

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870829

研究課題名(和文)抗結核菌活性を有する化合物CPZEN-45の作用機序の全容解明

研究課題名(英文) Mode of action study of a novel antituberculous agent CPZEN-45

研究代表者

石崎 仁将 (ISHIZAKI, Yoshimasa)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員

研究者番号：10414103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、申請者が所属する研究所が開発した抗結核菌作用を有する化合物CPZEN-45の作用機序の全容を解明することを目的とした。

3種類の酵素に標的としての可能性があると考えていたが、CPZEN-45はこのうち細胞壁の主要構成成分であるアラビノガラクトン(AG)の生合成に關与する酵素WecAを強く阻害し、またAGの新規合成を阻害した。他方、WecAの類縁酵素で、もう一つの細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカンの生合成に關与する酵素MurXについては、CPZEN-45はこれを阻害しなかった。また、第3の標的候補であるAGリガーゼについてはその酵素本体をほぼ特定するに至った。

研究成果の概要(英文)：In this research, I tried to identify the primary target of CPZEN-45, which is a promising anti tubercular agent derivatized from natural product caprazamycins. At the beginning of this research, I focused on following three candidate enzymes for the target; (1) MurX which is a target of caprazamycins and involved in peptidoglycan biosynthesis, (2) WecA which is a paralog of MurX and involved in biosynthesis of arabinogalactan (AG), and (3) AG ligase, which has similar function to MurX and WecA.

As the result of this research, it is revealed that CPZEN-45 inhibited the activity of WecA and de novo synthesis of AG. In contrast, CPZEN-45 did not inhibit the activity of MurX, which is a primary target of caprazamycins. These results indicated that CPZEN-45 showed antituberculous activity by inhibiting WecA enzyme and subsequent blocking of AG biosynthesis.

Also, my collaborator and I succeeded to identify AG ligase, which we expected to be a candidate of target of CPZEN-45.

研究分野：微生物の遺伝学

キーワード：作用機序の同定

## 1. 研究開始当初の背景

結核は、結核菌によって引き起こされる、世界でも最も患者数の多い感染症であり、世界3大感染症の一つに数えられている。世界的な対策により、21世紀に入ってからの患者数はほぼ横ばいであるが、治療の結果生じた薬剤耐性結核菌が新たな脅威となっている。

申請者の所属する研究機関では多剤耐性結核菌にも有効な抗結核薬の開発を行っている。その過程で、放線菌の培養物より有力な候補として caprazamycin 類が見出された。caprazamycin 類はそれ自体が良好な高結核菌活性を有するが、さらに誘導体化研究が進められ、その結果最も有望な化合物として CPZEN-45 が創出された。

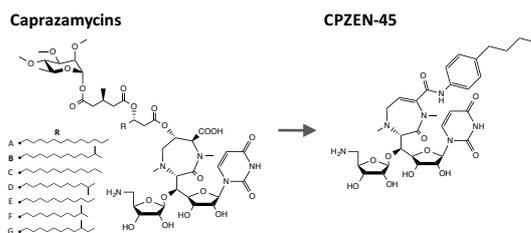


図1 : caprazamycin 類と CPZEN-45

## 2. 研究の目的

CPZEN-45 は、結核菌（多剤耐性結核菌を含む）および他の遅育性抗酸菌に特異的かつ良好な抗菌活性を示す。またヒト細胞に対する細胞毒性および溶血性は低く、さらにマウス感染治療実験において良好な治療効果を確認することから、新たな抗結核菌役として有望である。この CPZEN-45 を治療薬として臨床で使用するためには、本研究によって CPZEN-45 の作用機序を完全に解明し、有用性を明確に示すことが極めて重要である。

## 3. 研究の方法

CPZEN-45 の標的候補として、アラビノガラクトタン (AG) の生合成に関与する酵素 WecA、WecA のパラログであり、ペプチドグリカン (PG) の生合成に関与する MurX、そして AG と PG を結合する機能を有する AG リガーゼの3

種に着目した。CPZEN-45 はこれらのうちのどれを主たる標的とするかについて生化学的、遺伝学的手法を用いて評価した。このうち AG リガーゼについては酵素本体が明らかになっていなかったため、その同定を試みた

## 4. 研究成果

結核菌の細胞膜・壁面分を用いた酵素活性評価系において CPZEN-45 が WecA の活性を強く抑制すること (図2)、また、<sup>14</sup>C ラベルしたグルコース存在下で培養した結核菌を用いた評価により、CPZEN-45 が AG の新規合成を強く抑制する (IC<sub>50</sub> ≈ 4 ng/ml) ことを見出し (図3)、このことから CPZEN-45 の抗結核菌活性は WecA の阻害とこれによる AG 生合成阻害に起因する可能性が極めて高いと結論づけられた。なお、上記の実験系は、同属他種の細菌株における報告をもとに、申請者が構築したものである。

他方、CPZEN-45 は MurX の活性も阻害したが、WecA の阻害活性と比較すると IC<sub>50</sub> 値にして約 1/100 と極めて弱いものであった。このことから CPZEN-45 の抗結核菌活性は MurX とはほとんど無関係であると考えている。

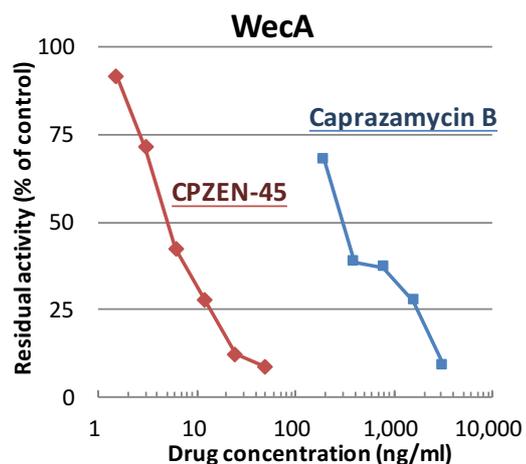
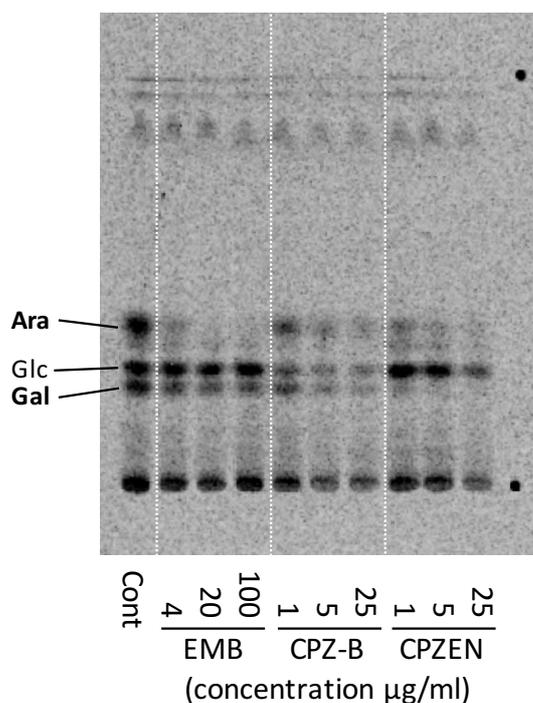


図2 : caprazamycin B と CPZEN-45 の WecA 阻害活性



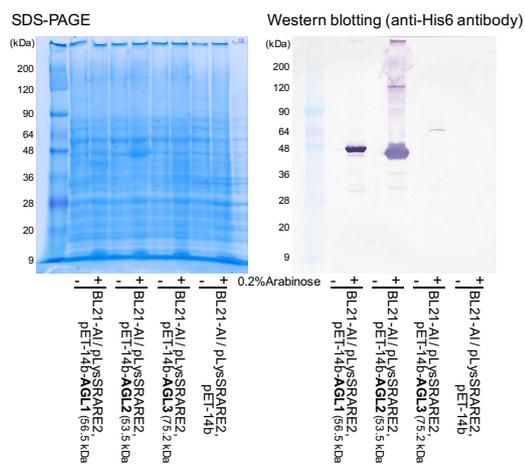
**図3：アラビノガラクトサン新規合成に及ぼす各種薬剤の影響。** 対数増殖中の結核菌培養液に  $^{14}\text{C}$  ラベルしたグルコースおよび各種薬剤（EMB, エタンプトール; CPZ-B, caprazamycin B; CPZEN, CPZEN-45）を添加し、一定時間培養後、細胞壁画分を単離、加水分解し TLC 及びオートラジオグラフィによる分析に供した。

抗結核菌活性に対する WecA の関与をより確実なものにするため、結核菌の近縁種である *M. smegmatis* をモデル生物として WecA の高発現を試みた。幾つかのプロモーターを試したが、得られた形質転換体の CPZEN-45 耐性は対照株と同等であった。この理由として WecA の発現が厳密に制御されており、薬剤感受性に寄与するほどに WecA を高発現する株を作成することが難しいことを考えている。なお、研究協力者の結核菌を用いた実験においても、同様の結果を得ていると聞いている。

また、研究協力者との共同研究によって、AG リガーゼの本体をほぼ特定するに至った。この中で申請者は、大腸菌における AG リガーゼの発現実験（図4）により本研究に寄与した。

CPZEN-45 による WecA の阻害活性が非常に強いことから、CPZEN-45 が AG リガーゼを阻害する可能性は低いと考えているが、AG リガーゼ自体も抗酸菌に特有の酵素であることから

新たな薬剤の標的として有望であると考えている。



**図4：結核菌のアラビノガラクトサンリガーゼパラログ（AGL1-3）の大腸菌における発現実験。** 当初、申請者らは3種のパラログに着目していたが、研究協力者らの実験結果より、AGL3は活性が弱いか、機能がないものと思われる。

いずれにせよ、WecA を標的とする CPZEN-45 の作用メカニズムは、治療薬として開発する上で大きな意味を持つ。すなわち、この機構はこれまで用いられてきたどの抗結核薬のものとも異なり、そのため多剤耐性結核菌にも有効であると考えられる。さらに黄色ブドウ球菌や腸球菌など、他の多くの病原微生物においては WecA のオルソログは必須でないかあるいは存在しないことから、長期間の結核の治療の間にこれらの病原微生物に耐性株が発生、蔓延するリスクがほとんどない。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① CPZEN-45; a promising drug candidate for treating extremely drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): synthesis, activity, and mode of action  
Yoshimasa Ishizaki, Kazushige Sasaki, Yoshiaki Takahashi, Masayuki Igarashi,

Toshiaki Miyake, Masaji Okada, Norio Doi, Patrick J. Brennan, Yuzuru Akamatsu, Akio Nomoto, Masakatsu Shibasaki

Cororado Mycobacteria conference 2016、  
2016/6/8-9、コロラド州フォートコリンズ  
(アメリカ)

- ② CPZEN-45, As a Promising Drug Candidate for Treating Extremely Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB): Synthesis, Activity and Mode of Action.

Kazushige Sasaki, Yoshimasa Ishizaki, Yoshiaki Takahashi, Masayuki Igarashi, Toshiaki Miyake, Masaji Okada, Norio Doi, Patrick J. Brennan, Yuzuru Akamatsu, Akio Nomoto

日本薬学会第 135 年会、2015/3/27、兵庫  
医療大学 (神戸)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石崎 仁將 (ISHIZAKI, Yoshimasa)

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 主任研究員

研究者番号：10414103