

令和 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06488

研究課題名（和文）MRSAに相乗的活性を示すクロプトシンとL-156,602の機序解析と有効性検討

研究課題名（英文）MOA study and efficacy evaluation of the synergistic activity of Chloptosin and L-156,602 against MRSA

研究代表者

橋爪 秀樹（Hashizume, Hideki）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員

研究者番号：10311276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：作用機序解析の結果、クロプトシン類およびL-156,602は共に膜作用性化合物であり、クロプトシンはMIC付近では静菌的に作用した一方、L-156,602は短時間で強い殺菌力を示し、相乗性を示すMIC以下の併用時には遅効的な殺菌力と特異な形態変化が認められた。次に単剤並びに併用時の遺伝子発現変化について検討した結果、細胞分裂に影響を及ぼすことが示唆された。また2化合物のマウスの致死容量と抗菌活性を比較すると、抗菌活性がより低濃度で発揮されたためマウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルで治療効果が期待されたが、これまで試験した中では治療効果が見られずさらに条件を詰め検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質は環境中で周囲の微生物との生存競争を有利にするために微生物が生産するものである。本研究では土壌放線菌MM621-AF10株が2種の相乗性を示す抗菌物質を生産することでより効率良く微生物間の競争に有利に働く機構について解析を進めた。単剤では抗菌力を発揮できない低濃度でも併用することで病原細菌の増殖を抑制することを明らかにした。また、電子顕微鏡観察などから、単剤と併用時では病原細菌に与える影響が異なることを示した。さらに解析を進めることで新しい薬剤標的の開拓につながることを期待された。

研究成果の概要（英文）：Results from the activity evaluation of Chloptocin and L-156,602 as single agents showed that both compounds are membrane-active. Chloptocin acted bacteriostatically near its MIC, whereas L-156,602 exhibited strong bactericidal activity within a short period. When used together at concentrations below their MICs, a delayed bactericidal effect and unique morphological changes were observed. Subsequent investigation of gene expression changes when used alone and in combination suggested an impact on cell division. Additionally, when comparing the lethal dose in mice and the antimicrobial activity of the two compounds, antimicrobial activity was observed at lower concentrations, suggesting potential therapeutic effects in a mouse model of systemic Staphylococcus aureus infection. However, no effects have been observed in tests conducted so far, and further detailed investigation is planned

研究分野：天然物化学

キーワード：mode of action synergy chloptosin L-156,602

1．研究開始当初の背景

現在、薬剤耐性菌の蔓延が社会的な問題となっており、薬剤耐性菌に有効な新たな薬剤開発が緊急の課題となっている。常在性のグラム陽性細菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染の主要な起因菌であり、高齢者や術後患者などの易感染性宿主に感染し、重篤な感染症を引き起こす。MRSA はベータラクタム剤をはじめとする主要な薬剤に対する耐性を獲得し、有効な薬剤はバンコマイシンなどに限定されるが、近年ではそれらに対する耐性菌も出現し、新たな薬剤開発が望まれていた。

我々は微生物代謝産物から新たな薬剤候補化合物を探索したところ、*Embleya* 属放線菌 MM621-AF10 株の培養液から L-156,602 ならびに新規化合物クロプトシン類を単離した (図 1)。L-156,602 ならびに新規化合物クロプトシンは、多剤耐性菌にも交差耐性を示すことなく強い抗菌活性を示したため、既存薬と異なる新規作用機序を有することが期待された。これら化合物は単剤でも MRSA に強い抗菌活性を示したが、併用するとさらに強力な抗菌活性を示すことを見出した (表 1)。

図 1 クロプトシン類と L-156,602 の構造

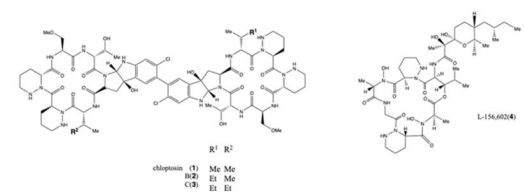


表 1 クロプトシンB と L-156,602 の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性

	MIC (μg/mL) against <i>S. aureus</i> Smith	
Chloptosin B	0.25	
L-156, 602	0.25	
ChloB + L-156	0.063	0.006

一方、クロプトシン類や L-156,602 は類縁の化合物が既に報告されていたが、それらはがん細胞に対する毒性およびその作用機構に関わるものばかりで、抗菌活性に関する論文は皆無であり、抗菌活性の発現機構については全く解明されていなかった。

2．研究の目的

L-156,602 ならびに新規化合物クロプトシンは、多剤耐性菌にも交差耐性を示すことなく強い抗菌活性を示したため、既存薬と異なる新規作用機序を有することが期待される。本研究では、申請者らが発見した新規化合物クロプトシン類と同時に生産される既知化合物 L-156,602 の単剤での作用機序と相乗性の機構について解析する。さらに併用時の抗菌活性は上記表 1 で示したように非常に低濃度で発揮され、マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおいて治療効果が期待できるため、マウスに対する上記 2 剤の急性毒性ならびに単剤・併用での治療効果を検討する。特に併用時の相乗性の機構解明は、現在社会問題となっている耐性菌を克服するにあたり、新しい作用標的や方向性を提供することが期待される。

3．研究の方法

(1) 放射ラベル前駆体の取り込みを指標とした高分子合成阻害様式の検討

前述したように今回の被験物質であるクロプトシンおよび L-156,602 は、その抗菌活性発現機構が全く解明されていない。そこで、薬剤の処理濃度を振って各種高分子、すなわちタンパク、DNA、RNA、脂肪酸、細胞壁の前駆体であるロイシン、チミジン、ウリジン、酢酸、*N*-アセチルグ

ルコサミンの放射ラベル体の黄色ブドウ球菌スミス株への取り込み阻害を検討し、細胞のどこに作用しているか絞り込む。また、以下の検討も黄色ブドウ球菌スミス株で行った。

(2) 細胞膜への影響の測定

上記(1)の結果より 2 化合物ともの膜への影響が示唆されたため、膜電位依存性色素 DiSC3(5) を用いて膜電位への影響を検討するとともに、膜非透過性色素 To-Pro-3 iodide を用いて膜機能障害を検討した。

(3) 膜作用性化合物との相乗性の検討

クロプトシンもしくは L-156,602 と他の膜作用性化合物の併用による相乗性の有無についてチェッカーボード法により検討した。

(4) 経時殺菌曲線の検討

クロプトシンおよび L-156,602 単剤、ならびに最小阻害濃度(MIC)以下の 2 剤併用時の殺菌曲線を検討することで、2 剤と併用時の細菌に与える影響の違いを検討した。

(5) 電子顕微鏡観察

クロプトシンおよび L-156,602 単剤、ならびに最小阻害濃度(MIC)以下の 2 剤併用時の細胞の形態変化を電子顕微鏡画像で検討し、2 剤と併用時の細菌に与える影響の違いを検討した。

(6) 遺伝子発現への影響

クロプトシンおよび L-156,602 単剤、ならびに最小阻害濃度(MIC)以下の 2 剤併用時の遺伝子発現変化を RT-qPCR 法にて検討した。

(7) マウスへの急性毒性試験

クロプトシンおよび L-156,602 単剤のマウスへの急性毒性試験を行った。

(8) マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルでの治療効果の検討

上記(7)の結果に基づき、クロプトシンおよび L-156,602 単剤、ならびに最小阻害濃度(MIC)以下の 2 剤併用時マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルでの治療効果を検討した。

4 . 研究成果

(1) 放射ラベル前駆体の取り込みを指標とした高分子合成阻害様式の検討

クロプトシンおよび L-156,602 は、ともに全ての高分子合成を非選択的に阻害し、その IC50 値はそれぞれの MIC 値をやや上回ったものであった。以上のような非選択的な阻害様式は、膜作用性化合物のダプトマイシンやパルガマイシンでも見られたため、クロプトシンおよび L-156,602 は膜作用性の化合物であることが示唆された。

(2) 細胞膜への影響の測定

上記の結果より、2 化合物とともに膜への影響が示唆されたため、蛍光色素を用いた実験により、膜電位への影響ならびに膜機能障害について検討を行った。その結果、クロプトシンは MIC 値以上で速やかに脱分極を引き起こしたものの膜機能障害は起こさなかった一方、L-156,602 は

MIC 値以上で脱分極ならびに膜機能障害をもたらした。

(3) 膜作用性化合物との相乗性の検討

クロプトシンおよび L-156,602 はともに細胞膜に作用する化合物であることがわかったため、クロプトシンと他の膜作用性の化合物ダプトマイシン、パルガマイシン、モネンシン、ノナクチン、ナイシンとの併用効果をチェッカーボード法にて評価した。その結果、いずれの膜作用性化合物との併用でも相乗性は認められず、クロプトシンと一緒に生産される L-156,602 と特異的に相乗性を示すことが明らかとなり、生産菌がこの 2 化合物を生産するのは生産菌の生存競争に利点があるためであることが改めて示唆された。

(4) 経時殺菌曲線の検討

クロプトシンは MIC 付近で静菌的に、MIC の 4 倍以上で殺菌的に作用し、L-156,602 は迅速に MIC 値以上で殺菌的に作用することがわかった。興味深いことに 2 剤を MIC 値以下で併用すると、遅行的に緩やかな殺菌性を発揮し、そのコロニーはスモールコロニーを形成した。この結果から、単剤と併用時の薬剤の抗菌作用は異なることが示唆された。

(5) 電子顕微鏡観察

MIC 値のクロプトシンを処理した細胞は細胞分裂が不十分な形態を示した一方、MIC 値の L-156,602 を処理した細胞は、窪んだものや破裂したものが多かった。興味深いことに 2 剤を MIC 値以下で併用した細胞は、これらの形態変化と異なり細胞の表面構造が崩れる、あるいは細胞分裂が不十分な形態を示し、単剤と併用時での作用機構の違いを示唆していた。

(6) 遺伝子発現への影響

クロプトシン、L-156,602 およびその併用時における遺伝子発現変化を RT-qPCR 法にて検討した。その結果、単剤ならびに併用時に細胞壁合成の抑制、細胞分裂の促進、嫌気呼吸促進、シデロフォア合成促進などが認められた。このうち、2 剤がシデロフォアであるかについて塩化第 2 鉄呈色反応、鉄添加による抗菌活性変化を検討したが、いずれも陰性であり、2 化合物がシデロフォアでないことが示された。細胞壁合成および細胞分裂に関する影響に関しては継続して検討を進めている。

(7) マウスへの急性毒性試験

ICR,4 週齢のメスマウスを使用した。クロプトシンは静脈内投与で致死量は 6.25 mg/kg, 皮下投与で 50 mg/kg 以上であった。一方、L-156,602 は静脈内投与で致死量は 0.39 mg/kg, 皮下投与で 50 mg/kg 以上であった。これらに対し、併用時における黄色ブドウ球菌スミス株に対する抗菌活性は、クロプトシン:0.063 mg/L + L-156,602:0.006 mg/L であった。

(8) マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルでの治療効果の検討

前項に記載したように抗菌活性と致死容量に 64 倍以上の選択性が見られたため、全身感染モデルにおいて治療効果が期待された。マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルに対し、皮下投与ならびに全身移行性に優れる静脈内投与で 2 化合物の単剤および MIC 値以下の併用で投与を行ったが、これまでのところ全ての条件で治療効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 微生物化学研究会 附属 微生物化学研究所
http://www.bikaken.or.jp

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
研究協力者	大石 智一 (OHISHI Tomokazu)	微生物化学研究所・沼津支所動物施設・主任研究員	
研究協力者	大庭 俊一 (OHBA Syun-ichi)	微生物化学研究所・沼津支所動物施設・研究員	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------