The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索とケミカルジェネティクスによるその標的分子の解明
Author(s)	山野, 喜
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54708
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【３】

氏　　名	山　野　　喜（やま の よし）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５７４４　号
学位授与年月日	平成 25 年 1 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索とケミカルジェネティクスによるその標的分子の解明**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小林　資正 （副査） 教　授　藤岡　弘道　　教　授　宇野　公之　　教　授　小比賀　聡

論　文　内　容　の　要　旨

結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）感染により引き起こされる結核は、現在でも年間約200万人の死亡原因となっている感染症である。結核菌は主に排菌患者の咳やくしゃみ、呼気などを吸い込むことで肺に感染する

が、結核菌感染は他の細菌感染と異なり、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たgranuloma(肉芽腫)内において、その代謝経路を変化させ潜在状態で数十年という長期に渡り生存し、老化、HIV感染、抗がん剤治療や免疫抑制剤の使用などによる免疫力の低下を機に再び活性化し、結核を発症することが知られている。また潜在性結核菌は既存の抗結核薬に対して低感受性であることが知られており、このことが、多剤併用による最低6カ月という長期の化学療法が必要な主因と考えられている。これらのことから、潜在性結核菌にも効果的に作用する新たな医薬シーズの探索と結核に対する新規薬剤標的分子の開拓は重要な課題である。そこで筆者は、潜在状態の結核菌にも有効な新規抗結核薬のリード化合物の創製を目的に、granuloma内の環境およびgranuloma内での結核菌の代謝変化に着目した2つの評価系（低酸素培養条件下で抗菌活性を保持する化合物のスクリーニング、脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌物質のスクリーニング）を用いて、海綿の抽出エキスライブラリーを対象とする探索研究を行った。

その結果、沖縄県産海綿*Neamphius* sp.のMeOH抽出エキスから、neamphamide B と命名した新規環状デプシペプチドを見出し、質量分析およびNMRスペクトル解析によりその平面構造を3-hydroxy-2,4,6-trimethylheptanoic acid (Htmha)-asparagine (Asn)-4-amino-7-guanidino- 2,3-dihydroxy heptanoic acid (Agdha)-3,4-dimethylglutamine (3,4-diMeGln)-*cycle* (threonine (Thr^1)-threonine (Thr^2)-arginine (Arg)-leucine (Leu)- *N*-methylglutamine (*N*MeGln)-β-methoxytyrosine (βOMeTry)-homoproline (Hpr))であると決定した。また、各アミノ酸の立体構造は、neamphamide Bの加水分解物を、FDAAまたはGITCで誘導体化し、標品のDおよびLアミノ酸の誘導体とHPLC上での保持時間を比較することにより決定した。その結果Asn、Hpr、Arg、Leuおよび2つのThrの絶対立体構造はそれぞれ*D*-Asn、*L*-Hpr、*D*-Arg、*L*-Leuおよび*D-allo*-Thrであることが明らかとなった。さらにAgdhaの立体化学に関しては、類縁化合物であるcallipeltin Aの立体構造を参考に、その結合定数から相対配置を推定した。Neamphamide Bは*M. smegmatis* に対して好気培養条件および潜在状態を誘導する低酸素培養条件において1.56 μg/mLの最小生育阻止濃度(MIC)を示し、*M. bovis* BCGに対しては好気培養条件で6.25 μg/mL、低酸素培養条件で12.5 μg/mLのMICを示した

また、インドネシア産海綿*Agelas* sp.のMeOH抽出エキスからは、ジテルペンアルカロイドagelasine B、CおよびD を単離した。これらの化合物はいずれも、好気培養条件および潜在状態を誘導する低酸素培養条件の両条件下において、*M. smegmatis*に対して0.8-3.13 μg/mLのMICを示し、*M. bovis* BCGに対しては1.56-12.5 μg/mLのMICを示した。

脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌物質の探索では、インドネシア産海綿*Melophlus* sp.のMeOH抽出エキスから、グルコースを炭素源とする培地と比較して、プロピオン酸を炭素源とする培地選択的に抗菌活性を示す化合物として、テトラミン酸誘導体melophlin A 、G 、H および I を単離した。Melophlin類は*M. smegmatis*に対して、glucoseまたはpalmitateを炭素源とする培地で3.13-25 μg/mLのMICを示すのに対して、propionateを炭素源とする培地ではMIC 0.4-0.8 μg/mLと4倍以上の選択的な抗菌活性を示した。また、*M. bovis* BCGに対しても同様に、4倍以上のpropionate含有培地選択的な抗菌活性を示した。

一方、これらPhenotypic Screeningにより得られた化合物は新規薬剤標的分子を阻害する抗菌物質であることが期待されるが、新規標的分子の解析には多くの時間を要するという問題がある。そのような中、筆者らは、簡便に抗菌物質の標的分子を明らかにする方法として、「抗菌物質の標的分子の高発現株は、その抗菌物質に対して耐性を示す」という考えを基本にしたゲノムDNAライブラリーを利用する抗菌物質の標的分子解析法を確立している。本研究では、取得量が多く、強い抗菌活性を示したagelasine D およびmelophlin A に本方法を適用して、その標的分子解析を行った。すなわち、*M. bovis* BCGのゲノムから作成したゲノムDNAライブラリーで、*M. smegmatis*を形質転換し、ランダムに*M. bovis* BCG株のゲノム断片を高発現する約4,000の形質転換株を作成した。そしてこの中から、化合物に耐性を示す形質転換株を取得後、そこに含まれるcosmidの配列を解析し、さらに分割した小さなゲノムを高発現する形質転換株の作成と化合物に対する耐性の有無を確認して行き、最終的に、化合物に対して耐性を付与する遺伝子を明らかにすることを試みた。その結果、agelasine D については、*M. bovis* BCGのdioxygenase と予想される*BCG3185c*遺伝子を高発現させた場合に、agelasine Dに対して耐性を示した。さらに*BCG3185c*遺伝子をHis-tag融合タンパク質として発現させ、agelasine Dとの結合親和性をBIACOREにより解析した結果、解離定数(K_D)が2.42 μMと算出され、agelasine Dと*BCG3185c*遺伝子のHis-tag融合タンパク質が直接結合していることが明らかとなった。一方melophlin A についても同様な手法を適応して、melophlin Aに対して耐性を付与する遺伝子を探索した結果、*M. bovis* BCGの*BCG1083*遺伝子(possibly exopolyphosphatase)と*BCG1321c*遺伝子(hypothetical HIT-like protein)を高発現させた場合に、melophlin Aに対して耐性を示すことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

結核は、結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*） を吸い込むことで肺に感染する感染症で、現在でも年間約200万人の患者が死亡する。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が、一部の菌は、免疫細胞により形成されたgranuloma(肉芽腫)内において潜在状態で数十年という長期に渡り生存することから、多剤併用による最低6カ月という長期の化学療法が必要である。そして、老化、HIV感染、抗がん剤治療や免疫抑制剤の使用などによる免疫力の低下を機に再び活性化し、結核を発症する。

申請者は、この潜在性結核菌にも効果的に作用する新たな抗菌剤シーズの探索と結核に対する新規薬剤標的分子の開拓を目指して、granuloma内の環境およびgranuloma内での結核菌の代謝変化に着目した低酸素培養条件下で抗菌活性を保持する化合物を探索するスクリーニングと新たに構築した脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌物質のスクリーニングを用いて、海綿の抽出エキスライブラリーからの探索研究を行った。

その結果、低酸素培養条件下で抗菌活性を保持する化合物のスクリーニングからは、沖縄で採取された海綿（*Neamphius* sp.）から、neamphamide B と命名した環状デプシペプチド構造を有する活性物質を見出し、その化学構造を解析した。また、インドネシアで採取した海綿（*Agelas* sp.）からは、活性物質としてジテルペンアルカロイドagelasine B、CおよびD を見出した。一方、脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌物質のスクリーニングからは、インドネシアで採取した海綿（*Melophlus* sp.）から、グルコースを炭素源とする培地と比較して、プロピオン酸を炭素源とする培地選択的に抗菌活性を示す化合物として、テトラミン酸誘導体melophlin A 、G 、H および I を見出した。

申請者らは、ゲノムDNAライブラリーを利用する抗菌物質の標的分子解析法を確立しており、agelasine D およびmelophlin Aの標的分子解析を行った。その結果、agelasine D については、*M. bovis* BCGのdioxygenase と予想されるBCG3185c遺伝子を高発現させた場合に、agelasine Dに対して耐性を示した。さらにBCG3185c遺伝子をHis-tag融合タンパク質として発現させ、agelasine Dとの結合親和性を共鳴プラズモン法により解析した結果、agelasine DとBCG3185c遺伝子のHis-tag融合タンパク質が直接結合することを明らかにした。一方、melophlin A についても同様な手法を適応して、melophlin Aに対して耐性を付与する遺伝子を探索した結果、*M. bovis* BCGのBCG1083遺伝子(possibly exopolyphosphatase)とBCG1321c遺伝子(hypothetical HIT-like protein)を高発現させた場合に、melophlin Aに対して耐性を示すことを明らかにした。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。