

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06733

研究課題名(和文) 新たな天然活性物質の発掘に基づいた新規メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤の創製

研究課題名(英文) Development of novel metallo-beta-lactamase inhibitors based on the discovery of new natural products

研究代表者

浅見 行弘 (Asami, Yukihiro)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：70391844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性(AMR)の要因の一つであるIMP型メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)阻害物質のスクリーニングを簡便に行う方法を構築して、微生物培養液からのスクリーニングを実施した。MBL阻害物質の一つとして、3Z,5E-Octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydride (ODTAA)の誘導体合成ならびにその活性評価を連携研究者らと実施した。得られた活性物質については、各種検定菌によるMEPM耐性克服活性、IMP型MBL阻害活性の詳細な検討およびMEPM併用時におけるMEPM耐性菌の抗菌スペクトルを評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2014年、我が国を含むWHO加盟国によって薬剤耐性(AMR)対策アクションプランが制定された。また、我が国において薬剤耐性菌株を調べた結果、薬剤耐性の要因の一つとして国内で主流であるIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子が確認されている。このような国内外の背景から、現在、特に米国で精力的に薬剤耐性を克服する新規薬剤の研究開発が行われ始めているが、微生物培養液由来の天然活性成分からメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤を研究開発する例は少ない。したがって、新たな天然活性物質を発掘し、それをもとにメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤の創製を目指す研究は、社会的意義のある研究であると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple method for screening of inhibitors of IMP-type Metallo-β-lactamase (MBL), which is one of the factors causing drug resistance, from a microbial culture broth. 3Z,5E-Octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydride (ODTAA) was synthesized as one of the MBL inhibitors and its activity was evaluated. The synthesis of derivatives of ODTAA and the evaluation of their activity was carried out in collaboration with our collaborators. For their activity in overcoming MEPM resistance, different test strains, their MBL-type inhibitory activity were examined in detail, and their antibacterial spectrum against MEPM resistant bacteria combined with MEPM.

研究分野：医歯薬学 天然資源系薬学

キーワード：生物活性物質 微生物薬品学 生物有機化学 天然物化学 抗生物質 ケミカルバイオロジー 有機合成化学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

β -ラクタム薬は重要な抗細菌薬であるが、耐性を獲得した細菌が出現している。 β -ラクタム薬耐性グラム陰性細菌の主要な耐性機構は β -ラクタマーゼによる β -ラクタム薬の不活化である。そこで、 β -ラクタマーゼ阻害薬を使用して β -ラクタム薬の有効性を復活させることが試みられているが、既存の β -ラクタマーゼ阻害薬が効かないメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌が出現し、世界で大きな問題となっている。厚生労働省が平成 23 年に発表した「我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査」によると、全国の医療機関において確認された腸内細菌科の多剤耐性菌 153 菌株を調べた結果、大腸菌 67 株中 23 株、肺炎桿菌 35 株中 19 株、エンテロバクター 28 株中 22 株に、国内で主流の IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼの遺伝子が確認されている。また、肺炎桿菌 2 株に NDM-1 型メタロ- β -ラクタマーゼが確認されたが、これは国内としては 2 例目および 3 例目にあたる。このような実態からも、メタロ- β -ラクタマーゼを阻害する薬剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、微生物培養液をスクリーニングすることによりメタロ- β -ラクタマーゼ産生大腸菌、肺炎桿菌および緑膿菌の薬剤耐性を阻害する天然活性成分を発掘し、メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌感染動物モデルを用いて β -ラクタム薬との併用効果を検討することで、メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌感染症に治療効果を示す新規物質を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

セリン- β -ラクタマーゼ阻害剤が既に開発されていることを参考に、メタロ- β -ラクタマーゼ阻害剤も同様に開発できると考え、まず、メタロ- β -ラクタマーゼ阻害物質のスクリーニングを行うことにした。スクリーニングを簡便に行う方法として、カルバペネム系のメロペネムを用いたアッセイ系を独自に構築し、メロペネム存在下において阻止円径の大きくなる微生物培養液を同定するスクリーニングを既に開始している。また、メタロ- β -ラクタマーゼ阻害物質を産出する微生物として土壌、植物、海洋などさまざまな環境より珍しい微生物を対象とすることで、新規物質の発見につながることを期待できる。なお、発見した新規物質については、実際にメタロ- β -ラクタマーゼ阻害活性を示すかを酵素を用いて確認し、有望な阻害物質については誘導体合成により高活性化物質を創製し、動物実験でその治療効果を評価する。さらに大腸菌、肺炎桿菌および緑膿菌以外のメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌に対する有効性も評価し、抗菌スペクトルを調べていく。クラス B に属する全てのメタロ- β -ラクタマーゼの活性中心は相同性が高いことから、創製された高活性化物質は、多くのグラム陰性細菌が産生するメタロ- β -ラクタマーゼに有効であることが期待できる。

4. 研究成果

初年度はこれまでに連携研究者によって調製・供給された糸状菌ならびに放線菌培養物のおよそ 4,000 検体の微生物培養液サンプルを用いてスクリーニングを行った。すなわち、メタロ- β -ラクタマーゼ阻害物質のスクリーニングを簡便に行う方法として、カルバペネム系のメロペネムと共存しているときに阻止円径の大きくなる物質のアッセイ系を独自に構築し、微生物培養液からのスクリーニングを開始した。さらに in house の天然物化合物ライブラリーからのスクリーニングも実施した。スクリーニングは以下の一次から三次までを行った。一次スクリーニングとしてメロペネム含有培地上で阻止円が確認された検体、二次スクリーニングとしてメロペネム含有、非含有培地で選択性が確認できた検体、そして三次スクリーニングとしてメタロ- β -ラクタマーゼ阻害活性が確認できた検体。その結果、強いメロペネム耐性克服活性を示し再現性のあった 3 検体の培養液を選抜した。この 3 検体について再培養後、活性物質生産が再現されることを確認した結果、海洋土壌由来放線菌の KMA-0491、KMA-0492 ならび KMA-0493 株のそれぞれ培養液にメロペネム耐性克服活性が再現された。放線菌 KMA-0491、KMA-0492 ならび KMA-0493 株は同種の可能性があり、かつ予備的な精製実験において活性画分の挙動が一致したことから、活性物質は同一物質である可能性が高いことが示唆された。そのため放線菌 KMA-0491、KMA-0492 ならび KMA-0493 株の培養物を混合し、その培養物の活性物質を精製・単離した結果、cinnamic acid と同定した。

次年度は、連携研究者によって調製・供給された糸状菌ならびに放線菌培養物のおよそ 3,000 検体の微生物培養液サンプルを用いてスクリーニングを行った。すなわち、初年度に続き IMP 型メタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) 阻害物質のスクリーニングを簡便に行う方法として、カルバペネム系の MEPM と共存しているときに阻止円径の大きくなる物質のアッセイ系を独自に構築し、微生物培養液からのスクリーニングを開始した。その結果、強い MEPM 耐性克服活性を示し再現性のあった 2 検体の培養液を選抜した。この 2 検体について再培養後、活性物質生産が再現されることを確認した結果、沖縄土壌由来放線菌の OK19-0025 株および糸状菌 FKR-0558 株培養液に MEPM 耐性克服活性を示した。しかしながら、活性物質生産の再現性に乏しく、MEPM

耐性克服活性物質の取得には至らなかった。そこで、これまで申請者らによって MEPM 耐性克服活性物質として糸状菌より見出された 3Z,5E-Octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydride の誘導体合成とその活性評価を連携研究者らと実施した。カルボン酸をメチル化した 3Z,5E-Octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydride (ODTAA)は、より高活性であることをすでに明らかにしている。そこで、より高活性で、且つ IMP 型 MBL 産生緑膿菌にも効果のある MBL 阻害剤を得るために各種誘導体を合成し、MEPM 耐性克服活性と MBL 酵素阻害活性を評価した。

最終年度は、これまでの研究結果から MBL 阻害活性を示す糸状菌 *Paecilomyces* sp. FKI-6801 株が生産する ODTAA の誘導体合成と MBL 阻害活性評価に連携研究者らとともに注力した。ODTAA の生物学的な特異性に着目し、その構造活性相関研究を行うべく、連携研究者らにより種々の誘導体合成がなされた。加えて、その誘導体に関して、MBL 阻害活性を評価した。連携研究者らの研究室で確立した ODTAA の全合成経路を用いて種々の誘導体を合成し、MBL 阻害活性を評価したところ、ODTAA が有する無水マレイン酸骨格はジカルボ キシラート骨格との平衡にあることが示唆された。そこで我々は、より安定な化学構造としてアミドの導入を検討することとした。3-furanmethanol から調製した化合物 1 を鈴木・宮浦カップリングにより化合物 2 へと合成し、続いて Wittig 反応を行うことで側鎖を導入した。得られた化合物 3 に対する光延反応によりアミンを導入した化合物 4 を合成し、光酸化を行うことで無水マレイン酸骨格の化合物 5 を構築した。最後に、塩基による分子内環化を行うことでラクタム誘導体の合成を達成した。合成した誘導体のうち、特に 10 員環ラクタム誘導体が高い MBL 阻害活性を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中里貴々、池田朱里、富山昂大、池谷佳紀、本庄雅子、浅見行弘、廣瀬友靖、砂塚敏明
2. 発表標題 メタロ-β-ラクタマーゼ阻害物質ODTAAの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池谷 佳紀、廣瀬 友靖、浅見 行弘、松井 秀仁、野口 吉彦、花木 秀明、塩見 和朗、大村 智、砂塚敏明
2. 発表標題 抗感染症薬を指向した3Z,5E-octa-3,5-diene-1,3,4- tricarboxylic acid-3,4-anhydride (ODTAA) の全合成 と構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------