

## 総説

微生物が産生する金属キレート化合物の医学的利用

田島健治

第一薬科大学 育薬研究センター

Potential medical applications of microbial chelators

Kenji Tabata

*Drug Innovation Research Center, Daiichi University of Pharmacy,*

*22-1, Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511, Japan*

1. 諸言
2. シデロフォア
  - 1 シデロフォアの構造
  - 2 シデロフォアの取り込み
  - 3 シデロフォアの生合成
  - 4 鉄イオンの取り込み以外のシデロフォアの機能
3. シデロフォアの医薬品としての応用
  - 1 シデロフォアの金属キレート剤としての利用
  - 2 シデロフォアの合成阻害
  - 3 シデロフォアに関連した抗生物質の開発
4. 総括

### 1. 諸言

生物は微量元素として Fe, Zn, Cu 等の様々な遷移元素を必要とし、呼吸などによるエネルギー獲得、電子移動、物質変換など、生命の根幹に関わる反応に利用している。これらの遷移元素は、生体の活動に必須ではあるが、過剰に存在すると生命に対して毒性を示す。そのため、遷移元素の生体内における含有量の調整がされている。

遷移金属の中で鉄は、クラーク数が4と、地表において比較的豊富に存在する遷移金属元素である。鉄イオンは、通常、 $\text{Fe}^{2+}$ または $\text{Fe}^{3+}$ の状態を取り、中性付近の pH においては、 $\text{Fe}^{2+}$ は水に対する溶解度が高いのに対し、 $\text{Fe}^{3+}$ は水に溶けにくい。還元状態にあった原始地球環境においては、鉄イオンは水溶性の高い $\text{Fe}^{2+}$ として存在し、生物にとって利用しやすいイオンであった。そのため、鉄イオンは、呼吸などによるエネルギー獲得、電子移動、などの生体内の主要な反応だけでなく、他の様々な反応においても利用され、現在までに100以上の酵素が鉄硫黄クラスターや、ヘムとしての鉄イオンを補酵素として利用していることが知られている。しかしながら、酸素分子の出現により可溶性の $\text{Fe}^{2+}$ の酸化が起こり、現在の地球環境下では、鉄イオンは主に不溶性の $\text{Fe}^{3+}$ として存在する。すなわち、現在の地球環境においては、鉄は豊富に

存在するものの、多くの鉄が生物にとって利用しにくい  $\text{Fe}^{3+}$  の状態にある。そのため、生物にとって鉄イオンは欠乏した状態にある。また、生体内は外的環境に比べ還元的雰囲気ではあるが、病原性細菌の宿主である生物の体内でも、宿主が生体内で循環、再利用しているため、遊離の鉄イオンはほとんど存在しない。例えば、哺乳類の鉄イオンのおよそ3分の2がヘモグロビンとして赤血球に存在し、30%が貯蔵タンパク質であるフェリチンに結合した状態である。また、残りのほとんどの鉄イオンはヘムタンパク質や、鉄硫黄クラスターを有する鉄硫黄タンパク質、さらに、トランスフェリンのような鉄イオン輸送タンパク質と結合しているといわれている。そのため、宿主内において遊離した  $\text{Fe}^{3+}$  の濃度は  $10^{-24}\text{M}$  と非常に低濃度である<sup>1,2</sup>。一般的な微生物が増殖するのに最適な鉄イオン濃度は  $10^{-6}\text{M}$  程度であるため、宿主に感染した微生物は鉄イオン欠乏状態にある。

鉄イオンは、DNA 合成に関わる酵素の補欠分子として利用されることから、すべての生物にとって必要な元素である。病原性細菌などの微生物にとっても例外ではなく、鉄イオンが欠乏すると生育に重大な問題がおこる。そこで、不足した鉄イオンを獲得するための手段が必要になる。微生物が鉄イオンを取り込む方法には、拡散による受動的な取り込みと、鉄イオンのキレート剤に対するエネルギー消費型のレセプターを介して能動的に取り込む方法がある。拡散による取り込みの場合、鉄イオンの取り込みは周辺環境の濃度に強く依存するため、鉄イオンが不足した宿主体内環境では十分な鉄イオンが取り込めない。一方で、能動輸送による鉄イオンの取り込みは、鉄イオンのキレート剤によって宿主から鉄イオンを競争的に得ることができるため、遊離した鉄イオンが不足した状態でも十分な鉄イオンを取り込むことが可能となる。

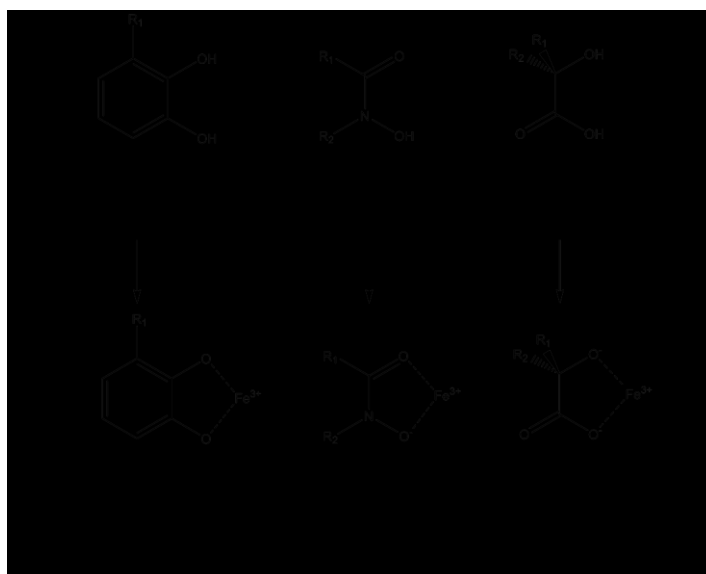
この微生物が鉄イオンを取り込むために、分泌するキレート化合物はシデロフォアと呼ばれている。シデロフォアは  $\text{Fe}^{3+}$  と非常に安定な錯体を形成する。この鉄イオンに対して高い結合能を有するシデロフォアは、鉄過剰症に対する治療に用いられているなど医薬品としての利用が行われている。また、このシデロフォアを介した鉄イオンの取り込み機構は、人をはじめとした哺乳類は有していないことから、新たな抗生物質開発のためのターゲットとなる。本総説では、シデロフォアをはじめとした微生物産生キレート剤について概略し、その医薬品への応用について述べる。

## 2. シデロフォア

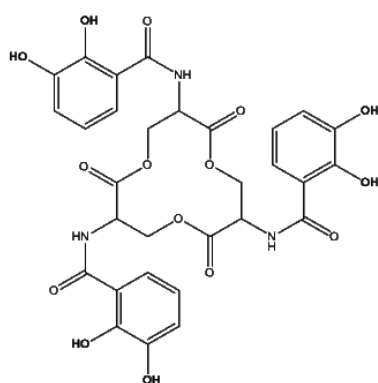
シデロフォア(siderophore)とは、ギリシャ語で鉄イオン運搬体を意味しており、シデロフォアは鉄イオンに結合する低分子代謝物の総称である。シデロフォアは低い鉄イオン濃度条件下で微生物によって分泌される化合物であり、菌体外で鉄イオンと強固に結合した後、細胞外膜に存在するレセプタータンパク質を介して菌体内に取り込まれる。そのため、シデロフォアの主な役割は微生物へ鉄イオンの供給であることが以前から報告されている。しかし、近年、シデロフォアの鉄イオンの取り込み以外の機能についても注目されている。

## 2-1 シデロフォアの構造

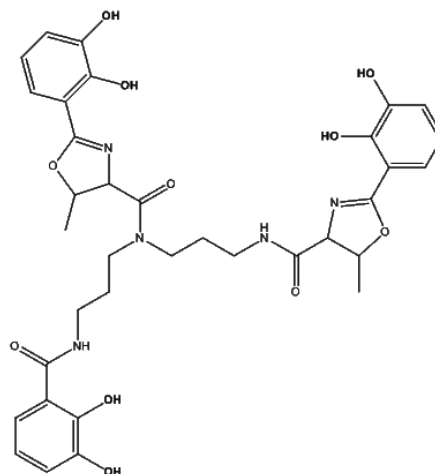
シデロフォアは現在までに多くの微生物が生産することが知られており、およそ500種類以上の構造のシデロフォアが知られている。これらシデロフォアは配位する官能基から、カテコール型、ヒドロキサム酸型、および $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸型に分類される（図1）。しかし、これらの官能基を複数種もつ混合型やHydroxyphenyloxazolone,  $\alpha$ -amino-carboxylate,  $\alpha$ -hydroxyimidazoleなどの官能基を有するシデロフォアも知られている。これらシデロフォアの多くは鉄イオンに配位する原子として、硬いルイス塩基である酸素原子をもつことから、シデロフォアは硬いルイス酸である $\text{Fe}^{3+}$ と安定性の高い錯体を形成する。一方で、中間的なルイス酸である $\text{Fe}^{2+}$ は、より軟らかいルイス塩基である窒素原子や硫黄原子と強く結合するため、酸素原子を配位原子とするシデロフォアとの錯体の安定性は低い。また、シデロフォア中のカテコール、ヒドロキサム酸といった官能基は、 $\text{Fe}^{3+}$ に対して二座配位し、安定な五員環構造を取る。また、シデロフォアは二座キレート形成するこれらの官能基を1単位として、2ないし3単位のキレート配位子が環状・鎖状・分岐状に集合した構造をとっている。（図2において、 $\text{Fe}^{3+}$ をキレートする部位を太字で示した）。配位部位にカテコールを有するシデロフォアとして、大腸菌やサルモネラ菌が生産するエンテロバクチン（Enterobactin, 図2(A))がよく知られている<sup>3,4</sup>。エンテロバクチンは分子内に3つのカテコール部位を有する。 $\text{Fe}^{3+}$ に配位したエンテロバクチンの構造は、六配位八面体構造しており、 $\text{Fe}^{3+}$ は高スピン状態で存在していることが明らかになっている。また、その安定度定数 $\log\beta(=49)$ は、鉄-シデロフォア錯体の中で最大の値である<sup>5</sup>。3つのヒドロキサム酸部位が、それぞれメチレン架橋したデスフェリオキサミン（Desferrioxamine, 図2(C))類の $\log\beta$ は30程度であり、一般的なキレート剤であるEDTAは $\log\beta=25$ であることを考えると、これらシデロフォアの鉄錯体は熱力学的にかなり安定であることがわかる。このエンテロバクチンやデスフェリオキサミンの $\text{Fe}^{3+}$ 錯体の安定度定数は、宿主の鉄イオン貯蔵タンパク質であるフェリチンや鉄イオン輸送タンパク質であるトランスフェリンより大きく、これらのタンパク質から鉄イオンを奪うことができる。そのため、病原性細菌はシデロフォアを利用することにより、鉄イオンが欠乏した宿主環境中においても、鉄イオンを取り込むことが可能となる。



## カテコール型

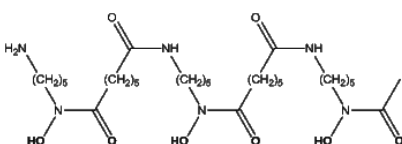


(A) エンテロバクチン

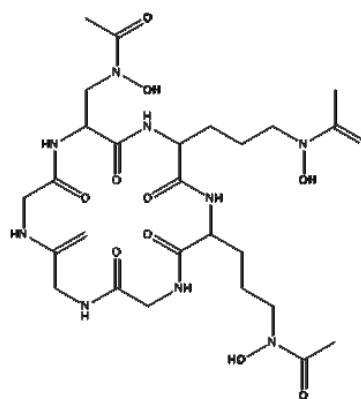


(B) ピブリオバクチン

## ヒドロキサム酸型

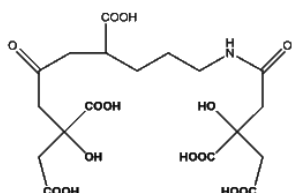


(C) デスフェリオキサミン



(D) フェリクロム

## $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸型



(E) スタフィロフェリン A

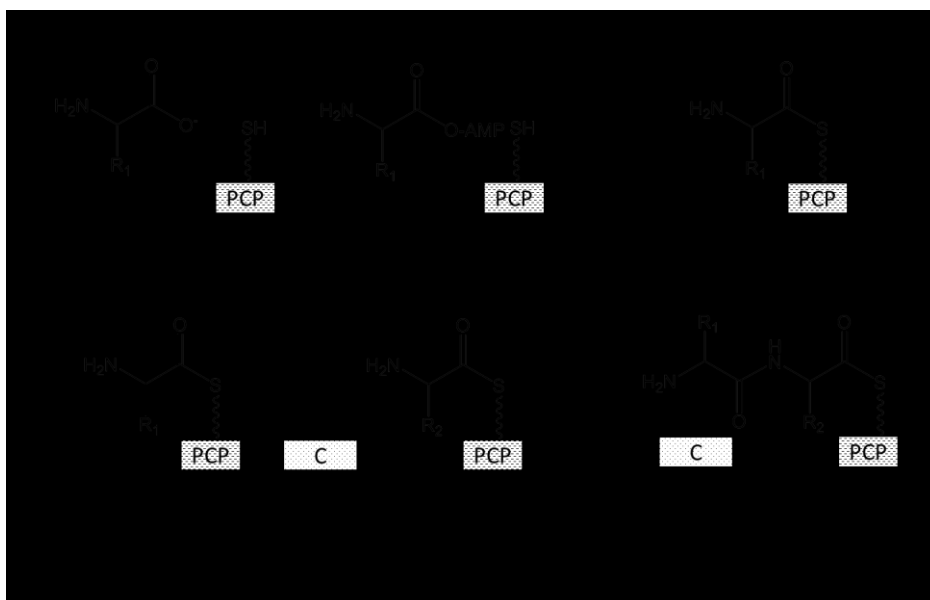
図2 代表的なシデロフォアの構造

### 2-2 シデロフォアの合成機構

多くの微生物においては、これらシデロフォアの合成システムやレセプターは包括的鉄イオン調節因子である Fur (ferric uptake repressor) や、Fur と類似したタンパク質により転写制御されている<sup>6-9</sup>。また、Streptomyces や Corynebacteria など高 GC グラム陽性菌では、DtxR (diphtheria toxin regulator) より制御されている<sup>10</sup>。微生物のシデロフォアや、そのレセプターは通常、菌体内の鉄イオン濃度が低い時に発現される。シデロフォアの生合成は通常は non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 依存型システム又は、non-ribosomal peptide synthetase independent siderophore (NIS) 合成酵素および polyketide synthase system (PKS) により行われる<sup>11</sup>。

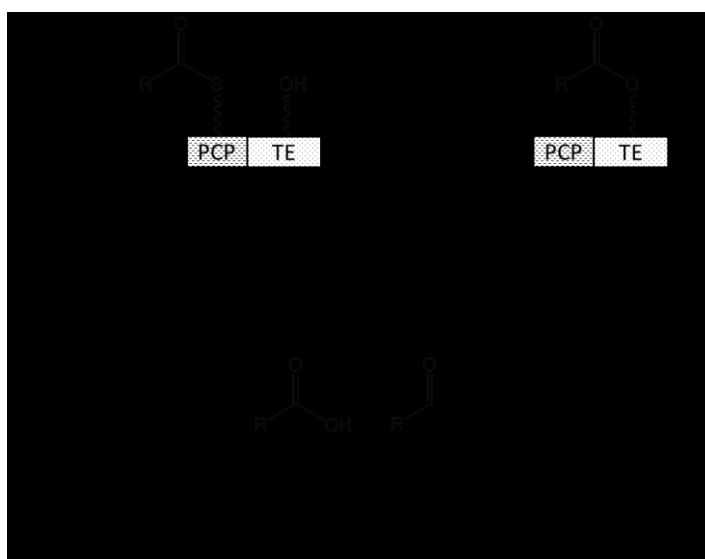
NRPS は複数のドメインにより構成されるモジュールが複数連結した構造を取る。例えば、NRPS によりペプチド鎖を合成する場合、NRPS は、1分子のアミノ酸残基の伸張に対し、1つのモジュールが必要である。このNRPSのモジュールには、開始モジュール、伸張モジュール、終結モジュールなどがある。開始モジュールは、アデニル化ドメイン(A) peptidyl carrier protein (PCP)ドメインから構成され、伸張モジュールでは、アデニル化ドメイン(A)、PCPドメイン、縮合ドメインから構成される。また、他の修飾に関わるドメインを含むものもある。

NRPS によるシデロフォアの合成は次のように行われる。最初のステップとして、開始モジュールのアデニル化ドメインにより、ATP を加水分解してアミノ酸中のカルボキシル基のアデニル化が起こる。その後、アデニル化されたアミノ酸は、Coenzyme A により活性化された PCP ドメインとチオエステル結合する。次に、伸張反応では、開始モジュールと同様の反応により伸張モジュールに結合したアミノ酸に対し、縮合ドメインを介して開始モジュールに結合したアミノ酸残基が結合する。



最終的な伸張反応後、シデロフォアは終了ドメインを含むモジュールにエステル結合により結合する。その後、エステル結合の加水分解による脱離化、環化が起こることにより、シデロフォアの合成が終了する。

また、NRPS に類似した構造を有する PKS をシステム内に含む NRPS/PKS により合成されるシデロフォアも存在する。このため、NRPS や NRPS/PKS は巨大な酵素



複合体であり、Yersiniabactin の生合成に関わるタンパク質 irp1 は 350 kDa を超える。

NRPS は主に、カテコール型シデロフォアの合成に関わり、NRPS を介して合成されるシデロフォアとしては、大腸菌, *Salmonella enterica*、*Klebsiella* spp.、*Shigella* spp. が合成するエンテロバクチン、緑膿菌が合成する pyrochein、pyoverdin や、コレラ菌が合成する Vibriobactin などが知られている<sup>12</sup>。

ヒドロキサム酸基やカルボキシル基を持つタイプのシデロフォアは、主に NIS 合成酵素により合成される。NIS 合成酵素はモノオキシゲナーゼや脱炭酸酵素、アミノ転移酵素、アミノ酸リガーゼ等から構成されている<sup>13</sup>。NIS 合成酵素により合成されるシデロフォアは、いくつかの病原性細菌の毒性因子として見出されている。例えば、百日咳菌や気管支敗血症菌が合成する alcaligin<sup>14,15</sup>、黄色ブドウ球菌が合成する staphylobactin<sup>16</sup>、炭疽菌が合成する petrobactin<sup>17,18</sup> などがある。これらシデロフォアの合成にかかわる NRPS/PKS や NIS 合成酵素は、人間には存在しないことから、抗生物質のターゲットとなっている。

### 2-3 シデロフォアの取り込み

Fe<sup>3+</sup>が結合したシデロフォア (Fe<sup>3+</sup>-シデロフォア) のグラム陰性菌への取り込みは outer-membrane receptors (OMRs), periplasmic binding proteins (PBPs), TonB complex, ABC-type transporters により行われる。Fe<sup>3+</sup>-シデロフォアは最初に外膜に存在する Fe<sup>3+</sup>-シデロフォア特異的 OMR と結合する。大腸菌の OMR である FepA<sup>19</sup>, FhuA<sup>20</sup>, FecA<sup>21</sup> および、緑膿菌の OMR である FpvA<sup>22</sup> および FptA<sup>23</sup> の結晶構造解析から、これら Fe<sup>3+</sup>-シデロフォア特異的 OMR は、おおよそ共通した構造をとることが明らかになっている。大腸菌のフェリクロム (Ferrichrome, 図 2(D)) の Fe<sup>3+</sup>錯体に対する OMR である FhuA は、2 2 個の  $\beta$  ストランドから構成される樽 ( $\beta$  バレル) 構造をとる C 末端側のバレルドメインと、その内部に存在するコルク栓構造をした N 末端側のプラグドメインにより形成されている (図. 5)<sup>24</sup>。FhuA と Fe<sup>3+</sup>-フェリクロムの複合体の研究から、Fe<sup>3+</sup>-フェリクロムは、 $\beta$  バレル構造の内側にある 10 個のアミノ酸残基と強く結合し、その結合定数は *in vitro* では 50 nM<sup>25</sup> になる。シデロフォアが外膜を通過するプロセスは、エネルギーを消費する能動輸送であり、その駆動力は細胞膜上に存在する TonB 複合体により供給される<sup>26,27</sup>。この TonB-複合体は、TonB, ExbB および ExbD から構成されている<sup>28</sup>。このうち、TonB タンパク質の C 末端側は 3 つの  $\beta$  ストランドを形成し、外膜の輸送タンパク質の N 末端側に

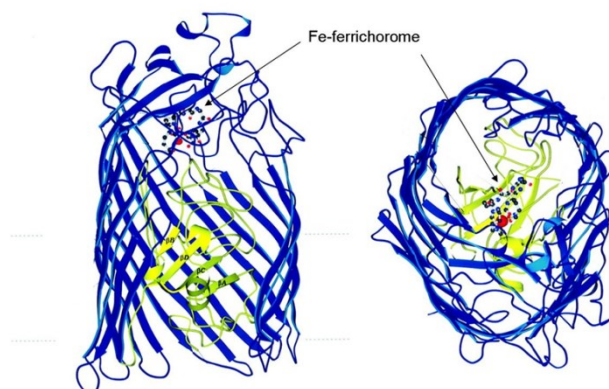


図5 FhuA-フェリクロム複合体の立体構造  
(Andrew D. Ferguson et al. *Science* 1998 282: 2215 – 2220)

あるプラグドメインに結合している。この TonB 複合体は細胞質膜内外のプロトン濃度勾配を駆動力とした構造変化により、OMR から  $\text{Fe}^{3+}$ -フェリクロムを遊離し、 $\text{Fe}^{3+}$ -フェリクロムを外膜中からペリプラズムへ移動させる。その後、ペリプラズムに移動した  $\text{Fe}^{3+}$ -フェリクロムは periplasmic binding proteins (PBPs) である FhuD に認識され、複合体を形成する。この  $\text{Fe}^{3+}$ -フェリクロム-FhuD 複合体が ABC-type transporter に結合した後、ABC transporter は ATP を加水分解して得られるエネルギーを利用して  $\text{Fe}^{3+}$ -フェリクロムを細胞質へ輸送する。

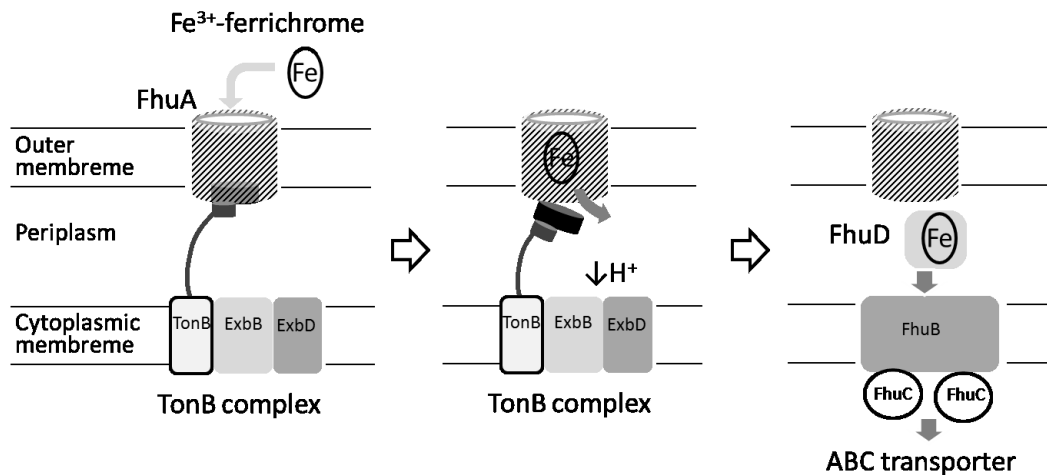


図6 大腸菌における $\text{Fe}^{3+}$ -フェリクロムの取り込み

細胞質内に輸送された  $\text{Fe}^{3+}$ -シデロフォアが鉄イオンを遊離する機構はいくつかの種類が知られている。そのうちの主な機構では、 $\text{Fe}^{3+}$ -シデロフォアの鉄イオンが還元酵素により  $\text{Fe}^{3+}$  から  $\text{Fe}^{2+}$  へと還元されることによりシデロフォアから  $\text{Fe}^{2+}$  が解離する<sup>29</sup>。ほかにも、 $\text{Fe}^{3+}$ -シデロフォアの加水分解が行われることがある<sup>30</sup>。鉄イオンを解離したシデロフォアは細胞内で分解されるか、細胞外へと放出される。

グラム陽性菌の場合は、グラム陰性菌と異なり外膜及びペリプラズムの通過が必要ないことから、OMR および TomB 複合体を介さない機構で細胞内に取り込まれる。グラム陽性菌の PCP はペプチドグリカン層に存在するリポタンパク質である<sup>31</sup>。グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* の場合、この PBP は  $\text{Fe}^{3+}$ -シデロフォアと高いアフィニティを示し、このシデロフォア-PBP 複合体を介して ABC-type transporter により細胞膜を透過する<sup>32,33</sup>。

#### 2-4 鉄の取り込み以外のシデロフォアの役割

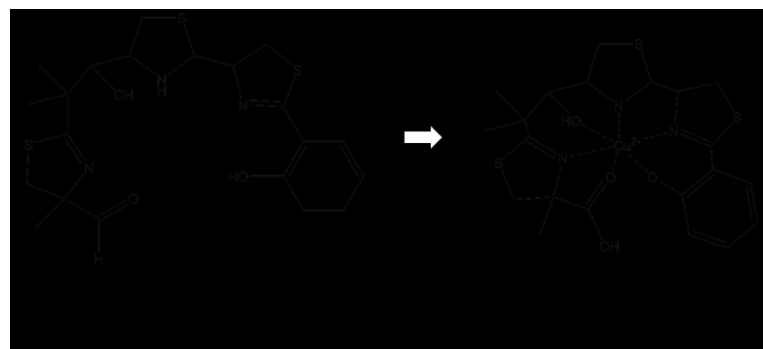
シデロフォアは宿主の鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンや、鉄輸送タンパク質であるトランスフェリンに結合した鉄イオンを解離する。そのため、シデロフォアは感染した宿主内における病原体微生物の低鉄イオン環境の改善に利用されていると考えられてきた。しかしながら、ある種の病原性細菌は、実験室内の培養環境において、鉄イオンが過剰にあるにもかかわらず、シデロフォアの生産を行う。そのため、このシデロフォアを介した鉄イオン取り込みシステムは、単に、鉄イオンの取り込みに利用されるのみならず、宿主と病原体とのインターフェイスにおいて特殊な役割を持つ

ていると考えられている<sup>34</sup>。

大腸菌が生産する主なシデロフォアとして、エンテロバクチンがある。しかし、動物や感染患者から分離した大腸菌は、エンテロバクチン以外にも、しばしば3つタイプのシデロフォアを生産する。例えば、尿路感染症患者から分離した大腸菌において、生育にとって必須な条件でないにもかかわらず、複数のシデロフォアの合成遺伝子の発現量が増加している<sup>35,36</sup>。また、尿路感染症において複数のシデロフォアが合成されていることは、質量分析による解析からも明らかになっている<sup>37</sup>。しかしながら、この大腸菌が複数のシデロフォアを合成する理由は、これまでのところ不明であった。

微生物が複数のシデロフォアを作る理由の一つとしては **inflammation-associated protein siderocalin (SCN)** の存在があげられる<sup>38</sup>。このタンパク質は、大腸菌が分泌する主要なシデロフォアであるエンテロバクチンの  $\text{Fe}^{3+}$  複合体と強く結合する。SCN 欠損マウスでは、シデロフォアとしてエンテロバクチンのみを生産する大腸菌の血液感染が増加することが報告されていることから、SCN は  $\text{Fe}^{3+}$ -エンテロバクチンと結合することにより微生物が利用できない形にすることにより、大腸菌の毒性を抑制していると考えられる<sup>39-41</sup>。しかしながら、シデロフォアの機能的な解析から、大腸菌が合成するエンテロバクチン以外の3つのタイプのシデロフォア (**salmochelin**, **yersiniabactin**, **aerobactin**) と、SCN は複合体を形成しないことが明らかになった。すなわち、**salmochelin**, **yersiniabactin**, **aerobactin** の3つのシデロフォアは宿主から見て、「ステルス シデロフォア」となる。**Salmochelin** (エンテロバクチンの加糖体) はエンテロバクチンに比べて細胞膜への透過性が低く、鉄イオンとの結合定数も低いにもかかわらず、エンテロバクチンと並行して合成される理由は、この SCN による鉄イオンの取り込み阻害を回避することが理由であると考えられた<sup>42</sup>。大腸菌が複数のシデロフォアを生産する他の理由としては、シデロフォアの構造の違いにより至適 pH などが異なる。そのため、尿路環境の変化など pH などの影響に対して広い範囲で対応可能になる。例えば、**aerobactin** は、 $\text{Fe}^{3+}$ -エンテロバクチンの安定性が低下する低い pH 環境において、安定性の高い  $\text{Fe}^{3+}$  錯体を形成する<sup>43,44</sup>。

一方、大腸菌が生産するシデロフォアのうち、エルシニアバクチン (**yersiniabactin**) については、鉄キレート剤として以外の機能が注目されている。エルシニアバクチンは当初、感染性エルシニア属細菌が生産するシデロフォアとして報告されていた。その後、尿路感染した大腸菌においても見つけられたシデロフォアである<sup>45</sup>。シデロフォアは、*in vivo* においては基本的に鉄イオンと錯体形成すると考えられているが、*in vitro* においては、鉄イオン以外の様々な金属イオンに対して錯体形成する。前述したようにカテコール、ヒドロキシサム酸、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸を含むシデロフォアは、酸素原子を配

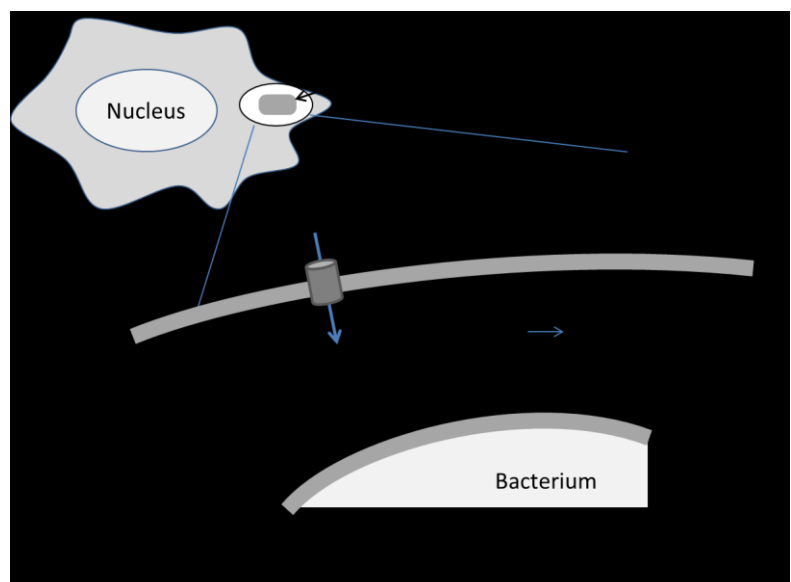




位原子として  $\text{Fe}^{3+}$  と安定な錯体を形成する。一方で、エルシニアバクチンは酸素原子以外に窒素原子が配位原子として作用することから、より軟らかい酸である  $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{Cu}^{2+}$  と安定な錯体を形成する。そこで、宿主の生体環境においてエルシニアバクチンがどのような金属に結合しているかについて研究がなされた。Chaturvedi et al. による LC-MS を用いたスクリーニングの結果、健常者の尿を用いたところ、エルシニアバクチンは鉄イオンとは別の金属とも錯体を形成していることが明らかとなった<sup>46</sup>。このエルシニアバクチンが結合していた金属は質量分析の同位体パターンから銅イオンであることが明らかとなった。その後、エルシニアバクチンを生産する大腸菌に感染した患者の尿中や、エルシニアバクチンを生産する大腸菌 UT189 株を感染させたマウスの尿中および血中から銅イオンと結合したエルシニアバクチンが検出された。興味深いことにこれらの人とマウスにおいて、 $\text{Fe}^{3+}$ -エルシニアバクチンと  $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンの割合を比較すると  $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンのほうが多く存在することが明らかとなった。これらの結果は、宿主の生体内において、エルシニアバクチンは鉄イオンよりも銅イオンと多く結合していることを示していた。また、生体内における銅イオン濃度と鉄イオン濃度を考慮すると明らかに過剰の  $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンが生成していることから、病原菌と宿主間においてエンテロバクチンが結合できる鉄イオンが制限されているか、または、利用できる銅イオンが増加していることが考えられた。

この過剰な  $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンの生成の理由として、銅イオンの抗菌作用を緩和が考えられている。微生物に対する銅イオンの毒性の機構についてはまだよくわかっていない点が多いが、Fenton 反応によるラジカル生成が重要であると考えられている。Fenton 反応では、 $\text{Cu}^+$  と過酸化水素が反応することにより毒性の高いヒドロキシルラジカルの生成が生成する。また近年の報告によると、細胞質の  $\text{Cu(I)}$  は鉄イオンクラスターの分解を引き起こし、それにより、ヘム合成や枝状アミノ酸合成などの様々な代謝プロセスを阻害することが明らかとなっている<sup>47-49</sup>。尿路感染した大腸菌は銅イオンに対して高い耐性を示す。エルシニアバクチン合成能を欠損した大腸菌の銅イオン耐性が著しく減少する一方、精製したエルシニアバクチンの添加により銅イオンに対する耐性の上昇がおこる。これらことから、この大腸菌の銅イオン耐性に  $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンの生成が関与していると考えられている。

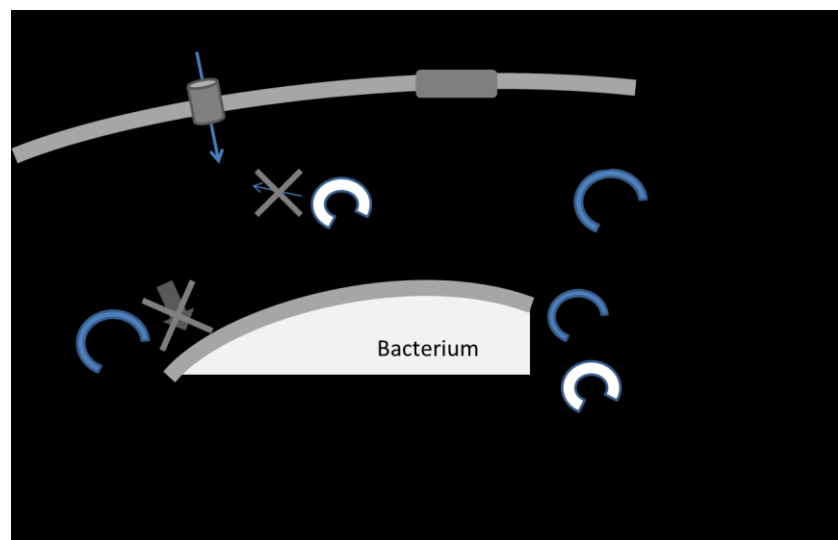
感染した病原性細菌はマクロファージに貪食さ



れた後、様々な作用により殺菌され、分解される。大腸菌を含むファゴソームに関する報告によると、ファゴソーム内における銅イオン濃度は、ATP7A トランスポーターによる銅イオン輸送により病原菌にとって十分な毒性を示す濃度まで上昇する<sup>50</sup>。このため、ファゴソーム内での殺菌機構の一つとして、銅イオンが重要な役割を担っていると考えられている。この銅イオンを利用した宿主の防御機構に対して、大腸菌がエルシニアバクチンを生産することは優位に働く。これまでの研究によると、エルシニアバクチン合成能を欠損した尿路感染性大腸菌はマクロファージ様細胞 RAW264.7 の細胞内での殺菌に対して、エルシニアバクチンを発現する野生株に比べて感受性が高いことが示されている。また、エルシニアバクチン欠損株は銅イオンを欠乏した RAW264.7 細胞に対して感受性の増加を示さなかった。これらのことから、マクロファージに貪食された大腸菌は、ファゴソーム中の銅イオンによる毒性に対してエルシニアバクチンを生産することにより防御していると考えられる。ファゴソーム内において ABC7A により輸送された  $\text{Cu}^+$  がどのようにエルシニアバクチンに結合できる  $\text{Cu}^{2+}$  へと酸化されるかについてはまだ明らかにされていないが、大腸菌のペリプラズムに存在する  $\text{Cu}^+$  の  $\text{Cu}^{2+}$  へ酸化を触媒する multi-copper oxidase, CueO などが関わっていると考えられる。宿主の尿中や血中で観測された  $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンはファゴソームの様な高銅濃度環境下で生成していると考えられる。

ファゴソーム内におけるエルシニアバクチンを介した銅イオン耐性機構はいくつか考えられている。1 つ目の機構として、エルシニアバクチンが  $\text{Cu}^+$  より毒性の低い  $\text{Cu}^{2+}$  と錯体を形成することにより、 $\text{Cu}^+$  によるフェントン反応が起こるのを抑制していると考えられている。 $\text{Cu}^{2+}$  との結合はすべてのシデロフォアにおいて、銅イオン耐性に関わるわけではなく、カテコール型のシデロフォアのみを生産する大腸菌は銅イオンの毒性に対してむしろ感受性が高い。これは、カテコール型のシデロフォアでは、 $\text{Cu}^{2+}$  をカテコールにより、より毒性の高い  $\text{Cu}^+$  へと還元するためである。そのため、銅イオン存在下においてエルシニアバクチンはエンテロバクチンによる  $\text{Cu}^+$  の形成を阻害し、フェントン反応を抑制することにより大腸菌を保護しているかもしれない。

また、もう 1 つの機構として、 $\text{Cu}^{2+}$ -エルシニアバクチンは、SOD 様活性を示すことから、ファゴソーム内において NADPH oxidase により、生成したスーパーオキシドアニオンラジカルを不均化反応により消去していることが考えられる。



さらに、Cu<sup>2+</sup>-エルシニアバクチンは、Fe<sup>3+</sup>-エルシニアバクチンと異なり、細菌内に取り込まれないことから、エルシニアバクチンが遊離銅イオンを細胞質に侵入するのを防いでいると考えられている。

このように、ある種のシデロフォアは、鉄イオンの輸送以外にも病原性細菌の宿主内での感染性に関与していることが示唆されている。

### 3 シデロフォアの医薬品としての応用

#### 3-1 シデロフォアの金属キレート剤としての利用

##### 鉄過剰症に対する治療

シデロフォアは、Fe<sup>3+</sup>に対して安定性の高い錯体を形成し、不溶性の Fe<sup>3+</sup>を可溶化することができることから、鉄過剰症に対する治療薬として利用されている。鉄過剰症として知られている病気としては、表 X に示したものがある。全身性疾患のうち、原発性ヘモクロマトーシスは遺伝的な要因による消化器官からの過剰な鉄の吸収が引き起こす鉄過剰症であり、瀉血による治療が可能である。一方で、残りの 5 つの鉄過剰症では、原発性ヘモクロマトーシスと治療法が異なる。例えば、クーリー貧血 (βサラセミア) は、ヘモグロビン合成において β鎖の変異により生産量が減少により、α/β鎖の比のバランスが崩れた結果、過剰な α鎖の凝集、沈殿し、赤血球の細胞膜に障害

がおこり、赤血球の寿命が短くなる。そのため、クーリー貧血の患者は輸血が必要となり、輸血により鉄が過剰に供給された結果、鉄過剰に陥る。しかし、クーリー貧血の鉄過剰に症に対しては、貧血がおこるため、ヘモクロマトーシスのような瀉血による治療が行えない。そのため、このような鉄過剰症には鉄キレート剤による治療が唯一の手段であり、*Streptomyces pilosus* により生産されるデフェリオキサミン-Aは鉄過剰症の効果的な治療薬として用いられている。

シデロフォアの鉄イオンに対する結合を利用した治療で注目されている領域としては、緑膿菌が引き起こす感染症がある<sup>51</sup>。この細菌は広い範囲の抗生物質に対して耐性を示す遺伝子(e.g the Mex-AB-OprM and MexXY efflux system)を染色体に有しているが、低鉄イオン濃度条件下においてこれらの遺伝子は過剰発現している。これは、これら抗生物質耐性遺伝子の遺伝子産物が低鉄イオン濃度条件における緑膿菌の生育に対して何らかの役割を担っていることを示めている。そこで、MexXY efflux system の阻害剤と、鉄イオンのキレート剤を組み合わせた結果、低鉄イオン濃度環境

表 1 鉄過剰症

<b>全身性疾患</b>
原発性ヘモクロマトーシス
クーリーの貧血
再生不良性貧血
鎌状赤血球症
骨髄異形成
<u>ダイヤモンドブラックファン貧血</u>
<b>局所性疾患</b>
パーキンソン病
再灌流障害
出血性脳卒中
黄斑変性症

下でより高い生育阻害効果を得られることが報告された<sup>52</sup>。この結果は多剤排出機構阻害剤と標的細菌に取り込まれないシデロフォアの組み合わせは、緑膿菌などの生育やバイオフィーム形成を効率的に阻害できる可能性を示している。

さらに、近年、微生物による銅イオンの取り込みに関わるシデロフォア様化合物が発見された。銅イオンは原始地球環境においては、水溶性の低い一価の銅イオンとして存在したのに対して、現在の酸化環境では、水溶性の高い二価銅イオンとして存在する。そのため、鉄、亜鉛、などの遷移金属は生体にとって不足になりがちであり、積極的な取り込みが行われているのに対し、銅イオンはむしろ生体内からの排出や無毒化が行われる傾向にある。しかしながら、メタンを唯一の炭素源として生育するメタン酸化細菌は、メタン代謝にかかわる最も重要な酵素メタンモノオキシゲナーゼの活性中心が銅イオンであることから、周辺環境から積極的に銅イオンを摂取する<sup>53</sup>。そのために、低分子化合物メタノバクチンを分泌する。メタノバクチンは、鉄イオン以外を対象とした金属イオンの取り込みに関わるキレート化合物として初めて発見された化合物である<sup>54,55</sup>。メタノバクチンは、配位原子として、やわらかいルイス塩基である窒素と硫黄を有しており、やわらかいルイス酸である  $\text{Cu}^+$  と非常に安定な錯体を形成する。この銅イオンに対する結合能からメタノバクチンはウイルスン病などの銅過剰症の治療薬など、その医学的応用が注目されている。また、シデロフォアとは異なりメタノバクチンは  $\text{Cu}^+$  と同様にやわらかい酸である水銀イオンとも安定な錯体を形成することから、重金属イオンに対する治療薬としての利用も期待されている<sup>56</sup>。

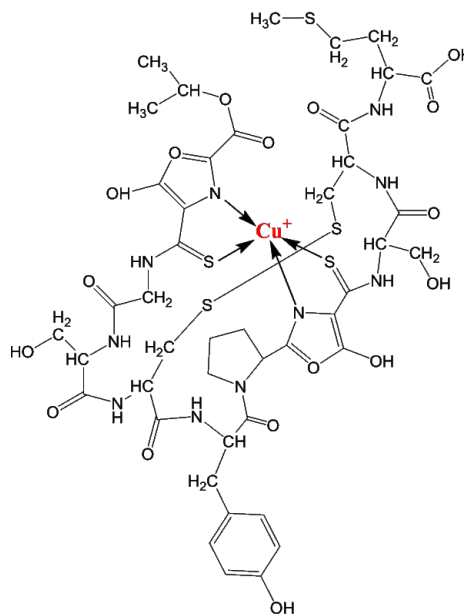


図10 銅-メタノバクチンの構造

### 3-2 シデロフォア合成阻害による抗生物質の開発

病原性細菌が鉄欠乏条件下で生育するためにシデロフォアを生産することから、シデロフォアの生合成阻害は、病原性細菌の増殖を抑制するうえで有効な戦略となると考えられている。そのようなシデロフォア合成阻害剤に関する報告は1970年代から行われている。抗結核薬である *p*-aminosalicylate (PAS) は micobactin の合成を阻害することにより *Mycobacterium smegmatis* や *M. bovis* の鉄の利用を阻害することが見出されている<sup>57</sup>。

PAS の投与は *M. smegmatis* に対し、鉄イオンの欠乏を引き起こし、鉄タンパク質に関わる代謝活性を低下させる。これは、Micobaction の合成を阻害するものと考えられる。PAS の添加により、鉄欠乏状態で培養した *M. smegmatis* では、micobactin の生

産量が40-80%低下する。また、micobactin合成の基質であるサリチル酸の蓄積が観測されたことから、PASによるmycobactin合成の阻害機構は、サリチル酸のアデニル化ドメインが標的となっていると考えられている<sup>58</sup>。また、シデロフォア生合成に関わる酵素の結晶構造解析の結果、触媒部位に対して特異的に結合する阻害剤の開発が行われている。NRPSによるシデロフォア合成経路においてカテコールを合成起点に持つシデロフォアは、サリチル酸のアデニル化ドメインをもつ。このサリチル酸アデニル化ドメインをターゲットとして salicyl sulfamoyl adenosine (SAL-AMS)が合成されている。このSAL-AMSは*M. tuberculosis*や*Y. pestis*のアデニル化ドメインに対して結合し、シデロフォアの合成を阻害することにより、低鉄イオン培地中におけるこれら病原性細菌の生育を阻害する<sup>59</sup>。

NRPS非依存型シデロフォア合成システムの阻害についても研究がなされている。NRPS非依存型シデロフォア合成システムは前述したようにNIS合成酵素により合成されるシデロフォアは、いくつかの病原性細菌の毒性因子として見出されている。そのため、NIS合成酵素の特異的な阻害は、これらの病原性細菌に対する効果的な抗生物質となる。黄色ブドウ球菌生産するシデロフォアstaphyloferrin BのNIS合成酵素に含まれるSbnEおよび炭疽菌の生産するpetrobactinのNIS合成酵素に含まれるAsbAに対する阻害物質の探索の結果、Baulamysin A, BはSbnEとAsbAの酵素活性に対して阻害効果を示すことが明らかとなった<sup>60</sup>。このBaulamysin A, Bは黄色ブドウ球菌や炭疽菌以外のグラム陽性菌やグラム陰性菌に対しても生育阻害を示した。このことから、NIS合成酵素をターゲットとした阻害剤の開発は、幅広い宿主に対する抗生物質の開発につながることを期待される。

また、シデロフォア生合成経路の阻害は、病原性細菌の鉄利用を妨げるだけでなく、病原性細菌の宿主の免疫に対する感受性を増加させる可能性がある。前述したように、エルシニアバクチンの役割として、ファゴソーム中の殺菌作用に対する体制の獲得がある。このようなタイプのシデロフォアの生合成の阻害は、マクロファージによる病原性細菌の殺菌をより効果的にすると考えられる。

### 3-3 シデロフォアを利用した抗生物質の開発

病原菌は、細胞内への抗生物質の侵入を阻害することにより、抗生物質に対する耐性を得ることができる。そのため、病原菌に対する効率的な薬剤の輸送方法の確立は、多剤耐性菌に対する効率的な治療法となる。この病原菌の抗生物質耐性を回避し、薬剤を輸送する方法の一つとして、「トロイの木馬法」(“Trojan Horse” strategy)がある。これは細菌が特異的なレセプターを通して、ある化合物を輸送する際に、その化合物と一緒に抗菌活性を有する物質を取り込ませる方法である。このトロイの木馬法を利用することにより、バイオフィーム中や病原菌内への薬剤の輸送効率を向上させることができる<sup>61</sup>。

シデロフォアを介した鉄イオンの取り込みは、前述したように、特異的レセプターを通して、能動的に取り込まれる。そのため、抗生物質をシデロフォアに結合するこ

とは、抗生物質の細胞内への侵入を促進し、抗菌活性を向上させる。また、宿主である人間はこのシデロフォアを介した鉄イオンの取り込み機構を有していないため、抗生物質のキャリアーとしてシデロフォアを用いることは、微生物に対する選択性が高めることが期待される。さらに、シデロフォアをキャリアーとすることのもう一つの利点は、シデロフォア-抗生物質複合体は、病原菌のシデロフォア特異的レセプターを介して取り込まれるため、病原菌の鉄イオンの取り込みを抑制させる効果を有する。このため、シデロフォアをキャリアーとして結合した抗生物質の開発が行われている。

トロイの木馬法に用いられる、シデロフォア-抗生物質複合体は、3つの部位から構成される。すなわち、シデロフォア、リンカー、薬剤である。シデロフォア領域は、鉄イオンと結合し、病原菌が持つシデロフォア特異的な細胞輸送システムを介してシデロフォア-薬剤複合体の菌体内への取り込みを促す役割を有する。リンカーの機能はシデロフォアと薬剤を結合させるとともに、薬剤の遊離を制御することにある。すなわち、シデロフォアと結合した薬剤が菌体内に輸送されたときにのみ毒性を発揮することができれば、より副作用の低い抗生物質となる。そこで、シデロフォア-薬剤複合体が微生物の細胞内に到達した際、薬剤を遊離するようなリンカーが用いられている。薬剤領域は、菌体内に輸送された際、病原菌に障害を与え、死滅させる役割を有する。

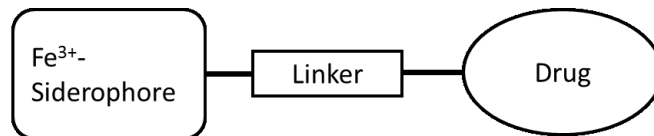


図11 シデロフォア-薬剤複合体（シデロマイシン）

シデロフォア-薬剤複合体は、天然の化合物として最初に発見された。この自然界から分離されたシデロフォア-薬剤複合体はシデロマイシンと呼ばれており、シデロマイシンの発見自体は、シデロフォアよりも古く1960年代に行われた抗生物質の探索の際に発見されている。当初は Sideramines, siderochroms と呼ばれていた。このようなシデロマイシンとしては、*Streptomyces* や *Actinomyces* が生産するアルボマイシン (Albomycins) , danomycins, salmycins などがある。

シデロマイシンの中で、最も詳細に研究されているのが、アルボマイシンである。アルボマイシンはフェリクロムに類似したシデロフォアが、抗生物質であるチオリボシルピリミジンに結合した構造を持つ。アルボマイシンは、フェリクロムの輸送システムにより、大腸菌やグラム陰性菌の細胞外膜と細胞内膜を通過することが明らかとなっている。*E. coli* の OMR であるフェリクロムの  $Fe^{3+}$  錯体に対するレセプター FhuA とアルボマイシンとの複合体の結晶構造解析によると、アルボマイシンは、フェリクロムと同じように FhuA コア中の 10 個のアミノ酸残基と結合している。また、抗生物質部位は他の 4 つのアミノ酸残基と結合していた。FhuA および Ton-システムにより細胞外膜を通過した後、アルボマイシンはペリプラズムにある FhuD と結合する<sup>62</sup>。

アルボマイシンと FhuD との結合定数は 5.4  $\mu\text{M}$  であり、フェリクロムと FhuD との結合定数は 1  $\mu\text{M}$  である。FhuD は細胞内膜に存在する ABC トランスポーターを介し得てアルボマイシンを大腸菌の菌体内に輸送する。大腸菌内において、リンカー部位がプロテアーゼである Peptidase N により切断されることにより抗生物質部位がアルボマイシンから遊離する。遊離した抗生物質部位は細菌内に留まり、seryl-tRNA synthetase を阻害する<sup>63</sup>。一方で鉄イオンを遊離したシデロフォア部位は菌体外に排出される。Peptidase N 欠損変異体は、アルボマイシンに対して耐性を示す。それゆえ、シデロマイシンからの抗生物質部位の遊離は、シデロマイシンの抗菌性にとって、必須であることがわかる。Peptidase N による切断を受けなかったアルボマイシンは、シデロフォアとして細胞内への鉄の輸送のみを行う。

他のシデロマイシンとしては、Ferrimycins は ferrioxamine B と抗菌活性をもつ部位からなる。この Ferrimycins はグラム陰性菌とくに *Staphylococcus aureus* や *Bacillus spp.* に対して抗菌作用を示す<sup>64,65</sup>。また、Danomycins や Salmycins はキャリアー部位である Trishydroxamate danoxamine と抗生物質部位であるアミノグリコシドからなる。これら化合物はグラム陽性菌、特に staphylococci や streptococci のタンパク質合成を阻害する<sup>66,67</sup>。これらシデロマイシンは微生物に対して、かなり低い濃度で生育阻害を起こす。アルボマイシンの大腸菌に対して  $10^{-8}$  M で生育阻害を引き起こす<sup>68</sup>。このように、いくつか報告において多剤耐性菌の感染などに対してシデロフォア-薬剤複合体の治療効果が示されている。しかしながら、シデロマイシンには、病原性細菌が耐性を獲得しやすいといった欠点がある。例えば、グラム陰性菌に対して、シデロマイシンは外膜に存在する特異的トランスポーターによる輸送に依存するが、この特異的トランスポーターの欠損はこれら複合体に対する耐性を獲得する。また、天然のシデロマイシンはあまり多くの種類が知られていないため、抗生物質の開発に限界がある。

シデロフォアの外膜レセプターの構造と機能に対する知見の増加は multiple TonB-dependent receptors をターゲットするシデロフォア-薬剤複合体の合成を可能にし、これら複合体に対する耐性の獲得を困難にする可能性がある。また、合成シデロフォアは hydroxamate, catecholate, hydroxamate-catecholate を混合した様々な構造をもつことができる。この配位分子を複数種もつタイプのシデロフォアは、様々な経路により、病原性細菌内に取り込まれることにある。2つのカテコール部位と1つのヒドロキサム酸部位を、carbacephem に結合したシデロフォアとのシデロフォア-薬剤複合体は、*Aceinetobacter* に対して、元の化合物の 2000 倍高い生育阻害活性を示した<sup>69,70</sup>。このようなトロイの木馬法を利用した、数々のシデロフォア-薬剤複合体が合成されている。例えば、 $\beta$  ラクタム系の抗生物質と結合したシデロフォア-薬剤複合体は細胞内に取り込まれた後、ペリプラズムに存在するペニシリン結合タンパク質と結合し、グラム陰性細菌の生育を阻害する。近年、 $\beta$  ラクタム系抗生物質をシデロフォア-薬剤複合体として用いることにより緑膿菌の細胞壁透過障壁を通過する能力を増加することが明らかにされている<sup>71</sup>。また、*In vitro* の実験において、ampicillin または amoxicillin を triscatechol に結合したシデロフォア-薬剤複合体は、緑膿菌の生育を効

果的に阻害する。他にも、Pyoverdine を緑膿菌の菌体内に、効率的に輸送することに成功している。シデロフォアに結合させる抗生物質として、 $\beta$ ラクタム系抗生物質の他に、バンコマイシン、norfloxacin, spiramycin, erihomysylamime などが用いられている。また、neoenactin や nucleoside analog と結合したシデロマイシンは、カビに対しても効果が示されている<sup>72,73</sup>。

#### 4. まとめ

微生物が産生する鉄イオンキレート剤であるシデロフォアは、その高い鉄イオン結合能を利用した薬剤としてだけでなく、その取り込みや合成が微生物特異的であることを利用した薬剤の開発に用いられている。特に、鉄イオンの取り込みは、病原性細菌が宿主の中で生育するうえで、必須なものであることから、その取り込み機構を利用することは、有用な抗生物質の開発のターゲットとなる。また、近年、シデロフォアの自然界の役割として、鉄イオンの取り込み以外の機能があることがわかってきた。これらは感染した病原菌が宿主の免疫機能を回避するうえで利用されている可能性があることから、このシデロフォア合成の阻害も抗生物質の効果を高めるうえでのターゲットになる。このようにシデロフォアは新たな抗生物質の開発のターゲットとして期待されている。さらに、メタノバクチンのように鉄イオン以外に結合するキレート化合物を微生物が産生することが明らかとなり、今後も新たな金属に対するキレート化合物の探索やその医学的な利用法が見出されることが期待される。

#### 参考文献

1. Aisen, P. *J. Biol. Chem.* **253**, 1930–1937 (1978).
2. Raymond, K. N., Dertz, E. a & Kim, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3584–3588 (2003).
3. Pollack, J. R. & Neilands, J. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 989–992 (1970).
4. O'Brien, I. G. & Gibson, F. *Biochim Biophys. Acta* **215**, 393–397 (1970).
5. Neilands, J. B. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723–26726 (1995).
6. Ernst, J. F., Bennett, R. L. & Rothfield, L. I. *J. Bacteriol.* **135**, 928–934 (1978).
7. Hantke, K.. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177 (2001).
8. Bagg, A. & Neilands, J. B. *Biochemistry* **26**, 5471–5477 (1987).
9. Hantke, K. *Molec. Gen. Genet.* **197**, 337–341 (1984).
10. Tao, X., Schiering, N., Zeng, H. Y., Ringe, D. & Murphy, J. R. *Mol. Microbiol.* **14**, 191–197 (1994).
11. Crosa, J. H. & Walsh, C. T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223–49 (2002).
12. Crosa, J. H. & Walsh, C. T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223–49 (2002).
13. Challis, G. L. *Chembiochem* **6**, 601–611 (2005).



14. Nishio, T., Tanaka, N., Hiratake, J., Katsube, Y., Ishida, Y. & Oda, J. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8733–8734 (1988).
15. Moore, C. H., Foster, L. a., Gerbig, D. G., Dyer, D. W. & Gibson, B. W. *J. Bacteriol.* **177**, 1116–1118 (1995).
16. Dale, S. E., Sebulsky, M. T. & Heinrichs, D. E. *J. Bacteriol.* **186**, 8356–8362 (2004).
17. Cendrowski, S., MacArthur, W. & Hanna, P. *Mol. Microbiol.* **51**, 407–417 (2004).
18. Koppisch, A. T. *et al. BioMetals* **18**, 577–585 (2005).
19. Buchanan, S. K. *et al. Nat. Struct. Biol.* **6**, 56–63 (1999).
20. Locher, K. P. *et al. Cell* **95**, 771–778 (1998).
21. Yue, W. W., Grizot, S., & Buchanan, S. K. *J. Mol. Biol.* **332**, 353–368 (2003)
22. Cobessi, D., *et al. J. Mol. Biol.* **347**, 121–134 (2005).
23. Cobessi, D., Celia, H., & Pattus, F. *J. Mol. Biol.* **352**:893–904 (2005).
24. Andrew D. *et al. Science* **282**, 2215 – 2220 (1998)
25. Locher, K. P. & Rosenbusch, J. P. *Eur. J. Biochem.* **247**, 770–5 (1997).
26. Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quiñones, F. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215–237 (2003).
27. Pawelek, P. D. *et al. Science* **312**, 1399–1402 (2006).
28. Higgs, P. I., Larsen, R. A. & Postle, K. *Mol. Microbiol.* **44**, 271–281 (2002).
29. Greenwood, K. T. & Luke, R. K. *J. Biochim. Biophys. Acta* **525**, 209–218 (1978).
30. Brickman, T. J. & McIntosh, M. A. *J. Biol. Chem.* **267**, 12350–12355 (1992).
31. Sutcliffe, I. C. & Russell, R. R. *J. Bacteriol.* **177**, 1123–8 (1995).
32. Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1781–1804 (2008).
33. Wencewicz, T. A., Long, T. E., Möllmann, U. & Miller, M. J. *Bioconjug. Chem.* **24**, 473–486 (2013).
34. Koh, E.-I. & Henderson, J. P. *J. Biol. Chem.* **290**, 18967–18974 (2015).
35. Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J., & Mobley, H. L. T. *PLoS Pathog.* **6**, e1001187 (2010)
36. Reigstad, C. S., Hultgren, S. J., & Gordon, J. I. *J. Biol. Chem.* **282**, 21259–21267 (2007)
37. Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E., & Henderson, J. P. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 731–736 (2012)
38. Holmes, M. A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C. & Strong, R. K. *Structure* **13**, 29–41 (2005).
39. Goetz, D. H., *et al. Mol. Cell* **10**, 1033–1043 (2002).

40. Berger, T., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1834–1839 (2006).
41. Flo, T. H., *et al. Nature* **432**, 917–921 (2004).
42. Luo, M., *et al. ACS Chem. Biol.* **1**, 29–32 (2006).
43. Valdebenito, M., Crumbliss, A. L., Winkelmann, G., & Hantke, K. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 513–520 (2006).
44. Abergel, R. J., Warner, J. A., Shuh, D. K., & Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8920–8931 (2006).
45. Henderson, J. P., *et al. PLoS Pathog.* **5**, e1000305 (2009).
46. Chaturvedi, K. S., *et al. Nat. Chem. Biol.* **8**, 731–736 (2012).
47. Macomber, L., & Imlay, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 8344–8349 (2009).
48. Chillappagari, S., *et al. J. Bacteriol.* **192**, 2512–2524 (2010).
49. Djoko, K. Y., & McEwan, A. G. *ACS Chem. Biol.* **8**, 217–2223 (2013).
50. White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., & Petris, M. J. *J. Biol. Chem.* **284**, 33949–33956 (2009).
51. Liu, Y., Yang, L. & Molin, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3960–3963 (2010).
52. Llanes, C. *et al.* **48**, 1797–802 (2004).
53. DiSpirito, A. A., *et al. J. Bacteriol.* **180**, 3606–3613 (1998).
54. Kim, H. J., *et al. Science* **305**, 1612–1615 (2004).
55. El Ghazouani, A. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8400–8404 (2012).
56. Vorobev, A. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5918–5926 (2013).
57. Brown, K. A., & Ratledge, C. *Biochim. Biophys. Acta* **385**, 207–220 (1975).
58. Adilakshmi, T., Ayling, P. D., & Ratledge, C. *J. Bacteriol.* **182**, 4–271 (2000).
59. Ferreras, J. A., Ryu, J. S., Di Lello, F., Tan, D. S., & Quadri, L. E. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 2–32 (2005).
60. Tripathi, A. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **136**, 1579–1586 (2014).
61. Möllmann, U., Heinisch, L., Bauernfeind, A., Köhler, T. & Ankel-Fuchs, D. *BioMetals* **22**, 615–624 (2009).
62. Clarke, T. E., Braun, V., Winkelmann, G., Tari, L. W. & Vogel, H. J. *J. Biol. Chem.* **277**, 13966–13972 (2002).
63. Stefanska, A. L., M. Fulston, C. S. Houge-Frydrych, J. J. Jones & S. R. Warr. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**:1346–1353 (2000).
64. Braun, V. *Drug Resist. Updat.* **2**, 363–369 (1999).
65. Zähler, H., Diddens, H., Keller-Schierlein, W., & Nägeli, H.U. *Jpn. J. Antibiot.* **30**:201–206 (1977).
66. Huber, P., Leuenberger, H. & Keller-Schierlein, W. *Helv. Chim. Acta* **69**, 236–245 (1986).

67. Vertesy, L., Aretz, W., Fehlhaber, H.-W., & Kogler, H. *Helv. Chim. Acta* **78**, 46–60 (1995).
68. Winkelmann, G., & Drechsel, H. (1997). Microbial siderophores, p. 200–246. In Kleinkauf, H. & von Döhren, H. (ed.), *Products of secondary metabolism*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
69. Ghosh, A., Ghosh, M., Niu, C., Malouin, F., Moellmann, U., & Miller, M. J. *Chem. Biol.* **3**, 1011–1019 (1996).
70. Ghosh, M., & Miller, M. J. *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 43–48 (1996).
71. Budzikiewicz, H. *Curr Top Med Chem* **1**, 73–82 (2001).
72. Bernier, G. *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 241–248 (2005).
73. Ghosh, M., & Miller, M. J. *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 1519–1525 (1995).