

放線菌が生産するマクロジオリド抗生物質の作用機序解析

君嶋 葵

北里大学 大村智記念研究所

研究の目的

Clostridioides difficile (*C. difficile*)が原因で発症する抗菌薬関連腸炎や偽膜性大腸炎などの多様な *C. difficile* Infection が世界的な問題となっている。¹⁾そのような背景のもと、大村智記念研究所において、*C. difficile* に対し選択的かつ強力な抗菌活性を示すマクロジオリド化合物として luminamicin が放線菌 *Streptomyces* sp. OMR-59 株の培養液から見出された。²⁾さらに、luminamicin は *in vivo* ハムスター感染実験においても、既存薬のバンコマイシンより優れた治療効果を示すことが明らかになっている。以上のよう、luminamicin は既存薬より優れた抗菌スペクトルと特徴的な構造を有することから新規作用機序を有することが期待されているが、未解明のままである。そこで、本研究では、当研究所が有する放線菌 luminamicin の抗嫌気性菌活性の作用機序解明を目的に標的分子の同定を行う。本作用機序が解明されれば、新規抗感染症治療薬の創製への応用が期待される。

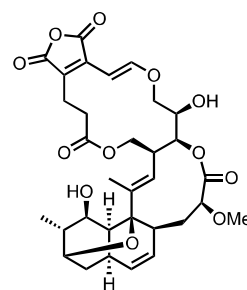


図1. luminamicin

方法

作用機構解明に向けて、まず、野生株 *C. difficile* (ATCC BAA-1382 strain 630)に対し、繰り返し luminamicin で薬剤処理後、継代培養することで luminamicin 耐性株を取得する。そして、それぞれの株の total DNA を抽出し、変異点解析を行う。その際、耐性度の異なる菌株間でも比較することで、耐性化に必須な因子を絞り込む。次に、luminamicin 耐性 *C. difficile* の変異点解析と並行して、ケミカルプローブ体の合成も進める。これまでの luminamicin の構造活性相関に関する検討において、マレインイミドへの変換はある程度許容であり、C21 位は非常に反応性が高く、容易に共役付加を受けることが、判明している。加えて、その共役付加体は活性が消失することから、標的分子に対し、luminamicin は 21 位で共有結合的に作用していると申請者は考察している。Luminamicin のケミカルプローブに関しては、活性を維持したまま誘導化可能なマレインプローブを設計した。仮に、申請者の考察通りに、21 位で標的分子と共有結合で作用している場合にはプローブ A を用いて、*C. difficile* ライセートと反応させ、蛍光剤を有するアジドとのクリックケミストリーによって、プローブと標的分子複合体を標識する。その後、その蛍光性を指標にした解析により、結合タンパクの解析を行う。もう一方の方法として、luminamicin が標的分子と非共有結合で

作用している場合には、強力な共有結合を形成できるジアジリンリンカーを導入したプローブも合成する。そして、*C. difficile* ライセートからのプルダウンアッセイを実施する。最後に、ゲノム解析とプルダウンアッセイによって絞り込みを行った候補に関して、想定標的分子遺伝子変異 *C. difficile* 株を作製する。標的分子としては、菌の生存に必須であることが想定されるため、想定標的分子過剰発現株を作製し、luminamicin に対する野生株との薬剤感受性を比較する(想定分子が標的であれば、過剰発現株における MIC が上昇する)。その手法として、Fagn らの報告³⁾を参考に大腸菌と *C. difficile* のシャトルベクターである pRPF185 を用いて、遺伝子変異株を作製する。本実験を持って、luminamicin の標的分子の同定を行う。

結果

Luminamicin は標準的な実験室適応嫌気性細菌株に対して選択的活性を示すことがわかっている。しかし、薬剤耐性臨床分離株に対する抗菌活性の評価はまだ行われていない。そこで、luminamicin の抗菌活性を再評価した。これまでの報告同様に luminamicin はグラム陽性偏性嫌気性菌に対して選択的抗菌活性を示した。さらに、luminamicin の *C. difficile* に対する抗菌活性はバンコマイシンに匹敵し、且つ *C. difficile* に対する狭域スペクトル抗生物質であることがわかった。また、luminamicin はフィダキソマイシン耐性 *C. difficile* 株にも有効であることから、既存の薬剤(バンコマイシン;ペプチドグリカン合成、フィダキソマイシン;RNA ポリメラーゼ)とは異なる作用機序を有することが期待される。続いて、luminamicin 耐性 *C. difficile* 株の取得を試みた。*C. difficile* を luminamicin 含有培地に播種すると、luminamicin 耐性 *C. difficile* 株 (MIC 値=2-8 mg/mL) が生じた。変異解析には MIC が最も高い株を選んだ。この変異体と野生株の全ゲノム解析を行なった。結果として、既存薬のフィダキソマイシンの標的である RNA ポリメラーゼには変異が見られなかったが、細胞壁タンパク質である CwpV の C 末端可変領域 (CDIF 630_RS 03155) の一部のアミノ酸の欠失が確認された。さらに、仮想タンパク質 (CDIF 630_02150) 部分にも変異が見られた。以上の結果からも、luminamicin が既存薬とは異なる作用機序を有することが強く示唆された。そして、天然物 luminamicin を用いて、ケミカルプローブ作製に向けて、誘導体合成と構造活性相関研究を行った。まず初めに、多くの生理活性化合物が求電子的な位置で標的結合部位に共有結合しているため、無水マレイン酸やエノールエーテルのような luminamicin の高度に求電子的な部分が誘導体化された。最終的に、9 つの誘導体を合成し、それらの誘導体の活性評価を行った。結果として、無水マレイン酸とエノールエーテル部分は抗菌活性を維持するために非常に重要な官能基であり、14 員環と 10 員環ラクトンは適切な分子配座をとることに起因すると考えられる。驚くべきことに、アシル誘導体は抗菌活性を示さなかったことから、C-18-OH 基が必須の官能基であることが示唆された。これらの発見と以前の報告から、luminamicin の全分子が抗嫌気性菌活性に必要であると考えられる。さらに、共役エ

ノールエーテルの高い求電子性を考えると、luminamicin は共役エノールエーテル部分を介して標的分子に結合する可能性がある。さらに、luminamicin を適切な立体配座に固定するには、酸素架橋含有デカリン骨格部分、14 員環および 10 員環ラクトン部分が必要であることがわかった。現在は、合成したプロパルギル基を有するマレインイミド体を用いて、プルダンアッセイを行っており、標的分子候補分子の選抜が進んでいる。

結論

Luminamicin 耐性 *C.difficile* の配列解析により、CwpV (CDIF 630_03155) および/または仮想的なタンパク質 (CDIF 630_02150) が分子標的である可能性が示された。CwpV はファージ感染に対する耐性因子であることが提案されているため (ref:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.13121>), luminamici が *C.difficile* のファージ感染を防御するために CwpV を予防するという 1 つの可能な仮説を仮定した。しかし、CwpV の C 末端領域は可変であることが知られているため、この欠失が luminamicin 耐性変異体の構築中に自然発生する可能性を考慮する必要がある。このことと、仮説上のタンパク質 (CDIF 630_02150) の機能が不明であることを考慮すると、luminamicin の作用機序を特定するためには更なる検討が必要である。さらに、天然物から誘導体を合成し、臨床分離株を含む 27 種類の病原体に対する生物活性を評価した。生物活性試験の結果に基づくと、無水マレイン酸とエノールエーテル部分は *C.difficile* に対する抗菌活性を維持するために非常に重要な官能基であると考えられ、14 員環と 10 員環ラクトンは適切な分子配座を取ることに影響する可能性がある。

文献

- 1) John G Bartlett, Dale N Gerding, (2008), *Clin. Infect. Dis.* 15 (46): S12-8.
- 2) S Ōmura, R Iwata, Y Iwai, S Taga, Y Tanaka, H Tomoda. (1985), Luminamicin, A New Antibiotic Production, Isolation and Physico-Chemical and Biological Properties. *J. Antibiot* (Tokyo). 38 (10): 1322–1326.
- 3) Robert P. Fang, Neil F. Fairweather, (2011), *Clostridium difficile* Has Two Parallel and Essential Sec Secretion System. *J. Biol. Chem.*, 286, 27483-27493.