

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13903
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K07857
研究課題名(和文) 薬剤耐性菌を克服する抗菌オリゴ糖の基盤構築

研究課題名(英文) Studies of antimicrobial oligosaccharides

研究代表者

山村 初雄 (Yamamura, Hatsuo)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80220440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌剤に対する耐性菌の出現と蔓延は世界的問題である。ここでは細菌膜を傷害して抗菌性を示すオリゴ糖の構造と活性の関係を調べ、その優れた特徴を理解する基礎研究を行った。どのような構造が大事かを調べるために、種々の膜傷害基を備え付けた物質を系統的に合成し、細菌への作用を調べてどのような活性を現すかを検証し、細菌膜への作用を調べてどのように膜を壊しているかを明らかにした。以上を通じて、抗菌オリゴ糖の構造と活性の関係を明らかにすることで、細菌に対抗する物質へと展開する研究基盤を構築できた。

研究成果の概要(英文)：Novel antibiotics have been highly demanded because of emergence of drug-resistant bacteria. Here we investigated membrane-active antimicrobial oligosaccharide cyclodextrins. These possess functional groups to permeabilize bacterial cell membranes. The polyfunctionalization of sugars was achieved through a microwave-assisted click reaction. A survey using the derivatives with systematically varied functionalities clarified the unique correlation of the antimicrobial activity of these compounds with their structures. The dependence of number of functional groups in the molecule demonstrates that the assembly of the groups is necessary for expressing antimicrobial activity. The compounds having selective toxicity against bacteria including multidrug-resistant pathogens were observed. The results demonstrate that the sugar is a versatile molecular scaffold for rationally designed structures and can be used for the development of new antibiotics.

研究分野：有機化学、生物有機化学、シクロデキストリン化学

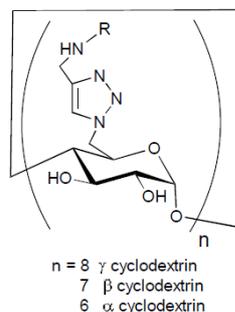
キーワード：抗菌 抗生物質 シクロデキストリン クリック反応

1. 研究開始当初の背景

抗菌剤に対する耐性菌の出現と蔓延は世界的問題である。従来の抗菌剤は細菌内部の生命維持機構を破壊し、これに対して細菌は耐性を獲得する。そこで注目されているのが、外から細菌の膜を傷害する天然抗菌ペプチドである。例えば、グラミシジン S は 1 ナノメートルの環状ペプチドであり、そのアミノ基が細菌膜脂質のリン酸に、疎水基が脂質アシル部に作用して膜を傷害する。そこから、他の環状分子に両方の官能基を備え付ければペプチド様の抗菌性が発現すると構想した。そこで 1 ナノメートルの直径を持つ環状糖質シクロデキストリンに着目し、誘導体を合成した。これは、単一のアルキルアミノ基を持つグルコースのオリゴマーであり、ペプチドに比べれば驚くほど単純な構造である。にも関わらず、効果的に細菌膜を傷害した(引用文献 1)。その抗菌性は医薬品として認可されている抗菌ペプチドに匹敵し、着想の正しさが実証できた。そこで、目的官能基を、マイクロ波加熱を用いることで分単位の反応時間で収率 80% 以上の高効率で導入する方法を開発した(引用文献 2)。これにより得た炭素数が 4 ~ 6 の環状構造を含むアルキルアミノ基を持つシクロデキストリンは細菌に対して強い抗菌性を示した。また、天然ペプチドの多くが動物細胞膜も同じく傷害するのに対し、細菌に選択的な物質も見出した(引用文献 3)。さらにメチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA)の発育を ppm 濃度で阻止できるものがあることも見出した。

2. 研究の目的

このように抗菌シクロデキストリンが薬剤耐性菌を含む細菌に優れた抗菌性を現す可能性が明らかになりつつある今、本研究でさらに研究展開をし、いまだ解明されていない点の基礎研究を進める研究を行った。対象とするシクロデキストリン誘導体の構造は以下の様であり、これについて具体的には下記を期間内に明らかにすることを目的とした。



(1) アルキルアミノ基のアルキル部の構造が異なるシクロデキストリンを系統的に合成し、どのような構造が抗菌性を示すかを明らかにする。

(2) シクロデキストリン上のアルキルアミノ基の数が抗菌性にどう関わるかを明らかにする。これには構成するグルコースの数が異なる、シクロデキストリンを原料に、アルキル

アミノ基の数が 6 ~ 8 個と異なる物質を合成する。

(3) どの細菌に対して、どれほど有効であるかを明らかにする。一般の薬剤感受性細菌だけでなく、さらに薬剤耐性を持つ細菌についても抗菌性を調べる。

(4) 赤血球の溶血性を調べて、動物細胞膜の傷害性を明らかにし、(3) と関連させて、どのような構造が細菌への選択毒性を示すかを明らかにする。

(5) 膜傷害・抗菌が、どのように起こっているかを、蛍光色素をプローブとして調べる。

(6) 複数のアルキルアミノ基を環状に立体配置することが必須なのかを明らかにする。これにはシクロデキストリンと同じ数のアルキルアミノ基を持つ物質を、直鎖オリゴ糖を原料に合成して調べる。関連してグルコース、マルトースを原料にアルキルアミノ基数の少ない物質も調べる。

(7) 加えて、アルキルアミノ基をさらに集積した効果を期待して、シクロデキストリンの 10 倍以上の膜傷害基を分子内に有する物質を、多糖アミロースを原料に研究する。

3. 研究の方法

(1) 種々のアルキルアミノ基を導入したシクロデキストリンを合成した。まず、ハロアルカンと Boc 保護プロパルギルアミンとの反応によって該当するアルキル基を持つアルキンを合成した。これと 6 - アジ化シクロデキストリン 2, 3 - ジアセテートとのマイクロ波支援クリック反応、引き続き保護基の脱保護によって目的とする、およびシクロデキストリン誘導体を得た。

(2) 合成した、およびシクロデキストリン誘導体の細菌に対する最小発育阻止濃度を測定した。用いた細菌は、薬剤感受性実験株であるグラム陽性菌の、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、*Bacillus subtilis* (枯草菌)、グラム陰性菌の *Escherichia coli* (大腸菌)、*Salmonella Typhimurium* (ネズミチフス菌)、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) であった。また、臨床分離株である薬剤耐性菌として、MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)、*Enterococcus faecium*、*Enterococcus faecalis*、VRE (バンコマイシン耐性腸球菌)、*Streptococcus agalactiae* (クリンダマイシン耐性 B 型連鎖球菌) を使用した。

(3) 溶血試験ではウサギ赤血球の膜傷害を漏出するヘモグロビンの吸光度を測定して定量した。100% 溶血にはリゾレシチン (50 μ M) を使用した。また、細菌膜傷害についてグラム陽性菌 (*S. aureus*) の膜電位変化を蛍光色素 (Disc3(5)) を活用して調べた。

(4) シクロデキストリンと同じ 8 個のアルキルアミノ基を持つ直鎖のマルトオリゴ糖、1 個のみのアルキルアミノ基を持つグルコース、

および2個のアルキルアミノ基を持つマルトースの誘導体、加えて、直鎖アミロースを原料に90個あるいは1000個程度のアルキルアミノ基が集積した高分子を合成し、その細菌に対する最小発育阻止濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 種々のアルキルアミノ基を持つ、およびシクロデキストリン誘導体の合成
予備実験より、抗菌性はアルキルアミノ基に依存することが判っている。炭素数、そして直鎖、分枝、環状、および芳香族環の有無などの構造と活性の関係を明らかにするために、炭素数4~10から成るアルキル部を含むアルキルアミノ基を系統的に導入したシクロデキストリンを用意した。まず各アルキルアミノ基を組み込んだアルキンを、ハロアルカンを使用した該当するアミンのアルキル化によって合成した。得られたアルキンをアジ化シクロデキストリンとマイクロ波加熱によって反応させて、8,7, または6個の膜傷害基を分子上に備え付けた、またはシクロデキストリン誘導体を合成した。

(2) 抗菌性と溶血性

合成した、およびシクロデキストリン誘導体の抗菌性を調べるために、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する最小発育阻止濃度を測定した。炭素数4~10から成るアルキル部を含むアルキルアミノ基を導入した22種類のシクロデキストリン誘導体について、グラム陽性菌である*S. aureus*に対して最小発育阻止濃度が16 µg/ml以下の高い抗菌性を示すものは15種、*B. subtilis*に対しては14種、グラム陰性菌である*E. coli*に対しては4種、*S. Typhimurium*に対しては1種、*P. aeruginosa*に対しては2種であった。18種類のシクロデキストリン誘導体については、グラム陽性菌である*S. aureus*に対して最小発育阻止濃度が16 µg/ml以下の高い抗菌性を示すものは12種、*B. subtilis*に対しては10種、グラム陰性菌である*E. coli*に対しては2種、*S. Typhimurium*に対しては見られず、*P. aeruginosa*に対しては1種であった。そして、12種類のシクロデキストリン誘導体について、グラム陽性菌である*S. aureus*に対して最小発育阻止濃度が16 µg/ml以下の高い抗菌性を示すものは9種、*B. subtilis*に対しては7種、グラム陰性菌である*E. coli*に対しては3種、*S. Typhimurium*に対しては見られず、*P. aeruginosa*に対しては1種であった。この結果からシクロデキストリン誘導体はグラム陰性菌よりグラム陽性菌に強い抗菌性を示す選択性があることが分かった。またアルキル基の炭素数が5~7のものが良い抗菌性を示し、そこには直鎖、環状、分枝構造の違いはないと示唆された。

さらに薬剤耐性菌に関する最小発育阻止濃度を測定した。使用した薬剤耐性菌はいずれも臨床分離株であり、それらの抗生物質に対する耐

性について、MRSAはarbekacin、levofloxacin、gentamicin、clindamycinに顕著な耐性を示し、*E. faecium*のerythromycin、gentamicin、kanamycin、streptomycinに対する最小発育阻止濃度はそれぞれ>128、>256、>256、256 µg/ml、*E. faecalis*のminocycline、gentamicin、kanamycin、streptomycinに対する最小発育阻止濃度はそれぞれ32、16、32、64 µg/ml、VREのampicillin、vancomycin、erythromycin、ciprofloxacin、gentamicin、kanamycinに対する最小発育阻止濃度はそれぞれ128、>128、>128、128、>256、>256 µg/ml、そして*S. agalactiae*のerythromycin、clindamycinに対する最小発育阻止濃度はそれぞれ>128、128 µg/mlであった。このような薬剤耐性菌に対して、合成したシクロデキストリン誘導体の中では、MRSAに対して最小発育阻止濃度が16 µg/ml以下の高い抗菌性を示すものは5種、*E. faecium*に対しては1種、*E. faecalis*およびVREに対しては見られず、*S. agalactiae*に対しては3種であった。シクロデキストリン誘導体では、最小発育阻止濃度が16 µg/ml以下の高い抗菌性を示すものは、MRSA、*E. faecium*、*E. faecalis*およびVREに対しては見られず、*S. agalactiae*に対しては3種であった。シクロデキストリン誘導体では、MRSAに対して最小発育阻止濃度が16 µg/ml以下の高い抗菌性を示すものは見られず、*E. faecium*に対しては1種、*E. faecalis*およびVREに対しては見られず、*S. agalactiae*に対しては5種であった。以上のようにMRSAおよび*S. agalactiae*に対して有効な誘導体が見いだされた。一方、*Enterococcus*に対する抗菌性は比較的弱い傾向が認められた。

次に、溶血性試験を行った。これは赤血球の膜傷害を、漏出するヘモグロビンで定量するもので、血中投与を想定した動物細胞への毒性が評価できる。50 µMのシクロデキストリン誘導体の存在下では、合成したシクロデキストリン誘導体の中で、8種が80%以上の高い溶血性を示し、逆に10%以下の低い溶血性を示すものは9種であった。シクロデキストリン誘導体では4種が80%以上の高い溶血性を示し、10%以下の低い溶血性を示すものは9種、

シクロデキストリン誘導体については4種が80%以上の高い溶血性を示し、10%以下の低い溶血性を示すものは7種であった。以上のように本研究の対象とした誘導体は比較的、溶血性の低いものが多数を占めた。さらに、アルキル基の炭素数が6個以下の誘導体の溶血性が低く、その中では直鎖、環状、分枝構造の違いはないと示唆された。結果としてMRSAに対する抗菌性が高く、溶血性が低いものは、シクロペンチルアミノ基、3-メチルペンチルアミノ基、および*n*-ペンチルアミノ基を導入したシクロデキストリンであることが分かった。およびシクロデキストリンには該当するものはなか

った。一方、*S. agalactiae* に対しては、2 - メチルブチルアミノ基および3 - メチルブチルアミノ基を導入した シクロデキストリン、*n*-ペンチルアミノ基を導入した シクロデキストリン、2 - エチルブチルアミノ基、3 - メチルブチルアミノ基を導入した シクロデキストリンの抗菌性が高く、かつ溶血性が低く、細菌に対する選択毒性を可能にすることが示唆された。今回の系統的な研究により、どのような構造が活性の強さと選択性を実現するのかについて情報を得た。

(3) 細菌膜傷害の蛍光プローブによる研究

(2)で観察した抗菌性が、膜傷害によるものかを調べた。ここでは細胞質膜傷害による細胞膜電位の変化を、細胞質膜のみを持つグラム陽性菌である*S. aureus*で調べた。細胞は内外でプロトンやカリウムイオン等の濃度差を作り出して膜電位を生じさせ、種々の生理活動に利用している。これは細菌も同様であり、シクロデキストリンが細菌膜を傷害すれば内容物が外に漏出し、膜電位を喪失すると考えられる。それを、動物細胞の膜電位観察に使用される蛍光色素(Disc3(5))を使用して検出した。その結果を図1に示す。

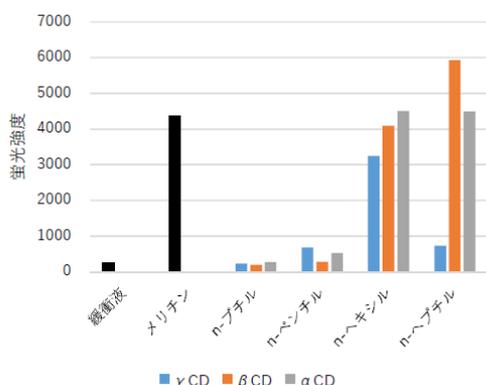


図1. Disc3(5)の蛍光による細菌膜電位の変化(シクロデキストリン及びメリチンの濃度; 1 μM)

これにより直鎖のアシルアミノ基(炭素数4~7)を持つシクロデキストリンについては、*n*-ヘキシルアミノ基を持つ誘導体はいずれも、*n*-ヘプチル基を持つものは、シクロデキストリンを除き、強い脱分極を示すことがわかった。その程度は、細孔形成により細菌膜を傷害することが知られているペプチドのメリチンと同程度であった。また、その変化は数分以内の急速な変化であった。これらはシクロデキストリンが膜傷害により脱分極を引き起こし、かつ、それは膜に細孔を形成する機構による傷害であることを示唆する。一方で、最小発育阻止濃度が小さいにも関わらず蛍光変化の小さなものがあつた。これは膜に作用する速度が比較的遅く短時間では大きな脱分極を示さないが、長時間の作用では結果として増殖抑制するため

と考えられる。

(4) マルトオリゴ糖、グルコースおよびアミロース誘導体

シクロデキストリンが抗菌性を持つ理由として、複数の膜傷害基を環状に配置することが必須なのかを明らかにするためにシクロデキストリンと同じ数のアシルアミノ基を持つ物質を、直鎖のマルトオリゴ糖を原料に合成した。さらに、シクロデキストリンの構成単位であるグルコースから1個のみのアシルアミノ基を持つ誘導体、および2個のアシルアミノ基を持つマルトースも合成した。また、分子量の異なる2種の直鎖アミロースを原料に90個および1000個程度の膜傷害基が集積した高分子をそれぞれ合成した。アミロースへの官能基導入はマイクロ波加熱により上記シクロデキストリンと同様に高収率であった。これら合成した糖誘導体のグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する最小発育阻止濃度を測定した。その結果、ペンチルアミノ基を1個持つグルコース及び2個持つマルトースの誘導体は、いずれの細菌に対しても抗菌性を示さなかった。一方、8個のペンチルアミノ基を持つマルトオクタオース誘導体は該当するシクロデキストリン誘導体とほぼ同等の優れた抗菌性を示した。より多くのペンチルアミノ基を持つアミロース(残基数約90個)はグラム陽性菌にはマルトオクタオース誘導体とほぼ同等の抗菌性を示したが、グラム陰性菌である大腸菌にはより優れた抗菌性を示した。これにたいして残基数が約1000、すなわち約1000個のペンチルアミノ基を持つアミロースの抗菌性は逆に低下した。このように膜傷害性基の数または分子量に応じて特徴のある抗菌性を示すことは非常に興味深い。

(5) まとめ

抗菌ペプチドは細菌膜脂質と相互作用するアミノ基と疎水基を分子上に巧みに配置して抗菌性を現す。優れた活性を目指す場合、ペプチドを改良するのが王道であるが、アミノ酸置換が立体構造の予期せぬ変化を引き起こし、良い結果が得られない場合も多い。また、ペプチド以外の他の物質での実現は、そう簡単でない。特に、分子上に複数の官能基を備え付ける必要性が実現をより困難にしている。本研究で、これらを解決するのが、剛直な分子構造と反応点となる複数のヒドロキシ基を持つオリゴ糖シクロデキストリンであり、官能基をその望む位置に導入する代表研究者が開発した技術である。特に、マイクロ波を利用した高効率な官能基導入法により、本研究に必要な構造の物質は容易に調製できた。これにより、本研究では「必要な性質を備えれば単純な人工物でも望む抗菌性が現れる」という方法論の有効性を強く示すことができた。ここで合成されたシクロデキストリン誘導体は抗菌剤の優れたリード化合物となると考える。米国疾病対策予防センターは抗菌薬の切り札とされるカルバペネムに耐性を持つ腸内細菌を「悪夢の耐性菌」と呼び、警鐘をならし

た。実際、米国では年間、200万人以上の人々が耐性菌による感染症に苦しみ、そのうち2万人超が死亡している。これは、わが国の胃がん死亡者数(女性)を上回る。わが国への侵入は水際で食い止められてはいるが、この実情に基づき、わが国でも警鐘がなされている。このような社会ニーズに基づいて応用も視野に入れつつ、大学の研究室の自由な発想を活かした本研究は特色あるものになったと考える。

<引用文献>

Hatsuo Yamamura, Ken Suzuki, Kazuma Uchibori, Atsushi Miyagawa, Masao Kawai, Chie Ohmizo, Takashi Katsu, Mimicking an antimicrobial peptide polymyxin B by use of cyclodextrin, Chemical Communications, 2012, 48, 892-894

Hatsuo Yamamura, Kyohei Shimohara, Ryuji Kurata, Yusuke Fujita, Kensuke Murata, Takaaki Hayashi, Atsushi Miyagawa, Unique, fast, and all-or-none click reaction on cyclodextrin and amylose, Chemistry Letters, 2013, 42, 643-645.

Hatsuo Yamamura, Yuuki Sugiyama, Kensuke Murata, Takanori Yokoi, Ryuji Kurata, Atsushi Miyagawa, Kenji Sakamoto, Keiko Komagoe, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, Synthesis of antimicrobial cyclodextrins bearing polyarylamino and polyalkylamino groups via click chemistry for bacterial membrane disruption, Chemical Communications, 2014, 50, 5444-5446

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Hatsuo Yamamura, Miho Nonaka, Shingo Okuno, Ryogo Mitsuhashi, Hisato Kato, Takashi Katsu, Kazufumi Masuda, Koichi Tanimoto, Haruyoshi Tomita, Atsushi Miyagawa, Membrane-active antimicrobial poly(amino-modified alkyl) -cyclodextrins synthesized via click reactions, MedChemComm, 2018, 9, 509-518
DOI: 10.1039/C7MD00592J

Hatsuo Yamamura, Takahiro Mabuchi, Tomoki Ishida, Atsushi Miyagawa, Syntheses and structure-membrane active antimicrobial activity relationship of alkylamino-modified glucose, maltooligosaccharide, and

amylose, Chemical Biology & Drug Design, 2017, 90, 1012-1018
DOI: 10.1111/cbdd.12989

[学会発表](計5件)

— 山村初雄, 谷本弘一, 富田治芳
細菌膜傷害性オリゴ糖の開発研究、第9回日本感染症学会学術講演会 第66回日本化学療法学会総会 合同学会、2018年

— 山村初雄, 馬淵貴浩, 石田智基, 林勇磨, 宮川淳、抗菌オリゴ糖およびアミロースのクリック反応による合成と構造 活性相関、第33回シクロデキストリンシンポジウム、2017年

山村初雄, 石田智基, 野中美帆, 宮川淳、細菌膜傷害による抗菌性 -シクロデキストリン誘導体のクリック反応による合成、構造および活性の相関、日本化学会第97春季年会 2017年

野中美帆, 石田智基, 宮川淳, 山村初雄、アルキルアミノ基を導入した抗菌 -シクロデキストリン、第33回シクロデキストリンシンポジウム、2016年

萩原達也, 林勇磨, 野中美帆, 石田智基, 宮川淳, 山村初雄、アルキルアミノ基を導入した抗菌 -シクロデキストリン誘導体、第33回シクロデキストリンシンポジウム、2016年

6. 研究組織

(1)研究代表者

山村 初雄 (YAMAMURA, Hatsuo)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 80220440

(2)連携研究者

宮川 淳 (MIYAGAWA, Atsushi)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 60469921