

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位論文要旨

土壌放線菌の産生する Quorum Sensing 阻害物質の探索

薬学研究科 微生物化学講座 大岡 和広

【序文】

世界初の抗生物質である penicillin が A. Fleming によって青カビから発見されて以来、今日までに世に送り出されてきた数々の抗生物質は、医学の進歩に飛躍的な進歩をもたらし、20 世紀前半において死因の上位を占めていた肺炎や結核などの感染症の治療を可能とし、多くの人々を救ってきた。当初、抗生物質は感染症治療に非常に有効であったが、抗生物質の使用に伴い、耐性細菌が出現し、近年では、複数種の抗生物質に耐性な多剤耐性緑膿菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci: VRE) などの出現が大きな問題となっている。このような現状において、新規骨格を持つ薬剤や、新規の作用機序を持つ薬剤の開発は喫緊の課題であるが、ここ 10 年間に於いて、そのよう報告はほとんどなく、1970 年以降に開発された抗生物質の数の伸びは少ないことから、かつて行われてきた経験的スクリーニングによる開発には限界があることが示唆され、一般の薬剤開発には、病原微生物ゲノム情報等を利用した分子ターゲティングなど、アッセイ方法の工夫等、検討がなされてきている。

本研究では、新たな感染症治療薬の開発を目的として細菌細胞間のシグナル伝達機構である quorum sensing (QS) の阻害活性をもつ物質の探索を行った。

QS は海洋発光細菌である *Vibrio fischeri* で最初に見出された。*V. fischeri* は発光器官を持つイカ、魚等の発光器官内に共生し、細胞密度が一定以上になるとルシフェラーゼ産生が急速に増大し発光することが明らかとなった。更に、対数増殖期初期の *V. fischeri* を定常期の培養上清に懸濁することにより発光が見られたことから定常期の培養上清に存在する物質が発光を誘導することが明らかとなった。当初は特定の微生物に見られる特異な現象とされていたが、現在では多くの細菌細胞間に認められる現象であり、低分子シグナル物質を介して種々の遺伝子発現が調節されている事が明らかとなっている。QS 阻害物質が新たな感染症治療薬として注目されるのは、QS により病原因子をコードしている種々の遺伝子の発現が誘導されることにある。例えば、院内感染症の原因菌の一つである *Pseudomonas aeruginosa* では、エラスターゼ、プロテアーゼ、ピオシアニン、レクチン、swarming motility、ラムノリピッド、siderophore の産生等が QS により誘導される。更に、これらの因子のうちラムノリピッド、swarming motility、siderophore の産生は緑膿菌のバイオフィーム形成にも関与している。従って、QS を特異的に阻害することにより病原細菌の病原因子産生をコントロールし無害な細菌に変える、または、バイオフィーム形成を抑えることにより、既存の抗生物質や免疫などの生体防御機構の効果を高めることも可能と考えられることから、QS を阻害する物質の探索は意義のあるものと考えられる。

【実験方法】

10,000 種以上の微生物由来の抗生物質や抗ガン物質、高脂血症治療薬、免疫抑制物質などの生理活性物質が報告されているが、その約65%が放線菌由来である。本研究では、様々な土壌より分離した放線菌を QS 阻害物質の探索限として *Chromobacterium violaceum* (CV026) を指標菌に用い、QS 阻害物質産生株のスクリーニングを行った。*C. violaceum* の野生株は、N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL) をシグナル伝達物質とした QS により紫色色素 (violacein) を産生する。CV026 株は HHL 合成遺伝子の変異により violacein 非産生となっており、HHL 添加時にのみ QS による色素産生が行われる。そのため放線菌培養液上清に QS を阻害する物質が存在する場合には、CV026 の QS が阻害される場合には、HHL 存在下でも色素産生が行われず、コロニーは透明～白色を呈する。

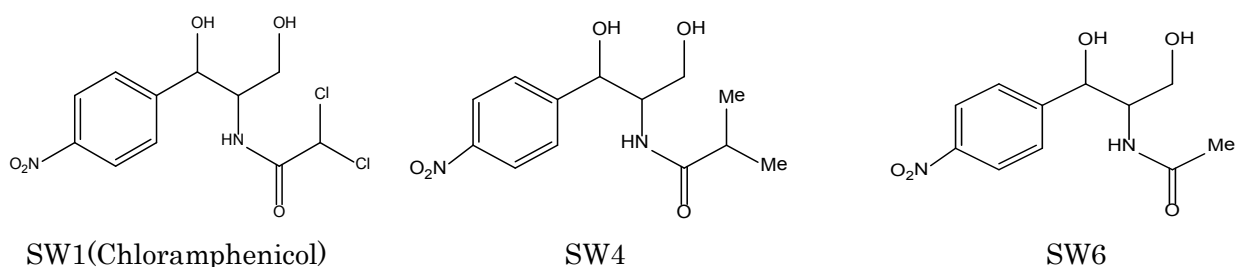
スクリーニングにより得られた株の培養液抽出物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC により QSI の単離精製を行い、NMR,MS により構造決定を行うと共に、CV026 を用いて単離した代謝産物の QSI 活性の評価をおこなった。

また、QSI 産生株の同定は 16S rDNA の塩基配列の決定ならびに細胞壁成分であるジアミノピメリン酸の解析により行った。

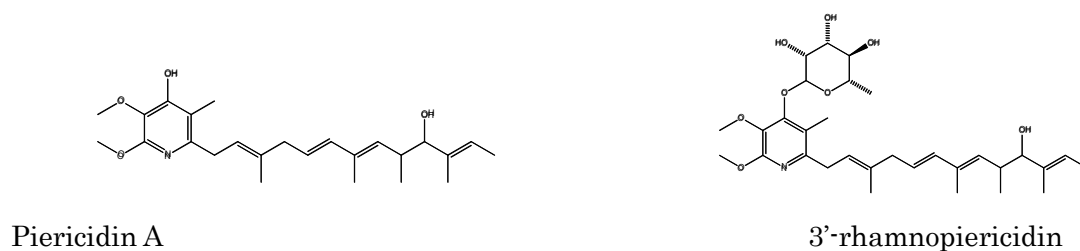
【結果および考察】

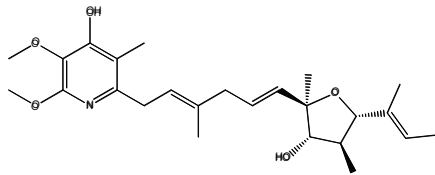
当研究室において各地の土壌より分離した放線菌約 1,000 株についてスクリーニングを行った結果、103 株の培養液中に QSI の存在を確認した。このうち以下に示す 5 株より QSI を単離した。

Streptomyces sp.TOHO-Q003 の培養上清よりクロラムフェニコール(SW1)及びその類縁物質 2 種 (SW-4, SW-6)を単離した。これらの代謝産物のうち SW6 に QSI 活性が、SW4 には弱い QSI 活性が認められた。



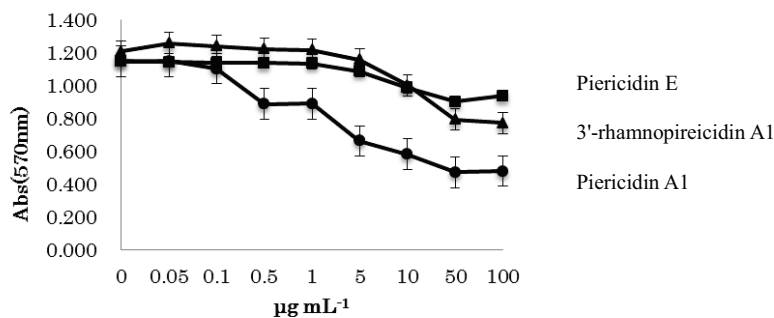
Streptomyces sp.TOHO-Y209 の培養上清からは Piericidin A1 及び Piericidin E、また、*Streptomyces* sp.TOHO-O348 の培養液上清からは Piericidin A1 及び 3'-rhamnopiericidin が分離された。



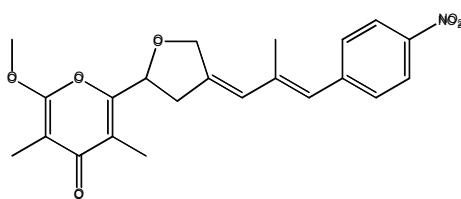


Piericidin E

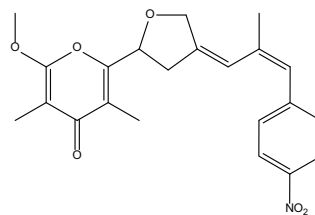
これらのpiericidinのQSI活性をCV026株を用いて測定した結果、下図に示すようにPiericidin A1が最も強い活性を示し、IC₅₀は10 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、これら代謝産物の*C. violaceum* CV026, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC27853に対するMICは >100 $\mu\text{g/ml}$ であった。従って、作用機序は今後明らかにする必要があるが、piericidinによるCV026株のQS阻害が明らかとなった。(Open Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 3, 93-99)



Streptomyces sp. TOHO-O443 の培養上清より、Aureothin 及び Alloaureothin を QSI として単離した。



Aureothin



Alloaureothin

本研究で単離・同定した QSI はいずれも抗菌活性を示さない低濃度において violacein の産生を抑制することから、これら QSI による阻害作用は抗菌作用によるものではなく、QS を特異的に阻害する作用であると考えられる。既に報告されている QSI に、グラム陰性細菌のシグナル分子であるアシルホモセリンラクトンの構造類似体があるが、本研究で単離された QSI は様々な骨格を持つことから QS 阻害には特定の構造を持つ物質が作用するのではなく、様々な化合物が QSI となりうると考えられた。また、本スクリーニングにおいて、QS 活性を促進し violacein を高度に産生する物質も種々の土壌分離株培養上清に認められた。グラム陽性細菌である放線菌代謝産物中にグラム陰性細菌の QS 阻害物質のみならず、QS 促進物質が存在することは、環境中での細菌細胞間の相互関係を考える上で興味深い結果であるが、今後の検討に委ねたい。

近年、QS を利用した治療の例として、緑膿菌が関与する難治性疾患の一つであるびまん性汎細気管支炎の治療に MIC 以下のマクロライド系抗菌薬が治療効果を示し、実験的にも erythromycin や clarithromycin または azithromycin と ciprofloxacin の併用により、ciprofloxacin の抗菌作用が増大することが報告されている。これは、マクロライド系抗菌薬は緑膿菌に対する抗菌作用はないが、低濃度のマクロライド系抗菌薬が緑膿菌の QS に影響を与えることにより、形成されたバイオフィルムを破壊し、結果として緑膿菌の ciprofloxacin への感受性が増大するためと考えられている。このように、QSI と既存の化学療法剤の併用により、QSI による病原因子産生の阻害、バイオフィルムの破壊による薬剤感受性の増大による殺菌的／静菌的作用が期待されることから、QSI のスクリーニングは将来の臨床応用においても意義のあるものであると考えられる。

本研究で単離された物質を将来臨床的に応用するには、細胞毒性、変異原性等種々の検討が必要であると考えられる。また、本研究ではグラム陰性細菌の QS を対象にした阻害物質の検索を行ったが、グラム陽性細菌の QS 阻害を指標としたスクリーニングも必要と考えている。

対象論文

Kazuhiro Ooka, Atsushi Fukumoto, Tomoe Yamanaka, Kanako Shimada, Ryo Ishihara, Yojiro Anzai, Fumio Kato .Piericidins, Novel Quorum-Sensing Inhibitors against *Chromobacterium violaceum* CV026, from *Streptomyces* sp. TOHO-Y209 and TOHO-O348. Open Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 3, 93-99

大岡 和宏氏の学位申請論文「土壌放線菌の産生する quorum sensing 阻害物質の探索」に対する審査意見

近年の医療現場における抗生物質の多用・濫用による、多剤耐性緑膿菌、メチシリン耐性ブドウ球菌、バンコマイシン耐性腸球菌などに代表される種々の薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。これらの耐性菌に対応すべく新たな抗生物質の開発が試みられているが、その成果は乏しいものである。

Vibrio fischeri の発光現象から見出された quorum sensing は、細菌細胞間におけるシグナル伝達機構として、殆どの細菌細胞間で行われていることが明らかにされてきた。更に、多くの病原細菌の病原因子の発現が quorum sensing により調節されていることが明らかにされてきている。大岡氏は、病原因子の発現に關与する quorum sensing 阻害物質を新たな細菌感染症治療薬の一つとして利用することを考え本研究を行った。

多くの有用生理活性物質生産菌が含まれる放線菌の代謝産物について *Chromobacter violaceum* CV026 を用いたアッセイ系で quorum sensing 阻害物質のスクリーニングを行った。約 1000 株の土壌放線菌について調べ、103 株の quorum sensing 阻害物質産生菌を得た。本論文では、TOHO-Q003、TOHO-0443、TOHO-Y209、TOHO-0348 株の代謝産物について検討を行った。

TOHO-Q003 株からは chloramphenicol とその類縁物質である、dimethylamphenicol 及び corynecin I を分離した。Dimethylamphenicol 及び corynecin I について、その quorum sensing 阻害活性について調べた結果、いずれも増殖抑制及び QS 阻害活性を示し、その作用濃度域はほぼ同等の 50~100 $\mu\text{g/mL}$ であった。

TOHO-0443 株からは aureothin 及び alloaureothin を分離した。これらの代謝産物はいずれも MIC 値 (400 $\mu\text{g/mL}$ 以上) よりも遥かに低い濃度 (0.3 μg -10 $\mu\text{g/mL}$) で quorum sensing を阻害した。また、allosaureothin は aureothin の 11-12 位の cis-異性体であるが、allosaureothin が強い阻害効果を示し、立体構造の相違により活性に大きな差があることを見出した。これらの物質はいずれも既知物質であるが quorum sensing 阻害活性に関する報告は無い。

TOHO-Y209 及び TOHO-0348 株からは piericidin A1 とその類縁物質である 3'-rhamnospiericidin A1 及び新規物質 piericidin E を単離した。いずれも MIC 値 (100 $\mu\text{g/mL}$ 以上) 以下の濃度、0.5~100 $\mu\text{g/mL}$ において QS を阻害すること、また阻害活性は piericidin A1 > piericidin E = 3'-rhamnospiericidin A1 の順であった。

本研究で、明らかにされた QS 阻害物質のうち、chloramphenicol の類縁物質である、dimethylamphenicol 及び corynecin I は 50~100 $\mu\text{g/mL}$ の高濃度で阻害活性が認められたが、allosaureothin、aureothin、piericidin 類の QS 阻害活性は数 $\mu\text{g/mL}$ の低濃度で認められることから、今後の開発のための seed となりうると考えられるが、aureothin については、抗真菌、抗腫瘍活性、抗マラリア活性等の真核細胞に対する毒性の報告が、piericidin A1 ではミトコンドリアの NADH-ユビキノン酸化還元酵素を阻害する細胞毒性が報告されているため、細胞毒性を含めた検討が必要であると考えられる。

以上、病原細菌の多くの病原因子の発現を調節する quorum sensing を阻害する物質は、従来の抗生物質とは全く異なる作用機序で病原性を弱めることが期待される。本論文では quorum sensing 阻害活性を持つ 7 種の代謝産物を単離し、構造を決定している。6 種の代謝産物は既知物質として報告されているが、quorum sensing 阻害活性に関しては新たな知見である。

本論文は博士 (薬学) に相当すると考える。

平成 26 年 2 月 26 日

加藤 文男