

in silico Structure-Based Drug Screening 手法を用いた *Mycobacterium* に対する新規抗菌作用化合物の同定

金城知広^{†1} 小関祐司^{†1} 山田淳美^{†1} 出水園優也^{†1}
アリイヴァロ志穂^{†1} 小林舞子^{†1} 青木俊介^{†1,2}

概要: *in silico* structure-based drug screening 手法を用いて結核菌 enoyl-acyl carrier protein reductase に対する新規抗菌剤の同定を行った。その結果、モデル細菌 *Mycobacterium smegmatis* に対して安定的な抗菌作用を示し、かつ腸内モデル細菌と哺乳類モデル細胞に対して有意な毒性がない 2 化合物が同定された。

キーワード: Structure-Based Drug Screening, *Mycobacterium*

Identification of Novel Molecule inhibitors of *Mycobacterium* by *in silico* structure-based drug screening

TOMOHIRO KINJO^{†1} YUJI KOSEKI^{†1} ATSUMI YAMADA^{†1}
YUYA IZUMIZONO^{†1} SHIHO AREVALO^{†1} MAIKO KOBAYASHI^{†1}
SHUNSUKE AOKI^{†1,2}

Abstract: We attempted to identify the novel potential antibiotics for *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase by *in silico* structure-based drug screening. As a result, We identified the two chemical compounds that stably inhibited growth of the model bacteria *Mycobacterium smegmatis*. Moreover, these chemical compounds did not have toxic effects on enterobacteria and mammalian cells.

Keywords: Structure-Based Drug Screening, *Mycobacterium*

1. はじめに

結核は *Mycobacterium tuberculosis* によって引き起こされる感染症で、未だ深刻な問題である。世界の総人口の三分の一が結核に感染しており、毎年、新たに 960 万人が新たに発症し、170 万人が死亡している。また、Human immunodeficiency virus (HIV) の感染は結核の罹患率の上昇にも影響している [1]。さらに、近年、第一選択薬に対して耐性を示す多剤耐性結核菌 (MDR-TB) や第一選択薬に加え第二選択薬の 3 種以上に耐性を示す超多剤耐性菌 (XDR-TB) の感染が急速に拡大している。そのため、抗結核薬の枯渇が危惧されている。

世界で最も広く使われている抗結核薬に isoniazid (INH) がある。INH はプロドラッグであり mycobacterial catalase peroxidase (KatG) によって複合体 INH-NAD を形成する。この複合体が結核菌にとって必須である細胞壁の合成に関与する主酵素である enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase に結合し阻害することで菌の増殖を抑制する。しかし、KatG や enoyl-ACP reductase に変異が生じることで INH 耐性を示すことが報告されている [2]。そのため、新規抗結核薬は変異残基と相互作用せず、直接 enoyl-ACP reductase に結合することが必要であると考えられる。

薬剤の多くは前述したように、その原因生物の生存にとってキーとなるタンパク質に結合し、その機能を阻害することで効力を発揮することが知られている。その結合をコンピュータによるシミュレーションによってエネルギーの安定性を指標とし予測することが可能である。現在、シミュレーションの手法には分子力学計算 (DOCK [3], GOLD [4]), 定量的構造活性相関 (QSAR), 分子動力学計算 (MD), 量子力学計算, Protein Ligand Interaction Fingerprint (PLIF) [5] など多くのツールがある。本研究では、分子力学計算に基づく Structure-Based Drug Screening 手法を用いて結核菌 enoyl-ACP reductase を標的とした新規抗結核薬の同定を試みた。その結果、哺乳類モデル細胞と腸内モデル細菌に対して有意な毒性が無く、結核モデル細菌に対して抗菌作用を示す化合物が 5 つの候補化合物中 1 化合物 (ヒット化合物) 同定された。さらに、ヒット化合物を基本骨格とし類似構造検索を行い、同様に抗菌効果の検証を進めた結果、より強力な化合物が 1 つ同定された。本研究の結果、同定された化合物はリード化合物となり得ると考えられるため、新規抗結核薬の開発に有益な知見を与えるものと考えられる。

2. 方法

2.1 Structure-based drug screening

結核菌 enoyl-ACP reductase の結晶構造データ (PDB ID: 2H7I) [6] と約 15 万化合物を用いて一段階目に grid docking (DOCK), 2 段階目に低分子化合物の単一配座を用いた遺伝

^{†1} 九州工業大学大学院 情報工学府 情報科学専攻 生命情報工学分野
Department of Bioscience and Bioinformatics, Graduate School of Computer
Science and System Engineering, Kyushu Institute of Technology

^{†2} 九州工業大学バイオメディカルインフォマティクス研究開発センター
Biomedical Informatics R&D Center, Kyushu Institute of Technology

的アルゴリズム (GOLD), 3 段階目に複数配座を用いた遺伝的アルゴリズムによりスクリーニングを行い, 標的タンパク質との結合親和性が高いと予測された 5 化合物 (KE1-KE5) を選定した.

2.2 in vitro 実験

結核モデル細菌として *Mycobacterium smegmatis* (identity: 87%) を用いて短期 (24 h), 長期 (~72 h) における増殖抑制効果の検証と IC_{50} の決定を行った. さらに, 腸内モデル細菌として *Escherichia coli* (*E. coli*) と哺乳類細胞として Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells を用いた毒性試験を行った.

2.3 類似化合物の選定

約 46 万化合物の中から Finger print 法により類似骨格を有する化合物を選別し (MOE) [7], 遺伝的アルゴリズム (GOLD) によるドッキング結果より 5 化合物 (KES1- KES5) 選定した.

3. 結果

SBDS により選定した 5 化合物中 2 化合物 (KE3, KE4) は *M. smegmatis* に対して短期 (24 h) において抗菌作用を示し (図 1A), 長期 (72 h) においても安定的に増殖を抑制した. さらに, 腸内細菌モデルに対して KE3, KE4 共に有意な毒性を示さなかった. 哺乳類細胞 (MDCK 細胞) に対する毒性試験では KE3 が有意な毒性を示したが KE4 は有意な毒性を示さなかった. また, 化合物 KE4 の IC_{50} 値は $23.7 \mu\text{M}$ と決定された (図 1B).

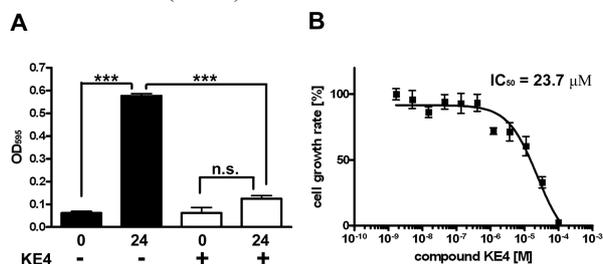


図 1. 化合物 KE4 の抗菌効果: (A) 短期 (24 h) における KE4 の増殖抑制効果, (B) 化合物 KE4 の IC_{50} 値.

これらの結果を踏まえ, 化合物 KE4 を基本骨格として選定した 5 つの類似化合物 (KES1-KES5) について抗菌作用を検証した結果, 4 化合物 (KES1-KES4) に抗菌効果が確認された. その後, 腸内モデル細菌 (*E. coli*) と哺乳類モデル細胞 (MDCK 細胞) に対して毒性試験を行った結果, KES3 は *E. coli* に対して有意な毒性を示した. また, KES1, KES2 は MDCK 細胞に有意な毒性を示した. 腸内モデル細菌, 哺乳類モデル細胞に対して有意な毒性が確認されなかった化合物 KES4 は今回同定された化合物の中で, 最も強力かつ安定的な抗菌作用を示し (図 2A), その IC_{50} 値は KE4 及び既存薬である INH (IC_{50} : $5.35 \mu\text{M}$) よりも低い $4.79 \mu\text{M}$ (図 2B) と決定された.

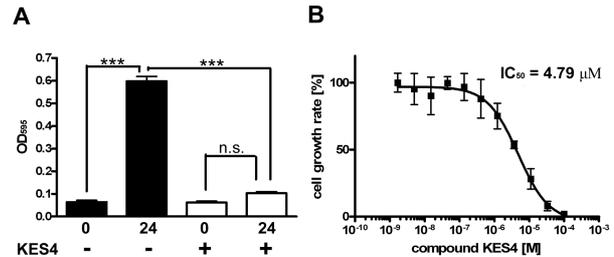


図 2. 化合物 KES4 の抗菌効果: (A) 短期 (24 h) における KES4 の増殖抑制効果, (B) 化合物 KES4 の IC_{50} 値.

4. おわりに

M. smegmatis の増殖を阻害し, 腸内モデル細菌, 哺乳類モデル細胞に対して有意な毒性を示さない化合物 (KE4, KES4) が同定された. これらの化合物の結合様式の予測に基づき, PLIF により化合物 KE4, KES4 の相互作用残基の差異を解析した結果, 活性中心 Tyr158, Leu218 との相互作用が重要であると予測された (図 3).

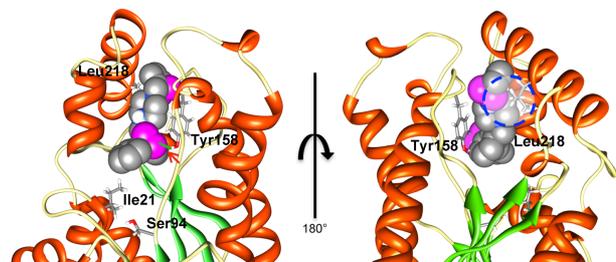


図 3. 化合物 KES4 の予測結合部位 (赤矢印: 水素結合, 青丸: vdW 相互作用).

また, INH 耐性結核菌では, I21V, S94A への enoyl-ACP reductase の変異を持つことが報告されている [2]. これらのアミノ酸の変異は INH の enoyl-ACP reductase への結合親和性を低下させることで INH 耐性を誘導する. 本研究で同定した化合物は enoyl-ACP reductase の Ser94, Ile21 などの点変異アミノ酸と相互作用を形成しないと予測された. 従って, 本研究の同定化合物は INH 耐性菌にも効果を有する新規抗結核薬の開発へのリード化合物となることが期待される.

参考文献

- 1) R. Rappuoli et al., Nature, 473 (2011)
- 2) J.S. Oliveria et al., J. Mol. Biol., 359 (2006)
- 3) T.J. Ewing et al., J. Comput. Aided. Mol. Des., 15 (2001)
- 4) G. Jones et al., J. Mol. Biol., 267 (1997)
- 5) T. Sato et al., J. Chem. Inf. Model., 50 (2010)
- 6) RCSB Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- 7) MOE 2010.10 <http://www.chemcomp.com>