

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07867

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーを基盤とした抗感染症剤の創製

研究課題名(英文)Discovery of new anti-infectives based on chemical biology

研究代表者

小山 信裕 (Koyama, Nobuhiro)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：60439156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1) 抗酸菌感染症の原因菌や関連菌に対して抗菌活性を示す新規化合物として、放線菌の培養液中より、14員環マクロラクタムを基本骨格とするKM17-28物質及び四環性キノン構造を有するOPMA02852物質を発見した。2) 抗MRSA剤stemphone類及び抗真菌剤tanzawaic acid類の作用機序について研究し、stemphone類がMRSAの細胞壁合成に関わるFemAに作用すること、またtanzawaic acid類の標的候補タンパク質として、真菌のlysineの生合成に関わるhomoisocitrate dehydrogenaseを同定した。

研究成果の概要(英文)：1) In the course of screening program of microbial origins, we discovered new macrolactam and anthraquinone compounds that exhibit antimycobacterial activity against *M. bovis* BCG, *M. avium* and *M. intracellulare*. 2) We studied the mechanism of action of microbial small compounds with unique chemical structure and biological activity. We found that stemphone is bound to FemA, leading to the inhibition of the enzymatic activity of FemA. Furthermore, we searched for binding proteins of tanzawaic acid in the lysate of *R. oryzae* and identified homoisocitrate dehydrogenase as a potential target protein.

研究分野：天然物化学

キーワード：ケミカルバイオロジー 抗感染症剤 MRSA 結核症 MAC症 真菌症

1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤耐性菌や多剤耐性菌は社会問題となっており、耐性菌に対して有効な薬剤や新たな創薬ターゲットの発見が求められている。このような中、研究代表者のグループでは、微生物を用いた特殊な評価系を駆使して、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や結核症に対して有効な新たな微生物由来化合物の開拓を積極的に進めてきた。その過程で、次にあげる 2 つの評価系より、構造的にも活性的にも大きな特色をもつ数種の化合物を発見してきた。1) 既存医薬品 (β -ラクタム薬) の抗 MRSA 活性を増強する化合物を検索し、stemphone 類や cyslabdan を発見した (図 1)。これらは、臨床で重要な imipenem の抗 MRSA 活性を 500-1000 倍まで劇的に増強する。さらに、cyslabdan については、その作用点を細胞壁合成のペントグリシン形成に関わる FemA と特定し、その機能阻害により imipenem 活性増強作用を発揮することを明らかにした。一方、stemphone 類の活性を引き起こす機序については未だ不明な点が多い。2) 抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* の生育を選択的に阻害する物質を検索するという新しいアイデアから真菌由来の calpinactam を発見した (図 2)。本化合物は、結核菌 *M. tuberculosis* に対しても活性を示し、既存薬とは違う機序で脂肪酸やミコール酸の生合成を特異的に阻害することを明らかにした。本化合物の活性発現に関わる責任分子 (標的分子) についての知見は少なく、その同定によって結核の新たな薬剤標的の提供に繋がることが期待される。

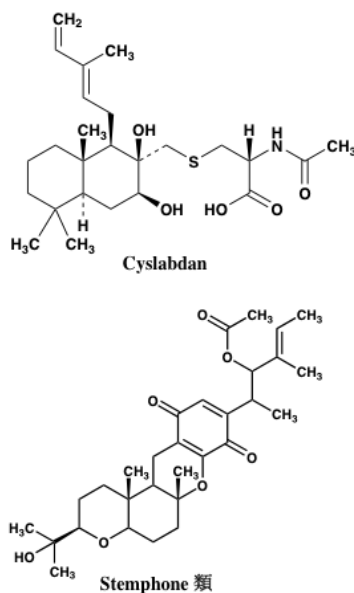
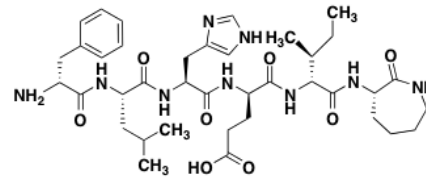


図 1 微生物由来の抗 MRSA 剤の構造



Calpinactam

図 2 微生物由来の抗結核剤の構造

2. 研究の目的

(1) Stemphone 類および calpinactam について、それぞれの病原性あるいは関連する微生物 (MRSA や *M. smegmatis*) を材料に、生化学的・分子遺伝学的手法を駆使して、これら化合物の標的分子の解明を目指す。

(2) これまでに確立した数種の評価系を利用して、社会問題となっている結核やマックに対する新たな抗感染症剤を微生物資源より探索する。

3. 研究の方法

(1) 新しい抗感染症剤の探索

結核菌の関連菌 *M. bovis* BCG の他、マック症の原因菌である *M. avium* や *M. intracellulare* を検定菌に用いて、その他のグラム陽性細菌・陰性細菌に対する抗菌活性を総合的に判断し、抗酸菌に対して選択的な抗菌活性を示すサンプルを、放線菌や真菌由来の微生物培養抽出液ライブラリーより検索した。その際に、有望なサンプルを効率的に絞り込むために、MS ネットワーク手法を利用した (図 3)。

(2) 微生物由来抗感染症剤の作用機序の解析

抗 MRSA 剤 stemphone 類

黄色ブドウ球菌 *S. aureus* FDA209P 由来の組み換え FemA タンパク質を材料に、酵素アッセイを用いて、化合物の FemA に対する影響を調べた (Bonn 大学との共同研究)。また、化合物の FemA に対する結合量は、ゲル濾過スピンカラムと HPLC を組み合わせた方法で定量した。さらに、cyslabdan を用いた競合実験により、FemA への結合様式についても解析した。

抗結核剤 calpinactam

光親和性標識を利用して、calpinactam の固定化ビーズを作製し、次いで抗酸菌 *M. smegmatis* のタンパク抽出液の中より、化合物と親和性を有するタンパク質を検索した。

抗接合菌剤 tanzawaic acid 類

Tanzawaic acid B のピオチン標識体を作製し、次いで、アビジンビーズを用いて、接合菌 *R. oryzae* のタンパク抽出液の中より、化合物と親和性を有するタンパク質を検索した。

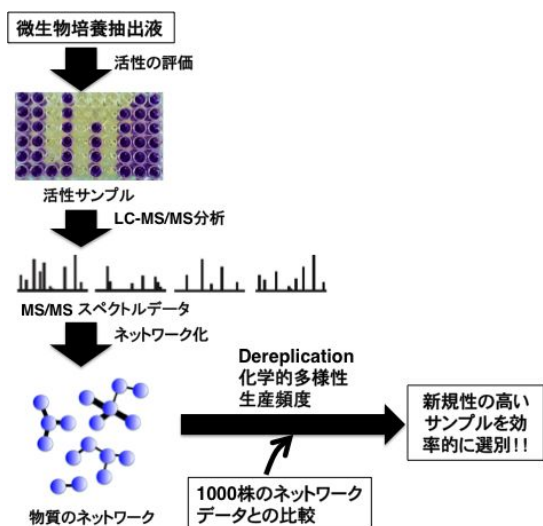


図3 MS ネットワーク手法を活用したスクリーニング戦略

4. 研究成果

(1) 新しい抗感染症剤の探索

抗結核剤及び抗マック剤

放線菌や真菌を含む微生物培養抽出液を対象にスクリーニングを実施し、抗結核活性を示すサンプルとして、海洋由来放線菌 KM17-28 株を選択した。次いで、本菌株の培養液中より、各種クロマトグラフィーを駆使して活性物質を単離精製し、各種機器分析の結果、本化合物 KM17-28 は、マクロラクタム系の新規構造を有することを明らかとし、新規 fluvirucin 類であることを見出した(図4)。微量液体希釈法に従って、本化合物の *M. bovis* BCG に対する抗菌活性を評価した結果、その MIC 値は、3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。当研究室で保有するその他抗酸菌についても同様に活性を評価した結果、*M. avium*、*M. intracellulare* 及び *M. smegmatis* に対する MIC 値は、それぞれ 12.5、6.25 及び 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。

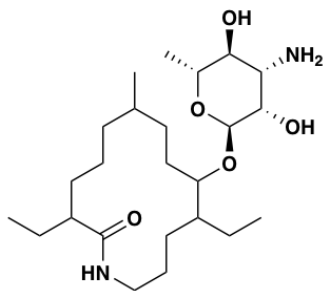
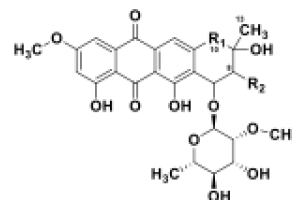


図4 KM17-28 物質の構造

また、抗マック活性を示すサンプルとして、海洋由来放線菌 OPMA02852 株を選択した。次いで、本菌株の培養液中より活性物質を単離精製し、四環性キノン構造を基本骨格とする新規 steffimycin (OPMA02852 物質) を発見した(図5)。この他、既知関連物質として、steffimycin 類 3 成分を見出した。新規 steffimycin の抗マック活性を評価した結果、*M. intracellulare* に対する MIC 値は、6.25

$\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。また、ヒト由来の HeLa 細胞を用いて細胞毒性を評価した結果、その IC_{50} 値は、76.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と測定され、抗マック活性と約 10 倍程度の選択性を示すことが分かった。

さらに、抗マック剤のスクリーニングにおいて、MS ネットワーク手法を用いた絞り込みにより、希少性の高い物質生産菌として、海洋由来放線菌 OPMA40551 株を選択した。



| | R ₁ | R ₂ |
|---------------------------|----------------|-------------------|
| OPMA02852 物質 | | -H |
| Steffimycin | | -OCH ₃ |
| 10-Dihydrosteffimycin | | -OCH ₃ |
| 8-Demethoxysteffermicycin | | -H |

図5 Steffimycin 類の構造

(2) 微生物由来抗感染症剤の作用機序の解析

抗 MRSA 剤 stemphone 類

放射標識体である [³H]グリシンを用いて、FemA の monoglycyl lipid II から triglycyl lipid II への酵素反応に対する影響を調べた結果、stemphone C は、cyslabdan と同程度の酵素阻害活性を示したのに対し、非活性型 stemphone C1c による阻害は確認されなかった。また、stemphone C の FemA への結合量は、1 分子当たり 1.7 分子と概算された。さらに、biotinylcyslabdan の固定化ビーズを用いて、pull down assay により競合実験を行った結果、cyslabdan は、FemA と biotinylcyslabdan との結合を阻害したのに対し、stemphone C は、FemA と biotinylcyslabdan との結合に影響しなかった。従って、stemphone C は、cyslabdan とは異なる部位に結合して FemA 酵素阻害作用を示すと予想された。

抗結核剤 calpinactam

これまでの研究により、calpinactam の各アミノ酸残基をアラニン置換した合成誘導体がいずれも活性消失すること、また N 末端のフェニルアラニン残基のアミノ基の修飾やグルタミン酸残基のカルボキシル基の修飾によって活性が消失することから、次のような光親和性標識によるランダムな化合物の樹脂への固定化を検討することにした。すなわち、ジアジリン基とリンカーをもつ光親和性標識体を固定化したビーズを作製し、続いて、UV 照射(波長 360 nm)することにより、

calpinactam を樹脂に固定化した。これを用いて、*M. smegmatis* タンパク抽出液を材料に結合タンパク質を解析した結果、数種のバンド（約 20, 37, 100 kDa 付近）を確認した。これらのバンドを切り出し、定法に従い、ゲル内トリプシン消化により得られるペプチド断片を LC-MS/MS 解析した結果、それぞれ、Porin、30S ribosomal protein 及び ClpC/mecB と同定した。今後は、これらタンパク質のうち、脂肪酸合成への関与の可能性のある Proin を中心に、標的分子としての妥当性について評価を進める予定である。

抗接合菌剤 tanzawaic acid 類

当研究室の抗真菌剤の探索研究で新たに見出された真菌由来の tanzawaic acid 類は、接合菌 *Rhizopus oryzae* に対して選択的な抗真菌スペクトルを有する興味深い化合物である。また、カイコ評価系でも活性を示すことから生体内での有効性が期待される。そこで本研究では、tanzawaic acid 類について、その結合タンパク質の解析を行った。まず、tanzawaic acid B の側鎖カルボキシル基に着目し、polyethylene glycol をリンカーとする biotin 化体を合成した。この biotin 化体が活性を保持していたことから、続いて、これをアビジンビーズに固定化した後、結合タンパク質の解析に用いた。その結果、*R. oryzae* タンパク抽出液の中より、biotin 化体の存在下でのみ再現性良く検出される 3 種のバンド（約 100 kDa 付近に 2 種及び 43 kDa 付近に 1 種）を確認した。これらのバンドについて、LC-MS/MS 解析を行った結果、それぞれ、homocitrate dehydrogenase、ferrioxamine binding cell surface proteins 及び transportin-1 と同定した。これらのうち、homocitrate dehydrogenase のみが生育に必須であることが報告されており、真菌の lysine の生合成に関わるタンパク質であった。そこで、次に、lysine の培地添加による tanzawaic acid B の抗 *R. oryzae* 活性に対する影響を調べることにした。その結果、lysine 濃度依存的に、tanzawaic acid の活性が減弱し、5 mM lysine 添加条件下では活性がほとんど消失することが確かめられた。これに対し、エルゴステロール作用剤 amphotericin B では、10 mM lysine 添加条件下においてもそのような影響は観測されなかった。従って、ひとつの可能性として、tanzawaic acid 類は、lysine 代謝に影響し、その生合成を阻害することで、*R. oryzae* の生育を阻止している可能性が想定された。今後、本タンパク質の酵素活性についても影響するか解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 7 件) 全て査読有り

Tominaga T, Uchida R, Koyama N, Tomoda H. Anti-Rhizopus activity of tanzawaic acids

produced by the hot spring-derived fungus *Penicillium* sp. BF-0005. J Antibiot, in press. doi: 10.1038/s41429-018-0049-8

Nguyen DD, Melnik AV, Koyama N, Lu X, Schorn M, Fang J, Aguinaldo K, Lincecum TL Jr, Ghequire MG, Carrion VJ, Cheng TL, Duggan BM, Malone JG, Mauchline TH, Sanchez LM, Kilpatrick AM, Raaijmakers JM, Mot R, Moore BS, Medema MH, Dorrestein PC. Indexing the *Pseudomonas* specialized metabolome enabled the discovery of poaeamide B and the bananamides. Nat Microbiol, 2:16197, 2016. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.197

Floros DJ, Jensen PR, Dorrestein PC, Koyama N. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. Metabolomics, 12:145, 2016. doi: 10.1007/s11306-016-1087-5

Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapon CA, Luzzatto-Knaan T, Porto C, Bouslimani A, Melnik AV, Meehan MJ, Liu WT, Crüsemann M, Boudreau PD, Esquenazi E, Sandoval-Calderón M, Kersten RD, Pace LA, Quinn RA, Duncan KR, Hsu CC, Floros DJ, Gavilan RG, Kleigrewe K, Northen T, Dutton RJ, Parrot D, Carlson EE, Aigle B, Michelsen CF, Jelsbak L, Sohlenkamp C, Pevzner P, Edlund A, McLean J, Piel J, Murphy BT, Gerwick L, Liaw CC, Yang YL, Humpf HU, Maansson M, Keyzers RA, Sims AC, Johnson AR, Sidebottom AM, Sedio BE, Klitgaard A, Larson CB, Boya PCA, Torres-Mendoza D, Gonzalez DJ, Silva DB, Marques LM, Demarque DP, Pociute E, O'Neill EC, Briand E, Helfrich EJ, Granatosky EA, Glukhov E, Ryffel F, Houson H, Mohimani H, Kharbush JJ, Zeng Y, Vorholt JA, Kurita KL, Charusanti P, McPhail KL, Nielsen KF, Vuong L, Elfeki M, Traxler MF, Engene N, Koyama N, Vining OB, Baric R, Silva RR, Mascuch SJ, Tomasi S, Jenkins S, Macherla V, Hoffman T, Agarwal V, Williams PG, Dai J, Neupane R, Gurr J, Rodríguez AM, Lamsa A, Zhang C, Dorrestein K, Duggan BM, Almaliti J, Allard PM, Phapale P, Nothias LF, Alexandrov T, Litaudon M, Wolfender JL, Kyle JE, Metz TO, Peryea T, Nguyen DT, VanLeer D, Shinn P, Jadhav A, Müller R, Waters KM, Shi W, Liu X, Zhang L, Knight R, Jensen PR, Palsson BØ, Pogliano K, Linnington RG, Gutiérrez M, Lopes NP, Gerwick WH, Moore BS, Dorrestein PC, Bandeira N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nat Biotechnol, 34(8):828-37, 2016. doi: 10.1038/nbt.3597

Inokoshi J, Koyama N, Miyake M, Shimizu Y, Tomoda H. Structure-activity analysis of Gram-positive bacterium-producing lasso peptides with anti-mycobacterial activity. Sci Rep, 6:30375, 2016. doi: 10.1038/srep30375

Katane M, Kaneko Y, Watanabe M, Doi Y, Tanaka T, Kasuga Y, Yoshida N, Kumakubo S, Nakayama K, Matsuda S, Furuchi T, Saitoh Y, Sekine M, Koyama N, Tomoda H, Homma H. Identification and characterization of natural microbial products that alter the free d-aspartate content of mammalian cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015.

doi: 10.1016/j.bmcl.2015.11.073

Koyama N, Sato H, Tomoda H. Discovery of new hazimycin congeners from *Kitasatospora* sp. P07101. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5, 564-568, 2015.

doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.010

〔学会発表〕(計 11 件)

細田 莞爾、小山 信裕、金本 昭彦、供田 洋
海洋由来放線菌 OPMA1245 株が産生する nosiheptide の抗 MAC 活性
日本薬学会第 138 年会(金沢)、2018 年 3 月 27 日

富永 剛広、小山 信裕、供田 洋
抗 Rhizopus 剤 tanzawaic acid B のピオチン誘導体の合成及び結合タンパク質の解析
日本薬学会第 138 年会(金沢)、2018 年 3 月 27 日

細田 莞爾、小山 信裕、尾仲 宏康、金本 昭彦、供田 洋
MS ネットワーク手法を利用した *Mycobacterium avium* complex に対する新規抗菌物質の探索研究
第 32 回日本放線菌学会大会(長野)、2017 年 9 月 7 日

茂野 聡、小山 信裕、金本 昭彦、供田 洋
海洋由来放線菌 OPMA02852 株の産生する抗 MAC 活性物質 steffimycin 類に関する研究
第 32 回日本放線菌学会大会(長野)、2017 年 9 月 7 日

Koyama N, Hosoda K, Onaka H, Kanamoto A, Tomoda H
Mass spectral library of microbial metabolomes for screening of antibiotics
International Union of Microbiological Societies
Singapore, 2017.7.20

細田 莞爾、小山 信裕、金本 昭彦、供田 洋
海洋由来放線菌が産生する *Mycobacterium avium* complex に対する活性物質の単離精製
日本薬学会第 137 年会(仙台)、2017 年 3 月 26 日

細田 莞爾、八木 瑛穂、内田 龍児、小山 信裕、供田 洋
Mycobacterium avium complex に有効な化合物の探索系の構築
日本薬学会第 136 年会(横浜)、2016 年 3 月 28 日

中原 悠太、田中 有理沙、郡司 雅奈子、Delfly BABDJEL、山崎 寛之、小山 信裕、浪

越 通夫、供田 洋
天然由来化合物ライブラリーを基盤とした抗結核剤の探索
日本薬学会第 136 年会(横浜)、2016 年 3 月 28 日

小山 信裕
微生物代謝産物探索へのネットワーク技術の活用
日本薬学会第 136 年会(横浜) 一般シンポジウム S08 MONOTORI の新戦略 2016 年 3 月 27 日

小山 信裕, Dimitrios J. Floros, Paul R. Jensen, Pieter C. Dorrestein
モレキュラーネットワーキングによる新規放線菌二次代謝産物の探索
日本放線菌学会(富山)、2015 年 9 月 7 日
小山 信裕
MS データの新しい解析ツール「Molecular Networking」を利用した海洋放線菌からの新規二次代謝産物の探索
第 26 回新薬創製談話会(静岡)、2015 年 9 月 4 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)
名称: マイコバクテリウム・アビウム複合感染症に対する治療活性を有する新規化合物及びその製造方法
発明者: 供田 洋、小山 信裕、金本 昭彦、橋本 絢子、小曾根 郁子
権利者: 学校法人北里大学、OP バイオ社、JBIC
種類: 特許
番号: 特願 2017-168404
出願年月日: 2018 年 9 月 1 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者
北里大学 薬学部 講師
小山 信裕 (KOYAMA NOBUHIRO)
研究者番号: 60439156

(2)研究協力者
北里大学 薬学部 助教
長井 賢一郎 (NAGAI KENICHIROU)
研究者番号: 30321649