

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670049

研究課題名(和文) 微生物二次代謝産物からの新抗結核薬の探索

研究課題名(英文) Screening of anti-tuberculosis substances produced by microorganism

研究代表者

三浦 広美 (Miura, Hiromi)

北里大学・感染制御科学府・助教

研究者番号：20462252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗結核薬の新たな標的として、細菌のペプチドグリカンの構成成分であるジアミノピメリン酸(DAP)の合成経路に着目し、簡便なペーパーディスクアッセイ法による抗結核物質の探索を行った。放線菌および糸状菌の培養抽出液約9600サンプルについてスクリーニングを行なった結果、Streptomyces sp. K12-0214の培養液中にDAP合成経路を阻害して抗結核菌活性を示すと思われる有望な物質を見出した。活性物質の単離には至っていないが、活性物質は水溶性であり、酸性条件下で活性が保持される、抗菌スペクトルは既存の抗結核薬であるリファンピシンおよびイソニアジドとは異なっていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To discover anti-tuberculosis drugs with a new mechanisms of action, we invented simple screening system that is targeted to biosynthesis pathway of diaminopimelate (DAP). We screened approximately 9,600 culture broths of actinomycete and fungi. As a result, we found anti-mycobacterium substance produced by Streptomyces sp. K12-0214. This substance is water-soluble, irreversibly inactivated under basic condition. Anti-microbial spectrum of this material was different from that of existing drug isoniazide and rifampicin.

研究分野：応用微生物学

キーワード：抗結核菌物質 放線菌 微生物培養抽出液 二次代謝産物

### 1. 研究開始当初の背景

結核は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)によって引き起こされる感染症である。WHOのレポートによると、2011年には世界で約870万人が結核に罹患し、約140万人が結核を原因として亡くなっている。日本においても、1990年代後半に結核患者の発生件数、罹患率の増加が見られ、さらに最近では代表的な結核治療薬であるリファンピシンとイソニアジドに耐性を示す多剤耐性結核の出現という新しい問題も生じている。そのため、既存の薬剤とは作用部位が異なる抗結核薬の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな作用機序を持つ抗結核薬の開発である。われわれは、新たな標的として細菌のペプチドグリカンの構成成分であるジアミノピメリン酸(DAP)の合成経路に着目した。細菌と植物において、DAPはlysine生合成の中間体である。この経路はDAP経路とよばれている(図1)。真菌やミドリムシなどはアミノアジピン酸を中間体とする経路(アミノアジピン酸経路)でlysineを生合成する。また、動物はlysineの合成系を持っていない。さらに大多数の細菌において、DAPはlysine生合成の中間体であるとともに細胞壁の構成成分である。そのため、この経路を阻害する物質は、細菌に対して選択性が高く、副作用の少ない薬剤になる可能性が高い。

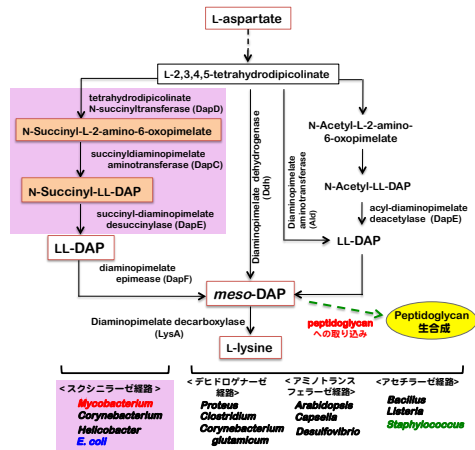


図1 細菌や植物の lysine 合成経路

また、現在使用されている代表的な結核治療薬であるリファンピシンとイソニアジドは、それぞれ RNA 合成開始とミコール酸合成に対する阻害剤であり(表1)、DAP経路は全く新しい標的であることから、この経路を阻害する物質が見つければ、多剤耐性結核に罹患した患者の治療に非常に有効である。また、作用機序の異なる薬剤を組み合わせる事は、耐性菌の出現頻度を抑える効果がある。

抗結核薬物質の探索源として放線菌およ

び糸状菌の培養液を用いた。培養液には、多様な構造を持つ二次代謝産物が含まれており、候補物質の探索源として非常に有望である。さらに、保有している280の天然物(化合物)も合わせて評価した。

表1 主要抗結核薬の作用機序

イソニアジド	Catalase/ peroxidase 活性阻害 ミコール酸(細胞壁成分)合成阻害 その他
リファンピシン	RNA合成開始阻害
ストレプトマイシン	タンパク合成阻害
エタンブトール	アラビノガラクトン(細胞壁成分)合成阻害
ピラジナミド	脂肪酸合成阻害
レボフロキサシン	DNAジャイレース阻害

### 3. 研究の方法

(1) 微生物の培養抽出液を用いたスクリーニング

#### 放線菌および糸状菌の培養

液体培地(10 ml)および固体培地(5 g)が入った試験管に、土壌や植物の根などから分離した放線菌および糸状菌を植菌し、培養を行なった。培地組成を表2に、培養条件を表3に示した。培養温度は27℃、振盪培養は、300 rpmで行なった。

表2 スクリーニングに用いた培地の組成

30 培地	51 培地	54 培地
Glucose 0.1%	Glucose 0.5%	Soluble starch 2.0%
Starch 2.4%	C. E. F. 0.5%	Glycerol 0.6%
Peptone 0.5%	Casein 1.0%	(株) 厚木小波証券 1.0%
Meat extract 0.3%	Pharmamedia 1.0%	Meat extract 0.3%
Yeast extract 0.5%	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5%	Dry yeast 0.3%
CaCO <sub>3</sub> 0.4%	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.5%	CaCO <sub>3</sub> 0.2%
Trace metals sol. 1ml/L	Trace metals sol. 1ml/L	Tap water, pH調整済
Tap water, pH調整済	Tap water, pH7	
57 培地	F8Q 培地	F40 培地
Glucose 2.0%	Soluble starch 3.0%	リブレフアワー 3.0%
Peptone 0.5%	Glycerol 1.0%	Sucrose 1.0%
Dry yeast 0.3%	S.B.M. 2.0%	Yeast extract 1.0%
Meat extract 0.5%	Dry yeast 0.3%	Glycerol 0.5%
NaCl 0.5%	ECG 0.3%	NaN <sub>3</sub> 0.5%
CaCO <sub>3</sub> 0.3%	CaCO <sub>3</sub> 0.2%	Ammonium acetate 0.5%
Tap water, pH7	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.001 %
	K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> P <sub>4</sub> 0.05%	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.001 %
	Quercetin 0.02%	Sodium valproate 0.02%
	Tap water pH 6.5	Tap water pH 6.0
F86 培地	F86 培地	
イタリヤ米 5g/本	Sucrose 3.0%	
馬布茶濃液* 5mL/本	Soluble starch 3.0%	
*馬布茶濃液 5g/60 mL	Malt extract 1.0%	
	Rhizus 0.3 %	
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%	
	K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> P <sub>4</sub> 0.5%	
	Tap water pH 6.0	

表3 培養条件

培地	培養条件
放線菌 30, 51, 54, 57	27℃、6日間振盪培養
F8, F40	27℃、6日間振盪培養
糸状菌 F88	27℃、8日間振盪培養後、室温(25℃)で10日間静置培養
F86	室温(25℃)で13日間静置培養

#### 培養抽出液および検定プレートの作製とペーパーディスクアッセイ

培養液にエタノール10mlを加えて混和し、菌体内の成分を抽出した。その後遠心(3,000 rpm, 10分)して得た上清(50% EtOH溶液)を培養抽出液とし、スクリーニングに供した。検定プレートは、菌液を混ぜた寒天培地を角

形シャーレに流し込んで作製した。丸形紙片（ペーパーディスク）に培養抽出液 50  $\mu$ l をしみこませ、風乾した。プレートにのせて培養（37  $^{\circ}$ C、24-48 時間）した後、ディスクの周りに形成された阻止円を観察し、判定した。

#### 一次スクリーニング

結核菌と同じ *Mycobacterium* 属に属し、非病原性である *M. smegmatis* を用いてペーパーディスクアッセイを行った。阻止円を示すサンプルを一次スクリーニング通過とした。

#### 二次スクリーニング（5 種抗菌アッセイ）

DAP 合成経路の違い（図 1 参照）を利用して、*Mycobacterium* と同じスクシニラーゼ経路をもつ菌に抗菌活性を示すようなサンプルを選択した。すなわち、スクシニラーゼ経路を持つ *M. smegmatis*, *E. coli*, アセチラーゼ経路を持つ *S. aureus*, アミノアジピン酸経路を持つ *M. racemosus* と *C. albicans* の計 5 種の菌を用いてペーパーディスクアッセイを行い、*M. smegmatis* と *E. coli* にのみ阻止円を示すサンプルを二次スクリーニング通過とした（図 2）。

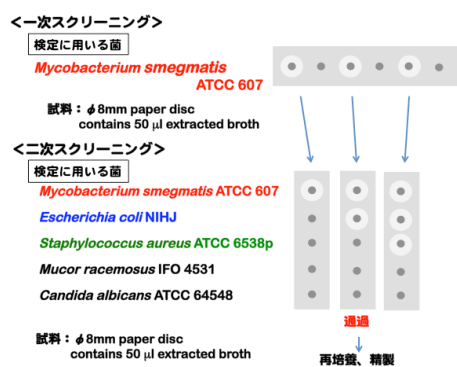


図2 スクリーニングの手順

#### (2) 活性物質の単離、精製

##### 酢酸エチルまたは n-ブタノールによる抽出

培養抽出液をエバポレーターにかけてエタノールを留去した後、等量の酢酸エチルまたは n-ブタノールを加えて混和し、有機溶媒層と水層に分配した。

##### 性状確認試験及び再培養

スクリーニングで選択した候補サンプルについて、中性、酸性、塩基性の条件で酢酸エチルによる抽出試験を行い、有機溶媒層と水層を用いてペーパーディスクアッセイを行なった。さらに三角フラスコを用いて再培養を行い、抗菌活性の再現性を確認した。

##### 活性炭カラムを用いた分画

酢酸エチルで分配した水層を、活性炭カラムを用いて分画した。溶出は、 $H_2O$ , 50% acetone, 100% acetone（いずれも塩酸で約 pH3 に調整した）で行なった。

##### 薄層クロマトグラフィー（TLC）による分離、かきとりと抽出

活性炭 50% acetone 溶出画分を、セルロース TLC (Microcrystalline cellulose CEL 400-10, MACHEREY-NAGEL, 20 x 20 cm) を用いて分

離した。開始点より 1 cm ずつ区切って樹脂をかきとり、試験管に入れた。0.1% TFA 溶液を加えて混和し、遠心後上清を回収して抽出液とした。抽出は 3 回行った。

##### HPLC による分離

TLC 画分の抽出液をポリマー系逆相カラム (Shodex ODP-2 HP-4E, Showa Denko, 4.6  $\phi$  x 250 mm) を用いて HPLC で分離した。溶出は、MeOH / 0.1% TFA (アイソクラティックモード) で、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 1 ml / min、検出は 254 nm で行なった。

## 4. 研究成果

### (1) スクリーニング結果

放線菌および糸状菌培養抽出液、化合物、計約 9600 サンプルについてスクリーニングを行なった。5 種の菌 (*Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor racemosus*, *Candida albicans*) に対してペーパーディスクアッセイを行い、結核菌と同じスクシニラーゼ経路をもつ *M. smegmatis* と *E. coli* の 2 菌にのみ生育阻害を示すサンプル（二次通過サンプル）が、放線菌より 11、糸状菌より 1、計 12 サンプル見出された。また、化合物（約 280）では、pyridomycin が二次スクリーニングを通過した（表 4）。

表4 スクリーニング結果

	サンプル数	一次通過	二次通過
精製品	278	36	1 (pyridomycin)
放線菌	3984	217 (5.4%)	11 (0.28%)
糸状菌	5360	256 (4.8%)	1 (0.02%)
	9622	509	13 (0.14%)

### (2) 二次通過サンプルの性状確認試験及び再培養

二次通過サンプル（12 サンプル）について、中性、酸性、塩基性の条件で酢酸エチルによる抽出試験を行った。その結果、放線菌のサンプルは、全て水層に活性が見られたことから、これらの活性物質は極性の高い水溶性物質であると予測された。糸状菌のサンプルでは酢酸エチル層に活性がみられたことから、活性物質は極性の低い脂溶性物質であると予測された。このうち放線菌の 4 サンプル (K12-0214 (30), K12-0214(54), K15-0178(57), K15-0182 (57))、および糸状菌の 1 サンプル (FKI- 7277(F8Q)) について三角フラスコ（培養容量は 100 ml / 本）を用いて再培養を行った。その結果、放線菌のサンプル K12-0214 (30), K12-0214(54) は三角フラスコ培養抽出液でも活性が再現した。糸状菌のサンプル FKI-7277(F8Q) は、三角フラスコ培養では活性が再現せず、大試験管（培養容量は 10 ml / 本）で培養したサンプルにのみ活性が見られた。放線菌のサンプル K15-0178(57), K15-0182(57) は三角フラスコ、大試験管培養のいずれにおいても活性が再現しなかった

(表5)。

表5. 抽出試験、再培養の結果

抽出後の活性の所在	再培養 (三角フラスコ)
K12-0214 (50),(54)	水層 活性が再現 → 精製を進める
K14-0050 (50),(57)	水層 未実施
K14-0086 (51),(54),(57)	水層 /
K14-0102 (51)	水層 /
K14-0158 (51)	水層 /
K15-0178 (57)	有機溶媒層、水層 活性再現せず
K15-0183 (57)	有機溶媒層、水層 活性再現せず
FBI-7277 (79q)	有機溶媒層、水層 活性再現せず

(3) *Streptomyces* sp. K12-0214 株が生産する活性物質の精製

*Streptomyces* 属と推定された K12-0214 株の(54)培地培養抽出液から、活性物質の精製を進めた。この候補サンプル中に含まれる活性物質は、酢酸エチル、n-ブタノールを用いた抽出試験では水層に分配され、限外ろ過 (Amicon Ultra 0.5 ml 3K, Millipore) による分画では、分子量 3K 以下の画分に活性が見られたことから、水溶性低分子物質であると予測された。また、塩基性条件下では、加熱 (50°C、1 時間) により活性が消失することが明らかになった。

活性物質を単離するために、三角フラスコ (培養容量は 100 ml / 本) にて大量培養し、活性物質の精製を進めた結果、活性物質は酢酸エチル抽出後の水層に含まれ、活性炭に吸着し、酸性 50 %アセトンで溶出された (図2)。

Streptomyces sp. K12-0214 (54)

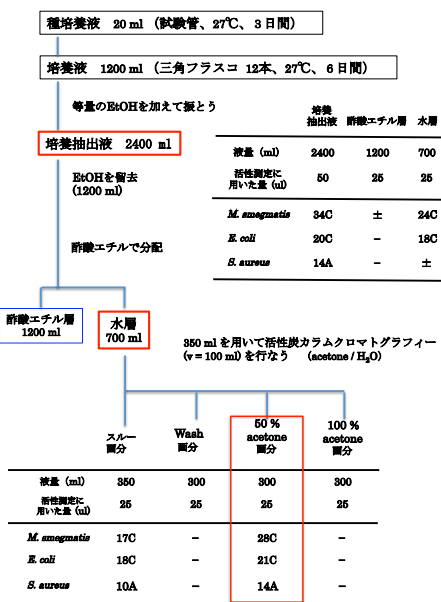


図2 精製スキーム ①

酸性 50 %アセトン画分をセルロース薄層板を用いてピリジン : n-ブタノール : 酢酸 : 水を種々の割合で混合した溶液で展開条件を検討した。その結果、n-BuOH : ピリジン : 酢酸 : H<sub>2</sub>O = 15 : 10 : 3 : 11 の条件で夾雑物と分離することができた。また、活性物質は Shodex カラム (ポリマー系逆相カラム) で非吸着画分に溶出された (図3)。

また、Shodex カラムで分画する際に酸を添加しない条件で溶出すると活性が消失する

こと、分取後に酸を添加しても活性は回復しないことから、中性および塩基性状態で不可逆的な変化 (分解や構造の変化) が起っている可能性が示唆された。

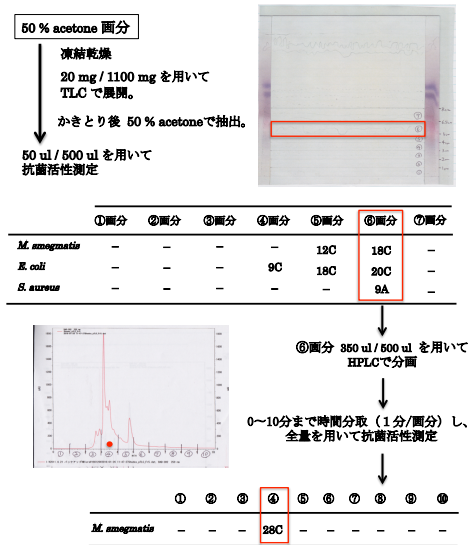


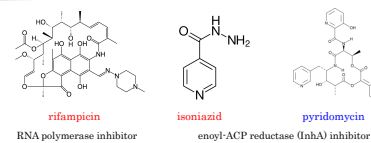
図3 精製スキーム ②

(4) 粗精製画分 (50 %アセトン溶出画分) と既知物質との抗菌スペクトルの比較

凍結乾燥した粗精製画分 (50 %アセトン溶出画分) を用いて発育を阻止する最少量を測定し、他の抗生物質の抗菌スペクトルと比較した (表5)。

表5 既存薬剤との最少発育阻止量の比較

assay strains	K12-0214 50% acetone 画分				
	rifampicin	isoniazid	gentamicin	pyridomycin	50% acetone 画分
<i>M. smegmatis</i>	4	0.8	0.8	0.8	40
<i>E. coli</i>	0.8	> 100	0.032	4	20
<i>S. aureus</i>	< 0.0064	> 100	0.16	20	> 100
<i>C. albicans</i>	> 100	> 100	100	> 100	> 100
<i>M. racemosus</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100



その結果、スクシニラーゼ経路を持つ *M. smegmatis*, *E. coli* に対してそれぞれ 40, 20 μg で発育を阻止したが、アセチラーゼ経路を持つ *S. aureus*, アミノアジピン酸経路を持つ *M. racemosus* と *C. albicans* に対しては、100 μg でも発育を阻止しなかった。この抗菌スペクトルは、今回検討した4つの抗生物質のいずれとも異なっていた。また、化合物の中で唯一、二次スクリーニングを通過した pyridomycin も *M. smegmatis* と *E. coli* の2菌に活性を示した。Pyridomycin は isoniazid と同様に enoyl-ACP reductase (InhA) inhibitor であると報告されている (Hartkoorn R.C. et al. EMBO Molecular Medicine 4, 2012, 1032-1042)。しかし、今回の結果から、pyridomycin は InhA の他にも作用点を持つことが考えられ、この

スクリーニングの標的である DAP 経路を阻害している可能性も示唆された。

また、発育を阻止する最少量の測定には至っていないが、Shodex カラムによる分離で得られた活性画分も同様の特性を保持していることが確認された。さらに回収率のよい精製方法を検討し、構造決定に必要な量の獲得をめざしていく。

## 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 1 件)

① 三浦 広美, 岩月 正人, 稲橋 佑起, 松本 厚子, 中島 琢自, 塩見 和朗, 高橋 洋子, 大村 智 **放線菌が生産する抗結核菌物質の探索** 2015 年度日本放線菌学会大会 2015 年 9 月 7-8 日 「富山国際会議場 (富山県富山市)」

[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

三浦 広美 (MIURA, Hiromi)

北里大学・感染制御科学府・助教

研究者番号 : 20462252

### (2) 研究分担者

松本 厚子 (MATSUMOTO, Atsuko)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号 : 20300759

中島 琢自 (NAKASHIMA, Takuji)

北里大学・北里生命科学研究所・特任准教授

研究者番号 : 40526216

### (3) 連携研究者

高橋 洋子 (TAKAHASHI, Yoko)

北里大学・感染制御科学府・研究員

研究者番号 : 80197186

塩見 和朗 (SHIOMI, Kazuro)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号 : 40235502

岩月 正人 (IWATSUKI, Masato)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号 : 70353464