抗菌薬の新規標的としての細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質

和 地 正 明¹・岩 井 伯 隆²

東京工業大学¹大学院生命理工学研究科・²フロンティア創造共同研究センター
〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

[受理：2007年9月]

細菌感染症の化学療法において薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。この問題に対抗する手段の一つは、新規作用標的を有する薬剤の開発であろう。我々は、細菌の染色体分配を阻害する薬剤のスクリーニングを行い、大腸菌細胞を球菌化し高頻度に無核細胞を放出させる化合物 A22 (S-(3,4-dichlorobenzyl) isothiurea) を見いだした。遺伝学的な解析から、A22 の作用標的は細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質 MreB であることが示された。さらに A22 を用いた解析から、MreB タンパク質は細菌染色体の娘細胞への分配に機能していることが明らかとなった。これらのことは、これまで有糸分裂装置を持たないと考えられてきた細菌にもアクチン様細胞骨格を用いた有糸分裂装置が存在することを強く示唆するものである。本稿では、細菌のアクチン様細胞骨格を標的とした薬剤の可能性について議論したい。

1. はじめに

今からちょうど 10 年前、フランスのベルサイユ宮殿の隣に建つトリアノンホテルで開催されたある国際会議に出席した。某製薬会社がスポンサーとなったもので、薬剤耐性菌の蔓延に対抗するための方策を話しあうという名目で、多くの細菌研究者が呼ばれて自由に議論を交わすというものであった。そのときの議論は大きく 3 つに分けられた。第一は既存の抗菌薬をいかに有効に使うか、第二に薬剤耐性機構の阻害剤の開発、そして第三に新規標的の探索である。第一の方策では、特に細胞壁合成阻害剤の有用性を再認識すべきであるという議論が中心であった。いわゆるペニシリンへの回帰であろう。第二は、耐性の原因そのものを抑えようという議論である。有効な薬剤が見出されれば、既存の薬剤の効能が復活するという主張であった。そして第三の議論が、いまだ抗菌薬の標的となっていないまったく新規の標的を有する薬剤を開発しようというものであった。ちょうど当時は、細胞分裂タンパク質 FtsZ が細菌のチューブリンホモログであることが報告された時期であり (1, 4)、多くの研究者が FtsZ が究極の標的である

と熱弁していた。細胞分裂を止めてしまうのであるから素人にも分かりやすい戦略である。あれから 10 年たったが、今でもこれらの方策が模索され続けている。ということは、未だに有効な対策は確立されていないということであろうか。

2. 染色体分配阻害剤のスクリーニング

さて、複製後の染色体を細胞分裂に伴って娘細胞に確実に伝達することはすべての生物にとって必須の作業である。真核細胞ではチューブリンから構成される微小管を使った有糸分裂装置がこれを行っている。詳細な研究が進んでいる真核細胞の有糸分裂と比べて、細菌では染色体分配機構の実態は長い間謎であった。細菌の染色体分配の仕組みを最初に提示したのは Jacob らのレプリコンモデルであろう。彼らは、複製した染色体は細胞中央の細胞膜に係留されており、細胞膜の伸長に伴って娘細胞へ分配されると考えた (12)。しかしながら、最近になって染色体の複製開始点は複製後に速やかに細胞の極付近に移動することが明らかになった (7, 23, 29)。その移動速度は明らかに細胞の伸長速度より速いことから、細胞膜の成長による分配機構は否定された。このことは、細菌にも染色体を能動的に一定方向に移動させる仕組みが存在することを意味している。

我々は、新規標的を有する薬剤を求めて、細菌の染色体分配過程を阻害する薬剤のスクリーニングを行ってきた。

Masaaki WACHI¹ and Noritaka Iwai²

Bacterial actin-like cytoskeletal protein as a new target of antibacterial agents

¹Department of Bioengineering, and ²Frontier Collaborative Research Center, Tokyo Institute of Technology

図1. *cafA* 過剰発現株で観察された細胞骨格様構造
cafA (*rng*) 遺伝子が大腸菌の中で過剰発現させると細胞の長軸方向に沿って繊維状の構造体が形成された。

このスクリーニングを始めるきっかけとなったのはある電子顕微鏡写真であった。後にも述べるように、我々は *mreB* 遺伝子の解析を行っていたが、そのクローニングの際一緒に取れてきた機能不明の遺伝子が、大腸菌の中で過剰発現させると繊維状の構造体を作ることを見出した (19)。超薄切片像では、2本の繊維状構造体が細胞極からもう一方の細胞極まで細胞の中心を貫いており、さらにはその周りを染色体が取り囲んでいるようにも見えた (図1)。これはまさに細菌の有糸分裂装置の糸ではないかと興奮したものである。そこでこの遺伝子を *cafA* (cytoplasmic axial filament) と名づけ解析を始めたが、その欠損株は明確な表

現型を何も示さなかったため、大腸菌は機能的に重複する遺伝子を他にも持っているのではないかなどと考えていた (この遺伝子はのちに *RNase* をコードすることがわかり、*rng* と改名した (27))。そこで、今から思えば無謀にも、遺伝子から攻めるのではなく阻害剤から攻めようと考えたのがこのスクリーニングを始めたきっかけであった。学生時代に所属していた研究室 (東大応微研) ではペニシリンの研究を中心に行っており、ペニシリンが細菌の細胞壁合成機構の解明に大きな役割を果たしたことを実感していたというのがその背景にあった。

スクリーニングは、染色体分配が阻害された結果生じる染色体を持たない細胞 (無核細胞) の放出を指標として行った。これは、平賀 (熊本大) らによって開発された *muk* 変異株を分離するための遺伝学的なトリック (8) をスクリーニング用に改良したものである (26)。簡単に説明すると、レポーター遺伝子として *lacZ* を染色体とは独立に複製、分配されるプラスミド上に持ち、そのリプレッサーをコードする *lacI* を染色体上に持つ菌株を検定菌として用いる。阻害剤により染色体の分配が阻害されて無核細胞が放出されると、染色体上の *lacI* からのリプレッサーの供給がなくなり、*lacZ* の転写が誘導されて β -ガラクトシダーゼが合成される (図2)。培地中に X-gal を入れておくことにより、無核細胞の放出を青色呈色として検出できるというものである (図3)。

3. アクチン様細胞骨格タンパク質 MreB 阻害剤 A22 の発見

スクリーニングにより、ケミカルライブラリーの中から

図2. 染色体分配阻害剤のスクリーニング用検定菌

レポーター遺伝子として *lacZ* を染色体とは独立に複製、分配されるプラスミド上に持ち、そのリプレッサーをコードする *lacI* を染色体上に持つ菌株を検定菌として用いる。阻害剤により染色体の分配が阻害されて無核細胞が放出されると、染色体上の *lacI* からのリプレッサーの供給がなくなり、*lacZ* の転写が誘導されて β -ガラクトシダーゼが合成される。

図3. スクリーニングの概略

寒天培地に検定菌と X-gal を入れておくで無核細胞の形成を青色呈色として検出できる。

得られたヒット化合物のひとつが A22 である。A22 は S-(3,4-dichlorobenzyl) isothioureia で (図 4), 大腸菌に対して 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度で抗菌作用を示した。A22 処理により大腸菌細胞は球菌化し, 同時に染色体を持たない無核細胞が高頻度で放出されることが観察された (図 5) (11)。このとき, 直感的にかつて扱っていた *mreB* 変異株との類似性を感じたのを覚えている。*mreB* 変異株は β -ラクタム系抗菌薬メシリナム (Mecillinam) の耐性株として得られたものであるが, 細胞が球菌形をしているのが特徴である (25)。メシリナムは側壁のペプチドグリカン合成酵素である PBP2 を阻害することにより細胞を球菌化することが知られている。しかしながら A22 の構造はメシリナムとはまったく似ていないことから (図 4), PBP2 以外の標的をもつことが期待された。そこで, A22 の作用標的を同定するために A22 耐性変異株を分離した。得られた耐性株はメシリナムと交叉耐性を示さなかったことからこのことは支持された (図 6)。そこで変異点の同定を進めたところ, MreB タンパク質の 22 番目のアミノ酸残基である Asn を Asp へと置換させる変異により A22 耐性が付与されることが明らかとなった (図 7)。

先にも述べたように MreB はもともと筆者らが *E. coli* の桿菌形態形成機構の研究の過程で発見したタンパク質である。その変異株が球菌形態を示すこと, 球菌は *mreB* 遺伝子を持たないことなどから, 側壁のペプチドグリカン層の形成に関与すると思われたが, その詳細な機能は不明であった。MreB とアクチンの関連性を初めて指摘したのは,

未処理

A22処理

10 μm

図5. 大腸菌に対する A22 の効果

A22 処理により大腸菌細胞が球菌化すると同時に高頻度で無核細胞 (矢頭) が放出される。

タンパク質のアミノ酸配列を既知の 3 次元構造と比較するプログラムを開発した研究グループであったが (2), しばらくその予測は検証されることはなかった。2001 年になって, イギリスのグループから相次いで MreB がアクチン様の細胞骨格タンパク質であることを示す報告がなされた。まずは, 枯草菌の MreB が細胞内でらせん状の構造体を構成していることが報告され (13), ほぼ同時に好熱菌由来の MreB の 3 次元構造が解かれ, 酵母のアクチンと瓜二つであることが報告された (21)。これより, MreB は細菌のアクチン様タンパク質であることが広く認識されるに至った。

このような情勢の下で, 細菌の DNA 分配におけるアクチン様タンパク質の関与が最初に示されたのは, *E. coli* の R1 プラスミドにコードされるアクチンホモログ ParM の例であった。ParM が R1 プラスミドの分配に関与することは遺伝学的な解析から既に知られていたが, 間接免疫蛍光染色により細胞内で F-アクチン様の繊維構造を形成することが示された (17, 22)。その様はまさに有糸分裂装置のミニチュア版とも言えるものであった。このことから誰もが予想したことは, 染色体にコードされるアクチンホモログ MreB の染色体分配における役割であった。そこで発現制御株を用いて MreB を枯渇させたり (20), 変異型 MreB を過剰発現させたりしたとき (16) の染色体の挙動が調べられた。それらの結果はいずれも染色体分配における MreB の関与を強く示唆するものであったが, これらの実験系では枯渇や過剰発現の効果が出るまでに時間がかかり, 細胞形

図4. A22 と Mecillinam の構造

図 6. A22 耐性株に対する A22 と Mecillinam の効果

A22 耐性株は A22 存在下でも桿菌形態を維持しているが、Mecillinam 処理により球菌化することから PBP2 は正常に機能していることがわかる。

図 7. A22 耐性 *mreB* 変異

A22 耐性変異株で置換していた大腸菌 MreB タンパク質の 21 番目の Asn 残基は細菌のアクチン様タンパク質間では高度に保存されているが、真核細胞ではこの Asn が保存されていない。

態も変化してしまうために、染色体分配における MreB の役割については明確な結論は導けない状況であった。

A22 耐性変異株で置換していた Asn 残基は細菌のアクチン様タンパク質間で高度に保存されており、3 次元構造解析より ATP との相互作用が示唆されている (21)。おそらく真核細胞ではこの Asn が保存されていない (図 7)。このことは A22 が細菌型のアクチン様タンパク質に特異的に作用する可能性を示唆している。A22 が確かに MreB に作用しているかを調べるために、緑色蛍光タンパク質 GFP と MreB の融合タンパク質を発現する細胞に A22 を作用させ、その効果を調べた。その結果、A22 処理により速やかに MreB らせん構造が破壊される様子が観察された (図 8)。これより、確かに A22 は MreB に作用していることが

確認された。

4. 染色体分配過程における MreB タンパク質の役割

細胞が分裂するときに、細胞内成分が倍化することは当然必要なことであるが、同時にそれらは空間的にも適切に分配されなければならない。特に遺伝情報の本体である染色体は単に倍化するだけでなく、将来の娘細胞の適切な位置に配置されて初めて細胞分裂が可能となる。先にも述べたように、真核細胞の染色体分配はチューブリンより構成される有糸分裂装置により正確に制御されている。一方、細菌のチューブリンホモログ FtsZ は分裂環を形成し、細胞分裂を行っている。細菌の染色体分配には有糸分裂装置のようなものは観察できない。おそらく真核細胞で

図 8. MreB ラセン構造に対する A22 の効果
蛍光顕微鏡で観察すると細胞側壁に光点が交互に並んで見えるのが GFP-MreB ラセン構造の特徴である (未処理)。GFP-MreB 融合タンパク質を発現する大腸菌細胞に A22 を作用させると、速やかに MreB ラセン構造が破壊された。

は分裂環はアクチンで構成されていることから、細菌研究者の中には細菌ではアクチンホモログが染色体分配を行うのではないかと密かな期待があったが、それを証明するには役者が十分にそろっていなかった。

染色体分配阻害剤の探索から見出された化合物 A22 は前述の通りアクチン様タンパク質 MreB を標的としていた。このことは、まさに MreB が染色体分配に関与しているということを強く示唆するものである。そこで、Shapiro (スタンフォード大学) らのグループとの共同研究により、*Caulobacter crescentus* の染色体分配に対する A22 の効果を調べた (6)。*C. crescentus* は三日月 (crescent) 形の細胞形態をしており、 α -プロテオバクテリアに属している。この菌は非対称分裂をするのが特徴で、柄 (stalk) と呼ばれる太い尻尾のような構造体をもつ有柄細胞と、極鞭毛をもつ遊走細胞に分かれる。有柄細胞ではすぐに次の染色体複製が始まるが、遊走細胞はしばらく泳ぎまわった後に有柄細胞へと形態変化してから次の複製サイクルが始まる。そのため、分裂直後の遊走細胞を回収することにより、容易に

同調培養ができる。分裂直後の遊走細胞では複製開始点は細胞分裂面から遠い方の極に存在するが、有柄細胞に変化後、複製が開始すると複製開始点の一つが速やかに反対の極付近に移動する。染色体複製期と細胞分裂期が完全に区別できるのもこの細菌の利点である。細胞分裂と染色体分配が明瞭に区別できることから、A22 の染色体分配に対する効果が確認しやすいと思われた。幸いにも A22 は *C. crescentus* に抗菌活性を示し、耐性株の分離から A22 が大腸菌と同じく MreB タンパク質を阻害することが示された。DNA 結合タンパク質と蛍光タンパク質の融合体を利用して染色体の特定領域の動きを追跡した結果、予想通り A22 処理により染色体の複製起点の移動が阻害される様子が見事に観察された (図 9)。このとき染色体複製そのものは阻害されていなかった。一方、複製起点の移動が終了した後に A22 処理をしても染色体の分配は正常に進行した。さらに、MreB 抗体を用いた Chromosome Immuno-Precipitation (ChIP) 実験から MreB は複製起点近傍の DNA とのみ相互作用していることが示された。これらのことから、MreB タンパク質は複製直後の複製起点近傍の DNA の移動に関与していること、複製起点が移動した後の染色体全体の移動は MreB に依存しない機構で行われていることが示唆された。細菌にも真核細胞のセントロメア様領域が存在することが示唆されており (30)、MreB タンパク質が直接または間接的にそのような領域に相互作用していると思われる。

5. MreB タンパク質と相互作用する因子

MreB が染色体分配に関与するということから容易に想像されるのは、有糸分裂における微小管のような役割である。有糸分裂では微小管に沿って染色体を運ぶ駆動力はモータータンパク質キネシンによって生じている。では、細菌ではなにがそれを担っているのだろうか？これまで

図 9. *Caulobacter crescentus* の染色体複製起点の局在に対する A22 の効果
(A) 分裂直後の遊走細胞では染色体の複製起点は細胞の一方の極に局在している。遊走細胞が有柄細胞に分化すると染色体の複製が始まる。複製された複製起点は速やかに細胞の反対側の極に移動する。その後、遊走細胞と有柄細胞へと不等分裂する。(B) 複製開始前に A22 を処理しておくで複製起点の移動が阻害された。細胞内の黒丸は染色体の複製起点の局在を示している。

図 10. MreB ラセンの上を RNA ポリメラーゼによって運ばれる染色体？

に多くの細菌のゲノム配列が決定されているがキネシンに対応するタンパク質は見出されていない。そこで、Gerdes (南デンマーク大学) らのグループとの共同研究で、MreB タンパク質と相互作用する因子の探索を行った (15)。MreB タンパク質と相互作用を持つ可能性があるタンパク質を免疫沈降法により調べた結果、転写装置 RNA ポリメラーゼの β サブユニットが見出された。MreB と RNA ポリメラーゼは一見なんの関係もなさそうな組み合わせであるが、実は我々にとってこの結果は非常に興味深いものであった。なぜなら、我々の構築した染色体分配阻害剤のアッセイ系でアンサマイシン系抗菌薬のリファンピシン (Rifampicin) が非常に強い陽性反応を示していたからである (26)。リファンピシンは細菌の RNA ポリメラーゼ β サブユニットを標的とする転写阻害剤であり、結核の治療薬などとして今日でも用いられている抗菌薬である。我々は準致死濃度のリファンピシンで大腸菌を処理すると細胞は若干伸張し、染色体を持たない無核細胞が放出されるのを観察していた。しかしながら、転写装置と染色体分配を結びつける明確な確証は得られずにいた。一方で近年、RNA ポリメラーゼを一種のモータータンパク質として捉え、染色体分配の大きな駆動力となるのではないかという仮説が提起されていた (3)。RNA ポリメラーゼが持つ駆動力は真核細胞の染色体分配に関与するモータータンパク質キネシンの駆動力の実に 4 倍近くあり (5, 28)、染色体分配を担う役者として申し分無い。MreB と RNA ポリメラーゼが相互作用することを示す免疫沈降実験の結果は、まさにこれらの知見をつなぎ合わせるものであったのである。

以上のことを総合すると、細菌の染色体は複製開始点近傍がセントロメアとして機能し、RNA ポリメラーゼの生ずる駆動力を使って MreB ラセンに沿って娘細胞に分配されるというなんとも奇妙な有糸分裂装置が浮かび上がってくる (図 10)。はたして我々は真実に近づいているのであろうか？

6. 抗菌薬の標的としてのアクチン様タンパク質

ここまで、MreB タンパク質の機能解析に阻害剤 A22 が有効であった例を紹介してきたが、MreB タンパク質は抗菌薬の作用標的としては有望であろうか？ また A22 は次世代の抗菌薬候補として期待できるのであろうか？ ここではその可能性と、これまでの構造活性相関による研究成果を紹介し、新規抗菌薬としての可能性を議論したい。

そもそも次世代の抗菌薬として求められるものは何か？ 最初にも述べたように、既存の薬剤に対する耐性を様々な細菌が獲得し始めている現状で、新規作用標的を阻害する薬剤を開発することは間違いなく確実な戦略の一つであろう。これまでの薬剤は、ほとんどすべてが生合成過程を標的としたものである。抗菌薬市場における販売高上位を見ても、 β -ラクタム系 (ペプチドグリカン合成阻害) 2 種、マクロライド系 (タンパク質合成阻害) 2 種、フルオロキノロン系 (DNA 合成阻害) 2 種と、いずれも生合成反応を阻害することにより抗菌活性を発現するものである。40 年ぶりの新規作用メカニズムの抗菌薬として話題となったオキサゾリジノン系抗菌薬リネゾリド (Linezolid) においても作用標的はタンパク質合成系であり、この範疇から脱していない。その意味で、MreB 阻害剤 A22 の発見は、生合成過程のみならず細胞骨格が薬剤の標的となりうることを示した最初の例である。

細菌ゲノム情報の充実と共に生存に必須な遺伝子の同定により、新薬の作用標的となりうる候補は確実に絞られてきている。細胞骨格として働く FtsZ と MreB は、いずれも生存に必須であり、その欠損は細胞死を誘導する。特に FtsZ の阻害剤は近年精力的に探索が進められており、標的としての有効性も提唱されてきている (24)。では、MreB タンパク質をはじめとするアクチン様タンパク質は抗菌薬の標的としてどれほど期待できるのであろうか？ *mreB* 遺伝子は必須遺伝子であるが、その欠損株ではかなりの高頻度でサプレッサー変異株が出現する。実際に我々が最初に分離した *mreB* 変異株もなんらかのサプレッサー変異を有し

表 1. S-Benzylisothioureia 化合物の構造活性相関

Compounds			MIC (μg/ml)				Shape
Gram	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	
R	X	MreB	+	+	+	-	
1	Ph	Cl	100	100	100	>100	S
2	2-ClC ₆ H ₄	Cl	12.5	25	>100	>100	S
3	3-ClC ₆ H ₄	Cl	50	>100	50	>100	S
4	4-ClC ₆ H ₄	Cl	3.13	3.13	>100	>100	S
5	2-BrC ₆ H ₄	Br	50	50	>100	>100	S
6	3-BrC ₆ H ₄	Cl	>100	>100	>100	>100	S
7	4-BrC ₆ H ₄	Br	3.13	6.25	>100	>100	S
8	4-FC ₆ H ₄	Cl	12.5	12.5	50	50	S
9	4-IC ₆ H ₄	Cl	12.5	25	>100	>100	S
10	4-CH ₃ C ₆ H ₄	Cl	12.5	25	>100	>100	S
11	4-C ₂ H ₅ C ₆ H ₄	Cl	>100	>100	>100	>100	S
12	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₄	Cl	25	>100	>100	25	S
13	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₄	Cl	1.56	1.56	>100	>100	S
14	2,5-Cl ₂ C ₆ H ₄	Br	12.5	25	>100	>100	S
15	2,6-Cl ₂ C ₆ H ₄	Cl	12.5	25	>100	>100	S
16	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₄	Cl	3.13	3.13	100	>100	S
17	3,5-Cl ₂ C ₆ H ₄	Cl	>100	>100	>100	>100	S
18	c-C ₆ H ₁₁	Br	>100	>100	>100	>100	R
19	n-C ₆ H ₁₃	Cl	>100	>100	>100	>100	R
20	CH ₃	Br	>100	>100	>100	>100	R

データは文献 9 および 10 より抜粋した。化合物は塩酸塩もしくは臭酸塩からなる。MIC の決定に用いた細菌は *E. coli* が MG1655 株, *S. typhimurium* が NBRC13245 株 (ゲノム配列が決定された LT2 株と同種), *B. subtilis* が 168 株, *S. aureus* が NBRC15035 株 (ATCC29213 と同種) である。形態は液体培地中で 300 μg/ml を上限として MIC の 3 倍濃度で処理した大腸菌を 30°C で 16 時間培養したときの菌の形態を観察したものである。R が桿菌, S が球菌形態を表す。

ていることが判明している。また, A22 を大腸菌に作用させるとき, 細胞濃度が濃いと増殖を十分に抑制することができない。これらの理由はまだ十分には解明されていないが, 細菌は容易に MreB の欠損をバイパスして生存する仕組みを持っていると思われる。このような理由から, MreB を阻害することにより殺菌効果そのものを期待することはあまりできないと思われる。

しかしながら, 最近になってアクチン様タンパク質が様々な細胞機能に関与している例が報告されてきている。第一に挙げられるのは, タンパク質や細胞内小器官の細胞内輸送や配置におけるアクチン様タンパク質の関与である。病原性という観点では, 赤痢菌の細胞極に発現する毒性因子タンパク質 IcsA (VirG) タンパク質の細胞極への移動に MreB タンパク質が関与する可能性が示唆されている (18)。IcsA タンパク質は赤痢菌が腸管粘膜上皮細胞内に侵入したのち細胞内を移動するのに必要なアクチン依存的駆動力の発現に関与するタンパク質である。大腸菌内で発現させると細胞極に局在することが蛍光タンパク質との融合体を用いた実験から知られているが, MreB タンパク質の機能を阻害することで局在が異常になることが見出された。このことは IcsA タンパク質の細胞極への正常な局在には細胞骨格タンパク質が必須であることを示唆している。もし, IcsA のような病原性タンパク質の細胞内局在を阻害することにより, 病原性の発現そのものを抑制できるとす

るならば, アクチン様タンパク質は抗菌薬の有望な標的となるであろう。また, 前述の ParM タンパク質は薬剤耐性因子 R1 プラスミドの分配に必須なタンパク質であるが, それを阻害することにより薬剤耐性因子の伝播を阻害できるかもしれない。病原性とは関係ないが, 磁性細菌のアクチン様タンパク質 MamK は磁性器官 (magnetsome) の整理と細胞膜への陥入に関与することが報告されている (14)。細胞内小器官の輸送や配置にアクチン様タンパク質が機能することを示した例である。このように, 様々な細胞機能の発現にアクチン様タンパク質が関与していることから, その阻害剤が病原菌の様々な機能を阻害することにより抗菌薬としても利用できる可能性は十分に考えられる。

そこで, 我々は A22 を研究ツールとしてだけでなく, 細菌の細胞骨格タンパク質阻害剤として有効な抗菌薬へ開発するためのリード化合物となることを期待している。これまでの構造活性相関研究から (表 1), 必須骨格が S-ベンジルイソチオウレア骨格であることを明らかにしている (9)。また, 塩素や臭素によるベンゼン環の修飾が抗菌力の飛躍的な上昇に寄与することを見出した。現在までに, ベンゼン環上の 2 位および 4 位を塩素修飾した化合物が大腸菌およびサルモネラ菌に対してもっとも強い抗菌力を示すことが分かった (10)。ただ, 残念なことに MreB タンパク質を持っているにも関わらずグラム陽性細菌である枯草菌に対しては有効な化合物が見つかっていない。これまでの誘導

体では枯草菌の球菌化は確認できていない。また、多くの薬剤に耐性を示すことで知られているシュードモナス属細菌に対しても MIC が 100 µg/ml を切る化合物は見出せていない。今後は広い抗菌スペクトルを示す阻害剤の開発が重要となってくるであろうが、そのためにはタンパク質の構造情報をもとにした薬剤設計などが有効であろう。

文 献

- Bi, E.F., Lutkenhaus J. (1991): FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161164.
- Bork, P., Sander, C., Valencia, A. (1992): An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7290–7294.
- Dworkin, J., Losick, R. (2002): Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14089–14094.
- Erickson, H.P. (1995): FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* **80**, 367–370.
- Gelles, J., Landick, R. (1998): RNA polymerase as a molecular motor. *Cell* **93**, 13–16.
- Gitai, Z., Dye, N.A., Reisenauer, A., Wachi, M., Shapiro, L. (2005): MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**, 329–341.
- Gordon, G.S., Sitnikov, D., Webb, C.D., Teleman, A., Straight, A., Losick, R., Murray, A.W., Wright, A. (1997): Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* **90**, 1113–1121.
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffé, A. (1989): Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* **171**, 1496–1505.
- Iwai, N., Ebata, T., Nagura, H., Kitazume, T., Nagai, K., Wachi, M. (2004): Structure-activity relationship of S-benzylisothiourea derivatives to induce spherical cells in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2265–2269.
- Iwai, N., Fujii T., Nagura, H., Wachi, M., Kitazume, T. (2007): Structure-activity relationship study of the bacterial actin-like protein MreB inhibitors: Effects of substitution of benzyl group in S-benzylisothiourea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 246–248.
- Iwai, N., Nagai, K., Wachi, M. (2002): Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2658–2662.
- Jacob, F., Brenner, S., Cuzin, F. (1963): On the regulation of DNA synthesis in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bio.* **23**, 329–348.
- Jones, C.A., Carballido-López, R., Errington, J. (2001): Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913–922.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D.K., Jensen, G.J. (2006): Magnetsomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**, 242–245.
- Kruse, T., Blagoev, B., Løbner-Olesen, A., Wachi, M., Sasaki, K., Iwai, N., Mann, M., Gerdes, K. (2006): Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes & Dev.* **20**, 113–124.
- Kruse, T., Møller-Jensen, J., Løbner-Olesen, A., Gerdes, K. (2003): Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **22**, 5283–5292.
- Møller-Jensen, J., Jensen, R.B., Löwe, J., Gerdes, K. (2002): Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J.* **21**, 3119–3127.
- Nilsen, T., Yan, A.W., Gale, G., Goldberg, M.B. (2005): Presence of multiple sites containing polar material in spherical *Escherichia coli* cells that lack MreB. *J. Bacteriol.* **187**, 6187–6196.
- Okada, Y., Wachi, M., Hirata, A., Suzuki, K., Nagai, K., Matsushashi, M. (1994): Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* **176**, 917–922.
- Soufo, H.J., Graumann, P.L. (2003): Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr. Biol.* **13**, 1916–1920.
- van den Ent, F., Amos, L.A., Löwe, J. (2001): Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**, 39–44.
- van den Ent, F., Møller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., Löwe, J. (2002): F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* **21**, 6935–6943.
- Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H., Shapiro, L. (2004): Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9257–9262.
- Vollmer, W. (2006): The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 37–47.
- Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S., Matsushashi, M. (1987): Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 4935–4940.
- Wachi, M., Iwai, N., Kuniyama, A., Nagai, K. (1999): Irregular nuclear localization and anucleate cell production in *Escherichia coli* induced by a Ca²⁺ chelator, EGTA. *Biochimie* **81**, 909–913.
- Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada, A., Nagai, K. (1999): *Escherichia coli* *cafA* gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 483–488.
- Wang, M.D., Schnitzer, M.J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., Block, S.M. (1998): Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* **282**, 902–907.
- Webb, C.D., Graumann, P.L., Kahana, J.A., Teleman, A.A., Silver, P.A., Losick, R. (1998): Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **28**, 883–892.
- Yamaichi, Y., Niki, H. (2004): *migS*, a cis-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.* **23**, 221–233.

(担当編集委員 杉山剛志)