

論文内容の要旨

論文題目 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

氏名 吉田 達彦

序論

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、細菌性肺炎を劇的に治癒させる抗菌剤は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、近年では多剤耐性ペニシリン耐性肺炎球菌、 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。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きたが、任意の標的に対する殺菌性を評価可能な系は知られていない。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、モデル微生物であり、肺炎の起因菌でもある *Escherichia 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。

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

複数の新規薬剤標的候補に対して、殺菌性が評価できれば、そ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、そのような系はこれまで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、*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¹⁾。

第 2 章 PyrH 阻害剤の探索研究で見出された化合物の評価

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原菌である *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus 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-ylacetylamino)phenyl]-1-cyclohexylmethylpropoxycarbonyloxy} acetate) は *S. pneumoniae* 及び *H. influenzae* PyrH に対する IC₅₀ がそれぞれ 48 および 75 μ M 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 SpPyrH に対する IC₅₀ (750 μ M) 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 Rmax 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 は市中肺炎の起原菌である *S. pneumoniae*、*Staphylococcus 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²⁾。

第 3 章 PyrG 阻害剤の探索研究で見出された化合物の評価

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 (SpPyrG) 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、SpPyrG に対し IC₅₀ が 0.091 μM であり、acivicin (グルタミンアナログ) の IC₅₀ (1.2 μM) 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、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 減衰率が共に 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 は市中肺炎の起原因菌である *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³⁾。

第4章 総括

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。

本研究により、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。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ことで新規抗菌化合物の創製につながる可能性がある。

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 および高次評価を進めている。得られたスクリーニングヒット化合物を誘導体展開したリード化合物は臨床で分離された各種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を明らかにしている。

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。

文献リスト

- 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