

# 微生物代謝産物からの新たな作用機序を有する生物活性物質の探索

感染制御科学専攻 創薬科学履修コース 細胞機能制御科学

DI-13003 須賀拓弥

【背景】 世界保健機関では人類に対する 3 つの脅威の内、薬剤耐性菌をその 1 つとして挙げている。薬剤耐性菌は世界に拡散する一方で、それらを抑制する画期的な手段は未だに開発されていない。化学療法薬の開発は、人々の生活の質を向上させ、幸福をもたらした。しかし、現在では、新薬の開発どころか既存薬が効果を示さない薬剤耐性菌の出現が問題となっている。これら薬剤耐性菌に対抗すべく既存薬を一部変換したものが臨床現場では用いられているが、根本的な解決には至っていない。

このような状況の中で、「新たな機構を持つ薬剤」、「薬剤耐性機構を克服する薬剤」や「病原性発現・感染機構を阻害する薬剤」という 3 つのコンセプトに着目して探索研究を行ってきた。現在、臨床現場で求められる化学療法薬は「病原菌を殺滅する薬剤」であり、最も効果的に治療できる薬だということが、歴史から証明されている。しかし、こうした薬は耐性菌を蔓延らせ、現在我々の脅威となっている。だからといって、化学療法薬なしの生活に戻すことは到底できない。「新たな機構を持つ薬剤」では、新たな薬剤標的に作用する薬剤を見出すことで、使用する薬剤に幅を持たせることができ、「薬剤耐性機構を克服する薬剤」では、無効になった薬剤と併用することで効果を復活させることができ、「病原性発現・感染機構を阻害する薬剤」では菌を殺すことなく菌を無毒化することができると考えられた。

そこで私は、

1. 「新たな機構を持つ薬剤」として「害虫 ADP/ATP 輸送体組換え出芽酵母に対する生育阻害物質の探索」
2. 「薬剤耐性機構を克服する薬剤」として「MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索」
3. 「病原性発現・感染機構を阻害する薬剤」として「3 型分泌装置阻害物質の探索」

を行うとともに、探索研究によって発見された活性物質の作用機構解析として

4. 「3 型分泌装置阻害物質 aurodox の標的タンパク質の同定」

を加えた全部で 4 つのテーマについて研究を行った。以下にその背景、方法およびに結果を示す。

1. 害虫 ADP/ATP 輸送体組換え出芽酵母に対する生育阻害物質の探索

【背景・目的】 農業害虫の ATP は主にミトコンドリアにおいて産生され、生

命活動の維持に必要なエネルギー源である。そのため、ヒトとの選択毒性の観点から、ミトコンドリアの ATP 産生を抑制するこれら農業害虫の殺虫剤の実用化は難しいと考えられてきた。しかし、近年ミトコンドリア機能を阻害する農薬も上市され、安全性の面からも十分に実用化できることが証明されている。また、ミトコンドリアの複合体 I を作用点とする殺ダニ剤は、ダニ以外の害虫にも有効であることから、化学構造次第では新たな活性や特性を付与した殺害虫剤のリード化合物の創出が期待できると考えられ、これまでミトコンドリアの電子伝達系を標的とした薬剤開発が行われてきた。電子伝達系以外のターゲットとして新たな標的分子をミトコンドリア内膜に局在する ADP/ATP 輸送体 (AAC) に定めて研究を開始した。害虫の生命維持に必須な ATP 輸送を担う AAC の機能を選択的に阻害することができれば、新しいタイプの殺害虫剤のリード化合物になると期待できる。以上のことを踏まえ、殺害虫剤開発の出発点であるリード化合物となりうる天然物リガンドを微生物二次代謝産物から単離・精製および構造解析して、その天然物リガンドの生物活性を評価した。

【方法】 害虫（エンドウヒゲナガアブラムシ、コクヌストモドキ）の AAC をミトコンドリア内膜で機能発現させた組換え出芽酵母を用いた。これら出芽酵母株を用いて、害虫の AAC 機能を選択的に阻害し阻止円を形成させる微生物培養液サンプルをペーパーディスク法により選抜し、活性物質の精製を行った。

【結果】 4,380 サンプルの糸状菌および放線菌の微生物培養液から、優先的に害虫 AAC 発現株に阻止円を形成する微生物培養液を見出した。活性物質を取得するために、*Trichoderma brevicompactum* FKI-6324 株および *Aspergillus flaszentraegeri* FKI-6682 株を培養後、各種クロマトグラフィーおよび各種機器分析の測定から、FKI-6324 株培養液より新規 peptaibol 類縁体として FKI-6324A 物質 (4.6 mg) を、FKI-6682 株培養液より新規 sterol 系物質 FKI-6682A 物質 (15.0 mg) を単離・構造決定し、生物活性を評価した。これら化合物は害虫 AAC 発現出芽酵母に対して 1 µg/disc においても阻止円を形成し、FKI-6324A 物質では 10 µg/disc で AAC 非発現株に阻止円を形成し、FKI-6682A 物質においては 100 µg/disc においても AAC 非発現株に阻止円を形成しなかった。このことから、10 倍および 100 倍の選択性があることがわかった。

## 2. MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索

【背景・目的】 アミノグリコシド系抗生物質アルベカシン (ABK) は、薬剤耐性菌にも有効であるため MRSA に対して用いられてきたが、ABK 耐性 MRSA も出現しており、使用範囲が限定されるようになってきた。MRSA の主な ABK 耐性機構は、修飾酵素である二機能酵素による ABK のアセチル化およびリン酸化と考えられている。この二機能酵素を阻害することができれば、ABK 耐性を

克服できることが期待される。そこで、微生物代謝産物からの MRSA に対する ABK 耐性克服活性物質の探索を行った。

【方法】 活性評価はペーパーディスク法により行い、試験菌として ABK 耐性 MRSA を用いた。菌の増殖に影響を与えない濃度の ABK を含有した寒天培地と ABK 非含有寒天培地にそれぞれペーパーディスクを置いて培養し、ABK 含有培地で阻止円径が大きいものを選択した。

【結果】 前任者によって見出された *Paraphaeosphaeria* sp. TR-022 株培養液について各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行った結果、既知化合物 berklesmin A と新規化合物 TR-022A および TR-022B 物質を活性物質として単離した。ABK 含有非含有培地において、berklesmin A をペーパーディスク上で評価した。ABK 非含有培地では 30 µg で 11 mm の阻止円径を示すのに対し、ABK 含有培地では 0.3 µg で同一の阻止円径を示した。このことから、berklesmin A は ABK の活性を 100 倍高めることが分かった。また、新規物質 2 種にも有意な選択性が確認された。

### 3.3 型分泌装置阻害物質の探索

【背景・目的】 細菌感染症治療薬において、殺菌的もしくは静菌的に起因菌の生存に影響して効果を示す抗菌薬を用いる限り、「薬剤耐性菌の出現」、「毒素の大量放出」、「正常細菌叢の攪乱」などの問題を避けることは困難である。

これらの問題を克服するため、本研究ではサルモネラ属細菌、ボルデテラ属細菌（百日咳起因菌）、緑膿菌、赤痢菌、腸管病原性大腸菌（Enteropathogenic *Escherichia coli* : EPEC）および血清型 O-157 に代表される腸管出血性大腸菌など多くのグラム陰性病原菌が高度に保存している 3 型分泌装置（Type III secretion system : T3SS）に着目した。この T3SS は病原菌が宿主へ感染する際にエフェクタータンパク質を宿主細胞内へと挿入させる装置として機能するため、病原性発揮に必須であるが病原菌の生存には必須ではないことがわかっている。したがって、T3SS 阻害剤は病原菌の生存に影響を与えず、感染過程のみを阻害する新しい作用メカニズムの抗感染症薬になることが期待される。そこで微生物培養液より T3SS 阻害物質の探索を行った。

【方法】 T3SS を有する病原菌を赤血球と接触させると、溶血が引き起こされることが報告されており、この特性を利用して T3SS 阻害活性を評価した。T3SS を保持するが弱毒株である EPEC E2348/69  $\Delta cesT$  株を、微生物培養液およびヒツジ赤血球をサンプル存在下、37°C、1.5 時間培養し赤血球の溶血反応を起こさせた。溶血活性は培養上清に溶出するヘモグロビンを OD<sub>550</sub> の吸光度で測定し、溶血阻害率を算出した。溶血阻害活性を有する培養液については抗菌活性試験を行い、溶血阻害活性と抗菌活性に開きがある培養液を選択した。

【結果】 放線菌および糸状菌培養液 10,093 サンプルスクリーニングした結果、優先的に 3 型分泌装置を阻害する 3 サンプルを見出した。特に活性が強く、また選択性に優れた K14-0012 株を培養し、その培養液から guadinomine 新規類縁体と期待される K14-0012A および B 物質を取得した。K14-0012A 物質は極めて低い濃度で溶血反応を阻害したが、その 100 倍高い濃度でも菌の増殖を抑制しなかった。K14-0012B 物質も A 物質と同程度の溶血反応阻害活性を示し、その 50 倍高い濃度でも菌の増殖に影響を与えなかった。

#### 4. 3 型分泌装置阻害物質 aurodox の標的タンパク質の同定

【背景・目的】 以前に、当研究室にて探索研究が行われた。その結果、aurodox が EPEC の溶血反応阻害物質として発見された。Aurodox の溶血反応阻害活性 ( $IC_{50}$ : 1.2  $\mu$ g/mL) と抗菌活性 ( $IC_{50}$ : 40  $\mu$ g/mL) の間に 33 倍の選択性が確認された。また、EPEC のマウスモデルである *Citrobacter rodentium* を用いたマウス感染実験において、tetracycline より 8 倍低い濃度で治療効果を示した。Aurodox は elongation factor Tu (EF-Tu) に作用してタンパク質合成を阻害することにより抗菌活性を示すと言われているが、T3SS に関与する報告は未だない。そこで、aurodox がどのようなタンパク質に関与し溶血反応を阻害しているかを、明らかにすることを目的とした。

【方法】 関与しているタンパク質を推定するために、開裂型 photo-cross-linker を用い、EPEC の菌溶解液から pull-down を行った。Aurodox-beads 特異的に結合してきたタンパク質について MALDI-TOF/MS 解析およびタンパク質発現・相対定量解析を行った。同定されたタンパク質をコードする遺伝子を knock-out することで、溶血活性に影響を与えているか判断した。また、knock-out した遺伝子の相補実験も行った。

【結果】 2 種類のタンパク質解析方法で aurodox-beads 特異的に結合するタンパク質として、adenylosuccinate synthetase (*purA*)、isocitrate dehydrogenase および EF-Tu が同定された。スーサイドベクターを用いて *purA* を knock-out したところ、溶血活性が消失した。また相補実験を行ったところ、溶血反応が回復したことから、*purA* が溶血反応に関わる 1 つの因子であることが示唆された。

【総括】 3 種類の探索研究を行い、新規物質と推定される化合物も含め新規物質を 6 物質、既知物質を 1 物質得た。これら活性物質は従来とは異なる方法で取得されていることから、新たな創薬研究のリード化合物となることが期待される。また、作用機構解析では、T3SS とは関係がないと考えられてきた 1 次代謝経路の酵素が同定された。このことから本酵素を標的とした新たなスクリーニング系も構築できると考えている。