

## 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 4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310143

研究課題名（和文）感染部位環境に着目した評価系を用いる抗結核物質の探索と新規薬剤標的の開拓

研究課題名（英文）Search for new anti-mycobacterial substances using established assay system focusing on the environments of infected region, and analysis of target molecule for development of new drug targets

研究代表者

荒井 雅吉（ARAI MASAYOSHI）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80311231

研究成果の概要（和文）：結核菌が感染部位で示す特異な性状変化に着目したスクリーニング系を構築した。そして、活性試験の結果を指標に、海綿などの底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象に活性物質の探索を実施した。その結果、潜在状態の結核菌に有効な抗菌物質として、halicyclamine 類、trichoderin 類および nybomysin を見出した。さらに、ゲノム DNA ライブラリーまたは次世代シーケンス法を利用することにより、その標的分子候補の選定に成功した。一方、バイオフィーム形成を阻害する化合物として、desferrioxamine E を単離し、その作用メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To explore new medicinal leads for Tuberculosis, we succeeded in establishment of the screening systems focusing on the environments of *Mycobacterium tuberculosis*-infected region. Then, we searched the active substances from the extracts of marine organisms and the culture of marine microbe by established bioassay-guided separation. As a result, we isolated halicyclamins, trichoderins and nybomysin as anti-dormant mycobacterial substances. In addition, we succeeded in choosing the candidates of their target molecules by using genomic DNA library and/or next-generation sequencer. On the other hand, desferrioxamine E was identified as an inhibitor of biofilm formation of *Mycobacterium* species. We also clarified the action-mechanism of desferrioxamine E as an inhibitor of biofilm formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：感染症、結核、活性天然物、ケミカルバイオロジー、海綿、海洋微生物

## 1. 研究開始当初の背景

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 感染

は他の細菌感染症と異なり、宿主に感染後、多くの場合、免疫応答により結核の発症は回

避される。しかしながら一部の菌は、免疫細胞により形成される granuloma 内においてその性状を変化させ、非分裂状態の潜在性菌として、長期に渡り生存する特異な性質を持つ。そして、老化、HIV 感染、抗がん剤や免疫抑制剤の使用による免疫力の低下などをきっかけに、再び活動を開始し発症する。またこのような特殊な性状が、多剤併用による最低 6 ヶ月間の化学療法が必要な要因となっている。このことから、次世代の抗結核剤には、潜在状態の結核菌にも効果を示し、短期間で治療可能であることが求められている。

## 2. 研究の目的

本研究は、独自に構築した結核菌感染部位とその微小環境での菌の性状に着目した評価系を利用して、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスをライブラリーおよび海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象とする抗菌物質の探索を実施し、既存の抗結核剤の欠点を克服した、新規医薬リードの創出を目的の 1 つとする。またゲノム DNA ライブラリーおよび次世代シーケンズ法を利用して、見出した抗菌物質の標的分子の解析を行うことにより、結核に対する新規薬剤標的の開拓に繋げるものである。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、感染部位環境での結核菌の性状変化に着目した以下の 3 つの評価系を構築し、独自に保有する、底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象とするスクリーニングを実施した。

① 低酸素培養モデルを利用する抗潜在性結核物質の探索：非病原性で早生育型の *M. smegmatis* を 0.2% 低酸素条件で培養することにより、抗結核薬 isoniazid に抵抗性を示す潜在状態を誘導し、本条件下でも抗菌活性を示す化合物を探索した。見出した抗菌物質については、*M. tuberculosis* と同じ遅生育型で、ゲノムの相同性も高い *M. bovis* BCG を用いて活性を評価した。

② バイオフィーム形成阻害物質の探索：

*M. smegmatis* は貧栄養の MG63 培地で培養することにより、バイオフィームを形成する。スクリーニングでは、M63 培地での抗菌活性

の最小生育阻止濃度 (MIC) およびバイオフィーム形成阻害活性の MIC を測定し、抗菌活性の MIC より低濃度でバイオフィームの形成を阻害するサンプルをスクリーニングした。また 2 次スクリーニングとして、*M. bovis* BCG においてもバイオフィーム形成が阻害されるか否かを確認した。

③ *M. fortuitum* とショウジョウバエ由来 S2 細胞との細胞感染モデル：*M. fortuitum* を S2 細胞へ感染させた後、被検サンプルを添加し、細胞内の生存菌数を減少させる化合物を探索した。

(2) 見出した抗菌物質の標的分子の解析には、以下の 2 つの手法を確立して使用した。

① ゲノム DNA ライブラリーを利用する標的分子の解析：抗菌物質の標的分子を高発現する形質転換株は、その抗菌物質に対して耐性を示すことが予想される。そこで本研究では、*M. bovis* BCG のゲノム DNA を断片化したゲノム DNA ライブラリーを作成して、これで *M. smegmatis* を形質転換することにより、ランダムに *M. bovis* BCG 遺伝子を高発現する形質転換株を作成した。そしてこの中から、見出した抗菌物質に対して耐性を示す形質転換株をスクリーニングし、その形質転換株に導入されている *M. bovis* BCG のゲノム遺伝子の情報を基に、見出した抗菌物質に対して耐性を付与する遺伝子を明らかにした。

② 次世代シーケンズ法を利用する標的分子の解析：抗菌剤に耐性を獲得した細菌には、抗菌剤の標的分子やその関連分子のゲノム内に変異を有するものが数多く知られている。このことから、化合物に対して自然耐性を示す菌株が取得できた場合には、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子変異の解析を行うことにより、抗菌剤の標的分子を解明することが可能と考えられる。本研究では、見出した抗菌物質に対する自然耐性株の取得と次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子変異の解析を実施した。

## 4. 研究成果

(1) 研究開始時に構築していた、低酸素培養モデルを利用する評価系に加え、バイオフィーム形成阻害物質を簡便に見出すことが可能な評価系の構築ならびにバイオセーフティレベル 2 の実験施設でも実験可能な、

*M. fortuitum*とショウジョウバエ由来S2細胞との細胞感染モデルを利用する評価系の構築に成功した。

(2) 低酸素培養モデルを利用する潜在状態の結核菌にも有効な抗菌物質の探索では、インドネシア産の*Haliclona*属海綿の抽出エキスから、22-hydroxyhaliclonaclamine Bと命名した新規化合物を含む、合計4種のhalicyclamine類を単離し、これらが潜在状態の結核菌に有効であることを明らかにした。また、最も強力な活性を示したhalicyclamine Aは、薬剤耐性株を含む各種*M. tuberculosis*に対しても、3.0 - 6.0 µg/mLのMICを示した。海綿から分離した*Trichoderma*属真菌の培養抽出物からは、trichoderin類と命名した3種の新規aminolipopeptideを単離し、その化学構造を明らかにした。主活性成分であるtrichoderin Aは、好気および低酸素の両条件下で、*M. tuberculosis*を含む各種*Mycobacterium*属細菌に対して、MIC 0.02-0.1 µg/mLと強力な抗菌活性を示した。さらに、海洋由来放線菌の培養抽出物からは、4環性のアルカロイドnybomycinを単離・同定し、これが、潜在状態の各種*Mycobacterium*属細菌に抗菌活性(MIC 0.8 µg/mL)を示すことを初めて見出した。(図1)

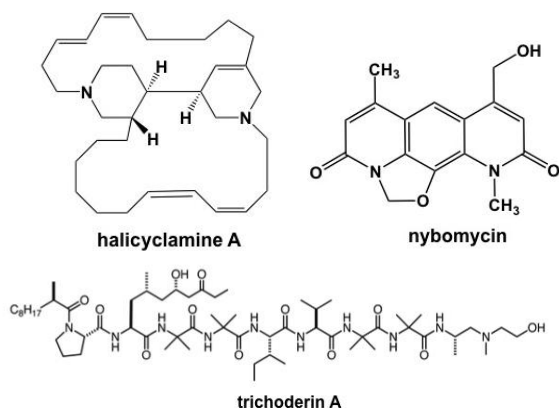


図1 潜在性結核菌に有効な抗菌物質として見出した化合物の化学構造

(3) 潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として見出した、halicyclamine Aおよびtrichoderin Aの標的分子の解析を、前述したゲノムDNAライブラリーを利用する方法により実施した。

作成した約4,000株の形質転換株の中から、halicyclamine Aに対して耐性を示す形質転換株をスクリーニングした結果、2株のhalicyclamine A耐性株の取得に成功した。また、形質転換株に導入されていたライブラリー遺伝子のシーケンシングから、halicyclamine Aに耐性を付与する遺伝子は、*M. bovis* BCGゲノム上の2920kb - 2933kbの13kb内に存在することを見出した。さらに、13kbのゲノム断片からライブラリーを作成し、耐性を付与する遺伝子を検索した結果、結核菌の機能未知の膜タンパク質である*dedA*遺伝子を高発現させた場合にのみ、halicyclamine Aに耐性となることが明らかとなった。

一方、trichoderin Aについても同様に検討を行った。その結果、3株のtrichoderin A耐性形質転換株の取得に成功し、trichoderin Aに耐性を付与する遺伝子を調べた結果、*M. bovis* BCGのATP合成酵素を構成する、*AtpB*、*E*、*F*および*H*遺伝子を含む領域を高発現させた場合にのみ、trichoderin Aに対して耐性を示しめすことを見出した。また、実際にtrichoderin Aは、菌体内ATP濃度を有意に低下させることも明らかにした。現在、さらに標的遺伝子の特定を進めている。

(4) 海洋由来放線菌から単離したnybomycinについては、自然耐性株を取得し、次世代シーケンス法により、ゲノム変異の網羅的解析を行った。そして、nybomycin自然耐性株には共通して、あるアミノ酸代謝酵素と転写因子内に変異を有することを見出した。現在、nybomycinの標的分子特定に向けたさらなる解析を進めている。

(5) バイオフィーム形成阻害物質として、海洋由来放線菌の二次代謝産物であるdesferrioxamine Eにバイオフィーム形成阻害活性を見出した。(図2)

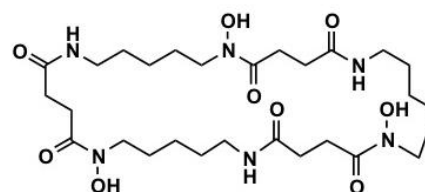


図2 desferrioxamine Eの化学構造

desferrioxamine Eは、*M. smegmatis*および *M. bovis* BCGに対して、抗菌活性を示さない濃度である10 μMでバイオフィーム形成を阻害した。また、バイオフィーム形成により惹起される、isoniazid抵抗性を解除できることを明らかにした。さらに、その作用メカニズムを解析した結果、desferrioxamine Eは、培地中の鉄イオンとキレートを形成することにより、菌体への鉄イオンの取り込みを阻害し、バイオフィーム形成を阻害していることを明らかにした。また、活性天然物を利用して、鉄イオンが*Mycobacterium*属細菌のバイオフィーム形成に必須であることを証明した。

#### 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8件)

- ① Pruksakorn P., Arai M., Liu L., Moodley P., Jacobs Jr. W.R., Kobayashi M. Action-mechanism of trichoderin A, an anti-dormant mycobacterial aminolipopeptide from marine sponge-derived *Trichoderma* sp. *Biol. Pharm. Bull.* (2011) 34(8), 1287-1290. 査読有り
- ② Arai M., Liu L., Fujimoto T., Setiawan A., Kobayashi M. DedA protein relates to action-mechanism of halicyclamine A, a marine spongean macrocyclic alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. *Marine Drugs* (2011) 9(6), 984-993. 査読有り
- ③ Ishida S., Arai M., Nikawa H., Kobayashi M. Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Biol. Pharm. Bull.* (2011) 34(6), 917-920. 査読有り
- ④ Kotoku N., Guo X.H., Arai M., Kobayashi M. Probe molecule equipped with boronic acid moiety as a reversible cross-linking group improves its binding affinity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2010) 20(14), 4152-4155. 査読有り
- ⑤ Pruksakorn P., Arai M., Kotoku N., Vilchèze C., Baughn A.D., Moodley P., Jacobs Jr. W.R., Kobayashi M. Trichoderins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma* sp., are active against dormant mycobacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2010) 20(12),

3658-3663. 査読有り

- ⑥ 荒井雅吉, 小林資正 海洋生物からの医薬シーズ探索 有機合成化学協会誌 68巻 470-479 2010年 査読有り
- ⑦ Arai M., Ishida S., Setiawan A., Kobayashi M. Halicyclamines, tetracyclic alkylpiperidine alkaloids, as anti-dormant mycobacterial substances from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Chem. Pharm. Bull.* (2009) 57(10), 1136-1138. 査読有り
- ⑧ 荒井雅吉, 小林資正 海洋天然物のケミカルバイオロジー 化学と生物 47巻 275-282 2009年 査読なし

[学会発表] (計13件)

- ① 荒井雅吉, Liu Liu、藤本貴男、小林資正 抗潜在性結核物質halicyclamine Aの作用メカニズム解析—ゲノムDNAライブラリーを利用する標的分子の解明— 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会 2011年10月22日 兵庫
- ② 韓 智秀、荒井雅吉、石田俊介、新川大貴、小林資正 海綿由来セスタテルペンheteroneminのbiofilm形成阻害活性 日本生薬学会第58回年会 2011年9月24日 東京
- ③ 山野 喜、荒井雅吉、小林資正 インドネシア産海綿由来の新規環状デブシペプチドneamphamide Bの抗潜在性結核活性 日本生薬学会第58回年会 2011年9月24日 東京
- ④ Masayoshi Arai, Shunsuke Ishida, Liu Liu, Mari Soubou, Andi Setiawan, Motomasa Kobayashi ANTI-MICROBIAL EFFECT OF MARINE SPONGEAN MACROCYCLIC ALKALOIDS, HALICYCLAMINES, AGAINST DORMANT MYCOBACTERIA AND ANALYSIS OF ITS ACTION MECHANISM, The 13th International Symposium on Marine Natural Products, 2010年10月18日 Phuket (Thailand)
- ⑤ Masayoshi Arai, Patamaporn Pruksakorn, Yoshi Yamano, Motomasa Kobayashi TRICHO DERINS, NEW AMINOLIPOPEPTIDES FROM A MARINE SPONGE-DERIVED TRICHODERMA SP., ARE ACTIVE AGAINST DORMANT MYCOBACTERIA, The 13th International Symposium on Marine Natural Products, 2010年10月18日, Phuket (Thailand)
- ⑥ 石田俊介、荒井雅吉、小林資正 海洋由来放線菌が産生する desferrioxamine Eのbiofilm形成阻害活性 日本生薬学会第57回年会 2010年9月25日 徳島
- ⑦ 小林資正 海洋天然物由来の医薬シーズの探索 第27回和漢医薬学会学術大会(招待講演) 2010年8月28日 京都

⑧ 荒井雅吉、山野喜、Patamaporn PRUKSAKORN、Ahmed Mohamed MOHAMED、小林資正 海洋由来微生物からの抗潜在性結核物質の探索 日本薬学会第130年会 2010年3月29日 岡山

⑨ 荒井雅吉、石田俊介、小林資正 海洋由来真菌が産生するsterigmatocystin類のbiofilm形成阻害活性 第83回日本細菌学会総会 2010年3月29日 横浜

⑩ 荒井雅吉、劉柳、石田俊介、惣坊真理、小林資正 海綿由来の大環状アルカロイドhalicyclamine類の潜在性結核菌に対する抗菌活性とその作用メカニズムの解析 第28回メディシナルケミストリーシンポジウム 2009年11月25日 東京

⑪ 荒井雅吉、Patamaporn Pruksakorn、古徳直之、小林資正 海洋由来真菌が産生する新規アミノリボペプチドtrichoderin類の抗結核活性とその作用メカニズム 日本生薬学会第56回年会 2009年10月4日 京都

⑫ 荒井雅吉、石田俊介、坪谷好恵、小林資正 海洋由来真菌が産生するsterigmatocystin類のbiofilm形成阻害活性 日本生薬学会第56回年会 2009年10月4日 京都

⑬ Motomasa Kobayashi、Naoyuki Kotoku、Masayoshi Arai Search for Medicinal Seed from Marine Organisms The 25th Naito Conference on Chemical Biology [II] 2009年9月10日 北海道

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI MASAYOSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80311231

### (2) 研究分担者

小林 資正 (KOBAYASHI MOTOMASA)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40116033