

黄色ブドウ球菌が生産する黄色色素生成阻害剤の探索

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	コバヤシ ケイスケ 小林 啓介
所属等	北里大学薬学部 微生物薬品製造学教室 助教
プロフィール	私は 6 年制課程の一期生として薬学部に入學しました。卒業研究の過程で、日本が誇る天然物化学研究の面白さに魅了され、学士を修了後、大学院博士過程 (4 年制) に進学しました。4 年間さらに研究に没頭し、その成果として日本学術振興会特別研究員 (DC2) への採択もしていただきました。現在は私大薬学教員としてアカデミックの世界に残り、教育と研究の両方に携わっていますが、自身の研究を遂行するだけでなく、学生の方にも研究の面白さを伝え、基礎研究の裾野をもっと広げていきたいと考えています。

1. 研究の概要

Staphyloxanthin (STX) は、黄色ブドウ球菌が特有に生産する黄色色素である。STX は 2 分子の farnesyl diphosphate を基質とし、各種中間体を経て生合成される。これまでに、生合成経路中の酵素である CrtM や CrtN の阻害により、菌自身の生育に影響を与えることなく、マウスへの感染が抑制されることが報告されている。すなわち、STX は宿主免疫系からの攻撃に対する防御物質であり、その生合成を阻害することで、抗菌作用を示さずに宿主免疫系を利用して菌を排除するという新しい概念の抗感染薬につながることを期待される。しかし、未だ STX 生合成阻害剤はほとんど報告されていない。そこで本研究では、STX 生合成経路中間体の変動を UFLC を用いて解析する新たな STX 阻害剤探索系の構築を行い、微生物由来化合物ライブラリーから STX 生成を阻害する 2 化合物を見出した。

2. 研究の動機、目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は世界的な規模でその蔓延が問題となっている。従来は、高齢者や新生児などの抵抗力が低い患者に発症することが主であったが、近年は、健康人にも感染する市中感染型 MRSA や、第一選択薬であるバンコマイシンに低感受性の菌 (VRSA) の出現も報告されており、新たな薬剤の開発が求められている。従来の抗菌薬の開発アプローチでは、細菌の細胞壁やタンパク質合成を阻害するなど菌の生育に直接作用を示すことから、耐性菌の出現に繋がると考えられる。一方で、菌の生育には関係のない標的、例えば、**宿主への感染性や病原性のみを低下させる**ことができれば、耐性菌を生み出さない新たな抗感染薬としての開発が期待できる。この考えに基づき、申請者は黄色ブドウ球菌が特有に生産する**黄色色素 staphyloxanthin (STX)** に着目した。黄色ブドウ球菌内において、STX は 2 分子の farnesyl diphosphate を出発原料とし、CrtM から CrtO までの各酵素により各中間体を経て生合成される (図 1)。これまでに、CrtM または CrtN の阻害により、生育に影響を与えることなくマウスへの感染が抑制されることが報告されている (*Science* **319**, 1391-1394 (2008)、*Nat. Chem. Biol.* **12**, 174-179 (2016))。すなわち、STX の生合成を阻害することで、抗菌作用を示すことなく宿主への感染性を低下させ、宿主内の防御機構を利用して菌を排除することが可能になると考えられる。通常は黄色である菌体の白色化を指標とした方法により、

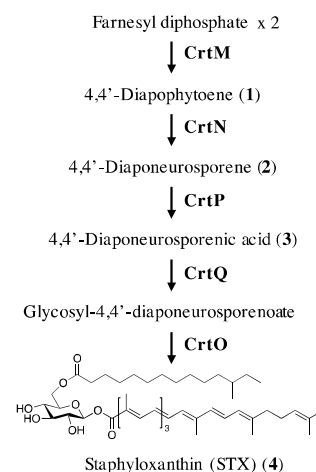


図 1. STX 生合成経路

これまでに STX 生合成阻害剤の探索が行われてきたが、未だその数は少なく、また CrtN 以降の阻害剤の報告例はない。STX 生合成経路において、farnesyl diphosphate および **1** は無色であるが、それ以降の化合物は黄色を呈す。すなわち、菌体の白色化を評価するだけでは、CrtN 以降の生合成酵素に対する影響を評価できないことが考えられた。そこで本研究では、STX および STX 生合成経路中間体の菌体内量の変動を検出することで **CrtM から CrtO までの阻害剤を網羅的に探索する新たな評価方法**の構築と、その評価系を用いた新たな STX 生合成経路阻害剤の探索を目的として研究を行った。

3. 研究の結果

本研究では実験上の安全を考え、黄色ブドウ球菌の野生株である *Staphylococcus aureus* FDA209P 株を使用した。

1) STX 生合成経路中間体を検出する評価系の構築 STX 生合成経路阻害剤の探索

96 穴プレートに *S. aureus* FDA209P 株の培養液 (McFarland 値 0.5 相当) を播種し、37°C で 96 時間培養した。菌体を MeOH (50 μ L) により抽出し、その菌体抽出液 10 μ L を Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) (カラム: LaChromUltra C18 (2.0 ϕ x 75 mm)、移動相: 80-100% CH₃CN/H₂O-0.05% H₃PO₄ 5 min、100% CH₃CN 15 min、流速: 0.55 mL/min、検出: UV 290, 450 nm) に注入し分析した。その結果、4 つの主要なピークを検出し、特徴的な UV スペクトルおよび MS 解析から、検出波長 290 nm の条件下で検出されたピークを STX 生合成経路中の **1**、および検出波長 450 nm 条件下で検出された 3 つのピークをそれぞれ **2**、**3** および STX (**4**) と同定した (図 2)。この解析条件下、CrtN 阻害剤である naftifine (*Nat. Chem. Biol.* **12**, 174-179 (2016))(0 ~ 50 μ g/mL) で処理した菌体抽出液を解析したところ、CrtN 反応基質である **1** のピークの増加と、CrtN 以降の STX 生合成経路産物 **2**、**3** および **4** のピークの減少をともに認めた。これは naftifine が CrtN を阻害したことにより、**1** から **2** への酵素変換が阻害されたためと考えられ、本評価系を用いて、STX 生合成中間体を網羅的に解析できることが示唆された。

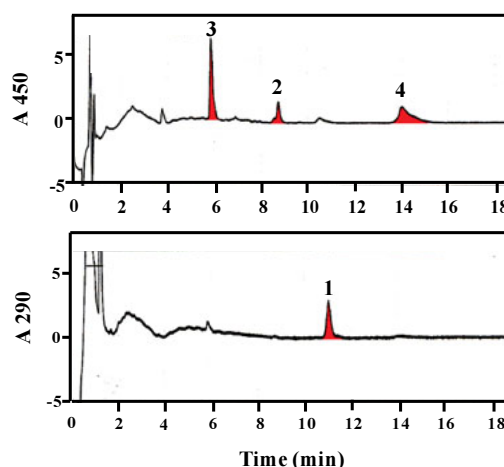


図 2. UFLC を用いた STX 生合成経路産物の検出
検出波長 450 nm (上段)、290 nm (下段)

2) 化合物ライブラリーを用いた STX 生合成経路阻害剤の探索

本評価系を用いて、我々のグループが保有する天然由来化合物ライブラリー約 350 化合物を評価した。その結果、2 化合物に **4** 生成を減少させる活性を見出した。真菌由来の化合物である FD549 (JP080003097 (1994)) は、naftifine と同様に **2**、**3** および **4** のピークの減少と **1** のピークの増加を示したことから、阻害点は CrtN であることが示唆された。また真菌由来化合物である citridone A (*Chem. Pharm. Bull.* **54**, 1659-1661 (2006)、*J. Antibiot.* **67**, 445-450 (2014)) は **1** から **4** 全てのピークを減少させたことから、阻害点は CrtM であることが示唆された。

3) 酵素レベルでの CrtM 阻害活性の評価

S. aureus FDA209P 株から抽出した DNA を鋳型として取得した *crtM* 遺伝子をベクターにライゲーション後、大腸菌に導入した。その大腸菌より、His タグ精製を行い、精製 CrtM を取得した。CrtM 阻害活性は Liu らの方法 (*Science* **319**, 1391-1394 (2008)) を参考に行った。サンプル存在下、精製 CrtM とその基質である farnesyl diphosphate を混合し 37°C で 1 時間酵素反応後、酢酸エチルにより酵素反応を停止させた。酢酸エチル層を乾固後、MeOH に再溶解し、UFLC で解析した。本精製酵素を用いて CrtM 阻害剤である zaragozic acid を評価したところ、その IC₅₀ 値は報告されている阻害活性と良い一致を示した。一方で、citridone A は 100 μ g/mL を作用させても **1** の生成を阻害しなかった。したがって citridone A の作用点は CrtM より上流である farnesyl diphosphate 合成酵素や、STX 生合成酵素群の遺伝子調節因子などに作用している可能性が示唆された。CrtM と同様に、CrtN についても、現在大腸菌異種発現系による精製酵素の取得

を行っており、FD549 の酵素レベルでの評価を実施する計画である。

以上の研究成果については、第 60 回日本脂質生化学会、第 91 回日本生化学会大会、日本薬学会第 139 年会で発表を行った。

4. これからの展望

本研究では黄色ブドウ球菌内の STX 生合成経路産物量の変動を UFLC を用いて検出する新たな STX 生合成阻害剤探索系の構築を行った。FD549 は naftifine と同様の UFLC 変動パターンを示したことから、その作用点は CrtN と予想された。CrtN 阻害剤として naftifine やその誘導体、また NP16 (*MBio* 8, e01224-17 (2017) が報告されているが、FD549 は既存の CrtN 阻害剤の構造とは全く異なっていることから、学術的な新規性が強く示唆される。さらに今後、酵素レベルでの CrtN 阻害活性について明らかとするとともに、*in vivo* レベルでの感染実験を行い、抗感染症治療薬のリード化合物へと発展させていきたいと考えている。

微生物資源はこれまでに、抗感染症薬をはじめとして、抗脂質異常症薬や免疫抑制剤などの創薬シーズだけでなく、研究用ツールとしてなど多岐に渡って有用であることが示されてきた。しかし近年、天然物化学研究は、製薬企業の撤退などに伴い下火になってきていると言われており。私は今後、アカデミックの立場から、本研究のように工夫を凝らした評価系を通して、天然物の魅力を発信し、天然物研究が再興する一助となるよう研究に励んでいきたいと考えている。

5. 社会に対するメッセージ

本研究では、宿主への感染性や病原性のみを低下させることに着眼した抗感染症薬へのアプローチを行いましたが、こうした挑戦的な研究に奨励金をいただけただけにととても感謝しております。本基金により、研究を遂行するための試薬等を整えられただけでなく、学会に参加し、多くの先生方とディスカッションする機会を得たことは何にも代えがたい財産となりました。私は、本研究の他にも、既存の抗菌薬の作用を増強させる化合物の探索およびその作用機序解析の研究も行っており、既存薬のポテンシャルを最大限に発揮させることに着眼した抗感染症(補助)薬へのアプローチも行っています。感染症の大規模な蔓延は多くの死者を出すなど人類の歴史上常に問題を引き起こし、その度に新しい抗生物質が開発されてきましたが、現在は、新しいタイプの抗菌薬がなかなか見つからないこと、また、経済的なメリットがあまりないことなどから新薬の開発はほとんど行われなくなっています。しかし、耐性菌出現の問題は常に存在しています。私たちがアカデミックで行っている独創的な発想に基づく研究が、こうした問題を解決するための一助となることを期待しています。これからもチャレンジングな研究へのご支援を宜しくお願い致します。