

平成 2 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号： 7 2 8 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2012 ~ 2013

課題番号： 2 4 7 1 0 2 5 4

研究課題名（和文）バンコマイシンよりも優れた治療効果を示すトリプロペプチンCの作用機序解析

研究課題名（英文）Mode of action study of tripropeptin C, which exhibits excellent in vivo efficacy superior to vancomycin

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： 1 0 3 1 1 2 7 6

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円、（間接経費） 1,110,000 円

研究成果の概要（和文）：トリプロペプチン（TPPC）は、院内感染で問題となっている薬剤耐性菌 MRSA に対し、動物実験においても非常に優れた治療効果を示す。我々は、どのような機構で TPPC が、耐性菌 MRSA に作用するかを明らかにすることを目的に検討を行った。その結果、TPPC の分子内のカルボン酸が抗菌活性に必須であること、ならびに既に明らかにしている標的分子と TPPC の結合の強さを明らかにした。さらに固体 NMR を利用して詳細な分子レベルでの作用機序を明らかにするため、安定同位体でラベルした TPPC などを発酵生産した。

研究成果の概要（英文）：Natural lipopeptide antibiotic tripropeptin C (TPPC) exhibits excellent in vivo efficacy in a mice-MRSA septicemia model. MRSA is well-known as multi-drug resistant, major nosocomial pathogen. The purpose of this study was to reveal how TPPC acts against MRSA. We found carboxylic acids in TPPC molecule are essential to exhibit antimicrobial activity. And we revealed the dissociation constant between TPPC and its target molecule UPP. We accomplished to produce isotope-labeled TPPC for the analysis of molecular based interaction by using solid-state NMR.

研究分野： 複合新領域

科研費の分科・細目： 生物分子科学・生物分子科学

キーワード： 薬剤耐性菌 院内感染 トリプロペプチン バンコマイシン MRSA

はあったが、フッ素ラベルされた7種のTPPC新規類縁体が生産された。フッ素導入TPPC類縁体の単離精製を行い、NMR、質量分析および構成アミノ酸のマーフィー法による解析から、フッ素が導入されていること、ならびにどの部位にフッ素が導入されたかについて推測できた。一方で、いまだに生産量ならびに収量が微量である。そこで、発酵生産条件および精製条件の改良を継続している。特に、4-フルオロプロリンは、TPPC生産菌に対し、培養開始後短時間であるほど、毒性の影響が顕著に表れるため、添加時間と添加量について様々な条件検討を進めている。¹³C-, ¹⁵N-, フッ素化標識体を必要量確保した後に、共同研究先にサンプルを送り固体NMRを利用して、TPPCのどの部位が黄色ブドウ球菌に対してどのように作用しているかを明らかにする予定である。なお、フッ素導入体は、いずれも抗菌活性を示したが、親化合物であるTPPCと比較して10分の一程度の抗菌活性であった。

(2) これと並行して、微化研 日吉支所との共同研究でTPPCの半合成誘導体を調製し、構造活性相関研究を行った。TPPCの分子内には特徴的な官能基として、2つのカルボン酸とグアニジル基が存在する。まずはカルボン酸の役割を明らかにすべく、カルボン酸に種々の化学修飾を行なったところ、どちらか一方のカルボン酸をメチルあるいはジフェニルメチルエステル化すると活性が8倍程度低下し、双方のカルボン酸を修飾すると抗菌活性が完全に消失することが明らかとなった(表1)。このことから、分子内に2つ存在するフリーカルボン酸が抗菌活性に必須であることが強く示唆された。さらに興味深いことに、上記ビスメチルエステル-TPPC(図3)は、標的分子との複合体形成能を失っていることが明らかとなり(図4)、TPPC分子内のカルボン酸が、標的との結合に必須であることが明らかとなった。(The Journal of Antibiotics (2014) 67, 265-268; doi:10.1038/ja.2013.128)

表1 TPPC とビスメチルエステル-TPPC (BM-TPPC)の臨床分離 MRSA 10株に対する抗菌活性

	MIC (μg/mL), MRSA (n=10)	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀
TPPC	0.78	1.56
BM-TPPC	100	100

図3 TPPC とビスメチルエステル-TPPC (BM-TPPC)の構造

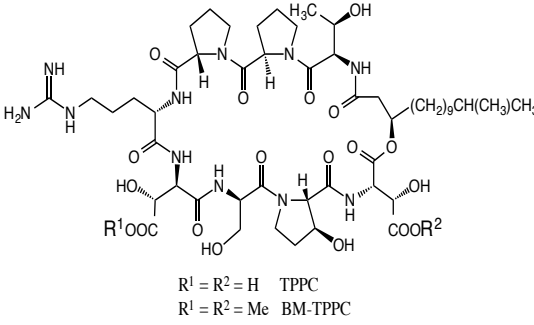
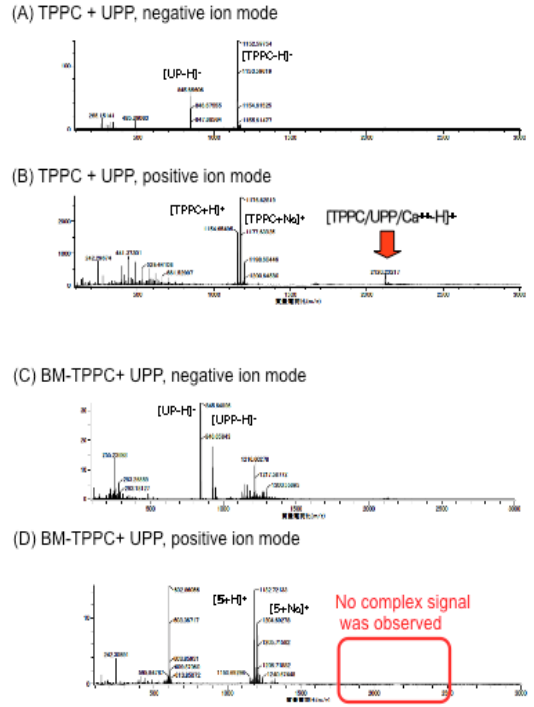


図4 TPPC とビスメチルエステル-TPPC の質量分析による標的UPPとの結合試験



(3) メチシリン感受性黄色ブドウ球菌であるスミス株を用いて、細胞壁合成下流の酵素の過剰発現株を作成したが、TPPCはいずれの変異株に対してもベクターコントロールや親株と同じ感受性を示し、酵素過剰発現による低感受性化は認められなかった。なお、陽性対照化合物として用いたツニカマイシン、バシトラシン、モエノマイシンでは対応する標的遺伝子の過剰発現株に対し明確な低感受性化が認められた。この他、TPPCの生物活性の検討の過程で、TPPCと既存のMRSA薬を併用することでMRSAに対し相乗的な抗菌活性を示すことを見出し、これを特許出願した。薬剤の併用療法は、投与量の低減による副作用の回避、耐性菌出現の抑制、ひいては社会保障費・医療費の削減につながるため、本知見は極めて重要なデータである。今後さらに多面的に検討を重ね、作用機序のより詳細な解明と実用化に向けた知見を積

み重ねていきたいと考えている。

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. 橋爪秀樹

新規抗 MRSA 抗生物質トリプロペプチンの作用機序解析 - SPR を利用した低分子-低分子間相互作用解析の一例 -

第 13 回 日本蛋白質科学会年会 2013.6.13, とりぎん文化会館 (鳥取市)

2. Sehei Hirosawa^{*1}, Hideki Hashizume, Yoshihiko Kobayashi^{*1}, Ryo Watabe^{*1}, Kunio Inoue, Yuko Takahashi, Shigeko Harada, Syunichi Ohba^{*2}, Tohru Masuda^{*2}, Ryuichi Sawa, Yoshiaki Takahashi^{*1}, Toshiaki Miyake^{*1}, Akio Nomoto and Masakatsu Shibasaki.

In Vitro Antimicrobial Activity and In Vivo Efficacy In a Mouse Staphylococcal-Septicemia Model of Water-soluble Tripropeptin C Analogs.

52nd ICAAC 2012.9.11. Moscone Convention Center (San Francisco, USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：併用抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌薬、及びβラクタム系抗生物質の抗菌活性増強剤

発明者：橋爪秀樹

権利者：公益財団法人 微生物化学研究会

種類：特許

番号：特願 2013-249729

出願年月日：2013 年 12 月 3 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

(1)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