

海洋医薬資源からの潜在性結核菌に有効な 抗菌物質の探索と標的分子解析



研究ノート

荒井 雅吉*

Exploring anti-dormant mycobacterial substance from
marine medicinal resource and analysis of target molecule

Key Words : Marine natural products, Tuberculosis, Antibiotics, Target molecule

1. はじめに

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染を主因とする結核は、現在でも年間約 150 万人が死亡している感染症であり、他の感染症と同様、多剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。また、結核菌は、宿主に感染後、感染部位で形成される肉芽種 (granuloma) 内の環境刺激により、既存の抗結核薬に抵抗性を示す非分裂状態となり潜在化する特徴を持ち、このことが、結核の治療に多剤併用による最低 6ヶ月という長期の化学療法が必要な主因となっている。これらのことから、次世代の抗結核薬には、多剤耐性菌に有効であるだけでなく、潜在化した結核菌にも有効な抗菌剤であることが必須とされている。

一方、海綿やホヤなどの底生海洋生物や海洋微生物は、多彩な化学構造を有する二次代謝産物 (天然物) を産生する。また、この化学構造多様性は、結核菌が持つ様々な分子と選択的に結合できることを示唆しており、海洋由来の天然物は医薬シーズとしてだけでなく、その標的分子 (結合タンパク質) を明らかにすることを通して、結核に対する新しい創薬標的の開拓にも貢献できる。

このような背景から、筆者は、海洋医薬資源からの潜在性結核菌にも有効な新しい抗菌物質の探索研究を行うとともに、見出した抗菌物質の結合タンパ

ク質の解析を進めてきた。本稿ではこれら一連の研究について紹介する。

2. 潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索

結核菌は、granuloma 内の低酸素、低栄養または低 pH といった環境刺激により潜在状態が誘導されると考えられている。筆者は、*Mycobacterium bovis* BCG または *Mycobacterium smegmatis* を 0.1% の低酸素環境で培養することで、結核の第一選択薬 isoniazid に対して抵抗性を示す潜在状態を誘導することに成功し、これを抗菌物質探索のための評価系に応用した。そして、独自に保有する底生海洋生物の抽出エキスまたは海洋微生物の培養抽出物から、潜在状態を誘導した検定菌に対しても抗菌活性を示す化合物を探索し、これまでに、大環状アルカロイド halicyclamine 類、アミノリポペプチド trichoderin 類、ジテルペンアルカロイド agelasine 類などを見出してきた (図 1)¹⁻⁵⁾。また、これらはいずれも潜在状態の検定菌に効果を示すだけでなく、薬剤耐性菌を含む *M. tuberculosis* にも有効であることを明らかにしており、医薬シーズとして期待できる。

3. ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用する標的分子解析

頻用されている活性天然物の標的分子解析法として、ピオチンリンカーの付与など、活性天然物を合成化学的にプローブ分子化し、結合タンパク質を LC-MS/MS で同定する手法がある。しかしこの方法では、活性天然物のプローブ分子化が必要であるとともに、プローブ分子化による活性消失の可能性があった。このような背景から、筆者は、活性天然物のプローブ分子化を必要としない標的分子解析法として、ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用する方法を確立して研究を進めてきた。



* Masayoshi ARAI

1968年10月生まれ
北里大学大学院 薬学研究科 博士課程
修了 (1998年)
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 天
然物創薬学分野 特任教授 (常勤)
博士 (薬学) 天然物化学, ケミカルバイ
オロジー

TEL : 06-6879-8215

FAX : 06-6879-8215

E-mail : araim@phs.osaka-u.ac.jp

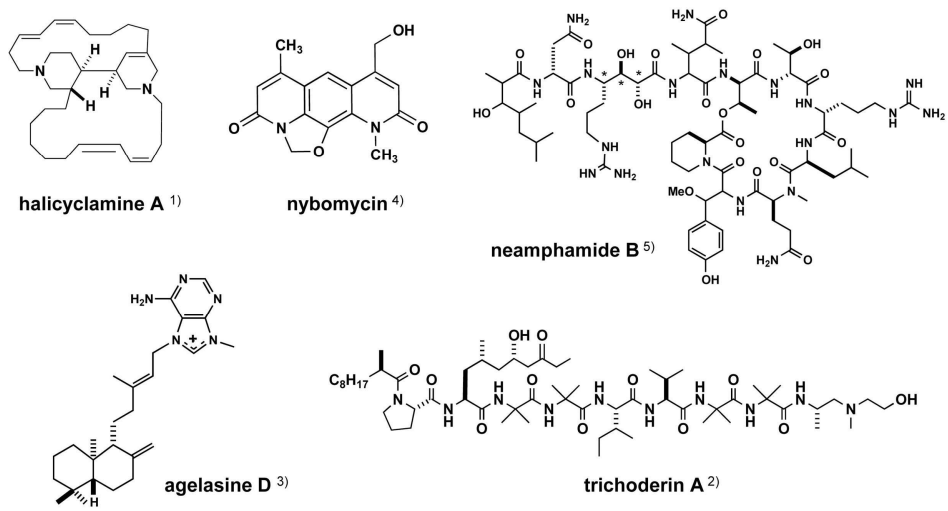


図1 潜在性結核菌に有効な海洋天然物

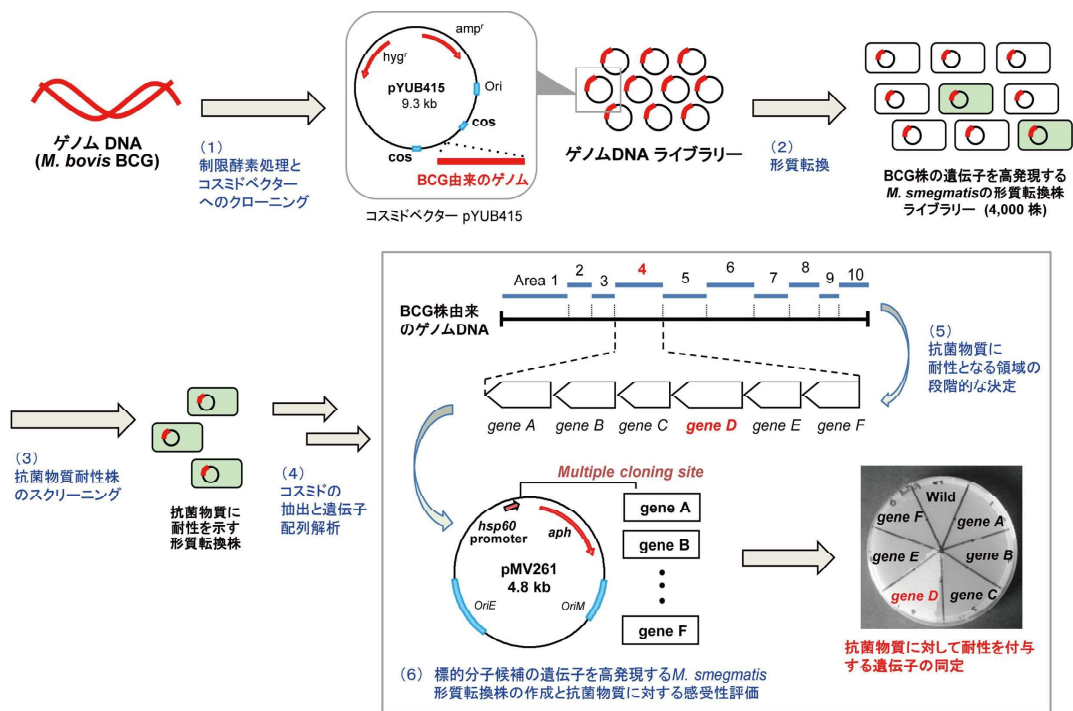


図2 ゲノムDNAライブラリー形質転換微生物を利用する標的分子解析方法

すなわち、筆者は、「抗菌物質に耐性を付与する遺伝子（タンパク質）の同定は、その標的分子の同定に繋がる」という考えのもと、*M. bovis* BCG由来のゲノムDNAライブラリーで形質転換した *M. smegmatis* の中から、抗菌物質に対して耐性を示す形質転換株を選択後、導入されている *M. bovis* BCG由来のゲノムを解析し、抗菌物質に耐性を付与する遺伝子を明らかにすることを行ってきた（図

2）。本稿では実際の研究例として、ジテルペンアルカロイド agelasine D（図1）の標的分子解析について紹介する。

4. 抗潜在性結核物質 agelasine D の標的分子解析

まず、ランダムに *M. bovis* BCGゲノムを高発現している約4,000株の *M. smegmatis* 形質転換株から、agelasine Dに耐性を示す形質転換株をスクリーニン

グした。その結果、8株の agelasine D 耐性株が得られた。次に、耐性株に導入されていた *M. bovis* BCG 由来のゲノムを解析した。その結果、全ての耐性株に含まれる共通配列として、*M. bovis* BCG ゲノムの 3475.0 ~ 3502.9 kb (27.9 kb) を見出した。すなわちこのことは、agelasine D に耐性を付与する遺伝子 (標的分子) が、この 27.9 kb 内に存在することを強く示唆する。そこで筆者は、この 27.9 kb のゲノムをさらに分割し、各領域を高発現する形質転換株を作成後、agelasine D に対する感受性を調べた。その結果、*BCG3184c* ~ *BCG3187c* の Open Reading Frame を含む領域を高発現させた形質転換株のみが agelasine D に対して耐性を示し、さらに同様な検討を進めた結果、最終的に dioxygenase と予想されるタンパク質をコードしている *BCG3185c* 遺伝子を高発現した形質転換株が agelasine D に対して耐性を示すことを明らかにした。また、*BCG3185c* 高発現株の菌体内 agelasine D 濃度を野生株と比較したところ、両株間での差は見られないことから、*BCG3185c* 高発現株の agelasine D 耐性機序は、agelasine D の代謝や菌体外排出の促進によるものではないことも確認された。次に、*BCG3185c* が agelasine D の標的分子であることを明らかにする為、リコンビナント *BCG3185c* を調製し、agelasine D と *BCG3185c* が直接結合するかどうかを表面プラズモン共鳴法で調べた。その結果、agelasine D と *BCG3185c* との結合親和性は、 K_D 値 $2.42 \mu\text{M}$ と算出された。一方、標的分子が異なる streptomycin と *BCG3185c* との結合親和性は、 K_D 値 1.47mM であった。以上の結果から、筆者は、抗菌物質としての agelasine D の標的分子は、*BCG3185c* であると結論付けた。

5. おわりに

発展途上国での発症や死亡率が高い結核に対する

新しい医薬シーズの創出は遅れており、潜在性結核菌にも有効な海洋天然物への期待は大きい。さらに、これまで見出されてきた結核に対する創薬標的の多くは、微生物学を中心とした研究から見出されており、本稿で紹介した活性天然物を利用する化学的視点からの検討は、これまでとは異なる新規創薬標的の開拓に繋がることが期待される。今後も海洋医薬資源からの潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索と標的分子の解析を積極的に進め、アカデミアからの医薬シーズや創薬標的の創出に貢献できるよう尽力したい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、科学研究費補助金、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (17am0101084j0001)、篷庵社の助成により行われたものである。また、本研究の遂行に際しご指導、ご助言を頂いた、現大阪大学名誉教授小林資正先生、共同研究者の方々、ならびに学生諸氏に深謝する。

参考文献

- 1) M. Arai, L. Liu, T. Fujimoto, A. Setiawan, M. Kobayashi, *Marine Drugs* **2011**, 9, 984-993.
- 2) P. Pruksakorn, M. Arai, L. Liu, P. Moodley, W. R. Jacobs, Jr., M. Kobayashi, *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, 34, 1287-1290.
- 3) M. Arai, Y. Yamano, A. Setiawan, M. Kobayashi, *ChemBioChem* **2014**, 15, 117-123.
- 4) M. Arai, K. Kamiya, P. Pruksakorn, Y. Sumii, N. Kotoku, J.P. Joubert, P. Moodley, C. Han, S. Dayoung, M. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 3534-3541.
- 5) Y. Yamano, M. Arai, M. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4877-4881.