

学 位 論 文 要 旨

氏 名 モハメド イムラヌル ホク

題 目 フェノール化合物とリゾチームの分子相互作用による新たな抗菌戦略
(Molecular Interaction of Phenolic Compounds with Lysozyme: A Novel Antimicrobial Strategy)

近年、使用されている抗生物質に対して抵抗性を示す薬剤耐性菌が増加し、その病原菌によって引き起こされる感染症が大きな問題となっている。そのため、耐性菌を生じさせない新規抗菌剤を開発することが早急に求められている。

フェノール化合物は抗菌作用や抗酸化作用といった多くの機能を有していることから抗菌剤として非常に魅力的な物質である。しかし、細菌膜によって細胞内への侵入が阻害されること、また水に難溶性であること、そして化学的に不安定であることから活性範囲が制限されている。そこで、我々の研究では、フェノール化合物を細菌の細胞内の殺傷部位に特異的に運搬するために、担体としての能力を有するリゾチーム (LZ) を用いた新たなドラッグデリバリーシステムの探究を行った。この新たなドラッグデリバリーシステムの研究では、強力な抗菌活性を持ち、さらに LZ と結合しやすいフェノール化合物を選択する必要がある。トリクロザン (TCS) は、水に難溶性なフェノール化合物であるが、細菌の脂肪酸合成に必須であるエノイル ACP 還元酵素あるいは FabI を阻害することで強力な抗菌活性を示し、さらに構造上の性質から LZ と結合しやすい。このことからフェノール化合物として TCS を用い、この TCS を LZ の内側に位置する芳香族アミノ酸残基と静電及び疎水性相互作用によって結合させ、TCS と LZ の複合体 (T-LZ) を合成した。

T-LZ は、LZ 及び TCS 単独の場合と比較して、水に完全に溶解し、LZ の持つ酵素活性が著しく増加した。また、グラム陽性菌及び陰性菌に対する抗菌活性も著しく強化され、スーパーオキシドアニオン除去においては独特な特異性を示した。

リボフラビンと光の照射による光酸化ストレスに対しても LZ と TCS 単独では、LZ の凝集と分裂が生じ、LZ の酵素活性と TCS の抗菌活性が著しく低下したのに対して、T-LZ では、LZ の酵素活性と抗菌活性が完全に保護されていた。このことから、TCS が LZ の活性部位であるトリプトファン残基と結合し、LZ の疎水性ポケットへ TCS が順応することで光酸化ダメージから保護できることが明らかとなった。

抗感染剤としての機能を証明するため、T-LZ の皮膚の病原性細菌及び酵母に対する抗菌活性を調べた。その結果、T-LZ は病原性細菌に対して優れた抗菌活性を示し、0.5~2 µg/ml の低濃度で、*Propiobacterium acnes* では 10 log の菌数が減少し、*Corynebacterium minutissimum* では 5 log の菌数が減少した。特に、FabI を大量に生産している *P. acnes* では、強い抗菌活性を示した。さらに、中性からアルカリ環境下でより高い抗菌活性を示し、そして 500 mM の NaCl の濃度でも強力な抗菌活性を示した。その一方で病原性酵母である *Candida albicans* と *Malassezia furfur* では、抗菌活性を示さなかった。ほとんどの細菌が FabI を所有している一方で真核生物である酵母はこの酵素を持っていないことからリゾチームが新たなドラッグデリバリー分子として機能していることが明らかとなった。さらに T-LZ が細胞内の脂肪酸合成酵素である FabI を阻害しているか調べるために細胞内の FabI 活性の解析を行った。その結果、T-LZ では、FabI の活性を完全に阻害しており、このことから T-LZ は FabI の代謝機能を干渉する TCS が細菌の細胞質内へ局在化することによって抗菌作用を発揮することが解明された。この独特な抗菌戦略は、人の感染症の治療に対して独特な抗菌戦略及び新たなドラッグデリバリーシステムの開発を促進することが期待できる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 MD. IMRANUL HOQ

題 目 Molecular Interaction of Phenolic Compounds with Lysozyme: A Novel Antimicrobial Strategy
(フェノール化合物とリゾチームの分子相互作用による新たな抗菌戦略)

The recurrent emergence of multiple drug resistance necessitates exploring novel agents or developing strategies to alleviate the problem. Phenolic compounds are attractive sources of antibiotic agents for their multi-functions such as antimicrobial and antioxidant effects. But they have limited spectrum of activity by virtue of membrane exclusion, insolubility in aqueous solvents and inherent chemical instability. This study explores, for the first time, a novel anti-infection drug-delivery strategy to allow specific targeting of phenolic compounds to the intracellular bacterial killing site by utilizing lysozyme (LZ), which serves as a carrier molecule. Triclosan (TCS), a water insoluble phenolic antibiotic, was selected to examine this novel drug-delivery strategy. TCS is a powerful antibiotic that inhibits bacterial fatty acid synthesis by blocking the active site of the essential enzyme enoyl-ACP reductase (or FabI). In this strategy, TCS was conjugated with the aromatic residues located in LZ interior via electrostatic and hydrophobic interactions. The conjugation turned TCS completely soluble in aqueous solvent and greatly promoted the enzymatic activity of LZ. The complex of TCS and LZ (T-LZ) exhibited significantly enhanced antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and a unique specificity to scavenge superoxide anions compared to the activity of LZ or TCS alone. Strikingly, the conformation of LZ in the complex, enzyme and antimicrobial activity of T-LZ complex were markedly protected against rigorous oxidative stress induced by riboflavin-light photooxidation system. This oxidative condition caused aggregation and cleavage of native LZ and dramatic reduction of its enzymatic activity and considerable loss of antimicrobial activity of TCS or LZ alone. The results suggest that TCS resides in the hydrophobic pocket of LZ, through binding to the tryptophan residues, protects structure and function of each other from photooxidative damage until the delivery of TCS to the bacterial cell. To validate the T-LZ complex as anti-infection agent, the potential of the complex was assessed against human skin pathogenic bacteria and yeasts. Notably, the complex exhibited superior activity against skin pathogenic bacteria, resulting in more than ten \log_{10} reductions of *Propionibacterium acnes* cells and five \log_{10} reductions of *Corynebacterium minutissimum* at concentration as low as 0.5 ~ 2 $\mu\text{g/ml}$. The pathogenic yeasts, *Candida albicans* and *Malassezia furfur*, were insensitive to the complex up to 200 $\mu\text{g/ml}$. The complex exhibited higher activity against bacterial pathogens at neutral to alkaline pH conditions and significant protection of activity at high salt (NaCl) concentrations was observed. Since most bacteria possess FabI while yeasts and eukaryotes do not have the enzyme, the validity of lysozyme as a novel drug-targeting molecule could be evident. Intracellular FabI activity analysis revealed that *P. acnes* producing greater amount of FabI was more susceptible to the T-LZ complex than *C. minutissimum* that produces minute amount of the enzyme. FabI inhibition experiments indicated that T-LZ exerts its action by localization of TCS into bacterial cytoplasm where TCS interferes with the metabolic functions of FabI. This study thus heralds a fascinating opportunity to the development of a unique drug-delivery strategy by using lysozyme and introduces a novel antimicrobial macromolecule for the treatment of human infectious diseases.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	モハメド イムラヌル ホク
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 イブラヒム ヒッサムラドワン
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
審査協力者	
題 目	フェノール化合物とリゾチームの分子相互作用による新たな抗菌戦略 (Molecular Interaction of Phenolic Compounds with Lysozyme: A Novel Antimicrobial Strategy)
<p>近年、使用されている抗生物質に対して抵抗性を示す薬剤耐性菌が増加し、その病原菌によって引き起こされる感染症が大きな問題となっている。そのため、耐性菌を生じさせない新規抗菌剤を開発することが早急に求められている。</p> <p>フェノール化合物は抗菌作用や抗酸化作用といった多くの機能を有していることから抗菌剤として非常に魅力的な物質である。しかし、細菌膜によって細胞内への侵入が阻害されること、また水に難溶性であること、そして化学的に不安定であることから活性範囲が制限されている。そこで、本研究では、フェノール化合物を細菌の細胞内の標的部位に特異的に運搬するために、担体としての能力を有するリゾチーム (LZ) を用いた新たなドラッグデリバリーシステムの探究を行った。この新たなドラッグデリバリーシステムの研究では、強力な抗菌活性を持ち、さらに LZ と結合しやすいフェノール化合物を選択する必要がある。トリクロザン (TCS) は、水に難溶性なフェノール化合物であるが、LZとの結合により水に可溶性となり、細菌の脂肪酸合成に必須であるエノイル ACP 還元酵素あるいは FabI を阻害することで強力な抗菌活性を示すと考えられる。</p>	

このことからフェノール化合物として TCS を用い、この TCS を LZ の内側に位置する芳香族アミノ酸残基と静電及び疎水性相互作用によって結合させ、TCS と LZ の複合体 (T-LZ) を調製した。T-LZ は、LZ 及び TCS 単独の場合と比較して、水に完全に溶解し、LZ の持つ酵素活性が著しく増加した。また、グラム陽性菌及び陰性菌に対する抗菌活性も著しく強化され、スーパーオキシドアニオン除去においては独特な特異性を示した。

リボフラビンと光の照射による光酸化ストレスに対しても LZ と TCS 単独では、LZ の凝集と分裂が生じ、LZ の酵素活性と TCS の抗菌活性が著しく低下したのに対して、T-LZ では、LZ の酵素活性と抗菌活性が完全に保護されていた。このことから、TCS が LZ の活性部位であるトリプトファン残基と結合し、LZ の疎水性ポケットへ TCS が順応することで光酸化ダメージから保護できることが明らかとなった。

抗菌剤としての機能を証明するため、T-LZ の皮膚の病原性細菌及び酵母に対する抗菌活性を調べた。その結果、T-LZ は病原性細菌に対して優れた抗菌活性を示し、0.5~2 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度で、*Propionibacterium acnes* では 10 log の菌数が減少し、*Corynebacterium minutissimum* では 5 log の菌数が減少した。特に、FabI を大量に生産している *P. acnes* では、強い抗菌活性を示した。さらに、中性からアルカリ環境下でより高い抗菌活性を示し、そして 500 mM の NaCl の濃度でも強力な抗菌活性を示した。その一方で、病原性酵母である *Candida albicans* と *Malassezia furfur* では、抗菌活性を示さなかった。ほとんどの細菌が FabI を所有している一方で、真核生物である酵母はこの酵素を持っていないことから、リゾチームが新たなドラッグデリバリー分子として機能していることが明らかとなった。さらに、T-LZ が細胞内の脂肪酸合成酵素である FabI を阻害しているかを調べるために細胞内の FabI 活性の解析を行った。その結果、T-LZ では、FabI の活性を完全に阻害しており、このことから T-LZ は FabI の代謝機能を干渉する TCS が細菌の細胞質内へ局在化することによって抗菌作用を発揮することが解明された。この独特な抗菌戦略は、人の感染症の治療に対して有効でさらに新たなドラッグデリバリーシステムの開発を促進することが期待できる。

以上本研究は、リゾチームを利用して水に難溶性な抗菌性フェノール化合物であるトリクロザンをアルカリ条件下での疎水性相互作用によって結合させ、強力な抗菌活性を持つ高分子を合成した。また、フェノール化合物を細菌の細胞内の標的部位に特異的に運搬するために、担体としての能力を有するリゾチームを用いた新たなドラッグデリバリーシステムの開発も明らかになった。したがって、本論文は学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	モハメド イムラヌル ホク
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 イブラヒム ヒッサム ラドワン
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
審査協力者	
実施年月日	平成22年1月21日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・ <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成22年1月21日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	モハメド イムラヌル ホク
[質問 1]	<p>トリクロザン (TCS) とリゾチーム (LZ) の複合体 (T-LZ) の酵素活性が LZ 単独の酵素活性と比較して上がったのはどうしてなのか？</p> <p>[回答 1] LZ の活性残基は、Asp52 と Glu35 であり、この活性残基は LZ の疎水性ポケットに存在している。この疎水性ポケットは、3つのトリプトファン残基により疎水性環境を維持しており、このことは、LZ の活性残基と基質とのプロトン交換において重要である。また、これらのトリプトファン残基は、基質が LZ の疎水性ポケットへの出入りに必要な hinge-bending motion を構成している。本研究より TCS は、LZ の疎水性ポケットに存在するトリプトファン残基と疎水性結合を行う。このことで、疎水性ポケット内がより疎水性の環境になり、このことで LZ の活性残基と基質間のプロトン交換を促進することで酵素活性が上がるということが考えられる。さらに TCS が疎水性ポケットの空間を広げることで hinge-bending motion を促進し、基質の出入りを促進することで酵素活性が上がるということが考えられる。</p> <p>[質問 2] TCS と LZ の複合体は安定しているということだが、この T-LZ の状態からどのようにして TCS が解離されるのか？</p> <p>[回答 2] T-LZ が安定しているという意味は、光酸化ストレスに対して機能性を保持しているということであり、TCS と LZ の結合が安定しているということではない。TCS と LZ は疎水性結合で複合体を形成しており、この結合様式は比較的弱い結合である。T-LZ は、細菌膜と結合すると細菌膜の構造変化を引き起こし、細菌膜内部の疎水性領域である脂質と TCS が接近する。その結果、TCS が脂質による疎水性相互作用を受けることにより、LZ から TCS が解離し、細胞内部へ TCS が侵入することができると思われる。</p> <p>[質問 3] LZ の疎水性領域は複数存在している。そこで、実際には1分子の LZ に対してどれほどの TCS が結合しているのか？</p> <p>[回答 3] TCS30 と T-LZ30 を水に溶解後、A280 nm の吸光度を測定した結果、TCS30 の吸光度と比較して T-LZ30 の吸光度は 73% 減少していた。TCS は LZ 内部に存在する疎水性ポケットに侵入したときに TCS の吸光度がなくなる。このことから TCS の 30 分子中、約 21 から 22 分子の TCS が疎水性ポケットに存在しているものと思われる。</p> <p>[質問 4] T-LZ の FabI への阻害活性について in vivo では示されているが、in vitro では阻害活性がみられたのか？</p> <p>[回答 4] データとして示してはいないが、実際に FabI を菌体内から精製し、FabI 単独を用いた in vitro での T-LZ による阻害活性も調べた。その結果、in vivo の実験と同様に T-LZ では FabI に対して阻害活性を示していた。</p> <p>[質問 5] T-LZ によるドラッグデリバリーシステムにより細胞内に侵入した TCS は細菌の薬剤耐性の機能として知られている efflux pump によって細胞外へ放出はされていないのか？</p> <p>[回答 5] T-LZ のドラッグデリバリーシステムにより菌体内に侵入した TCS が efflux pump により細胞外へ放出されているかについては調べなかった。しかし、本研究では、T-LZ によるドラッグデリバリーシステムを介して細菌の TCS の侵入を妨害する機能を改善することで抗菌活性を強化することを目的とした。その結果、T-LZ の抗菌活性は、TCS 単独と比較して著しく強くなっていた。このことは細菌の既存の抵抗性では、T-LZ による抗菌作用を防ぐことができないことを示すものであり、このことから細菌の efflux pump による TCS の放出について確認しなかった。</p>

[質問6] T-LZ の yeast に対する抗菌活性が弱かったのはどうしてなのか？

[回答6] まず、yeast の細胞内は、ヒトの細胞と同様に TCS の標的となる FabI が存在しないため、T-LZ では抗菌活性をほとんど示さなかった。このことから、T-LZ によって細胞内へ TCS を侵入させるドラッグデリバリーシステムが完全に証明された。また yeast は細菌とは膜の構造が異なり、LZ が yeast の膜とは結合することができないために T-LZ のドラッグデリバリーシステムが機能せず抗菌活性を示さなかったことも考えられる。

[質問7] TCS の *C. minutissimum* 菌体内の FabI に対する阻害活性が *P. acnes* 菌体内の FabI に対する阻害活性と比較して弱かったのはどうしてなのか？

[回答7] *P. acnes* 菌体内の FabI に対する阻害活性を調べるときに調製した TCS の濃度が高いことから本来細胞内に侵入することができない TCS が膜を破壊することで中に侵入し、阻害効果を示す結果となった。ドラッグデリバリーシステムを証明するためには T-LZ だけが FabI を阻害していることが望ましい。そこで *C. minutissimum* 菌体内の FabI に対する阻害活性を調べるときに、TCS の濃度を低く調製した。その結果、T-LZ では、ドラッグデリバリーシステムにより FabI の阻害活性を示したが、一方、TCS 単独では、菌体内に侵入できず FabI の阻害活性を示さなかった。

[質問8] TCS と LZ の複合体形成していない混合物に対する抗菌活性についてはどのような結果が得られたのか？

[回答8] データでは示していないが TCS と LZ の混合物についても抗菌活性の研究を行った。結果として、TCS と LZ の混合物よりも、T-LZ の方が強い抗菌活性を示していた。これより、抗菌活性を強くするためには TCS と LZ が複合体を形成することが重要である。

[質問9] T-LZ のドラッグデリバリーシステムにおいて TCS だけでなく LZ も細胞質内へ侵入するのか？

[回答9] 本研究より、T-LZ によるドラッグデリバリーシステムにより TCS が細菌の細胞質内に侵入していることは解明したが、LZ の細胞質内への侵入については詳細まで明らかにするには至らなかった。しかし、LZ に関する論文において、LZ が細菌の細胞質内に侵入すると報告されているものも存在した。

[質問10] T-LZ の抗感染作用の研究で行う In vivo と Ex vivo の違いは何か？

[回答10] In vivo での抗感染作用の研究では、実験対象として生物を用い、この生物に直接 T-LZ を投与したときの抗感染作用について調べることである。一方、ex vivo での抗感染作用の研究では、生物から細胞を分離して、この細胞に T-LZ を投与したときの抗感染作用について調べることである。

[質問11] TCS は抗ガン作用も有しているということだが、T-LZ は皮膚ガンの治療に対しても有効であるのか？

[回答11] 本研究で、T-LZ によるドラッグデリバリーシステムにより抗菌作用を強化することに成功した。このドラッグデリバリーシステムは、ガン細胞に対する有効な治療方法として知られており、このことから皮膚ガンに対する治療薬としても期待できると考えている。しかし、それには、ガン細胞を用いたドラッグデリバリーシステムに関する研究を行うことが必要である。