

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07932

研究課題名(和文)失われた抗菌活性を復活させる抗菌活性増強薬の開発

研究課題名(英文)Development of an antibacterial activity enhancer that restores lost antibacterial activity

研究代表者

黒田 照夫(Kuroda, Teruo)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号：80304327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Compound K (6, 6'-dihydroxythiobinupharidine)による抗菌活性機構及び既存抗菌薬との併用効果機構について解析を行った。Compound KはDNA複製に重要なtopoisomerase IVを阻害し、その阻害様式はシプロフロキサシンやノボビオシンとは異なる新しい様式であることが示唆された。またバンコマイシンとの併用効果は、バンコマイシン耐性遺伝子群の発現抑制ではなく、結合標的であるD-alanyl-D-alanineの存在量を復活させることによることもわかった。

研究成果の概要(英文)：The action mechanism of compound K on MRSA and VRE was investigated. Compound K inhibited topoisomerase IV of *Staphylococcus aureus*. However, this action mechanism was different from both ciprofloxacin and novobiocin, already known inhibitors of topoisomerase IV. Compound K also showed the combined effect with vancomycin. Expression of vancomycin resistant cluster genes was not inhibited with compound K, and exposure to compound K restored D-alanyl-D-alanine in VRE cells.

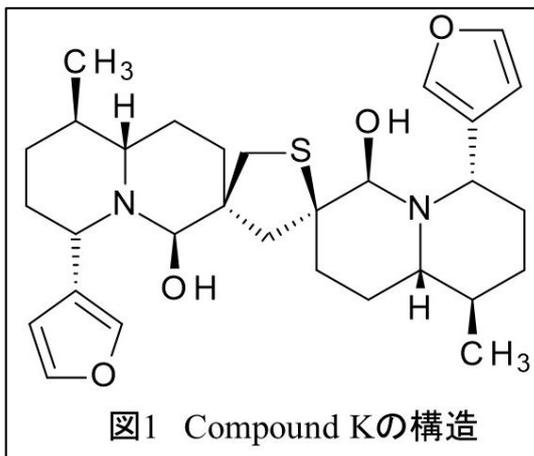
研究分野：微生物学

キーワード：topoisomerase vancomycin キノロン

1. 研究開始当初の背景

ペニシリンの開発以来、抗菌薬の開発は急速に行われてきた。しかし最近はその開発速度が鈍化している。その理由は、(1)抗菌薬の新たなターゲット分子が見当たらないこと、(2)抗菌薬耐性菌が継続的に出現すること、である。研究代表者らはこれまで抗菌薬耐性機構を明らかにすることを目的とし、特に様々な抗菌薬に対して同時に耐性を付与する多剤排出ポンプに着目して研究を行ってきた(文献 - など)。一方で、新規抗菌薬のシーズを見出すため、生薬・ハーブからメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下、MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(以下、VRE)などの抗菌薬耐性菌に対して抗菌活性を示す物質の同定を行い、その物質がなぜ抗菌活性を示すのかを分子生物学的な手法を用いて明らかにしてきた(文献 - など)。そしてそれら化合物の中には既存抗菌薬と同時に作用させると著しい活性増強作用を含む物質も見つかった。

研究代表者らは生薬センコツ(植物名コウホネ、*Nuphar japonicum*)に含まれる6,6'-dihydroxythiobinupharidine(以下、compound K(図1))が、MRSAやVREに対して、非常に強い抗菌活性を示すことを見出した。それだけにとどまらず、単独では抗菌活性を示さない濃度のcompound Kと、本来ならばVREに対して治療効果が全く期待できないバンコマイシンを併せて用いると、バンコマイシンの効果が著しく増大した(表1)。またcompound Kはバンコマイシンとは作用機構の異なるアミノグリコシド系抗菌薬の抗菌作用をも増強させる活性を持つ(表1)。そしてアミノグリコシド系抗菌薬との併用効果は、MRSAにおいても認められた。Compound Kの作用点はDNA複製において中心的な役割を果たすDNA topoisomerase IVであることを見出しているが、併用効果については、DNA topoisomerase IVの阻害だけでは説明ができない。



		最小生育阻止濃度 (μg/mL)	
		バンコマイシン	アルベカシン
VRE	コントロール	256	256
	Compound K併用	1	1
VSE	コントロール	0.5	4
	Compound K併用	0.25	0.25
MRSA	コントロール	0.25	1
	Compound K併用	0.25	0.13

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、compound Kに関して以下のことを明らかにするべく研究を進めることとした。

- (1)Compound KによるDNA topoisomerase IVに対する作用機序のさらなる解明
- (2)Compound Kとバンコマイシンとの併用効果の作用機構の解明
- (3)Compound Kとアミノグリコシド系抗菌薬との併用効果の作用機構の解明

以上の解析結果を踏まえ、抗菌薬耐性菌に対して効果がある新規物質の作用機序の解明とともに、同じターゲット分子を持つ新規化合物の同定への道筋をつけることを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1)Cleavage assay

Supercoiled plasmid DNA(pBR322) 240 ngを含む反応溶液(10 mM NaCl, 10 mM DTT, 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 200 mM potassium glutamate, 0.2 mg/mL BSA)にシプロフロキサシンもしくはcompound Kを添加した。黄色ブドウ球菌のTopoisomerase IV 1 Uを加えた後、25℃で1時間インキュベーションした。その後、0.2% SDS、100 μg/mL proteinase Kを添加し、37℃で30分インキュベーションした。反応液を1% agarose gelを用いて電気泳動し、評価した。

(2)ATPase assay

Topoisomerase IV ATPase kitを用いた。添付のbufferを用いて総量を100 μL(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 2 mM ATP, 350 mM potassium glutamate, 0.05 mg/ml albumin)とする反応液を作成した。これに0.8 mM phosphoenolpyruvate, 0.4 mM NADH, 10 nM linearized pBR322, 1 U Topoisomerase IV, 1.5 μL pyruvate kinase/lactate dehydrogenase enzyme mix及びノボピオシンもしくはcompound Kを添加した。25℃で10分インキュベーションした後、2 mM ATPとなるように添加した。10分毎に340 nmの吸光度を測定した。

(3) D-alanyl-D-alanine 存在量の測定

蛍光標識されたバンコマイシンを用いて、バンコマイシン結合量 (D-alanyl-D-alanine 存在量) に与える compound K の影響を評価した。

0. D. 650 0.1とした培養液を4本の試験管に分注し、3本の試験管にそれぞれ、1 µg/mL バンコマイシン、1 µg/mL compound K、1 µg/mL バンコマイシン + 1 µg/mL compound K を添加した。その後、37 °Cにて3時間培養した。遠心分離による集菌後、M9 最小塩培地にて1回、洗浄した。M9 培地にて懸濁して蛍光標識されたバンコマイシン (Vancomycin-BODIPY FL Conjugate) を 2 µg/mL となるように添加した。室温で5分インキュベートした後、遠心分離により集菌し、M9 培地で3回洗浄した。洗浄後、菌を M9 培地にて懸濁し、蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) Compound K による DNA topoisomerase IV に対する作用機序のさらなる解明

In vitro 実験系において、Compound K が黄色ブドウ球菌の DNA topoisomerase IV を阻害することはすでに明らかにしていた。この作用はターゲットが同じであるキノロン系抗菌薬 (シプロフロキサシン) とほぼ同等であった。シプロキサシンは topoisomerase の阻害過程において、DNA と酵素との三者複合体を形成し、一時的に DNA を切断している状態で固定するという性質を持つ (cleaved complex の形成)。そこで compound K でも同様の過程を経るのかを Cleavage assay により確認した。その結果、シプロフロキサシンとは異なり、cleaved complex を形成しなかった。このことは compound K はシプロフロキサシンと同様に topoisomerase IV を標的とするが、その作用機序は大きく異なることが示唆された (研究成果)。

ノボビオシンは topoisomerase の ATPase 活性を阻害することで抗菌活性を示す。そこで、compound K の topoisomerase IV の ATPase 活性に与える影響を評価した。ノボビオシンでは濃度依存性に ATPase 活性の阻害が見られたが、compound K では阻害活性は見られなかった (図 2)。このことから compound K の作用機序は既存抗菌薬とは異なることが強く示唆された。

作用機序が既存抗菌薬と異なることは、その化合物が新規抗菌薬としての可能性を秘めていることを意味する。一方で、作用機序が分子レベルで明らかにならなければ、抗菌薬のシーズとしての開発が進めにくい。そこで topoisomerase IV における compound K の結合部位を推定するため、すでに明らかにされている肺炎球菌の topoisomerase IV とキノロン系抗菌薬である ciprofloxacin, DNA

の三者から構成される cleaved complex (文献) 内におけるキノロン結合ポケットに対して、docking simulation を行った。しかしこの部位には結合しないと予想された。この結果は compound K が未知の作用機序を持っていることを示唆している。今後、黄色ブドウ球菌の topoisomerase IV との共結晶を用いた構造解析などを行うことで、その作用機序が明らかになると考えている。

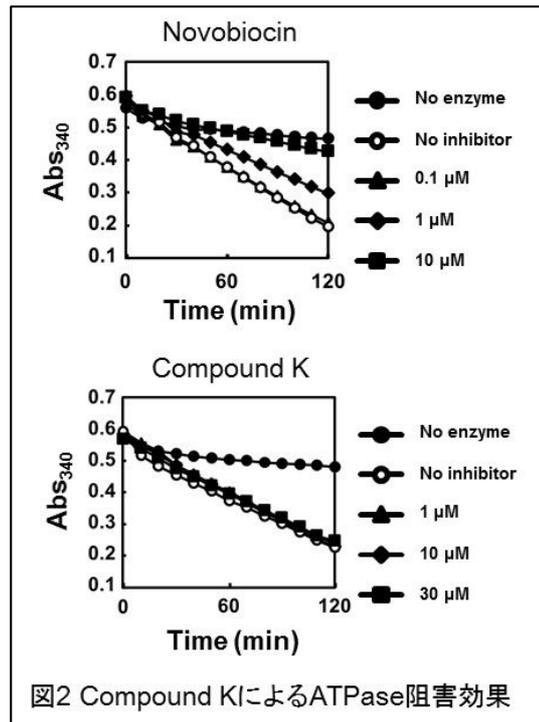


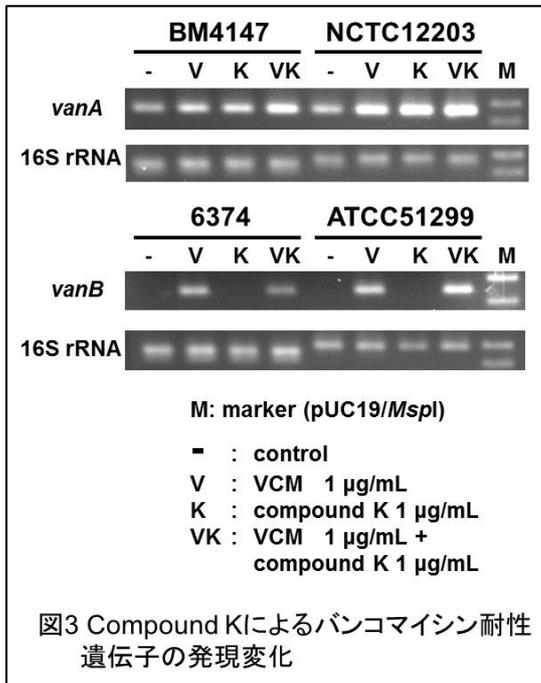
図2 Compound KによるATPase阻害効果

(2) Compound K とバンコマイシンの併用効果の作用機構の解明

Compound K は調べた 20 株程度の VRE において、バンコマイシンの併用効果が見られた (表 1)。この効果はバンコマイシン感受性腸球菌では見られなかったことから、VRE が保有するバンコマイシン耐性遺伝子群に原因があると考えられた。

バンコマイシン耐性遺伝子群は一部の株ではバンコマイシン存在下で発現誘導される。この発現制御は遺伝子群に含まれる二成分制御系である VanRS によって行われている。この VanRS に何らかの影響を与えることで併用効果が見られるのではないかと予想し、VanRS の制御下にある *vanA* 及び *vanB* の発現状態を RT-PCR により調べた。しかし、両遺伝子の発現は減少していなかった (図 3)。このことは compound K の作用機序はバンコマイシン耐性遺伝子群の発現抑制ではないことを示している。

また細胞膜上においてバンコマイシンが結合する D-alanyl-D-alanine (以降、D-Ala-D-Ala) の存在量が変化するかどうかを調べた。バンコマイシン存在下では結合標的である D-Ala-D-Ala の量は著しく減少した。バンコマイシンと compound K を共存さ



せた場合ではD-Ala-D-Alaの存在量は増えていた。このことから compound K はD-Ala-D-Alaの存在量を増やし(復活させ)バンコマイシンの結合量を増加させることでバンコマイシンに対する感受性を与えていることが強く示唆された。

以上の結果から、compound K は、バンコマイシン耐性に関与する酵素(VanA など)の活性を阻害することでバンコマイシンに対して感受性を与えていることが予想された。そこでバンコマイシン耐性遺伝子群の中で、D-Ala-D-Alaの分解や、D-Ala-D-Alaの代替でありバンコマイシンが結合できないD-alanyl-D-lactateの産生に関与する酵素を選び、タンパク質の精製を開始した。現在それらタンパク質の精製は完了しており、評価系の確立を進めている。

(3) Compound K とアミノグリコシド系抗菌薬との併用効果の作用機構の解明

Compound K はバンコマイシンだけではなく、アミノグリコシド系抗菌薬との併用効果も見られる(表1)。バンコマイシンとアミノグリコシド系抗菌薬はターゲットが異なっており、併用効果の機構も異なっていると考えられる。

アミノグリコシド系抗菌薬はターゲットがリボソームであるため、細胞内濃度が上昇すれば効果は強くなる。したがって細胞膜の透過性が上昇すれば併用効果が得られると考えられた。そこで細胞膜の傷害に関して解析を進めた。Compound K に曝露した細胞を走査型電子顕微鏡で観察したところ、明らかな差は観察されなかった。また細胞内のDNAと結合することで蛍光強度が増大するエチジウムブロマイドを用いて、細胞膜透過性試験

を行ったが、透過性の上昇は見られなかった。Compound K は静菌的に作用することからも、細胞膜の透過性による影響ではないと考えられた。

現在、compound K に曝露した細胞から調製したmRNAを用いて、RNA-seq法による発現状態を調べている。発現状態が明らかとなれば、アミノグリコシド系抗菌薬との併用効果の機構を解明する糸口にもなると考えている。

以上 compound K による抗菌効果及びバンコマイシンおよびアミノグリコシド系抗菌薬との併用効果の機構を明らかにすべく研究を進めた。今後さらに研究を進めることで、新規抗菌薬のシーズとして開発を進めることができるとともに、同様の作用を持ちながらも化学合成が行いやすい化合物のスクリーニングを行うことができると期待される。

<引用文献>

Matsuo, T. et al., Overexpression of *vmeTUV* encoding a multidrug efflux transporter of *Vibrio parahaemolyticus* causes bile acid resistance., *Gene*, 541(1), 2014, 19-25.

Onishi, M. et al., Suppression of stop codon UGA in *acrB* can contribute to antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031., *Gene*, 534(2), 2014, 313-9.

Tanaka, Y. et al., Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter., *Nature*, 496(7444), 2013, 247-51.

Eerdunbayaer et al., Structures of new phenolics isolated from licorice, and the effectiveness of licorice phenolics on vancomycin-resistant enterococci., *Molecules*, 19(9), 2014, 13027-41.

Liu, M.H. et al., Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*., *Biol Pharm Bull*, 32(3), 2009, 489-92.

Otsuka, N. et al., Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*., *Biol Pharm Bull*, 31(9), 2008, 1794-7.

Veselkov, D.A. et al., Structure of a quinolone-stabilized cleavage complex of topoisomerase IV from *Klebsiella pneumoniae* and comparison with a related *Streptococcus pneumoniae* complex. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 72, 2016, 488-96.

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2件)

黒田照夫, 小川和加野 新規抗菌薬のシーズ発掘と標的探索, 薬学雑誌, 査読無, 137(4), 2017, 383-388.

DOI: 10.1248/yakushi.16-00235-3

Okamura, S., Nishiyama, E., Yamazaki, T., Otsuka, N., Taniguchi, S., Ogawa, W., Hatano, T., Tsuchiya, T., Kuroda, T. Action mechanism of 6, 6'-dihydroxythiobinupharidine from *Nuphar japonicum*, which showed anti-MRSA and anti-VRE activities., Biochim. Biophys. Acta (General subject), 査読有, 1850, 2015, 1245-1252.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.02.012

〔学会発表〕(計4件)

Okamura, S., Nishiyama, E., Yamazaki, T., Horikoshi, Y., Otsuka, N., Taniguchi, S., Ogawa, W., Hatano, T., Tsuchiya, T., Kuroda, T. Novel anti-MRSA and anti-VRE compound from *Nuphar japonicum*, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2017, Singapore, 2017/7/17-7/21

黒田照夫, 耐性菌に効く薬を創るということ, 第28回微生物シンポジウム(招待講演), 名古屋, 2016/9/2-9/3

黒田照夫, 小川和加野 新規抗菌薬のシーズ発掘と標的探索, 日本薬学会第136年会, 横浜, 2016/3/27-3/29

岡村真弥, 西山永理, 山崎智弘, 大塚菜緒, 谷口抄子, 波多野力, 小川和加野, 土屋友房, 黒田照夫 コウホネに含まれる抗MRSA, VRE活性を有する成分の単離と解析, 第27回微生物シンポジウム, 岡山, 2015/9/4-9/5

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: 抗菌剤、及び抗菌活性増強剤

発明者: 黒田照夫、波多野力、土屋友房

権利者: 国立大学法人岡山大学

種類: 特許

番号: 特許第6084084号

取得年月日: 平成29年2月3日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/pharm/research/lab/Microbiology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 照夫 (KURODA, Teruo)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科
・教授

研究者番号: 80304327