

Title	Search for anti-mycobacterial substances against dormant bacilli from marine organisms
Author(s)	Patamaporn, Pruksakorn
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57945
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	Patamaporn Pruksakorn パタマーポーン プルックスアコーン
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 23762 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	Search for anti-mycobacterial substances against dormant bacilli from marine organisms (海洋生物由来の抗潜在性結核菌物質の探索研究)
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

*Mycobacterium tuberculosis*感染を原因とする結核症は、2007年でも約180万人が死亡している感染症である。結核菌感染は他の感染症とは異なり、多くの場合その発症は宿主の免疫応答により回避される。しかしながら一部の菌は、免疫細胞により形成されるgranuloma内においてその性状を変化させ、非分裂状態で長期に渡り潜在し続ける特徴を持つ。またこのことが多剤併用による長期の化学療法を必要とする主因となっている。このことから、潜在性結核菌にも有効で、短期間に効果を示す新しい薬剤の開発は重要な課題である。

一方、海洋生物は海水中という高圧な閉鎖系の環境に生育し、陸上生物とは異なった代謝系あるいは生体防御系を発展させてきたと考えられる。したがって、それらの二次代謝産物の中には、陸棲の生物では見られない、特異な化学構造を有する生物活性物質の存在が期待されている。

以上のような背景から、著者は、潜在性結核菌に有効な抗菌物質の創製を目的に、スクリーニング系を構築し、底生海洋生物の抽出エキスおよび海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーからの探索を行った。

活性試験は、granuloma内が低酸素環境にあること、また低酸素環境で培養した結核菌は、granuloma内の結核菌と同様、抗結核剤isoniazidに対して抵抗性を示すという知見を基に構築した。すなわち検定菌にはヒトへの感染性がなく生育の早い*Mycobacterium smegmatis*と、結核菌と同様に生育の遅いワクチン株*Mycobacterium bovis* BCGを使用し、isoniazidの最小生育阻止濃度(MIC)を好気条件の10倍以上に上昇させる0.2%の低酸素条件下、MTT試薬を用いる比色定量法によりMICを算出した。そして本法によりスクリーニングを行った結果、3つの新規アミノリポペプチド化合物および13種の既知化合物を潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として単離した。本論文では、新規化合物trichoderin類および潜在性結核菌にも有効であることを初めて明らかにしたnybomycinに関する詳細な検討を行った。

Trichoderin類は、2005年にインドネシア産海綿から分離した真菌*Trichoderma* sp. 05F148株の培養抽出物から発見した。活性試験の結果を指標に分画精製を行った結果、3種の活性成分を単離した。各種スペクトルデータの解析からこれらの化合物はいずれも新規化学構造のアミノリポペプチド類であることが明らかとなり、trichoderin A, A1およびBと命名した。またtrichoderin類は、*M. smegmatis* および*M. bovis* BCGに対して好気、低酸素の両条件下で0.02から1.56 µg/mLのMICを示した。一方、trichoderin類の作用メカニズム解析については、ケミカルゲノミックスのアプローチによる解析を行った。すなわち、*M. bovis* BCGのゲノムDNAライブラリ

一で *M. smegmatis* を形質転換し、ランダムに *M. bovis* BCG のゲノムを発現する約4000の形質転換株を作成した。そしてこの中から trichoderin A に対して耐性を示す形質転換株を選択し、得られた形質転換株に含まれる *M. bovis* BCG のゲノムDNAを明らかにした。本手法を実施した結果、3つの trichoderin A に耐性を示す形質転換株を取得した。そしてこれらに含まれる *M. bovis* BCG のゲノムDNAフラグメントを調べた結果、trichoderin A の標的分子は、*M. bovis* BCGゲノム配列の1461.9kbから1488.4kbの26.5kbの間に存在することが明らかとなった。また、trichoderin類と類似した化学構造を持つ leucinoastatin類は、mitochondriaのATP合成を阻害することが報告されている。この知見と、trichoderin Aの標的分子を含む26.5kbの配列内に、*Mycobacterium*属細菌のATP合成酵素をコードする遺伝子が含まれていることから、trichoderins Aは *Mycobacterium*属細菌のATP合成酵素を阻害することにより、抗菌活性を示していることが示唆された。そこで菌体内ATP量への trichoderins Aの影響を検討した。その結果 trichoderin Aは菌体内ATP量を減少させることが明らかになった。

一方、海洋由来の放線菌から単離した nybomycin が、潜在状態の結核菌に対しても有効であることを見出した。Nybomycinは、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対して好気、低酸素の両条件下で、MIC 1.0 µg/mLを示し、その抗菌活性は殺菌的であることを明らかにした。さらに、nybomycinで *M. smegmatis* を処理した場合、菌の死滅過程で菌の形状が変化することを見出した。また論文調査の結果、Ser/Thr protein kinaseの *pknA* および *pknB*、細胞分裂に関わる *whmD* や *ftsZ* 遺伝子の欠損株が、nybomycin処理時と同様な形態変化を示すことが明らかとなった。そこでこれら遺伝子の高発現形質転換株を作成し、nybomycinに対して耐性を示すか否かを検討した。その結果、作成した形質転換株はいずれもnybomycinに耐性を示さなかった。そこで次に著者は、nybomycinの自然耐性株を取得し、そのゲノム中の変異を明らかにすることにより、標的分子を見出すことを試みた。Nybomycinの自然耐性株を取得後、その全ゲノム配列を調べた結果、MSMEG_6223の tetR family と呼ばれる転写因子およびMSMEG_6471の Glycine/D-amino acid oxidase に変異を見出した。

論文審査の結果の要旨

結核は他の感染症とは異なり、その発症は宿主の免疫応答により回避されるが、一部の菌は、免疫細胞により形成される granuloma 内においてその性状を変化させ、非分裂状態で長期に渡り潜在し続ける。そのため、多剤併用による長期の化学療法を必要とすることから、潜在性結核菌にも有効で、短期間に効果を示す新しい薬剤の開発が求められている。申請者は、潜在性結核菌に有効な抗菌物質を創製することを目的に、探索スクリーニング系を構築し、医薬資源の宝庫として注目されている底生海洋生物の抽出エキスおよび海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーからの探索を行った。

スクリーニング法は、granuloma内が低酸素環境にあること、また低酸素環境で培養した結核菌は、granuloma内の結核菌と同様に抗結核剤 isoniazid に対して抵抗性を示すという知見を基に、ヒトへの感染性がなく生育の早い *Mycobacterium smegmatis* と、結核菌と同様に生育の遅いワクチン株 *Mycobacterium bovis* BCG を検定菌として用いて構築した。そして本法によりスクリーニングを行った結果、3つの新規アミノリポペプチド化合物および13種の既知化合物を潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として見出した。本論文では、新規化合物 trichoderin 類および nybomycin に関する詳細な検討を行っている。

活性を示したインドネシア産海綿から分離した真菌 *Trichoderma* sp. の培養抽出物から、活性試験の結果を指標に分画精製を行い、3種の新規活性成分 trichoderin A, A1 および B を見出した。Trichoderin 類は、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対して好気、低酸素の両条件下で生育阻害活性を示した。Trichoderin 類の作用メカニズム解析については、ケミカルゲノミックスのアプローチによる解析を行った。すなわち、*M. bovis* BCG のゲノムDNAライブラリーで *M. smegmatis* を形質転換し、ランダムに *M. bovis* BCG のゲノムを発現する約4000の形質転換株を作成した。そしてこの中から trichoderin A に対して耐性を示す形質転換株を選択し、得られた形質転換株に含まれる *M. bovis* BCG のゲノムDNAを明らかにした。そして、trichoderin 類と類似した化学構造を持つ leucinoastatin類が、mitochondriaのATP合成を阻害することが報告されており、trichoderin Aの標的分子を含むゲノム中に、*Mycobacterium*属細菌のATP合成酵素をコードする遺伝子が含まれていたことから、trichoderins Aは *Mycobacterium*属細菌のATP合成酵素を阻害することにより、抗菌活性を示すことが示唆された。そこで菌体内ATP量への trichoderins Aの影響を解析し、trichoderin Aは菌体内ATP量を減少させることを明らかにした。

また、海洋由来の放線菌から単離した nybomycin が、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対して好気、低酸素の両条件下で抗菌活性を示し、その抗菌活性は殺菌的であることを明らかにした。さらに、nybomycinで *M. smegmatis* を処理した場合、菌の死滅過程で菌の形状が変化することを見出したことから、同様な形態変化を誘導する Ser/Thr protein kinaseの *pknA* および *pknB*、細胞分裂に関わる *whmD* や *ftsZ* 遺伝子の高発現形質転換株を作成し、nybomycinに対して耐性を示すか否かを検討したが、作成した形質転換株はいずれもnybomycinに耐性を示さなかった。そこで次に著者は、nybomycinの自然耐性株を取得し、そのゲノム中の変異を明らかにすることにより、標的分子を見出すことを試みた。Nybomycinの自然耐性株を取得後、その全ゲノム配列を調べた結果、MSMEG_6223の tetR family と呼ばれる転写因子およびMSMEG_6471の Glycine/D-amino acid oxidase に変異を見出した。

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。