績がある。しかし、この手法は多検体を処理する能力が低い。本研究では、捕捉したリン酸化タンパク質を高感度に定量分析できる蛍光標識フォスタグを創出する(図3)。



標的となる病原菌特有のヒスチジinkinナーゼの反応(自己のヒスチジン残基をリン酸化させる反応、すなわち、自己リン酸化反応)によって、どれだけのヒスチジンリン酸化タンパク質が生成されるのか、あるいはその生成がくすり候補化合物によってどれだけ阻害されるのかは、この蛍光標識フォスタグを反応液に混合し、レーザー照射するだけでヒスチジンリン酸化タンパク質を定量化することができる。煩雑な操作で時間をかけないので、不安定なリン酸基の分析にも適している。さらには、一度に 96 検体以上の分析ができる方法にも応用可能で、特に、たくさんあるくすり候補化合物群から薬理面や安全面でさらに優れた



リード化合物(副作用が少なく耐性菌が生じにくい抗生物質)へと繋ぐための、多検体高速スクリーニング法への適用が期待できる(図4、将来的には自動化・ロボット化への適用も諮る)。

本研究ではスループット性の追求を主目的とする。多検体を一度に検査できるアレイフォーマットのヒスチジinkinナーゼアッセイ法を構築し、従来の電気泳動法を凌駕する創薬を指向した世界初の実用的な阻害剤プロファイリング法を創造する。

3.研究成果および今後の課題

フォスタグ蛍光ゲル染色剤を用いたヒスチジンリン酸化タンパク質の定量解析

フォスタグ蛍光ゲル染色剤は、生理 pH で電気泳動ゲル等を染色することができるリン酸化蛍光イメージング試薬である(ナード研究所より市販化)。研究代表者らはこの染色剤を開発し、これを用いてヒスチジンリン酸化タンパク質のリン酸化プロファイリング(時系列リン酸化定量解析)を行った(投稿論文1)。

大腸菌のヒスチジンキナーゼ EnvZ の自己リン酸化反応を行った。ATP を用い、その反応液を電気泳動で分離後、フォスタグ蛍光ゲル染色剤の1つである Phos-tag Magenta ($\lambda_{Ex} = 547$ nm; $\lambda_{Em} = 561$ nm)を用いてゲル染色した(図5 A の左パネル)。リン酸化反応の進行に伴って EnvZ のバンドの蛍光強度が増大していることがわかる。フォスタグ蛍光ゲル染色の後には CBB 染色等の他のゲル染色が適用可能であり、すべてのレーンのタンパク質量がほぼ等しいことが CBB による後染色によって示された(図5 A の右パネル)。また、同じ試料をフォスタグ電気泳動で分離した後、CBB 染色を行った(図5 B)。Phos-tag Magenta を用いて染色されたバンドの蛍光強度とフォスタグ電気泳動を用いて

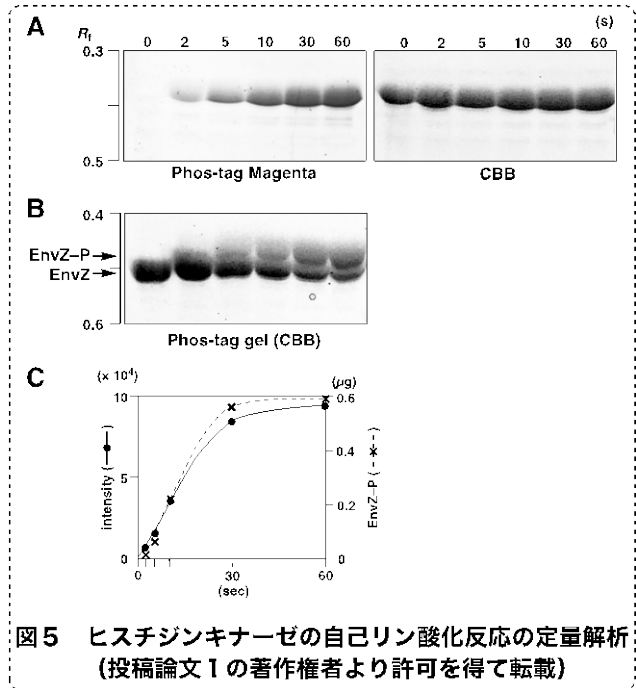


図5 ヒスチジンキナーゼの自己リン酸化反応の定量解析 (投稿論文1の著作権者より許可を得て転載)

分離したリン酸化型の EnvZ の量を定量し、両者のタイムコースを比較したところ、それらはほぼ同等であることが示された(図5C)。この結果から、フォスタグ電気泳動と同様に、フォスタグ蛍光ゲル染色剤を用いることで、ヒスチジンリン酸化タンパク質を簡便に定量解析できることが示された。

フォスタグ蛍光ゲル染色剤を用いたヒスチジンキナーゼ阻害剤プロファイリング

EnvZ を自己リン酸化反応の実験に用いた。ヒスチジンキナーゼ阻害剤プロファイリングの最初の実施例として既知の waldiomycin を用いた。ATP 存在下の反応液を電気泳動で分離後、フォスタグ蛍光ゲル染色剤の1つである Phos-tag Cyan ($\lambda_{Ex} = 643$ nm; $\lambda_{Em} = 661$ nm)を用いてゲル染色した(図6A)。その結果、waldiomycin 濃度依存的にリン酸化の程度を示す蛍光強度は低下し、EnvZ に対する IC₅₀ 値が算出された(図7B)。これらは既に報告されている数値(IC₅₀ = 22.4 μM)とほぼ同等であった。このことより、フォスタグ蛍光ゲル染色法をヒスチジンキナーゼ阻害剤のプロファイリング法として応用できることが示された。

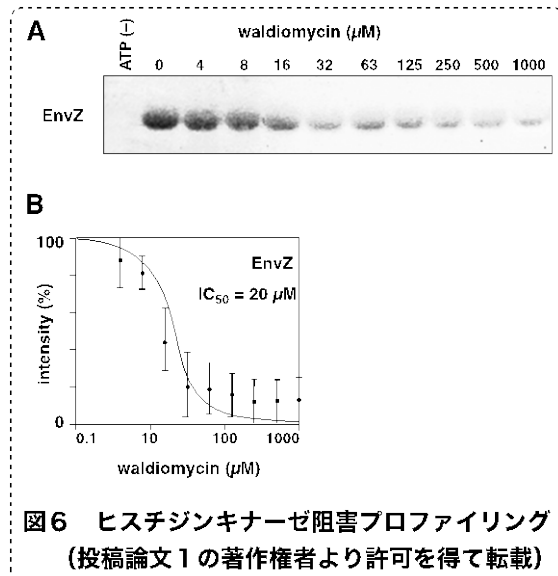


図6 ヒスチジンキナーゼ阻害プロファイリング (投稿論文1の著作権者より許可を得て転載)

リン酸化ヒスチジン抗体を用いたドットブロットアッセイによるヒスチジンキナーゼ阻害剤プロファイリング

研究代表者らはリン酸化ヒスチジン抗体(ミリポア社)を用いることで、細菌のヒスチジンキナーゼのリン酸化を定量解析できることをウェスタン解析によって実証した。さらには、この原理をドットブロットアッセイに応用することで、世界で初めて、リン酸化ヒスチジンキナーゼの阻害プロファイリングを行った(投稿論文2)。

上記のように、ヒスチジンキナーゼ阻害剤として *walidiomycin* を用い、ATP 存在下における EnvZ の自己リン酸化反応液を PVDF 膜上にドットブロットした後、リン酸化ヒスチジン抗体により検出した。その結果、阻害剤濃度依存的にリン酸化の程度を示す化学発光強度は低下し、EnvZ に対する IC₅₀ 値が 15.0 μM として算出された。この値は上記のフォスタグ蛍光ゲル染色剤によって得られた数値とほぼ同等であった。ドットブロットアッセイによる成功例は、今後の多検体高速スクリーニングシステムへの適用に期待できる。

4. おわりに

研究代表者、株式会社フォスラボ、株式会社ナード研究所の三者が協力することにより、本研究においてフォスタグ蛍光ゲル染色剤を共同開発することに成功した。このゲル染色剤は富士フイルム和光純薬株式会社より販売が開始された(<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/01739.html>)。これまでのフォスタグ試薬と同様、(株)ナード研究所が製造・卸、富士フイルム和光純薬(株)と広島和光(株)など関連各社が販売するといった事業体制で、市場を拡大し続けるとともに、本研究より開発に成功したドットブロットアッセイの原理を取り込むことで、多検体高速スクリーニングシステムへと展開していきたい。

5. 本研究の今後の計画

細菌特有のヒスチジンキナーゼ阻害薬を探索するための簡単で多検体処理能力に秀でたスクリーニング技術を開発することができた。今後はこの技術を基盤としたスクリーニングシステムに展開させ、将来的には自動化・ロボット化への適用も諮りたい。

6. その他

(1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

(2) 投稿論文(タイトル・学会名等)

1) Quantitative monitoring of His and Asp phosphorylation in a bacterial signaling system by using Phos-tag Magenta/Cyan fluorescent dyes. Kinoshita-Kikuta, E., Kusamoto, H., One, S., Akayama, K., Eguchi, Y., Igarashi, M., Okajima, T., Utsumi, R., Eiji Kinoshita, Koike, T. *Electrophoresis* **40**, 3005–3013 (2019).

2) An immuno-dot blot assay for screening histidine kinase inhibitors. Kinoshita-Kikuta, E., Shiho, M., Eguchi, Y., Igarashi, M., Okajima, T., Utsumi, R., Eiji Kinoshita, Koike, T. *Anal. Biol.* **600**, 113765 (2020).

(3) 本研究会の参加企業・団体名

1. 株式会社フォスラボ, 2. 株式会社ナード研究所, 3. 広島和光株式会社



競輪の補助事業

この事業は、競輪の補助を受けて実施しました。

<https://www.jka-cycle.jp/>