

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659506

研究課題名（和文） CoMFA 3D-QSAR 解析法による新規抗結核薬の創出

研究課題名（英文） Development of new antituberculous drugs based on CoMFA 3D-QSAR analysis.

研究代表者

富岡 治明 (TOMIOKA HARUAKI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：40034045

研究成果の概要（和文）：

本研究では、GST 融合 PknG タンパク質と市販の化合物ライブラリーを用いて、PknG に対する阻害作用を有する化合物の探索を行った。なお、コントロールとして既存の PknG 阻害剤である AX20017 を用いた。その結果、4 種の化合物について PknG 阻害作用が認められた。

また、in silico でのドッキングモデル解析の結果、この 4 種の化合物については、AX20017 と同様に ATP 結合領域に結合する可能性の高いものと、AX20017 とは異なる結合様式で PknG の活性を阻害する可能性が示唆されるものが存在した。

研究成果の概要（英文）：

We explored the possibility of producing novel compounds that can target PknG protein with serine/threonine kinase activity with a modified luciferase assay. A screening test using the commercial library of protein kinase inhibitor including 80 chemical compounds was run, and AX20017, which is known as a specific inhibitor against PknG targeting the ATP-binding site, was used as a control inhibitor. Four compounds were showed a more favorable inhibition of PknG. Molecular docking analysis was carried out. Three of the four novel compounds interacted with a central kinase domain containing the ATP-binding pocket in silico, similar to AX20017. These four novel lead-compounds are promising candidates for anti-tuberculous drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染防御・制御，オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

多剤耐性結核と HIV 感染者での難治性結核の増加が結核治療をますます困難なものにしているが、治療期間の短縮と多剤耐性結核への対策に欠かせない新しいタイプの強力な抗結核薬、特に休眠型や持続型生残型の結核菌に有効な薬剤の開発は遅々として進ん

でいない。研究代表者の富岡が編集した Curr Pharm Des(米国)の特集号に掲載の Kantardjieff らの総説にも述べられているように、欧米では、bioinformatics や genomics の研究成果に 3 次元 QSAR 解析などの chemoinformatics 手法をベースにしての抗結核薬のドラッグデザイン研究が始動

しつつあるが、我が国では未だに手つかずのままに残されている(富岡: Emerging Trends in Antibacterial Discovery, Horizon Scientific Press, 2011, Expert Opin Drug Discov, 2008; Expert Rev Resp Med, 2008; Curr Pharm Des, 2006)。

QSAR は物質の化学構造上のパラメーターとその物質の生物活性との関係を回帰式などを用いた統計解析に供し、供試物質の化学構造の特徴からその生物活性を予測する SAR モデルを作成するものである。諸外国では、抗結核薬のドラッグデザインに drug target として有望な種々のタンパクの立体構造の解析と QSAR の手法を組み合わせ、COREPA 解析法、ETM、さらには薬剤分子の立体構造、特にそれを取り囲む電子雲と生体側のレセプターとの間の interaction について種々の物理化学的パラメーターで解析する CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 法、CoMSIA 法などの手法を駆使しての 3D-QSAR 解析研究が進められつつある。こうした QSAR 解析では、今のところ化学物資の結核菌に対する抗菌活性が主なパラメーターとして用いられているが、強力な病原因子を武器に宿主免疫防御メカニズムからの攻撃を躲しつつ、生体内で生き延びていく結核菌に対しても、強力に働く新しいタイプの薬剤のドラッグデザインをするには、候補化学物質の生物活性としては、結核菌の病原因子に対する阻害活性を指標とした方がより合目的である。

ところで、結核菌の生菌がマクロファージに感染した場合には、病原因子の 1 つであるマンノース化リポアラビノマンナン (ManLAM) の作用により、CaMKII 活性化、PI3K のリクルートが阻害されるため、phagosome 膜への EEA1 や Rab7 などのリクルートが起こらなくなる。この結果、最終的には phagosome-lysosome 融合 (P-L 融合) が起こらず、結核菌に対して有効な殺菌力が発揮されないことになる。これに関連して、結核菌と近縁の *Mycobacterium bovis* BCG 株が産生する PknG 蛋白が、マクロファージの P-L 融合を抑制することが報告されている。同様に結核菌は、protein tyrosine phosphatase A (PtpA) 蛋白を感染マクロファージ内に産生し、Vps33B 蛋白の脱リン酸化を介してシグナル伝達系を攪乱することにより P-L 融合を阻害する。結核菌のマクロファージ内の生き延び策としては、この P-L 融合に対する阻害作用が最も重要であるので、PknG や PtpA のマクロファージ内シグナル伝達系とのクロストークのプロフィールを明らかにすることと、PknG の機能発現を阻害する薬剤の探索ならびに 3 次元 QSAR 解析をベースにしたドラッグデザインを試みることは、

今までにない新しいタイプの抗結核薬の開発に果たす意義は大きいと思われる。

従来の 3 次元 QSAR 解析による統計的回帰式モデルの作成やそれに基づくドラッグデザインは、候補化学物質の生物活性については、多数の薬剤を供試しての測定に供しやすいからと言う理由で、単なる抗菌活性をパラメーターとして用いてきている。然し、この方法では、結核菌の生存に関わる蛋白や菌体成分を drug target とすることは可能であるが、結核菌と宿主あるいは宿主の免疫防御に関わる細胞との間の interaction において働く結核菌の病原因子そのものを drug target にすることは出来ない。従来のタイプとは全く異なる作用メカニズムで結核菌あるいは宿主側の生体反応に働き治療効果を発揮するような新規抗結核薬のドラッグデザインや探索研究には、後者のような発想をベースにした新しい形の 3 次元 QSAR 解析が極めて有効であるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、現在までの新規抗結核薬の開発状況を踏まえつつ、新しいタイプの抗結核薬の開発のための薬剤標的の探索をどのように進めていくのかと言う観点に立ち、結核菌感染宿主における感染防御に重要なサイトカイン・ネットワークの形成に関わる細胞内シグナル伝達系に介入して、それを攪乱する結核菌の種々の病原因子に照準を合わせ、それら病原因子の分子生物学的な機能について、新しいタイプの薬剤標的の探索研究との関連から一連の検討を進める。特に、BCG 菌や結核菌より産生される PknG が、マクロファージの P-L 融合を抑制することに着目し、既に PknG 阻害剤として知られている AX20017 を基準として、種々の化合物ライブラリーについて PknG に対する阻害活性を定量的に測定し、AX20017 以外の PknG 阻害活性を持つ化合物の探索を行う。AX20017 をはじめ、PknG 阻害活性を持つ化合物の PknG に対する阻害活性の定量的数値をパラメーターとして、3 次元 QSAR 解析を行い、統計的回帰式を求める。この回帰式をベースとした QSAR モデルについて、適合度、頑健性、予測性と言った回帰式の正確性・有用性についての評価を行った上で、新規抗結核薬のドラッグデザインを試みる。

## 3. 研究の方法

(1) GST 融合 PknG および GST 融合 PtpA タンパク質発現ベクターの作成

結核菌 DNA を鋳型として、PCR 法により

*pknG*および*ptpA*遺伝子をそれぞれ取得した。その際に *pknG* 遺伝子, *ptpA* 遺伝子ともに開始コドンに欠失させた。これらの遺伝子を N 末 GST 融合タンパク質発現ベクターである pGEX-3X (GE Healthcare Life Sciences 社) の EcoRI 制限酵素部位に導入し, N 末端 GST-tagged PknG 発現ベクター (GST-PknG 発現ベクター), および GST-tagged PtpA 発現ベクター (GST-PtpA 発現ベクター) をそれぞれ作成した。

#### (2) GST-PknG および GST-PtpA タンパク質の調製

各種 GST 融合タンパク質発現ベクターを大腸菌 BL-21 株に各々導入し, 薬剤選択により得た菌株を大量培養の後, 0.1mM IPTG 存在下で一晩培養してそれぞれの融合蛋白の発現誘導を行った。その後, 菌体を超音波破碎し可溶性画分について GST カラムを用いて融合蛋白を精製した。精製後の溶出液について SDS-PAGE および immunoblotting にて目的蛋白質の取得を確認した。

#### (3) GST-PknG の酵素活性測定および AX20017 をはじめとする PknG 阻害剤活性に対する阻害活性の定量的解析

##### ① GST-PknG の酵素活性測定

1 次反応として, GST-PknG (1・M), Myelin basic protein (5・M), ATP (1・M), MnCl<sub>2</sub> (10mM), DTT (1mM), BSA (250・g/ml), Tris-HCl (50mM, pH 7.4) を混和した反応液 (40・1) を調整し, 96well plate 中, 30°C, 2 時間インキュベートする。

続いて, 反応液中の ATP の残存量を測定するため, 2 次反応として, Kinase-Glo™ Luminescent Kinase Assay kit 溶液 (Promega 社) を 40・1 加え (全量 80・1), 25°C, 5 分間静置した後, 各反応溶液の発光強度を測定した。

##### ② AX20017 および種々の化合物の GST-PknG に対する阻害活性の測定

上記 (3)-①に示す 1 次反応溶液中に, 既存の PknG 阻害剤である AX20017 または市販のキナーゼ阻害剤ライブラリーの化合物を加え (10・M), 上記 (3)-①と同様の方法に従って, ハイスループット解析を行った。各種化合物の阻害率 (%) は, 次の計算式に従って算出した:

$$\text{Inhibition \%} = 100 \times \frac{(\text{rawdata of compound} - \text{positive control})}{(\text{negative control} - \text{positive control})}$$

#### (4) ドッキングモデル解析

In silico 分子ドッキングシミュレーション解析ソフト MOE (菱化システム) および AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute) を用いて, PknG に対して阻害活性を示した化合物の PknG タンパク結合部位について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) GST-PknG タンパク質の調製

結核菌 DNA を鋳型として, PCR 法により開始コドンに欠失させた *pknG* 遺伝子を増幅し, N 末 GST 融合タンパク質発現ベクター (pGEX-3X) に導入し, N 末端 GST-tagged PknG 発現ベクター (GST-PknG 発現ベクター) を作成した。次に, このプラスミドベクターを大腸菌 BL-21 株に形質転換して得た菌株を大量培養した後, IPTG 存在下で GST-PknG の発現誘導を行った。その後, 菌体を超音波破碎し可溶性画分について GST カラムを用いて融合蛋白を精製した。精製後の溶出液について SDS-PAGE (図 1) および immunoblotting にて目的蛋白質の取得を確認した。

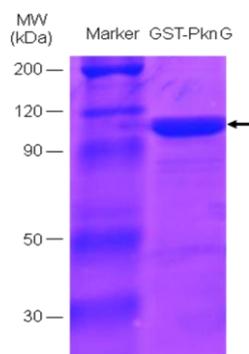


図 1. GST-PknG タンパク質精製後の確認

### (2) AX20017 の各 GST-PknG に対する阻害活性の簡易かつ定量的なアッセイ法の確立

Myelin basic protein をリン酸化標的タンパク質 (基質) として, 反応系に存在する ATP の, リン酸化反応に伴った消費に基づく量的変化を, 同じく反応系に存在するルシフェラーゼの発光強度の変化として検出する簡易測定系の確立を目的として, 反応液中の ATP の濃度 (図 2), 2 価金属イオンの条件 (MgCl<sub>2</sub> および MnCl<sub>2</sub>), 1 次反応および 2 次反応の各々の反応時間など, 種々の条件検討を行った。

また, 既存の PknG 阻害剤である AX20017 を用いて, PknG に対する阻害活性測定条件の検討を行った。その結果, PknG 阻害剤の濃度は 10・M とし, 1 次反応を 2 時間行った場合

に、AX20017 非存在下の場合と比べて、PknG による ATP の消費量の顕著な低下、すなわち、PknG 酵素活性に対する阻害活性を高感度に検出できることが示された (図 3, 4)。これらの成績より、上述の方法 (3)-①, ② に示すプロトコールを確立した。

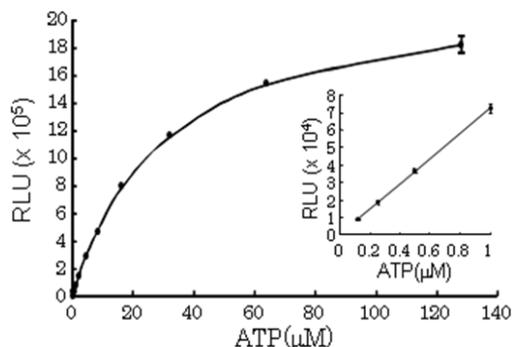


図 2. PknG 酵素活性測定における ATP の指摘濃度の検討

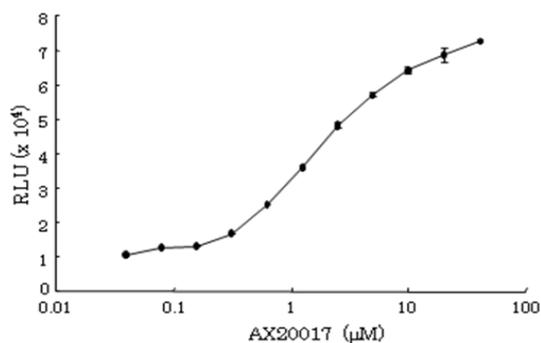


図 3. AX20017 の濃度についての条件検討

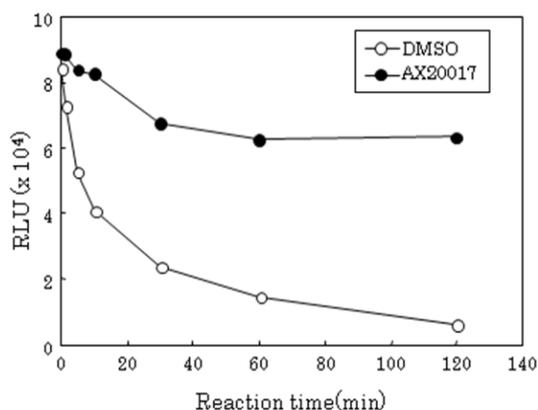


図 4. AX20017 を用いた PknG 阻害活性測定における 1 次反応の反応時間の検討

(3) 市販のリン酸化タンパク質阻害剤ライブラリーを用いての PknG 阻害活性を持つ化合物のスクリーニング

次に、PknG のリン酸化活性に対する阻害作

用を有する化合物の探索を目的として、市販の各種リン酸化タンパク質の阻害剤ライブラリー (およそ 80 種類の化合物) を用いて、PknG 阻害活性を持つ化合物のスクリーニングを行った (方法 (3)-②)。その結果、4 種類の化合物 (Compound 1~4) において、AX20017 と同程度の PknG 阻害活性が認められた (図 5)。なお、AX20017 および Compound 1~4 の PknG に対する阻害活性の 50% 阻害濃度は、それぞれ 5.49, 30.3, 16.1, 7.98, 35.1  $\mu$ M であった。

(4) AX20017 および PknG 阻害活性を示した 4 種の化合物と PknG タンパク質のドッキングシミュレーション解析

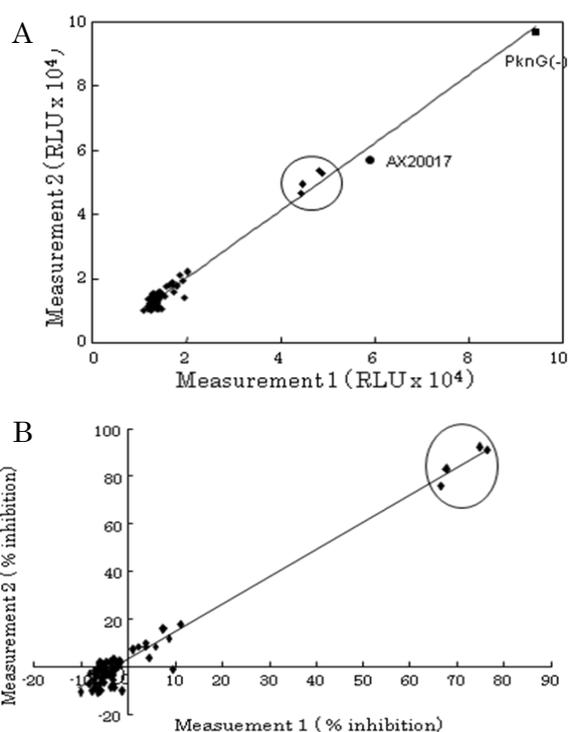


図 5. キナーゼライブラリーを用いた PknG 阻害剤の検索

現在、PknG と AX20017 との結晶構造解析データが、protein data bank (PDB) に記録されている (Scherr N, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:12151-12156, 2007)。そこで、PDB のデータを基に、PknG の kinase domain と、AX20017 および上述した 4 種の化合物について、分子ドッキングシミュレーション解析ソフト MOE および AutoDock 4.2 を用いた in silico による解析を行った。図 6 には、AX20017 と PknG kinase domain とのドッキングモデル解析の結果を示す。結晶構造解析の結果から、AX20017 は、ATP の結合部

位に入り込むことにより PknG の活性を阻害することが知られているが (Scherr N, et al. 2007), 今回の分子ドッキングシュミレーション解析においても, AX20017 は ATP の結合するポケットにはまるのがエネルギー的に安定であることが確認できた (図 6)。他方, 今回新たに PknG 阻害活性が認められた 4 種類の化合物については, AX20017 と同様に ATP 結合領域に結合する可能性の高いものと, ATP 結合領域ではなく, AX20017 とは異なる結合様式で PknG の活性を阻害する可能性が示唆されるものが存在した。

以上の成績から, 本研究において, 新規 PknG 阻害剤のリード化合物となりうる候補を見出した。

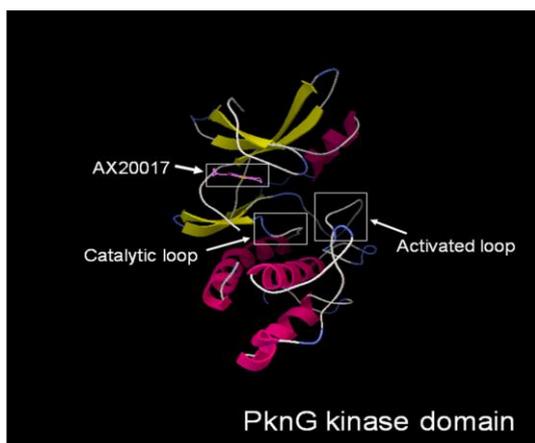


図 6. PknG kinase domain と AX20017 との分子ドッキングシュミレーションモデル

## 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 12 件)

①富岡治明. サイトカイン・ネットワークに介入する病原因子を drug target にした抗結核薬の開発. 感染症学雑誌, 査読無し, 86, 2012, 715-722.

②富岡治明, 多田納豊, 佐野千晶, 金廣優一, 山部清子. *Mycobacterium smegmatis* 感染マクロファージにおけるアポトーシスに関する研究. 乳酸菌研究会に関する報告書 (全国乳酸菌研究会), 平成 23 年度号, 2012, 282-285.

③富岡治明, 多田納豊, 金廣優一, 佐野千晶, 清水利朗. 性状と機能を異にするマクロファージポピュレーション: 免疫抑制性マクロファージとの関連から. 島根医学, 査読無し, 32, 2012, 1-9.

④富岡治明, 多田納豊, 佐野千晶. サイトカインと病態—3. 感染—. 臨床免疫・アレルギー科, 査読無し, 57, 2012, 721-730.

⑤佐野千晶, 多田納豊, 清水利朗, 佐藤勝昌, 富岡治明. ヒトマクロファージ中での *Mycobacterium avium* complex 4 菌株の増殖動態の比較. 医学と生物学, 査読有り, 156, 2012, 230-234.

⑥多田納豊, 佐野千晶, 江森方子, 斎藤肇, 佐藤勝昌, 清水利朗, 富岡治明. らい菌食に伴うマクロファージの抗 *Mycobacterium intracellulare* 殺菌能の低下. 日本ハンセン病学会雑誌, 査読有り, 81, 2012, 175-183.

⑦Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T. Characteristics of Suppressor Macrophages Induced by Mycobacterial and Protozoal Infections in Relation to Alternatively Activated M2 Macrophages. Clin Dev Immunol (open access journal), 査読有り, ID 635451, 2012, 1-19. DOI:10.1155/2012/635451

⑧Tatano Y, Sano C, Tomioka H, et al. Correlation between variable-number tandem-repeat-based genotypes and drug susceptibility in *Mycobacterium avium* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 査読有り, 31, 2012, 445-454. DOI: 10.1007/s10096-011-1326-7

⑨Sano C, Emori M, Saito H, Tatano Y, Shimizu T, Tomioka H. Antimicrobial activity of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells against Mycobacterial pathogens. Shimane J Med Sci, 査読有り, 28, 2011, 35-40.

⑩富岡治明, 多田納豊, 佐野千晶, 清水利明, 山部清子. 細菌、特に抗酸菌感染でマクロファージに誘導されるアポトーシスに関する研究. 乳酸菌研究会に関する報告書 (全国乳酸菌研究会), 平成 22 年度号, 2011, 282-285.

⑪Tomioka H, Tatano Y, Sano C, Shimizu T. Development of new antituberculous drugs based on bacterial virulence factors interfering with host cytokine networks. J Infect Chemother, 査読有り, 3, 2011, 302-317. DOI: 10.1007/s10156-010-0177-y

⑫Sano C, Tatano Y, Tomioka H, et al. Comparative in vitro and in vivo antimicrobial activities of sitafloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin against

*Mycobacterium avium*. Int J Antimicrob Agents. 査読有り, 37, 2011, 296-301. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.12.014

〔学会発表〕(計 41 件)

①多田納豊, 富岡治明. 【シンポジウム】非結核性抗酸菌の免疫学基礎的背景. 第 88 回日本結核病学会総会, 2013 年 3 月 29 日, 千葉: 幕張メッセ国際会議場

②佐野千晶. 【基調講演】非結核性抗酸菌に対する漢方治療の可能性—基礎的検討を中心に—. 島根呼吸器・がん化学療法漢方講演会, 2013 年 3 月 21 日, 出雲: ホテル武志山荘

③富岡治明. 【特別講演】抗酸菌に対する宿主感染防御システム解明の歩みと今後の治療薬開発への展望. 63 回日本結核病学会中国四国支部会, 2013 年 2 月 16 日, 徳島: あわぎんホール

④多田納豊. 【特別企画 若手登竜門】抗酸菌研究の面白さ、醍醐味、そして苦勞. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2012 年 11 月 6 日, 福岡: アクロス福岡

⑤多田納豊. 【若手研究者奨励賞受賞講演】*Mycobacterium avium* complex 感染マウスで誘導される免疫抑制性マクロファージの IL17 産生 T 細胞誘導能についての検討. 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2012 年 10 月 20 日, 徳島: 徳島大学長井記念ホール

⑥富岡治明. 【教育講演】宿主免疫系に作用する病原因子を drug target にした抗結核薬の開発. 第 6 回日本結核病学会中国四国支部研究会, 2012 年 9 月 29 日, 岡山: 岡山国際交流センター

⑦Tatano Y, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T, Tomioka H. *Mycobacterium avium* complex-induced suppressor macrophages specifically induce Th17 cells. EMBO Conference Tuberculosis 2012, 2012 年 9 月 14 日, Institut Pasteur, Paris, France.

⑧Tatano Y, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T, Sato K, Tomioka H. Correlation between variable-number tandem-repeat based genotypes and drug susceptibility in *Mycobacterium avium* isolates. EMBO Conference Tuberculosis 2012, 2012 年 9 月 12 日, Institut Pasteur, Paris, France.

⑨富岡治明. 【特別講演】抗酸菌, 特に *Mycobacterium avium* complex 感染症の免疫補助治療. 第 24 回青森県滅菌・消毒研究会,

2012 年 9 月 8 日, 弘前: コラボ弘大 八甲田ホール

⑩富岡治明. 【二木賞受賞講演】サイトカイン・ネットワークに介入するビルレンスファクターを drug target にした抗結核薬の開発. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会, 2012 年 4 月 25 日, 長崎: 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール

⑪佐野千晶, 多田納豊, 金廣優一, 富岡治明. 【シンポジウム】非結核性抗酸菌の細菌学的特徴とその最新知見. 第 5 回日本結核病学会中国四国支部研究会, 2011 年 9 月 17 日, 岡山: 岡山国際交流センター

〔図書〕(計 3 件)

①富岡治明, 磯部威. 抗菌薬の選択と使い方 (呼吸器科領域) - 肺結核. 医薬ジャーナル社, 東京, 2012, 91-105.

②富岡治明. 抗酸菌薬剤感受性試験 (結核菌薬剤感受性試験), LAB DATA 臨床検査データブック コンパクト版 第 5 版. 医学書院, 東京, 2011, 221-230.

③Tomioka H. Prospects for the Development of New Anti-TB Drugs Based on Novel Targets Related to the Host-Parasite Relationship in Tuberculosis. *In: Emerging Trends in Antibacterial Discovery - Answering the Call to Arms, Part III Microbial Communities and Interactions with the Host*, Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2011, 241-280.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富岡 治明 (TOMIOKA HARUAKI)  
島根大学・医学部・教授  
研究者番号: 40034045

### (2) 研究分担者

佐野 千晶 (SANO CHIAKI)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70325059

多田納 豊 (TATANO YUTAKA)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 70432614

金廣 優一 (KANEHIRO YUICHI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 60609197