

# 博士論文

呼吸器感染症治療薬候補としての  
UMP キナーゼおよび CTP 合成酵素阻害剤に関する研究

吉田 達彦

## 目次

序論	p 5
第 1 章 発現抑制による大腸菌殺菌性評価系の構築と評価研究	
序	p24
第 1 節 N-end rule に基づいた分解促進系株の構築	p24
第 2 節 トリプトファンプロモーターによる発現制御株の構築	p27
第 1 項 <i>tnaA</i> 遺伝子の破壊と <i>trpR</i> 遺伝子の導入	p27
第 2 項 <i>DnaB</i> 、 <i>FabB</i> 、 <i>PyrG</i> 発現制御株の構築	p27
第 3 項 <i>GlmU</i> 、 <i>DnaX</i> 、 <i>DnaG</i> 、 <i>IspA</i> 、 <i>Era</i> 、 <i>PyrH</i> 、 <i>Der</i> 発現制御株の構築	p28
第 3 節 コロニー形成能の評価	p35
第 4 節 短時間殺菌性評価	p37
第 1 項 殺菌的な標的 ( <i>DnaB</i> 、 <i>GlmU</i> 、 <i>DnaX</i> ) の結果	p37
第 2 項 その他の標的について	p39
第 5 節 考察	p41
第 6 節 実験方法詳細	p43
第 2 章 <i>PyrH</i> 阻害剤の探索研究で見出された化合物の評価	
序	p49
第 1 節 <i>S. pneumoniae</i> および <i>H. influenzae</i> <i>PyrH</i> の精製	p49
第 2 節 <i>PyrH</i> 酵素アッセイ系構築	p51
第 3 節 <i>S. pneumoniae</i> <i>PyrH</i> を用いた HTS	p53
第 4 節 <i>PYRH-1</i> の SPR 解析	p57

第5節	PYRH-1の有効性（酵素阻害活性、抗菌活性）評価	p59
第6節	考察	p61
第7節	実験方法詳細	p64
第3章	PyrG 阻害剤の探索研究で見出された化合物の評価	
序		p71
第1節	<i>S. pneumoniae</i> および <i>H. influenzae</i> PyrG の精製	p71
第2節	PyrG 酵素アッセイ系構築	p73
第3節	<i>S. pneumoniae</i> PyrG を用いた HTS	p76
第4節	COMPOUND G1 の NMR 解析	p80
第5節	COMPOUND G1 の有効性（酵素阻害活性、抗菌活性）評価	p83
第6節	考察	p85
第7節	実験方法詳細	p87
第4章	総括	p92
謝辞		p97
参考文献		p98
主論文目録		p101

## 略語表

BSA	bovine serum albumin
CAMHB	cation-adjusted Mueller-Hinton broth
CBPC	carbenicillin
CFU	colony-forming unit
CP	chloramphenicol
CV	coefficient of variation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HTS	high throughput screening
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50
IAA	$\beta$ -indoleacrylic acid
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactoside
KM	kanamycin
LB	Luria-Bertani
MeOH	methanol
MHA	Mueller-Hinton agar
MIC	minimum inhibitory concentration
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
RU	resonance unit
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecylsulfate
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SPR	surface plasmon resonance
STD	saturation transfer difference

## 序論

### 呼吸器感染症

呼吸器感染症はその疾患が認知されてから 100 年以上の歴史がある。日本ではジフテリア、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、肺炎桿菌などの病原菌の発見と各種毒素などの病原因子の解明、インフルエンザや結核などの感染症流行と社会的対応、抗毒素療法やワクチン開発および後述するペニシリンなどの抗菌剤の発見とその臨床応用といった歴史がある。呼吸器感染症の病原微生物の多くは、飛沫感染で伝播するものであり、ヒトからヒトへの感染症として位置づけられる。

これら感染症を予防する方策としては古くからジフテリア、破傷風、百日せきなどに対するワクチンが知られている。日本におけるワクチン開発は、1980-90 年代にいくつかのワクチンで副作用が報告され一部ワクチンが接種中止となったことや予防医学に対する認知率の低さなどが要因となり、2000 年代には世界のワクチン開発に 20 年遅れていると揶揄されていた。2007 年に厚生労働省より、ワクチン産業ビジョンが発表されるとともに近年インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) Type b (Hib) ワクチン、高齢者向けの肺炎球菌 (23 価) ワクチン、新生児、小児向けの肺炎球菌 (13 価) ワクチンなどが呼吸器感染症の感染予防ワクチンとして実用化されている。しかし、日本に限らず世界的に見ても未だに実用化されているワクチンの数は少なく、さらに多くの病原菌に対するワクチン開発が求められている。また、肺炎球菌ワクチンはすでに実用化されているが、種類が多い夾膜多糖を抗原として用いているため、肺炎球菌の多様性をカバーできるワクチンは存在せず、すべての肺炎球菌に有効なワクチンは存在しない。インフルエンザ菌に対するワクチンも同様であり、小児の髄膜炎の主要起炎菌である Type B には有効であるものの、Type B 以外のインフルエンザ菌に有効なワクチンは存在しない。

一方、抗菌化学療法開発の歴史は、人類にとって罹患率、死亡率ともに高いものであった細菌性肺炎を劇的に治癒させるものであり、医学医療の進歩の象徴でもあった。ただし、

呼吸器感染症は小児での感染率が極めて高く十分な治療が受けられない途上国では小児の死亡原因の代表的なものであり続けている。先進国でも高齢化社会（図-序 1）や易感染宿主の増加を背景に弱毒菌による日和見感染症あるいは後述の耐性菌感染症に苦しめられている。

日本における高齢化率と肺炎の関係を考えて場合、わが国の総人口に占める 65 歳以上の割合は 2012 年に 24.1%となり、このうち 74 歳以下の前期高齢者は 12.2%、75 歳以上の後期高齢者は 11.9%である。2025 年には、75 歳以上の割合が約 18%に増加すると推計されている。2011 年に、それまで死因の第 4 位であった肺炎が脳血管疾患を抜いて第 3 位になった（図-序 2）。加齢に伴い肺炎死亡リスクは急激に高まることが知られており（図-序 3）、40 年後には総人口の 4 割が 65 歳以上になると予測されていることから今後さらに増加すると予想される肺炎患者、すなわち高齢者における呼吸器感染症のコントロールは、非常に重要な課題の一つとなっている。

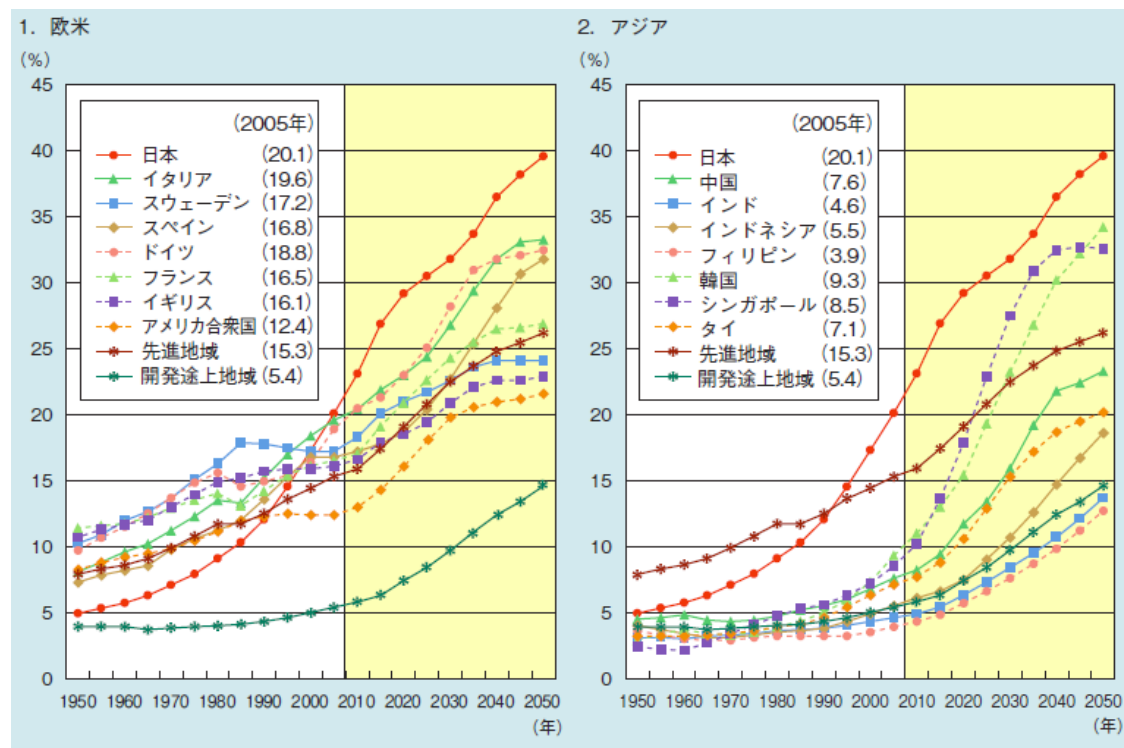


図-序1 世界の高齢化率の推移（平成23年版 高齢社会白書（内閣府）より）

65歳以上を高齢者とした場合の高齢化率を示す。2005年時点で開発途上国の高齢化率（5.4%）に比べて日本をはじめとする先進国で高齢化が進んでいる。開発途上国も含めて今後高齢化率は向上すると予測されている。



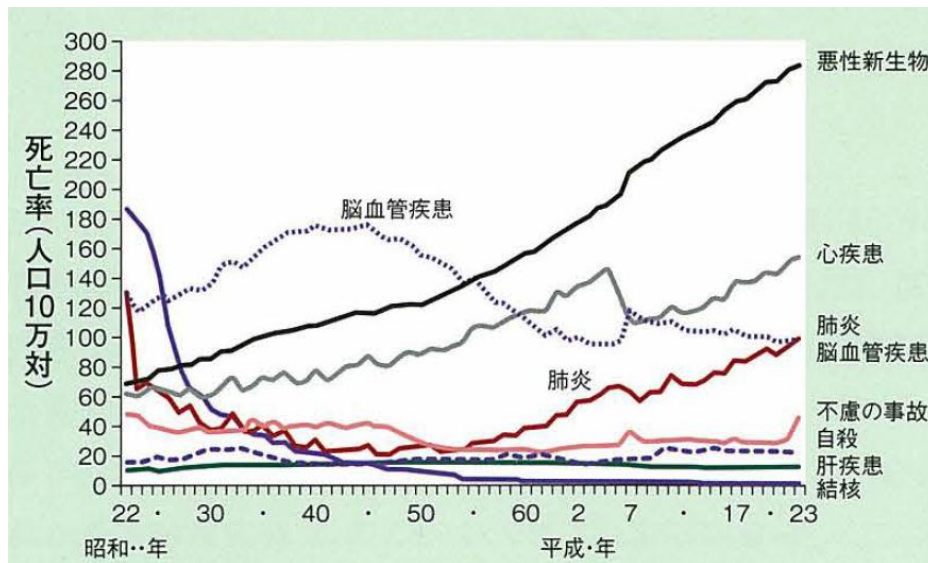


図-序2 主な死因別にみた死亡率の年次推移（厚労省人口動態統計 平成23年度より）

本邦において過去30年で肺炎による死亡率は増加傾向であり、近年脳血管疾患による死亡を抜き第三位の死亡分類となっている。

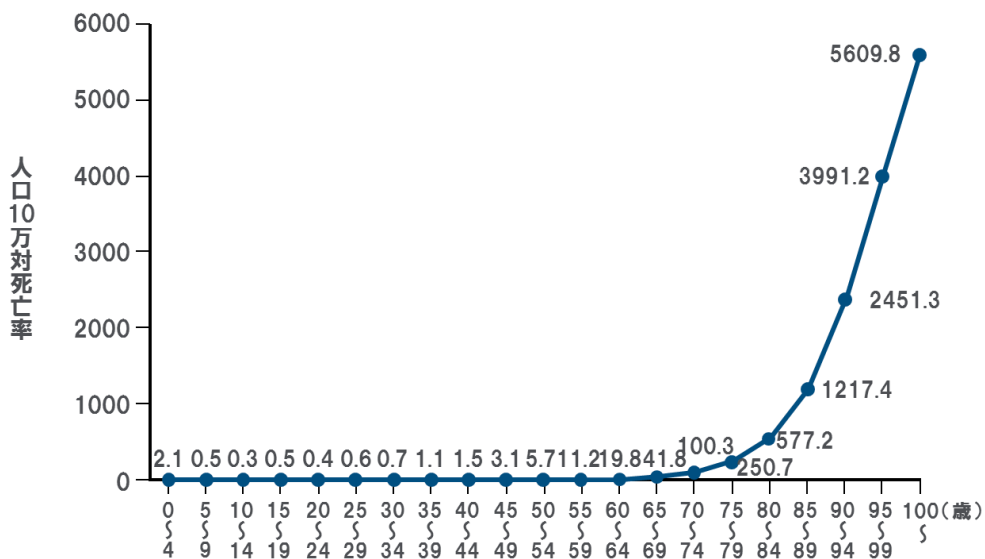


図-序3 主要死因別粗死亡率年次推移（国立がん研究センターHPより）

肺炎の年齢別死亡率を人口10万対死亡率で示す。65歳を超えるに従い肺炎による死亡率が急速に増加する。

## 呼吸器感染症の起炎菌

呼吸器感染症は、その発症部位ごとに副鼻腔炎、咽喉頭炎、気管炎、気管支炎、細気管支炎、肺炎に分類される。中でも下気道感染症の一つである肺炎は、重症化例が多数報告されている感染症の一つである。肺炎は市中肺炎（CAP: community acquired pneumonia）と院内肺炎（HAP: hospital acquired pneumonia）に大きく分けられる（近年その両者の特徴を併せ持つ医療ケア関連肺炎（HCAP : healthcare-associated pneumonia）の概念が米国胸部学会と米国感染症学会により HAP のガイドラインの中で提唱され、本邦でも 2011 年に日本呼吸器学会から医療・介護関連肺炎診療ガイドラインが出され、その中で本邦の医療・介護制度の実状に即した HCAP が定義されている。）

CAP で分離される起炎菌を図-序 4 に示す。報告により一定のばらつきが認められるため一般的にガイドラインでは分離頻度まで記載されないが、主に肺炎球菌、インフルエンザ菌が分離され、マイコプラズマ、クラミジア等の非定型細菌、黄色ブドウ球菌の分離頻度が高いとされている。

HAP で分離される起炎菌を図-序 5 に示す。肺炎球菌、インフルエンザ菌のほかに黄色ブドウ球菌、もしくは大腸菌などのグラム陰性菌が検出されることが特徴である。重症化しにくいと言われる非定型細菌は分離されることはほとんどない。高齢者では黄色ブドウ球菌やグラム陰性菌の分離頻度が高まる傾向が報告されている。

Patient type	Etiology
Outpatient	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> Respiratory viruses <sup>a</sup>
Inpatient (non-ICU)	<i>S. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>Legionella</i> species Aspiration Respiratory viruses <sup>a</sup>
Inpatient (ICU)	<i>S. pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella</i> species Gram-negative bacilli <i>H. influenzae</i>

図-序 4 市中肺炎の主要な起炎菌

(IDSA/ATM の市中呼吸器感染症治療ガイドラインより)

外来、入院加療が必要となった入院患者（ICU 加療中か否か）で起炎菌を分類した場合、肺炎球菌およびインフルエンザ菌、マイコプラズマ、クラミジア、黄色ブドウ球菌、レジオネラ菌、その他 RS ウイルス、インフルエンザウイルス等の呼吸感染症関連ウイルスが分離される。

	院内肺炎 (n=61)	院内肺炎	
		65 歳以上 (n=59)	25-50 歳(n=59)
肺炎球菌	10.0%	—	—
黄色ブドウ球菌	31.0%	22.0%	8.5%
インフルエンザ菌	3.3%	1.7%	13.6%
肺炎桿菌	21.0%	15.3%	15.3%
緑膿菌	31.0%	23.7%	10.2%
大腸菌	5.0%	15.3%	6.8%

図-序5 院内肺炎の分離頻度（日本内科学会雑誌 87:210-6 より）

院内肺炎の分離頻度が報告されている2件の起炎菌分離頻度の一覧を示す。院内では、肺炎球菌、インフルエンザ菌は少数検出されるが、重症化しにくいと言われる非定型細菌はほとんど検出されない。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌と大腸菌などグラム陰性菌の分離頻度が高いことが特徴である。なお、原因菌が特定できなかったもの、上記菌種より低分離頻度のものは記載していない。

## 抗菌剤の歴史

1909年のポール・エーリッヒらによるサルバルサン、1928年のアレキサンダー・フレミング博士によって発見されたペニシリンなど抗生物質（抗菌剤）が果たした人類への貢献は他に類をみない。これら抗菌剤は、それまでの伝染性病原細菌や化膿性細菌による市中感染を激減させた。ヒトへの害が少なく病原性細菌に有効なこれら抗菌剤は「魔法の弾丸」と称され、その後も1942年に結核に有効なストレプトマイシンの発見、1950年代のアミノグリコシド、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、マクロライド、バンコマイシンの発見、1960年代のメチシリン、ナリジクス酸の発見へと続いた。日本でもこれら抗菌剤が導入され肺炎、結核の治療に貢献したほか梅毒、赤痢の患者数減少に寄与している。その他、コレラ、ペスト、チフス、ジフテリア等の伝染病も抗菌剤により国内ではほとんど認められなくなっている。その後は、改良新薬が開発され有効性、安全性もしくはPK/PD（Pharmacokinetics；薬物動態学とPharmacodynamics；薬力学の組合せにより抗菌剤の血中濃度とその濃度推移から抗菌剤としての有効性を最適化すること）の概念を取り入れ、少ない服用回数で済むまたは経口にて服用が可能であるといった服薬コンプライアンスが改善された各種抗菌剤が上市されている。現在は、主にフルオロキノロン系、マクロライド系、βラクタム系抗菌剤が臨床利用されており、その他グリコペプチド系、オキサゾリジノン系、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系、カルバペネム系などの抗菌剤も重症度、起因菌に応じて使用されている。

## 耐性菌の出現

前述のように、抗菌剤は、1900年代初頭から臨床における化学療法に著しい進歩をもたらした。しかし、一方ではこれまで病原性をもたないと考えられていた細菌が入院患者等から分離されるようになってきている。また既存の抗菌剤に耐性を示す細菌も分離されてきている。薬剤耐性出現の主要因は、抗菌剤の不適切な使用が挙げられている。1980年代以降、

様々な抗菌剤が開発され、臨床の場で大量に使用されてきた。抗菌剤に暴露された細菌は、遺伝子組換えや挿入などの方法で、耐性システムを構築し、抗菌剤に対応した。その結果、自然耐性変異や突然変異によって生じた耐性菌が、これら抗菌剤によって選択され入院患者等を通じて広く分布することになった。図-序 6 に抗菌剤開発の歴史と临床上重要な耐性菌の出現の関係を、図-序 7 に临床上重要であると考えられる耐性菌を示した。

最近、肺炎球菌性感染症は、高齢者や小児における髄膜炎などで重篤化、難治化することが明らかとなっている。宿主の免疫力の低下や菌株の強病原性の獲得もその一因と考えられるが、第一選択薬であるペニシリンやその他βラクタム系抗菌剤（セフェム系抗菌剤など）に耐性となった PRSP（ペニシリン耐性肺炎球菌）の増加が主要因と考えられている。PRSP は、細菌の細胞壁合成酵素（PBP：ペニシリン結合タンパク質）のペニシリンに対する結合親和性が低下した変異により生じたものである。近年、これら PRSP は、βラクタム系抗菌剤だけでなく、他の第一選択薬の候補であるマクロライド系抗菌剤に対する耐性やフルオロキノロン系抗菌剤への耐性を獲得した多剤耐性ペニシリン耐性肺炎球菌（多剤耐性 PRSP）が出現している。そのほか、マクロライド系抗菌剤の一つであるエリスロマイシンに耐性を獲得した ERSP、キノロン系抗菌剤に耐性を獲得した QRSP も報告されている。

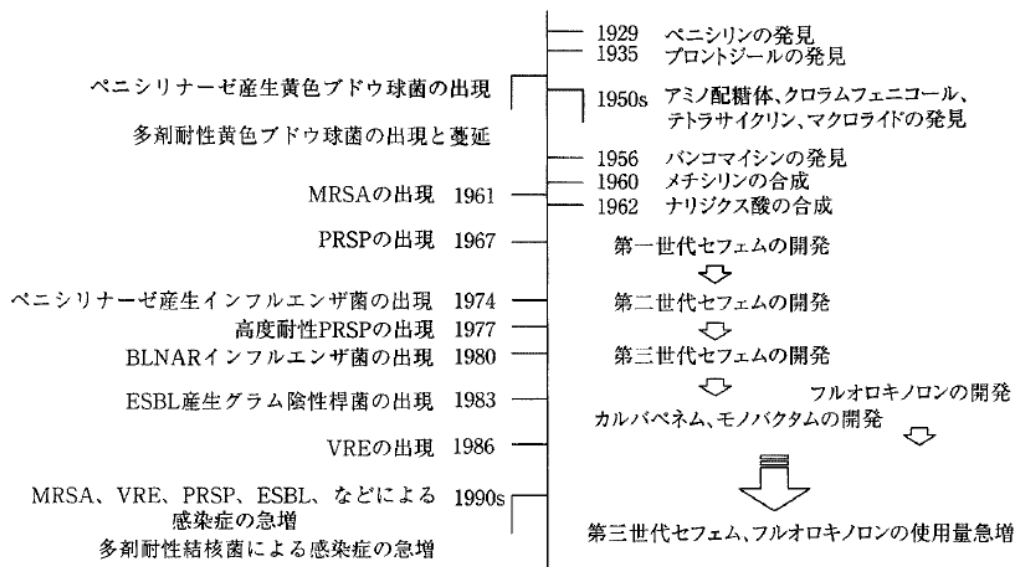


図-序6 抗菌剤開発の歴史と耐性菌の出現の関係

(日本内科学雑誌 2002;91:154-8 より)

メチシリンの合成成功後、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）が出現し、ペニシリンまたはその後のセフェム系抗菌剤の開発とともに PRSP（ペニシリン耐性肺炎球菌）、ペニシリナーゼ産生インフルエンザ菌および BLNAR（βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌）が出現した。その後もセフェム系抗菌剤に耐性を有する ESBL（広域スペクトルβラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌）が出現している。

◇ グラム陽性球菌

- ・メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）
- ・ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）
- ・バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）
- ・バンコマイシン低感受性黄色ブドウ球菌（VISA）

◇ グラム陰性桿菌

- ・緑膿菌（多剤耐性）
- ・βラクタメース産生菌  
基質拡張型βラクタメース（ESBL）  
メタロβラクタメース
- ・BLNARヘモフィルス

図-序7 临床上重要な耐性菌

(日本内科学雑誌 2002;91:154-8 より)

抗菌剤に耐性を有し臨床で問題視されている耐性菌を示す。PRSP、BLNAR など呼吸器感染症（市中肺炎、院内肺炎など）の起炎菌になりえるものが含まれる。

## 抗菌剤耐性のメカニズム

現在までに知られている抗菌剤耐性は、以下の4つを基本としたメカニズムである。

- 1) 抗菌剤の不活性化； $\beta$ ラクタマーゼのように抗菌剤を分解する酵素の産生、アミノグリコシド系抗菌剤耐性に代表される抗菌薬の構造を一部変化させることで、抗菌剤の有効性を減弱するもの
- 2) 作用標的の変化；PBP（ペニシリン結合タンパク質）の変異に代表されるように、遺伝子変異により抗菌剤が作用する標的タンパク質の構造を変化させ、抗菌剤と標的タンパク質との結合親和性を低下させるもの
- 3) 細胞壁透過性の減少；グラム陰性菌の耐性化で多いが、抗菌剤が微生物の細胞内に入らないようにするもの
- 4) 薬剤排出機構；ABC トランスポーターの機能亢進など、細胞内に取り込まれた抗菌剤が、薬剤排出ポンプを介して菌体外に排出され致死または増殖阻害とならないものである。グラム陰性菌が多い。

## 新規抗菌剤探索のアプローチ

1990年代半ばまでは、耐性菌に有効な新たな抗菌剤の研究開発は、既存の抗菌剤クラスの改良新薬を中心としていた。また、抗菌剤の不活性化に寄与する酵素の阻害剤や、薬剤排出ポンプの阻害剤に関する研究も行われていた。しかしこれら抗菌剤補助剤は、既存の抗菌剤と併用する必要があり、用法用量の設計が難しく、薬物間相互作用が認められることもあり合成ペニシリンであるピペラシリンと $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤タゾバクタムの配合剤を除き上市実績はない。非必須遺伝子を標的とした場合、非必須遺伝子の阻害剤処理条件下でも菌は増殖可能であることから、複製の過程で突然変異した非必須遺伝子耐性株が分離されやすくなる可能性も考えられる。

新規標的に対する抗菌剤の探索として、大規模化合物ライブラリーを用いて標的病原細



菌に対する抗菌活性を指標とした抗菌化合物のスクリーニングを行う場合があるが、抗菌活性を有する化合物が得られても化合物が作用する標的タンパク質の同定が難しく抗菌化合物の誘導体展開の方針を立てることが難しいこと、または細胞毒性を有し宿主であるヒトへの選択性が期待できない場合が多く、近年、単純なスクリーニングから得られた抗菌剤の臨床への応用例は報告されていない。

1995年に *H. influenza* の全遺伝子配列が決定されて以降、各種病原細菌の遺伝子配列が明らかにされ、各遺伝子の増殖必須性が判明するとともに多くの製薬会社は、ヒトに保存されていない、または保存されていたとしても選択性が期待できる新規抗菌剤の標的候補タンパク質に対する高速スクリーニング (HTS) を実施する戦略をとっている。HTS とは、新規に阻害活性物質を獲得する為の手法であり、数十万から時には 100 万を越える大規模化合物ライブラリーを用いて、目的とする標的タンパク質に対する阻害活性評価を行う手法である。HTS では、一日に 1~数万化合物の評価を行うことが求められるが、阻害物質の検出感度を向上する必要がある一方で、実験間差を最少にした安定なアッセイ系の構築やアッセイの一部自動化が求められる。そのため、反応溶液量の検討、反応基質量・温度等の最適化、ナノリットルスケールの微量溶液分注機器や高速測定機器の導入を静電気の影響等も加味して HTS アッセイ系を確立する必要がある。さらに、非特異的な阻害活性を示す化合物がフォールスポジティブに検出されないようにし、特異的に標的タンパク質を阻害する化合物のみを検出することができるアッセイ系を構築する必要がある。HTS 系の安定性は、式 1 に記載の Z' 値により評価することができる。 $\sigma_h$  が陽性コントロール標準偏差、 $\sigma_i$  が陰性コントロール標準偏差、 $\mu_h$  が陽性コントロール平均値、 $\mu_i$  が陰性コントロール平均値を示す。この Z' 値は、1 以下の数字となる。式 1 の  $3\sigma_h + 3\sigma_i$  (標準偏差の和) が 0 である場合、または  $|\mu_h - \mu_i|$  (陽性および陰性コントロールの差の絶対値) が無限大となるような場合に最大値 1 となる。統計学的には Z' 値が 1 であれば理想的なアッセイ系、0.5 以上 1 未満であれば優れたアッセイ系、0 以上 0.5 未満であれば 1 化合物について 2 回アッセイ

が必要なバラつきのあるアッセイ系、0未満であれば HTS は実施不可能なアッセイ系であるとされる。数万から数十万化合物を扱う HTS では Z' 値を 0.5 以上にすることが必要である。

式 1

$$Z' = 1 - \left( \frac{3\sigma_h + 3\sigma_l}{|\mu_h - \mu_l|} \right)$$

新規抗菌剤の標的候補タンパク質に対する HTS には、大きく分けて 2 つの方法がある。微生物を用いて標的候補タンパク質の発現を制御し、抗菌活性を指標としてスクリーニングを行う Cell-based のアッセイ系と標的候補タンパク質の酵素阻害活性を指標とした Cell-free の酵素アッセイ系である。Cell-based 系は、細胞壁の成分など細胞表層に存在する標的に対するスクリーニングとして有用であるが、多くが抗菌活性を指標としていることから特定の遺伝子の発現制御下で抗菌活性を示したとしても、その化合物が直接目的とする標的候補タンパク質の酵素を阻害しているかどうか分からないこと、細胞透過性が悪い化合物は選択されてこないことなどといったデメリットがある。一方、Cell-free 系は、酵素アッセイ系を構築できれば、目的とする酵素の活性を阻害する化合物を獲得することができ、Cell-based では透過性等が理由で検出不可能な化合物を検出することが期待されるため、細胞内標的を含めた新規抗菌剤候補化合物のスクリーニングに適している。酵素阻害活性を有するが、抗菌活性を示さない化合物も検出されることになるが、FabI 阻害剤及び Met tRNA 合成酵素阻害剤<sup>1)</sup>、MurF 阻害剤<sup>2)</sup>の報告では誘導体展開により、酵素阻害活性とともに抗菌活性が向上した化合物が得られることが報告されている。

## 本研究の目的と本論文の構成

呼吸器感染症治療薬として多数の薬剤が存在するが、薬剤の作用標的は限定されている。

キノロン系抗菌剤は、DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ IV を阻害、マクロライド系やテトラサイクリン系そしてアミノグリコシド系抗菌剤は、リボソームのタンパク合成機能を阻害、β-ラクタム系抗菌剤は、細胞壁合成を阻害することがそれぞれ知られている。近年多剤耐性 PRSP、BLNAR など既存薬に対する薬剤の耐性化は年々増加傾向であり、新規の作用機序を有し耐性菌に対して有効な抗菌薬の開発が望まれている。

主要病原細菌の全ゲノム配列決定後、比較ゲノム解析により、ヒトとの選択性が期待され、細菌間で保存性の高いタンパク質が市中呼吸器感染症治療薬標的候補として選ばれてきている<sup>3-5)</sup>。この標的候補は複数あり、その優先順位付けは重要な課題の一つと考えられる。殺菌的な薬剤は免疫力の低下した患者にも効果が期待でき<sup>6,7)</sup>、治療期間の短縮に繋がる可能性もある<sup>8)</sup>ことから、殺菌性は標的の優先順位付けに有用な項目であると思われる。これまで殺菌性の評価にはいくつかの標的について、温度感受性変異株や既知標的に作用する化合物を用いた検討が行われていた。ただし、温度感受性変異株を用いた解析では、目的とする遺伝子に変異が入らない場合、評価が不可能という課題がある。また、第一三共株式会社で温度感受性変異点が報告されている遺伝子に対して、温度感受性変異を有する遺伝子組換え株を構築し殺菌性評価をした場合、殺菌的であることが報告されている遺伝子であっても、変異箇所により温度感受性変異株の増殖は止まるものの十分に失活しない場合が認められ、殺菌的な生菌数の減少を示さないことを確認している。以上から十分な目的遺伝子の温度感受性変異が認められない場合は適切な評価ができない可能性がある。既知標的に作用する化合物を用いた解析は、阻害剤が報告されていない標的に対して適用できないという課題がある。*Mycobacterium* では IPTG 誘導型 antisense RNA 発現システム<sup>9)</sup> または Clp protease による分解システム<sup>10)</sup>による殺菌性評価の報告があるが、生菌数まで評価されていない。また、モデル微生物であり、肺炎の起原因菌でもある *Escherichia coli* に適用可能であり、任意の標的に対する殺菌性を評価できる系は知られていない。私は、本研究に先立ち殺菌的であることが報告されている既知標的に対して antisense RNA を用いた殺

菌性評価系構築を検討したが、任意の標的の翻訳阻害を十分に示す antisense RNA による殺菌性評価系の構築はできなかった。その原因は、任意の標的の mRNA に対して特異的かつ十分なアフィニティーを有する antisense の設計が難しいこと、そして標的タンパク質の半減期が長い場合は *de novo* のタンパク合成を antisense RNA で阻害しても細胞内に標的タンパク質が残存することなどが考えられる。また、評価対象の標的が複数の必須遺伝子をコードするオペロンに含まれる場合、antisense RNA による特異的な殺菌性評価は不可能である。そこで本研究では、新規作用機序を有する抗菌薬候補化合物の探索を目的として、*E. coli* を用いて転写および分解の両面から標的タンパク質の発現を制御する殺菌性評価系の構築を行い、呼吸器感染症治療薬の標的候補に対する殺菌性評価と標的候補タンパク質である UMP キナーゼおよび CTP 合成酵素阻害剤に関する研究を行った。

第 1 章では *E. coli* を用いて、トリプトファンプロモーター (Ptrp) による転写制御、N-end rule に基づくタンパク質分解制御株構築を 10 遺伝子 (Table 1) について行い、標的タンパク質の発現を抑制した際の生菌数を測定し、殺菌性が期待される標的タンパク質を選抜した。

本研究で構築した系について以下、簡単に述べる。*E. coli* 細胞内で発現したタンパク質の N 末端のアミノ酸はメチオニンアミノペプチダーゼによりプロセッシングを受けるなどしてメチオニンではない場合が存在する。N 末端がフェニルアラニン (Phe) のタンパク質は ClpAP プロテアーゼの働きにより速やかに分解されることが報告されているが (Phe の場合、半減期はおおよそ 2 分以下)、この N-end rule は、通常細胞質または内膜に局在するタンパク質に適用される<sup>11-13)</sup>。本研究では *Saccharomyces cerevisiae* 由来の Ubi4 (ユビキチン) を、Phe を介して目的とするタンパク質の N 末端に融合し、*S. cerevisiae* 由来の UBPI (ユビキチンプロテアーゼ) を発現させることでユビキチンを切断し、N 末端に Phe を露出<sup>14)</sup>、さらに *clpA* の上流に conditional プロモーターである LacUV5 プロモーターを挿入し、N 末端が Phe であるタンパク質の分解が IPTG の添加によって誘導される株を構築した (Fig. 1)。ま

た、目的遺伝子の転写はトリプトファンプロモーターを用いて制御した。トリプトファンプロモーターは TrpR (トリプトファン結合型転写抑制因子) がトリプトファン存在下で転写を抑制するトリプトファン抑制型プロモーターであり、TrpR とトリプトファンの結合を阻害する 3- $\beta$ -indoleacrylic acid (IAA) を用いることでトリプトファンの発現は厳密に制御可能である<sup>15)</sup>。また、トリプトファンナーゼである *tnaA* は、トリプトファン分解活性を有するため、上述のように構築した株に対して、*tnaA* 遺伝子を *trpR* 遺伝子に置換した株を構築した。

第 2 章では、第 1 章で評価された標的のうちのひとつ、PyrH の阻害剤探索で見出された化合物である PYRH-1 (sodium {3-[4-tert-butyl-3-(9H-xanthen-9-ylacetyl amino)phenyl]-1-

cyclohexylmethylpropoxycarbonyloxy} acetate) の評価を行った。PyrH は細胞内に存在し、微生物の主要な代謝経路であるピリミジン生合成経路において UMP と ATP からリン酸化反応により UDP と ADP を生成する UMP キナーゼであり、*S. pneumoniae*<sup>16,17)</sup> および *H. influenzae*<sup>18)</sup> で生育に必須であることが報告されている。本遺伝子は、ほぼすべての原核生物で保存されているが、ヒトをはじめとする真核生物では、非特異的 UMP-CMP kinase と呼ばれる酵素によって UDP が合成され、そのアミノ酸配列に相同性が無いことが知られている。また、真核生物の adenylate kinase family と同相同性が低いことから新規抗菌剤の標的候補として有望と考えられる。今回私はこの PyrH について *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来の PyrH を用いて酵素アッセイ系を構築し、*S. pneumoniae* PyrH 阻害活性を指標に 1536 well プレートを用いた Cell-free HTS を第一三共株式会社が有する大規模化合物ライブラリーを用いて行い、PYRH-1 を見出した。さらに表面プラズモン共鳴技術を用いて PYRH-1 と *S. pneumoniae* PyrH の相互作用解析および細菌に対する薬剤感受性評価を行った。

第 3 章では、同じく第 1 章で評価された標的のうちのひとつ、PyrG 阻害剤探索で見出された化合物である COMPOUND G1 (2-(3-[3-oxo-1,2-benzisothiazol-2(3H)-yl]

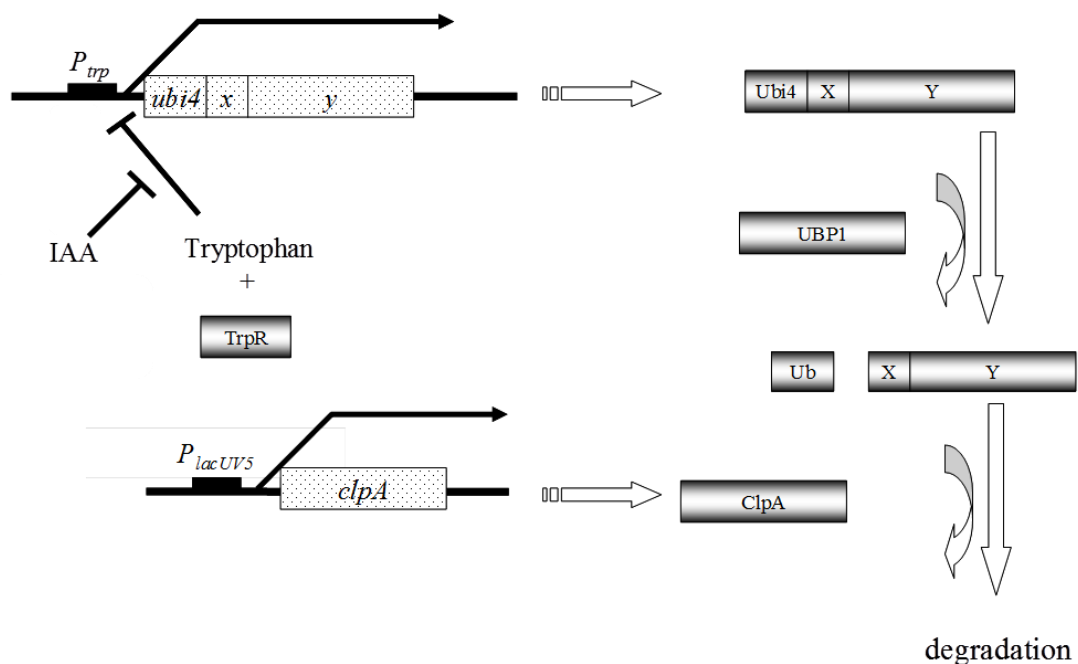
phenylsulfonlamino) benzoic acid) の評価を行った。PyrG は細胞内に存在しピリミジン生

合成経路において  $UTP + ATP + Gln + H_2O \rightarrow CTP + ADP + Glu + Pi$  の反応により CTP を生成する CTP synthase<sup>19,20)</sup>であり、*H. influenzae*<sup>18)</sup>、*E. coli*<sup>21)</sup> で生育に必須であることが報告されている。出芽酵母では、URA7, URA8、ヒトでは、CTPS1 および CTPS2 のようにアイソフォームの存在が知られており、細菌の PyrG とは相同性が低いと考えられている。今回私はこの PyrG について *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来の PyrG を用いて酵素アッセイ系を構築し、*S. pneumoniae* PyrG 阻害活性を指標に 384 well レベルの Cell-free HTS を第一三共株式会社が有する大規模化合物ライブラリーを用いて行い、COMPOUND G1 を見出した。さらに NMR を用いて COMPOUND G1 と *S. pneumoniae* PyrG の相互作用解析および細菌に対する感受性評価を行った。PyrG 阻害剤としては、これまでに酵素反応の基質アナログである cyclopentenyl cytosine<sup>22-24)</sup>、3-deazauridine<sup>25)</sup> および acivicin<sup>26)</sup> が報告されているが、COMPOUND G1 が PyrG 阻害活性を有する化合物であることを本研究で初めて明らかにした。

第 4 章では、第 1 章から第 3 章までの成果のまとめと、本研究に関連する新規抗菌剤探索研究の進捗を含めた今後の展望について述べた。

**Table 1. *E. coli* essential genes for the construction of the regulatable gene expression system in this study (in alphabetical order).**

Gene name	Product
<i>der</i>	predicted GTP-binding protein
<i>dnaB</i>	Replicative DNA helicase
<i>dnaG</i>	DNA primase
<i>dnaX</i>	DNA polymerase III gamma and tau subunits
<i>era</i>	GTP-binding protein
<i>fabB</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I
<i>glmU</i>	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine pyrophosphorylase homologue
<i>ispA</i>	Farnesyltranstransferase
<i>pyrG</i>	CTP synthase
<i>pyrH</i>	uridylyate kinase



**Figure 1. Schematic representation of the gene expression system used in this study.**

Tryptophan/TrpR 複合体は、トリプトファンプロモーターからの転写を負に制御する。一方、IAA/TrpR 複合体は、tryptophan の TrpR への結合を IAA により阻害することで TrpR のトリプトファンプロモーターへの結合を阻害し、Tryptophan/TrpR 複合体の転写抑制を解除する。LacUV5 プロモーターは IPTG の添加によりその転写活性が正に制御される。すなわち IPTG の添加により ClpA の発現が誘導される。酵母由来のユビキチンである Ubi4 は同じく酵母由来の UBp1 により切断されることが知られている。UBp1 により Ubi4 が切断され、図中 X と記載されているアミノ酸（フェニルアラニン）が N 末端に露出した場合、N-end rule に従い、ClpAP プロテアーゼにより速やかに分解されると考えられる。

X/x: フェニルアラニン残基/コドン

Y/y: 新規抗菌剤の候補遺伝子 タンパク質/遺伝子 (Table 1 に記載)

Ubi4/ubi4: 酵母のユビキチン タンパク質/遺伝子

Ubp1: ユビキチンプロテアーゼ

ClpA/clpA: ClpAP プロテアーゼのサブユニット タンパク質/遺伝子

TrpR: トリプトファンオペロンのリプレッサー



## 第1章 発現抑制による大腸菌殺菌性評価系の構築と評価研究

### 序

主要病原細菌の全ゲノム配列決定後、比較ゲノム解析により、ヒトとの選択性が期待され、細菌間で保存性の高いタンパク質が市中呼吸器感染症治療薬標的候補として選ばれてきている。第一三共株式会社でも、市中呼吸器感染症起因菌の主要な起因菌である *S. pneumoniae*、*S. aureus*、*H. influenzae*、*E. coli* で保存性が高く、ヒトとの選択性が期待され、さらに特定の菌種で生育に非必須であることが報告されている遺伝子を除外した複数の標的候補を見出していたが、その後の優先順位付けは重要な課題の一つであった。殺菌的な薬剤は免疫力の低下した患者にも効果が期待でき、治療期間の短縮に繋がる可能性もあることから、殺菌性を標的の優先順位付けの有用な指標の一つと位置づけ、任意の標的に対する殺菌性評価を目的に、評価系の構築を試みた。評価系構築には、モデル微生物であり肺炎の起因菌でもある *E. coli* を用い、N-end rule に基づくタンパク質分解制御株を作製、その株に対してトリプトファンプロモーター (Ptrp) による転写制御が可能となる株の構築を行った。また、標的候補のうち、温度感受性株による論文など、殺菌性に関する情報が少ない 10 遺伝子を評価対象とした。

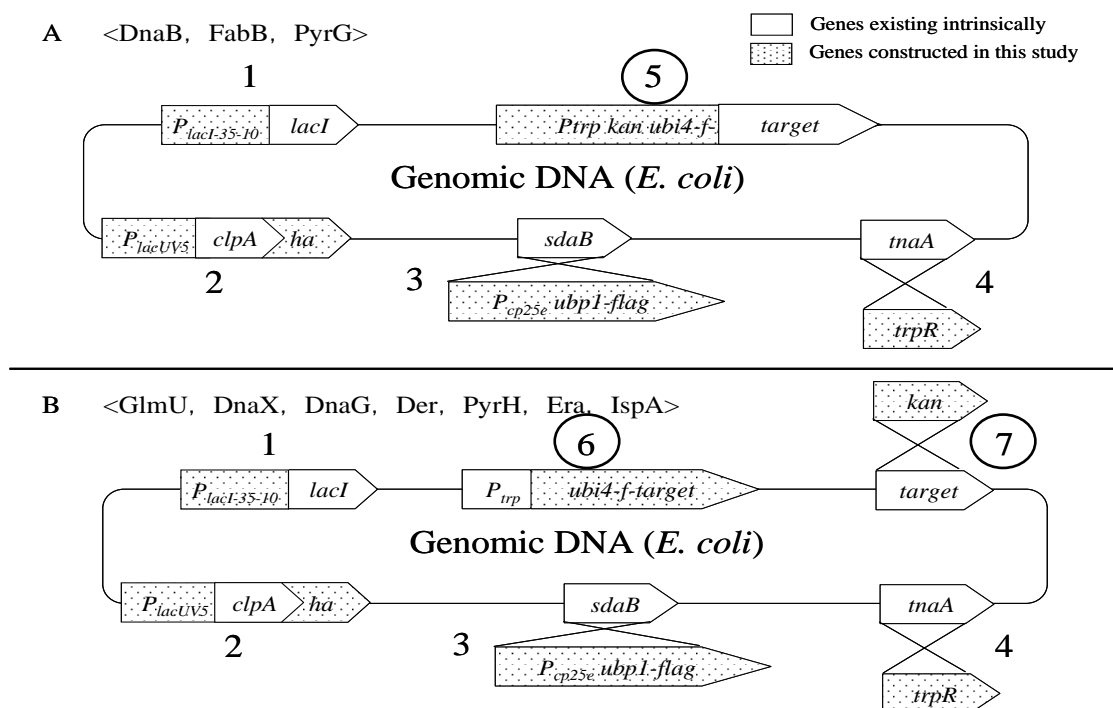
### 第1節 N-end rule に基づいた分解促進系株の構築

本研究で構築した株の全体像を Figure 2 に示す。本研究では、プロテアーゼをコードする *clpA* 遺伝子の転写制御を IPTG 誘導型 lacUV5 プロモーターにより行っている。lacUV5 プロモーターを負に制御する野生型 LacI をコードするプロモーター活性はとても弱いことが知られている<sup>27)</sup>ため、まず *E. coli* K-12 MG1655 株に対して pKO3-lacI-35-10<sup>28)</sup>を導入し、相同組換えにより、*lacI* プロモーターを効率的な LacI の発現が期待される配列にした。なお、本研究内では相同組換え方法の一つとして pKO3 または pKOV を用いているが、これらプ

ラスミドには、クロラムフェニコール (CP) 耐性遺伝子である *cat*、温度感受性 *ori*、Sucrose 存在下で宿主が致死となる *sacB* 遺伝子が存在している。プラスミドの形質転換を CP 添加培地で 30°C または 43°C で行うことでプラスミドを染色体へ挿入し、得られたコロニーを Sucrose 添加培地に継代し挿入したい遺伝子領域以外のプラスミド領域を脱落させたクローンを得た。得られたクローンは、コロニー-PCR、シーケンス解析によりプラスミドが完全に脱落し、目的とする配列に相同組換えがおこっていることを確認した。

続いて pKO3-Placuv5-clpA および pKO3-clpA-HA を用い、*clpA* のプロモーターを LacUV5 プロモーター (IPTG 誘導型)<sup>29)</sup> に、*clpA* の C 末端に HA タグを相同組換えにより導入した。上記により、C 末 HA タグが融合した LacUV5 プロモーター制御 (*lacI* プロモーター改変) 型 *clpA* 発現制御株を構築した。

次に酵母由来ユビキチンプロテアーゼである *ubp1* の相同組換えを行った。組換えには pKO3-Pcp25e-ubp1-FLAG (*sdaB*) を用いた。外来由来の遺伝子を挿入するにあたり、*sdaA* と相同性が高く非必須である *sdaB*<sup>30)</sup> の open reading frame を選択した。*sdaB* をコードする領域に CP25e プロモーター (constitutive 人工プロモーター CP25<sup>31)</sup> を *E. coli* 型に改変) および *ubp1* (C 末端 FLAG タグ) を導入し、第 2 節の転写制御株を親株とした。なお、抗 HA 抗体および抗 FLAG 抗体を用いて ClpA-HA および UBp1-FLAG の本株における発現を確認した (data not shown)。



**Figure 2. Construction of *E. coli* strains with regulatable gene expression systems.**

(A) DnaB, FabB, and PyrG; (B) GlmU, DnaX, DnaG, Der, PyrH, Era, and IspA.

- 1; *lacI* のプロモーターを  $lacI_{35-10}$  プロモーターに置換した。
- 2; *clpA* のプロモーターを *lacUV5* promoter に置換し、*clpA* の3'末端に *ha* 配列を挿入した。
- 3; *sdaB* 領域に CP25e promoter-*S. cerevisiae ubp1-flag* tag を挿入した。
- 4; *tnaA* を *trpR* に置換した。
- 5; 標的遺伝子(*dnaB, fabB, and pyrG*)のプロモーター領域をトリプトファンプロモーター、*kan* (カナマイシン耐性遺伝子)、標的遺伝子の5'末端に *S. cerevisiae ubi4-phenylalanine* となるように置換した。
- 6; トリプトファンプロモーターの下流に *ubi4-phenylalanine*-標的遺伝子(*glmU, dnaX, dnaG, der, pyrH, era, and ispA*)配列が来るように置換した。
- 7; 標的遺伝子(*glmU, dnaX, dnaG, der, pyrH, era, and ispA*) を *kan* で破壊した。1-4 は標的遺伝子に拘わらず共通の操作であり、A と B で異なる操作の番号を円で示した。

## 第2節 トリプトファンプロモーターによる発現制御株の構築

### 第1項 *tnaA* 遺伝子の破壊と *trpR* 遺伝子の導入

殺菌性を評価する対象である標的遺伝子の発現は、トリプトファンプロモーターで行った。すなわ *Trp* 添加により *Trp* が *Trp* リプレッサー (*TrpR*) と結合し、その転写活性が負に制御されるトリプトファンプロモーターにより制御する設計とした。*E. coli* には *Trp* を分解するトリプトファンナーゼである *tnaA* 遺伝子がコードされており、*Trp-TrpR* 複合体形成を阻害する可能性を回避するため、第1節で構築した株に対して、pKOV-*tnaA-trpR* を用いた相同組換えによって *tnaA* 遺伝子を *trpR* 遺伝子に置換した株を構築した。

### 第2項 *DnaB*、*FabB*、*PyrG* 発現制御株の構築

第2節第1項で構築した株に対し、トリプトファンプロモーター下流に選択マーカーとしてカナマイシン (KM) 耐性遺伝子をコードする *kan* 遺伝子および *Ubi4 + F +* 融合タンパク質 (*DnaB*、*FabB*、*PyrG*) をコードする直鎖状 DNA (Table 2 の product No.33, 34, 60) を用いて直接必須遺伝子の組換えを行い Figure 2A に示す株を構築した。直鎖状 DNA の組換えでは、トリプトファンプロモーター領域、*kan* 遺伝子および酵母由来の *Ubi4* と N-end rule で不安定残基として知られる *Phe* を PCR および各 PCR 断片を PCR で一つにするクロスオーバーPCR で直鎖状 DNA を作製した。別途第2節第1項で構築した株に L-rhamnose 添加時にリコンビナーゼを発現させる pKD46r を導入し、L-rhamnose 添加条件下でコンピタントセルを作製した。続いて直鎖状 DNA とコンピタントセルを混合し、エレクトロポレーションにより形質転換し、トリプトファンプロモーターの *TrpR* による転写抑制を解除するために IAA (*TrpR* と結合し、tryptophan の *TrpR* への結合を阻害することで、Tryptophan/*TrpR* 複合体の転写抑制効果を解除する) と組換え株の選択のために KM を含有する培地で培養し、目的とするコロニーを選択、シーケンス解析により相同組換えが変異なく行われていることを確認した。

### 第3項 GlmU、DnaX、DnaG、IspA、Era、PyrH、Der 発現制御株の構築

第2節第2項で構築した株以外は、pKO3-Ptrp-Phe-GlmU、pKO3-Ptrp-Phe-DnaX、pKO3-Ptrp-Phe-DnaG、pKO3-Ptrp-Phe-Der、pKO3-Ptrp-Phe-PyrH、pKO3-Ptrp-Phe-Era、およびpKO3-Ptrp-Phe-IspAを用いて第2節第1項で構築した株に対し、第7節に示した相同組換え法によってトリプトファンプロモーターの下流に(トリプトファンオペロン *trpE* の直前) Ubi4 + Phe + 融合タンパク質 (GlmU、DnaX、DnaG、Der、PyrH、Era、IspA) をコードする遺伝子配列を挿入した。この時点では、標的遺伝子がトリプトファンプロモーター下流および当該遺伝子が従来コードされている領域の2箇所が存在する。そこで従来コードされている遺伝子を破壊するために、*kan* をコードするDNAで被制御遺伝子(従来コードされている遺伝子)を直鎖状DNAによる相同組換えにより欠損させ、Figure 2Bに示す株を構築した。前項のように直接必須遺伝子の組換えができなかった場合(目的とするコロニーが得られない場合)、またはオペロンを形成する遺伝子の場合、オペロン内の他の遺伝子発現に対するトリプトファンプロモーター制御の影響を回避する意味で本方法を用いた。

**Table 2. List of PCR template, primer, and vector for the construction of the regulatable gene expression system.**

PCR product No.	PCR template	Primer		Restriction enzymes	Donor vector	Vector name
		1	2			
1	Ec gDNA	lacI-No	lacI-Ni3	-	-	-
2	Ec gDNA	lacI-Co	lacI-Ci3	-	-	-
3	1 and 2	lacI-No	lacI-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-lacI <sub>35-10</sub>
4	Ec gDNA	clpA-No2	clpA-Ni2	-	-	-
5	Ec gDNA	clpA-Co2	clpA-Ci2	-	-	-
6	4 and 5 and lacUV5	clpA-No2	clpA-Co	NotI/SalI	pKO3	pKO3-P <sub>lacuv5</sub> -clpA
7	Ec gDNA	clpA-No3	clpA-Ni3	-	-	-
8	Ec gDNA	clpA-Co	clpA-Ci3	-	-	-
9	7 and 8	clpA-No3	clpA-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-clpA-HA
10	Ec gDNA	sdaB-No	sdaB-Ni	-	-	-
11	10 and CP25e	sdaB-No	CP25e-Co	-	-	-
12	Sc gDNA	ubp1-No3	ubp1-Co-F	-	-	-
13	Ec gDNA	sdaB-Co	sdaB-Ci	-	-	-
14	12 and 13	sdaB-Co2	ubp1-No3-CP25e	-	-	-
15	11 and 14	sdaB-No2	sdaB-Co2	-	-	-
16	15	sdaB-No	sdaB-Co	BamHI/SmaI	pKO3	pKO3-Pcp25e-ubp1-FLAG(sdaB)
17	Ec gDNA	tnaA-No	tnaA-Ni	-	-	-
18	Ec gDNA	tnaA-Co	tnaA-Ci-L	-	-	-
19	Ec gDNA	trpR5-L	trp3	-	-	-
20	17 and 18 and 19	tnaA-No	tnaA-Co	BamHI/NotI	pKOV	pKOV-tnaA-trpR
21	Ec gDNA	ampC-N-No	ampC-N-Ni	-	-	-
22	Sc gDNA	Ub-No	Ub-R-Co2	-	-	-
23	21 and 22	ampC-N-No	Ub-R-Co2	-	-	-
24	Ec gDNA	ampC-R-No	ampC-orf-Co	-	-	-
25	23 and 24	ampC-N-No	ampC-orf-Co	-	-	-
26	25	Ub-No-RBS-Km	Ub-R-Co2	-	-	-
27	Sc gDNA	ubp1-No3	ubp1-Co	-	pCRII-Blunt TOPO	pCR-ubp1
28	pCR-ubp1	Km-No	Km-Co	-	-	-
29	26 and 28	Km-No	Ub-R-Co2	-	pCRII-Blunt TOPO	pCR-Km-RBS-Ub
30	pCR-Km-RBS-Ub	AntiKmRBSUb-se1	AntiKmRBSUb-anti1	XbaI/EcoRI	pFLAG-CTC	pFLAG-AntiKm-RBS-Ub
31	pFLAG-AntiKm-RBS-Ub	Lig-w-f1	Lig-w-R-r1	-	-	-
32	Strain 1 gDNA	Trp-N-No2	Trp-N-Ni-lig	-	-	-
33	pFLAG-AntiKm-RBS-Ub	DnaB-w-f2	DnaB-w-F-r1	-	-	-
34	Strain 2 gDNA	FabB-w-f1	FabB-w-F-r1	-	-	-
35	pFLAG-AntiKm-RBS-Ub	DnaB-w-f1	DnaB-F-r1	-	-	-
36	Strain 3 gDNA	Ub-orf-No-trp	DnaB-orf-Co-trp	-	-	-

**Table 2. (continued)**

PCR product No.	PCR template	Primer		Restriction enzymes	Donor vector	Vector name
		1	2			
37	Strain 3 gDNA	Trp-C-Co4	Trp-C-Ci-DnaB2	-	-	-
38	32 and 36 and 37	Trp-N-No2	Trp-C-Co4	-	-	-
39	38	Trp-N-No	Trp-C-Co3	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-DnaB
40	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-GlmU	-	-	-
41	Ec gDNA	GlmU-orf-No-Ub	GlmU-orf-Co-trp	-	-	-
42	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-GlmU	-	-	-
43	40 and 41 and 42	Trp-N-No	Trp-C-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-GlmU
44	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-Dnax	-	-	-
45	Ec gDNA	DnaX-orf-No-Ub	DnaX-orf-Co-trp	-	-	-
46	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-DnaX	-	-	-
47	44 and 45 and 46	Trp-N-No	Trp-C-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-DnaX
48	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-DnaG	-	-	-
49	Ec gDNA	DnaG-orf-No-Ub	DnaG-orf-Co-trp	-	-	-
50	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-DnaG	-	-	-
51	48 and 49 and 50	Trp-N-No	Trp-C-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-DnaG
52	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-Der	-	-	-
53	Ec gDNA	Der-orf-No-Ub	Der-orf-Co-trp	-	-	-
54	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-Der	-	-	-
55	52 and 53 and 54	Trp-N-No-NotI	Trp-C-Co-NotI	NotI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-Der
56	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-PyrH	-	-	-
57	Ec gDNA	PyrH-orf-No-Ub	PyrH-orf-Co-trp	-	-	-
58	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-PyrH	-	-	-
59	56 and 57 and 58	Trp-N-No	Trp-C-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-PyrH
60	Strain No.3 gDNA	PyrG-w-f2	PyrG-w-F-r1	-	-	-
61	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-Era	-	-	-
62	Ec gDNA	Era-orf-No-ub	Era-orf-Co-trp	-	-	-
63	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-Era	-	-	-
64	61 and 62 and 63	Trp-N-No-SmaI	Trp-C-Co	SmaI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-Era
65	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-N-No2	Ub-F-Co-IspA	-	-	-
66	Ec gDNA	IspA-orf-No-Ub	IspA-orf-Co-trp	-	-	-
67	pKO3-Ptrp-F-DnaB	Trp-C-Co2	Trp-C-Ci-IspA	-	-	-
68	65 and 66 and 67	Trp-N-No	Trp-C-Co	BamHI/SalI	pKO3	pKO3-Ptrp-F-IspA

-: 該当なし

Restriction enzymes: PCR products と donor vector を処理するのに用いた制限酵素

Ec: *Escherichia coli*

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

gDNA: genomic DNA

Strain 1: Recombinant strain using PCR product #31 from *E. coli* with PlacI-35-10, PlacUV5-clpA-ha, and sdaB::Pcp25e-ubp1-flag

Strain 2: *E. coli* strain with regulatable DnaB expression

Strain 3: Recombinant strain using PCR product #35 from *E. coli* with PlacI-35-10, PlacUV5-clpA-ha, and sdaB::Pcp25e-ubp1-flag



**Table 3. Oligonucleotide sequences of the primers listed in Table 2 (in alphabetical order)**

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
ampC-N-Ni	CGGTCAAAGTCTTGACGAAAATCTGCATAGGGTCTGGTTCCATACAAAAC
ampC-N-No	AAGGAAAAAGCGGCCGCGCAACATGACGACTAAACGTAAACC
ampC-orf-Co	GGATCCGCGCCAGTCCAGCATTTCAG
ampC-R-No	TTGTGCTAAGGCTAAGAGGTGGTCGATTCAAAACGACGCTCTGCG
AntiKmRBSUB-anti1	GCTCTAGAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
AntiKmRBSUB-se1	GGAATTCACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
clpA-Ci2	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGCTCAATCAAGAACTGGAECTCA
clpA-Ci3	CCCATACGACGTCCAGACTACGCTTAATCTGATTGTTAGGTAGGTTGGTCAA
clpA-Co	CGCACGCATGTCGACGCTAGAGTTAGAAAACGGTCAC
clpA-Co2	CGCACGCATGTCGACATGCTGTTAGTGTCTGCTCC
clpA-Ni2	AGCCTGGGGTGCCATAGAGTGAGCTAATCATTGACTAATATCACTTTATACATAGATGGCG
clpA-Ni3	CGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAATGCGCTGCTTCCGCC
clpA-No2	AAGGAAAAAGCGGCCGCGATTGGTTTTTCACCGTTGGC
clpA-No3	CGGGATCCCATTGAGGCGCTGACTGAAG
CP25e-Co	GCTTCAATAAACAATAATCCATGAGGAATACCTCCTTAAAGTTACCCTAA
Der-orf-Co-trp	GTGGTTTTTGTGTTTGCATTTATTTATTTTTCTTGATGTGCTTCATCAGACG
Der-orf-No-Ub	GCTAAGAGGTGGTTTTCGTTGCTGATGATTTATAAAAATGAGGC
DnaB-orf-Co-trp	GTTGCATTGTTTCTTATTCGTCGTCGACTGCGG
DnaB-w-f1	TCATATGATAAAGTTTCGACCCATTCTTATCTCGGTAACCTCCATTCACTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
DnaB-w-f2	GGAGTGAACCTACGGCTTGAAGTACTTCCGGGCCACCGTGTGTGAACTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAG TACGCAAGTTCACGTA AAAAGGGTATCGACAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
DnaB-w-F-r1	TCGCGTTCGCGGGGTTACGCTGCTGTTGTTGAAGGGTTATTTCTGCAAAAACCACTCTTAGCCTTAGCAC
DnaG-orf-Co-trp	GTGTTTGCATTCACTTTTTTCGCCAGCTCCTG
DnaG-orf-No-Ub	GGCTAAGAGGTGGTTTTGCTGGACGAATCCACG
DnaX-orf-Co-trp	GTGTTTGCATTCAAATGGGGCGGATACTTTC
DnaX-orf-No-Ub	GCTAAGAGGTGGTTTTAGTTATCAGGCTTAGCCCGAAAATG
Era-orf-Co-trp	GTGTTTGCATTTAAAGATCGTCAACGTAACCGAG
Era-orf-No-Ub	GGCTAAGAGGTGGTTTTAGCATCGATAAAAAGTTACTGCGG
FabB-w-f1	GCGATGTGTGTAAGGCTGCGCAAAATTCCTATTAAATGGCTGATCGGACCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAAC
FabB-w-F-r1	TTATTACCGATGCTGGAAACAATGCCAGGCCAGTAATCACTGCACGTTAAAACCACTCTTAGCCTTAGC
GlmU-orf-Co-trp	GTGGTTTTTGTGTTTGCATTCATTTTTCTTTACCGGACGAC
GlmU-orf-No-Ub	GGCTAAGAGGTGGTTTTTGAATAATGCTATGAGCGTAGTGATCC
IspA-orf-Co-trp	GTGGTTTTTGTGTTTGCATTTATTTATACGCTGGATGATGTAGTCCG
IspA-orf-No-Ub	GCTAAGAGGTGGTTTTGACTTTCCGCAGCAACTC
Km-Co	CTGCATGGGTACCTTTCTCCTCTTTAATCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGC
Km-No	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC

**Table 3. (continued)**

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
lacI-Ci3	GACAAACCTTTCGCGGTATGGTATAATAGCGCCCGGAAGAGAGTC
lacI-Co	CGCACGCATGTCGACGTAATGGCGCGCATTGCG
lacI-Ni3	ATTATACCATACCGCGAAAGGTTTGTCAACATTCGATGGTGTCAACGTAAATGC
lacI-No	CGCGGATCCTATGCAGAACAATGAGCAGACGG
Lig-w-f1	TCCTCTCGAACCCCGCTTGTCTGGGGTTTTAGCATTGATGGTGCATATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
Lig-w-R-r1	TGATGGCGAAGCGTCGTTCCGAGTTCGTGAGTTGTTGTTTCGATTGATTCTCGACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
PyrG-w-f2	TTTAAATGACAAGCGCTTGATTTGCGTCAAAAACATTTACCCAAAGGGGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAAC
PyrG-w-F-r1	TTACCCAGAGAGGATACGACCCCGCGGTACAAAAATATAGTTCGTTGTAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
PyrH-orf-Co-trp	TTGTGTTTGCAATTTATCCGTGATTAAGTCCCTTCTTTTTTC
PyrH-orf-No-Ub	GGCTAAGAGGTGGTTTTGCTACCAATGCAAAAACCCGTC
sdaB-Ci	CGACTACAAGGACGATGACGACAAGTAATCGCTCTCCAAAGGCCCTC
sdaB-Co	CGCGGATCCGTCGATATGCAAAATCGGTTTGTAAGC
sdaB-Co2	GTCGATATGCAAAATCGGTTTGTAAGC
sdaB-Ni	CATGTCAAGAATAAACTGCCAAAGCATAATGGGTTAGCTGAACAGAGAGTAGAAGATTGC
sdaB-No	TCCCCGGGGTGAGCAGATGATCGTTAAAGCG
sdaB-No2	GTGAGCAGATGATCGTTAAAGCG
tnaA-Ci-L	GTTGGGCCATTTATTTAATTACAGTGATCCCTGTG
tnaA-Co	AAGGAAAAAAGCGGCCCGCACAGAGCATGGGCTTTGACAC
tnaA-Ni	CTGAAAAGCGATTGACGAAAAGTATTGCGTCACTTCACC
tnaA-No	CGCGGATCCAGGCTGGGAATATTGCCGTG
trp3	GACGCAATACTTTCGTCAATCGCTTTTCAGCAACACCTC
Trp-C-Ci-Der	CATCAAGAAAAATAAATAAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Ci-DnaB2	GCAGTACGACGACGAATAAGAAACAATGCAACGCAACGG
Trp-C-Ci-DnaG	GAGCTGGCGAAAAAGTGAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Ci-DnaX	GTATCCGCCCCATTTGAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Ci-Era	GGTTACGTTGACGATCTTTAAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Ci-GlmU	GTAAGAAAAAAGTGAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Ci-IspA	CCAGCGTAATAAATAAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Ci-PyrH	GGGACTTTAATCACGGAATAAATGCAAAACACAAAAACCGACTCTC
Trp-C-Co	CGCACGCATGTCGACCATACTTGAGCGAGCTTTCGG
Trp-C-Co2	CATACTTGAGCGAGCTTTCGG
Trp-C-Co3	CGCACGCATGTCGACGATGTTGTTCAATACGAGCGCG
Trp-C-Co4	GATGTTGTTCAATACGAGCGCG
Trp-C-Co-NotI	ATAGTTTAGCGGCCCATACTTGAGCGAGCTTTCGG
Trp-N-Ni-lig	GTCTTGACGAAAAATCTGCATTGTTATTCTTAATTTGTTCAAAAAAAGCCCG

**Table 3. (continued)**

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
Trp-N-No	CGGGATCCCCATTTAGCACTAAGATTGTACCGCC
Trp-N-No2	CCATTTAGCACTAAGATTGTACCGCC
Trp-N-No-NotI	ATAAGAATGCGGCCGCCCATTTAGCACTAAGATTGTACCGCC
Trp-N-No-SmaI	TCCCCGGGCCATTTAGCACTAAGATTGTACCGCC
trpR5-L	CACTGTAATTAATAAATAAATGGCCCAACAATCACCTATTTC
Ub-F-Co-Der	CATCAGACAACGAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-F-Co-DnaG	CGTCCAGCAAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-F-Co-Dnax	GCTAAGACCTGATAACTAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-F-Co-Era	CTTTTATCGATGCTAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-F-Co-GlmU	GCTCATAGCATTATTCAAAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-F-Co-IspA	CTGCGGAAAGTCAAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-F-Co-PyrH	GCATTGGTAGCAAAAACCACCTCTTAGCCTTAGCAC
Ub-No	ATGCAGATTTTCGTCAAGACTTTGAC
Ub-No-RBS-Km	CTGATTAAGAGGAGAAAAGGTACCCATGCAGATTTTCGTCAAGACTTTGAC
Ub-orf-No-trp	GAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAGATTTTCGTCAAGACTTTGAC
ubp1-Co	GTTTACATCTTTACCAGAAATATCTCTATGGTC
ubp1-Co-F	GTTACTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCGTTTACATCTTTACCAGAAATATCTCTATGGTC
ubp1-No3	ATGGATTTGTTTATTGAAAGCAAGATAAACAGT
ubp1-No3-CP25e	GGAGGTATTCCTCATGGATTTGTTTATTGAAAGCAAGATAAACAGT
Ub-R-Co2	TCGACCACCTCTTAGCCTTAGCAC

### 第3節 コロニー形成能の評価

第2節で構築した株を用いてコロニー形成能を評価した。いずれの株も標的遺伝子の発現が期待される 25  $\mu$ g/mL IAA 含有 LB agar では、およそ 1000 CFU/plate コロニー形成が認められる条件で、転写が抑制される 1 mg/mL Trp 含有 LB agar または転写抑制およびタンパク質分解促進条件と考えられる 1 mg/mL Trp+10 mM IPTG 含有 LB agar においてコロニー形成が認められず、本系でコロニー形成は制御可能であると考えられた (Table 4)。Trp 含有 LB agar のみでもコロニー形成阻害が認められたことから、いずれの株も転写制御のみでコロニー形成阻害は可能であると考えられた。なお、LB agar では DnaB 制御株で IAA 含有 LB agar 培地と同程度のコロニー形成が確認され (その他の株についてはコロニー形成なし)、DnaB 制御株については IAA による転写活性化が必要ないと思われた。また、DnaB 制御株を用いて 10 mM IPTG 含有 LB agar でコロニー形成能を評価したところ、25  $\mu$ g/mL IAA 含有 LB agar に比べてコロニーのサイズは小さいがコロニー形成が認められたことからタンパク質分解促進のみではコロニー形成は阻害できないと考えられた (data not shown)。*tnaA* の *trpR* への置換を行わない株では Trp 含有培地におけるコロニー形成阻害は認められないことから *tnaA* の *trpR* への置換は必須のステップであると考えられた (data not shown)。さらに GlnU、DnaX、DnaG、IspA、Era、PyrH、Der 発現制御株の構築の過程でオリジナルの遺伝子を *kan* で破壊する前にコロニー形成能の評価を行ったところいずれもコロニー形成が確認されたことから今回構築した遺伝子制御システムは標的遺伝子特異的であると考えられた (data not shown)。

**Table 4. Colony-forming ability in each medium**

	IAA25LA	LA	Trp1LA	Trp1IPTG10LA
DnaB	+	+	-	-
GlmU	+	-	-	-
DnaX	+	-	-	-
FabB	+	-	-	-
PyrG	+	-	-	-
DnaG	+	-	-	-
Der	+	-	-	-
PyrH	+	-	-	-
Era	+	-	-	-
IspA	+	-	-	-

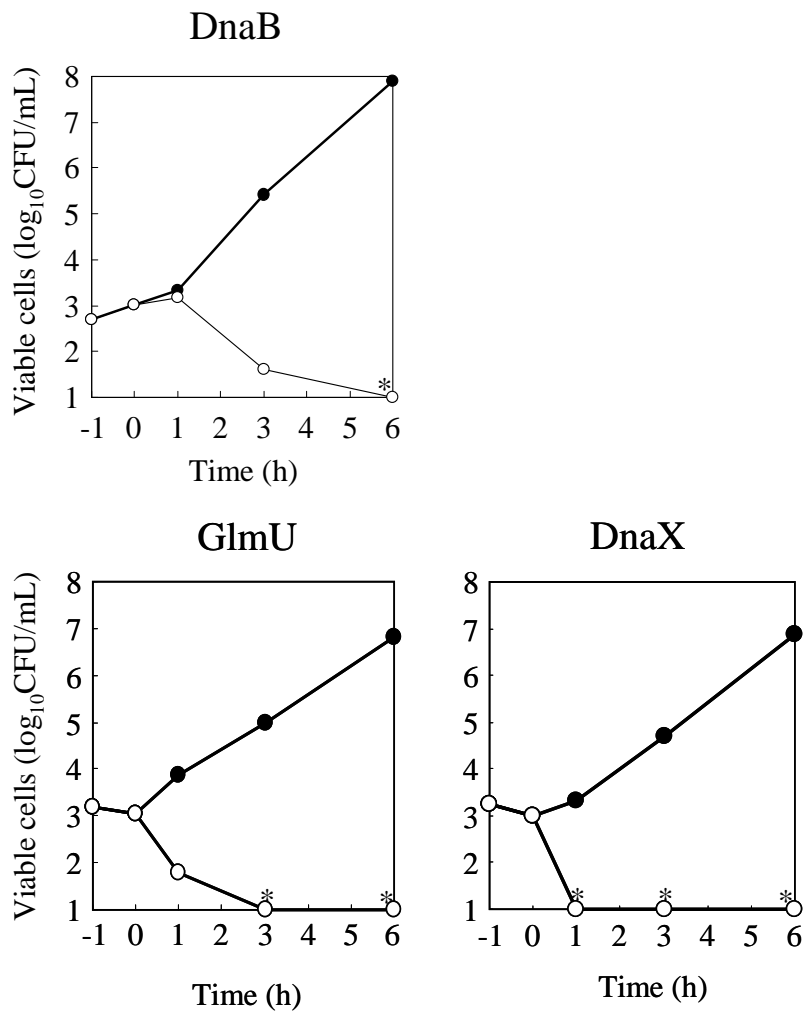
IAA25LA: 25 mg/mL IAA 含有 LB 寒天培地、LA: LB 寒天培地、Trp1LA: 1 mg/mL tryptophan 含有 LB 寒天培地、Trp1IPTG10LA: LB agar 1 mg/mL tryptophan および 10 mM IPTG 含有 LB 寒天培地、+: 約 1000 CFU/plate のコロニーを検出、-: コロニー未検出

## 第4節 短時間殺菌性評価

### 第1項 殺菌的な標的 (DnaB、GlmU、DnaX) の結果

DnaB、GlmU、DnaX の短時間殺菌性評価結果を Figure 3 に示す。本研究では抗菌剤の一般的な殺菌性評価手法である生菌数（コロニー数）測定による評価を行った。抗菌剤の殺菌性評価では通常前培養開始後、薬剤添加時を 0 時間とするが、本研究では IPTG および Trp を添加した時点を 0 時間とし、0 時間の生菌数より 6 時間以内に生菌数が 1/100 以下 ( $2 \log_{10}$ CFU/mL 以上の生菌数減少) となった場合、殺菌性があると判断した。殺菌性評価時には陽性コントロールとして 0 時間目に IAA を添加する群を設け、発現を抑制しない場合は、増殖可能であることを確認している。また、第 2 節第 1 項で構築した株に対し、同様の評価を行った場合、IAA 添加群、IPTG および Trp 添加群ともに増殖に差がないことを確認している (data not shown)。

短時間殺菌性評価により DnaB、GlmU、DnaX はいずれも殺菌的な標的であることが示唆された。菌種、評価方法が異なることから直接比較することは出来ないが、*E. coli* DnaB に相当する *S. aureus* DnaC の温度感受性変異株を用いた殺菌性評価<sup>32)</sup>では殺菌的な傾向が認められていることから、本結果は他の報告と矛盾しない結果であった。なお、生菌数をカウントするために各時点で得られたサンプルを 10 倍段階希釈し、24 時間以上培養しているが、培養時には IAA および KM 添加培地で培養することで、培養期間中に発現低下を理由に菌が死滅することを回避するとともに評価対象となる株のみのコロニー数を測定している。



**Figure 3. Time killing curves in *E. coli* strains with regulatable DnaB, GlmU and DnaX under the treatment of Trp and IPTG.**

発現抑制下で、6時間以内にコロニーは検出限界値以下となり殺菌的であることが明らかとなった。Closed circle; 25 mg/mL IAA 添加条件（発現抑制を行わない陽性対照）、Open circle;

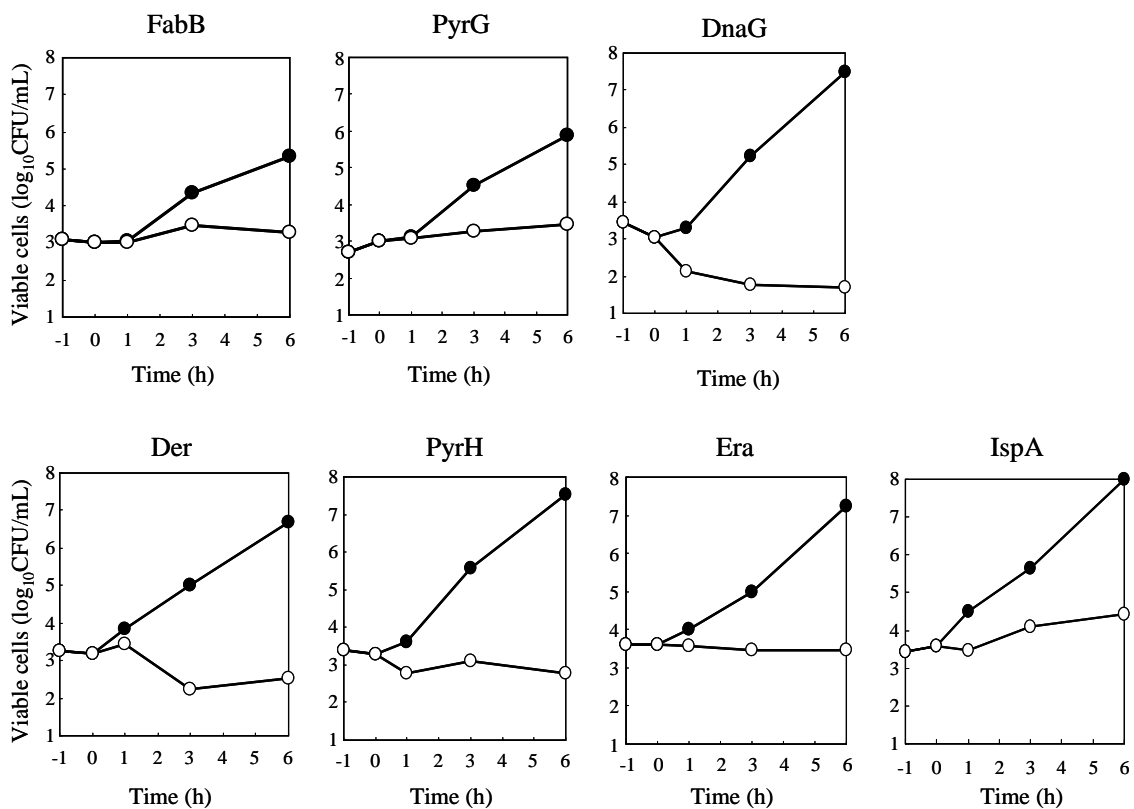
1 mg/mL Trp および 10 mM IPTG 添加条件（発現抑制条件）

\*: 検出限界値以下

## 第2項 その他の標的について

FabB、PyrG、DnaG、Der、PyrH、Era、IspA の短時間殺菌性評価結果を Figure 4 に示す。いずれの発現制御株も6時間以内に生菌数は、1/100以下とならなかった。FabBについては、その阻害剤である cerulenin を用いた殺菌性評価で静菌的であるとの結果が報告されている<sup>33)</sup>。なお、今回私は TOPA (DNA topoisomerase I omega subunit) についても発現制御株の構築を試みたが成功しなかった。相補的な変異が DNA topoisomerase では起きることが報告<sup>34)</sup>されておりそれが原因の一つであった可能性があると考えている。





**Figure 4. Time killing curves in *E. coli* strains with regulatable FabB, PyrG, DnaG, Der, PyrH, Era and IspA under the treatment of Trp and IPTG.**

これら株では、発現抑制時においても 1/100 以下の生菌数減少効果は認められなかった。  
 Closed circle; 25 mg/mL IAA 添加条件 (発現抑制を行わない陽性対照)、Open circle; 1 mg/mL Trp および 10 mM IPTG 添加条件 (発現抑制条件)

## 第5節 考察

以上の結果より DnaB、GlmU、DnaX は殺菌性が期待される点で、有望な標的であると考  
えられ、その他の標的は殺菌性という点では優位性が認められない遺伝子と考えられた。

DnaG は、殺菌性評価の中で基準を上回る生菌数の減少効果を示さなかったが、6 時間目  
で生菌数の減少傾向を認めたことから、24 時間目の生菌数を測定したところ、検出限界値  
以下（コロニーを検出しない）であったことから殺菌的な資質を有するものであると考  
えている。なお、その他の静菌的な標的は、24 時間目もコロニーが検出され死滅するこ  
とはなかった（data not shown）。これまで抗菌剤では、キノロン系（遺伝子複製阻害）、βラ  
クタム系（細胞壁合成阻害）などで殺菌的な傾向が認められており、マクロライド系（タン  
パク質合成阻害）では静菌的であることが一般に知られているが、本研究でも DnaB、DnaX  
および基準には到達しなかったものの DnaG を含めて DNA 複製にかかわる遺伝子、そして  
GlmU のように細胞壁合成にかかわる遺伝子で殺菌的な傾向を認めたことは興味深い。一方  
タンパク質合成に関与する Era は、今回静菌的であった。今後更に評価する標的遺伝子数  
が増えれば、このような殺菌性分類の概念を確立できるものとする。

これまで antisense RNA による遺伝子発現制御の報告例があるが、オペロンを形成する場  
合は、特異的な遺伝子の制御が出来ないこと、mRNA に対するアフィニティーが弱く  
antisense RNA による十分な発現制御が期待できない場合は評価が不可能であるといった課  
題があった。本研究では、単に発現を正にのみ制御するのではなく Trp の添加により負に制  
御するプロモーターを用いている。また、厳密な転写制御を目的に *tnaA* を欠損（*trpR* に置  
換）し、標的遺伝子のみの制御を目的として、オペロンを形成する場合、トリプトファン  
プロモーターの下流に標的遺伝子を相同組換えし、従来存在する遺伝子は破壊することで  
オペロン構造を有する遺伝子も特異的に評価することが可能な株を構築した。実際、本研  
究に先駆け標的遺伝子に対してトリプトファンプロモーターを用いず LacUV5 プロモータ  
ーで発現制御を行うよう株を構築したが、目的とする発現制御は不可能であった。

温度感受性変異株の場合も、変異導入剤等で温度感受性を示す株を選抜する機会が多いが、温度感受性が目的とする遺伝子のみであることを証明するために、野生型遺伝子をコードするプラスミドを当該温度感受性株に導入し温度感受性を回避する相補実験を行う必要がある。さらに野生株（親株）に目的遺伝子の変異のみを加えた相同組換えを行い、温度感受性を示すことを証明する必要がある。また、すべての遺伝子に対する温度感受性変異株を取得することは困難であると考えられる。さらに、温度感受性変異株が得られたとしても変異により完全にそのタンパク質の機能が失活するかは不明であり、慎重な評価が求められる。

殺菌性評価として、これまでの antisense RNA や温度感受性株を用いた実験結果の多くは、抗菌剤の殺菌性評価指標で用いられる生菌数測定法ではなく、吸光度測定により簡易的に評価しているものが多く、濁度と生菌数は完全には相関しないことから生死を直接評価できないという課題があった。今回は、その点でも正確に評価することが可能な系である。網羅的な解析を行う場合、Figure 2 の 1-4 まで構築した株を使用することで、Figure 2 の 5 または 6, 7 の操作をするだけで目的とする株が構築可能であることから数十遺伝子については、一定の期間で解析が可能であると考ええる。また、たとえば生育に必須な遺伝子すべてに対して網羅的な解析を行う場合は、温度感受性変異株を取得した後に取得が困難であった遺伝子に対して本系を適用することで一定規模の評価も可能であると考ええる。

以上、今回構築した系は、N-end rule と Ubi4 が *E. coli* 内で発現した ubp1 により切断されるという知見を組合せ *E. coli* を用いてトリプトファンプロモーターによる転写制御およびラクトースプロモーターによる分解制御の両面から標的タンパク質を制御することが可能となった初めての系であり、antisense RNA による制御が不可能または温度感受性株の取得が困難な遺伝子も含めて原則あらゆる標的遺伝子に適用可能と考えられる点でも有望な評価系であると考ええる。

## 第 6 節 実験方法詳細

### 1) 菌株、および染色体 DNA

遺伝子発現制御系の親株として、*E. coli* K-12 MG1655 株 (ATCC 47076、American Type Culture Collection) を用いた。遺伝子のクローニングには *E. coli* DH5  $\alpha$  株 (competent high *E. coli* DH5  $\alpha$ 、東洋紡績株式会社) を用いた。プラスミドについては、pKO3<sup>35)</sup> および pKOV<sup>36)</sup> [いずれも *cat*、*repA* (*ts*)、*sacB*] は Harvard Medical School より、pKD4 および pKD13<sup>37)</sup> (いずれも *kan*) は Yale University より入手した。pKD46<sup>37)</sup> は *amp*、Red recombinase :  $\gamma$ 、 $\beta$ 、*exo* をコードしているものであるが、本研究では pKD46 の BAD プロモーターを rhamnose promoter に置換した pKD46r を作製して用いた。pFLAG-CTC (*amp*) は Sigma-Aldrich Co. より購入した。クローニングベクターとして pCRII-Blunt TOPO (*kan*、Zero Blunt TOPO PCR cloning kit) を用いた。*S. cerevisiae* S288C の染色体 DNA は Promega Corporation より購入した。

菌株の培養には LB broth (Becton, Dickinson and Company) あるいは LB agar (Becton, Dickinson and Company) を用い、保有するプラスミドの耐性マーカーに応じ、以下の濃度の抗生物質を必要時に添加した : 100  $\mu$ g/mL CBPC (Sigma-Aldrich Co.、耐性マーカー : *amp*)、20  $\mu$ g/mL CP (Sigma-Aldrich Co.、耐性マーカー : *cat*)、50  $\mu$ g/mL KM (Sigma-Aldrich Co.、耐性マーカー : *kan*)。なお、ゲノム上遺伝子の相同的組換え体の選抜時に添加する抗生物質の濃度については、後述の各操作のところに記載する。

### 2) DNA 調製

*E. coli* 染色体 DNA の抽出には DNeasy Tissue Kit (Qiagen K.K.) を用いた。プラスミド DNA の抽出には QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen K.K.) を用いた。PCR 産物およびプラスミドの制限酵素反応液の精製には QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen K.K.) を用いた。PCR 産物の制限酵素反応液の精製には MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen K.K.) を用いた。

### 3) エレクトロポレーションによる形質転換

#### 3-1) エレクトロコンピタント *E. coli* 株の作製

形質転換の宿主となる *E. coli* 株を LB agar に塗抹し、37°C で培養した。生育した 1 コロニーを LB broth (1–5 mL) に接種し、37°C で振盪培養した (前培養)。LB broth (100 mL) に 1/200 量の前培養菌液を接種し、OD<sub>600</sub> がおよそ 0.5 に到達するまで 37°C で振盪培養した (本培養)。なお、pKD46r 保有株を使用した場合には、100 μg/mL CBPC 含有 LB broth で前培養し、本培養時には 100 μg/mL CBPC および 100 mM L-rhamnose (和光純薬工業株式会社) 含有 LB broth に接種し、30°C で振盪培養した。培養後の菌液は氷中で 10 分間静置後、2,440 x g、15 分、4°C で遠心して得られた沈殿を、遠心前の菌液量と等量の氷冷滅菌蒸留水に懸濁した。再度遠心および懸濁操作を実施した後さらに遠心し、得られた沈殿を遠心前の菌液量の 0.3 倍量の氷冷 10% glycerol (和光純薬工業株式会社) に懸濁した。さらにこれを遠心して得られた沈殿を、沈殿とほぼ等量の氷冷 15% glycerol に懸濁し (培養液と比べおよそ 100 倍濃縮)、これをエレクトロコンピテントセルとした。必要に応じエタノール-ドライアイスバスにて急冷後、-80°C に設定した超低温冷凍庫で使用時まで保管した。

#### 3-2) 形質転換

導入するプラスミドあるいは直鎖状 DNA をエレクトロコンピテントセルと混和し、氷冷したキュベット (0.1 cm、Bio-Rad Laboratories, Inc.) に添加した。このキュベットをエレクトロポレーション装置 (Gene pulser、Bio-Rad Laboratories, Inc.) に設置し、1.8 kV、25 μF、200 Ω の電圧を加えた後、1 mL の SOC medium (東洋紡績株式会社) を速やかにキュベットに添加して菌液を回収、30°C で 1 時間培養し、目的に応じ各選択試薬含有 LB agar 培地に培養液を塗抹し 30°C、37°C、43°C のいずれかで一晩静置培養した。

#### 4) PCR の鋳型 (CP25e と LacUV5) の調製

##### CP25e

(5'-CCCATTATGCTTTGGCAGTTTATTCTTGACATGTAGTGAGGGGGCTGGTATAATCACAT  
AGTACTGTTGGGTCTAGATTAGGGTAACTTTAAGGAGGTATTCCTC-3') およびその相補鎖の配列からなる合成 DNA (いずれも 200 nM) を等量 (50  $\mu$ L ずつ) 混和、95°C で 5 分加熱し、室温まで冷却したものを PCR の鋳型とした。

##### LacUV5

(5'-CTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTG  
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT-3') およびその相補鎖の配列からなる合成 DNA (いずれも 200 nM) を等量 (50  $\mu$ L ずつ) 混和、70°C で 10 分加熱し、室温まで冷却したものを PCR の鋳型とした。

#### 5) 組換え用 (pKO3、pKOV)、PCR 鋳型用プラスミドの構築

Table 2 (配列は Table 3) に示すプライマーおよびテンプレートを含む反応液 (50  $\mu$ L) に対し、AccuPrime Pfx DNA Polymerase、Platinum Pfx DNA Polymerase (いずれも Life Technologies Japan Ltd.)、あるいは Pyrobest DNA polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて PCR または crossover PCR<sup>35)</sup>を行った。Table 2 の restriction enzyme 欄に制限酵素名が記された PCR 産物については、表記の制限酵素反応を行い、donor vector については、同じ制限酵素処理を行った後、alkaline phosphatase (calf intestine、タカラバイオ株式会社) を用いて脱リン酸化反応を行った。その後、この vector と制限酵素処理 PCR 産物とを混和し、DNA Ligation Kit Ver.2 (タカラバイオ株式会社) を用いてライゲーション後、*E. coli* DH5  $\alpha$  に形質転換した。PCR、制限酵素反応、脱リン酸化反応、ライゲーションおよび *E. coli* DH5  $\alpha$  への形質転換はいずれも添付のプロトコールに従い実施した。Colony-direct PCR でインサートの挿入が確認されたコロニーからプラスミドを抽出し、シーケンス解析を実施した。

各データは、ATGC (Genetyx Corp.) を用いてアライメント解析し、染色体 DNA から増幅した領域については *E. coli* 既知配列 (GenBank accession number NC\_000913) または *S. cerevisiae* 既知配列 (*ubi4* は GenBank accession number X05731 の 768-995 base 部分、*ubp1* は同 Z74170) と 100%一致することを確認した。また、pKO3-lacI-35-10 では *lacI* のプロモーター部分が TGGCGCAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGATAGCG から目的配列である TGTTGACAAACCTTTTCGCGGTATGGTATAATAGCG になっていることを確認した。その他 CP25e、LacUV5 は実験方法 4) に示す配列と、制御タンパク質 N 末端に付加したフェニルアラニン は TTT であることを、pCRII-Blunt TOPO 由来の *kan* 配列はメーカーホームページに記載の配列と 100%一致することを確認し、Table 2 の vector name 欄に記載の各プラスミドを構築した。

#### 6) pKO3 または pKOV を用いたゲノム上遺伝子の相同的組換え

pKO3 または pKOV を用いた *E. coli* ゲノム上遺伝子の相同的組換え (*cat* または温度感受性 *ori* を利用した染色体へのプラスミド導入および sucrose 存在下で致死となる *sacB* 遺伝子を利用した導入プラスミドの脱落) は既報の方法<sup>35)</sup>を一部改変し、下記の通り実施した。pKO3 または pKOV 由来のプラスミドを目的の菌株へエレクトロポレーションにより形質転換し、20  $\mu$ g/mL CP 含有 LB agar に塗抹し、30°C あるいは 43°C で培養した。43°C で培養したプレートよりコロニーが得られた場合はそのコロニーを、得られなかった場合は 30°C で培養したプレートより得られたコロニーを CP 含有 LB agar に塗抹し、43°C で培養した。生育したコロニーを 3 個ピックアップし、それぞれ 1 mL の LB broth に接種した。30°C で培養後、培養液を 1 つにまとめ、その一部 (100  $\mu$ L) を 10% (w/v) sucrose (和光純薬工業株式会社) 含有 LB agar に塗抹し、37°C で培養した。得られたコロニーを生理食塩水に懸濁して CP 含有 LB agar および sucrose 含有 LB agar に接種し、20  $\mu$ g/mL CP 含有 LB agar に生育せず、かつ sucrose 含有 LB agar に生育したコロニーを、pKO3 または pKOV が脱落した

株として選抜した。得られた組換え体より染色体 DNA を抽出し、シーケンス解析を行い導入領域に変異が無いことを確認した。

#### 7) 直鎖状 DNA を用いた遺伝子の組換え

ゲノム上のオリジナルな被制御遺伝子の欠損のための直鎖状 DNA の組換えは既報の方法<sup>35)</sup>の一部を改変し実施した。すなわち、pKD4 あるいは pKD13 由来の *kan* を含む PCR 産物を KD46r 含有 *E. coli* 株に形質転換し、KM (5 または 25  $\mu$ g/mL) および 25  $\mu$ g/ml IAA 含有 LB agar で生育したコロニーを純培養し、colony-direct PCR で欠損の有無を確認した。なお、遺伝子欠損以外の目的での直鎖状 DNA を用いた組換えでは、組換え体の選抜に 25  $\mu$ g/mL KM 含有 LB agar を用いた。

#### 8) コロニー形成能の評価

5  $\mu$ g/mL KM+25  $\mu$ g/mL IAA 含有 LB agar 上に生育したコロニーを生理食塩水に懸濁し、生理食塩水で 10 倍段階希釈液を調製し、各希釈菌液を 25  $\mu$ g/mL IAA 含有 LB agar、LB agar、1 mg/mL Trp 含有 LB agar、1 mg/mL Trp+10 mM IPTG 含有 LB agar に 100  $\mu$ L/plate 塗抹、37°C で 24 時間以上静置培養した。培地上に生育したコロニーを確認し、およそ 1000 CFU/plate 塗末したプレートにおけるコロニー形成の有無によりコロニー形成能を判定した。

#### 9) 短時間殺菌性評価

5  $\mu$ g/mL KM+25  $\mu$ g/mL IAA 含有 LB agar 上に生育したコロニーを生理食塩水に懸濁し、OD<sub>600</sub>=0.08-0.10 に調製した。この菌液を LB で 10<sup>4</sup> 倍希釈し、37°C、120 rpm で 2 時間振盪培養後、25  $\mu$ g/mL IAA または 1 mg/mL Trp+10 mM IPTG を添加した。添加時を 0 として、-1、0、1、3、6 時間に培養液 100  $\mu$ L を採取し、滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈系列を作製し、培養液原液および各希釈液の 100  $\mu$ L を 5  $\mu$ g/mL KM+25  $\mu$ g/mL IAA 含有 LB



agar に塗沫して 37°C で 24 時間以上静置培養し、1-300 コロニー/プレートのコロニーが得られた最小希釈倍率の平板生菌数をカウントし、培養液中の生菌数を算出した。培養液原液のコロニー数が 0 個の場合は、検出限界値 [10 CFU/mL] を生菌数とした。

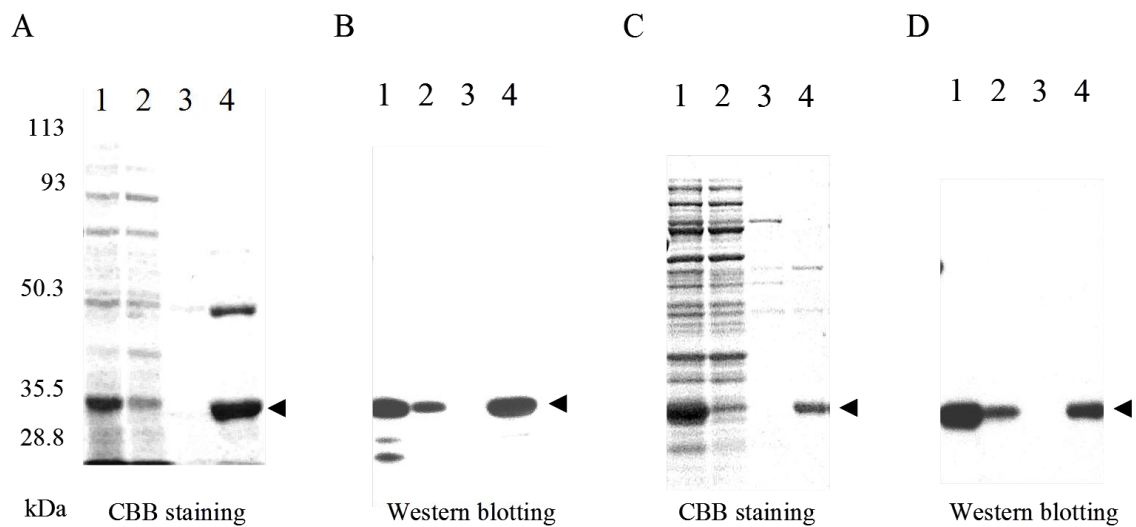
## 第2章 PyrH 阻害剤の探索

### 序

第1章で評価した標的のうちのひとつ、PyrH は細胞内に存在し、微生物の主要な代謝経路であるピリミジン生合成経路において UMP と ATP からリン酸化反応により UDP と ADP を生成する UMP キナーゼであり、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* で生育に必須であることが報告されている。本遺伝子は、第1章の殺菌性評価で静菌的であったものの、第一三共株式会社内で実施された遺伝子解析により、ヒトで保存された相同遺伝子はなく、新規抗菌剤の標的候補として有望と考えた。そこで PyrH 阻害剤の探索を目的に *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来の PyrH を用いて酵素アッセイ系を構築し、*S. pneumoniae* PyrH 阻害活性を指標に 1536 well プレートを用いた Cell-free HTS を実施した。

### 第1節 *S. pneumoniae* および *H. influenzae* PyrH の精製

呼吸器感染症の主要な起炎菌であることが知られる *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来 PyrH を用いた酵素アッセイ系構築に必要な PyrH を取得するため、IPTG 添加で発現が誘導されることが期待される T7 プロモーターを有する pET15b に N 末 6×His 融合 SpPyrH および HiPyrH をクローニングし、*E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) に導入した。得られたクローンを IPTG 添加条件で培養し、Ni-NTA を用いたアフィニティー精製を実施、精製過程を SDS-PAGE (CBB 染色) により確認したところ、目的分子量 (それぞれおよそ 29.2 および 28.3kDa) の位置に精製タンパク質が検出された (Fig. 5A, C)。また、抗 6×His 抗体によるウェスタン解析にて精製タンパク質が目的のものであることを確認した (Fig. 5B, D)。なお Figure 5A および 5C の lane 4 では、目的バンド以外にもタンパク質が検出されたが、ウェスタン解析では検出されなかったため、宿主由来のタンパク質であると考えられた。



**Figure 5. Purification of 6xhistidine-tagged PyrH from *S. pneumoniae* and *H. influenzae* using Ni-NTA.**

(A and C) Ni-NTA により SpPyrH (A)および HiPyrH (C)を精製し、各分画を SDS-PAGE 後、CBB 染色により解析した。

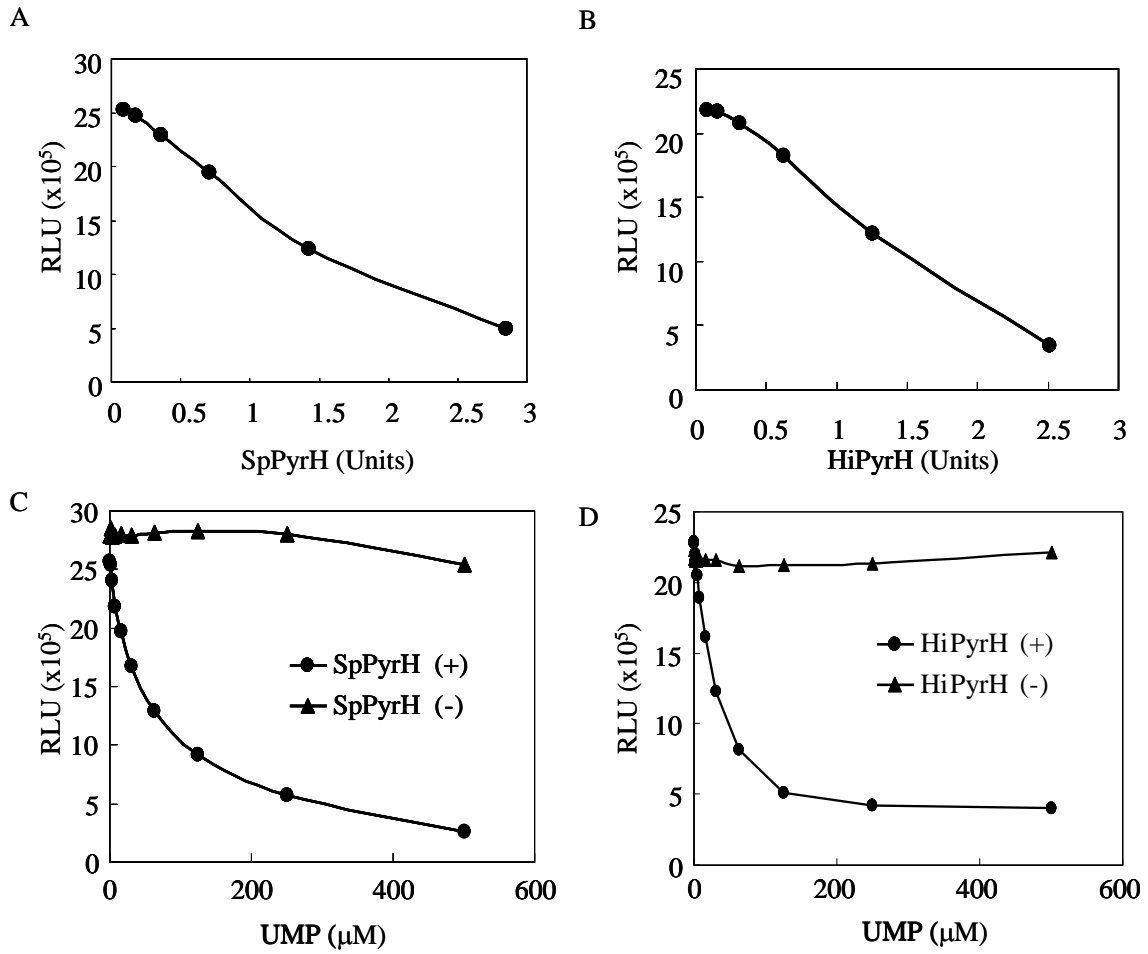
(B and D) 同様に Ni-NTA により精製した SpPyrH (B) and HiPyrH (D)を anti-6×His monoclonal antibody を用いたウェスタン解析に供した。

Lane 1; PyrH 発現大腸菌の可溶性画分, lane 2; Ni-NTA agarose を通過した flow-through, lane 3; Ni-NTA agarose の洗浄液, lane 4; Ni-NTA agarose の溶出画分

Arrowhead: PyrH

## 第2節 PyrH 酵素アッセイ系構築

PyrH の有する ATPase 活性は、ATP 量依存的に発光する Kinase-Glo (Promega Corporation) を用い、ATPase 反応により消費される ATP 量を相対発光量により測定した。具体的には本系で、SpPyrH および HiPyrH 濃度依存的な相対発光量の減少 (ATP の消費) が認められたことから、SpPyrH および HiPyrH の ATPase 活性を検出できると考えた (Fig. 6A, B)。酵素反応における基質である UMP の濃度依存性について SpPyrH および HiPyrH を用いて評価した。SpPyrH および HiPyrH 未添加条件で相対発光量が UMP 濃度に拘わらず一定である条件で、SpPyrH および HiPyrH の ATPase 活性は UMP 依存的な反応であることが確認された (Fig. 6C, D)。続いて PyrH が UTP により阻害されることが *S. pneumoniae*<sup>38)</sup>、*E. coli*<sup>39)</sup> について報告されているため、SpPyrH および HiPyrH について、UTP による阻害作用を検討した。いずれの酵素も UTP により阻害され、IC<sub>50</sub> はそれぞれ 710 および 71  $\mu$ M であった (Table 5, p.60)。本評価で HiPyrH が UTP により阻害されることが初めて明らかとなった。



**Figure 6. Inverse correlation of PyrH ATPase activity with relative luminescence units (RLU) and UMP dose-dependency in *S. pneumoniae* and *H. influenzae* PyrH activity.**

SpPyrH (A)およびHiPyrH (B)はタンパク質量の増加とともに ATP の消費を意味する RLU の減少を示した。SpPyrH (C) および HiPyrH (D) の酵素活性は、UMP 濃度依存的に向上した。Circle; PyrH 添加条件, triangle; PyrH の代わりに滅菌水を添加したもの

### 第3節 *S. pneumoniae* PyrH を用いた HTS

HTS は 1536 ウェルプレートを用い市中肺炎で最も分離頻度が高い *S. pneumoniae* の阻害剤を検出、評価するために SpPyrH 酵素アッセイ系にて実施した。系のバリデーションの一端として HTS 実施前にまずプレートに①酵素未添加②酵素添加③酵素および阻害物質である UTP の IC<sub>50</sub> 付近の濃度 (728 μM) を添加の 3 条件で 512 well 分ずつ添加し測定したところ (Fig. 7)、UTP 添加群の平均阻害率は 60%、CV 値 (標準偏差/平均から算出されるバラつきを評価する指標であり、一般に 10%以内が目安) が 4%と本系はバラツキが小さい系であると考えられた。なお阻害率の求め方に関しては、第7節9) において詳述した。続いて第一三共株式会社が有する合成ライブラリーを用いて HTS を実施した。HTS の一例を Figure 8 に示す。HTS 時の Z'値 (データのばらつきや測定値から計算されるアッセイ系の精度を評価する指標であり、0.5 以上が目安) は常時 0.9 前後であり、安定な条件下で実施した。再現性の得られた HTS ヒット率は約 0.07%であった。これら化合物に対して、構造面の懸念 (脂溶性が高い、化学的に反応性が高いと考えられる構造を有する、分子量が大きいなど) から継続評価を中止した化合物を除外後、SpPyrH に対する IC<sub>50</sub> を算出し、UTP の IC<sub>50</sub> より小さい値を示す化合物を選別した。選抜した化合物に対して第4節に示す SPR 解析を行い、PYRH-1 (Fig. 9) を見出し以下の評価を実施した。なお、PYRH-1 の HTS 時の SpPyrH 阻害率は、30-40%であった。

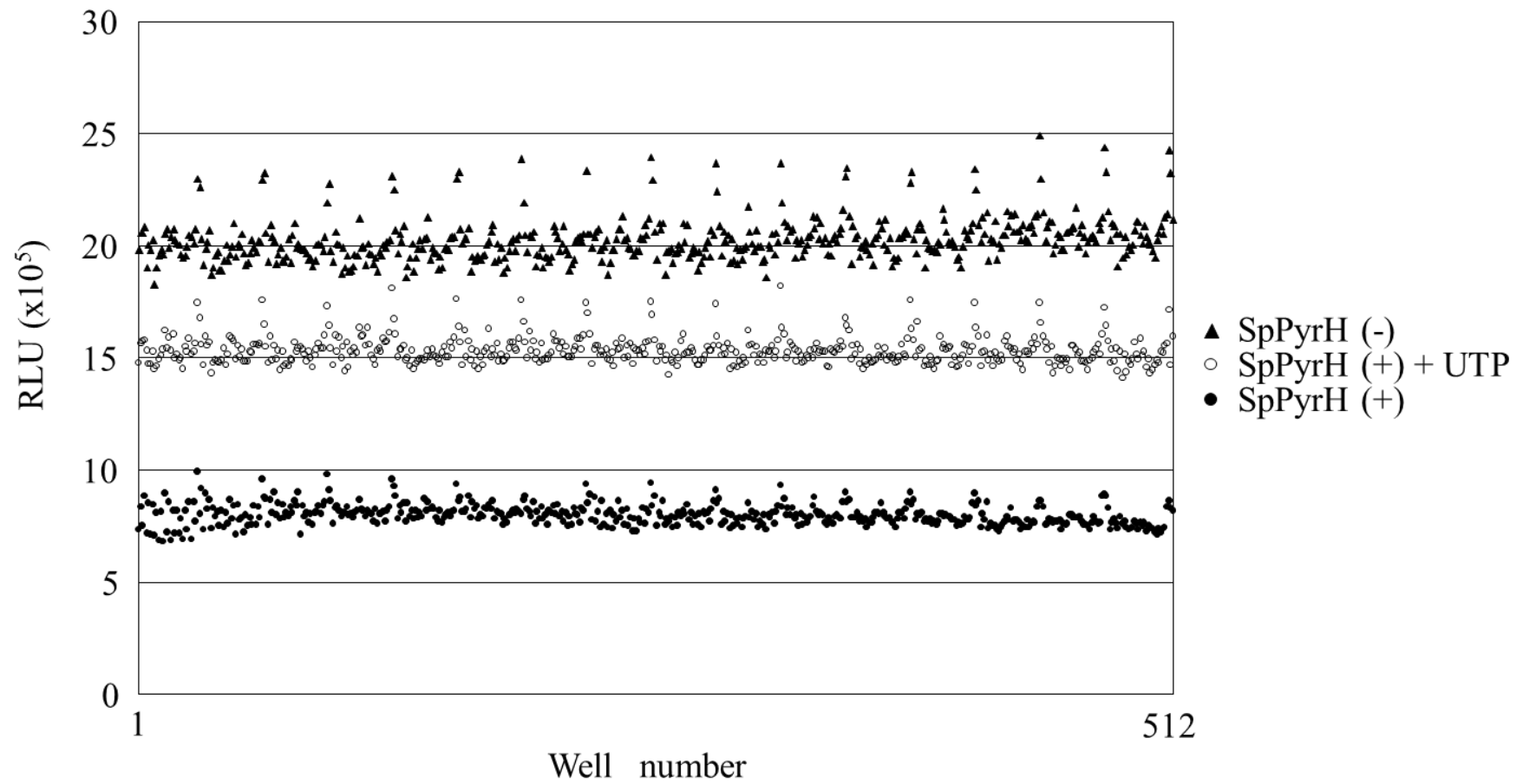


Figure 7. Evaluation of *S. pneumoniae* PyrH ATPase screen.

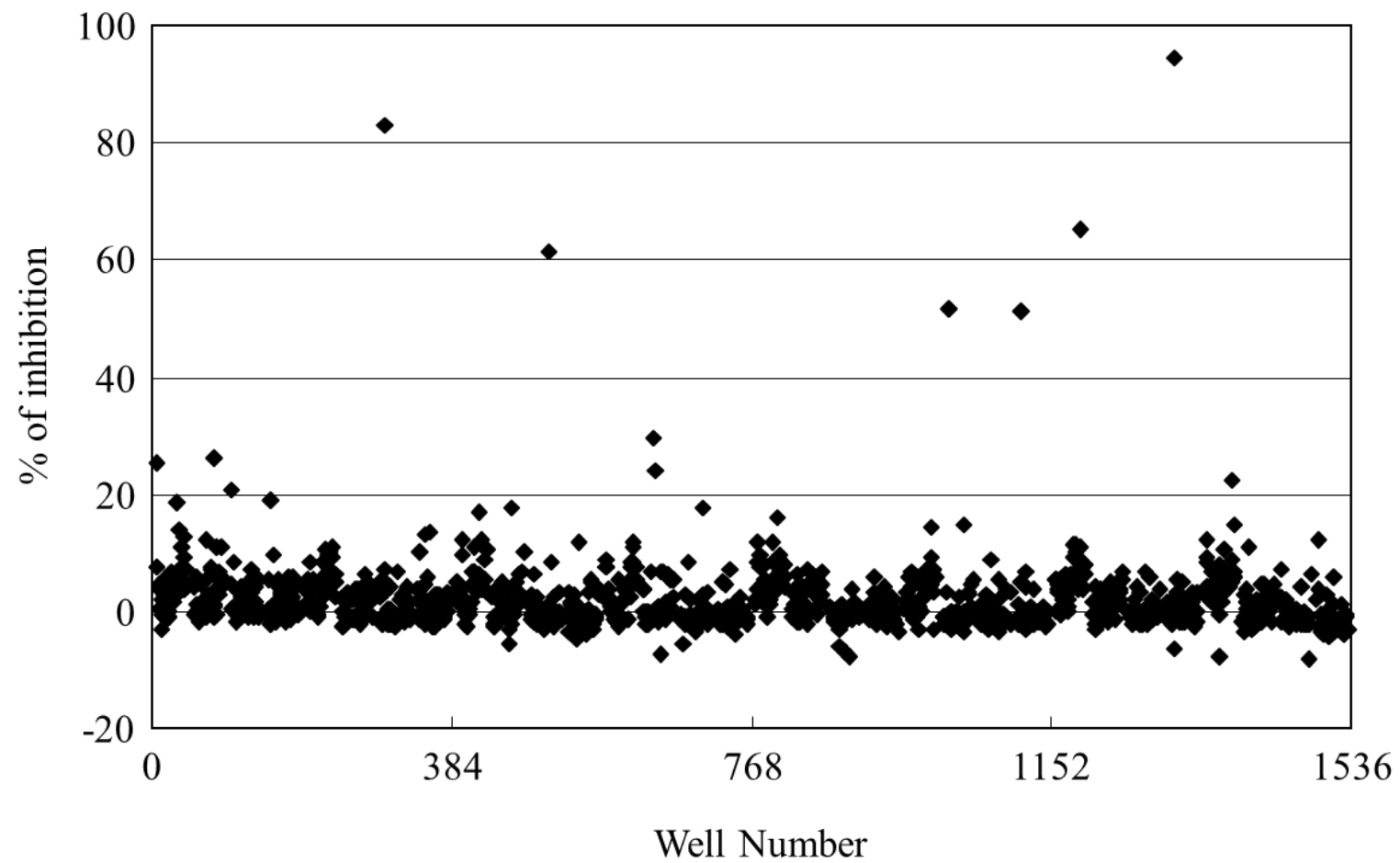
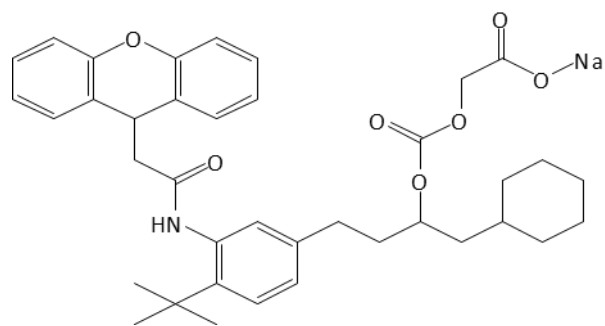


Figure 8. An example of 1536 well ultra high throughput screening (percent of inhibition).



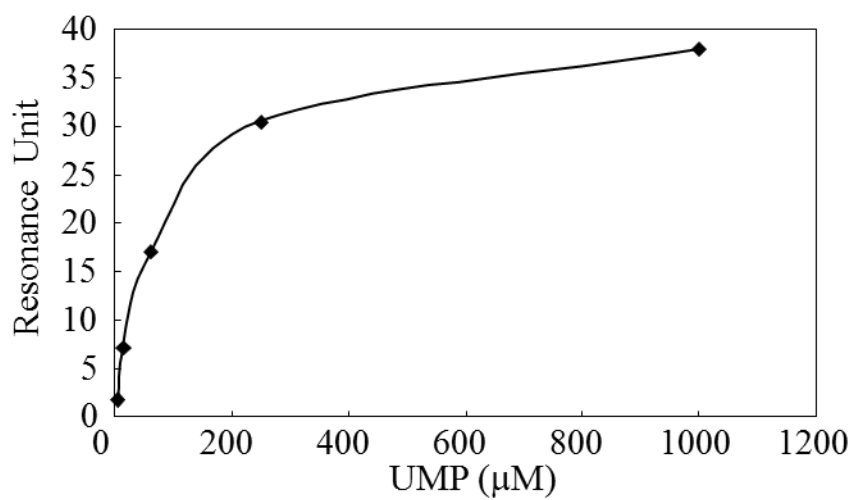


**Figure 9. Chemical structure of PYRH-1.**

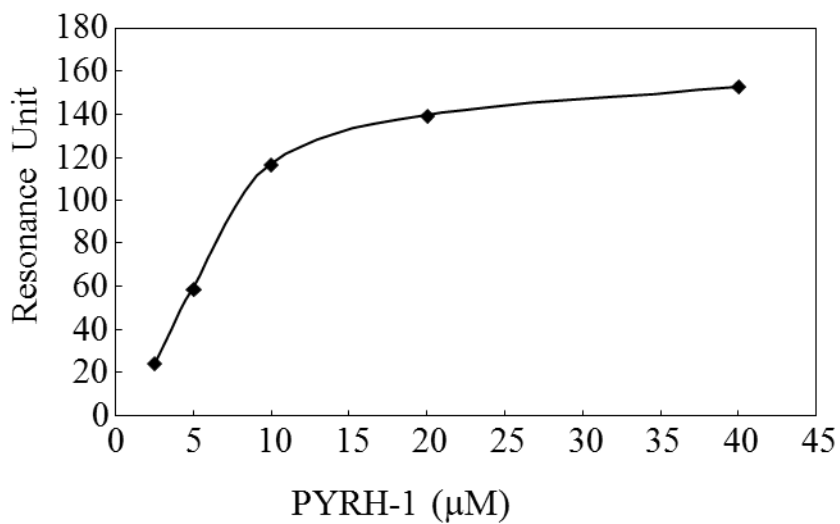
#### 第4節 PYRH-1 の SPR 解析

PYRH-1 と SpPyrH との結合特異性を解析するため、SPR (Biacore3000) による平衡化解析を行った。SPR 解析は、第一三共株式会社創薬化学研究所にて実施した。なお、反応基質である UMP をポジティブコントロールとして用い同様に解析した。SpPyrH を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride および N-hydroxysuccinimide によって活性化した sensor chip CM5 にアミンカップリング反応により固定化し、その後 ethanolamine HCl (pH 8.5) により sensor chip の酵素非結合領域を非活性化したあと、UMP または PYRH-1 と SpPyrH の相互作用によりセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化を SPR シグナルとして検出し RU (レゾナンスユニット、0.1 度のシフトを 1,000 RU と定義) に換算後、BIAevaluation Ver3.1 の Equilibrium 解析モードにて解析し、平衡時の RU 値を算出した。この SPR による平衡化解析により SpPyrH と UMP または PYRH-1 の特異的結合が示唆された。すなわち、検討濃度範囲で理論的 Rmax 値 (83 および 222 RU) 内でのシグナルの収束が認められ、PYRH-1 は SpPyrH と 1 対 1 の特異的な結合を示していることが示唆された (Fig. 10)。なお、PYRH-1 では認められなかったが、SPR 解析で 1:1 の特異的ではなく非特異的に結合する化合物の場合、RU 値は収束せず、化合物の濃度依存的に RU 値が大きくなる。これは一つのタンパク質分子に対して複数の化合物が結合した結果だと考えることができる。

A



B



**Figure 10. SPR equilibrium analysis for binding of UMP and PYRH-1 to *S. pneumoniae* PyrH.**

SPRによる平衡化解析の結果を示す。UMPまたはPYRH-1が一定量以上添加された場合、PyrHと化合物の結合は平衡化し、1:1の結合と考えられるRUで安定した。

## 第5節 PYRH-1の有効性（酵素阻害活性、抗菌活性）評価

PYRH-1のSpPyrHとの特異的な結合が認められたことから、PYRH-1の酵素阻害活性および市中呼吸器感染症の主要起因菌に対する抗菌活性測定を実施した。Table 5にPYRH-1のSpPyrHおよびHiPyrHに対するIC<sub>50</sub>および試験菌株に対する最小発育阻止濃度（MIC）を示す。MIC測定は、National Committee for Clinical Laboratory Standardsの微量液体希釈法<sup>40)</sup>を一部改変し、次のとおり実施した。96ウェルハーフエリア平底プレートにPYRH-1の2倍段階希釈系列を11段階調製し、培地は、*S. pneumoniae* 1414021には5%馬溶血液添加CAMHBおよび馬溶血液中の血清成分へのPYRH-1吸着の影響を除外した評価を行うためにTodd Hewitt Brothを用いた。*S. aureus* ATCC 6538Pおよび*E. coli* K-12 MG1655  $\Delta$ tolCにはCAMHB、*H. influenzae* Rd KW20  $\Delta$ acrAにはHemophilus test mediumを用いた。このプレートに菌液を接種し、35°Cで18-20時間静置培養後、目視にて菌の増殖が認められない最小濃度をMICとした。グラム陰性菌である*H. influenzae*または*E. coli*のAcrAB-TolC排出ポンプシステムは、さまざまな化合物の感受性を変化させることが知られているため、本研究ではacrAまたはtolC欠損株を用いて評価を行った。

PYRH-1のSpPyrHに対するIC<sub>50</sub>はUTPより小さい値を示し、臨床分離株である*S. pneumoniae* 1414021株、*S. aureus*標準株、*H. influenzae*標準株 $\Delta$ acrA欠損株に対して抗菌活性を示した。*S. pneumoniae* 1414021株に対するMICは、馬溶血液含有培地で64  $\mu$ g/mL、Todd Hewitt培地で16  $\mu$ g/mLであり、血液成分の影響を受ける可能性が示唆された。なお、UTPは、試験菌株内で複数の代謝反応に用いられる基質であり、仮にUTPで抗菌活性が認められたとしても、PyrHの阻害によるもののみとは考えられず抗菌活性の陽性対照としてUTPを用いることは適切ではないと判断し、抗菌活性の評価は実施しなかった。

**Table 5. IC50s/MICs of PYRH-1 against bacteria tested in this study**

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)		MIC (μg/mL)			
	SpPyrH	HiPyrH	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>H. influenzae</i> ΔacrA	<i>E.coli</i> ΔtolC
PYRH-1	48	75	64 (16)* <sup>1</sup>	2	1	>128
UTP	710	71	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

\*1: MICs であり、5% lysed horse blood/MHB 培地 (Todd Hewitt Broth 培地)の結果をそれぞれ示す。

N.T.: Not tested

## 第 6 節 考察

以上、PYRH-1 は SpPyrH と 1 対 1 の特異的な結合を示し、市中肺炎の起因菌である *S. pneumoniae*、*S. aureus*、*H. influenzae* (*acrA* 欠損株) に抗菌活性を示すことが明らかとなった。細菌の細胞内で PyrH が PYRH-1 により阻害されることを確認する目的で、MIC 測定時に用いた培地中に 500  $\mu$ M の UDP (細胞増殖に影響を与えないことを確認済) を添加しても PYRH-1 の MIC に変化を与えなかった (data not shown)。UDP では細胞内への移行性が悪い可能性が考えられるため Uridine を添加するなど工夫することで細菌の細胞内での PYRH-1 の阻害メカニズム解析が可能となると考えられる。また、耐性菌の分離、または PyrH の過剰発現により PYRH-1 の細菌に対する増殖阻害活性が減弱することを確認する PyrH の相補実験を行うことで、細菌の細胞内における PYRH-1 の作用機序解析が可能となる。今回、HTS ヒット化合物に対して早期に SPR を実施し、特異性を指標に PYRH-1 を見出した。実際 PYRH-1 は、20  $\mu$ g/mL で実施した HTS 実施時の阻害率は、30-40%であり、阻害活性としては、他により強力な阻害活性を有する化合物が存在した。しかしそれらは、研究の過程で構造不適などの理由で脱落し、一方で PYRH-1 は SPR により特異性が明らかになったことで SpPyrH 阻害剤として見出された。このように単なる阻害活性での絞り込みではなく、特異性・作用機序解析を早期に行うことは HTS 実施において重要であると考えられる。

抗菌活性測定について、*S. pneumoniae* では馬溶血液含有培地と Todd Hewitt 培地で 4 倍の差が認められたが、市販薬の中にも血清添加の影響を数倍受ける化合物も存在することから HTS ヒット化合物としては、一定の抗菌活性を有すると判断している。今後 *H. influenzae* の野生株に対する抗菌活性評価のほかに、市中呼吸器感染症起因菌の各種薬剤耐性株に対する抗菌活性評価を進める必要がある。

PyrH の酵素アッセイ系として、これまでは、文献 38 にあるように UMP kinase 反応後に NADH の消費を指標として 340 nm の吸光度を測定することにより評価しているものが知られている (PK-LDH 系)。たとえば一日に 10 万化合物の HTS を実施する場合、1 化合物目

から最後の 10 万化合物目のサンプルを測定するまでに、数時間の時間差があるケースが存在するが反応を止めることが難しい PK-LDH 系では課題となる。さらに 340 nm に吸収を持つ化合物が存在すると酵素アッセイ系の阻害要因となることが考えられる。また、一般的に HTS 系を構築する際は、大規模化合物ライブラリーのアッセイを実施可能な試薬コストを加味する必要がある。本研究では、新たに kinase-glo の系を構築したが、本系は kinase-glo 試薬を入れた段階で反応が停止し作業時間の影響を受けにくい。また、反応基質である ATP を発光検出する系（酵素反応とともに発光量が減少）であるが故に、たとえば発光を阻害する化合物は、小さい RLU 値を示すため、酵素反応が進んでいると判断されアッセイ系の阻害化合物としてヒットしにくい。また、PK-LDH 系に比べて少ない基質量で、1 アッセイ当たり数円レベルで実施可能といった特徴を有している。

PyrH は、その活性に  $Mg^{2+}$  が必要であることが知られているほか、GTP によりアロステリックに活性が増強されることが報告されている。本研究では、*in vitro* と *in vivo* における濃度の違いにより阻害活性が異なることが推察される  $Mg^{2+}$  との拮抗阻害剤、もしくは GTP のアロステリックな PyrH の酵素活性増強能を阻害する化合物を選択しないように  $Mg^{2+}$  は十分量添加し、GTP は未添加とし、本アッセイ系の律速条件は ATP、UMP、酵素量とした。以上から概念的には ATP または UMP との結合サイトを阻害する化合物を検出可能な評価系となっている。

一般的に HTS で安定と言われるのは Z' 値が 0.5 以上であることが一つの指標となっている。過剰な酵素反応の基質を加え反応時間を長くすれば単純に反応系は安定することが期待されるが、上述のように ATP、UMP、酵素量を制限した中で、系を構築し Z' 値を高めた結果、ヒット率 0.07% という一定の割合で阻害化合物を検出できたものとする。

また、今回酵素の精製では、native な活性を期待して可溶性画分の PyrH を精製したが、不溶性画分にも PyrH は検出された。正確な回収率は算出していないが、数 L の培養液から精製すれば大規模 HTS を実施するのに十分な酵素量が得られることを確認している。精製過

程で宿主由来の夾雑タンパク質が検出されたが、UTP やPYRH-1 でPyrH は100%阻害されることから本評価系に与える影響はほぼ無いと考えている。



## 第7節 実験方法詳細

### 1) 使用菌株

本研究で使用した菌株を Table 6 に示した。

**Table 6.** 使用菌株

Organism	Strain No.	Description
<i>S. pneumoniae</i>	TIGR4	This strain was obtained from American Type Culture Collection and used for the cloning of <i>pyrH</i> .
	1414021	This strain was clinically isolated in Japan in 2002 and used for the measurement of the MIC.
<i>H. influenzae</i>	Rd KW20	This strain was obtained from American Type Culture Collection and used for cloning of <i>pyrH</i> .
	Rd KW20 $\Delta$ acrA	This strain was constructed by deleting the <i>acrA</i> gene and replacing it with a gene that confers resistance to chloramphenicol ( <i>cat</i> ).
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$	This strain was obtained from TOYOBO Co., Ltd. and used for the cloning of <i>pyrH</i> .
	Rosetta-Gami B (DE3)	This strain was obtained from Novagen and used for the expression of PyrH.
	K-12 MG1655 $\Delta$ tolC	This strain was constructed by deleting the <i>tolC</i> gene and used for the measurement of the MIC.
<i>S. aureus</i>	ATCC6538P	This strain was obtained from American Type Culture Collection and used for the measurement of the MIC.

### 2) PyrH 発現系菌株と培養条件

遺伝子のクローニングには *E. coli* DH5 $\alpha$  (competent high *E. coli* DH5 $\alpha$ 、東洋紡績株式会社)、PyrH 発現系の親株として *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) (Novagen) を用いた。PyrH 発現用のベクターには pET15b (Novagen) を用いた。菌株の培養には LB broth あるいは LB agar (ともに Becton, Dickinson and Co.) を用い、プラスミド保有株の選抜のために 100  $\mu$ g/mL CBPC (Sigma-Aldrich Co.) を添加し 35°C で培養した。

### 3) DNA 調製

*S. pneumoniae* TIGR4 および *H. influenzae* Rd KW20 の染色体 DNA 抽出には DNeasy Tissue

Kit (Qiagen K.K.) を用いた。プラスミド DNA の抽出には QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen K.K.) を用いた。PCR 反応液 (50  $\mu$ L) およびプラスミドの制限酵素反応液 (50  $\mu$ L) の精製には QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen K.K.) を用い、添付の Buffer EB 50  $\mu$ L にて溶出した。PCR 産物の制限酵素反応液 (50  $\mu$ L) は MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen K.K.) を用いて精製し、添付の Buffer EB 10  $\mu$ L にて溶出した。いずれもキット添付のプロトコールに従った。

#### 4) PCR

PCR は GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Inc.) あるいは Tetrad Thermal Cycler (MJ Research Inc.) を用い、以下の条件にて実施した。*S. pneumoniae* TIGR4、*H. influenzae* Rd KW20 の染色体 DNA からの *pyrH* の増幅のため、2.5 U AccuPrime Pfx DNA polymerase、1 $\times$ AccuPrime Pfx Reaction mix (Life Technologies Japan Ltd.) および 0.3  $\mu$ M の各プライマー (7 に記載) を含む PCR 反応バッファー (50  $\mu$ L) を調製し、染色体 DNA を添加後、PCR 反応 (95 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクル、95 $^{\circ}$ C 15 秒、57 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 60 秒/kilobase を 30 サイクル) を実施した。Colony-direct PCR のため、0.5 U TaKaRa Z-Taq (タカラバイオ株式会社)、1 $\times$ Z-Taq Buffer、0.25 mM dNTPs およびそれぞれ 1  $\mu$ M の pET101-se1 (5'-GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG-3') および pET101-anti1 (5'-CTCAAGACCCGTTTAGAGGC-3') プライマーを含む PCR 反応バッファー (20  $\mu$ L) を調製し、これに 1 コロニーを懸濁後、PCR 反応 (94 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクル、98 $^{\circ}$ C 5 秒、57 $^{\circ}$ C 5 秒、72 $^{\circ}$ C 15 秒/kilobase を 35 サイクル) を実施した。なお PCR 反応終了後、反応液の一部を用いて 1% アガロース (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い電気泳動にて増幅サイズを確認した。

#### 5) 形質転換

ライゲーション反応液 5-10  $\mu$ L とコンピテントセル 50-100  $\mu$ L を氷上で混和し、30 分氷冷

後に 43°C で 35 秒インキュベートし、200 µL の SOC medium (東洋紡績株式会社) へ菌液を添加、37°C で 1 時間培養した。その後 100 µg/mL carbenicillin 含有 LB agar に全量塗抹し 1 晩 35°C で培養した。

#### 6) シークエンス解析

形質転換後の colony direct PCR で目的インサートの挿入が確認されたクローンからプラスミドを抽出し、これを DNA シークエンス反応の鋳型とした。シークエンス反応は BigDye Terminator (Applied Biosystems, Inc.) を用い、ABI PRISM 3700 DNA sequencer または ABI 3730xl DNA sequencer (いずれも Applied Biosystems, Inc.) にて塩基配列を決定した。各データは *S. pneumoniae* TIGR4 または *H. influenzae* Rd KW20 のゲノム配列 (それぞれ GenBank accession number; AE005672 または L42023) を参照し、ATGC (Genetyx Corp.) を用いてアライメント解析を行った。

#### 7) *pyrH* のクローニング

*S. pneumoniae pyrH* のクローニングには、*S. pneumoniae* TIGR4 の染色体 DNA を鋳型として、プライマー SpPyrH-N-XhoI (5'-CCGCTCGAGGTGAAAATGGCGAATCCCAAGT-3') および SpPyrH-C-BamHI (5'-CGCGGATCCTTATTCCTTTCTTCGATATTATTGAACTGTTG-3') を用いた PCR により全長 *pyrH* を増幅した。*H. influenzae pyrH* のクローニングには、*H. influenzae* Rd KW20 の染色体 DNA を鋳型として、プライマー HiPyrH-N-XhoI (5'-CCGCTCGAGATGAGCCAACCAATTTATAAACGTATTTTATTGA-3') および HiPyrH-C-BamHI (5'-CGCGGATCCCTAACAATAGTGGTGCCTTCTTCAG-3') を用いた PCR により全長 *pyrH* を増幅した。PCR 産物は精製後、1× H buffer、90 U BamHI、90 U XhoI (いずれもタカラバイオ株式会社) を含む反応液中で 37°C、1 時間以上制限酵素処理し精製した。pET15b は同条件で XhoI、BamHI 処理し、精製後 alkaline phosphatase (calf intestine) (タカ

ラバイオ株式会社) を用い、試薬添付のマニュアルに従って脱リン酸化反応を行った。ベクター (BamHI/XhoI/alkaline phosphatase 処理 pET15b) およびインサート (BamHI/XhoI 処理 PCR 産物) は DNA Ligation Kit Ver. 2 (タカラバイオ株式会社) を用い、2  $\mu$ L のベクター、7  $\mu$ L のインサート、9  $\mu$ L の solution I を混合、16°C で 3 時間以上インキュベートすることによりライゲーションさせた。その後、*E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換し、colony-direct PCR で挿入が確認されたクローンからプラスミドを精製し、シーケンス解析により *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の既報配列と 100%一致したものをそれぞれ pET15b-SpPyrH および pET15b-HiPyrH とした。

#### 8) 組換え PyrH の発現と精製

100  $\mu$ g/mL carbenicillin 含有 LB broth 5 mL で一晩 37°C で振盪培養した Rosetta-gami B (DE3) /pET15b-SpPyrH または Rosetta-gami B (DE3) /pET15b-HiPyrH を 250 mL の 100  $\mu$ g/mL CBPC 含有 LB broth に混和し、37°C、230 rpm で振盪培養した。3 時間後に終濃度 1 mM の IPTG を添加、同培養条件でさらに 3-4 時間培養した。16,100 x g、15 分の遠心により集菌し、上清を除いた pellet を 10 mL の B-PER 試薬 (Thermo Fisher Scientific Inc.) に懸濁し室温で 10-30 分攪拌した。続いてその懸濁液を Biorupter (コスモ・バイオ株式会社) で超音波破碎 (破碎 30 秒、破碎停止 30 秒のサイクルを 4°C の水浴で 30 分実施) した。16,100 x g、15 分の遠心操作で得られた上清を Ni-NTA agarose (Life Technologies Japan Ltd.) 2 mL と 1 時間反応させ、反応後のレジンを Wash Buffer 1 (2 mL  $\times$  3 回)、Wash Buffer 2 (3 mL  $\times$  2 回) により洗浄し、Elution Buffer (いずれも Thermo Fisher Scientific Inc.) (3 mL  $\times$  2 回) で *S. pneumoniae* PyrH (SpPyrH) および *H. influenzae* PyrH (HiPyrH) を溶出させた。精製過程の各サンプルは、Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に溶解し 12.5% ポリアクリルアミドプレキャストゲル (ATTO Corporation) を用い、2.5 mM Tris (pH 8.3)、19.2 mM glycine、0.01% SDS (Bio-Rad Laboratories, Inc.) の泳動バッファー中で泳動分離し、Coomassie G-250

(Life Technologies Japan Ltd.) で染色した。また、精製タンパク質が目的のもの (N 末 6×His 融合 PyrH) であることを確認するため、SDS-PAGE 後、2.5 mM Tris (pH 8.3)、19.2 mM glycine (Bio-Rad Laboratories, Inc.) の転写バッファー中で PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に対して転写反応を行い、HRP conjugate anti-His antibody (Promega Corporation) を用いて ECL plus (GE Healthcare Japan) 検出によるウェスタン解析を行った。

#### 9) PyrH 酵素アッセイ

PyrH の有する ATPase 活性は、ATP 量依存的に発光する Kinase-Glo (Promega Corporation) を用い、ATPase 反応により消費される ATP 量を相対発光量により測定した。アッセイは秤量した被験化合物に測定最高濃度の 50 倍濃度となるように溶媒 [DMSO:MeOH (7:3)] を加えて溶解し、溶媒で 2 倍段階希釈、被験化合物溶液を 2% (v/v) になるように添加後、2.5 unit/well の SpPyrH あるいは 1.5 unit/well の HiPyrH と混和し、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、50 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub> (いずれも和光純薬工業株式会社)、0.2 mM UMP、5 μM ATP (いずれも Sigma-Aldrich Co.) を添加、混和後、30°C で 2.5 時間 (SpPyrH) あるいは 2 時間 (HiPyrH) インキュベートした (いずれも終濃度)。HTS 時は 0.25 unit/well (1536 ウェル白プレート) の SpPyrH を使用し、室温で反応した。酵素反応後に反応液 (96 ウェル白色ハーフエリアプレートの場合は 50 μL、1536 ウェル白プレートの場合は 5 μL) と等量の Kinase-Glo 試薬を添加、混和し、室温で 10 分反応後、相対発光量を測定した (96 ウェル白色ハーフエリアプレートの場合は ARVO、1536 ウェル白プレートの場合は ViewLux にて測定した。いずれも Perkin Elmer Co.,Ltd.)。被験化合物溶媒である 2% (v/v) DMSO:MeOH (7:3) を添加した反応を阻害率 0%、2% (v/v) DMSO:MeOH (7:3) を添加し、酵素の代わりに滅菌水を添加した反応を阻害率 100% とした。被験化合物添加時の ATPase 活性の阻害率 (%) は式 2 に従い算出した。N=2 で求められる阻害率の平均値が 50% を挟む 2 点より直線式を求め、これより IC<sub>50</sub> を算出した。なお、30°C、2 時間で 0.1 nmol の ATP を分解する酵素活性を 1 unit

とした。

式2

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \frac{100 \times \{(\text{阻害率100\%の平均相対発光量}) - (\text{各反応の相対発光量})\}}{(\text{阻害率100\%の平均相対発光量}) - (\text{阻害率0\%の平均相対発光量})}$$

#### 10) HTS 方法

第一三共が保有する合成ライブラリーに対して SpPyrH を用いた HTS を 1536 ウェル白プレートで実施した。DMSO:MeOH (7:3) に溶解した検体を最終濃度が 20 µg/mL となるように添加した。ヒット基準は、阻害率平均 + 3×SD とした。HTS 系の安定性を確認するために Z'値は序論に記載の式 1 を用いて算出した。

#### 11) MIC 測定

試験菌株に対する被験化合物の最小発育阻止濃度 (MIC) は、National Committee for Clinical Laboratory Standards の微量液体希釈法を一部改変し、下記の手順で測定した。試験菌株の凍結 (-80°C) 保存ストック (in 10% glycerol, 関東化学株式会社) の一部を、*S. pneumoniae* 1414021 は 5% 綿羊脱繊維血 (Nippon Bio-Test Laboratories Inc.) 添加 MHA (Becton, Dickinson and Co.) に、*S. aureus* ATCC6538P および *E. coli* K-12 MG1655 ΔtolC は MHA に、*H. influenzae* Rd KW20 ΔacrA はチョコレート寒天培地 (Becton, Dickinson and Co.) に塗抹し、35°C で一晩静置培養した。平板上に生育したコロニーを生理食塩水に懸濁し、OD<sub>600</sub>=0.08-0.10 に調整後、生理食塩水で 16 倍希釈したものを接種菌液とした。被験化合物は秤量後、DMSO:MeOH (7:3) を加えて測定最高濃度の 78 倍になるように溶解し、100 µL/well (96 ウェルハーフエリア平底プレート) の培地に 1.3% の被験化合物溶液を含む測定最高濃度ウェルを作製後、50 µL/well 添加した培地に対して 2 倍段階希釈系列を 11 段階調製した (測定最小濃度ウェルからは 50 µL 除去)。培地は *S. pneumoniae* 1414021 には 5% 馬溶血液 (Nippon Bio-Test

Laboratories Inc.) 添加 CAMHB (Becton, Dickinson and Co.) または Todd Hewitt Broth (Becton, Dickinson and Co.)、*S. aureus* ATCC 6538P および *E. coli* K-12 MG1655  $\Delta$ tolC には CAMHB、*H. influenzae* Rd KW20  $\Delta$ acrA には Hemophilus test medium [5 g/L Yeast Extract (Becton, Dickinson and Co.)、15 g/L Hemin、15 g/L  $\beta$ -NAD (いずれも Sigma-Aldrich Co.) 添加 CAMHB] を用いた。このプレートに接種菌液を 4  $\mu$ L/well 分注した後混合し、35°C で 18-20 時間静置培養した。各ウェル内の菌の増殖を目視により観察し、菌の増殖が認められない最小濃度を MIC とした。

## 12) SPR による平衡化解析

SPR による平衡化解析は、第一三共株式会社創薬基盤研究所で実施した。SPR による平衡化解析は、Biacore3000 と Sensor Chip CM5 (research Grade) (いずれも GE Healthcare Japan) を用いて行った。SpPyrH (0.10 mg/mL) を acetate buffer (pH 4.8) で 10 倍希釈し、80 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride および 20 mM N-hydroxysuccinimide によって活性化した sensor chip にアミンカップリング反応により固定化した。固定化は 10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant (HBS-EP) を用い、流速 10  $\mu$ L/分、420 秒の条件下で行い、固定化後、1 M ethanolamine HCl (pH 8.5) により sensor chip の酵素非結合領域を非活性化した。固定化酵素に対する化合物の相互作用は 5% DMSO 添加を用い、流速 30  $\mu$ L/分、120 秒の条件下で行った。結合によりセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化を SPR シグナルとして検出し RU に換算後、BIAevaluation Ver3.1 の Equilibrium 解析モードにて解析し、平衡時の RU 値を算出した。

### 第3章 PyrG 阻害剤の探索

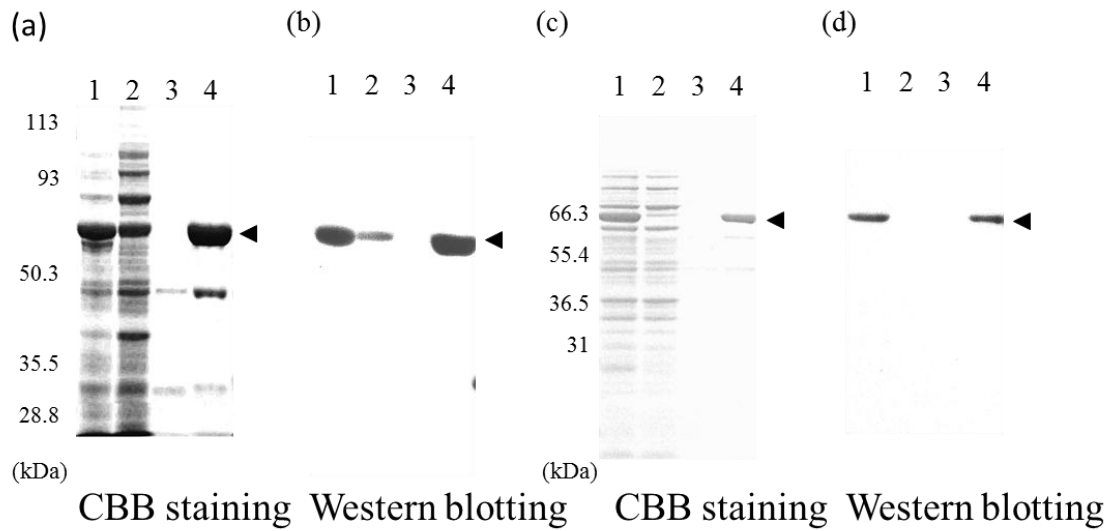
#### 序

第1章で評価された標的のうちのひとつ、PyrG は細胞内に存在し、ピリミジン生合成経路において  $UTP + ATP + Gln + H_2O \rightarrow CTP + ADP + Glu + Pi$  の反応により CTP を生成する CTP synthase であり、*H. influenzae*、*E. coli* で必須であることが報告されている。本遺伝子は、第1章の殺菌性評価で静菌的であったものの、ヒトで保存されている CTPS1, 2 は細菌の PyrG とは相同性が低いと考えられ、新規抗菌剤の標的候補として有望と考えた。そこで PyrG 阻害剤の探索を目的に *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来の PyrG を用いて酵素アッセイ系を構築し、*S. pneumoniae* PyrG 阻害活性を指標に 384 well レベルの Cell-free HTS を実施した。

#### 第1節 *S. pneumoniae* および *H. influenzae* PyrG の精製

呼吸器感染症の主要な起炎菌であることが知られる *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来 PyrG を用いた酵素アッセイ系構築に必要な PyrG を取得するため、IPTG 添加で発現が誘導されることが期待される T7 プロモーターを有する pET15b に N 末 6×His 融合 SpPyrG および HiPyrG をそれぞれクローニングし、*E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) に導入した。得られたクローンを IPTG 添加条件で培養し、Ni-NTA を用いたアフィニティー精製を実施、精製過程を SDS-PAGE (CBB 染色) により確認したところ、目的分子量(それぞれおよそ 61.8 kDa および 62.8 kDa) の位置に精製タンパク質が検出された (Fig. 11A, C)。また、抗 6×His 抗体によるウェスタン解析にて精製タンパク質が目的のものであることを確認した (Fig. 11B, D) なお Figure 11A の lane 4 では、目的バンド以外にもタンパク質が検出されたが、ウェスタン解析では検出されなかったため、宿主由来のタンパク質、または低分子量のものは PyrG の分解産物であると考えられた。





**Figure 11. Purification of 6×histidine-tagged PyrG from *S. pneumoniae* and *H. influenzae* using Ni-NTA.**

(a and c) Ni-NTA により SpPyrG (a)および HiPyrG (c)を精製し、各分画を SDS-PAGE 後、CBB 染色により解析した。

(b and d) 同様に Ni-NTA により精製した SpPyrG (b) and HiPyrG (d)を anti-6×His monoclonal antibody を用いたウェスタン解析に供した。

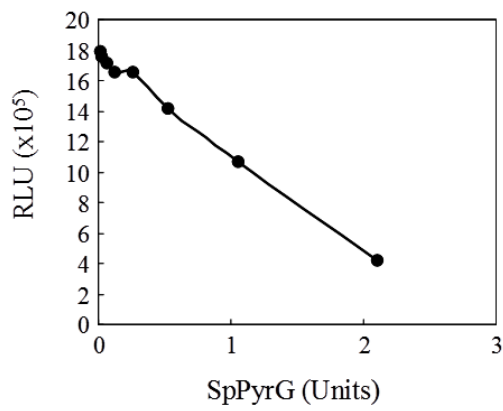
Lane 1; PyrG 発現大腸菌の可溶性画分, lane 2; Ni-NTA agarose を通過した flow-through, lane 3; Ni-NTA agarose の洗浄液, lane 4; Ni-NTA agarose の溶出画分

Arrowhead: PyrG

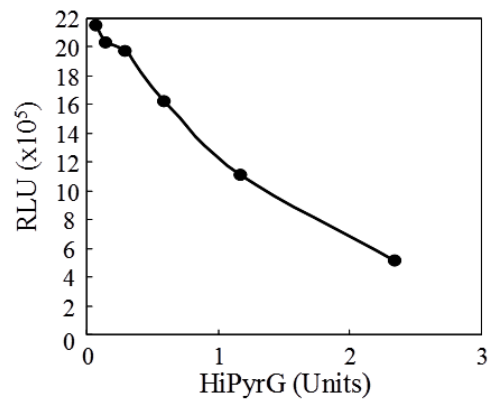
## 第2節 PyrG 酵素アッセイ系構築

PyrG の有する ATPase 活性は、第2章の PyrH 阻害剤の探索研究で用いた測定系と同様に、ATP 量依存的に発光する Kinase-Glo (Promega Corporation) を用い、ATPase 反応により消費される ATP 量を相対発光量により測定した。具体的には本系で、SpPyrG および HiPyrG 濃度依存的な相対発光量の減少が認められたことから、SpPyrG および HiPyrG の ATPase 活性を検出できると考えた (Fig. 12)。酵素反応における基質である UTP の濃度依存性について SpPyrG および HiPyrG を用いて評価した。SpPyrG および HiPyrG 未添加条件で相対発光量が UTP 濃度に拘わらずほぼ一定である条件で、SpPyrG および HiPyrG の ATPase 活性は UTP 依存的な反応であることが確認された (Fig. 13)。Rat 由来の CTP synthase が acivicin (グルタミンアナログ) により阻害されると報告<sup>24)</sup>されているため、SpPyrG および HiPyrG について、acivicin による阻害作用を検討した。いずれの酵素も acivicin により阻害され、IC<sub>50</sub> はそれぞれ 1.2 および 0.51 μM であった (Table 7, p.84)。本評価で SpPyrG および HiPyrG が acivicin により阻害されることが初めて明らかとなった。

A

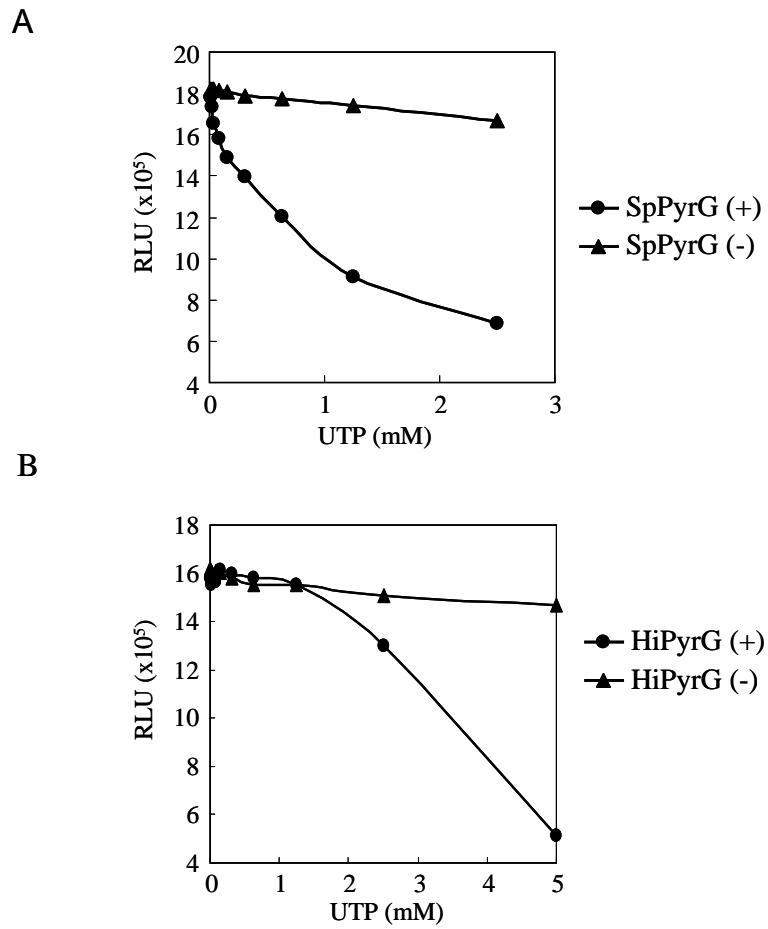


B



**Figure 12. Inverse correlation of PyrG ATPase activity with relative luminescence units (RLU).**

SpPyrG (a) および HiPyrG (b)の酵素量に逆相関する形で RLU 値の減少すなわち ATP 量の減少が認められた。



**Figure 13. UTP dose-dependency in *S. pneumoniae* and *H. influenzae* PyrG activity.**

SpPyrG (a)および HiPyrG (b)による ATPase 活性は UTP の添加とともに向上した。SpPyrG (2 units/well)または HiPyrG (1.5 units/well) を使用した評価である。

Circle; PyrG 添加条件

triangle; PyrG の代わりに滅菌水を添加した条件

### 第3節 *S. pneumoniae* PyrG を用いた HTS

HTS は 384 ウェルプレートを用い市中肺炎で最も分離頻度が高い *S. pneumoniae* の阻害剤を検出、評価するために SpPyrG 酵素アッセイ系にて実施した。系のバリデーションの一環として HTS 実施前にまずプレートに①酵素未添加②酵素添加③酵素および阻害物質である acivicin の IC<sub>50</sub> 付近の濃度 (1.14 μM) 添加の 3 条件で 128 well 分ずつ添加し測定したところ (Fig. 14)、acivicin 添加群の平均阻害率は 38%、CV 値は 3.4% と本系はバラツキが小さい系であると考えられた。なお阻害率の算出は、第 2 章と同様の方法により実施した。続いて第一三共が保有する合成ライブラリーに対して、HTS を実施した。HTS の一例を Figure 15 に示す。HTS 時の Z' 値は 0.5 以上であり、安定な条件下で実施した。再現性の得られた HTS ヒット率は約 0.19% であった。これら化合物に対して、構造面の懸念 (脂溶性が高い、化学的に反応性が高いと考えられる構造を有する、分子量が大きいなど) から継続評価を中止した化合物を除外後、*S. pneumoniae* に対して 64 μg/mL で菌の増殖阻害活性を有する、または HiPyrG の IC<sub>50</sub> が ≤10 μg/mL かつ *H. influenzae* ΔacrA に対して 32 μg/mL で増殖阻害活性を有するという基準より、数十化合物に絞込んだ。これらについて第 4 節に示すグルタミン変換アッセイ、飽和移動差スペクトル法による競合アッセイを行い、COMPOUND G1 (Fig. 16) を見出した。なお、COMPOUND G1 の HTS 時の SpPyrG 阻害率は、ほぼ 100% であった。

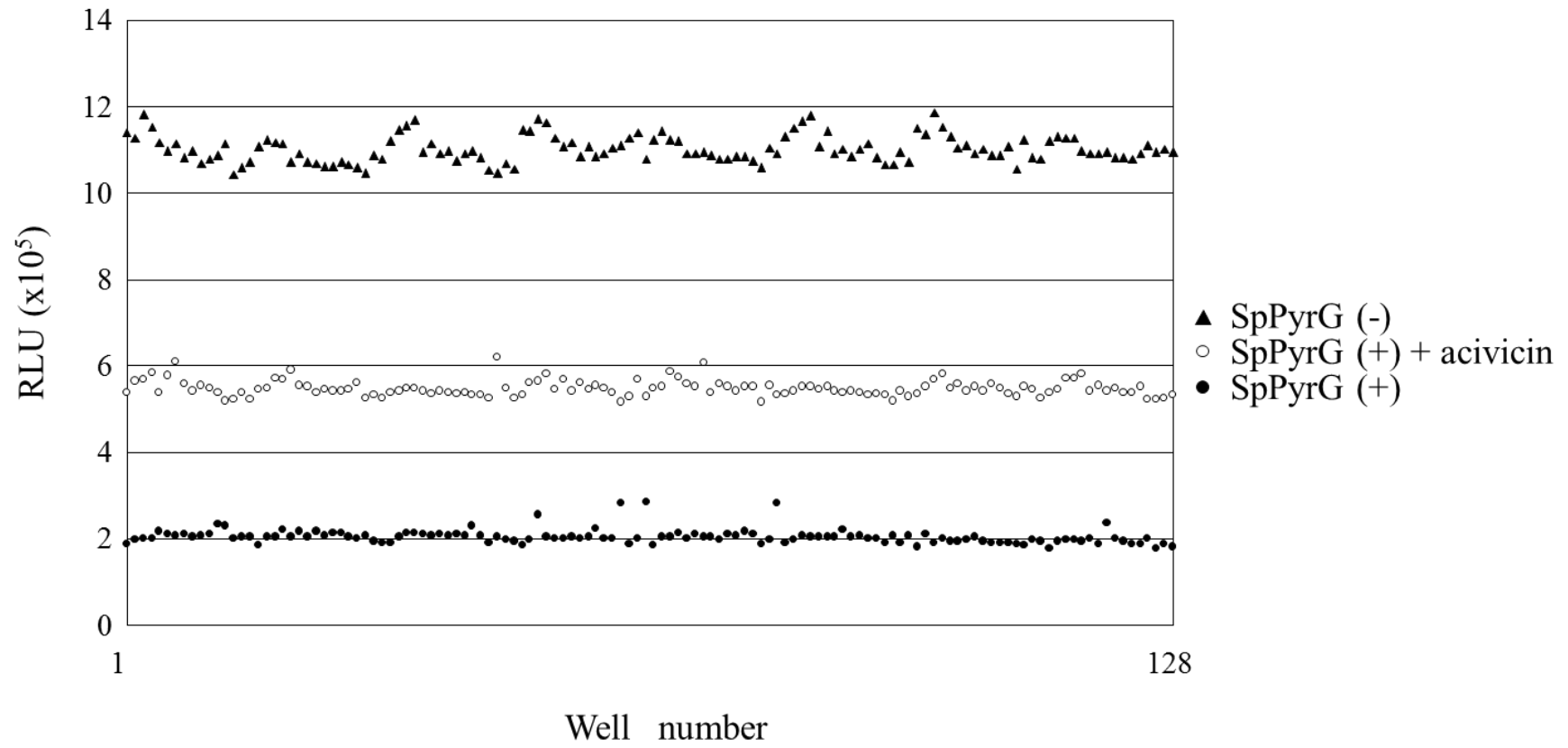


Figure 14. Evaluation of *S. pneumoniae* PyrG ATPase screen.

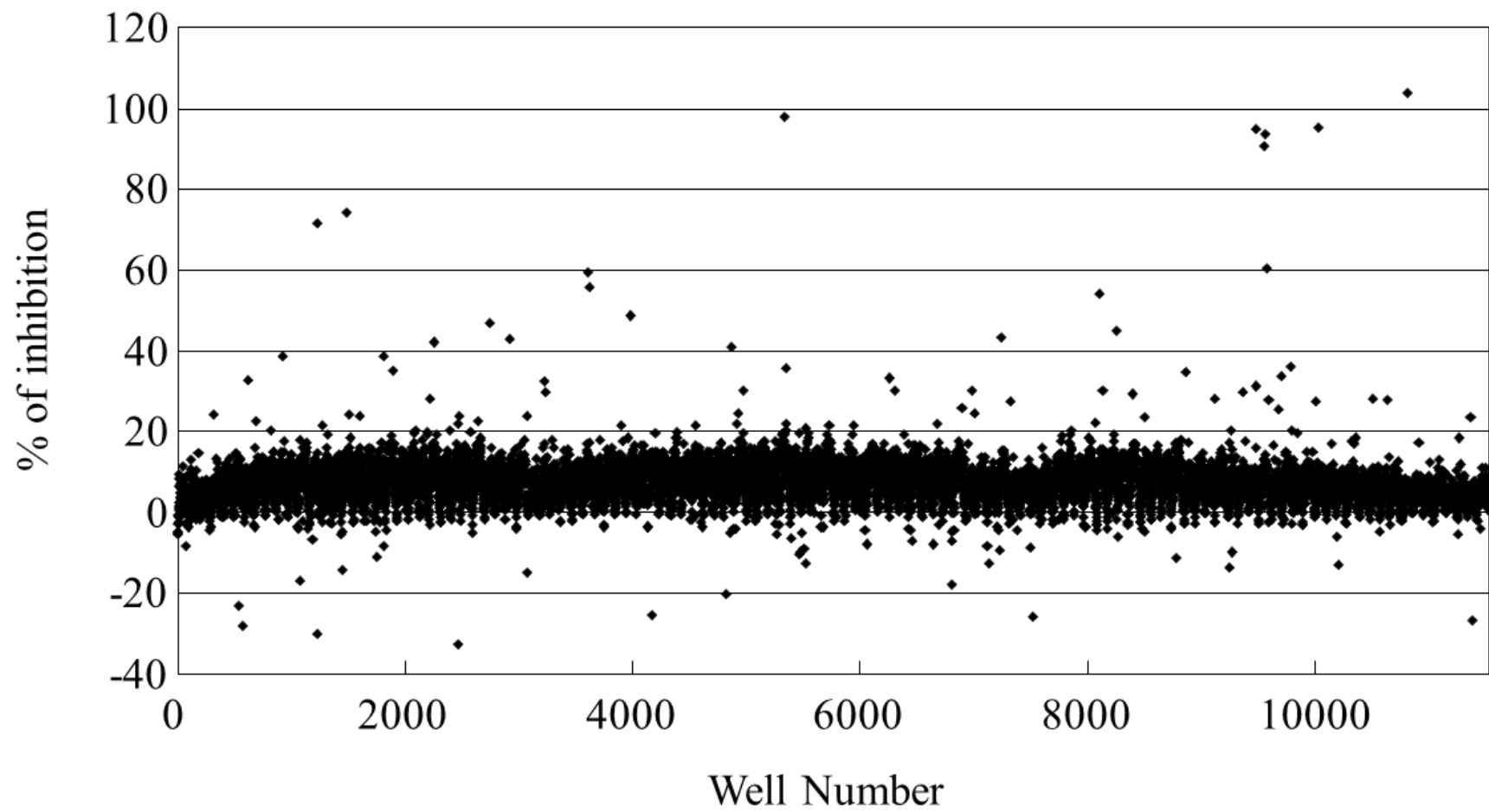
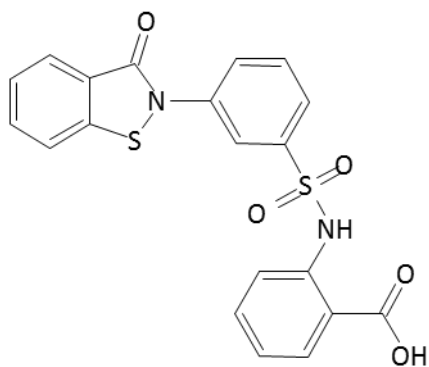


Figure 15. An example of 384 well high throughput screening (percent of inhibition).



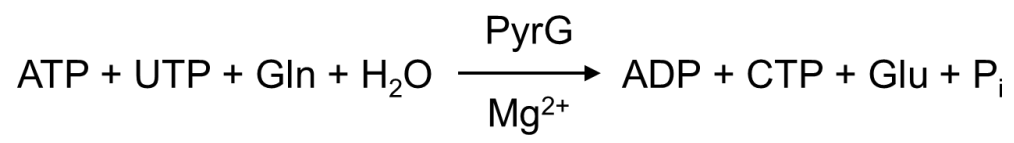
**Figure 16. Chemical structures of COMPOUND G1.**

化合物提供会社からの COMPOUND G1 の構造情報を示す。本研究で用いた COMPOUNDG1 は分解が無いことを液体クロマトグラフィーで確認している。



#### 第4節 COMPOUND G1 の NMR 解析

PyrG の CTP 合成反応式を Figure 17 に示す。HTS では、ATPase 反応により消費される ATP 量を測定することで COMPOUND G1 を見出したが、異なるアッセイ系でも CTP 合成反応を阻害することを確認するため、COMPOUND G1 が Gln から Glu への変換を阻害することを検討した。具体的には SpPyrG による Gln から Glu への変換反応で Glu  $\gamma$  位のプロトンに生じる化学シフト変化を NMR 装置 AVANCE600 で測定した。NMR 解析は、第一三共株式会社創薬化学研究所にて実施した。変換率は溶媒のみを添加した時の Glu  $\gamma$  位のプロトンシグナル強度を 100% とし、被験化合物添加時のプロトンシグナル強度から換算した。グルタミン変換アッセイをグルタミンアナログである Acivicin を用いて評価した際の結果を Figure 18 に示す。Acivicin 未添加条件では、Gln から Glu へ変換されるが、Acivicin 添加条件では、PyrG への結合を示す Acivicin のシグナルが検出され、Gln のシグナルのみが検出される。COMPOUND G1 無添加時の Gln から Glu への変換率 100% とした場合、COMPOUND G1 添加時の Glu への変換率は 0% であり、グルタミン酸変換アッセイ系においても、COMPOUND G1 が SpPyrG を阻害する可能性が示唆された。続いて作用機序推定のため、SpPyrG を用いて、基質である ATP または UTP と COMPOUND G1 との競合の有無を NMR における飽和移動差 (STD) スペクトル法にて実施した (Fig. 19)。測定は AVANCE600 で行い、COMPOUND G1 無添加時の ATP または UTP の STD シグナル強度をそれぞれ減衰率 0% とし、化合物添加時の ATP および UTP それぞれの STD シグナル強度から減衰率を算出した。その結果、COMPOUND G1 は ATP 減衰率および UTP 減衰率がともに 100% であり、COMPOUND G1 は ATP または UTP と競合していると考えられた。*E. coli* PyrG では ATP および UTP の結合サイトは近接していることが報告<sup>20)</sup>されていることから、COMPOUND G1 は ATP および UTP の結合サイトに結合し、ATP、UTP の PyrG への結合を阻害している可能性がある。



**Figure 17. CTP-forming reaction catalyzed by PyrG (CTP synthase).**

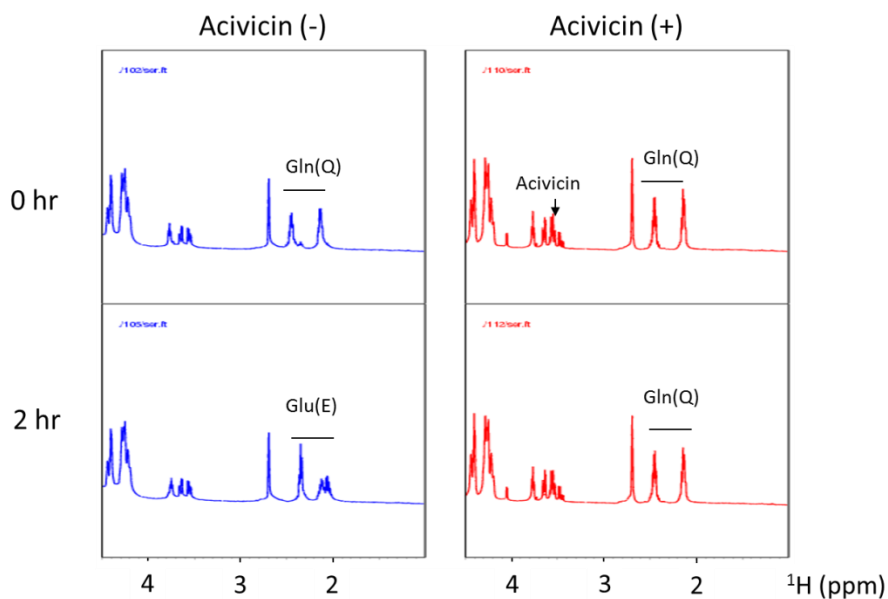


Figure 18. グルタミン酸変換アッセイ

Acivicin を添加しない場合、反応開始（左上）では Gln が検出されるが、反応 2 時間後（左下）には、Glu が検出されるようになる。Acivicin を添加した場合、Acivicin のタンパク質への結合を示すシグナルが検出（右上、右下）されるとともに、反応 2 時間後にも Gln が検出され（右下）SpPyrG による酵素反応が阻害されていると考えられる。

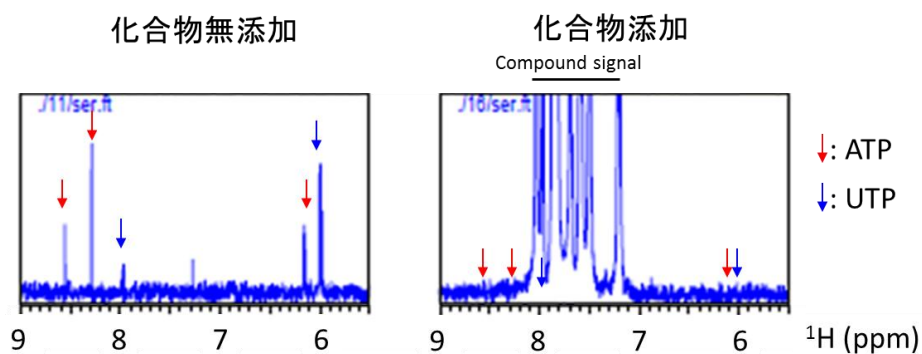


Figure 19. 飽和移動差スペクトル法による競合アッセイ

参照群(左)では、SpPyrG への ATP, UTP の結合を示すシグナルが検出されるのに対して、化合物を添加した場合（右）化合物との結合を示すシグナル（Compound signal）が検出されるとともに、ATP, UTP との結合シグナルが消失する。

## 第 5 節 COMPOUND G1 の有効性（酵素阻害活性、抗菌活性）評価

COMPOUND G1 の SpPyrG との特異的な結合が認められたことから、COMPOUND G1 の酵素阻害活性および市中呼吸器感染症の主要起因菌に対する抗菌活性測定を実施した。Table 7 に COMPOUND G1 の SpPyrG および HiPyrG に対する IC<sub>50</sub> および試験菌株に対する MIC を示す。MIC 測定は、National Committee for Clinical Laboratory Standards の微量液体希釈法を一部改変し、第 2 章と同様の方法で実施した。COMPOUND G1 は SpPyrG に対して、acivicin の IC<sub>50</sub> より小さい値を示した。また、COMPOUND G1 は黄色ブドウ球菌、抗菌剤の排出ポンプとして知られる AcrAB-TolC システムを欠損した *H. influenzae*、*E. coli* に対して抗菌活性を示した。なお、Acivicin は、試験菌株内で複数の代謝反応に用いられるグルタミンのアナログであり、仮に Acivicin で抗菌活性が認められたとしても、PyrG の阻害によるもののみとは考えられず抗菌活性の陽性対照として Acivicin を用いることは適切ではないと判断し、抗菌活性の評価は実施しなかった。

**Table 7. IC<sub>50</sub>s/MICs of COMPOUND G1 against bacteria tested in this study.**

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)		MIC (μg mL <sup>-1</sup> )			
	SpPyrG	HiPyrG	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>H. influenzae</i> Δ <i>acrA</i>	<i>E. coli</i> Δ <i>tolC</i>
Compound G1	0.091	0.45	>128	16	16	64
Acivicin	1.2	0.51	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

N.T.: Not tested

COMPOUND G1 と acivicin の SpPyrG に対する IC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.039 および 0.21 μg/mL に相当する。HiPyrG に対する IC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.19 および 0.092 μg/mL に相当する。

## 第6節 考察

以上の結果より、COMPOUND G1 は SpPyrG を用いた NMR 特異性解析の結果、ATP または UTP と競合する可能性が示唆され、市中肺炎の起因菌である *S. aureus*、*H. influenzae* (*acrA* 欠損株)、*E. coli* (*tolC* 欠損株) に抗菌活性を示すことが明らかとなった。細菌の細胞内で PyrG が COMPOUND G1 により阻害されることを確認する目的で、MIC 測定時に用いた培地中に 500  $\mu\text{M}$  の CTP (細胞増殖に影響を与えないことを確認済) を添加しても COMPOUND G1 の MIC に変化を与えなかった (data not shown)。CTP では細胞内への移行性が悪い可能性が考えられるため Cytidine を添加するなど工夫することで細菌の細胞内での COMPOUND G1 の阻害メカニズム解析が可能となると考えられる。また、耐性菌の分離、または PyrG の過剰発現により COMPOUND G1 の細菌に対する増殖阻害活性が減弱することを確認する相補実験を行うことで、細菌の細胞内における COMPOUND G1 の作用機序解析が可能となる。COMPOUND G1 では認められなかったが、STD スペクトル法による ATP または UTP との競合解析において、競合が不十分な場合は、化合物添加時の ATP または UTP の減衰率が 100% 阻害とならず、数十% で頭打ちになる場合があるほか、ATP や UTP の結合ポケットに対する阻害と異なる阻害様式を示す化合物の場合は、ATPase アッセイやグルタミン変換アッセイで阻害を示しても減衰率 0% となる化合物も存在する。PyrG の ATP および UTP 結合ポケットは近接<sup>20)</sup>しており、COMPOUND G1 がこれら結合ポケットに結合して阻害する可能性があるが、1 分子の SpPyrG に対して何分子の COMPOUND G1 が結合しているかは不明である。ATP および UTP の各結合ポケットに結合する場合は、2 分子の COMPOUND G1 が結合することも考えられる。また、酵素反応速度論の観点から  $K_m$ 、 $V_{max}$  を算出することで、その阻害様式が競合もしくは非競合であるかといった酵素学的解析が可能となる。

PyrG の酵素アッセイ系として、これまでは、NADH の消費を指標として 340 nm の吸光度を測定することにより評価しているものが知られている。PyrG の系構築でも第 2 章で記

載した留意点を加味したアッセイ系としている。

また、今回酵素の精製では、**native** な活性を期待して可溶性画分の **PyrG** を精製したが、不溶性画分にも **PyrG** は検出された。ちなみに **PyrG** の不溶性画分から **Urea** 等で再可溶化し、精製した **PyrG** を用いて **acivicin** による酵素阻害アッセイを行ったが、酵素比活性が低く、多くの酵素を必要としたこともあり  $IC_{50}$  が **native** な条件で精製した **PyrG** を用いて評価した値より大きくなったことから使用を中止している。また **PyrG** の精製過程で夾雑物が含まれたが、**acivicin** や **COMPOUND G1** で **PyrG** の酵素活性は 100% 阻害されることから本評価系に与える影響はほぼ無いと考えている。

## 第 7 節 実験方法詳細

### 1) 使用菌株

本研究で使用した菌株を Table 8 に示した。

**Table 8. 使用菌株**

Organism	Strain No.	Description
<i>S. pneumoniae</i>	TIGR4	This strain was obtained from American Type Culture Collection and used for the cloning of <i>pyrH</i> .
	1414021	This strain was clinically isolated in Japan in 2002 and used for the measurement of the MIC.
<i>H. influenzae</i>	Rd KW20	This strain was obtained from American Type Culture Collection and used for the cloning of <i>pyrH</i>
	Rd KW20 $\Delta$ <i>acrA</i>	This strain was constructed by deleting the <i>acrA</i> gene and replacing it with a gene that confers resistance to chloramphenicol ( <i>cat</i> ).
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$	This strain was obtained from TOYOBO Co., Ltd. and used for the cloning of <i>pyrH</i> .
	Rosetta-Gami B (DE3)	This strain was obtained from Novagen and used for the expression of PyrH
	K-12 MG1655 $\Delta$ <i>tolC</i>	This strain was constructed by deleting the <i>tolC</i> gene and used for the measurement of the MIC.
<i>S. aureus</i>	ATCC6538P	This strain was obtained from American Type Culture Collection and used for the measurement of the MIC.

### 2) PyrG 発現系菌株と培養条件

遺伝子のクローニングには *E. coli* DH5 $\alpha$  (competent high *E. coli* DH5 $\alpha$ 、東洋紡績株式会社)、PyrG 発現系の親株として *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) (Novagen) を用いた。PyrG 発現用のベクターには pET15b (Novagen) を用いた。菌株の培養は第 2 章に記載の方法と同様に実施した。



### 3) DNA 調製

第 2 章に記載の方法と同様に実施した。

### 4) PCR

PCR は Tetrad Thermal Cycler (MJ Research Inc.) を用い、以下の条件にて実施した。*S. pneumoniae* TIGR4、*H. influenzae* Rd KW20 の染色体 DNA からの *pyrG* の増幅のため、2.5 U AccuPrime Pfx DNA polymerase、1×AccuPrime Pfx Reaction mix (Life Technologies Japan Ltd.) および 0.3 μM の各プライマー (6 に記載) を含む PCR 反応バッファー (50 μL) を調製し、染色体 DNA を添加後、PCR 反応 (95°C 2 分を 1 サイクル、95°C 15 秒、57°C 30 秒、68°C 60 秒/kilobase を 30 サイクル) を実施した。Colony-direct PCR は、第 2 章に記載の方法と同様に実施した。

### 5) 形質転換およびシーケンス解析

第 2 章に記載の方法と同様に実施した。

### 6) *pyrG* のクローニング

*S. pneumoniae pyrG* のクローニングには、*S. pneumoniae* TIGR4 の染色体 DNA を鋳型として、プライマー SpPyrG-N-XhoI (5'-CCGCTCGAGATGTCTACGAAATATATTTTTGTAACTGTGGTG-3') および SpPyrG-C-XhoI (5'-GGCCTCGAGCTAATTGCTGTTCTCAACTGCTGC-3') を用いた PCR により全長 *pyrG* を増幅した。*H. influenzae pyrG* のクローニングには、*H. influenzae* Rd KW20 の染色体 DNA を鋳型として、プライマー HiPyrG-N-XhoI (5'-CCGCTCGAGATGGCTACAAATTATATTTTCGTCCTACTGG-3') および HiPyrG-C-XhoI (5'-GGCCTCGAGTTACTTCACAGATTTTTTGTGATTTTCATAGGC-3') を用いた PCR により全長 *pyrG* を増幅した。PCR 産物は精製後、1×H buffer、165 U XhoI (いずれもタカラバイ

オ株式会社) を含む反応液中で 37°C、1 時間以上制限酵素処理し精製した。pET15b は同条件で XhoI 処理し、精製後 alkaline phosphatase (calf intestine) (タカラバイオ株式会社) を用い、試薬添付のマニュアルに従って脱リン酸化反応を行った。ベクター (XhoI/alkaline phosphatase 処理 pET15b) およびインサート (XhoI 処理 PCR 産物) は DNA Ligation Kit Ver. 2 (タカラバイオ株式会社) を用い、2  $\mu$ L のベクター、7  $\mu$ L のインサート、9  $\mu$ L の solution I を混合、16°C で 3 時間以上インキュベートすることによりライゲーションさせた。その後、*E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換し、colony-direct PCR で挿入が確認されたクローンからプラスミドを精製し、シーケンス解析により目的の方向にインサートが挿入され、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* の既報配列と 100% 一致したものをそれぞれ pET15b-SpPyrG および pET15b-HiPyrG とした。

#### 7) 組換え PyrG の発現と精製

第 2 章に記載の方法と同様に実施した。

#### 8) PyrG 酵素アッセイ

PyrG の有する ATPase 活性は、ATP 量依存的に発光する Kinase-Glo (Promega Corporation) を用い、ATPase 反応により消費される ATP 量を相対発光量により測定した。アッセイは秤量した被験化合物に測定最高濃度の 50 倍濃度となるように溶媒 [化合物は DMSO:MeOH (7:3)、acivicin は滅菌水] を加えて溶解し、溶媒で 2 倍段階希釈、被験化合物溶液を 2% (v/v) になるように添加後、2 unit/well の SpPyrG あるいは 1.5 unit/well の HiPyrG と混和し、70 mM HEPES (pH7.0-7.6) (Sigma-Aldrich Co.)、0.5 mM L-glutamine、0.5 mM EDTA、10 mM MgCl<sub>2</sub> (いずれも和光純薬工業株式会社)、1 mM (SpPyrG) または 5 mM (HiPyrG) UTP、5  $\mu$ M ATP (いずれも Sigma-Aldrich Co.) を添加・混和後、37°C で 2 時間 (SpPyrG) あるいは 2.5 時間 (HiPyrG) インキュベートした (いずれも終濃度)。HTS 時は 0.8 unit/well (384 ウェル白ブ

プレート) の SpPyrG を使用し、室温で反応した。酵素反応後に反応液 (96 ウェル白色ハーフエリアプレートの場合は 50  $\mu$ L、384 ウェル白プレートの場合は 20  $\mu$ L) と等量の Kinase-Glo 試薬を添加、混和し、室温で 10 分反応後、相対発光量を測定した (96 ウェル白色ハーフエリアプレートの場合は ARVO、384 ウェル白プレートの場合は ViewLux にて測定した (いずれも Perkin Elmer Co.,Ltd.))。被験化合物溶媒である 2% (v/v) DMSO:MeOH (7:3) を添加した反応を阻害率 0%、2% (v/v) DMSO:MeOH (7:3) を添加し、酵素の代わりに滅菌水を添加した反応を阻害率 100% とした。被験化合物添加時の ATPase 活性の阻害率 (%) は第 2 章に記載の式 2 に従い算出した。N=2 で求められる阻害率の平均値が 50% を挟む 2 点より直線式を求め、これより IC<sub>50</sub> を算出した。なお、37°C、2 時間で 0.1 nmol の ATP を分解する酵素活性を 1 unit とした。

#### 9) HTS 方法

第一三共が保有する合成ライブラリーに対して SpPyrG を用いた HTS を 384 ウェル白プレートで実施した。DMSO:MeOH (7:3) に溶解した検体を最終濃度が 10  $\mu$ g/mL となるように添加した。ヒット基準は、阻害率 40% 以上とした。HTS 系の安定性を確認するために Z' 値は序論に記載の式 1 を用いて算出した。

#### 10) MIC 測定

第 2 章と同様の方法により測定を実施した。

#### 11) NMR を用いた特異性評価

NMR を用いた特異性評価は、第一三共株式会社創薬基盤研究所で実施した。

##### 11-1) グルタミン酸変換アッセイ

SpPyrG による Gln から Glu への変換反応で Glu  $\gamma$  位のプロトンに生じる化学シフト変化

を NMR 装置 AVANCE600 (Bruker Biospin K.K.)で測定した。NMR 試料管 (株式会社シゲミ)に 500  $\mu$ M の被験化合物を含む 10% (v/v) DMSO-*d*6 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc) と PBS (pH7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM DTT、0.5 mM ATP、0.5 mM UTP、0.5 mM Gln を混和し、1  $\mu$ M の SpPyrG を添加、混和後、室温で 2 時間インキュベーションすることで Gln から Glu への変換反応を行い、反応後に 10 mM EDTA を添加、混和することで反応を停止し、プロトンスペクトルを測定した (いずれも終濃度)。(A) 被験化合物溶媒である 10% DMSO-*d*6 を添加した反応 (変換率 100%) の Gln  $\gamma$  位のシグナル強度、(B) 被験化合物を添加した反応の Gln  $\gamma$  位のプロトンシグナル強度を測定し、 $100 \times B/A$  を Gln から Glu への変換率 (%) とした。なお、各プロトンシグナル強度は 0.5 mM sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (Eurisotop) 添加時のシグナル強度を用いて標準化した値を用いた。

#### 11-2) 飽和移動差 (STD) スペクトル法による競合アッセイ

ATP および UTP に対する STD スペクトル法による競合実験は、500  $\mu$ M の被験化合物を含む 10% (v/v) DMSO-*d*6 と 50 mM Tris-*d*11 (pH7.5) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)、150 mM NaCl、2 mM DTT、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM ATP、0.1 mM UTP を混和し、10  $\mu$ M の SpPyrG を添加、混和後、AVANCE600 で STD スペクトルの測定を行った。(A) 被験化合物溶媒である 10% DMSO-*d*6 を添加した反応 (減衰率 0%) の ATP および UTP の各 STD シグナル強度 (B) 被験化合物を添加した反応の ATP および UTP の各 STD シグナル強度を測定し、 $100 \times (A-B) / A$  を ATP および UTP の減衰率 (%) とした。なお、各 STD シグナル強度は、飽和パルス未照射時の STD シグナル強度を用いて標準化した値を用いた。

## 第4章 総括

世界的に高齢化が進む中で、呼吸器感染症対策は非常に重要な課題の一つである。人類の歴史の中で抗菌剤は、細菌性肺炎を劇的に治癒させるものであり、医学医療の進歩の象徴であった。抗菌剤の発見以降、改良新薬を含め複数の抗菌剤が開発されてきたが、近年では多剤耐性 PRSP、BLNAR など既存薬に対する薬剤の耐性化は年々増加傾向であり、新規の作用機序を有し耐性菌に対しても有効な抗菌薬の開発が望まれている。主要病原細菌の全ゲノム配列決定後、比較ゲノム解析により、ヒトとの選択性が期待され、細菌間で保存性の高いタンパク質が市中呼吸器感染症治療薬標的候補として選ばれてきている。この標的候補は複数あり、その優先順位付けは重要な課題の一つと考えられる。そこで本研究では、新規作用機序を有する抗菌薬候補化合物の探索を目的として、*E. coli* を用いた殺菌性評価系の構築を行い、呼吸器感染症治療薬の標的候補に対する殺菌性評価を行った。さらに、標的候補タンパク質である UMP キナーゼおよび CTP 合成酵素阻害剤に関する研究を行った。本章では、第1章から第3章までの成果のまとめと本研究に関連する新規抗菌剤探索研究の進捗を含めた今後の展望について述べる。

### 第1章のまとめ

複数の新規薬剤標的タンパク質に対して、標的阻害による殺菌性が評価できれば、標的タンパクの優先順位付けにとって重要な指標となりうる。しかしながら、これまで任意の標的に対する殺菌性が評価可能な系は存在していなかった。本研究では、標的タンパク質の発現を制御することで殺菌性を評価することを目的として、*E. coli* を用いて、トリプトファンプロモーターによる転写制御と N-end rule によるタンパク質分解制御が可能な系を、市中呼吸器感染症治療薬標的候補 10 遺伝子について構築した。これらの株を用いた短時間殺菌性評価により、DnaB、GlmU、DnaX 阻害は殺菌的、FabB、PyrG、DnaG、Der、PyrH、Era、IspA 阻害では静菌的な作用が示唆された。以上の結果より、本系は任意の遺伝子に対して

発現制御に基づく殺菌性評価が可能な系であることが示された。また、DnaB、GlmU、DnaX は殺菌性が期待される点で、有望な標的であると考えられた。

## 第2章のまとめ

PyrH は UMP と ATP からリン酸化反応により UDP と ADP を生成する UMP キナーゼである。第1章の実験結果では、PyrH は静菌的な標的であったが、ヒトには相同遺伝子が存在しないことから有望な標的候補であると考えた。そこで、PyrH 阻害剤の獲得を目的に市中肺炎の起因菌である *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来の PyrH を用いた酵素アッセイ系を構築し、*S. pneumoniae* PyrH (SpPyrH) の酵素阻害活性を指標に阻害剤探索ハイスループットスクリーニング (HTS) を行った。得られた HTS ヒットから絞り込まれた化合物である PYRH-1 (sodium {3-[4-tert-butyl-3-(9H-xanthen-9-ylacetyl-amino)phenyl]-1-

cyclohexylmethylpropoxycarbonyloxy} acetate) は *S. pneumoniae* 及び *H. influenzae* PyrH に対する IC<sub>50</sub> がそれぞれ 48 および 75 μM であり、PyrH に対してアロステリックな阻害活性が知られる UTP の *S. pneumoniae* PyrH に対する IC<sub>50</sub> (750 μM) より小さい値を示した。PYRH-1 の表面プラズモン共鳴による平衡化解析の結果では、検討濃度範囲で理論的 R<sub>max</sub> 値 (222 RU) 内でのシグナルの収束が認められ、本化合物は SpPyrH と 1 対 1 で特異的に結合することが示唆された。また、PYRH-1 は市中肺炎の起因菌である *S. pneumoniae*、*S. aureus*、*H. influenzae* (*acrA* 欠損株) に抗菌活性を示した。以上の結果から、PYRH-1 は細菌の PyrH の活性抑制を作用機序とするプロトタイプ抗菌化合物であると考えられた。

## 第3章のまとめ

PyrG は UTP から CTP の合成反応を触媒するピリミジン生合成経路に必須な CTP synthase である。第1章の実験結果では、PyrG は静菌的な標的ではあったが、ヒト相同遺伝子との選択性が期待されることから有望な標的候補であると考えた。そこで、PyrG 阻害剤の獲得

を目的に発光検出による ATPase assay 系を *S. pneumoniae* および *H. influenzae* 由来の PyrG について構築し、*S. pneumoniae* PyrG の酵素阻害活性を指標に阻害剤探索 HTS を行った。得られた HTS ヒットから絞り込まれた化合物 COMPOUND G1 (2-(3-[3-oxo-1,2-benzisothiazol-2(3H)-yl]phenylsulfonylamino) benzoic acid) は、*S. pneumoniae* PyrG に対し IC<sub>50</sub> が 0.091  $\mu$ M であり、acivicin (グルタミンアナログ) の IC<sub>50</sub> (1.2  $\mu$ M) より 13 倍小さい値を示した。本化合物の作用機序推定のため、*S. pneumoniae* PyrG を用いて、基質である ATP または UTP と COMPOUND G1 との競合の有無を NMR における飽和移動差スペクトル法にて検討した。COMPOUND G1 は ATP 減衰率および UTP 減衰率がともに 100% の減衰率を示し、ATP または UTP と競合していると考えられた。また、COMPOUND G1 は市中肺炎の起因菌である *S. aureus*、*H. influenzae* (*acrA* 欠損株) に抗菌活性を示した。以上から本化合物は、細菌の PyrG を阻害し、新規骨格を有するプロトタイプ抗菌化合物であると考えられた。

## 今後の展望

第 1 章では *E. coli* を対象に条件抑制型プロモーターを用いた転写制御と N-end rule を利用したタンパク質分解制御系を構築し、コロニー形成を指標に標的遺伝子産物の枯渇が殺菌性を示すかどうかを調べた。今回対象とした遺伝子は、必須遺伝子であり、転写・分解制御により静菌または殺菌的になるため、mRNA 量やタンパク質量の推移解析が難しく、それらを詳細に検討するに至っていない。今後はたとえば、非必須遺伝子でありモデル分子として利用可能な GFP を用いて qRT-PCR、ウェスタンブロッティング等を行うことによって、本系における標的遺伝子産物の消長を分子レベルで解析することが必要であると考えている。今回は十分な栄養条件下でも殺菌性を示す標的候補を選択するために LB broth を用いて評価を実施したが、実際の宿主における細菌の増殖環境とは異なることから嫌気性条件下や Uridine や Cytidine 存在下などの条件で殺菌性評価を行うことで、各標的遺伝子産

物の機能阻害時の殺菌性に関する知見が深まると考えられる。

本研究以降、これまでに追加で 3 遺伝子の殺菌性評価を行っており、複製および細胞壁合成にかかわる遺伝子産物の機能阻害は殺菌的な効果を示し、脂肪酸生合成系にかかわる遺伝子産物の機能阻害は静菌的な効果を示す可能性が高いことが示唆された。今後、さらに多くの遺伝子について調べることで、標的遺伝子産物の機能阻害が及ぼす影響が殺菌的であるのか静菌的であるのかについての知見が深まると期待される。

第 2 章、第 3 章では、(i) PyrH と直接結合して阻害活性を示す PYRH-1、(ii) PyrG を ATP、UTP の結合阻害を作用機序とし直接阻害する COMPOUND G1 をそれぞれ見出した。これら化合物の抗菌活性はすぐに臨床に使用できるレベルではないが、今後、誘導体展開により活性に必須な化合物の母格の同定、活性や動態を含む物性向上に有用な側鎖の同定といった構造活性相関について研究を進めていくと共に呼吸器感染症の各種起因菌に対する抗菌活性測定（抗菌スペクトル解析）やたとえば肺炎球菌だとしても実験に用いるための標準株だけでなく臨床分離された PRSP 等を含む多様な感受性を示す肺炎球菌に対する抗菌活性を評価することで新規抗菌化合物の創製につながる可能性がある。

本研究以降、これまでに PYRH-1 の類縁体を評価し、構造活性相関データを取得している。COMPOUND G1 については、同様に類縁体の評価を進めているが、その他の HTS ヒット化合物の評価を進めており、ATP, UTP の結合をともに阻害する化合物、ATP の結合のみ阻害する化合物、ATP, UTP 結合サイトとは競合しない化合物を複数得ている。

今回 kinase-glo を用いて HTS に必要な要素を兼ね備えた ATPase アッセイを基本とする酵素アッセイ系を構築した。本研究以降、殺菌的な結果が得られた標的について同様のアッセイ系を 2 系立ち上げており、HTS および SPR 等の高次評価を進めている。このように類似の ATPase アッセイ系を複数並行して評価を実施することで、複数の系で非特異的に阻害する化合物を分類することや、ごくまれに認められるアッセイ系の阻害化合物を除外することができる。



追加で実施した他の標的候補タンパク質に対する HTS の過程で、スクリーニングのヒット化合物を誘導体展開し得られたリード化合物は、当該酵素に対する IC<sub>50</sub> が数 ng/mL であり、*S. pneumoniae*, *S. aureus* に対する MIC が数 ng/mL、*H. influenzae* に対する MIC も数十 ng/mL である化合物を見出している。本化合物は新規薬剤標的に作用することから既存の臨床分離株に対しても有効であり、PRSP, MRSA, BLNAR, VRE 等の薬剤耐性菌に対しても薬剤感受性株に対する MIC と同等の抗菌作用を発揮することが明らかにされている。本リード化合物は、細胞毒性等安全性に疑念を抱く宿主への毒性作用は認められず、PRSP のマウスに対する感染実験においても薬剤作用下では感染を防御することが明らかにされており、第一三共グループで評価を継続している。

このように、本研究はすでに枯渇しているといわれる呼吸器感染症治療薬の探索にひとつの道筋を立てることが可能となる成果として位置づけられる。今後も今回得られた知見を活用し、グローバルに抗菌剤の研究拠点を有する第一三共グループは呼吸器感染症治療薬の研究開発を行っていくこととなる。同時に前述の結果についても科学的知見を論文等で公表することを通じて、新規抗菌剤を研究する科学者へ貢献することが期待される。

## 謝辞

本論文提出の機会をお与えいただき、ご指導、ご高配を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 醗酵学研究室大西康夫教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました第一三共株式会社 生物医学第四研究所（当時） 第四グループ長 山下誠博士、鎌井泰樹博士に心から感謝いたします。

本研究の実施において HTS の実施、補助をしていただき、終始有益なるご助言を賜りました第一三共株式会社 生物医学第四研究所（当時） 那須初美副主任研究員および難波栄子研究員に深く感謝いたします。

また、SPR による平衡化解析および NMR を用いた特異性解析にご協力いただき御助言を賜りました第一三共株式会社 創薬化学研究所（当時） 生方修専門研究員に深く感謝の意を表します。

本論文の主要論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なる御指導、御鞭撻を賜りました第一三共株式会社 武下文彦博士に篤く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:29-40
- 2) Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Klinger A et al. A MurF inhibitor that disrupts cell wall biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4420-4426
- 3) Fleischmann RD, Adams MD, White O et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995;269: 496-512
- 4) Hoskins J, Alborn WE Jr, Arnold J (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 2001;183: 5709-5717
- 5) Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I et al. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001;357: 1225-1240
- 6) Doudar SM & Snodgrass WR. Potential role of fluoroquinolones in pediatric infections. *Rev Infect Dis* 1989;11:878-889
- 7) von Rosenstiel N & Adam D. Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 1994;47:872-901
- 8) Anderson VR & Perry CM. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. *Drugs* 2008;68:535-565
- 9) Kaur P, Agarwal S, Datta S. Delineating bacteriostatic and bactericidal targets in *mycobacteria* using IPTG inducible antisense expression. *PLoS One*, 2009;4:e5923.
- 10) Wei JR, Krishnamoorthy V, Murphy K, Kim JH, Schnappinger D, Alber T, Sasseti CM, Rhee KY, Rubin EJ. Depletion of antibiotic targets has widely varying effects on growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011;108:4176–4181
- 11) Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, et al. The N-end rule in bacteria. *Science* 1991;254:1374-1377
- 12) Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:12142-12149
- 13) Link AJ, Robison K, Church GM. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 1997;18:1259
- 14) Tobias JW, Varshavsky A. Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1991;266:12021-12028
- 15) Chevalet L, Robert A, Gueneau F, et al. Recombinant protein production driven by the tryptophan promoter is tightly controlled in ICONE 200, a new genetically engineered *E. coli* mutant. *Biotechnol Bioeng.* 2000;69:351-358
- 16) Thanassi JA, Hartman-Neumann SL, Dougherty TJ et al. Identification of 113 conserved

- essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 2002;30:3152-3162
- 17) Song JH, Ko KS, Lee JY et al. Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. Mol Cells. 2005;19:365-374
  - 18) Akerley BJ, Rubin EJ, Novick VL et al. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:966-971
  - 19) Long CW & Pardee AB Cytidine triphosphate synthetase of *Escherichia coli* B. I. Purification and kinetics. J Biol Chem 1967 242, 4715-4721.
  - 20) Endrizzi JA, Kim H, Anderson PM, Baldwin EP. Mechanisms of product feedback regulation and drug resistance in cytidine triphosphate synthetases from the structure of a CTP-inhibited complex. Biochemistry 2005;44: 13491-13499
  - 21) Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW et al. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. J. Bacteriol. 2003;185:5673
  - 22) Lim MI, Moyer JD, Cysyk RI, Marquez VE. Cyclopentenyluridine and cyclopentenylcytidine analogues as inhibitors of uridine-cytidine kinase. J Med Chem 1984;27:1536-1538
  - 23) Gharehbaghi K, Zhen W, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T, Jayaram HN. Studies on the antitumor activity and biochemical actions of cyclopentenyl cytosine against human colon carcinoma HT-29 in vitro and in vivo. Life Sci 1998;64:103-112
  - 24) Verschuur AC, van Gennip AH, Brinkman J, Voûte PA, van Kuilenburg AB. Cyclopentenyl cytosine induces apoptosis and secondary necrosis in a T-lymphoblastic leukemic cell-line. Adv Exp Med Biol 2000;486:319-325
  - 25) Brockman RW, Shaddix SC, Williams M, Nelson JA, Rose LM, Schabel FM Jr. The mechanism of action of 3-deazauridine in tumor cells sensitive and resistant to arabinosylcytosine. Ann N Y Acad Sci 1975;255: 501-521
  - 26) Lui MS, Kizaki H, Weber G. Biochemical pharmacology of acivicin in rat hepatoma cells. Biochem. Pharmacol 1982;31: 3469-3473
  - 27) Calos MP. DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation. Nature. 1978;274:762-765
  - 28) Glascock CB & Weickert MJ. Using chromosomal lacIQ1 to control expression of genes on high-copy-number plasmids in *Escherichia coli*. Gene 1998;22: 221-231.
  - 29) Lanzer M & Bujard H. Promoters largely determine the efficiency of repressor action. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988;85:8973-8977
  - 30) Shao Z, Newman EB. Sequencing and characterization of the *sdaB* gene from *Escherichia coli* K-12. Eur. J. Biochem. 1993;212:777-784
  - 31) Jensen PR, Hammer K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates

- the strength of prokaryotic promoters. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:82-87
- 32) Kaito C, Kurokawa K, Hossain MS et al. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of the *Staphylococcus aureus* dnaC gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002;210:157-164
  - 33) Horne D & Tomasz A. Lethal effect of a heterologous murein hydrolase on penicillin-treated *Streptococcus sanguis*, *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;17:235-46
  - 34) Stupina VA & Wang JC Viability of *Escherichia coli* topA mutants lacking DNA topoisomerase I, *J Biol Chem.* 2005;280: 355-360
  - 35) Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 1997;179:6228-6237
  - 36) Bulyk ML, McGuire AM, Masuda N, et al. A motif co-occurrence approach for genome-wide prediction of transcription-factor-binding sites in *Escherichia coli*. *Genome Res.* 2004;14:201
  - 37) Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:6640
  - 38) Florence F, Odile K, Maryse L et al. UMP kinase from *Streptococcus pneumoniae*: evidence for co-operative ATP binding and allosteric regulation. *BioChem. J.* 2004;384:619-627
  - 39) Serina L, Blondin C, Krin E et al. *Escherichia coli* UMP-kinase, a member of the aspartokinase family, is a hexamer regulated by guanine nucleotides and UTP. *Biochemistry* 1995;34:5066-74
  - 40) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-6th ed M7-A6. Wayne, Pa, United States: NCCLS; 2003.

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

- 1) Yoshida T, Nasu H, Yamashita M. Construction of the control system of target molecule expression in *Escherichia coli*: application to a validation platform for bactericidal and bacteriostatic profiles due to suppression of a target molecule. FEMS Microbiol Lett. 2012;331:113-119
- 2) Yoshida T, Nasu H, Namba E, Ubukata O, Yamashita M. Discovery of a compound which acts as a bacterial UMP kinase PyrH inhibitor. FEMS Microbiol Lett. 2012;330:121-126
- 3) Yoshida T, Nasu H, Namba E, Ubukata O, Yamashita M. Discovery of a compound that acts as a bacterial PyrG (CTP synthase) inhibitor. J Med Microbiol. 2012;61:1280-1285