

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450112

研究課題名(和文) 抗菌物質ハンティング～多剤耐性菌を打ち破る新奇抗菌物質の獲得～

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

研究代表者

坪内 泰志 (TSUBOUCHI, Taishi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術副主任

研究者番号：30442990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は海洋堆積物から新奇性の高い放線菌を分離し、同菌株が生産する物質が多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に抗菌活性を示すことを発見した。本物質を精製し、核磁気共鳴法、赤外分光法、精密質量分析などの分析法により物質同定を行った結果、同物質はアセチルエステル基、メトキシ基およびメチル基を含むポリオール構造を有するマクロライド系化合物構造であることが見出された。またその抗菌スペクトル解析からMRSAのみならずバンコマイシン耐性腸球菌に対しても強力な抗菌活性を示すことから、世界規模で蔓延傾向にある多剤耐性菌に対する抗菌薬としての開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Streptomyces sp. strain 05, which isolated from deep-sea sediment, is capable to produce antimicrobial agent. This agent exhibits antimicrobial activity for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), which is famous for the drug-resistant bacteria. We achieved to get the purified substance by some steps. By some analytical methods such as nuclear magnetic resonance method, IR spectroscopy and accurate mass analysis, this substance is a macrolide antibiotic, possesses polyol structure with acetyl-ester group, methoxy group and methyl group. Additionary, from analysis of antibacterial spectrum, this agent effects against the vancomycin resistant enterococcus. 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

キーワード：抗生物質 抗MRSA物質 多剤耐性菌 新規放線菌 醗酵生産

1. 研究開始当初の背景

(1) 院内感染の起炎菌であり、多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が臨床問題視されているのは、薬剤耐性の獲得性にある。現在臨床分野で用いられている抗 MRSA 薬は、5 種類存在するが、耐性菌が検出されていないのはダプトマイシンのみである。臨床分野における新規治療薬のニーズにより、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、今後 10 年以内で新規抗 MRSA 薬は最大 10 品目の導入が見込まれる。しかしながらこれらは全て化学修飾型であり、新奇構造 / 作用機序に基づく創薬ではない。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。

(2) 新規抗 MRSA 物質の探索には新規生産菌の単離が欠かせないが、その一方で問題視されているのが、抗菌物質の単離源の枯渇化である。現在認知されている抗菌物質の主たる単離源は放線菌や糸状菌 (カビ) であり放線菌に至っては実にその 7 割を占める。抗 MRSA 薬に関しては 4 種が放線菌由来 (硫酸アルベカシンは化学修飾型)、リネゾリドのみが完全化学合成で開発されたものである。経験的手法による新規放線菌のスクリーニングも国内外を問わず継続して試みられているが、単離種数は頭打ちの状態である。

(3) 抗 MRSA 活性を呈する *Streptomyces* sp. Spo05 株は、研究代表者が統計数学を取り入れた環境微生物単離法を用いて単離した微生物の一株であり、このような単離手法の研究事例は存在しない。自然界の微生物が産生する抗菌物質は主としてグリコペプチド系抗菌薬であり、分子量も大きいのが一般的であるのに対して、本株が生産する抗 MRSA 物質は芳香環を部分構造に持つ、分子量 1,200 程度の化合物である。その構造特性の相違や抗菌スペクトル、実効力価を鑑みると当該抗菌物質は新規抗 MRSA 物質として高い可能性を持つ。従って構造特性を考慮した作用機序を解明すれば、有用な抗 MRSA 薬の創薬が可能である。

2. 研究の目的

多剤耐性菌である MRSA に強力な抗菌活性を示す抗菌物質を獲得することに成功している。本抗菌物質は芳香環含有の非ペプチド物質であり、既知抗 MRSA 薬 5 種とは構造特性を異にする。既知抗 MRSA 薬が主として殺菌的に作用するのに対して、本抗菌物質は殺菌・静菌的に作用し、その実効力価は実に 50 ~ 100 倍に及ぶ。また生産菌である *Streptomyces* sp. Spo05 株は深海底泥から単離した放線菌であり、既知最近縁株との相同性が 97.9% と非常に新規性が高い。本課題はこれまでの抗 MRSA 薬とは一線を画す第 6 番

目の作用機序を有する抗 MRSA 薬の創薬に向けた研究課題であり、当該物質の構造特性を考慮した作用機序を解析することで、硫酸アルベカシンに続く日本発抗 MRSA 薬第 2 号を輩出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 MRSA 物質の単離精製

Streptomyces sp. Spo05 株は抗 MRSA 物質を菌体外に分泌生産しているため、本株培養後期上清液から同活性物質の単離精製を試みた。溶媒分配後の精製にはイオン交換カラム、ODS シリカゲル逆相カラム、多孔性グラファイトカーボン充填カラム、ゲル濾過用カラム等を装備した液体クロマトグラフシステムを使用し、単一成分となるまで目的物質の精製を行った。精製を進めるにあたりその検出系として、低沸点化合物を除き原理的にほとんど全ての化合物を検出する蒸発光散乱検出法と紫外・可視吸光度法を採用した。

(2) 抗 MRSA 物質構造解析

抗菌物質の構造解析は主として核磁気共鳴法 (NMR) を用いて行った。上記手法により精製した抗 MRSA 物質をクロロホルム-d 溶媒で 10 mg/ml に調整し、500 MHz の NMR 装置 (日本電子 EX270, ECA500) に供した。プロトンの位置関係を分析するために ¹H-NMR、炭素および炭素級数をみるために ¹³C-NMR、¹³C-NMR DEPT データセットを、水素と炭素の位置相関をみるために二次元 NMR (COSY, TOCSY, HMBC, etc.) データセットを取得した。原子団としての官能基を同定するために赤外分光分析を行い、構造解析の補足データとした。また分子質量を分析するために、ミリマスを用いて精密質量分析を行った。その際のイオン化方法として、Fast atom bombardment 法を採用した。

(3) 抗菌スペクトル解析

抗 MRSA 活性物質の評価には、2 種類の黄色ブドウ球菌 (メチシリン感受性, MSSA; メチシリン耐性, MRSA) を用いた。またその特異性を評価するためにグラム陽性菌株として *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, グラム陰性菌株として *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 真菌株として *Candida albicans* も指示菌として用いた。またバンコマイシン耐性腸球菌やカルバペネム耐性腸球菌、リネゾリド耐性菌などの多剤耐性菌を含め、指示菌株を増やし、選択毒性および有用性を詳細に評価した。

(4) 抗 MRSA 物質生産株のゲノム解析

次世代シーケンサーである Ion torrent (Life 社) や RS II/Sequel システム (Pacific Biosciences 社) を用いて塩基配

列を解読し、全長ゲノムを決定した。また遺伝子機能を予測するために CLC Genomics Workbench (CLC Bio 社) を解析プラットフォームとして採用し、解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 抗 MRSA 物質の単離精製・構造解析

中規模培養スケール(30 リットル)で生産菌株の培養を行い、同培養上清から、クロロホルム/メタノール/酢酸エチルの混合溶媒を用いた液々分配、メタノール/酢酸エチルを移動相とするイオン交換カラム、非極性溶媒を移動相とするシリカゲルクロマトグラフィー、ジメチルスルホキシド(DMSO)を移動相としたゲル濾過用カラムの手順で精製を行った。上記精製過程により、精製度約 90%のサンプル 500 mg を得た。また最終精製段階において溶媒にメタノールを 5%添加することにより精製度 95%程度まで高めることに成功した。なお、課題計画当初で使用予定であった多孔性グラファイトカーボン充填カラムは担体樹脂に目的化合物が吸着してしまうことが判明し、使用を中止した。同精製物質を 500 MHz の核磁気共鳴装置に供することで $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを得た。10 mg/ml ではスペクトルの強度が低かったため、30 mg/ml まで濃度を上げることで $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ DEPT スペクトルを得た。また、水素-水素間のクロスピークを検出する CH-COSY 解析や水素-炭素間の結合様式を見出す HSQC、HMBC を測定することで異原子間結合様式を特定化し、強度の芳香性を有することを見出した。赤外分光分析では相当数の水酸基シグナルが検出された。上記解析手法を解読することで本活性物質は、アセチルエステル基、メトキシ基およびメチル基を含むポリオール構造を有するマクロライド系化合物構造であることが見出された。また精密質量分析では分子構造の完全性を担保するため、3-ニトロベンジルアルコールをマトリクスとした Fast atom bombardment 法によりイオン化を行い、引き続きミリマス分析で窒素原子非含有、分子量 1,180 の物質であることを明らかとした。これまでの既存抗 MRSA 菌薬のなかには上記諸性質を満たす活性物質は存在しない。

(2) 抗菌スペクトル解析

精製した抗 MRSA 物質を用いて抗菌活性を決定した。本活性物質は *B. subtilis* (実効量 0.02 $\mu\text{g/ml}$) や *K. rhizophila* (同 0.04 $\mu\text{g/ml}$)、MSSA (同 0.08 $\mu\text{g/ml}$)、MRSA (同 0.16 $\mu\text{g/ml}$) に殺菌・静菌的に作用することを明らかとした(図1)。また *P. aeruginosa*、*K. pneumoniae* には抗菌活性を示さなかった(図2)ことから、本物質はグラム陽性菌に抗菌活性を示す物質であると推測できた。MRSA に対する詳細な実効力価を算出するために、1~1/512,000 倍希釈系列を調整して 96 ウェルプレートアッセイ法により、評

価を行った(図3)。同評価時に、バンコマイシン耐性腸球菌やカルバペネム耐性腸球菌、リネゾリド耐性菌などの多剤耐性菌も指示菌として付け加え、臨床薬学的意義を評価した。

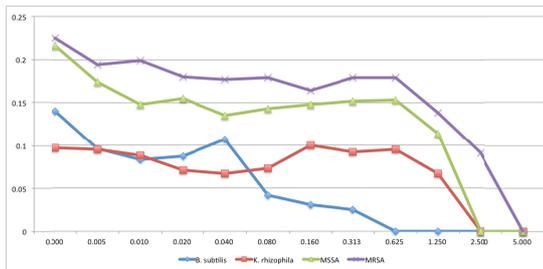


図1 グラム陽性菌抗菌スペクトル解析

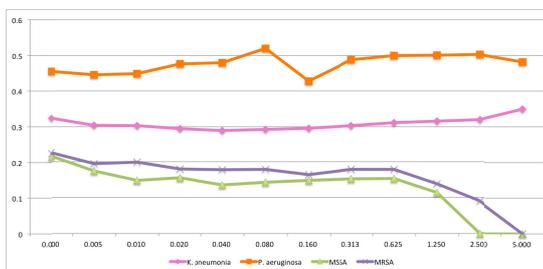


図2 グラム陰性菌抗菌スペクトル解析

カルバペネム耐性腸球菌、リネゾリド耐性菌に対しては抗菌活性を示さなかったが、バンコマイシン耐性腸球菌 2 種に対しては抗菌作用を呈した(図3)。希釈系列から判断すると、抗 MRSA 活性より抗 VRE 活性の方が低濃度として作用することを見出した。このことはバンコマイシン耐性 MRSA 株に対しても効果があることが期待される。なお、*Mycobacterium smegmatis* に対してのアッセイも同時に行い、同菌株に対する抗菌活性は認められなかったため、*Mycobacterium* 汚染による抗菌活性ではないことが示されている。

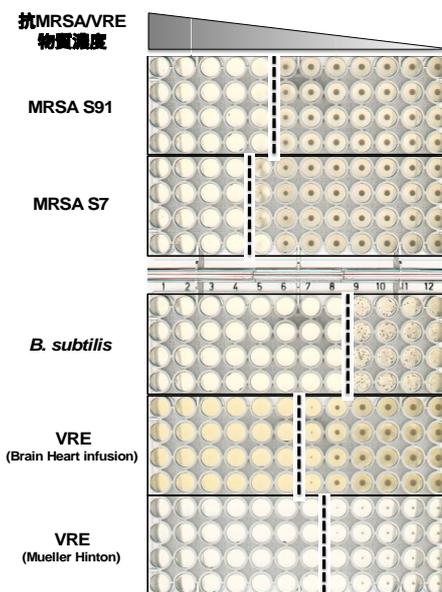


図3 抗 MRSA, 抗 VRE 生物活性評価結果

(3) 生産菌株ゲノム解析

本株のゲノム解析を行うに当たりゲノム DNA を菌体から抽出精製する必要がある。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) を用いた汎用的な抽出法や種々のゲノム DNA 抽出キットを用いてみたが、どれもゲノム DNA を抽出することは出来なかった。これは放線菌特有の頑健な細胞壁に起因すると考え、その効率的な破碎法を検討した。最終的には本菌株を溶菌酵素存在下で石英砂と共にすり潰し、プロトプラスト化を促進させた状態にしておき、それから CTAB 抽出精製を行うとゲノム抽出が出来るようになった。抽出したゲノム DNA は Bioanalyzer (Agilent 社) により状態を確認した後に 200 bp にサイズセレクトしたゲノムライブラリを作成した。次世代シーケンサー Ion torrent を使用して、同ライブラリ 0.5Gb スケールのゲノムシーケンスを実施し、得られた 1,602,006 リードをアセンブルした結果、コンティグ数が 213 個と多いため全体構造の解読が困難であった。同問題を解決するべく、long-read sequence 技術である RS II/Sequel システムを用いたシーケンス解析に変更し (図 4) 1 分子リアルタイム分析を行った。解析プラットフォームとして LC Genomics Workbench を利用し同リード配列をアセンブルした結果、Max length 7.64 Mb、Min length 54 Kb、Average length 2.6 Mb の配列を得ることに成功し、最終的に 3 コンティグ (線状ゲノム x1、プラスミド x2) のゲノム配列を得ることに成功した (表 1)。本菌株のゲノムはゲノムサイズ 7.79 Mb、GC 含量 71.59% から構成され、6,929 CDS を見出した。特徴的な点としてはリボソーム RNA クラスターを 6 個有しており、複数種の抗菌活性物質生合成ポテンシャルを有していた。当該抗菌物質の生合成関連構造遺伝子及びその反応経路を特定するためには遺伝子発現情報を取得する必要がある。そのため本ゲノムデータは引き続き行う RNA-sequence による発現遺伝子データをマッピングする際のリファレンス配列として利用する。

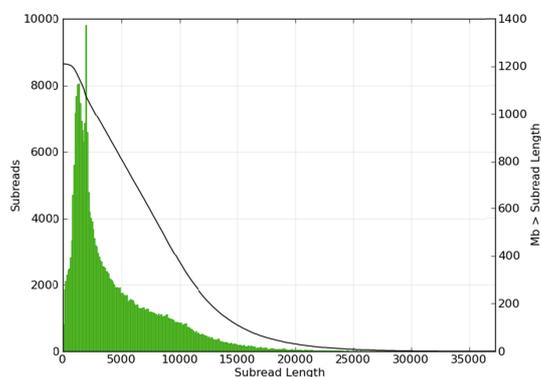


図 4 サブリード配列分布

表 1 コンティグ情報

Contig Name	Length (bp)	GC %	Depth	Circular
contig1	7,640,199	71.6	124	No
contig2	100,311	70.5	153	Yes
contig3	54,075	71.6	221	Yes
Total	7,794,585	71.59	125	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Koyama S, Nishi S, Nagano Y, Tame A, Uematsu K, Nogi Y, Hatada Y, Tsubouchi T, “Electrical Retrieval of Living Streptomyces Spores Using a Potential-Controlled ITO Electrode” *Electrochemistry -Tokyo-*, 査読有, 2017, 85(6):297-309.
DOI: 10.5796/electrochemistry.85.297

Koyama S, Nishi S, Tokuda M, Uemura M, Ishikawa Y, Seya T, Chow S, Ise Y, Hatada Y, Fujiwara Y, Tsubouchi T, “Electrical Retrieval of Living Microorganisms from Cryopreserved Marine Sponges Using a Potential-Controlled Electrode” *Mar Biotechnol (NY)*. 査読有, 2015, 17(5):678-92.
DOI: 10.1007/s10126-015-9651-y

〔学会発表〕(計 3 件)

坪内泰志、「海洋性放線菌が秘める創薬シーズの探索」、第 7 回醗酵学フォーラム、平成 28 年 11 月 13 日、石和温泉常磐ホテル (山梨県・笛吹市)

上村萌佳, 坪内泰志, 西真郎, 徳田真紀, 寺原猛, 今田千秋, 秦田勇二, 丸山正 「深海放線菌ゲノムを読み解く～多剤耐性菌を打ち破る新奇抗菌物質の獲得」、Blue Earth 2015、平成 28 年 3 月 8 日 東京海洋大学 (東京都・品川区)

坪内泰志、「統計数理的手法を用いた未培養環境微生物培養法の導出」、第 29 回海洋生物活性談話会 2015、平成 27 年 5 月 10 日 筑波大学下田臨海実験センター (静岡県・下田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪内 泰志 (TSUBOUCHI, Taishi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術副主任
研究者番号: 30442990

(2)研究分担者

秦田 勇二 (HATADA, Yuji)
埼玉工業大学・工学部・教授
研究者番号：20399562

浦井 誠 (URAI, Makoto)
国立感染症研究所・真菌部・研究員
研究者番号：20398853

金子 幸弘 (KANEKO, Yukihiro)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)
院)・教授
研究者番号：90469958