

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07743

研究課題名(和文) 続・抗菌物質ハンティング～蔓延する多剤耐性菌を駆逐する新規抗菌物質の開発～

研究課題名(英文) Hunting of antibacterial agent, 2nd. Development of novel antibacterial agent which drives multiple-drug-resistant bacteria away.

研究代表者

坪内 泰志 (TSUBOUCHI, TAISHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：30442990

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)：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に対し高い抗菌活性を示す物質を天然物に求めた結果、海洋環境から分離に成功した新規放線菌Yut-A株が生産することを見出した。同株は4種類の抗MRSA/VRE活性物質を生産しており、生産性および実効力価において最も高い化合物について特性解析を行うと共に、生産菌ゲノム解析を行うことで、多剤耐性菌に対する新規抗菌薬の開発貢献に期待がかかる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌の出現により、臨床現場では既存の治療薬が効かない感染症が世界規模での深刻な問題となっている。臨床分野で用いられている抗MRSA薬は現在6種類存在するが、耐性菌が検出されていないのは未承認薬のキヌプリスチン・ダルホプリスチン(商品名シナシッド)のみであり、感染症問題に備えるべく新規抗菌薬の開発が期待される。本研究成果より得られた抗MRSA/VRE活性物質は膜タンパク質に作用してその活性を呈すると推察され、構造作用機序の面で新規開発シーズとしての価値が見出される。

研究成果の概要(英文)：Streptomyces sp. Yut-A, which isolated from marine environment using electrical device, is capable to produce antimicrobial substance for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Vancomycin-resistant Enterococcus sp. Strain Yut-A produces four kinds of substances which have the antimicrobial spectrum. We performed some characteristic analyses for chemical compound shows the highest effective titer and productivity among them. Additionally, complete genome sequence of the strain Yut-A was decoded. Therefore, it is hoped that this substance is developed to a novel antimicrobial agent against multiple-drug-resistant bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：海洋性放線菌 抗MRSA活性 抗VRE活性 ゲノム解析 中分子芳香環化合物 構造解析 作用機序解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌の出現により、臨床現場では既存の治療薬が効かない感染症が世界規模での深刻な問題となっている。米国疾病予防管理センターの報告では薬剤耐性菌による感染症により、米国内で年 200 万人の罹患者数、そのうち少なくとも 2.3 万人の死亡者数が推計されている。また昨年度に公表された英国の調査では、今後効果的な措置を講じなければ、耐性菌による年間死者数は 2050 年には 1,000 万人に達すると見積もられている。数ある多剤耐性菌のなかでも臨床、特に問題視されているのがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) である。MRSA は日本国内で見つかる薬剤耐性菌の 95% を占めており、年間医療費や死者数は増加傾向にあることから経済的損失も懸念されている。MRSA がここまで蔓延しているのは、その薬剤耐性の獲得性にある (Brakstad et al, 1997)。臨床分野で用いられている抗 MRSA 薬は現在 6 種類存在するが、耐性菌が検出されていないのは未承認薬のキヌプリスチン・ダルホプリスチン (商品名シナシッド) のみである。耐性菌を発生させないためには、これまでの薬剤とは異なる作用機序で、且つ高い実効力価を有する薬剤が必要である。しかしながら抗 MRSA 薬に限らず新規抗菌物質の探索・開発には莫大なコストがかかる一方で、利益率の低さから多くの製薬企業は抗菌薬の開発から撤退してしまい、現在では新規承認される抗菌薬がほとんど出てこない状況に陥っている。このような危機的状況を受けて日米英仏では後期開発パイプラインの拡大が重点政策の一つとして推し進められており、米国では 2020 年までに耐性菌に有効な抗菌薬を 10 薬剤開発することを目標に、“Bad bugs, Need Drugs 10 x 2020” というスローガンを掲げて研究を進めている。2016 年時点では 7 薬剤の開発が進んでいるが、そのうち抗 MRSA 薬は従来の反応点に沿った作用機序を示すセフトロリン/アピバクタムの 1 種類のみである。また薬剤耐性対策の強化は本年 5 月に開催された G7 サミットおよび世界保健総会での主要議題のひとつとして取り扱われ、日本では初のアクションプランの決定に至っている。

2. 研究の目的

薬剤耐性菌である MRSA および VRE に強力な抗菌活性を示す抗多剤耐性菌物質を獲得することに成功している。本物質は分子量 1183.7 からなる芳香環含有・窒素原子非含有物質であり、既知抗 MRSA、抗 VRE 薬とは構造特性を異にする。静菌的に作用する本抗菌物質は既知抗 MRSA、抗 VRE 薬と比較するとその実効力価は 12.5~32 倍に及ぶ。また生産菌である *Streptomyces sp. Spo05* 株は深海底泥から分離した放線菌であり、最近縁株との相同性が 97.9% と非常に新規性が高い。本申請はこれまでの抗 MRSA 薬、抗 VRE 薬とは一線を画す作用機序を有する抗多剤耐性菌薬の創薬に向けた研究課題であり、構造特性を考慮した作用機序を解析すると共にファーマコフォア解析を組み込むことで、日本発抗多剤耐性菌薬第 1 号を輩出することを目的とする。

3. 研究の方法

本申請課題は下記の研究内容から構成される。

(1) 分子間相互作用解析による抗菌物質受容体因子の取得および作用機序解析

抗 MRSA/VRE 物質の作用機序を解明するために、分子間相互作用解析装置 (BIAcore T200; GEヘルスケア社製) による抗 MRSA/VRE 物質親和性因子の取得を行う。具体的には精製した抗 MRSA/VRE 物質を T200 センサーチップに固定化し、同物質と親和性の高い作用因子 (アナライト) を標的薬剤耐性菌である MRSA の菌体破砕液より分離濃縮する。その後センサーチップからアナライトを離脱溶出させ、ナノフロー LCMS を用いてアナライトの de novo シーケンス解析を行う。同結果と公開されている MRSA ゲノム配列情報を照合して作用因子を同定する。特異性を考慮するため、VRE 菌体破砕液に対しても同様に行う。引き続き、特定した作用因子の組換え体過剰発現株を作成し、抗菌物質の感受性を評価する。

(2) 生産菌完全長ゲノム配列決定

生産菌である Spo05 株のゲノム配列は既に完了していたが、Ion torrent PGM (ThermoFisher Scientific 社) を用いてデータ出力したため、その精度には問題が残っていた。そのため本課題においては、long-read sequence として MinION (Oxford Nanopore Technologies 社)、short-read sequence として NovaSeq (Illumina 社) から出力されたデータを Hybrid assemble することでその精度を飛躍的に向上させる。

(3) 網羅的遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム解析)

次世代シーケンサー (MiSeq; Illumina 社製) を用いて、遺伝子発現解析を行う。抗 MRSA/VRE 物質生産菌 Spo05 株を培養し、その増殖曲線初期 (抗菌活性: なし)、中期 (活性: 微弱) および後期 (活性: 強) から抽出した Total RNA を解析対象とし、解読データは Spo05 株ゲノムデータ (完全長ゲノム) を鋳型としてマッピングする。培養時系列に沿って情報数理的に解析することで、抗 MRSA/VRE 物質生合成に関連する酵素遺伝子群やその生合成経路、発現誘導因子の同定に活用する。

(4) 前臨床試験に向けた毒性試験

本抗 MRSA 物質は真菌である *Candida albicans* には抗菌活性を呈していないため、真核細胞 (マ

ウス、ヒト培養細胞の使用を想定)にも影響はないと推察している。一方で実用化を考慮した際には長期抗菌物質処理による副作用の検証などの観点から、この検証試験は不可欠である。生細胞/死細胞試験双方を行い、細胞毒性を評価する。生細胞は代謝活性のある細胞に由来するATPを定量することで培養中の生存細胞数を測定し、死細胞は細胞膜の完全性を失った細胞から放出される死細胞由来プロテアーゼ活性を測定することで同試験の評価とする

4. 研究成果

(1) 分子間相互作用解析による抗菌物質受容体因子の取得および作用機序解析
 抗 MRSA/VRE 活性物質の作用機序を解明する一環として、作用因子の同定を行った。OctetRed (ForteBIO 社) を用い、抗 MRSA/VRE 活性物質を Ligand、MRSA 破砕抽出液を Analyte とした。種々の条件検討を行ったところ、Ligand-Analyte 相互作用の有意差が観察されたが、 $K_{\text{associ.}} > K_{\text{dissoci.}}$ であり、センサーから乖離しないため、ナノフローLCでの解析には至らなかった。そのため方針転換し、プロテオーム解析により作用因子の候補を見出すこととした。MICの1管低い抗菌物質で処理したMRSAと無処理MRSAの細胞破砕液を調製し、2次元電気泳動を行い、gel-imagingで変化率(D)を算出、 $\log_2(D)$ が2< or <-2をピックアップしたところ5つのスポットが候補に挙げられた。結果としてmembrane proteinに多く発現差異が見出せることから、当該抗菌物質の作用因子候補として考えられた(下表)。

#	Product	Description	aa_length	Query cover	E-value	Δ
①	membrane protein	Uncharacterized membrane protein	607	86.5	3e-59	Dw
②	membrane protein	* from aa similarity	374	91.1	1e-111	Dw
③	membrane protein	Integral membrane protein, interacts with FtsH	214	93.8	2e-164	Dw
④	DNA gyrase B subunit	DNA gyrase subunit B; Validated	640	84.9	4e-57	Dw
⑤	membrane protein	Leucine-rich repeats of kinetochore protein	1031	77.3	6e-51	Up

(2) 生産菌完全長ゲノム配列決定

上記2プラットフォームを用いて出力したデータを解析に供した。まず long read data を Canu (ver1.7) でアセンブルし、Pilon (ver1.43) により illumina data を用いて polish した結果、最終的に3コンティグ(線状ゲノム x 1, プラスミド x 2)が得られた(下表)。本菌株ゲノム配列の特徴としては ribosomal RNA のクラスターセットを6つ保有しており、それぞれの配列間の相同性は100%一致しなかった。また以前の配列と比較すると複数箇所に indel や SNPs が存在することから、より精度の高い完全長ゲノム配列を決定することができた。

< Sequence raw data >

Mean Subread length	N50	Total number of bases [bp]	Number of Reads
4,408	7,395	1,225,157,355	277,896

< de novo assembly >

Contigs	Total Length [bp]	N50	Max length	Min length	Avg length
3	7,794,585	7,640,199	7,640,199	54,075	2,598,195

Contigs #	Length [bp]	G + C content (%)	Circular	Depth
1	7,640,199	71.6	No	124
2	100,311	70.5	Yes	153
3	54,075	71.6	Yes	221

< ORF >

Complete	Partial	Total ORF	CDS	RNAs	rRNAs	tRNAs
6,926	0	6,926	6,843	85	18	67

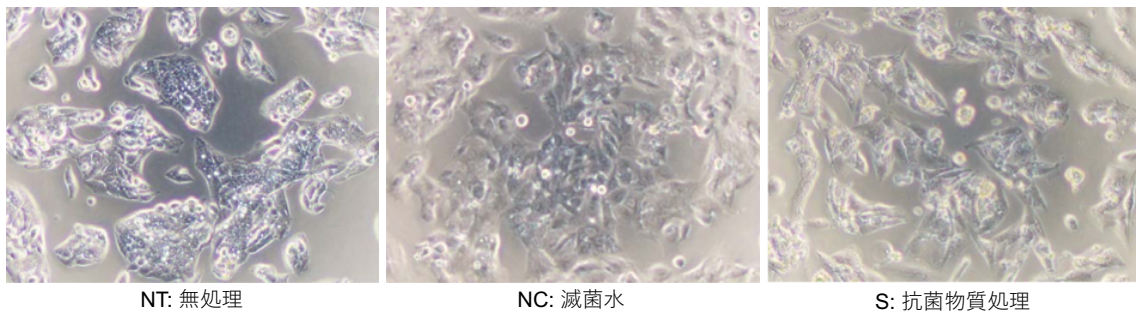
(3) 網羅的遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム解析)

抗 MRSA/VRE 活性物質の生合成酵素関連遺伝子群および生合成経路の同定を行うために、遺伝子発現解析を行った。培養後期 (stationary phase) に抗 MRSA/VRE 活性物質は生産されていることから、経時培養サンプル (d=0, 10, 20) から Total RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行うこととした。d=0 vs. d=10 は生合成酵素関連遺伝子群の発現調節機構の解明を、d=0 vs. d=20 は生合成酵素関連遺伝子群および生合成経路の同定を目的とする。結果として、前者の変動遺伝子 (DEG) 数は 87 であるのに対し、後者は 136 であり、acyl transferase や acyl carrier protein, ketoreductase が DEG 上位に上がってきていることが見出された (下表)。このことより、本課題対象化合物は II 型 PKS により生合成されていることが推測された。

The screenshot displays a table of differentially expressed genes (DEGs) from a transcriptome analysis. The table includes columns for gene identifiers (e.g., M000000001), gene names (e.g., acyl transferase, acyl carrier protein), and various numerical values representing expression levels or fold changes. The interface also shows a search bar and various tool icons at the top.

(4) 前臨床試験に向けた毒性試験

既存の抗 MRSA、抗 VRE 薬は往々にして副作用として重度の肝障害が生じることが知られている。本課題では実用化に向けた研究展開を行うために、肝臓における代謝ストレスを評価系として採用し、ヒト培養肝細胞である Hep38.7 培養細胞評価系を立ち上げ、同候補化合物を MIC 濃度で評価した。結果として検鏡レベルでは細胞形態の萎縮や接着性の低減が観察されないことから、毒性は呈さないことが示された (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsubouchi T, Suzuki M, Niki M, Oinuma KI, Niki M, Kakeya H, Kaneko Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Acinetobacter Baumannii ATCC 19606T, a Model Strain of Pathogenic Bacteria Causing Nosocomial Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announcement	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00289-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taishi Tsubouchi
2. 発表標題 薬剤耐性菌対策に向けた海洋微生物資源ライブラリの構築
3. 学会等名 Zoobiquity symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moeka Uemura, Taishi Tsubouchi, Takeshi Terahara, Takeshi Kobayashi, Chiaki Imada
2. 発表標題 Analysis of transcriptional regulator in antibiotic biosynthetic gene clusters of deep-sea-derived Streptomyces sp.
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪内泰志
2. 発表標題 薬剤耐性菌対策に向けた海洋微生物資源ライブラリの構築
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第46回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪内泰志
2. 発表標題 薬剤耐性菌対策に向けた海洋微生物資源ライブラリの構築
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪内泰志
2. 発表標題 Brevundimonas abyssalisが有する薬剤耐性機構の解析
3. 学会等名 第20回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪内泰志
2. 発表標題 Brevundimonas abyssalisが有する 薬剤耐性機構の解析
3. 学会等名 第19回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐伯康匠、坪内泰志、金子幸弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社ヴァンメディカル	5. 総ページ数 200
3. 書名 感染対策ICTジャーナル	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浦井 誠 (URAI MAKOTO) (20398853)	東京農業大学・生命科学部・准教授 (32658)	
研究分担者	金子 幸弘 (KANEKO YUKIHIRO) (90469958)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	
連携研究者	老沼 研一 (OINUMA KEN-ICHI) (20635619)	大阪市立大学・大学院医学研究科・助教 (24402)	