

論文の内容の要旨
博士(工学)学位論文

論文題目 緑膿菌および他のグラム陰性菌におけるクオラムセンシング (Quorum Sensing) を標的とした新規抗菌剤システムの開発と医療応用

氏名 東京大学 先端科学技術研究センター 先端学際工学専攻 五十嵐 潤

論文概要

細菌クオラムセンシング (Quorum Sensing、以下 QS と表記) とは、シグナル分子を利用して細菌間コミュニケーションを行ない、自らの細菌数に応じた遺伝子発現の制御を行なう機構である。医療分野において QS が引き起こす重要な問題は細菌性の慢性疾患症状に深く関与していることであり、グラム陰性菌では毒素発現だけでなく多剤耐性化の一因となるバイオフィルムや多剤排出ポンプの発現を制御している。筆者は緑膿菌 QS シグナル分子であるオートインデューサー (Auto Inducer、以下 AI と表記) をモデルにした阻害剤を新たに創出し、単剤あるいは既存抗菌剤と併用する事で緑膿菌を含めたグラム陰性菌に対し多剤耐性菌発生の抑制が望める新しい抗菌システムの開発と医療応用を目指すため研究を行った。

本論文では、第 1 章で細菌クオラムセンシング研究の背景と本研究の目的を述べ、本研究結果である QS アンタゴニストの効果を 2 章に分け報告する。第 2 章では農業分野で問題となるグラム陰性菌のモミ枯れ細菌 (*B. glumae*) に対する効果を評価し、第 3 章では医療分野で問題となるグラム陰性菌の緑膿菌 (*P. aeruginosa*) に対する効果を評価した。

第 2 章では、モミ枯れ細菌 (*B. glumae*) に対し QS 阻害スクリーニングを進め AI 受容体阻害剤である 3oxoC6-E9C と AI 合成酵素阻害剤である C8-J8 を見出した。さらに、それぞれの病原性の抑制評価だけでなくフィールドテストまで評価を行ない、モミ枯れ細菌病の病害を抑制した (図 1)。引き続き AI 合成酵素阻害剤であった C8-J8 については、阻害機構を解明するためにその X 線結晶構造解析まで行ない機能解析や C8-J8 の認識部位を明らかとした (図 2)。これらの知見から新たな AI 合成酵素阻害剤の開発につながる知見が得られた。

第 3 章では、モミ枯れ細菌に対し効果を示した 3oxoC6-E9C をリード化合物に新たにピリミジノン環を共通構造とする QS フォーカスライブラリーを構築し新たな QS アンタゴニストの探索を行ない、各 QS アンタゴニストの水溶液中安定性まで評価した (図 3)。次にフローセルモデルを用いた緑膿菌バイオフィルム形成抑制評価を行なった。さらに抗生物質 Tobramycin を併用した場合の評価を進め、QS アンタゴニストが Tobramycin の効果を増強したことを確認した (図 4)。

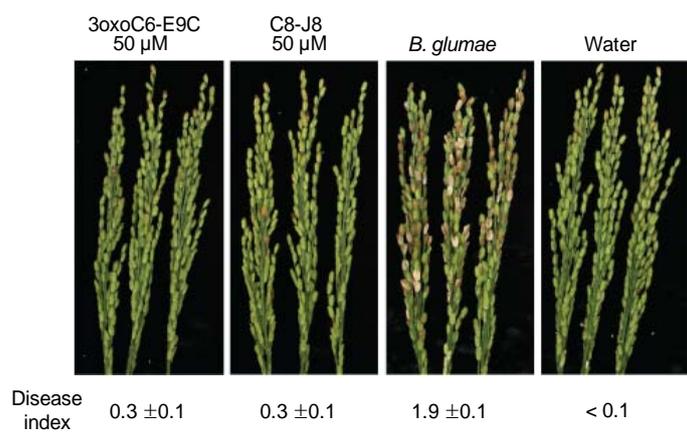


図1: QS 阻害剤の投与によるモミ枯れ病の防除効果。モミ枯れ細菌の QS 阻害スクリーニングから 3oxoC6-E9C は受容体阻害効果を示し C8-J8 は合成酵素阻害効果を示した。またいずれの化合物も、試験場での評価で病害の発生をほぼ抑制した。

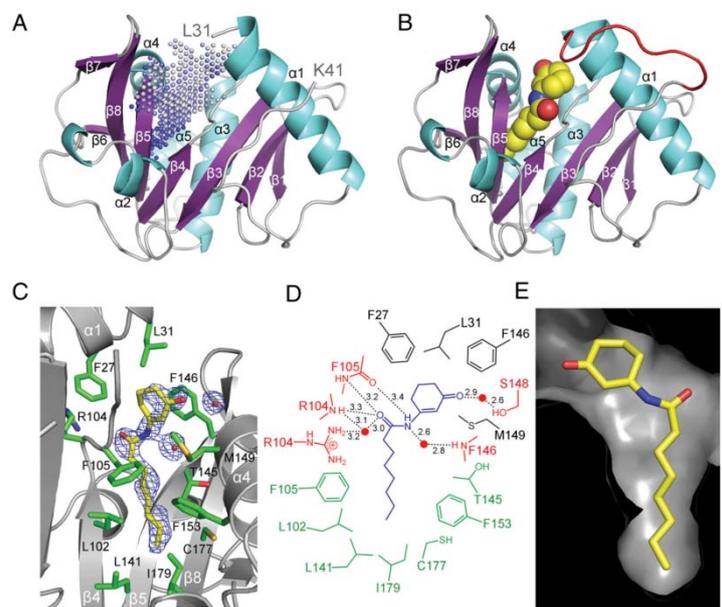


図2: モミ枯れ細菌のシグナル分子合成酵素 TofI と C8-J8 の X 線結晶構造解析。(A, B) アポ型酵素に存在する青ドットで示すスペースに C8-J8 は位置していた。(C, D) C8-J8 の各置換基と相互作用を示す酵素中のアミノ酸残基の解析が行なえ、(E) 図中灰色で示すポケットの構造から、C8-J8 はアルキル基側から酵素内部に取り込まれる機構が示唆された。

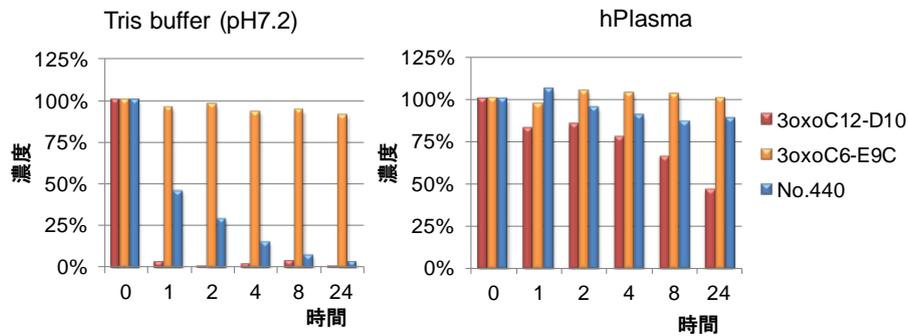


図3: ピリミジノン環を共通構造とするQSフォーカスライブラリーの合成法と高活性 QS アンタゴニストの水溶液中安定性。上記の一般式で示される約 40 種類の化合物を準備し、緑膿菌 QS/GFP レポーター株によるスクリーニングを実施した。高活性な化合物は水溶液中安定性を評価した。

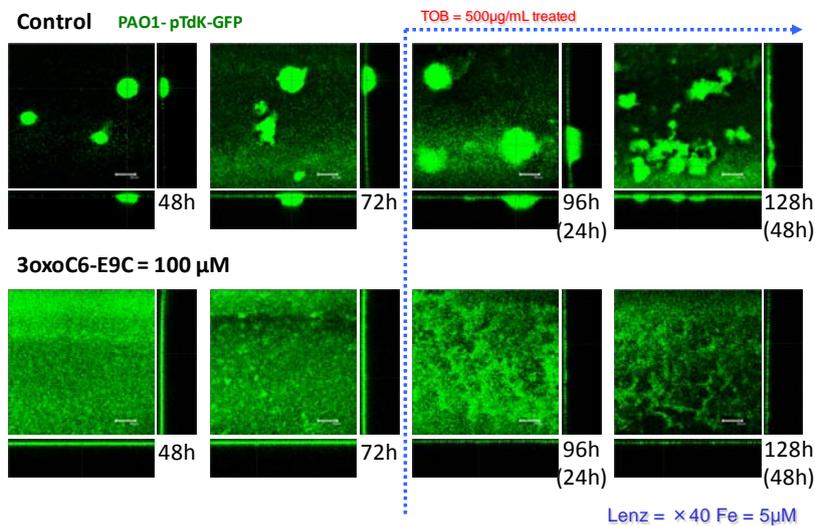


図4: QS 阻害剤(3oxoC6-E9C)と抗生物質を併用した場合の緑膿菌バイオフィーム形成阻害効果。GFP を恒常的に発現する緑膿菌とフローセルシステム、共焦点レーザー顕微鏡を用いて QS アンタゴニストのバイオフィーム形成阻害評価を行なった。3oxoC6-E9C と抗生物質の併用で、抗生物質の殺菌効果が増強され厚さが半減した事を確認した。

緑膿菌感染症で QS 阻害剤が注目される理由は、理論上、QS 阻害剤の耐性株は発生しにくいと予想されるからである。QS 阻害剤が作用を失う場合として作用点の酵素の変異が考えられるけれど、細菌 QS は AI 合成酵素と AI 受容体で構成されるため、いずれか一方に突然変異が起きて QS 阻害剤の効果が激減しても細菌そのものも QS を活性化することができず、結局は病原性の発現が大きく低下することが予想される。このことがクオラムセンシングを対象とした研究の本質を知る上で重要な背景である。

第 2 章におけるモミ枯れ細菌 (*B. glumae*) の今後の展望として、第 1 に化合物の毒性評価が重要なカギであると考えている。ヒトへの毒性ばかりでなく環境残留性や環境毒性を評価する必要があり、結果によっては毒性低減のための誘導体合成を行なう必要がある。第 2 にその病害抑制効果のスペクトルを評価する必要がある。農業分野では多様な細菌が土壌中に存在するために、試験株で効果があっても実際の病害を起こした地域で効果を示すか知るためには十分な評価が必要である。また、複数の細菌に効果があることは商業的に重要な要素であり、モミ枯れ細菌にしか効果がない場合の商品化は難しいと考えられる。しかしながら、モミ枯れ細菌だけに効果があるだけでも既存商品にはない効果のため差別化できることから、今後の安全性の結果次第では十分な商品化の可能性はあると考えている。第 3 には C8-J8 と MTA の関係性から明らかにされた新規薬剤開発の可能性である。この化合物は広くグラム陰性菌の AI 合成酵素を阻害できる可能性が示唆されていることから広い抗菌スペクトルが期待できる。ただし、モミ枯れ細菌の評価でも AI 合成酵素阻害剤は完全に AI 合成を止めることができなかつたため競合拮抗作用では効果が望めない可能性もある。さらに親和性を高める必要もあるため、その化合物開発は大変興味深い。

第 3 章における緑膿菌 (*P. aeruginosa*) 評価での現在の問題点として、評価に用いた 3oxoC6-E9C と Tobramycin との併用効果では完全に緑膿菌を死滅するまでには至らなかつたことであり、QS アンタゴニスト、併用した抗生物質、バイオフィーム中の緑菌を検出する方法といういずれにも改善の余地が感じられた。

今後の展望として、ピリミジノン誘導体はこれまでにない構造を持つ化合物であることから、受容体との親和性を評価するためのモデルのドッキングを行なえば新たな化合物デザインも行なえる可能性がある。また、現在のフローセルを用いた評価系も改良の余地があり継続して評価を行なう必要があると考えられる。また、少なからず 3oxoC6-E9C による Tobramycin の効果増強が認められたため動物を用いた試験に移行する価値は十分あると考えている。

本手法は QS を標的とした多剤耐性菌発生の抑制が望める新しい抗菌システムの開発が期待できる成果である。医療分野に限らず農業分野への応用も可能である点に言及している。

特記事項

- ・第 2 章のモミ枯れ細菌を用いた研究は、Seoul National University の Ingyu Hwang 教授との共同研究の一環で行なわれた。