

9. 病原菌の特異的代謝経路をターゲットにした抗生剤開発

大利 徹

北海道大学 大学院工学研究院 応用化学部門 応用生物化学研究室

Key words : メナキノン, ペプチドグリカン, 生合成, 阻害剤, アクチノマイシン D

緒言

メナキノン (MK) は、人間にとって血液凝固に必須なビタミン (ビタミン K) であり、また微生物においては呼吸の際の電子伝達系の補酵素として働く生育に必須な物質である。その生合成は、大腸菌や枯草菌においてはコリスミ酸から σ スクシニル安息香酸 (OSB) を経る経路で生合成されることが明らかにされている。しかし筆者は、*Helicobacter* 属細菌や *Campylobacter* 属細菌は、生育に MK が必要であるにもかかわらず既知の MK 生合成遺伝子を持たないことに気づき、全く新規な経路を明らかにした (図 1) [1]。人の腸内細菌である大腸菌や乳酸菌は既知経路でメナキノンを生合成することから、新規経路の阻害剤はピロリ菌に特異的な抗生剤になると期待される。そこで放線菌と糸状菌の培養液に目的化合物を探索した。

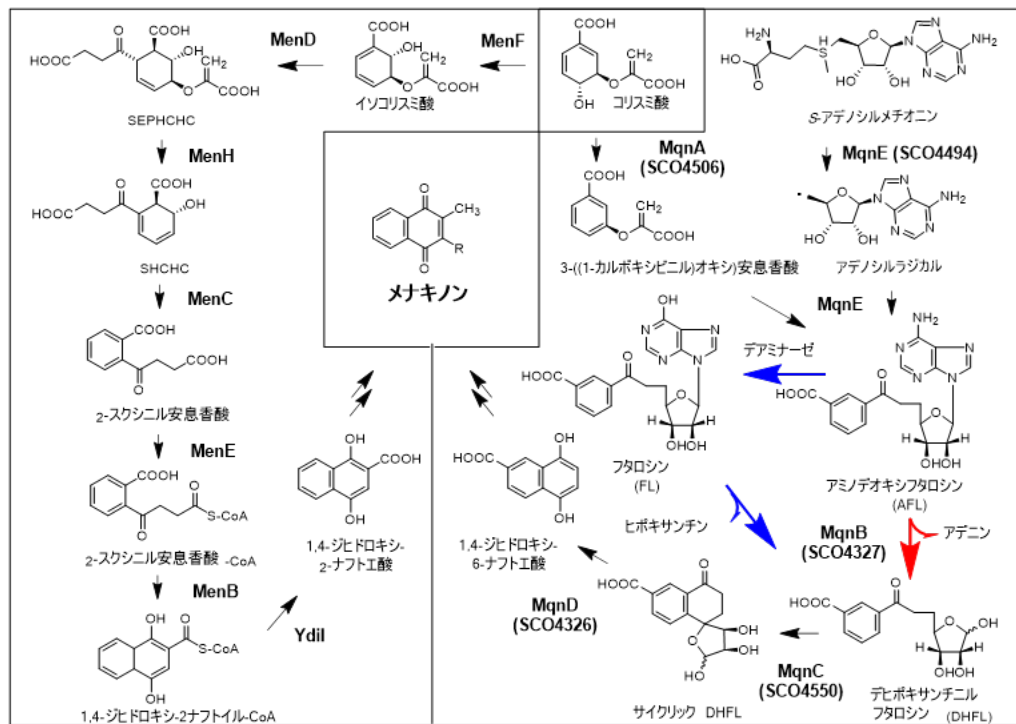


図 1. メナキノン新規 (右)、既知 (左) 生合成経路

また最近、筆者は微生物のペプチドグリカンの生合成に関与する新規なエピメラーゼを発見した [2]。微生物のペプチドグリカンに含まれる D-グルタミン酸 (D-Glu) は、一般に Glu ラセマーゼにより供給され、UDP-N-アセチルムラミン酸-L-Ala (UDP-MurNAc-L-Ala) に連結されるが、詳細な比較ゲノム解析の結果、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) などでは本遺伝子は存在しなかった。そこで、D-Glu 要求大腸菌 WM335 株とイネ白葉枯病菌のゲノムを用いてショットガンクローニングを行った結果、XOO_1319 と XOO_1320 の 2 つの遺伝子が UDP-

MurNAc-L-Ala-D-Glu の生合成に関与することがわかった。組換え酵素を用いて検討した結果、XOO_1320 は UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を連結し、XOO_1319 は生成物末端の L-Glu をエピメリ化することが判明した (図 2)。今回見出した生合成機構は、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) に加え、果樹の病原菌である *Xylella* 属細菌、病院内で日和見感染し重篤な免疫不全、肺炎などを引き起こす *Stenotrophomonas* 属細菌が利用している。したがって XOO_1319 と XOO_1320 の阻害剤は、これら病原菌の特異的農薬や抗生剤になると考えられることから、上記同様に放線菌やカビの培養液に候補化合物を探索した。その結果、XOO_1320 の阻害剤としてアクチノマイシン D を単離、同定した [3]。

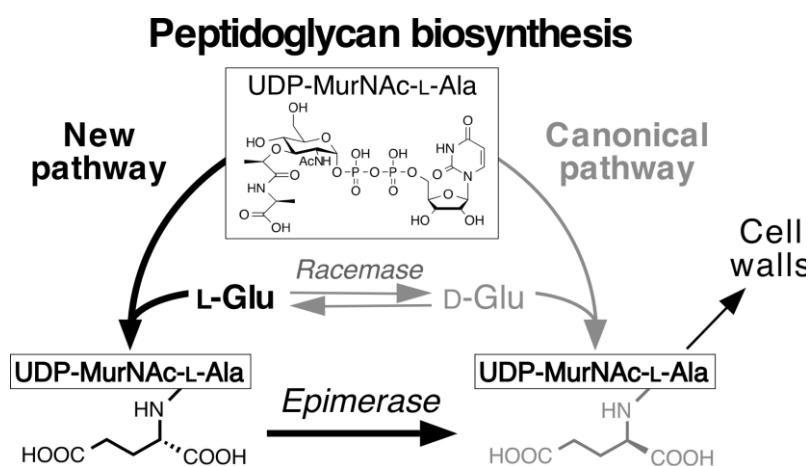


図 2. ペプチドグリカン生合成経路

方法

1. MK 新規経路阻害剤の探索

当研究室では病原菌であるピロリ菌を扱うことができないため、スクリーニングには互いに近縁な 2 種の *Bacillus* 属細菌を用いた。既知 MK 生合成経路保有株である *Bacillus subtilis* および新規経路保有株である *Bacillus halodurans* を微生物培養液サンプルの存在下でそれぞれ培養し、*B. halodurans* の生育のみを阻害するサンプルを探索した。さらに、経路の最終産物である MK を添加した生育回復アッセイを行うことで新規経路のみを特異的に阻害するサンプルを探索した。サンプルには放線菌および糸状菌の培養液を用いた (北里大学生命科学研究所微生物機能研究室から供与)。

放線菌と糸状菌の培養液乾固物および培養液エタノール抽出物 5,200 サンプルに対しペーパーディスクアッセイを行った。既知経路保有株である *B. subtilis* のプレートには阻止円が形成されず、新規経路保有株である *B. halodurans* のプレートにのみ阻止円が形成されるサンプルが新規経路阻害剤の候補となる。選別されたサンプルに対し、2 次スクリーニングとして MK 添加による *B. halodurans* の生育回復アッセイを行った。サンプルが新規経路を阻害している場合、サンプルとともに経路の最終産物である MK を添加することにより菌の生育が回復すると考えられる。そこで *B. halodurans* を液体培養する際に候補サンプルのみを添加した場合に生育が阻害され、MK を同時添加した場合に生育が回復するものを選別した。

2. ペプチドグリカン生合成阻害剤の探索

上記同様に互いに近縁な 2 種細菌を用いたペーパーディスクアッセイを行った。既知経路保有株として *Streptomyces lividans* を、新規経路保有株として *Micromonospora* sp. を被検菌に用い生育阻止円検定を行った。放線菌サンプル 3,280 を用いてスクリーニングを行った。候補サンプルについて、組換え XOO_1319 と XOO_1320 酵素を用いた *in vitro* アッセイで実際に阻害活性を有するか検討した。

結果および考察

1. MK 新規経路阻害剤の探索

放線菌と糸状菌の培養液乾固物および培養液エタノール抽出物 5,200 サンプルに対しスクリーニングを行った結果、18 のヒットサンプルを得た。しかし、何れも放射状の阻止円を示した (図 3A)。当研究室の先行研究で、阻止円形状が放射状になるサンプルは活性物質として脂肪酸を含む可能性が高いことがわかっていたため、これらサンプルからの活性本体の単離は中止した。

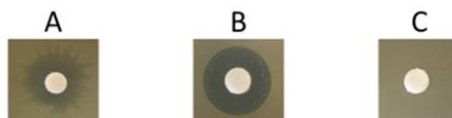


図 3. ペーパーディスクアッセイ。A : 放射状の阻止円、B : 円形の阻止円、C : 阻止円なし

2. ペプチドグリカン生合成阻害剤の探索

放線菌培養物 3,280 サンプルを用いて生育阻止円検定を行った。被検菌として用いた 2 種の菌のうち、*S. lividans* (既知経路保有株) には活性を示さず、*Micromonospora* sp. ATCC 39149 (新規経路保有株) にのみ活性を示すサンプルを候補サンプルとして選別した。アッセイは 2 度行い、阻止円が大きく再現性のある 1 つの候補サンプルを得た。

候補サンプル生産菌を大量培養後、遠心分離により上清を得たのち、酢酸エチルで抽出し *Micromonospora* sp. に対して生育阻止円検定を行ったところ、酢酸エチル層に活性化化合物が含まれていた。そこで酢酸エチルをエバポレーターで除去し、アセトニトリルに再溶解して HPLC で分析した (isocratic、アセトニトリル 60%)。UV210 nm で検出した結果、1 つの大きなピークが検出され、本ピークを分取しペーパーディスクアッセイを行った結果、本ピークに活性本体が含まれていることがわかった。活性本体を精製後、LC-MS で分析を行った結果 $m/z = 1255.67$ [M+H]⁺ のイオンが、精密質量分析 (HRMS) の結果、親イオンの精密質量 ($m/z = 1255.6373$) を得た。構造解析を NMR で試みたが、活性本体は対称的な構造を含んでいると予想され構造決定には至らなかった。しかし、活性化化合物は結晶性が良かったことから、結晶構造解析を行った結果、actinomycin D (図 4) であることが明らかとなった。Actinomycin D は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの阻害剤として知られ、またグラム陽性細菌にも抗菌活性を示す報告があるが、*Xanthomonas* のようにグラム陰性細菌に抗菌活性を示した報告はない。そこで、actinomycin D が実際に XOO_1319 あるいは XOO_1320 酵素を阻害しているか組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイで検討した。

酵素合成で調製した UDP-MurNAc-L-Ala および UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu を基質として、actinomycin D 添加、非添加の条件で *in vitro* 反応を行った。その結果、XOO_1320 の反応のみを阻害した。Dixon plot で阻害定数 (K_i) を算出した結果、UDP-MurNAc-L-Ala に対し 0.46 mM であった。

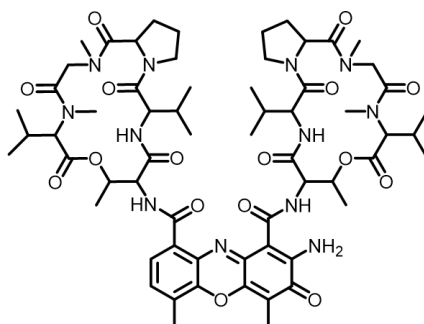


図 4. Actinomycin D の構造

共同研究者

本研究は、北海道大学大学院工学研究院応用生物化学研究室の小笠原泰志助教との共同研究で実施した。

文献

- 1) Hiratsuka T, Furihata K, Ishikawa J, Yamashita H, Itoh N, Seto H, Dairi T. An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science*. 2008 Sep 19;321(5896):1670-3. doi: 10.1126/science.1160446.
- 2) Feng R, Satoh Y, Ogasawara Y, Yoshimura T, Dairi T. A glycopeptidyl-glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis. *J Am Chem Soc*. 2017 Mar 29;139(12):4243-4245. doi: 10.1021/jacs.7b01221. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28294606
- 3) Ogasawara Y, Shimizu Y, Sato Y, Yoneda T, Inokuma Y, Dairi T. Identification of actinomycin D as a specific inhibitor of the alternative pathway of peptidoglycan biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 2020 Feb;73(2):125-127. doi: 10.1038/s41429-019-0252-2. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31654037