

Title	潜在性結核菌に有効な海洋天然物の探索とその標的分子解析
Author(s)	神谷, 謙太郎
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61693
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (神谷 謙太郎)

論文題名

潜在性結核菌に有効な海洋天然物の探索とその標的分子解析

論文内容の要旨

結核の主な原因菌である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) には、世界人口の1/3が感染していると言われ、現在も年間150万人が結核により亡くなっている。また、結核菌は宿主に感染後、その一部が感染部位で形成される granuloma 内の環境刺激により潜在化し、長期に渡り生存し続ける特徴をもつ。さらに、潜在化した結核菌は isoniazid などの既存の抗結核薬に抵抗性を示すことが知られており、このことが最低6ヵ月の長期にわたる化学療法、それに伴う副作用の発生、不完全な治療による再発や薬剤耐性菌出現の原因と考えられている。したがって、潜在性結核菌にも有効な新しい医薬シーズの探索と、結核に対する新規薬剤標的の開拓は重要な課題である。

このような背景の下、筆者は、潜在性結核菌にも有効な新規医薬シーズの創製を目的に、granuloma 内の低酸素環境に着目した評価系を用いて、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象に探索研究を行った。その結果、海洋由来真菌 *Aspergillus* sp. の培養抽出物からナフトキノン誘導体 viomellein、xanthomegnin、rubrosulphin ならびに α -ピロン誘導体 asteltoxin を単離した。また、インドネシア産海綿 *Aaptos* sp. の MeOH 抽出物からは、3-(phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA と略す) を単離した。これらの化合物のうち、viomellein および xanthomegnin は、好気培養条件および潜在状態を誘導した低酸素培養条件の両条件下で *M. smegmatis* に対して中程度の抗菌活性を示し、さらに、viomellein は *M. bovis* BCG に対して最小生育阻止濃度 (MIC) が 1.56-6.25 $\mu\text{g/mL}$ の強い抗菌活性を示した。また、PDOA は、好気および低酸素の両培養条件下で *M. bovis* BCG に対して MIC が 0.78 $\mu\text{g/mL}$ の強い抗菌活性を示した。さらに、PDOA は多剤耐性結核菌 (MDR-TB) を含む各種 *M. tuberculosis* に対して MIC が 0.5-4.0 $\mu\text{g/mL}$ の良好な抗菌活性を示した。また、筆者の研究室ではこれまでに、潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として海洋由来放線菌の二次代謝産物 nybomycin を見出しており、nybomycin は臨床分離株を含む各種 *M. tuberculosis* に対して良好な抗菌活性を示す。そこで筆者は、PDOA および nybomycin の詳細な作用メカニズム解析および結核に対する新しい薬剤標的分子の開拓を目的として、その標的分子の解析を行った。

Nybomycin の標的分子解析については、筆者の研究室で構築しているゲノム 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法を適応した。すなわち、*M. bovis* BCG のゲノム DNA から調製したゲノム DNA ライブラリーで *M. smegmatis* を形質転換することで、*M. bovis* BCG のゲノム DNA 断片をランダムに高発現する約 4,000 株の形質転換株を作成しており、この中から、nybomycin に耐性を示す形質転換株をスクリーニングし、そこに含まれる *M. bovis* BCG 由来のゲノム DNA 断片を解析することで、nybomycin に耐性を付与する遺伝子領域を見出し、見出した遺伝子領域を基にして最終的にどの遺伝子を高発現した場合に nybomycin に耐性を示すかを明らかにすることを試みた。その結果、*M. bovis* BCG ゲノムの 686,465 kb~709,074 kb (22.6 kb) または 4101,265 kb~4130,915 kb (29.7 kb) の領域を高発現した形質転換株が nybomycin に対して耐性を示すことを見出した。すなわち、両領域内にコードされているいずれかのタンパク質が nybomycin の標的分子であることが示唆された。次に筆者は、見出した遺伝子領域を基にして、さらに nybomycin に対して耐性を付与する遺伝子の解析を進めた。しかし、耐性を付与する遺伝子または遺伝子領域は複数存在し、その遺伝子の種類や機能に類似性が確認できなかった。このことから筆者は、nybomycin は特定のタンパク質と結合する化合物ではなく、結核菌のゲノム DNA に直接結合するものと予想した。そこで、設計・合成した nybomycin のビオチン標識化プローブを用いて、*M. bovis* BCG のゲノム断片を含むプラスミド DNA との結合能の有無を検証した。その結果、nybomycin はゲノム DNA と直接結合することにより抗菌活性を示すことを強く示唆する知見を得た。

PDOA の標的分子解析については、PDOA が蛍光を有することを利用した光アフィニティラベリング法により解析を行った。すなわち、PDOA のアナログ化合物による構造活性相関の検討結果を基にして、光反応性基であるトリフルオロメチルジアジリン基を構造中に含む PDOA のプローブ分子を設計・合成した。次に、これと *M. bovis* BCG から調製した菌体破砕液を混和後、紫外線照射することにより標的分子をプローブ分子で標識した。そして PDOA が有する蛍光を検出することにより、プローブ分子で標識された複数のタンパク質の検出に成功している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (神谷 謙太郎)		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	小林資正
	副 査	教授	藤岡弘道
	副 査	教授	大久保忠恭

論文審査の結果の要旨

結核は、世界人口の1/3が感染していると言われ、現在も年間150万人が結核により亡くなっている。また、結核菌は宿主に感染後、その一部が感染部位で形成されるgranuloma内の環境刺激により潜在化し、長期に渡り生存し続ける特徴を有し、既存の抗結核薬に抵抗性を示すことが知られていることから、最低6ヵ月の長期にわたる化学療法が必要であり、不完全な治療による再発や薬剤耐性菌出現が問題となっている。したがって、潜在性結核菌にも有効な新しい医薬シーズの探索と、結核に対する新規薬剤標的の開拓は重要な課題である。

神谷君は、潜在性結核菌にも有効な新規医薬シーズの創製を目的に、granuloma内の低酸素環境に着目した評価系を用いて、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象に探索研究を行った。その結果、海洋由来真菌の培養抽出物から、好気および低酸素の両培養条件下で*M. bovis* BCGに対して強い抗菌活性を示すナフトキノ誘導体viomelleinを見出した。また、インドネシア産海綿の抽出物からも、好気および低酸素の両培養条件下で*M. bovis* BCGに対して強い抗菌活性を示す3-(phenethylamino)demethyl(oxy) aaptamine (PDOAと略す)を見出した。さらに、PDOAは多剤耐性結核菌(MDR-TB)を含む各種*M. tuberculosis*に対しても良好な抗菌活性を示した。

神谷君は、研究室においてこれまでに潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として海洋由来放線菌から見出されているnybomycinと新たに見出したPDOAについて、詳細な作用メカニズム解析および結核に対する新しい薬剤標的分子の開拓を目的として、標的分子の解析を行った。

Nybomycinの標的分子解析については、研究室で構築しているゲノム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法を適応した。すなわち、*M. bovis* BCGのゲノムDNAから調製したゲノムDNAライブラリーで形質転換した*M. smegmatis*を用いて、nybomycinに耐性を示す形質転換株をスクリーニングした。しかし、耐性を付与する遺伝子または遺伝子領域は複数存在し、その遺伝子の種類や機能に類似性が確認できなかった。さらに、設計・合成したnybomycinのビオチン標識化プローブを用いて、*M. bovis* BCG のゲノム断片を含むプラスミドDNAとの結合能の有無を検証し、nybomycinはゲノムDNAと直接結合することにより抗菌活性を示すことが強く示唆する知見を得た。

PDOAの標的分子解析については、PDOAが蛍光を有することを利用した光アフィニティラベリング法により解析を行った。すなわち、PDOAのアナログ化合物による構造活性相関の検討結果を基にして、光反応性基であるトリフルオロメチルジアジリン基を構造中に含むPDOAのプローブ分子を設計・合成した。次に、これと*M. bovis* BCGから調製した菌体破碎液を混和後、紫外線照射により標的分子をプローブ分子で標識し、PDOAが有する蛍光を検出することにより、標識された複数のタンパク質の検出に成功した。

以上の成果は、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。