

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011年度～2012年度

課題番号：23658101

研究課題名（和文）アシルホモセリンラクトン生合成を阻害する生合成中間体アナログの創製

研究課題名（英文）Acylhomoserine lactone synthase inhibitors mimicking the enzyme reaction intermediate

研究代表者

林 英雄 (HAYASHI HIDEO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：30128772

研究成果の概要（和文）：

クオラムセンシング (QS) は、細菌が化学シグナルを介して協調的に振る舞うメカニズムである。グラム陰性菌ではアシルホモセリンラクトン (AHL) がそのシグナルとして機能している。本課題では、AHL 生合成阻害物質の創製を目指し研究を進めた。構築した酵素アッセイ法を用いて、合成した生合成中間体アナログの活性を評価したところ、強い活性を示す阻害剤を作り出すことに成功した。現在、これら化合物の細胞レベルでの評価を進めている。本研究で見出された AHL 生合成酵素阻害剤はクオラムセンシング阻害剤としての発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Bacteria employ a mechanism of intercellular communication known as quorum sensing (QS) that regulate gene expression in a cell population-dependent manner. The most common QS signals in Gram-negative bacteria are *N*-acylhomoserine lactones (AHLs), which are synthesized from acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) and *S*-adenosylmethionine (SAM) in a reaction catalyzed by AHL synthase. Despite considerable interest in controlling bacterial QS, there is still no efficient inhibitor of the key enzyme. Here we report a new class of AHL synthase inhibitors that were designed based on the structure of *N*-acyl-SAM, a potent reaction intermediate of AHL synthase. The AHL synthase TofI from the plant pathogen *Burkholderia glumae* produces *N*-octanoylhomoserine lactone (C8-HSL) from octanoyl-ACP and SAM, which reaction was inhibited by the *N*-octanoyl-SAM analogs. Approach of simplification and optimization of the analogs structure led to compounds with high inhibitory activity. The present TofI inhibitors can be seed or lead compounds for the design of a new class of QS quenching agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：情報分子

1. 研究開始当初の背景

細菌はホストに侵入すると、爆発的に増殖しはじめ病原性を発現する。この過程で、細菌は同種の菌密度を AHL 濃度として感知し、それが閾値に達すると病原性に関わる遺伝子を発現しはじめる。この QS を特異的に阻害することができれば、細菌に生存選択圧をかけずに病原性だけをなくすことができる。AHL 類はグラム陰性菌において広く保存されているものの、アシル鎖の長さ、置換様式、不飽和結合の有無などが異なる 20 種類以上の類縁体がある。ナチュラルリガンドである AHL の構造模倣化合物によるアンタゴニストが QS に依存した病原性を制御するのに有効なことは疑いないが、多くの菌種の QS を制御できるアンタゴニストは見出されていない。そして最も厄介なのは、ある菌にはアンタゴニストとして作用しても、別の菌にはアゴニストとして作用してしまう点である。そのため、AHL 構造類似物を基盤としたアンタゴニストによる細菌 QS 制御法に代わる化学基盤の構築が求められていた。

AHL 生合成阻害剤は耐性菌が出現し難い抗病原薬に発展することが期待される。近年、多剤耐性菌が病院内だけでなく、様々な環境中で発見されている。スーパー多剤耐性菌が国内ではじめて発見されたというニュース・新聞報道は記憶に新しい。そのような背景から耐性菌への多面的な対策は必須である。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの AHL 受容を阻害するアンタゴニストではなく、AHL の出所を止める、生合成阻害による細菌 QS の化学制御

を目指すものである。細菌の QS 機構が新しい薬剤の作用点として注目されて以来、合成 AHL アナログ、化合物ライブラリー、天然物から多くのアンタゴニストが見出されてきた。中でも AHL アナログが最も優れた結果を与えてきた。しかし、このような AHL 構造類似体では、全ての菌種にアンタゴニストとして作用するのではなく、種によってアゴニストとして作用してしまう危険性がある。したがって、その生合成を阻害する方がより効率的であり、このジレンマを解消できる。AHL は SAM と FACP から生合成される。SAM を基質とする反応はそのアナログで阻害できる例が多い。これを利用しない手はない。しかし SAM アナログでは、たとえ AHL 生合成を阻害できたとしても、他の生体反応も阻害してしまい、後々選択性が問題になってくる。そこで前項でも述べたように、アシル化 SAM のアナログ体が有望なリード化合物であることが考えられた。すでに、幾種かのアナログ体は合成しているが、sinefungin と同程度の活性をもつ化合物しか見出されていない。多くのアナログ体をデザイン・合成して活性試験に供し、十分な活性を有するアナログ体を作製することが必須である。ここが本課題の成否を決める。未だ見出されていない AHL 生合成阻害物質を世界で初めて見出すことを目指した。

3. 研究の方法

アシル化 SAM アナログを各ユニットから化学合成できる段階になっているので、はじめはより多くのアナログ体を合成し、in vivo での試験で候補化合物を見出すことに専念する。候補が見つかれば、酵素アッセイ法の

確立を進める。酵素アッセイができれば、候補アナログをより細かく構造展開していき、得られてくるアナログ体の活性を酵素レベルできちんと評価していく。さらに、再度 *in vivo* での試験を行い、QS が制御している様々な現象がどのような影響を受けるかをきちんと評価して、生合成阻害剤としての活性を確固たるものにする。

本研究を行っている段階で、競争相手が先に AHL 生合成阻害剤として J8-C8 という化合物を *PNAS* 誌に報告した。しかし、本化合物をこちらで化学合成し、AHL 生合成酵素に対する活性を調べたところ、非常に弱い阻害活性しか示さず、阻害剤としての機能には大きな疑問がもたれた。しかし、本論文では AHL 生合成酵素の X 線結晶構造解析が行われており、この知見を利用した構造展開も検討することにした。

4. 研究成果

構築した酵素アッセイ法を用いて、合成した生合成中間体アナログの活性を評価したところ、*N*-*o*octanoylSAM の 5'-methyl 基を除去したアナログで $K_i = 7.8 \mu\text{M}$ と強い阻害活性が認められた。本アナログは構造がやや構造が複雑なため、さらなる構造展開には不向きであった。そこでメチオニン部分のカルボキシ基を除去したアナログ作製し、阻害活性を調べたところ大きな差は認められなかったことから、カルボキシ基が活性発現には必須ではないことが明らかになった。さらに構造展開を進めたところ $K_i = 0.21 \mu\text{M}$ の強い活性を示す阻害剤を作り出すことに成功した。今回見出した阻害剤の構造活性相関研究から、阻害剤の C8 アシル鎖とアデノシン部分が *ToFI* によって厳密に認識され、メチオニン部分については炭素鎖長が高活性発現には

重要であることが分かった。現在、これら化合物の細胞レベルでの評価とコンピュータモデリングによる高活性発現に至った原因解析を進めている。本研究で見出された AHL 生合成酵素阻害剤はクオラムセンシング阻害剤としての発展が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. *N*-Acylhomoserine lactone 生合成阻害剤の開発 藤井祐城、前中理沙、甲斐建次、林英雄 日本農薬学会第 38 回大会 2013 年 3 月 14~16 日 つくば

2. アシルホモセリンラクトン産生を阻害する生合成中間体アナログの開発 藤井祐城、前中理沙、甲斐建次、林英雄 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 22~26 日 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 英雄 (HAYASHI HIDEO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 3 0 1 2 8 7 7 2

(2) 研究分担者

甲斐 建次 (KAI KENJI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号 : 4 0 5 0 8 4 0 4

(3) 連携研究者