

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310159

研究課題名(和文) 結核菌感染部位で機能する活性天然物の探索とその標的分子解析

研究課題名(英文) Search for bioactive natural products acting at infected region of *M. tuberculosis* and analysis of their target molecules

研究代表者

荒井 雅吉 (Arai, Masayoshi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80311231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：既存の抗結核剤に抵抗性を示す潜在性結核菌に有効な新しい抗結核物質の創出を目的として、結核菌感染部位での菌の特性に着目して構築したスクリーニング方法を用いて探索研究を実施した。その結果、海洋生物の抽出物または海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーから、医薬シーズとして期待できる、数種の新規化合物を含む複数の活性天然物を見出した。さらに、ゲノムDNAライブラリー形質転換微生物を用いる手法、遺伝子変異解析または合成したプローブ分子を用いて見出した抗菌物質の標的分子を解析し、潜在性結核菌に対する新しい薬剤標的を開拓した。

研究成果の概要(英文)：In order to search for new anti-microbial substances against the dormant *Mycobacterium tuberculosis*, which shows tolerance to the conventional anti-Tuberculosis drugs, we constructed several screening systems focusing on the characteristic phenotypes of mycobacteria at the infected region. On the guidance of the screening from the extract library of marine sponges and marine-derived microbes, we could explore several anti-microbial compounds including structurally new compounds, which are expected to be a new medicinal seed. In addition, we could clarify the target molecules of some isolated anti-microbial compounds by the method utilizing the transformants overexpressing genomic DNA library, the analysis of gene mutation and/or the pull-down assay using a synthetic probe of the active compound. The clarified target proteins are expected to become a new drug target against the dormant *M. tuberculosis*.

研究分野：生物有機化学

キーワード：抗菌物質 結核 感染症 活性天然物 ケミカルバイオロジー

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、感染後も多くの場合、宿主の免疫応答により結核の発症は回避される。しかし一部の菌は、免疫細胞により形成される肉芽腫 (granuloma) 内で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。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質が、多剤併用による最低 6 ヶ月間の化学療法が必要な主因となっている。このことから、次世代の抗結核剤には、granuloma 内に存在する潜在状態の結核菌にも効果を示し、短期間で治療できることが求められていた。また同時に、潜在化した結核菌に対する新しい薬剤標的分子の創出も重要な課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、結核菌感染部位とその微小環境での菌の特性 (低酸素環境、低 pH 環境、炭素源要求性変化およびバイオフィーム産生) に着目した、4 つのスクリーニング法を用いて、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスおよび海洋由来微生物の培養物ライブラリーから、潜在性結核菌に有効な新しい抗菌物質を見出すことを目的の一つとした。また、見出した抗菌物質の医薬シーズとしての有用性を検証するとともに、その標的分子を明らかにすることを通して、潜在性結核菌に対する新しい薬剤標的を開拓することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では以下の検討を行った。

(1) 潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索を目的として、検定菌 (*Mycobacterium smegmatis* および *M. bovis* BCG) を低酸素、低 pH または脂肪酸を炭素源とする条件で培養することにより、これらに潜在状態を誘導した。そして、潜在状態を誘導した検定菌に対して抗菌活性を示す化合物を、底生海洋生物の抽出エキスおよび海洋由来微生物の培養物ライブラリーから探索した。さらに、*Mycobacterium* 属細菌のバイオフィーム形成を阻害する化合物の探索についても合わせて実施した。

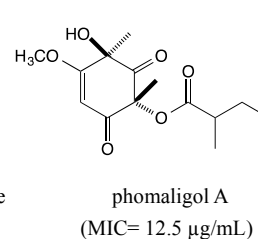
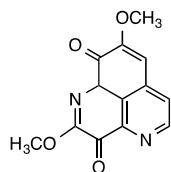
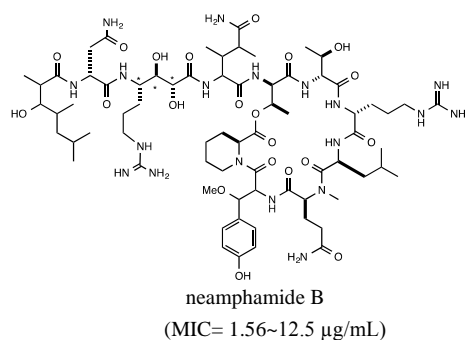
(2) 見出した抗菌物質の医薬シーズとしての有用性は、バイオセーフティーレベル 3 の施設を有する研究協力者と連携して、病原性を有する *M. tuberculosis* ならびにその薬剤耐性株や臨床分離株に対する効果を評価することで検証した。

(3) 見出した抗菌物質の標的分子の解析は、ゲノム DNA ライブラリー形質転換株を用いて見出した活性物質に耐性を付与する遺伝子を同定する手法、抗菌物質に対する自然耐性株を取得して次世代シーケンサーにより変異を同定する手法等を用いて実施した。

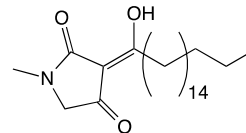
4. 研究成果

(1) 潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索

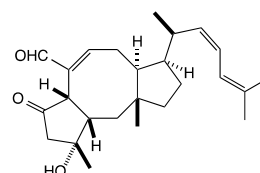
潜在性結核菌に有効な抗菌物質を探索した結果、低酸素培養条件で潜在状態を誘導した検定菌に対して抗菌活性を示す化合物として、*Neamphius* 属海綿の抽出物から新規環状デプシペプチド neamphamide B を発見した。また、*Aaptos* 属海綿の抽出物からは、2-methoxy-3-oxoaaptamine と命名した新規化合物を含む、数種の aaptamine 類を見出した。さらに良好な活性を示した aaptamine 類について、病原性を有する *M. tuberculosis* に対する効果を評価したところ、多剤耐性株を含む *M. tuberculosis* 株にも良好な抗菌活性を示すことが明らかとなった。さらに、海洋由来真菌の培養抽出物からは、phomaligol A を単離・同定した (下図)。



一方、脂肪酸を炭素源とする培地で培養することにより検定菌に潜在状態を誘導し、本条件においても抗菌活性を示す化合物を探索した結果、*Melophlus* 属海綿の抽出物から、テトラミン酸誘導体 melophlin 類を見出した (下図)。



さらに、*Mycobacterium* 属のバイオフィーム形成を阻害する化合物として、海洋由来真菌 *Emericella varicolor* から単離した、ophiobolins 類にその活性を見出した (下図)。



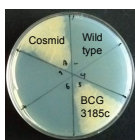
(2) 見出した抗菌物質の標的分子解析

以前の研究において潜在性結核菌に有効な抗菌物質として見出した、海綿由来のジテルペンアルカロイド agelasine D、海洋由来放線菌の二次代謝産物 nybomycin、さらに本研究で見出した melophlin A の標的分子解析を実施した。

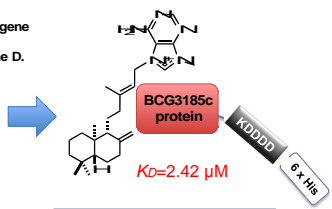
Agelasine D の標的分子解析

Agelasine D の標的分子解析には、ゲノム DNA ライブラリー形質転換株を用いる解析方法を適用した。すなわち研究代表者が構築した、ランダムに *M. bovis* BCG ゲノムを高発現する約 4,000 株の *M. smegmatis* 形質転換株の中から、agelasine D に耐性を示す形質転換株をスクリーニング後、agelasine D 耐性株に含まれる *M. bovis* BCG ゲノムの配列を解析した。さらに、解析したゲノムをさらに断片化するとともに、それらの高発現株を作成し、agelasine D に対する感受性を確認した。そして、本操作を繰り返すことにより、agelasine D に対して耐性を付与している遺伝子を明らかにした。その結果、agelasine D に耐性を付与している遺伝子は、dioxygenase と予想される BCG3185c タンパク質であることが明らかとなった。さらに、リコンビナント BCG3185c タンパク質との結合親和性解析から、agelasine D は、BCG3185c タンパク質と直接結合することを証明した(下図)。

Over-expression of BCG3185c gene (possibly dioxygenase) gives a resistance to agelasine D.



Transformant of *M. smegmatis*

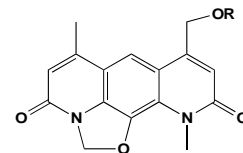


Sensor chip NTA (BIAcore SYSTEM)

Nybomycin の標的分子解析

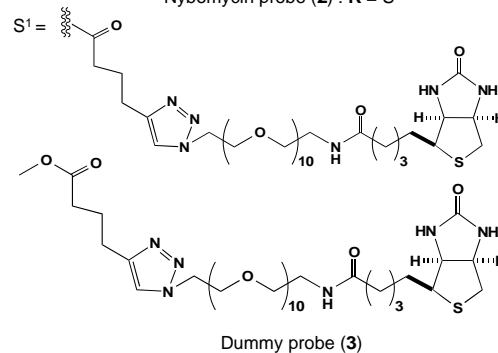
Nybomycin の標的分子解析については、まず初めに、ゲノム DNA ライブラリー形質転換株を用いる方法を適用した。その結果、4 株の nybomycin 耐性株の獲得に成功した。しかし、耐性を付与する遺伝子の解析段階で、全く異なる機能を有する複数の遺伝子が、nybomycin 耐性に関与する結果が得られた。さらに、nybomycin 自然耐性株を取得し、次世代シーケンサーによる網羅的変異解析を実施した。その結果、先の方法で見出された遺伝子とは全く異なる遺伝子に変異を有することが明らかとなった。以上の結果から nybomycin は、特定のタンパク質と結合してその機能を阻害する化合物ではなく、ランダムに Mycobacteria ゲノムに結合することで抗菌活性を示すことを予想した。

そこで、nybomycin プローブならびにダミープローブを合成し、プラスミド DNA との結合親和性を検討した(右上図)。



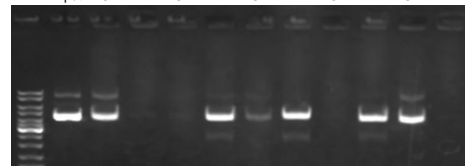
Nybomycin (1) : R = H

Nybomycin probe (2) : R = S¹



Dummy probe (3)

Probes :	None	2		3					
Competitors :	None	None	1	Isoniazid	None				
	M Input	S.	B.	S.	B.	S.	B.	S.	B.



Lane : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

S:probe と結合しない B:probe と結合する

その結果、nybomycin probe (2) はプラスミド DNA と直接結合することが明らかとなり (lane 4) この結合は、nybomycin を競合物質として添加することで部分的に阻害されることも確認された (lane 5)。以上結果から、nybomycin の標的分子は DNA であると結論付けた。

Melophlin A の標的分子解析

Melophlin A の標的分子解析には、agelasine D と同様、ゲノム DNA ライブラリー形質転換株を用いる方法を適用した。その結果、melophlin A に耐性を示す 5 株の形質転換株を得ることに成功した。また、得られた melophlin A 耐性株に含まれる、*M. bovis* BCG ゲノムの配列を解析した結果、melophlin A に耐性を付与する遺伝子は、*M. bovis* BCG ゲノムの 1422.304 kb~1448.713 kb および 1169.370 kb~1183.760 kb の 2 つの領域に存在することが明らかとなった。現在、さらに標的分子候補となる遺伝子の絞り込みを進めている。

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 6 件)

Anti-dormant mycobacterial activity and target analysis of nybomycin produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. Arai, M.; Kamiya, K.; Pruksakorn, P.; Sumii, Y.;

Kotoku, N.; Joubert, J.-P.; Moodley, P.; Han, C.; Shin, D.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3534-3541. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.033 (査読有)

Aaptamines, marine spongean alkaloids, as anti-dormant mycobacterial substances. Arai, M.; Han, C.; Yamano, Y.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. *J. Nat. Med.* **2014**, *68*, 372-376. DOI: 10.1007/s11418-013-0811-y (査読有)

Identification of target protein of agelasine D, a marine spongean diterpene alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. Arai, M.; Yamano, Y.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 117-123. DOI: 10.1002/cbic.201300470 (査読有)

Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. Arai, M.; Niikawa, H.; Kobayashi, M. *J. Nat. Med.* **2013**, *67*, 271-275. DOI: 10.1007/s11418-012-0676-5 (査読有)

Potent growth inhibitory activity of (±)-platencin towards multi-drug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. G.A. I. Moustafa, G.A.I.; Nojima, S.; Yamano, Y.; Aono, A.; Arai, M.; Mitarai, S.; Tanaka, T.; Yoshimitsu, T. *Med. Chem. Comm.* **2013**, *4*, 720-723. DOI: 10.1039/C3MD00016H (査読有)

Neamphamide B, new cyclic depsipeptide, as an anti-dormant mycobacterial substance from a Japanese marine sponge of *Neamphius* sp. Yamano, Y.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1877-4881. DOI: 10.1248/cpb.c13-00375 (査読有)

[学会発表](計 15 件)

- 「Phenotypic screening による活性天然物探索と新規薬剤標的の開拓」荒井雅吉 日本薬学会第 135 年会 一般シンポジウム「天然物ケミカルバイオロジー(3): 天然物ターゲット ID 最前線」, 2015/3/28、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)
- 「活性天然物の標的分子解析による新規薬剤標的の探索」荒井雅吉 日本薬学会第 135 年会、2015/3/27、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)
- “Phenotypic Screening and Chemical Biology for Exploring New Medicinal Seeds and Drug Targets”Masayoshi Arai, The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2014/9/13,

福岡大学薬学部(福岡県・福岡市)

- 「潜在性結核菌に有効な海綿由来テトラミン酸 melophlin 類の抗菌活性とその標的分子の解明」荒井雅吉, 山野喜, 神谷謙太郎, 小林資正 日本薬学会第 134 年会、2014/3/28、熊本大学(熊本県・熊本市)
- 「病態の体内微小環境で機能する活性天然物の探索とその標的分子の解明」荒井雅吉 日本生薬学会第 60 回年会、2013/9/8、北海道医療大学(北海道・石狩郡)
- 「海綿由来ジテルペンアルカロイド agelasine 類の潜在性結核菌に対する抗菌活性とその標的分子の解明」荒井雅吉, 山野喜, 小林資正 日本薬学会第 133 年会、2013/3/28、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- 「潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索とゲノム DNA ライブラリーを利用する標的分子の解明」荒井雅吉, 山野喜, 韓智秀, Patamaporn Pruksakorn, 小林資正 第 54 回天然有機化合物討論会、2012/9/19、東京農業大学(東京都・世田谷区)
- 「海洋由来真菌が産生するセスタテルペン ophiobolin 類の biofilm 形成阻害活性」荒井雅吉, 新川大貴, 小林資正 日本生薬学会 第 59 回年会、2012/9/17、かずさアカデミアパーク(千葉県・木更津市)

[図書](計 1 件)

“Search for New Medicinal Seeds from Marine Organisms” Kobayashi, M.; Kotoku, N.; Arai, M. *Chembiomolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology* (Springer) **2013**, pp. 93-101.

[その他]

ホームページ等
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/index.cgi>

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) 連携研究者

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