

2022年11月4日

新潟大学

ライソシン E は抗結核薬の有望なリード化合物である — 新規の抗菌メカニズムを持った抗菌薬 —

新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野の Geberemichal Geberetsadik 特任助教、西山晃史講師、松本壮吉教授らの研究グループは、帝京大学(医真菌研究センター・浜本洋准教授、薬学部寄付講座カイク創薬学講座・関水久特任教授ら)、大阪健康安全基盤研究所、同研究科顕微解剖学分野との共同研究で、放線菌が産生する抗菌物質ライソシン E (lysocin E)^{*1} が、従来の抗結核薬とは異なる抗菌メカニズムで、多剤耐性結核菌に高い抗菌活性を示すことを明らかにしました。

【本研究成果のポイント】

- 結核は現在でも、単独の病原細菌による感染症で最も人命を奪っている。2020 年の死亡者数は、150 万人に上った (WHO, 2021)。
- 新規結核患者及び再燃例全体の治療成功率は 85% (2018 年) だが、多剤耐性 / リファンピシン耐性結核^{*2} では 59% (2018 年) に低下する (WHO, 2021)。既存の抗結核薬と交差耐性の無い新薬の開発が必要である。
- ライソシン E は放線菌が産生する抗菌物質で、黄色ブドウ球菌等の細胞膜中の電子伝達系のメナキノン^{*3} に結合し、細胞膜を障害して殺菌作用を示すことが報告された。
- 本研究グループでは、ライソシン E が多剤耐性菌を含めた結核菌に良好な抗菌活性を示すことを明らかにした。しかも、ライソシン E は除菌に難渋する休眠菌に対しても効果的であった。
- ライソシン E は宿主細胞への浸透性に問題があるものの、同様に浸透性の低い既存薬ストレプトマイシンと比較しても良好な結果を得た。今後の抗結核薬開発において、既存の抗結核薬と交差耐性が無い、新規のメカニズムを持つ有望なリード化合物^{*4} として期待できる。

I. 研究の背景

結核菌の感染によって引き起こされる結核は、単独の細菌による感染症で最も人命を奪っている。2020 年には HIV/AIDS 患者を含め 150 万人以上が結核で死亡したと推計される (WHO, 2021)。抗結核薬や環境ストレス等に低感受性となる休眠菌は活動性結核の主要なソースである無症候の潜伏感染や、治療の長期化に深く関連している。また、多剤耐性結核は治療の成功率を低下させる。休眠菌や薬剤耐性菌の除菌に有効な、新しい作用機序を備えた抗結核薬の開発は急務である。

ライソシン E は土壌放線菌 (*Lysobacter* sp. RH2180-5) が産生する抗菌物質である。黄色ブドウ球菌等の細胞膜中のメナキノンに結合し、細胞膜を障害して殺菌作用を示すことが報告された。メナキノンを含む呼吸鎖は、増殖中、休眠中ともに結核菌の生育に必須である。

II. 研究の概要

本研究は、ライソシン E の結核菌に対する抗菌活性を評価し、その作用機序を解明することを目的

とした。ライソシン E を用いて、複数の多剤耐性菌を含む結核菌の薬剤感受性試験を実施し、被検菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC 値)^{*5}、および最小殺菌濃度 (MBC 値)^{*6} を測定した。結核菌におけるライソシン E の作用機序を明らかにするため、結核菌のメナキノン生合成系の必須遺伝子 *menA*^{*7} の発現抑制株を構築し、結核菌のメナキノン量の低下がライソシン E に対する感受性に及ぼす影響を調べた。また、ライソシン E による結核菌の細胞膜破壊、呼吸鎖阻害 (酸素消費と ATP 合成への影響) を評価した。さらに、マクロファージおよびマウス感染モデルでのライソシン E の有効性を評価した。

III. 研究の成果

ライソシン E は、薬剤感受性試験において、薬剤感受性および耐性結核菌に対して高い抗菌作用を示した。薬剤耐性菌を含めた結核菌に対するライソシン E の MIC 値は $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ であった。また、結核菌 H37Rv 株に対する MBC 値は $0.5 \mu\text{g/ml}$ で、高い殺菌作用を示した。特に、ライソシン E は 7 日間で結核菌の生菌数を $1/10^4$ に低下させ、比較した既存の一次除菌薬 (イソニアジド、リファンピシン、エタンブトール) よりも優れた除菌効果を示した (図 1A)。ライソシン E の抗菌活性は試験培地中に添加したメナキノンによって中和された。また、結核菌のメナキノンの含有量を有意に低下させた *menA* 発現抑制株は、ライソシンに対する感受性が低下したことから、結核菌でもライソシン E が細胞膜のメナキノンに結合して抗菌作用を発現していることが示唆された (図 1B)。実際に、電子顕微鏡解析等によって、ライソシン E が結核菌の細胞膜を障害することを明らかにした (図 1B)。また、ライソシン E は、ATP 合成酵素を標的とする既存薬ベダキリンよりも顕著に結核菌の酸素消費と ATP 合成を阻害した。このように、ライソシン E は、細胞膜障害と呼吸阻害の相乗効果によって、結核菌に対して高い抗菌活性を発現すると考えられた。さらに、ライソシン E は休眠抗酸菌に対しても効果を示した。

THP1 細胞株から分化させたマクロファージに感染した結核菌に対するライソシン E の抗菌活性は、培地中の結核菌に対する活性よりも低かった。これは、ライソシン E のマクロファージ内への浸透性が低いことが原因である可能性がある。しかし、ライソシン E の感染結核菌への有効性は、同じく細胞内浸透性の低い一次除菌薬ストレプトマイシンよりも優れており、またマクロファージ及びマウス感染モデルで結核菌の生菌数を減少させていることから、今後の新薬開発の有望なリード化合物であると言える。

IV. 今後の展開

本研究成果によりライソシン E が、既存の抗結核薬とは異なる抗菌メカニズムを持ち、従来の多剤耐性菌等を含む薬剤耐性結核菌や、現在の活動性結核の主要なソースであり、治療の長期化の主要因でもある休眠菌にも有効な、有望な抗結核薬候補であることが示された。今後は、ライソシン E をベ

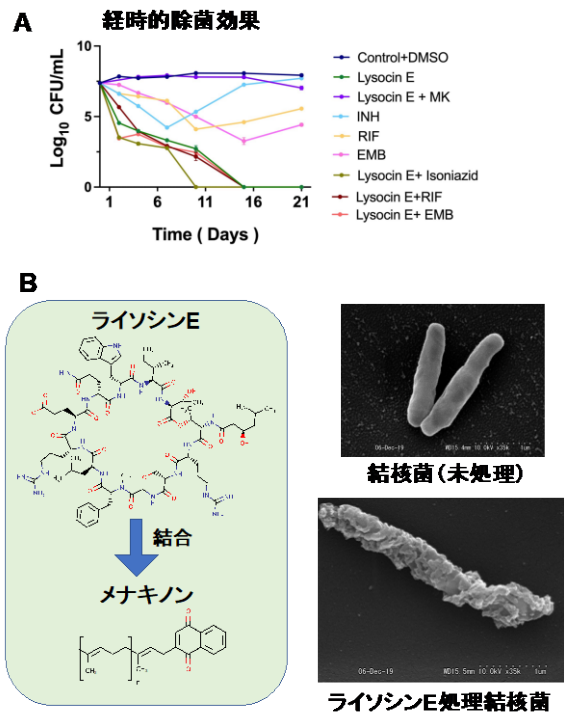


図 1. 結核菌に対するライソシン E の抗菌効果. A. 既存の一次除菌薬 (イソニアジド [INH]、リファンピシン [RIF]、エタンブトール [EMB]) と比較して、ライソシン E は培養液中の結核菌を迅速に除菌した。Lysocin E, ライソシン E. MK, メナキノン。INH, イソニアジド。RIF, リファンピシン。EMB, エタンブトール。CFU/ml, 生菌数。B. ライソシン E は結核菌細胞膜のメナキノンに結合し、最終的に結核菌の細胞膜を破壊する。

一スに、細胞内および生体内での除菌効果の改善など、臨床での使用を目指して開発を進めていく予定である。

V. 研究成果の公表

本研究成果は、2022年9月20日、米国微生物学会(American Society for Microbiology)の *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 誌に掲載された。

論文タイトル: Lysocin E Targeting Menaquinone in the Membrane of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Promising Lead Compound for Antituberculosis Drugs

著者: Geberemichal Geberetsadik, Akane Inaizumi, Akihito Nishiyama, Takehiro Yamaguchi, Hiroshi Hamamoto, Suresh Panthee, Aki Tamaru, Manabu Hayatsu, Yusuke Mizutani, Shaban Amina Kaboso, Mariko Hakamata, Aleksandr Ilinov, Yuriko Ozeki, Yoshitaka Tateishi, Kazuhisa Sekimizu, Sohkiichi Matsumoto

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2022 Sep 20, VOLUME 66, ISSUE 9, e0017122.
doi: 10.1128/aac.00171-22.

【用語解説】

- *1 ライソシン E (lysocin E): 土壌放線菌 *Lysobacter sp.* RH2180-5 株の培養上清から分離された抗菌物質。黄色ブドウ球菌等の細胞膜中のメナキノンに結合し、細胞膜を障害して殺菌作用を示すことが報告された (Hamamoto H et al. *Nat Chem Biol*. 2015. 11:127–33)。
- *2 多剤耐性/リファンピシン耐性結核: 結核治療に重要な一次除菌薬リファンピシン(リファンピシン耐性)、または一次除菌薬イソニアジド、リファンピシンの両方に耐性(多剤耐性)な結核菌によって引き起こされる結核。
- *3 メナキノン: 一般的にはビタミン K2 として知られる。結核菌、黄色ブドウ球菌等では細胞質膜に存在する電子伝達系において電子伝達体として働く。
- *4 リード化合物: 新薬(今回では新規抗結核薬)の開発のもととなる候補化合物。
- *5 最小発育阻止濃度(MIC 値): 一定濃度の被検菌の増殖を抑制する薬剤の最小濃度。
- *6 最小殺菌濃度(MBC 値): 一定濃度の被検菌を殺菌する薬剤の最小濃度。
- *7 *menA*: メナキノン生合成系の 1, 4-dihydroxy-2-naphthoic acid prenyltransferase をコードする遺伝子。結核菌では必須遺伝子。

本件に関するお問い合わせ先

新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野

講師 西山 晃史(にしやま あきひと)

E-mail: anishi@med.niigata-u.ac.jp

教授 松本 壮吉(まつもと そうきち)

E-mail: sohkiichi@med.niigata-u.ac.jp