

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670043

研究課題名(和文)新規感染症治療薬のリード化合物の創出

研究課題名(英文)Development of lead compounds for new anti-infective agents

研究代表者

浜本 洋(HAMAMOTO, Hiroshi)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90361609

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルでの治療効果を指標に探索された3つの化合物について、その活性と、作用機序解析を実施した。化合物の抗菌スペクトラムを解析したところ、何れも黄色ブドウ球菌、及び多剤耐性黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示した。1つの化合物について、RNA合成を阻害し、RNAポリメラーゼのシグマ因子を標的とする新しいメカニズムで抗菌活性を示すと考えられた。また、マウス黄色ブドウ球菌感染モデルにおいても、延命効果を示した。これらの結果から、カイコ細菌感染モデルは、天然物だけでなく、有機合成化合物からの治療効果を有する新規抗菌薬の探索にも有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文): We evaluated antimicrobial activity and mechanistic analysis of the compounds which identified by therapeutic effectiveness on silkworm infection model. These compounds showed antimicrobial activity against Staphylococci, and one of compound showed prolonged proliferation activity on mouse systemic infection model. This compound is implied to have a novel mechanism. These results suggest that silkworm infection model is useful model to identify therapeutically effective antimicrobial compounds from synthetic compounds library.

研究分野：微生物学

キーワード：抗菌薬 化合物ライブラリー カイコ 作用機序解析

1. 研究開始当初の背景

世界的な多剤耐性菌の蔓延に対抗するために、従来の抗菌薬にはない新奇な標的を有する治療薬の開発が必要とされている。申請者等は、治療効果を指標に抗菌化合物を探索すれば、細菌に対する特異性が高く体内動態が優れた化合物が選別されると考え、コストも安く倫理的な問題が無いカイコの細菌感染症モデルを用いた、抗生物質の定量的な治療効果の評価系を確立した。これまでの我々の研究から、カイコは哺乳動物と同様な薬物代謝経路を有し、毒性の評価もラットにおける場合と高い相関性を有することを明らかにしている。実際に、治療効果を指標に、一般に標的特異性が高いとされる天然物から新規抗生物質「ライソシン E」を見いだすことに成功している。さらに、研究代表者は、10万個に及ぶ化合物ライブラリーからもスクリーニングを実施し、カイコで治療効果を示す3つの化合物を見いだしていた。

2. 研究の目的

カイコモデルで治療効果を示すこれらの化合物は、HTSで探索されたものとは異なり、非特異的なタンパク質への結合が小さく、安全性も高いと考えられる。また、これらの化合物は、カイコに対する毒性も示さないことから、細菌特異的な作用により、抗菌治療活性を発揮していると考えられる。そこで、本研究においては、既存の抗菌化合物とは骨格が全く異なっている、これらの化合物の標的を同定し、新奇作用メカニズムを有する抗菌化合物の創出を実施する。さらに、これらの化合物の体内動態を明らかにすることにより、創薬のモデルとしてのカイコの地位を確固たるものにする。

3. 研究の方法

それぞれの化合物について、抗菌スペクトラムを求める。また、化合物の抗菌活性が殺菌的であるか静菌的であるか検討し、さらに、DNA合成などの高分子合成の阻害活性を検討し、メカニズム解析の端緒を開く。次に、化合物に対する変異原処理を行った株を用いて耐性菌を取得し、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析により変異部位を同定し、共通した変異遺伝子を同定する。遺伝子の変異部位から、作用機序を推定し、生化学的な解析により、抗菌化合物の作用メカニズムを解明する。また、化合物の血清添加による抗菌活性の低下率、及び、マウスモデルにおける治療効果と毒性を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗菌化合物の抗菌スペクトラム

本カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルでの治療効果を指標に探索された3つの化合物について、作用機序解析を実施した。化合物の抗菌スペクトラムを解析したところ、いずれも黄色ブドウ球菌、及び多剤耐性黄色ブドウ

球菌、*Staphylococcus* 属に対して抗菌活性を示したが、他のグラム陰性の菌種には抗菌活性が弱く、狭域なスペクトラムであると考えられる(表1)。化合物Bは抗菌活性がやや低く、またカイコモデルにおける治療効果も残りの2つと比べ弱いものであったことから、今後の解析が困難であると判断し研究の対象から除外した。化合物A、Cについては、抗菌スペクトラムがやや狭いものの、多剤耐性黄色ブドウ球菌に対する効果がメチシリン感受性株と変わらなかった。

Bacteria	MIC (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA1	4
<i>S. aureus</i> NCTC 8325	8
<i>S. aureus</i> RN4220	4
<i>S. aureus</i> Newman	4
<i>S. aureus</i> Smith ATCC13709	4
<i>S. aureus</i> MRSA4	4
<i>S. aureus</i> USA300	4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	4
<i>Bacillus subtilis</i> JCM2499	128
<i>Bacillus cereus</i> JCM20037	128
<i>Listeria monocytogenes</i> 10403S	128
<i>Enterococcus faecalis</i> EF5	>256
<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	>256
<i>Streptococcus pneumonia</i>	>256
<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671	>256
<i>Streptococcus sanguinis</i> JCM5678	>256
<i>Serratia marcescens</i>	>256
<i>Escherichia coli</i> W3110	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	>256

表1 化合物Cの抗菌スペクトラム

(2) 抗菌活性の作用機序解析

2つの化合物A、Cについて、黄色ブドウ球菌に対する作用様式を検討した。その結果、化合物Aは弱い殺菌性を示し、化合物Cは静菌的であった(図1)。両者の黄色ブドウ球菌のDNA、RNA、タンパク質、及びペプチドグリカンの高分子合成に対する阻害活性を検討したところ、化合物AはRNA合成が阻害され、タンパク質合成が部分的に阻害された。また化合物CはRNA合成が主に阻害され(図2)、及びタンパク質合成が部分的に阻害された。

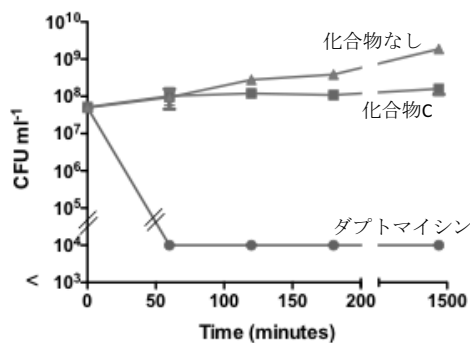


図1 化合物Cの静菌的活性

従って、両化合物とも RNA 合成経路を主に阻害すると考えられた。

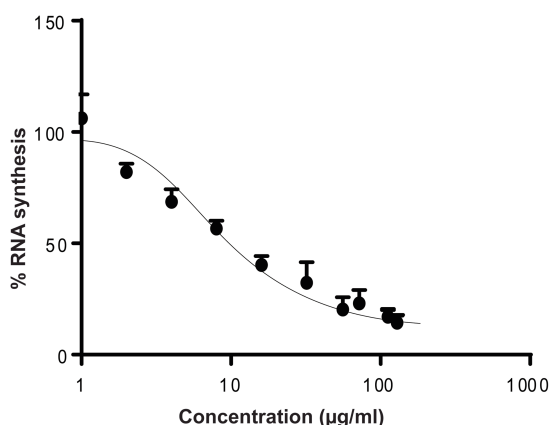


図2 化合物 C の RNA 合成阻害

(3) 耐性菌の遺伝子変異部位解析

化合物 A, C の作用機序を明らかにするため、黄色ブドウ球菌を変異原処理し、薬剤含有寒天培地上で生育した耐性株を取得し、その遺伝子変異部位を、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析により解析した。化合物 A に対する耐性菌株については、耐性株間で共通した遺伝子変異が認められず複数の要因によって耐性化していると考えられ、メカニズム解析に必要な情報は得られなかった。化合物 C については、独立に取得された株間で共通して *sigA* 遺伝子に変異が認められた。*sigA* 遺伝子の変異が化合物 C の耐性化に必要な遺伝子であるか、ファージトランスダクションによる解析によって検討した結果、*sigA* 遺伝子の 1 遺伝子変異が化合物 C に対する耐性化に必要な十分であることがわかった。なお、本耐性菌の増殖速度を検討したところ、増殖性は野生型に比べ劣っており、細菌の増殖機能には障害が生じていることがわかった。

	<i>sigA</i> 遺伝子	化合物C感受性	化合物C耐性
野生型遺伝子 を変異株に	野生型	22/29 (76%)	0/29 (0%)
	変異型	0/29 (0%)	7/29(24%)
変異遺伝子を 野生株に	野生型	16/20 (80%)	0/20 (0%)
	変異型	0/20 (0%)	4/20(20%)

表2 ファージトランスダクション解析

(4) 生化学的なメカニズム解析

化合物 C について、作用機序解析を実施した。次世代シーケンサーの解析から、*sigA* 遺伝子の変異が耐性化に必要な十分であることがわかったため、*sigA* 遺伝子産物である、RNA ポリメラーゼの σ サブユニットが標的ではないかと仮説を立て、検討を行った。まず、野生型株と *sigA* 遺伝子変異型株における、

RNA 合成に対する化合物 C の効果を検討したところ、野生型は RNA 合成が阻害されるのに対して、耐性変異株は化合物の添加による RNA 合成能の低下が抑制されていた。

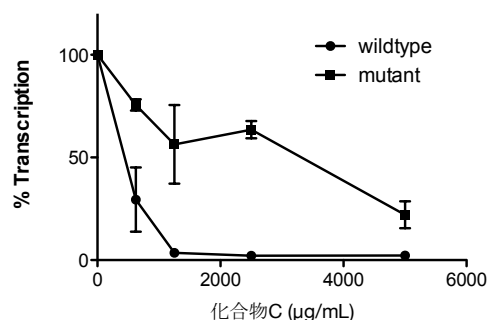


図2 化合物 C の野生株と *sigA* 遺伝子変異株に対する RNA 合成阻害における効果

また、部分精製した RNA ポリメラーゼの試験管内における活性についても、化合物 C は野生型由来の RNA ポリメラーゼのプロモーターからの転写は阻害するが、変異株由来のものは化合物 C に対して耐性を示した。また、大腸菌の RNA ポリメラーゼのコア酵素に、黄色ブドウ球菌の野生型と変異型の σ サブユニットを加えてホロ酵素を形成させ、化合物 C に対する感受性について検討したところ、変異型は化合物 C に対して耐性を示した。さらに、化合物 C は RNA ポリメラーゼの σ サブユニットに結合した。これらの結果から、化合物 C は、RNA ポリメラーゼの σ サブユニットを標的として抗菌活性を示していると推察される。これまで、 σ サブユニットを標的とする小分子の抗菌化合物は知られておらず、本化合物は新しいメカニズムを有していることが明らかになった。

(5) 化合物 C のマウスモデルにおける治療効果と安全性の解析

化合物 C についてマウス黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療効果を検討した。その結果、化合物の投与により全数生存するような治療効果は認められなかったが、有意な延命効果が見いだされた。血清による抗菌活性に対する影響を検討したところ、10%のウシ血清の添加により最小発育阻止濃度が 4 倍上昇したことから、本化合物はやや血清に結合しやすく、そのためにカイコ、及びマウスにおける ED₅₀ 値が MIC の 10 倍以上になると考えられる。また、治療効果を示す濃度より高い、化合物の溶解性の限界の濃度のサンプルを投与しても急性毒性は認められなかった。従って、本化合物は抗黄色ブドウ球菌薬のシード化合物として有用であると考えられ、本研究の目的は達成できたと考えられる。

以上の結果は、カイコ細菌感染モデルが、天然物からの治療効果を示す化合物の探索だ

けでなく、創薬における重要なソースの一つである有機合成された化合物ライブラリーに対しても有用であることを示していると考えられる。

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7件)

1. Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains developed from multiple clinical MRSA strains by in vitro mutagenesis,

Ishii K, Tabuchi F, Matsuo M, Tatsuno K, Sato T, Okazaki M, Hamamoto H, Matsumoto Y, Kaito C, Aoyagi T, Hiramatsu K, Kaku M, Moriya K, Sekimizu K: *Sci Rep*, 5, 17092, 2015,

DOI: 10.1038/srep17092

2. 新規MRSA抗生物質ライソシンEの発見 - カイコを用いる治療効果を指向したスクリーニング創薬,

浜本洋, 関水 和久: *化学*, 70, 12-16, 2015
<http://www.kagakudojin.co.jp/book/b201119.html>

3. Identification of lysocin E using a silkworm model of bacterial infection, Hamamoto H, Sekimizu K: *Drug Discov Ther*, 10, 24-29, 2016,

DOI: 10.5582/ddt.2016.01012

4. Rational design, synthesis, and biological evaluation of lactam-bridged gramicidin analogues: discovery of a low-hemolytic antibacterial Peptide,

Mao J, Kuranaga T, Hamamoto H, Sekimizu K, Inoue M: *ChemMedChem*, 10, 540-545, 2015

DOI: 10.1002/cmcd.201402473

5. カイコをモデル動物とした創薬研究展開, 浜本洋: *JATAFFジャーナル*, 2, 38-43, 2014

<https://www.jataff.jp/books/order/journal/yousi/JATAFFj0207.htm>

6. カイコを用いた創薬研究, 松本靖彦, 浜本洋, 西田智, 関水 和久: *生体の科学*, 65, 613-620, 2014

<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.2425200089>

7. カイコにおける昆虫サイトカイン paralytic peptide を中心とする自然免疫制御機構,

石井健一, 浜本洋, 関水 和久: *生化学*, 85, 1091-1095, 2013

<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2015/06/86-05-05.pdf>

[学会発表] (計8件)

1. カイコ真菌感染モデルを利用した抗真菌薬の治療効果の評価と探索

浜本洋, 関水 和久

第36回関東医真菌懇話会、6月27日、京王プラザホテル、新宿区西新宿

2. カイコ細菌感染モデルにて同定された新規抗生物質ライソシンE

浜本洋, 関水 和久

第64回日本感染症学会東日本地方学術集会、第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、10月21~23日、ロイトン札幌、北海道札幌市

3. Identification and mechanistic analysis of a novel antibiotic lysocin E Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu

The 8th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, Jan 18-20, Okinawa (Japan)

4. カイコ感染実験系の有用性と課題 ライソシンEの研究を中心として

浜本洋

メディカル・サイエンス セミナー (日本感染症医薬品協会主催)、3月24日、学士会館、千代田区神保町

5. Novel Therapeutically Effective Antimicrobial Agent Targets Bacterial RNA Polymerase Sigma Factor A

Paudel Atmika, Hamamoto Hiroshi, Kaneko Keichi, Matsunaga Shigeki, Suzuki Yutaka, Kanai Motomu, Kazuhisa Sekimizu

The 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 9月5-9日, Washington, USA

6. Host factors enhance the antimicrobial activity of a novel antibiotics kaikosin E,

Hiroshi Hamamoto

The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, 10月28-29日, Life Science Center, Osaka

7. Silkworm as an animal model for novel antibiotic development

Hiroshi Hamamoto, Jyunichiro Yasukawa, Kenich Ishii, Atmika Paudel, Kazuhisa Sekimizu,

the Xth European Congress of Entomology, 8月3-8日, York, England (Invited)

8. カイコモデルを用いた治療効果を有する新規抗菌薬の同定と開発

浜本洋, 石井健一, 安川淳一郎, 西田智, 関水 和久

日本薬学会第135年会、2015年3月26日~

28 日、神戸学園大学、神戸（招待講演）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

微生物薬品化学教室のホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

帝京大学医真菌研究センターのホームページ

http://www.teikyo-u.ac.jp/affiliate/laboratory/fungal_center/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜本 洋 (HAMAMOTO, Hiroshi)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90361609