

102. 抗嫌気性活性天然物ルミナミシンの作用機序解析

君嶋 葵

北里大学 大村智記念研究所 微生物応用化学研究室

Key words : ルミナミシン, 抗生物質, *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), 嫌気性細菌

緒言

医療関連感染症の原因菌として最も多くみられるのが嫌気性菌であり (10~25%)、その中でも *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) が原因で発症する抗菌薬関連腸炎や偽膜性大腸炎などの多様な *C. difficile* Infection (CDI) が世界的な問題となっている [1]。特徴として、抗菌薬使用等により健全な腸内フローラが乱れることで *C. difficile* の過増殖を招き、その結果 *C. difficile* が産生する毒素によって、重症化し、腸閉塞・消化管穿孔・敗血症を起し、死に至らしめる (図 1)。CDI の深刻な問題として、重症化による死亡例はもちろん、その高い再発率が挙げられる。事実、CDI 患者の 20~35% は一度目の抗菌薬投与では完治することがなく、そのうちの 40~60% に症状の再燃が起きている [2]。その様な状況下で *C. difficile* は “ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2019” において、最も耐性化の危機レベルが高い病原菌の一つとされている [3]。アメリカ国内では、毎年、43 万人の罹患者および 2 万 9 千人以上の死者が出ており、年間 15 億ドルもの医療コストがかかる事から CDI 対策が急務となっている [4]。その治療としては、原因抗菌剤の使用中止とグラム陽性菌に対し幅広い抗菌スペクトルを有するバンコマイシンの投与が有効であるが、耐性菌の出現と再発率の高さが深刻な問題となっている [5]。その様な背景のもと、大村智記念研究所で 1985 年に、放線菌 *Streptomyces* sp. OMR-59 株の培養液から嫌気性菌に対し選択的な抗菌活性を示す 10 員環、14 員環を有するマクロジオリド化合物ルミナミシンが見出された (図 2) [6]。芽胞を形成するグラム陽性偏性嫌気性桿菌である *Clostridioides* 属に対して特に強い抗菌活性を示す一方で、好気性菌である *Staphylococcus* 属や *Streptococcus* 属, *Pseudomonas* 属などには抗菌活性を示さず、嫌気性菌に対して選択的な抗菌活性を示す特徴を有している。実際に、*C. difficile* 臨床分離株を用いた評価によると、MIC (minimum inhibitory concentration) = 0.25~2 $\mu\text{g/mL}$ であることが分かり、既存薬であるバンコマイシン (MIC=0.5~2 $\mu\text{g/mL}$) と同等の抗菌活性を示すことが明らかとなった。さらに、ルミナミシンは当研究所が有するハムスター *C. difficile* 感染モデルの系において、既存薬のバンコマイシンより優れた治療効果を示すことが明らかになっている。以上のように、ルミナミシンは既存薬とは異なる抗菌スペクトルと特徴的な構造を有することから新規作用機序を有することが期待される。しかし、その高い抗感染症薬としての潜在能力にも関わらず、ルミナミシンの抗菌活性メカニズムは明らかになっていない。そこで、新規抗感染症薬の創製を目指し、ルミナミシンの抗嫌気性菌活性の作用機序解明を目的に研究を行う。

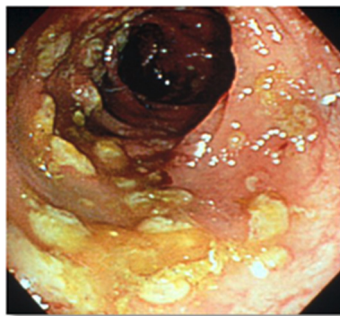


図 1. 偽膜性大腸炎



Streptomyces sp. OMR-59

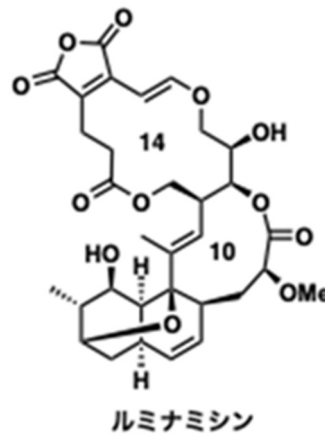


図2. 放線菌由来マクロライドルミナミシンの構造

方法

まず *Streptomyces* sp. を培養し、天然物ルミナミシンを得た。そして、作用機構解明に向けて、野生株 *C. difficile* (ATCC BAA-1382 strain 630) に対し、繰り返しルミナミシンで薬剤処理後、継代培養することでルミナミシン耐性株を取得した。そして、それぞれの株の total DNA を抽出し、変異点解析を行った。耐性化に必要な因子を解析し、標的分子の絞り込みを行った。さらに、天然物から新規誘導体を合成し、臨床分離株を含む 27 種類の病原体に対する抗菌活性を評価した。

結果および考察

1. ルミナミシンの抗菌活性

ルミナミシンは標準的な実験室適応嫌気性細菌株に対して選択的活性を示すことがわかっている。しかし、薬剤耐性臨床分離株に対する抗菌活性の評価はまだ行われていない。そこで、ルミナミシンの抗菌活性を再評価した。これまでの報告同様にルミナミシンはグラム陽性偏性嫌気性菌に対して選択的抗菌活性を示した。さらに、ルミナミシンの *C. difficile* に対する抗菌活性はバンコマイシンに匹敵し、且つ *C. difficile* に対する狭域スペクトル抗生物質であることがわかった。また、ルミナミシンはフィダキソマイシン耐性 *C. difficile* 株にも有効であることから、既存の薬剤（バンコマイシン：ペプチドグリカン合成、フィダキソマイシン：RNA ポリメラーゼ）とは異なる作用機序を有することが期待される。

2. ルミナミシン耐性 *C. difficile* 株の取得と変異点解析

次にルミナミシン耐性 *C. difficile* 株の取得を試みた。*C. difficile* をルミナミシン含有培地に播種すると、ルミナミシン耐性 *C. difficile* 株 (MIC 値=2~8 mg/mL) が生じた。変異解析には MIC が最も高い株を選んだ。この変異体と野生株の全ゲノム解析を行った。結果として、既存薬のフィダキソマイシンの標的である RNA ポリメラーゼには変異が見られなかったが、細胞壁タンパク質である CwpV の C 末端可変領域 (CDIF 630_RS 03155) の一部のアミノ酸の欠失が確認された。さらに、仮想タンパク質 (CDIF 630_02150) 部分にも変異が見られた。以上の結果からも、ルミナミシンが既存薬とは異なる作用機序を有することが強く示唆された。

表 1. ルミナミシンの抗菌活性

	strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		FDX	VCM	1
1	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 700057	0.25	2	2
2	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 43255	0.5	1	2
3	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC BAA-1803	0.5	2	1
4	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC BAA-1870	1	2	2
5	<i>Clostridioides difficile</i> DSM 105001	>16	1	0.5
6	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 13124	≤ 0.03	1	0.25
7	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 27337	≤ 0.03	0.5	0.5
8	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 14963	4	0.125	16
9	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 3000	0.125	1	>16
10	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 29328	1	0.5	8
11	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 43055	0.063	2	>16
12	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 3012	16	1	>16
13	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 3013	>16	1	>16
14	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 3014	0.5	1	4
15	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 11827	2	0.25	16
16	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC17929	0.063	1	16
17	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 25285	>16	>16	>16
18	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 2982	>16	>16	16
19	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 29741	>16	>16	>16
20	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 2984	>16	>16	>16
21	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 3009	>16	>16	16
22	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 2989	>16	>16	>16
23	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 2991	>16	>16	4
24	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 3005	>16	>16	>16
25	<i>Clostridioides difficile</i> KUB 2992	>16	>16	>16
26	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 27725	>16	>16	>16
27	<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 25586	>16	>16	>16

FDX : fidaxomicin, VCM : vancomycin, MIC : minimum inhibitory concentration.

3. ルミナミシン誘導体の合成

ルミナミシンの標的分子同定のために、構造活性相関の解明とプローブ体の合成を行った。最初のアプローチとして、多くの生理活性化合物が求電子的な位置で標的結合部位に共有結合しているため、無水マレイン酸やエノールエーテルのようなルミナミシンの高度に求電子的な部分が誘導体化された。無水マレイン酸部分は、 TMSCHN_2 と対応するマレイミド誘導体 4~6 をアミン (図 3、条件 a、b) の存在下で使用して、容易にマレイン酸ジメチル 3 に変換された。無水マレイン酸の反応性を利用して、無水マレイン酸基を NaBH_4 で選択的にラクトン 7 に還元し、その構造を二次元核磁気共鳴分光法 (図 3、条件 c) で決定した。著者らの報告に基づき、チオフェノールはエノールエーテル部分に対して良好な求核剤であり、チオアセタール誘導体 8 はジアステレオ混合物 (図 3、条件 d) として得られた。1 の水素化は進行し、ジアステレオ混合物 (図 3、条件 e) として誘導体 9 を与えた。次に無水マレイン酸存在下でのヒドロキシ基の誘導体化に注目した。広範な研究の後、酸性アセチル化条件 (Ac_2O , H_3PO_4 , MeCN) 15 がアシル誘導体 10 (図 3、条件 f) を与えるのに成功することが分かった。14 員環の立体配座変化が 1 の生物活性に及ぼす影響を検証するため、 K_2CO_3 による選択的メタノーリシスを行い、開環生成物 11 (図 3、条件 g) を得た。

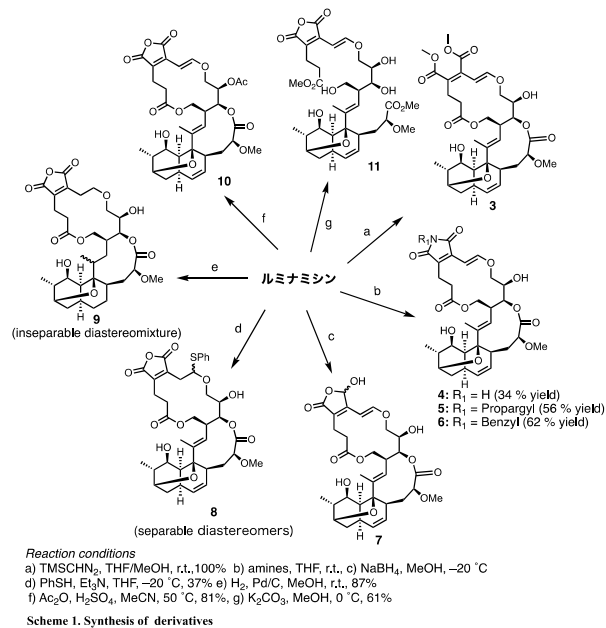


図 3. ルミナミシン誘導体の合成

4. ルミナミシン誘導体の抗菌活性評価

臨床分離株を含む 27 種類の病原体に対する 9 化合物の生物活性を評価した。マレイミド誘導体 4, 6, チオアセタール誘導体 8 は *C. difficile* 株に対する抗菌活性を失ったが、リンゴ酸ジメチル 3, プロパルギルマレイミド 5, ラクトン 7 は *C. difficile* 株に対する抗菌活性を保持した。これは、より強力な誘導体を作るためのさらなる実験を探索する大きなチャンスとなるだろうし、5 は重篤な食品媒介疾患を引き起こす *Clostridium perfringens* に対して比較的強い抗菌活性を示した。クリック化学戦略を用いた標的同定のための化学プローブとして 5 を利用することができる。一方、水素化誘導体 9 とリングオープン生成物 11 の抗菌活性も減弱した。この点で、無水マレイン酸とエノールエーテル部分は抗菌活性を維持するために非常に重要な官能基であり、14 員環と 10 員環ラクトンは適切な分子配座をとることに起因すると考えられる。驚くべきことに、アシル誘導体 10 は抗菌活性を示さなかったことから、C-18-OH 基が必須の官能基であることが示唆された。これらの発見と以前の報告から、1 の全分子が抗嫌気性細菌活性に必要であろう。2 の生物活性の違いと共役エノールエーテルの高い求電子性を考えると、1 は共役エノールエーテル部分を介して標的分子に結合する可能性がある。さらに、1 を適切な立体配座に固定するには、オキサ橋かけデカリン部分、14 員環および 10 員環ラクトン部分が必要であろう。結論として、1 の抗菌活性を再評価したところ、1 は狭域スペクトルであり、*C. difficile* に対して強力な抗生物質であり、フィダキソマイシン耐性 *C. difficile* 株に対して有効であることがわかり、新しいクラスの抗 CDI 薬のリード化合物となる可能性が示された。この情報により、ターゲットの検証を検討した。ルミナミシン耐性 *C. difficile* の配列解析により、CwpV (CDIF 630_03155) および/または仮想的なタンパク質 (CDIF 630_02150) が分子標的である可能性が示された。CwpV はファージ感染に対する耐性因子であることが提案されているため (ref: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.13121>)、ルミナミシンが *C. difficile* のファージ感染を防御するために CwpV を予防するという一つの可能な仮説を仮定した。しかし、CwpV の C 末端領域は可変であることが知られているため、この欠失がルミナミシン耐性変異体の構築中に自然発生する可能性を考慮する必要がある。このことと、仮説上のタンパク質 (CDIF 630_02150) の機能が不明であることを考慮すると、ルミナミシンの作用機序を特定するためには更なる検討が必要である。さらに、天然物 1 から誘導体を合成し、臨床分離株を含む 27 種類の病原体に対する生物活性を評価した。生物活性試験の結果に基づくと、無水マレイン酸とエノールエーテル部分は *C. difficile* に対する抗菌活性を維持するために非常に重要な官能基であると考えられ、14 員環と 10 員環ラクトンは適切な分子配座を取ることに影響する可能性がある。以上の結果から、プロパルギルマレイミド 5 を用いて、1 の嫌気的活性に対する結合タンパク質を同定する検討を行っている。

表 2. ルミナミシン誘導体の抗菌活性

	strain	MIC (μg/mL)												
		FDX	VCM	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	<i>Clostridioides difficile</i>	ATCC 700057	0.25	2	2	4	16	16	>16	2	>16	>16	>16	>16
2	<i>Clostridioides difficile</i>	ATCC 43255	0.5	1	2	4	16	16	>16	2	>16	>16	>16	>16
3	<i>Clostridioides difficile</i>	ATCC BAA-1803	0.5	2	1	2	8	16	>16	2	>16	>16	>16	>16
4	<i>Clostridioides difficile</i>	ATCC BAA-1870	1	2	2	4	16	16	>16	2	>16	>16	>16	>16
5	<i>Clostridioides difficile</i>	DSM 105001	>16	1	0.5	4	8	16	>16	2	>16	>16	>16	>16
6	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	≤0.03	1	0.25	0.25	2	1	8	0.25	8	8	>16	>16
7	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337	≤0.03	0.5	0.5	4	8	2	>16	1	8	16	>16	>16
8	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	ATCC 14963	4	0.125	16	>16	16	2	16	>16	>16	16	>16	>16
9	<i>Parvimonas micra</i>	KUB 3000	0.125	1	>16	>16	>16	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16
10	<i>Finegoldia magna</i>	ATCC 29328	1	0.5	8	>16	>16	2	>16	>16	>16	>16	>16	>16
11	<i>Eggerthella lenta</i>	ATCC 43055	0.063	2	>16	2	>16	16	>16	2	>16	>16	>16	>16
12	<i>Olsenella uli</i>	KUB 3012	16	1	>16	2	>16	>16	>16	1	>16	>16	>16	>16
13	<i>Bulleidia extracta</i>	KUB 3013	>16	1	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
14	<i>Atopobium rimae</i>	KUB 3014	0.5	1	4	2	16	>16	>16	1	>16	>16	>16	>16
15	<i>Cutibacterium acnes</i>	ATCC 11827	2	0.25	16	1	8	4	16	2	>16	>16	>16	>16
16	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	ATCC 17929	0.063	1	16	2	8	8	>16	2	>16	>16	>16	>16
17	<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
18	<i>Bacteroides fragilis</i>	KUB 2982	>16	>16	16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
19	<i>Bacteroides thetaioamicron</i>	ATCC 29741	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
20	<i>Bacteroides thetaioamicron</i>	KUB 2984	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
21	<i>Bacteroides ovatus</i>	KUB 3009	>16	>16	16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
22	<i>Prevotella histicola</i>	KUB 2989	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
23	<i>Prevotella intermedia</i>	KUB 2991	>16	>16	4	8	>16	>16	>16	8	>16	>16	>16	>16
24	<i>Prevotella melaninogenica</i>	KUB 3005	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
25	<i>Prevotella buccae</i>	KUB 2992	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
26	<i>Fusobacterium varium</i>	ATCC 27725	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
27	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16

FDX : fidaxomicin, VCM : vancomycin, MIC : minimum inhibitory concentration.

共同研究者・謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご協力を賜りました北里大学特別栄誉教授、大村智先生に感謝申し上げます。本研究は、北里大学大村智記念研究所微生物応用化学研究室で行われた研究であり、浅見行弘教授をはじめとするメンバーに感謝いたします。本研究奨励金により研究が進展し、成果を見出すことができました。この場を借りて公益財団法人上原記念生命科学財団の皆様へ御礼申し上げます

文 献

- 1) John G Bartlett, Dale N Gerding, Clin. Infect. Dis. 2008, Jan 15;46 Suppl 1:S12-8. PMID: 18177217 DOI:10.1086/521863
- 2) Roy J Hopkins, Robert B Wilson, Treatment of Recurrent Clostridium Difficile Colitis: A Narrative Review. Gastroenterol. Rep. 2018 Feb;6 (1):21–28. PMID: 29479439 DOI:10.1093/gastro/gox041
- 3) Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. 2019, 148.
- 4) Daniel A Leffler, J Thomas Lamont, Clostridium Difficile Infection. N. Engl. J. Med. 2015, Apr 16;372 (16):1539–1548. PMID: 25875259 DOI:10.1056/NEJMra1403772
- 5) Sholeh, M.; Krutova, M.; Forouzesh, M.; Mironov, S.; Sadeghifard, N.; Molaeipour, L.; Maleki, A.; Kouhsari, E. Antimicrobial resistance in Clostridioides (Clostridium) difficile derived from humans: A systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 2020, 9 (1), 158.
- 6) S Ōmura, R Iwata, Y Iwai, S Taga, Y Tanaka, H Tomoda, Luminamicin, A New Antibiotic Production, Isolation and Physico-Chemical and Biological Properties. J. Antibiot (Tokyo). 1985, Oct;38 (10): 1322–1326. PMID:3840790 DOI:10.7164/antibiotics.38.1322