

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11日現在

機関番号：32607
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790020
 研究課題名（和文）メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効な微生物由来耐性克服剤の創製
 研究課題名（英文）DEVELOPMENT OF NEW MICROBIAL AGENT RESTORING MRSA SUSCEPTIBILITY TO β -LACTAM DRUGS
 研究代表者
 小山 信裕（KOYAMA NOBUHIRO）
 北里大学・薬学部・助教
 研究者番号：60439156

研究成果の概要（和文）：（1）MRSA に対して特異的な活性を示す新しい機能分子として、放線菌の培養液中より、非糖化の 14 員環マクロライド様構造を有する albocycline 及びリン脂質を基本構造とする nosokophilic acid を発見した。（2）発見した新しい機能分子の作用機序について研究し、albocycline が MRSA 細胞壁合成阻害作用を示すことを見出した。また結合タンパク質の解析を基盤とする戦略から、imipenem 活性増強剤 cyslabdan の標的分子を MRSA 細胞壁合成に関わる FemA と同定し、その増強メカニズムを解明した。

研究成果の概要（英文）：From our screening program of microbial sources, we discovered albocycline and nosokophilic acid as new small molecules that show specific activity against MRSA. Furthermore, we studied the mechanism of action of the compounds with unique chemical structure and biological activity. As a result, we found that albocyclin is a new inhibitor of cell wall biosynthesis of MRSA. Furthermore, we took a proteomic strategy to identify the proteins that bind to cyslabdan. We successfully found that cyslabdan primarily targets FemA that is involved in the peptidoglycan synthesis of MRSA.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：天然物化学、生化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：感染症、MRSA、天然物、ケミカルバイオロジー、結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）は、院内感染の原因菌として社会的な問題となっており、耐性菌に有効な新たな薬剤の開拓が求められている。このような背景のもと、申請者の研究グループでは、MRSA に対して特異的な活性を示す機能分子を探索することを目的に、2 種の独自の評価系（黄色ブドウ球菌に選択的な活性を示す物質を探索する系と β -lactam 薬 imipenem の

活性を増強させる物質を探索する系）を構築した。これらの評価系を基軸とし、微生物資源からの探索を進めた結果、放線菌 *Streptomyces* sp. K04-0144 株の培養液中から、labdan 型 diterpene を基本構造とする cyslabdan と命名した新物質を発見した（図 1）。本化合物は、それ自身は抗 MRSA 活性をほとんど示さないのに対し、imipenem と併用すると、その抗 MRSA 活性を最大 1000 倍以上に増強させるという興味深い特徴を有する。 β -lactam 薬に選択的な増強活性を

示す一方で、 β -lactam 薬の耐性因子 PBP2' に対する作用や影響を認めないことが明らかとなり、MRSA の未知の耐性因子に作用することが期待されている。しかしながら、その作用機序については未だ不明な点が多かった。

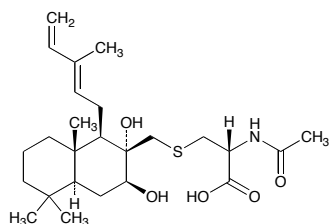


図1 Cyslabdan の構造式

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ひとつのアプローチとして、MRSA 抽出タンパク質の中から化合物と親和性を示すタンパク質を同定する等ケミカルバイオロジー研究を展開し、それを糸口にして cyslabdan の作用機序の解明を目指す。

(2) これまでに確立した 2 種の評価系を駆使して、MRSA に対して特異的な活性を示す機能分子を新たに分離した微生物の培養抽出液を対象に探索する。

3. 研究の方法

(1) Cyslabdan の作用機序の解析

①結合タンパク質の解析

まず、定法に従い、cyslabdan の側鎖カルボキシル基部分からの biotin 化体を合成した。次いで、avidin beads に biotin 化体を固定化後、MRSA より lysostaphin 処理により調製したタンパク抽出液を材料に、化合物と親和性を示すタンパク質を検索した。

②細胞壁 peptidoglycan 組成の解析

de Jong らの方法 (*J Biol Chem*, 1992) に従い、cyslabdan 処理した MRSA からの peptidoglycan 組成を調べた。MRSA から SDS 存在下で煮沸処理後、超音波破碎により細胞壁を回収した。次に、これを mutanolysin (MurNAc-GlcNAc 間分解酵素) で処理し、 NaBH_4 で糖部分を還元し、得られた mucopeptide を ODS column を用いて HPLC で分析した。

③Pentaglycine 修飾酵素に対する影響

Sahl ら (University of Bonn) との共同研究により、*S. aureus* 由来の FemA 及びその関連酵素 FemX や FemB の酵素反応に対する影響を調べた。すなわち、各酵素の基質

(monoglycyl lipid II, nonglycyl lipid II 及び triglycyl lipid II) と ^{14}C glycine を tRNA 及び glycyl-tRNA synthetase の存在下で反応させた後、生じた ^{14}C glycyl products を TLC で分離後、それらの放射活性を測定することで

解析した。

(2) MRSA に対して特異的な活性を示す新しい機能分子の探索

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、MRSA、グラム陽性菌・陰性細菌や真菌に対する抗菌活性を総合的に判断し、黄色ブドウ球菌に選択的な活性を示す物質を、放線菌や真菌由来の微生物培養抽出液ライブラリーより検索した。また同時に、 β -lactam 薬 imipenem の活性を増強させる物質の検索についても進めた。

(3) Albocycline の作用機序の解析

MRSA を用いて、各種ラベル体

(^3H]thymidine、 ^3H]uracil、 ^3H]leucine 及び ^3H]GlcNAc) の取り込み実験により、DNA、RNA、タンパク質及び細胞壁 peptidoglycan の生成に対する影響を調べた。

4. 研究成果

(1) Cyslabdan の作用機序の解析

①結合タンパク質の解析

Cyslabdan の側鎖 *N*-acetylcysteine の carboxyl 基に着目し、polyethylene glycol を linker とする biotin 化体を合成した (図 2)。誘導前と同等の活性を示すことが確認できたため、これを avidin beads を利用した結合タンパク質の解析に用いた。MRSA タンパク抽出液の中より、biotin 化体の存在下でのみ再現性良く検出されるタンパク質として約 50 kDa 付近のバンドを確認した (図 3)。

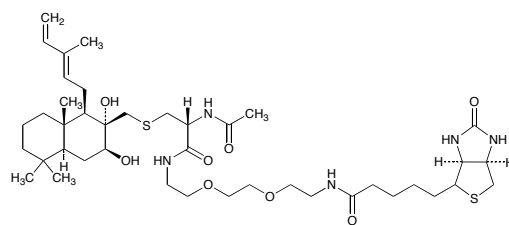


図2 Cyslabdan の biotin 化体の構造式

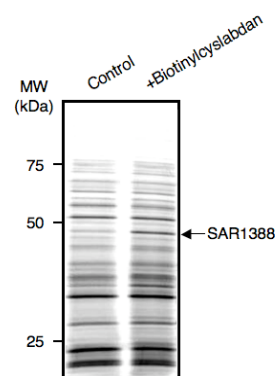


図3 Cyslabdan 結合タンパク質の解析

このバンドを切り出し、定法に従い、ゲル内 trypsin 消化後に得られるペプチド断片を LC-MS/MS 解析した結果、本タンパク質を SAR 1388 と同定した。SAR1388 は、別名 FemA と呼ばれ、メチシリン耐性に必須な因子であり、MRSA 細胞壁 peptidoglycan の生合成に関わることが報告されていた。

S. aureus は、細胞壁 peptidoglycan 中に、interpeptide として pentaglycine 構造を有するのが特徴である。この部分構造の形成には 4 種の酵素が関与する。まず、FemX により、lipid II から monoglycyl lipid II が形成され、次に FemA によって monoglycyl lipid II から triglycyl lipid II が形成され、さらに FemB により triglycyl lipid II から pentaglycyl lipid II が形成される。最終的に、この末端の glycine 残基が、PBPs の働きにより隣接する pentaglycyl lipid II の *D*-Ala-*D*-Ala 残基と反応し、架橋構造を形成することで、peptidoglycan が作られる。

以上の様に FemA は、細胞壁の合成酵素としての機能が報告されていたため、さらに cyslabdan の細胞壁 peptidoglycan に対する影響を解析した。

②細胞壁 peptidoglycan 組成の解析

MRSA を 2 種の cyslabdan 濃度条件下 (x1/16 MIC 及び x1/4 MIC) で処理したところ、菌体量の差は認めないにも関わらず細胞壁の回収量が濃度依存的に減少することを確認した。次いで、x1/4 MIC 条件下での peptidoglycan の組成解析より monoglycyl murein monomer 及び nonglycyl murein monomer が蓄積していることが明らかとなった (図 4)。

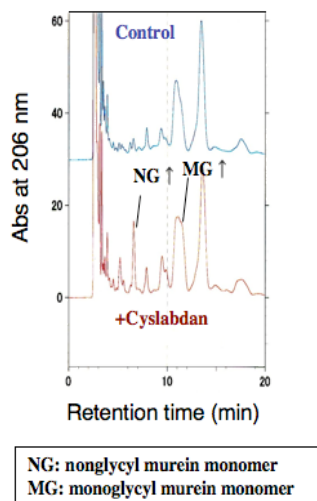


図 4 Cyslabdan の MRSA 細胞壁 peptidoglycan 組成に対する影響

③Pentaglycine 修飾酵素に対する影響

実際に、cyslabdan が FemA の酵素反応に対して影響を及ぼすか解析した。その結果、cyslabdan は高濃度 0.8 mM の条件下において、FemA による monoglycyl lipid II から triglycyl lipid II への変換反応のみを特異的に阻害し、一方で FemX や FemB の酵素反応に対してはほとんど影響しなかった (図 5)。

以上の結果にもとづき、cyslabdan による imipenem 活性増強の機構を次の様に考察している。まず、cyslabdan は、FemA の酵素反応を阻害することで、monoglycyl lipid II を細胞壁中に蓄積させる。しかしながら、cyslabdan の存在下では MRSA は生育できることから、この基質を PBPs が利用でき、その架橋反応が進行すると考えられる。一方、cyslabdan と imipenem が共存している場合には、MRSA は生育することができない。この条件下では、PBPs のうち imipenem 低親和性の PBP2' のみが働くと考えられるが、PBP2' が monoglycyl lipid II を基質として利用できないために monoglycyl lipid II 間の架橋反応が上手く進行せず、その結果として細胞壁 peptidoglycan の合成が阻害されるため MRSA を死に至らしめると考えられる。

近年、FemA は、MRSA において PBP2' による β -lactam 薬の耐性度を決定する重要な因子であることが報告された。Cyslabdan は、FemA を選択的に阻害する初めての低分子化合物であり、MRSA 細胞壁の生合成のみならず MRSA の耐性機構を解析するためのツールとして、さらには抗 MRSA 剤の新規リードとしての発展が期待される。

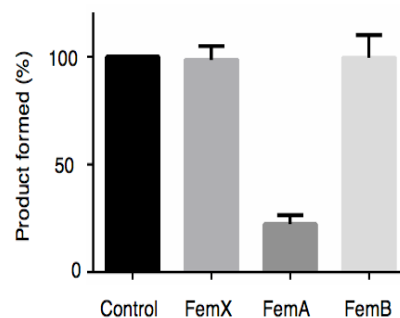


図 5 Cyslabdan の FemA 及びその関連酵素 FemX と FemB に対する影響

(2) MRSA に対して特異的な活性を示す新しい機能分子の探索

①*S. aureus* の生育を選択的に阻害する物質

放線菌や真菌を含む微生物培養液 (約 3000 サンプル) を対象にスクリーニングを実施し、石川県舳倉島の土壌より分離された放線菌 *Streptomyces* sp. 6-31 株を選択した。さらに、その培養液中 (2.0 L) より、本活性

を指標にして、溶媒抽出及び各種クロマトグラフィーで精製することにより、活性物質 (15.0 mg) を単離した。質量分析及び各種 NMR 解析により、本物質は、1967 年に Nagahama らによって抗細菌物質として報告されていた albocycline と同定した (図 6)。

ペーパーディスク法による活性評価から、本化合物は 5 µg/6 mm disk の濃度において、*S. aureus* 及び MRSA に対して強い抗菌活性を示したのに対し、グラム陽性・陰性菌や真菌 (*Bacillus subtilis*、*Micrococcus luteus*、*Mycobacterium smegmatis*、*Escherichia coli*、*Xanthomonas campestris*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Mucor racemosus* 及び *Candida albicans*) の生育に対しては影響しなかった。さらに、微量液体希釈法による活性評価から、MRSA に対する MIC 値は、0.5-1.0 µg/mL と算出され、vancomycin と同程度の抗 MRSA 活性を示すことが明らかとなった。

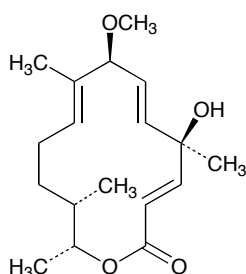


図 6 Albocycline の構造式

②Imipenem の抗 MRSA 活性増強物質

放線菌 *Streptomyces* sp. K04-0144 株は cyslabdan と nosokomycin の生産菌として報告してきたが、以前の精製検討の過程において cyslabdan とは別の imipenem の抗 MRSA 活性増強物質を生産することを見出していた。そこで、再度、本菌の大量培養液 (110 L) を精査することにより、nosokophic acid と命名した新物質 (22.5 mg) を新たに発見した。質量分析及び各種 NMR 解析により、その化学構造を 3-phosphoglycosyl-2-sesquiterpenyl dihydroxypropionic acid と決定した (図 7)。本物質は、nosokomycin の関連物質である抗生物質 moenomycin の生合成中間体として予測されていたが、天然物としての発見は本研究が初めての知見となった。本物質は、興味深いことに、それ自身はほとんど抗 MRSA 活性は示さないが、imipenem との併用により、その活性を 512 倍に増強させることが明らかとなった。Cyslabdan とは構造的に異なっており、これら化合物の作用点は異なることが期待される。今後、その作用機序を解明することで、MRSA の薬剤耐性に関わる新

しい因子の発見につながることを期待される。

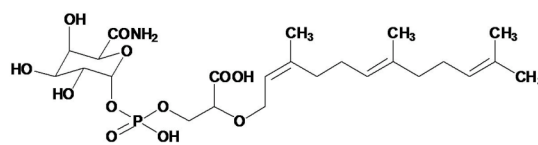


図 7 Nosokophic acid の構造式

(3)Albocycline の作用機序の解析

Albocycline は、非糖化のマクロライド様の構造を有し、*S. aureus* や MRSA に対して選択的な抗菌活性を示すのが特徴である。いま現在、この様な生物活性を示す物質の報告例は非常に少なかったことから、その作用機序に大変興味を持たれた。そこで、本研究では、MRSA のラベル体を用いた取り込み実験により、その作用機序を解析した。Albocycline は 50 µg/mL の濃度条件下において、³H]GlcNAc の高分子画分への取り込みのみを阻害したことより、albocycline は細胞壁 peptidoglycan の生合成を特異的に阻害することが明らかとなった。一方、その他の高分子画分 (DNA、RNA 及びタンパク質) の生合成に対する影響は認められなかった。代表的なマクロライド系抗生物質は、細菌のタンパク質の生合成を阻害することで、抗菌作用を発揮することが知られている。Albocycline は、マクロライド系抗生物質とは異なる作用機序を有しており、この様な化学構造を有する細胞壁合成阻害剤はこれまで見当たらない。従って、このコア構造は、*S. aureus* の選択的な細胞壁合成阻害剤を開発するための新しい基本骨格となることが期待され、さらには新しい抗 MRSA 剤の開発へと発展することが期待される。

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 7 件)

① Koyama N, Yotsumoto M, Onaka H, Tomoda H. New structural scaffold 14-membered macrocyclic lactone ring for selective inhibitors of cell wall peptidoglycan biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot.* in press
doi: 10.1038/ja.2012.122

② Koyama N, Tokura Y, Takahashi Y, Tomoda H. Discovery of nosokophic acid, a predicted intermediate of moenomycins, from nosokomycin-producing *Streptomyces* sp. K04-0144. *Bioorg Med Chem Lett.* **23**, 860-863 (2013)

doi: 10.1016/j.bmcl.2012.11.044

③ Koyama N, Inokoshi J, Tomoda H. Anti-infectious agents against MRSA. *Molecules*. **18**, 204-224 (2012)

doi: 10.3390/molecules18010204

④ Koyama N, Tokura Y, Münch D, Sahl HG, Schneider T, Shibagaki Y, Ikeda H, Tomoda H. The nonantibiotic small molecule cyslabdan enhances the potency of β -lactams against MRSA by inhibiting pentaglycine interpeptide bridge synthesis. *PLoS One*. 2012;**7(11)**:e48981.

doi: 10.1371/journal.pone.0048981

⑤ Nagai K, Koyama N, Sato N, Yanagisawa C, Tomoda H. Synthesis and antimycobacterial activity of calpinactam derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 7739-7741 (2012)

doi: 10.1016/j.bmcl.2012.09.069

⑥ Sakai K, Koyama N, Fukuda T, Mori Y, Onaka H, Tomoda H. Search method for inhibitors of Staphyloxanthin production by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* **35**, 48-53 (2012)

doi: 10.1248/bpb.35.48

⑦ Koyama N, Tokura Y, Takahashi Y, Tomoda H. New cyslabdans B and C, potentiators of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by *Streptomyces* sp. K04-0144. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **1**, 236-239 (2011)

doi: 10.1016/j.apsb.2011.10.008

[学会発表] (計 4 件)

① Sakai K, Fukuda T, Koyama N, Tomoda H. Inhibition of MRSA yellow pigment production by citridone A

The 6th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Sapporo, 2012.1.27

② Koyama N, Tokura Y, Tomoda H.

Mechanism of action of cyslabdan, a potentiator of β -lactam drug activity against MRSA

The 6th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Sapporo, 2012.1.27

③ 供田 洋、小山 信裕

微生物由来の新しい抗感染症剤の開拓とその標的分子の解析

日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台)

2013 年 03 月 27 日

④ 小山 信裕, Hans-Georg SAHL, 供田 洋

放線菌由来 Cyslabdan は MRSA 細胞壁合成に関わる FemA を阻害する

日本薬学会第 133 年会 (横浜)

2013 年 03 月 28 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: MRSA 産生黄色色素の生成阻害能を示す新規化合物とその製造方法

発明者: 供田 洋、小山 信裕、福田 隆志

権利者: 学校法人北里大学

種類: 特許

番号: 2011-156720

出願年月日: 2011 年 07 月 15 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北里大学 薬学部 助教

小山 信裕 (KOYAMA NOBUHIRO)

研究者番号: 6 0 4 3 9 1 5 6