

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310146

研究課題名（和文） 天然由来抗感染症活性を有する新規化合物を用いた
ケミカルバイオロジー研究

研究課題名（英文） THE CHEMICAL BIOLOGY OF NEW MICROBIAL ANTI-INFECTION AGENTS

研究代表者

供田 洋（TOMODA HIROSHI）

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：70164043

研究成果の概要（和文）：ケミカルバイオロジーのアプローチから 3 種の微生物由来の抗感染症剤の作用機序について研究した。Cyslabdan（MRSA に対する β -ラクタム薬イミペネム活性増強剤）について MRSA 抽出タンパク質を材料に研究し、その結合タンパク質として細胞壁ペプチドグリカンの生合成に関わる SAR1388 を同定した。また、lariat A（結核菌の選択的な生育阻害剤）についても、*M. smegmatis* 抽出タンパク質を材料に研究し、その結合タンパク質として機能未知な MSMEG1878 を同定した。これら結合タンパク質の解析をもとに化合物の作用機序を推定した。Spirohexaline 類（UPP synthase 阻害剤）については、*in silico* 実験において、viridicatumtoxin と標的タンパク質 UPP synthase とのドッキングモデルを解析し、その結合様式を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of action of three anti-infective agents was studied. Lariat A showed selective growth inhibition against mycobacteria. The proteins that bind to lariat A were investigated in the lysate of *Mycobacterium smegmatis*, which led to the identification of MSMEG1878 protein whose function has not been reported. Cyslabdan potentiated β -lactam imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The proteins that bind to cyslabdan were investigated in the lysate of MRSA, which led to the identification of SAR1388, which is involved in the synthesis of the pentaglycine interpeptide bridge of the MRSA peptidoglycan. Furthermore, the docking model of viridicatumtoxin and UPP synthase was investigated *in silico* to elucidate the binding mode of spirohexalines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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

キーワード：感染症、天然物、ケミカルバイオロジー、標的分子、結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、耐性菌や再興感染症の問題から、新

しい観点からの抗感染症薬の開発が社会的に強く望まれている。このような状況のもと、

申請者の研究グループでは、感染症に対する新しい切り口から独創的な評価系を構築し、天然物、特に微生物の培養液あるいはその代謝産物のライブラリーを保持し、その評価系を基軸にこのライブラリーを対象に新しい抗感染症剤の探索を進めてきた。その過程で、次にあげる評価系より構造的にも活性的にも特色のある抗感染症活性を示す新しい化合物(図1、以下抗感染症剤と称す)を発見してきた。1) 耐性菌に対する新しいアプローチとして、既存医薬品(β-ラクタム薬)のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)に対する抗菌活性を増強する化合物を検索し、放線菌 *Streptomyces* sp. K04-0144 株の生産する *cyslabdan* を発見した。本化合物は、臨床的に重要性の高い *imipenem* の抗 MRSA 活性を 1000 倍以上にも増強する。2) 細菌の細胞壁合成に重要なウンデカプレニルピロフوسفेट合成酵素(UPP synthase)活性を評価する系より真菌 *Penicillium* sp. FKI-3368 株より初めての UPPS 阻害剤 *spirohexaline* 類を発見した。本物質は、グラム陽性菌に対して強い抗菌活性を有しており、MRSA にも活性を示す。3) 抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* の生育を選択的に阻害する物質を検索し、放線菌 *Rhodococcus jostii* K01-B0171 株の生産する特異な投げ縄ペプチド *lariat*in 類を発見した。本物質は、ヒト病原性の結核菌 *M. tuberculosis* に対しても非常に強い活性を示す。

以上のように申請者らが微生物資源より発見した抗感染症剤は、現在社会問題となっている感染症の起原菌に対して、特色ある活性を示すユニークな化合物群である。しかしながら、これら化合物の活性を示す作用機序については未だ知見は少ない。

2. 研究の目的

申請者らの発見したこれら抗感染症剤(*cyslabdan*, *spirohexaline* 類と *lariat*in 類)について、それぞれの病原性あるいは関連する微生物(MRSA や抗酸菌 *M. smegmatis* 等)を材料に活性発現に重要な責任分子(標的分子)を同定し、その作用メカニズムを明らかにする。このメカニズムを解明することができれば、病原微生物の耐性メカニズムや生育に必須な分子の特定につながり、将来的には抗感染症薬開発の新たな方向性を提供することも期待される。

3. 研究の方法

A) *Lariat*in に関する研究

A-1) 作用機序の解析

①ビオチン標識体の合成

*Lariat*in の構造中の C 末端プロリン残

基のカルボキシル基に着目し、縮合剤の存在下においてポリエチレングリコール鎖をリンカーとする *amine*-PEO₂-*biotin* を反応させることで、*biotinylariatin* を合成した。

②*Lariat*in 結合タンパク質の解析

全ゲノムが解明されている *M. smegmatis* MC²155 からのタンパク抽出液(超音波破碎液やフレンチプレス処理液)を材料に、アビジン樹脂を用いて親和性を示すタンパク質を SDS-PAGE 分析することにより検索した。まず、*biotinylariatin* をアビジン樹脂に固定化させた後、*M. smegmatis* MC²155 由来のタンパク質を加え、4°C下で 1.5 時間混和させた後に非特異的に吸着したタンパク質を PBS で洗浄した。最終的に、*lariat*in 結合タンパク質を過剰量の 25 mM *lariat*in A を含有する PBS を用いて樹脂より回収した。次いで、検出された結合タンパク質については、ゲル内でトリプシン消化後、得られた断片化ペプチドを質量分析装置 LC-MS/MS を駆使して、データベースとの照合からタンパク質を同定した。

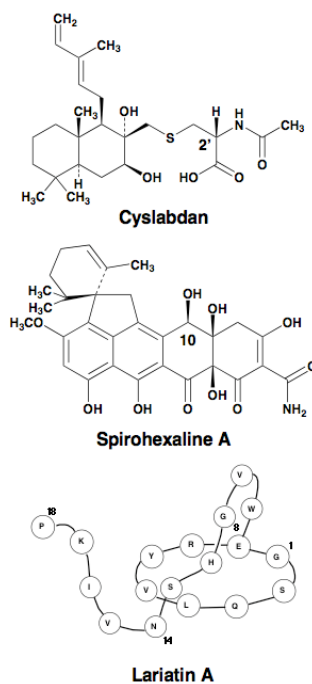


図1 抗感染症剤の構造式

③*Lariat*in 結合タンパク質 MSMEG1878 の組み換え体を用いた結合実験

M. smegmatis MC²155 の染色体 DNA を鋳型に増幅した *msmeg1878* を pET-42b(+) に連結した後、大腸菌 *Escherichia coli* BL21 株に導入し、ヒスタグ融合させた組み換えタンパク質を発現調製した。さらに、定法に従い、大腸菌破碎液をニッケルカラムで精製することにより組み

換えタンパク質を得た。これを biotinyllariatin との結合性の評価に使用した。

④Lariatin 結合タンパク質 MSMEG1878 の機能解析

上記③で調製した組み換えタンパク質を用いて、*M. smegmatis* MC²155 の抽出タンパク質の中より、MSMEG1878 と親和性を示すタンパク質を検索した。その解析には、ニッケルカラムにヒスタグ融合タンパク質を固定化させ用いた。

⑤各種ラベル体を用いた取り込み実験

各種ラベル体として、³H]thymidine、³H]uracil、³H]leucine 及び ³H]N-acetyl-D-glucosamine を *M. smegmatis* MC²155 に取り込ませた後に、菌体内の高分子 (DNA、RNA、タンパク質やペプチドグリカン) の生合成に対する lariatin の影響を評価した。さらに、¹⁴C]acetic acid からの脂肪酸及びミコール酸への生合成に対する影響についても調べた。定法に従って、*M. smegmatis* の菌体より脂質成分を抽出しメチル化後、TLC で各脂質成分を分離し、イメージングアナライザーによりそれらの放射活性を測定した。

A-2) 生合成遺伝子の解析

生産菌 *R. jostii* K01-B0171 株の IS1415 を用いた transposon 変異導入による解析及び lariatin ポリペプチド配列より設計した遺伝子配列をプローブとした southern hybridization による解析を行い、lariatin 生合成に関わる遺伝子群をクローニングした。

さらに、放線菌宿主発現系 (*R. jostii* K01-B0171:: Δ larA) を構築し、lariatin A のポリペプチド配列をコードする遺伝子を改変導入することで、抗結核活性の発現および投げ縄構造の形成に重要なアミノ酸残基を解析した。

B) Cyslabdan に関する研究

B-1) Cyslabdan 結合タンパク質の解析

まず、cyslabdan の 2' 位カルボキシル基より A-1) の方法と同じ様に、biotinylcyslabdan を合成した。次に、このビオチン標識体をアビジン樹脂に固定化させた後、MRSA 由来のタンパク質を加え、4°C 下で 1 時間混和させた後に非特異的に吸着したタンパク質を PBS で洗浄した。最終的に、cyslabdan 結合タンパク質を Laemmli 緩衝液を用いて変性させることで樹脂より回収した。A-1)と同様に、ゲル内トリプシン消化法によりタンパク質を同定した。

B-2) Cyslabdan 結合タンパク質 SAR1388 の組み換え体を用いた結合実験

S. aureus FDA209P の染色体 DNA を鋳

型に増幅した sar1388 を pET-21a(+) に連結した後、大腸菌 *E. coli* Rosetta (pLys) 株に導入し、ヒスタグ融合させた組み換えタンパク質を発現調製した。さらに、定法に従い、大腸菌破碎液をニッケルカラムで精製することにより組み換えタンパク質を得た。これを biotinylcyslabdan との結合性の評価に使用した。その解析には B-1) と同じ手法を用いた。

B-3) MRSA 細胞壁ペプチドグリカン組成の解析

de Jonge らの方法 (*J. Biol. Chem.*, **267**, 11248-11254, 1992) に従って、cyslabdan (終濃度 4 μ g/mL) を処理した MRSA 菌体より、SDS 存在下で煮沸処理し、続いて超音波破碎により細胞壁を回収した。次いで、これを各種酵素 (α -amylase、DNase、RNase、trypsin と alkaline phosphatase) で処理した後に NaBH₄ で糖部分を還元し、得られたムロペプチドを ODS カラムを用いた酸性条件下 (リン酸緩衝液とメタノールの混合液) で HPLC 分析を行った。

C) Spirohexaline に関する研究

既にクローニングされている *S. aureus* の UPPS 酵素の配列情報に基づき、*in silico* で viridicatumtoxin と本酵素の 3 次元モデル構造を CHIMERA モデリング法を用いて構築し、Choose LD を用いて、化合物とタンパク質との結合様式を解析した。

4. 研究成果

A) Lariatin に関する研究

A-1) 作用機序の解析

Lariatin A は、*M. smegmatis* 及び *M. tuberculosis* に対して選択的な生育阻害活性を示す (それぞれの MIC 値は 0.01 μ g/mL と 0.39 μ g/mL)。既存薬とはその基本構造が全く異なっており、特異な投げ縄構造を有することから新しい作用機序により抗結核活性を示すことが期待されている。Lariatin 類似の投げ縄ペプチドとして、グラム陰性細菌が生産する microcin J25 及び capistrain が知られており、これらは共に DNA 依存性 RNA polymerase を阻害することにより抗菌活性を示すことが報告されている。そこで、lariatin A もまた同じ機序を有する可能性を想定し、まず各種ラベル体を用いた取り込み実験を行った。その結果、lariatin A は、50 μ g/mL の濃度条件下において、³H]thymidine の高分子画分 (DNA) への取り込みを時間依存的に阻害することが明らかとなった。一方で、³H]uracil、³H]leucine と ³H]N-acetyl-glucosamine の高分子画分 (RNA、タンパク質や細胞壁ペプチドグリカン) への取り込みには影響せず、また ¹⁴C]acetic acid からの脂肪酸及びミコ

ールの生合成に対して影響しなかった。

次に, lariat A の DNA 合成阻害に関わるターゲット分子を同定するために, *M. smegmatis* 抽出タンパク質の中より化合物と親和性を示すタンパク質を検索することにした。まず, biotinyl lariat A の活性を調べた結果, 抗 *M. smegmatis* 活性の保持が確認できた。そこで次に, ビオチン標識体をアビジン樹脂に固定化した後, *M. smegmatis* 抽出タンパク質を材料に結合タンパク質を解析した結果, 25 kDa から 37 kD 間のバンドが再現性良く検出されることを確認した。続いて, そのタンパク質のバンドを切り出し, 定法に従って, ゲル内トリプシン消化後に, ペプチド断片を LC-MS/MS

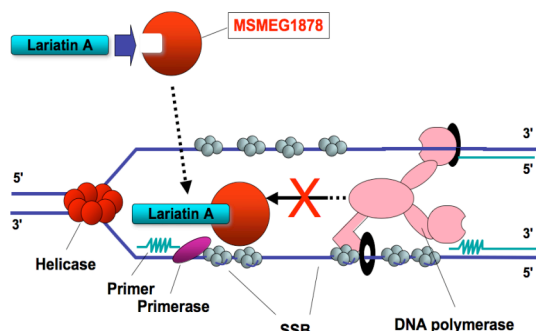


図2 Lariat A の作用機序の仮説

で解析した結果, 本タンパク質を MSMEG1878 と同定した。さらに, この結果は組み換え MSMEG1878 タンパク質を用いた結合実験の結果からも支持された。

本タンパク質の機能は未知であったが, ホモロジー検索により, sigma 54 modulating protein と類似性が高いことが予測された。Sigma 54 は, RNA polymerase の構成タンパク質のひとつであり, DNA のどの部位に結合するか決定する役割を担っている。これより, lariat A は sigma 54 modulating protein に結合し, RNA polymerase を阻害する可能性が想定されたが, lariat A はラベル体の取り込み実験の結果より, [¹⁴C]uracil の高分子画分 (RNA) への取り込みを阻害せず, また生物情報科学的な解析より結核菌は sigma54 family のシグマ因子は存在していないことが分かっている。従って, MSMEG1878 は, 結核菌の場合には異なる機能を持つと推定された。そこで, 本タンパク質の機能を調べる目的で, MSMEG1878 と相互作用するタンパク質を *M. smegmatis* の抽出タンパク質の中より検索することにした。その結果, 15 kDa 付近のタンパク質を再現性良く検出し, これを LC-MS/MS の解析より single-stranded DNA binding protein (SSB) と同定した。大腸菌における研究から, SSB は, DNA 複

製, DNA 修復と DNA 組み換えといった DNA transaction に関わる鍵タンパク質であり, 一本鎖 DNA に結合することで安定化させることが分かっている。Lariat A が, *M. smegmatis* の DNA 合成を阻害することを考慮すると, 本タンパク質は DNA 複製に関わるタンパク質であることが期待される。さらに, タンパク質のドメイン分析からは, MSMEG1878 は, DNA 結合部位を持っておらず, DNA に直接作用しないと推定される。おそらく, MSMEG1878 は, SSB に結合し, その機能を調節するタンパク質と予想される。以上のことをまとめ, lariat A の作用機序の仮説を図2に図示している。初めに lariat A は, MSMEG1878 に結合することで複合体を形成し, これが引き金となり SSB の機能が阻害され, その結果として *M. smegmatis* の DNA polymerase がうまく働かなくなると予想される。

A-2) 生合成遺伝子の解析

生産菌 *R. jostii* K01-B0171 株より, lariat A の生合成に関わる遺伝子を同定し, 5つの ORF (*larA~E* と命名) がオペロンを形成し, かつ lariat A がリボソームで形成されることを明らかにした。さらに, 放線菌宿主発現系 (*R. jostii* K01-B0171:: Δ *larA*) を確立し, プラスミドを改変導入する手法を用いて, 30 種以上のアミノ酸変異体を人為的に作製した。その結果, 投げ縄構造の形成や抗結核活性に必須なアミノ酸残基を特定することができた。今後, これらのファーマコフォアの情報をもとに, *in silico* の non-peptide 創製への応用に期待がもてる。

B) Cyslabdan に関する研究

これまでに, imipenem の抗 MRSA 活性増強物質としては, ポリフェノール類である植物成分 (epigallocatechin gallate, corilagin や tellimagrandin I) やジテルペン (植物成分 totarol や合成剤 MC-200,616 化合物) が主に知られている。これら作用メカニズムは生化学的な解析により明らかにされ, β -ラクタム薬に低親和性のトランスペプチダーゼ PBP2' の活性や発現に影響することにより imipenem 活性増強作用を引き起こすことが報告されている。しかし, cyslabdan は PBP2' に対してそのような作用や影響は確認されなかった。

そこで, 別のアプローチとして, MRSA 抽出タンパク質の中より cyslabdan と親和性を示すタンパク質の同定を試みた。まず, 合成した biotinyl cyslabdan の活性を調べ, imipenem の抗 MRSA 活性を増強する作用を保持していた。次に, このビオチン標識体を用いて, MRSA 抽出タンパク質の中より化合物と親和性を示すタンパク質を検索

した結果、50 kDa 付近のタンパク質のバンドが再現性良く検出されることを確認した。続いて、そのタンパク質のバンドを切り出し、定法に従って、ゲル内トリプシン消化後に、ペプチド断片を LC-MS/MS で解析した結果、本タンパク質を SAR1388 と同定した。

実際に、cyslabdan が SAR1388 と相互作用するか確認する目的で、*S. aureus* 由来の組み換え SAR1388 タンパク質を材料に、biotinylcyslabdan を固定化させたアビジン樹脂を用いて解析した。その結果、期待していたように、SAR1388 と cyslabdan が結合することが確認された。

SAR1388 は、別名 factor essential for expression of methicillin-resistance A (FemA) とも呼ばれており、MRSA のペプチドグリカン合成において重要な役割をすることが知られている。MRSA はペプチドグリカンの最小単位であるムレイン単量体どうしがペンタグリシンを介して架橋される特徴を有する。この架橋反応には 4 つの酵素が関与する。まず、FemX 酵素がムレイン単量体中の *L*-リシン残基から最初のグリシン残基を連結させる。続いて、FemA 酵素により 2 番目と 3 番目のグリシン残基が連結された後に、FemB 酵素が 4 番目と 5 番目のグリシン残基を連結し、最終的に、PBP 及び PBP2' 酵素が末端のグリシン残基と別のムレイン単量体中の *D*-アラニン残基とを架橋し、細胞壁ペプチドグリカンが合成される。一方で、FemA を欠損させた MRSA 変異株では β -ラクタム薬に対する感受性が回復し、さらにはモノグリシンが置換したムレイン単量体がペプチドグリカン中に蓄積することが報告されている。従って、以上の知見は、cyslabdan の標的分子が FemA であることを強く示唆するものと考えられる。

Cyslabdan の標的分子が FemA であることを立証する目的で、MRSA のペプチドグリカン組成に対する cyslabdan の影響を解析した。その結果、cyslabdan 処理した MRSA ではムレイン単量体領域に 2 つのピークの蓄積が観察された。これらのピークを HPLC 分取し、ESI-MS で解析した結果、モノグリシン置換ムレイン単量体及びグリシン未置換ムレイン単量体であると決定した。その一方で、トリグリシン置換ムレイン単量体は検出されなかった。従って、cyslabdan は FemA に作用し、ペンタグリシンの伸長反応を阻害していることが明らかとなった。

以上、得られた知見に基づいて推定された cyslabdan のイミペネムの抗 MRSA 活性増強作用の機構を図 3 に図示した。MRSA を cyslabdan で処理すると FemA による酵素反応が阻害された結果、モノグリシン置

換及びグリシン未置換ムレイン単量体が蓄積する。しかしながら、cyslabdan 自身は抗 MRSA 活性をほとんど示さないことから、PBP と PBP2' の両方あるいはいずれかがこれらの基質を認識し架橋しペプチドグリカン生成を生成することができると推定される。一方で cyslabdan と IPM を併用すると MRSA の生育は完全に阻止される。すなわち、IPM 存在下でも機能できる PBP2' はモノグリシン置換ムレイン単量体を基質として使えず架橋できないと推定され、MRSA のペプチドグリカン合成の進行が完全に停止するものと推定される。

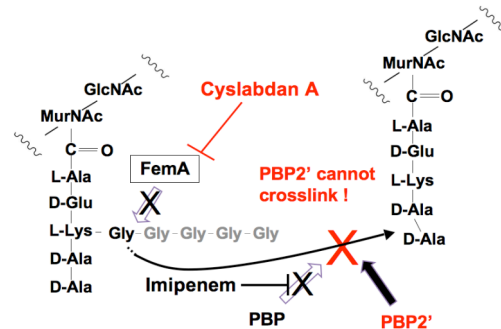


図 3 Cyslabdan の作用機序の仮説

C) Spirohexaline に関する研究

UPP synthase は、lipid cycle におけるムレインモノマーの担体として働き、ペプチドグリカン合成に関与する細菌の生育に必須な酵素である。本酵素は、細菌特異的に存在する *cis* 型プレニル鎖伸長酵素であり、1 分子の farnesyl pyrophosphate と 8 分子の isopentenyl pyrophosphate を合成する。先の研究において、本酵素活性に対する影響及び *S. aureus* と *B. subtilis* に対する抗菌活性を評価するというアプローチから、真菌の生産する viridicatumtoxin 及び spirohexaline を発見した。これら化合物は、スピロを特徴とする多環性化合物であり、MRSA にも強い抗菌活性を示すのが特徴である。Spirohexaline は、viridicatumtoxin の 13 位のアミノ基がメチル基に置換した構造を有している。

In silico での分子モデリング実験の結果を、図 4 に図示している。UPP synthase は 2 つの α -ヘリックスによって形成されるクラフトにリガンドが結合し、プレニル鎖伸長反応が進行する。Viridicatumtoxin は UPP synthase の活性ポケット奥側の疎水性領域にスピロ環が結合すると予測された。すなわち、Glu88 は viridicatumtoxin の親水部の 1 位のカルバモイル基のケトンと結合する。さらに、viridicatumtoxin の 5 位、10 位と 12 位の水酸基は、それぞれ Ala76、Met54 と Asn35 と水素結合していると考えられた。また、Ile57、Leu95、Phe99 と Phe148 は疎水ク

ラフトを形成しており、疎水クラフトにスピロ環の疎水性基が結合していると推定された。

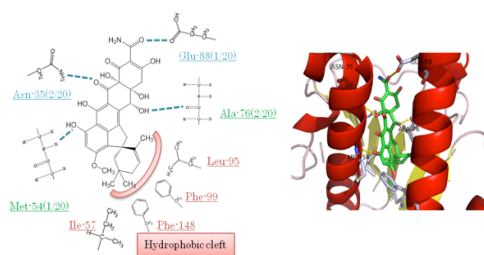


図4 黄色ブドウ球菌由来の UPP synthase 酵素と viridicatumtoxin とのドッキングモデル

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 22 件)

① Inokoshi J., Matsuhama M, Miyake M, Ikeda H, Tomoda H. (2012) Molecular cloning of the gene cluster for lariatins biosynthesis of *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *Appl Microbiol Biotechnol.* in press.

DOI: 10.1007/s00253-012-3973-8

② Tomoda H. (2012) Mode of action of microbial anti-MRSA agents. *Yakugaku Zasshi.* **132**, 37-44.

DOI:10.1248/yakushi.132.37

[学会発表] (計 35 件)

① Tomoda H.
Mechanism of action of new anti-infectious agents from microorganisms.

The Uehara Memorial Foundation Symposium
2011 (Tokyo) 2011.6.8

② 供田 洋

微生物由来の抗 MRSA 剤の作用機構の解析

日本薬学会第 131 年会一般シンポジウム
(静岡) 2011.3.29

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

①名称: MRSA 産生黄色色素の生成阻害能を示す新規化合物とその製造方法

発明者: 供田 洋、福田隆志、小山信裕

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特願

番号: 2011-156720

出願年月日: 2011.7.15

国内外の別: 国内

②名称: MRSA 産生黄色色素の生成阻害能を示す新規化合物とその用途

発明者: 供田 洋、長光 亨、福田隆志、小山信裕

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特願

番号: 2011-224968

出願年月日: 2011.10.12

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

供田 洋 (TOMODA HIROSHI)

研究者番号: 7 0 1 6 4 0 4 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

・猪腰 淳嗣 (INOKOSHI JUNJI)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号: 3 0 1 5 1 6 4 0

・内田 龍児 (UCHIDA RYUJI)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 6 0 2 8 0 6 3 2

・小山 信裕 (KOYAMA NOBUHIRO)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号: 6 0 4 3 9 1 5 6

・長光 亨 (NAGAMITSU TORU)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号: 9 0 3 0 0 7 5 6

・梅山 秀明 (UMEYAMA HIDEAKI)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号: 2 0 0 5 0 6 1 9