

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710191

研究課題名（和文）感染症制御に有用な機能分子の開拓とその応用

研究課題名（英文）DISCOVERY OF ANTI-INFECTIVE AGENTS
AND THE DEVELOPMENT TO CHEMICAL BIOLOGY

研究代表者

小山 信裕 (KOYAMA NOBUHIRO)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：60439156

研究成果の概要：(1) 結核感染症に焦点を当てた特殊な細胞評価系を用いたスクリーニングを展開し、新しい機能分子として真菌由来の低分子ペプチド性化合物 **calpinactam** を発見した。

(2) 独自に発見してきたイミペネムの抗 MRSA 活性増強剤 **stemphone** 類の標的分子の解析過程において、種々の誘導体合成を展開し **stemphone** 類の構造活性相関を解明した。さらにある種の誘導体が新規活性としてマクロファージ脂肪滴蓄積阻害を有することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	300,000	2,900,000

研究分野：微生物天然物化学、生化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：感染症、機能分子、MRSA、ケミカルバイオロジー、微生物代謝産物

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、院内感染の原因菌として社会問題となっており、最近では唯一の治療薬であったバンコマイシンに対する耐性菌も報告されたことより新たな治療薬の開発が強く望まれている。申請者らは、臨床上重要な抗細菌薬であるイミペネムに着眼し、その抗 MRSA 活性を増強させる物質の探索過程において、四環性キノンを基本骨格とする新規 **stemphone** 類として B から F 成分を発見してきた (図 1)。本化合物は、それ自身ではほとんど抗 MRSA 活性を示さないのにも関わらず、イミペネムと併用することによ

り、その抗 MRSA 活性を 500 倍以上にも増強させる。さらに、 β -ラクタム薬以外の作用機序の異なる薬剤に対しては増強せず、その効果が感受性菌ではなく耐性菌にのみ有効であることを見出している。本化合物は、このように構造および活性ともに従来の抗細菌薬とは全く異なる興味深い特性を持っており、これまでの抗生物質使用で問題となってきた耐性菌出現の抑制作用をもつことが期待されるため、新しい創薬ターゲットの提供のみならず新しいタイプの抗生物質開発のリードとしての発展も見込まれる。しかしながら、その活性を示すメカニズムについては未だ知見が少ない。

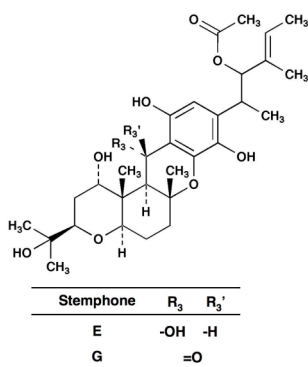
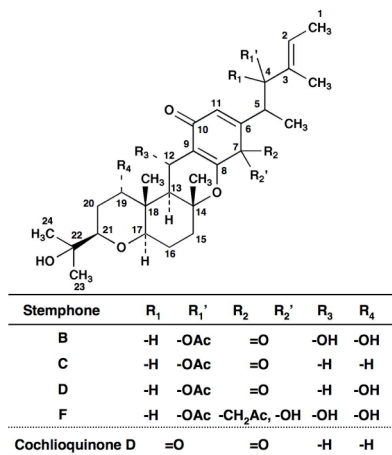


図1 Stemphone 類の構造式

(2) 結核症は、HIV やマラリアと並び世界三大感染症の一つであり、世界人口の約 1/3 (20 億人) ものヒトが感染していると推定され、年間 200 万人以上のヒトが命を落とす世界最大級の感染症である。その治療は、数種の薬剤を組み合わせた長期間の併用療法がとられているが、治療の短縮が求められていることにくわえて薬剤耐性や再発などの問題から新しいタイプの抗結核薬の開発が世界的に急務となっている。

2. 研究の目的

(1) Stemphone 類は MRSA の β -ラクタム薬の耐性機序に作用すると想定している。その作用メカニズムを明らかにするため、本研究ではケミカルバイオロジーからのアプローチを中心に活性発現に重要な責任分子(標的分子)の同定を試みた。
 (2) 既存の抗結核薬のうち第一選択薬である合成剤イソニアジドとエタンブトールともに、結核菌に特有の細胞壁の生合成を阻害し、結核菌のみに抗菌作用を示すことが知られている。このような背景のもと、本研究では、結核選択的な薬剤開発の重要性に着眼し、結核菌 (*Mycobacterium smegmatis*) に対して

のみ抗菌活性を示すという発想から、微生物資源を対象としたスクリーニングを展開し従来の抗結核薬とは作用点の異なる新しい機能分子の開拓を試みた。

3. 研究の方法

(1) Stemphone 類の作用メカニズムの解析

①耐性機序 PBP2' に対する作用

本化合物は耐性機序に作用している可能性を想定し、まず MRSA の β -ラクタム薬の主な耐性機序として知られており、耐性菌が特異的に発現する細胞壁合成酵素である PBP2' に焦点を当てた解析を進めた。PBP2' を多く含有する膜タンパク質画分をリゾスタフィン処理により MRSA から調製し、蛍光ペニシリン (BOCILLIN FL) を用いて binding assay を行った。また、本化合物の PBP2' 発現への影響を調べるため、抗 PBP2' 抗体を用いたラテックス凝集反応による解析を行った。

②Stemphone 類の構造活性相関の解明

半合成による種々の誘導体(メチル化、アセチル化やアシル化体など)を合成することで、stemphone 類の構造活性相関を明らかにし、結合タンパク質の解析に使用する biotinyl 化体を作製するための修飾部位の絞り込みを行った。

③結合タンパク質の解析

上記②の情報をもとに本活性とは関連性の低いと予想される水酸基部分に biotinyl-COOH を縮合させる。最終的に、合成したビオチン標識体を用いてアビジンを介してアガロース樹脂担体に化合物を固定化し MRSA 抽出タンパク質の中より結合タンパク質の解析を行う。

(2)結核特異的に生育阻害を示す新規機能分子の探索

結核菌 (*M. smegmatis*) およびグラム陽性・陰性細菌や真菌に対する活性を総合的に判断し、結核の生育を特異的に阻害する物質を微生物培養液ライブラリーより検索した。また同時に、既存の薬剤による結核菌 (*M. smegmatis*) の生育阻害を特異的に増強させる物質の検索についても進めた。

4. 研究成果

(1) Stemphone 類の作用メカニズムの解析

①耐性機序 PBP2' に対する作用

MRSA タンパク質抽出液と蛍光ペニシリンとの binding assay の結果から、stemphone C は PBP2' に対して親和性はほとんど示さないことを明らかとした。また、PBP2' 抗体を利用した解析から stemphone C 共存下においても発現阻害は認めなかったことより、

stemphone 類は PBP2' とは異なる別の部位に作用することが予想された。

② Stemphone 類の構造活性相関の解明

Stemphone C、E および G をもとに 21 種の誘導体を半合成した (図 2)。これらすべての誘導体のイミペネムの抗 MRSA 活性増強作用を評価した結果、4 位にフリーの水酸基または C2 から C5 の炭素鎖をもつ *O*-アシル誘導体は活性を保持していたのに対し、それよりも長い炭素鎖をもつ誘導体では活性が消失することが明らかとなった (表 1)。さらに、10 位へのアルキル化の導入により活性が完全に消失したことよりオキシ体あるいはフリーの水酸基が活性には必須であることが明らかとなった (表 1)。これら stemphone 類のうち、stemphone E が最も強いイミペネム増強活性を示し、Jurkat 細胞への毒性の低下が確認された (表 1)。

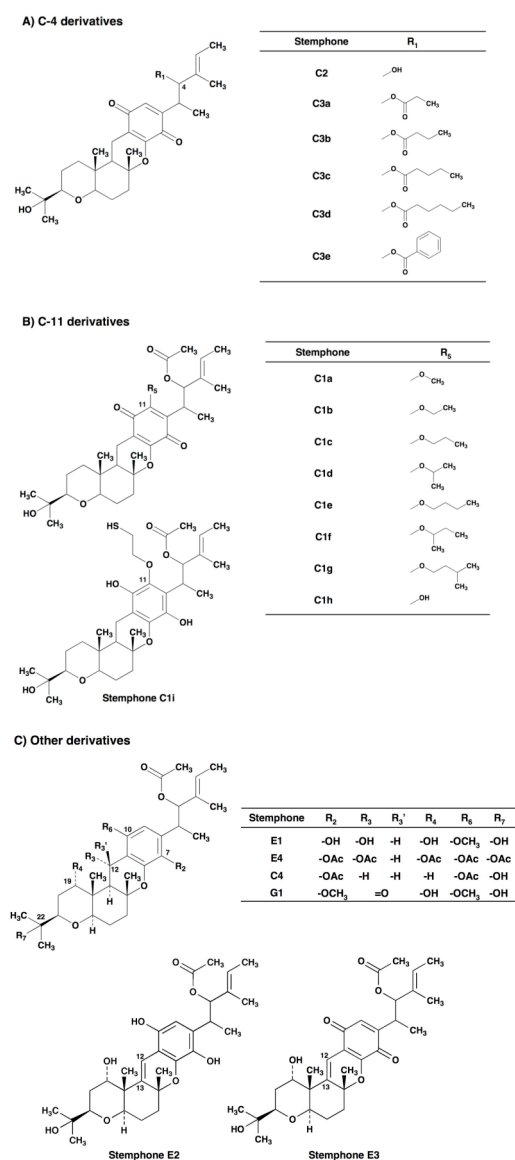


図 2 Stemphone 半合成誘導体の構造式

表 1 Stemphone 類の存在下におけるイミペネムの MIC 値および Jurkat 細胞に対する細胞毒性 IC₅₀ 値

In combination with	MIC of IPM (ng/ml)	Potentiatio Ratio (None/stemphone)	IC ₅₀ (μg/ml)
None	16000	1	-
Stemphone B	30	533	2.13
C	30	533	0.43
C1a	1000	16	13.7
C1b	16000	1	5.75
C1c	16000	1	8.51
C1d	2000	8	16.2
C1e	16000	1	9.12
C1f	16000	1	12.2
C1g	16000	1	20.6
C1h	1000	16	15.1
C1i	16000	1	2.82
C2	60	266	0.78
C3a	60	266	0.50
C3b	60	266	1.35
C3c	250	64	1.50
C3d	16000	1	0.56
C3e	250	64	0.95
C4	16000	1	34.8
D	60	266	1.81
E	30	533	3.64
E1	4000	4	26.2
E2	30	533	4.44
E3	30	533	0.59
E4	16000	1	>100
F	60	266	2.69
G	16000	1	23.7
G1	16000	1	>100
Cochlioquinone D	8000	2	0.070

Concentration of stemphones is 4.0 μg/ml

IPM, imipenem

さらに、これら誘導体を当研究室のさまざまな評価系にかけたところ、ある種の誘導体 (11 位の *O*-アルキル体) が選択的にマクロファージ内の脂肪滴の形成を阻害することを発見した。脂肪滴の形成は動脈硬化初期病変で観察される重要な所見のひとつであり、その阻害剤の開発は新しいタイプの動脈硬化予防治療薬への発展が期待される。

本活性は、これまで当研究室で見出されていた阻害剤と比べても非常に強く、その作用機構に興味を持たれた。そこで、本標的分子の解析についても検討を行うこととした。まず、¹⁴Cオレイン酸からの脂肪滴の構成成分である¹⁴Cコレステリルエステル (CE) および¹⁴Cトリアシルグリセロール (TG) への取り込み阻害を測定したところ、これら誘導体が CE と TG の両生成を阻害することが明らかとなった。最も強い活性を示す stemphone C1f の IC₅₀ 値は 0.16 μM と 0.96 μM であった。これらのデータは、マクロファージ形態観察による脂肪滴形成阻害の結果とも良く相関していた。そこで、脂肪酸の活性化に参与するアシル CoA 合成酵素活性は阻害しなかったことから、まず CE 生成の阻害部位について検討を進めた。リソソーム以降のコレステロール代謝の過程を阻害したことから、CE 生成の最終段階の小胞体酵素

であるアシル CoA:コレステロールアシル転移酵素 (ACAT) 活性に対する影響を調べたところ、本化合物は ACAT を阻害した (IC₅₀ 値 0.25 μM)。そこで、TG 生成の阻害部位については TG 生成に関与する最終酵素で ACAT とも相同性が報告されているアシル CoA:ジアシルグリセロールアシル転移酵素 (DGAT) 活性に対する影響を調べたが、本化合物は 30 μM においてほとんど阻害しなかった。したがって、stemphone C1f の標的分子のひとつは ACAT と想定されたが、TG 生成阻害の標的分子については不明である。ACAT とも相同性の高い DGAT を阻害しないことから、本化合物は脂肪滴形成に関わる複数の阻害部位を有する可能性を想定している。今後、その作用機構を解明することができれば、新しい創薬ターゲットの提供にもつながることが期待される。

③結合タンパク質の解析

構造活性相関をもとに、本活性とは相関性の低いと予想される位置への biotinyl 化の修飾を検討した。まず、最も活性に及ぼす影響が少ないと考えられる末端に位置する 3 級水酸基への導入を検討した。Stemphone C を材料に縮合剤の存在下において biotinyl-COOH の 3 級水酸基への導入を試みたが、biotinyl 化反応は全く進行せず、これら部位への修飾は困難であることが予想された。そのため、次に 2 級水酸基への導入を検討した。材料として、19 位に水酸基を有する stemphone D を用いることにした。まず本化合物はマイナー成分であったことから、新たに大量培養した液を再調製し、その培養液より溶媒抽出、各種クロマトグラフィーおよび逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーを駆使して stemphone D (10.0 mg) を単離した。本化合物を用いて biotinyl 化反応を検討したところ、温和な条件でも容易に反応が進行することを見出した。その活性についても修飾前とほとんど変化せず、この部位の修飾は標的分子との親和性には影響しないことが予想された。以上のようにして結合タンパク質解析のための stemphone D を用いたプローブ合成を確立した。将来的に、このプローブを用いて MRSA 抽出タンパク質の中から stemphone 類に結合するタンパク質を解析し、stemphone 作用の標的分子を同定できれば、新しい抗感染症薬開発のための創薬ターゲットの提供につながることが期待される。

(2) 結核特異的に生育阻害を示す新規機能分子の探索

放線菌や真菌を含む微生物培養液 (約 5000 サンプル) を対象にスクリーニングを実施し、結核菌 (*M. smegmatis*) の生育を特

異的に阻害する物質を探索する系より真菌 *Mortierella alpina* FKI-4905 株が選択された (図 3)。その培養液 (1.0 L) より、本活性を指標にして溶媒抽出、各種クロマトグラフィーおよび逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで精製することにより calpinactam (13.0 mg) を単離した。その構造について、質量分析および各種 NMR 解析をもとに解明し、C 末のリシンが自身で脱水環化した直鎖状ヘキサペプチド構造を有する新物質であることを明らかにした (特許出願中 2009-049154)。

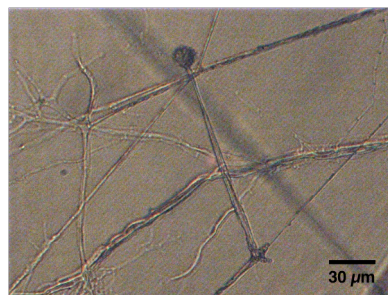


図 3 生産菌 *M. alpina* の走査型電子顕微鏡写真

ペーパーディスク法による活性評価から、本化合物は、5 μg/6 mm disk の濃度において *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Micrococcus luteus*、*Escherichia coli*、*Candida albicans*、*Saccharomyces cerevisiae* を含む 14 種の微生物のうち、*M. smegmatis* に対してのみ活性を示した。さらに、微量液体希釈法による活性評価から、*M. smegmatis* に対する最小発育阻止濃度 (MIC) 値が 0.78 μg/ml と算出され、非常に強い抗結核活性を示すことが明らかになった (参考: 抗結核薬イソニアジドの MIC 値 1.56 μg/ml)。また、ヒト病原性の結核菌 *M. tuberculosis* に対しても、その生育を阻害することが明らかになっている (MIC 値 12.5-50 μg/ml)。本化合物は結核菌自身の生育に必須な鉄キレーターである mycobactin に類似の構造を有するが、鉄キレート活性を持たず新しい作用機構により抗結核活性を示すと推定している。将来的に、本化合物を基盤としたケミカルバイオロジー研究を展開し、その作用機構を解明することができれば、新しい抗結核薬ターゲットの提供にもつながり、さらには本化合物をリードとした創薬研究への発展も期待される。

一方、既存薬による結核菌 (*M. smegmatis*) の生育阻害を特異的に増強させる物質の探索系からは、放線菌や真菌を含む微生物培養液 (約 5000 サンプル) を対象にスクリーニングを実施し、真菌由来の MBI-F0085 株が唯一選択された。いま現在、本培養液より各種クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーを駆使して活性物質の単離

精製を進めている段階である。既存薬の抗結核活性増強を指標とした探索系はこれまで見当たらないことから、結核症のための新しい機能分子の開拓につながることを期待される。

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3件)

① Koyama, N., Kobayashi, K., Yamazaki, H. & Tomoda, H. (2008) Inhibition of lipid droplet accumulation in mouse macrophages by stemphone derivatives. *J. Antibiot.* **61**, 509-514

② Yamazaki, H., Koyama, N., Omura, S. & Tomoda, H. (2008) Structure-activity relationships of stemphones, potentiators of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antibiot.* **61**, 426-441

③ Koyama, N., Inoue, Y., Sekine, M., Hayakawa, Y., Homma, H., Omura, S. & Tomoda, H. Relative and absolute stereochemistry of quinadoline B, an inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages. *Org. Lett.*, **10**, 5273-5276 (2008)

[学会発表] (計7件)

① 山崎寛之, 小山信裕, 大村 智, 供田 洋
Stemphone 誘導体の生物活性研(1)MRSA に対するイミペネム活性増強 日本薬学会第128年会(横浜) 2008.3.26 [日本薬学会第128年会要旨集2 p.127 2008.3]

② 小山信裕, 小林 翔, 山崎寛之, 大村 智, 供田 洋

Stemphone 誘導体の生物活性研(2)マクロファージ脂肪滴蓄積阻害活性
日本薬学会第128年会(横浜) 2008.3.26 [日本薬学会第128年会要旨集2 p.127 2008.3]

③ Yamazaki H, Koyama N, Omura S, Tomoda H
Potentiation of imipenem activity against methicillin-resistant *staphylococcus aureus* by stemphones

The 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium (鬼怒川) 2008.5.22

④ 小山信裕, 井上勇佑, 野中健一, 山口裕一, 増間碌郎, 大村 智, 供田 洋

海洋由来真菌 *Aspergillus clavatonanicus* FKI-1746 株の生産する新規マクロファージ

脂肪滴蓄積阻害物質

第11回マリンバイオテクノロジー学会大会(京都) 2008.5.24

⑤ 野中健一, 増間碌郎, 小山信裕, 供田 洋, 大村 智

石垣島土壌より分離された *Stephanonectria* sp. FKI-2703 について

日本菌学会第52回大会(三重) 2008.5.31

⑥ 小山信裕, 供田 洋

微生物資源からのβ-ラクタム薬の抗MRSA活性増強物質の開拓

第53回ブドウ球菌研究会(東京) 2008.9.19

⑦ 山下 皓平, 猪腰 淳嗣, 小山 信裕, 供田 洋

投げ縄構造を有する抗結核ペプチド lariat A の作用機序の解明

平成20年度AKPS研究集会(東京) 2008.12.13

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 新規FKI-4905物質およびその製造方法
発明者: 供田 洋, 小山 信裕, 増間 碌郎, 大村 智

権利者: 学校法人北里学園

種類: 特許

番号: 2009-049154

出願年月日: 2009.3.3

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小山 信裕 (KOYAMA NOBUHIRO)

研究者番号: 60439156