

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬基盤推進研究事業
(英語) Research on Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 北里微生物資源ライブラリーを基盤とした多剤耐性菌を克服する
天然物創薬
(英語) Drug development research of circumventors against multiple-drug-resistant
bacteria using the Kitasato Microbial Resources Library

研究開発担当者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 教授 砂塚敏明
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Professor Toshiaki Sunazuka

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 微生物資源ライブラリーの提供、微生物分離
開発課題名： (英語) Preparation of microbial resources library and isolation of microorganisms

研究開発分担者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 准教授 松本厚子
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Associate Professor Atsuko Matsumoto

分担研究 (日本語) 微生物資源ライブラリーの提供、微生物分離
開発課題名： (英語) Preparation of microbial resources library and isolation of microorganisms

研究開発分担者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 助教 野中健一
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Assistant Professor Kenichi Nonaka

分担研究 (日本語) 天然物探索
開発課題名: (英語) Search for natural compounds

研究開発分担者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 特任教授 花木秀明
所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Specially Appointed Professor Hideaki Hanaki

分担研究 (日本語) 天然物探索
開発課題名: (英語) Search for natural compounds

研究開発分担者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 教授 塩見和朗
所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Professor Kazuro Shiomi

分担研究 (日本語) 天然物探索
開発課題名: (英語) Search for natural compounds

研究開発分担者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 准教授 岩月正人
所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Associate Professor Masato Iwatsuki

分担研究 (日本語) *In situ* click chemistry を駆使した高活性化化合物の創製
開発課題名: (英語) *In situ* click chemistry for the discovery of high-activated compounds

研究開発分担者 (日本語) 北里大学大学院感染制御科学府 准教授 廣瀬友靖
所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University
Associate Professor Tomoyasu Hirose

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

平成 28 年度の北里微生物資源ライブラリーの提供、微生物分離に関しては、糸状菌・放線菌の独自性の高い微生物ライブラリーを構築し、スクリーニンググループに提供した。加えて、形態的特徴により属レベルでの分類を行った。

糸状菌：研究例が少ない地域、固有種が多い地域から独自の分離法で分離し、スクリーニングサンプルの供給をした。平成 28 年度は、陸上由来：687 株、海洋由来：640 株および、深海由来：280 株を分離し、2,720 サンプルを作製後にスクリーニンググループに供給した。

放線菌：日本各地の土壌サンプルに加え、植物や海洋などの分離源から放線菌を分離し 713 株をスクリーニングに供した。また、微生物からの代謝産物は培養条件に大きく左右されるため、下記のとおりスクリーニングサンプル作製に工夫を加えた。

1. 生産培養には、独創的な成分を含む 4 種類の培地を基本として用いた。
2. 固体培地でのみ生産が確認された代謝産物が 19 株において確認され、化合物 1, 2 および 3 などを同定した。
3. 分画サンプル作製を行ないサンプルの成分分画および濃縮を行なった。カラムの選択、溶出液、溶出量等の検討の結果、サンプルを 5 分画に分けると同時に 5 倍濃縮したサンプルの供給を実現した。

以上、培養法およびサンプル作製法を検討し、3,178 サンプルをスクリーニングに供給した。

平成 28 年度の多剤耐性菌に対して効果のある新規抗菌物質探索並びに単離、構造決定 に関しては耐性機構（アルベカシン耐性、セフトジジム耐性、メロペネム耐性、アミカシン耐性、β-ラクタム薬耐性）を標的とした耐性克服薬のスクリーニング系の構築と目的物質の探索を行った。

結果として、アルベカシン耐性克服活性物質のスクリーニング系では化合物 4, 5 and 6 mixture, 7, 8 および 9 を耐性克服活性物質として取得した。これはいままでに報告されていない新しい知見であった。

セフトジジム耐性克服活性物質のスクリーニング系では、北里微生物資源ライブラリーより供給された放線菌および糸状菌の培養サンプル計 10,942 検体をスクリーニングし強い抗菌活性を示す化合物 10 を取得した。

メロペネム耐性克服活性物質のスクリーニング系を臨床分離株 *Escherichia coli* KB366 株、*Klebsiella pneumoniae* KB365 株および、*Pseudomonas aeruginosa* KB370 株を用いてそれぞれ構築した。化合物 11, 12, 13, 14 に加えて 15, 16, 17 および 18 に耐性克服活性を見出した。これはいままでに報告されていない新しい知見であった。

アミカシン耐性克服活性物質のスクリーニング系および β-ラクタム薬耐性克服活性物質のスクリーニング系を作製し、構築した。北里微生物資源ライブラリーより供給された放線菌および糸状菌の培養サンプルをスクリーニングし、目的物質の探索を開始した。

平成 28 年度の *In situ click chemistry* を駆使した高活性化化合物の創製に関しては天然物の誘導化により、*in situ click chemistry* 利用のために必要な官能基の天然物骨格への最適導入位置を決めた。

高活性化化合物取得のために、天然物の誘導化を目指した。メロペネム耐性克服活性を示す化合物 11 の変換体をそれぞれ合成した（化合物 12, 13 および 14）。その結果、3~10 倍の高活性化が見られた。また、その詳細な活性発現機構の一端を明らかにした。

また、活性向上が確認された化合物 12 の *in vivo* での有効性を確認するためサンプル合成をおこない、基質 170 mg を供給した。一方、化合物 15 の誘導体化も行い、化合物 16 を合成し、*Escherichia coli* KB366 株の耐性克服活性を示すことを明らかにした。

(英文)

One of our projects for 2016 was generation of the Kitasato Microbial Resources Library and isolation of microorganisms. We built the library of filamentous fungi and actinomycetes with highly unique characteristics and submitted them to the screening group. We also classified the fungi at the genus level by morphological characteristics.

Filamentous fungi: Fungi were isolated from regions where little research has been conducted and regions with numerous endemic strains using methods we had developed, and screening samples were submitted. In 2016 alone, we isolated 687 land strains, 640 marine strains, and 280 deep sea strains. In total, 2,720 samples were prepared and submitted to the screening group.

Actinomycetes: Actinomycetes were isolated from soil samples from across Japan as well as from plant and marine sources; 713 strains were submitted for screening. Because metabolites produced by microorganisms are greatly influenced by culture conditions, the following measures were observed during preparation of screening samples.

1. Four types of medium with original compositions were used for production of metabolites by production culture.

2. Metabolites were produced on solid medium alone in 19 strains, and we identified certain compounds including compounds 1, 2, and 3.

3. Fractionated samples and fractionated and enriched sample components were prepared and subjected to tests with different columns, eluents, and elution volumes. We separated the samples into 5 fractions and obtained 5-fold enriched samples. Next, we tested culture methods and sample preparation methods as described above, and submitted 3,178 samples for screening.

Another one of our projects for 2016 was the discovery, isolation, and structural analysis of new antibiotic substances effective against multidrug-resistant bacteria. We designed and built screening systems for drugs that can overcome bacterial resistance by targeting resistance mechanisms (arbekacin resistance, ceftazidime resistance, meropenem resistance, amikacin resistance, and beta-lactam resistance) and used these to discover target substances.

Our screening system for active substances for overcoming arbekacin resistance identified compounds 4, mixture of 5 and 6, 7, 8, and 9. This is a completely new finding. Also, our screening system for active substances for overcoming ceftazidime resistance analyzed a total of 10,942 culture samples of filamentous fungi and actinomycetes provided by the library and identified compound 10 as having potent antibiotic activity. We also built screening systems for active substances for overcoming meropenem resistance using clinically isolated *Escherichia coli* KB366, *Klebsiella pneumoniae* KB365, and *Pseudomonas aeruginosa* KB370. Compounds 11, 12, 13, and 14 as well as compounds 15, 16, 17, and 18 were all identified as active substances for overcoming resistance. This is also a completely new finding. Our screening systems for active substances for overcoming amikacin resistance and beta-lactam resistance also screened culture samples of filamentous fungi and actinomycetes provided by the library and began discovery of target substances.

Yet another one of our projects for 2016 was the creation of highly potent compounds through *in situ click* chemistry. We determined the optimal positioning for introducing functional groups required for *in situ click* chemistry to natural product skeletons by derivation of natural products. Our goal was to derive natural products in order to obtain highly potent compounds. We synthesized transformed versions of compound 11 that can

overcome meropenem resistance (compounds 12, 13, and 14). The transformed versions were 3 to 10 times more potent. We also uncovered a part of their specific mechanism of action.

In addition, we synthesized samples for assessing the *in vivo* efficacy of the highly potent compound 12 with 170 mg of substrate. We also synthesized compound 16 as a derivative of compound 15 and found that it can overcome resistance in *Escherichia coli* KB366.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

- (4) 特許出願

該当なし