

Structure-Based Drug Screening 手法を用いた *Staphylococcus* 属細菌に対する新規抗菌薬同定の試み

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

概要: 薬剤耐性黄色ブドウ球菌に対する有効な抗菌薬の枯渇により多くの患者が世界中で亡くなっている。本研究では structure-based drug screening 手法を用いてジヒドロ葉酸還元酵素を標的として抗菌作用を有する新規化合物の同定を試みた。その結果、黄色ブドウ球菌のモデル細菌に対して抗菌効果を有する 4 種類の新規化合物を同定した。またそれら化合物は腸内モデル細菌や培養哺乳類細胞に対し有意な毒性を持っていないことも確かめる事が出来た。

キーワード: 構造をベースとした創薬スクリーニング手法, 黄色ブドウ球菌, ジヒドロ葉酸還元酵素

Identification of novel potential antibiotics for *Staphylococcus* by Structure-Based Drug Screening

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

Abstract: The lack of effective antibiotics against drug-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is resulting in deaths of many patients all over the world. In this study, we attempted to identify novel antibiotics targeting dihydrofolate reductase by structure-based drug screening method. We identified novel 4 chemical compounds with antibacterial effects on the model bacterial strains of *S. aureus*. We also confirmed that the compounds do not have any toxic effects on enterobacteria and cultured mammalian cells.

Keywords: Structure-Based Drug Screening, *Staphylococcus aureus*, dihydrofolate reductase

1. はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は院内感染の主たる原因菌であり, 抵抗力の低下した乳幼児や高齢者が院内で罹患し死亡する感染症を引き起こす[1]. さらに, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) を始めとする薬剤耐性黄色ブドウ球菌が出現し, 利用可能な抗菌薬の枯渇が危惧されている。本研究では Structure-Based Drug Screening (SBDS) 手法を用いて DNA 複製の補酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase: DHFR) を標的とした新規骨格を有する抗菌薬の候補化合物の同定を試みた。その結果, 黄色ブドウ球菌のモデル細菌に対して抗菌効果を示し, 且つ腸内モデル細菌と哺乳類モデル細胞に対する毒性効果を示さなかった化合物 4 つを同定した。今回同定された化合物の中で最も高い抗菌作用を示した 1 化合物は, 新規抗菌薬開発のリード化合物となることが期待される。

2. 方法

2.1 Structure-Based Drug Screening 手法

黄色ブドウ球菌の DHFR の結晶構造データ (PDB ID :

2W9G) と約 15 万化合物の 3 次元構造化合物ライブラリ (Chembridge SanDiego, CA) を用いて SBDS 手法による階層的薬剤スクリーニングを行った[2]. 第 1 次スクリーニングでは, タンパク質のポケット構造に注目したグリッドドッキング (DOCK) を行い, 500 化合物に絞り込んだ[3]. 第 2 次スクリーニングは, 遺伝学的アルゴリズムを用いたドッキング (GOLD) を単一の初期配座に対してスクリーニングを行い, 134 化合物にまで絞り込んだ[4]. 最後に複数の初期配座に対して, 再度遺伝学的アルゴリズムを用いたドッキング (GOLD) でスクリーニングすることによって, 5 つの候補化合物 (KB1~5) を選定した[4].

2.2 抗菌作用の検証と毒性試験

SBDS 手法によって予測された化合物の薬効を検証する実験を行った。黄色ブドウ球菌のモデル微生物株である表皮ブドウ球菌 (相溶性: 95%) に対して抗菌作用の検証を行い, 腸内細菌の一つである大腸菌 (*Escherchia coli* : *E.coli*) と哺乳類モデル細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に対する毒性の検証も行った[5].

2.3 類縁化合物の選定と類似化合物の抗菌作用の検証

約 46 万化合物の三次元構造化合物ライブラリ (Chembridge SanDiego, CA) より, フィンガープリント法によって KB1 の類縁化合物を選別した[6]. 選別した化合物はに対して, 遺伝学的アルゴリズムを用いたドッキングシミュレーション (GOLD) によって KB1 の類縁化合物 5 化合物 (KBS1~5) を選定した。選定された類縁化合物 KB1 との相溶性は 88% 以上であった。抗菌作用の検証を行った[4].

^{†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, Kyutech Institute of Technology

3. 結果

3.1 候補化合物による抗菌作用の検証

SBDS 手法によって選定された 5 つの候補化合物 (KB1~KB5) 中 1 つ (KB1) は表皮ブドウ球菌の増殖を有意に抑制することが確認され (図 1A)、IC₅₀ 値は 3.88 μM となった (図 1B)。この数値は、陽性コントロールとして用いた Ampicillin の IC₅₀ 値 480 nM と比較すると約十倍程度高い数値である。

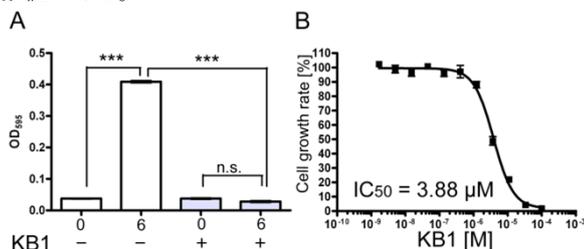


図 1: (A)表皮ブドウ球菌に対する抗菌作用の検証 (Bonferroni's test : p<0.001 ***, p>0.05 not significant), (B)KB1 の IC₅₀ 値の決定

3.2 毒性効果の検証

KB1 は大腸菌 (図 2A) に対して有意な毒性を示さなかったが、MDCK 細胞に対しては、毒性作用がみられた (図 2B)。

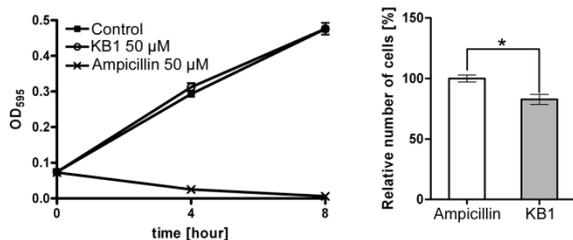


図 2: KB1 の毒性効果検証 (A) 大腸菌、(B)MDCK 細胞 (t test : p<0.05 *)

3.3 類縁化合物の検証

KB1 の類縁化合物も 5 化合物中 4 化合物 (KBS1~4) において表皮ブドウ球菌の増殖を抑制した。KBS3 において KB1 よりも IC₅₀ 値の低い 3.44 μM が決定された。また、KBS1~4 は大腸菌と MDCK 細胞 (図 3) に対して有意な毒性を示さなかった。

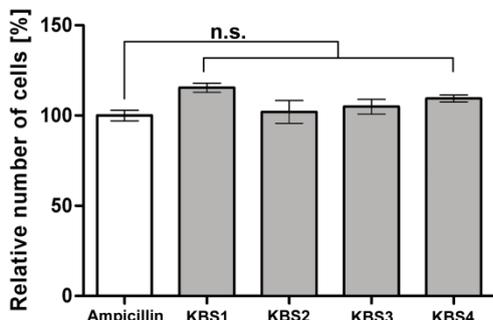


図 3: MDCK 細胞に対する毒性の検証 (Dunnett's test : p>0.05 not significant)

3.4 予測された結合様式

KBS3 と DHFR の結合様式に着目すると、DHFR の活性中心近傍の Arg57 と KBS3 が相互作用していると予測された (図 4)。

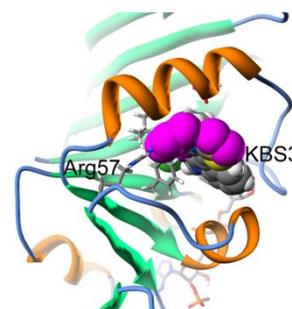


図 4 :KBS3 の結合予測図

4. おわりに

本研究でまず始めに同定された化合物 KB1 は表皮ブドウ球菌に対して抗菌作用を示した。また、大腸菌に対して毒性を示さなかったが、MDCK 細胞に対して毒性を示した。KB1 と KBS3 の構造を比較すると、メタ位からパラ位に塩素原子の結合位置が変化することによって、MDCK に毒性を持たず、且つ抗菌作用の高い化合物が同定されたと考えられる。従って、SBDS 手法におけるスクリーニング結果より、さらに類縁化合物を探索することによって、スクリーニング結果の向上ができると思われる。

既存の DHFR 標的薬の相互作用部位は Leu5, Asp27, Phe92 であり [2]、本研究で同定された KBS3 はこれらとは異なる Arg57 の部位を標的とする新規骨格を有する化合物である。そのため本化合物 KBS3 は DHFR に対する抗菌薬開発の為の新規リード化合物になることが期待される。

5. 謝辞

本研究にあたり、サポートしてくださった鶴田康一郎さんに感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) <http://www.bdj.co.jp/articles/infectioncontrol/3/2.html>
- 2) Holly H., et al., *PROTEINS*, 76, (2009), pp.706-717
- 3) http://dock.compbio.ucsf.edu/DOCK_6/tutorials/index.htm
- 4) http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/3_1/gold31.pdf
- 5) Izumizono Y, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, 46, (2011), pp.1849-56
- 6) Justin Lakota, et al., *J. Chem. Inf. Model*, 45, (2005), pp1824-1836.