

Title	海洋薬物資源からのバイオフィルム形成阻害物質の探索
Author(s)	石田, 俊介
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58564
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

の効果的な新薬開発戦略を提案した。

ドラッグ・ラグはわが国にとって非常に深刻な課題であり、その解消に向けてバイオマーカー、ブリッジングなどの使用が規制当局から推奨されてきたが、その効果に関する系統的な検証はなされていない。本研究成果は、今後の新薬開発手法に方向付けを行うという点で貴重な研究と判断される。また、ドラッグ・ラグ解消に向けた新たな開発戦略の提案は、国際的な規制基準を考慮して、現在推奨されている開発手法を、グローバルな観点から進展させたものでありレギュラトリーサイエンスの面から高く評価できる。

以上から、本論文の内容は博士の学位を授与するに相応しいと考える。

【18】

氏名	いし 田 しょう 介
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 24525 号
学位授与年月日	平成23年3月25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	海洋薬物資源からのバイオフィーム形成阻害物質の探索
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正 (副査) 教授 田中 徹明 教授 宇野 公之 教授 小比賀 聡

論文内容の要旨

多くの病原微生物が形成する能力を持つbiofilmは、病原因子産生や増殖調整のための微生物間のコミュニケーションの場となるだけでなく、抗菌剤や宿主免疫システムからの防御機構としても機能すると考えられている。また実際に、*Pseudomonas aeruginosa* による嚢胞性線維症、*Escherichia coli* による尿路感染症や*Staphylococcus aureus* による骨髄炎などは、biofilm形成がその要因や慢性化の原因となることが報告されている。これらのことから、病原微生物のbiofilm形成を阻害する化合物は、関連する疾患の増悪化や慢性化の予防、抗菌剤や免疫細胞の病原微生物に対する感受性を増強することが期待される。さらに、その作用メカニズムを明らかにすることは、biofilm形成に関与する新しい制御機構の解明に繋がると考えられる。一方、海洋由来の活性天然物は化学構造の多様性が非常に広いことから、菌体内のbiofilm形成に関わる未知の標的分子に対して特異的に作用することが期待でき、これらの探索源から見出される化合物は、新規の作用メカニズムを有する可能性が高い。

このような背景から著者は、海洋薬物資源からの新規biofilm形成阻害物質の創製を目的として、96-well plateによる多検体の評価が可能なスクリーニング系を構築した。すなわち、*Mycobacterium smegmatis* をモデル微生物に、biofilm形成を阻害できるサンプルの最小濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) と、サンプルの抗菌活性のMICを測定し、biofilm形成阻害活性のMICが抗菌活性のMICよりも低濃度となるスクリーニングサンプルを選択した。そして、本活性を示した、海綿を中心とす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について、活性試験の結果を指標に、溶媒

間分配、各種カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、海洋由来真菌からは、mycotoxinとして報告されているsterigmatocystin類、海洋由来放線菌からは、macrodilolideであるelaiophyllinおよびcyclic trihydroxamateであるdesferrioxamine E、海綿からはsesterterpeneであるheteronemin類およびneomanoalide類など計10種の化合物をbiofilm形成阻害物質として見出した。本論文においては、desferrioxamine Eおよびheteroneminについてさらに詳細な検討を行った。

Desferrioxamine Eおよびheteroneminは、それぞれ*M. smegmatis* のbiofilm形成を10 μMおよび6.4 μMで阻害し、160 μMおよび205 μMまで抗菌活性を示さなかった。また*M. tuberculosis* と同じ遅生育型の*M. bovis* BCG に対しても同様な活性を示した。次に、両化合物が、biofilm形成により獲得した*M. smegmatis* の抗結核薬isoniazid抵抗性を解除できるか否かを検討した。その結果、両化合物は抗菌活性を示さない濃度で、*M. smegmatis* のisoniazid抵抗性を解除できることが明らかとなった。

さらに、desferrioxamine Eおよびheteroneminの作用メカニズムを解析した。Desferrioxamine Eは、鉄イオンをキレートするsiderophoreとして知られている。また*M. smegmatis* の鉄獲得に関与する遺伝子を欠損させた場合、biofilmを形成できなくなることが報告されている。そこでdesferrioxamine Eのbiofilm形成阻害活性における鉄イオンの影響を検討した。その結果、鉄イオン非存在下では*M. smegmatis* のbiofilm形成は観察されず、鉄イオンは*M. smegmatis* のbiofilm形成に必須であることが確認された。また、通常の活性評価で使用する2 μMの鉄イオンを含む培地では、desferrioxamine Eは10 μMのMICを示すのに対し、鉄イオン濃度を0.5 μMにした培地ではその活性が増強し、逆に鉄イオン濃度を増加させた場合には、活性の減弱が見られた。また鉄イオン濃度は、*M. smegmatis* の増殖速度に影響せず、desferrioxamine Eの抗菌活性も変化しないことから、desferrioxamine Eは、*Mycobacterium* 属細菌への鉄の供給を阻害することによりbiofilm形成阻害作用を示すことが示唆された。

一方、heteroneminについてはケミカルジェネティクスの手法による解析を試みた。すなわち、化合物の標的分子を高発現する形質転換体は、その化合物に耐性を示すという考えのもと、*M. bovis* BCG 株由来のゲノムDNAライブラリーで*M. smegmatis* を形質転換し、ランダムに*M. bovis* BCG 株由来のゲノムDNAを高発現する形質転換体を作成した。そして、この中からheteroneminのbiofilm形成阻害活性に耐性を示す形質転換体をスクリーニングした。その結果、heteroneminのbiofilm形成阻害活性に耐性を示す4つの形質転換体の分離に成功し、さらに含有されるコスミドDNAの配列を解析すると、いずれのコスミドも*M. bovis* BCG ゲノムの901.55 kb-929.23 kbの領域 (30個のOpen Reading Frame) を含んでいることが明らかとなった。またこの領域と*M. tuberculosis* のゲノム配列はほぼ同一であった。

M. tuberculosis については、トランスゴザン変異実験により必須遺伝子が明らかにされている。またheteroneminは抗菌活性を示さずbiofilm形成阻害活性を有する。このことから、この領域に存在する遺伝子のうち、必須遺伝子として報告されている遺伝子はheteroneminの標的分子候補から除外できると考えられる。さらにheteroneminは、*M. smegmatis* および*M. bovis* BCG の両株に対して同様なbiofilm形成阻害活性を示すことから、両菌株に共通して存在する遺伝子が標的分子の候補であると予想された。これらのことを考慮すると、heteroneminの標的分子は、コスミド配列中の24個の遺伝子の中のいずれかであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

多くの微生物が形成するバイオフィームは、増殖調整のための微生物間のコミュニケーションの場になる他、病原微生物の病原因子産生にも関わる。さらにバイオフィームは、抗菌剤に対する抵抗性の獲得や宿主生物の免疫システムから逃れるための防御機構としても役立っている。したがって、申請者は、病原微生物のバイオフィームの形成を阻害する化合物は、抗菌剤に対する抵抗性の発現を押さえ、免疫細胞の病原微生物に対する感受性を増強させることにより病原微生物が引き起こす疾患の増悪化や慢性化を予防することができると考えた。また、バイオフィームの形成阻害の作用メカニズムを明らかにすることが、バイオフィーム形成を阻害する新しい制御機構の発見に繋がると考えた。

著者は、病原性のない早成型の結核菌*Mycobacterium smegmatis* を使って96穴プレートを用いるバイオフィーム形成阻害活性物質を探索するスクリーニング法を構築した。そして、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスライブラリーと海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーから、活性試験の結果を指標にして探索した結果、海洋由来放線菌から環状化合物のdesferrioxamine Eを、海綿からはセスタテルペンのheteronemin類など計10種の活性物質を見出した。

Desferrioxamine Eおよびheteroneminは、それぞれ*M. smegmatis* のバイオフィーム形成を阻害するが、高濃度まで抗菌活性を示さないことから、増殖抑制によるバイオフィームの抑制ではないことが判明した。また*M. tuberculosis* と同じ遅生育型の*M. bovis* BCG に対しても同様な活性を示した。さらに両化合物は抗菌活性を示さない濃度で、*M. smegmatis* のisoniazid抵抗性を解除できることが明らかとなった。

Desferrioxamine Eの作用メカニズムを解析した結果、鉄イオンをキレートするシデロフォアとして働き、*Mycobacterium* 属細菌への鉄の供給を阻害することによりバイオフィーム形成阻害作用を示すことを明らかにした。

一方、heteroneminについてはケミカルジェネティクスの手法を用いて解析を試みた。すなわち、

化合物の標的分子を高発現する形質転換体は、その化合物に耐性を示すという考えのもと、*M. bovis* BCG 株由来のゲノムDNAライブラリーで *M. smegmatis* を形質転換し、ランダムに *M. bovis* BCG 株由来のゲノムDNAを高発現する形質転換体を作成した。そして、この中からheteroneminのバイオフィーム形成阻害活性に耐性を示す形質転換体をスクリーニングした。その結果、heteroneminのバイオフィーム形成阻害活性に耐性を示す4つの形質転換体の分離に成功し、さらに含有されるコスミドDNAの配列を解析した結果、現時点で30個のOpen Reading Frameを含んでいる領域まで絞り込むことができた。

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。