

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06509

研究課題名(和文) ラクタム系抗生物質とチオール反応産物に関する基盤研究

研究課題名(英文) Study of the reaction between beta-lactam antibiotics and thiol compounds

研究代表者

小野 勝彦(Ono, Katsuhiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：80573592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：最近、ラクタム系抗生物質がシステインなどのチオール化合物の存在下で抗菌活性を失うことを見出した。質量分析器と核磁気共鳴を用いた解析から、システインとラクタム系抗生物質は、1:1付加体を形成していることが明らかとなった。また、大腸菌のシステイン輸送関連遺伝子であるfliY欠損株ではラクタム感受性が高くなり、さらに付加体形成が減少していることが分かった。これらのことから、ペリプラズムのシステインがラクタム系抗生物質と反応し、不活化することで、細菌の抗菌剤耐性に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently we found that beta-lactam antibiotics is inactivated by reaction with thiol compounds such as cysteine. On the basis of LC-MSMS and NMR analysis, it was shown that beta-lactam antibiotics and cysteine formed one to one adduct. E.coli fliY mutant, which is loss of cysteine/cystien shuttle system, showed high-sensitive to beta-lactam antibiotics and produced less cysteine-beta lactic antibiotics adduct compared with wild type strain. These results suggest that bacterial cysteine might contribute to antibiotics resistance via formation of cysteine-beta-lactam antibiotics adduct in periplasmic space.

研究分野：分子生物学

キーワード：ラクタム系抗生物質 システイン チオール化合物

1. 研究開始当初の背景

抗生物質はその分子標的の違いに依らず、共通して細菌の活性酸素生成を高めることにより、特異的な抗菌作用と協調して働いていることが報告された (*Cell* 130: 797-810, 2007; *Nature Biotechnol.* 31: 120-121; 2013)。このことから、細菌の活性酸素除去系は、抗生物質感受性に大きな影響を与えていると考えられている。

一方、システインやグルタチオンなどのチオール化合物は抗酸化の主要役割を担っていることが知られている。そこで、チオール化合物の抗生物質感受性に与える影響を解析したところ、システインがラクタム系抗生物質を不活性化することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、システインとラクタム系抗生物質の不活性化機序を明らかにするとともに、本反応の抗生物質耐性に与える影響やその生物学的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) チオール化合物とβラクタム系抗生物質の反応産物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて単離、精製した。

(2) チオール化合物とβラクタム系抗生物質の反応産物の定量には質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて定量した。

(3) チオール化合物とβラクタム系抗生物質の反応産物の構造解析には核磁気共鳴機 (NMR) を用いた。

(4) チオール化合物とβラクタム系抗生物質の反応産物の抗菌活性評価には、ディスク法を用いた。

(5) 大腸菌変異株の抗生物質感受性試験には段階希釈法を用いた。

4. 研究成果

(1) システインは生理的条件下でβラクタム系抗生物質を不活性化することが分かった。また、チオール基を持たないアミノ酸である、セリン、メチオニン、グリシンではβラクタム系抗生物質の不活性化は起こらないことから、システインのチオール基が重要であることが示唆された。

システイン以外のチオール化合物である、グルタチオン (GSH) や N-アセチルシステイン (NAC) では、高 pH 条件においてβラクタム系抗生物質との付加体形成が見られるものの、生理的条件下では見られない。このことから、チオール化合物とβラクタム系抗生物質との反応はチオール基の pKa に依存していることが考えられる。

(2) βラクタム系抗生物質であるアンピシ

リン、メロペネムとシステインの反応産物を単離、精製に成功した。単離、精製した反応産物の抗菌活性を調べたところ、いずれの反応産物も抗菌活性を失っていた。

(3) βラクタム系抗生物質とシステインの反応産物の質量分析計と核磁気共鳴による解析から、反応産物はβラクタム系抗生物質のβラクタム環とシステインのアミノ基が 1 : 1 で結合した構造であることが分かった。

(4) βラクタム系抗生物質を処理した大腸菌、黄色ブドウ球菌からは、システイン-βラクタム系抗生物質付加体が検出されることから、本反応は菌体内で起こっているものと考えられる。

(5) βラクタム系抗生物質は細胞膜を透過できないことが知られている。このことから、βラクタム系抗生物質とシステインの反応は細胞膜外空間であるペリプラズムで起こっていると考えられた。大腸菌はペリプラズムにシステインを積極的に輸送すると同時に、システインの酸化体であるシスチンを細胞質内に取り込むことで、外環境からの酸化ストレスからの防御システムの存在が知られている (*JBC* 2010: 285, 17479-)。このシステイン/シスチンシャトルシステムの構成因子である YdeD と FliY の大腸菌変異株を用いて、βラクタム系抗生物質感受性を調べたところ、FliY 変異株で有意にβラクタム系抗生物質感受性が上がることが分かった。

以上のことから、ペリプラズムに輸送されたシステインがβラクタム系抗生物質と付加帯を形成することでβラクタム系抗生物質を不活性化し、抗生物質に対する耐性を上昇させていることが示唆された。

本研究より、システイン/シスチンシャトルシステムの阻害剤は抗生物質の効果を高めることが考えられ、新しい抗菌剤開発につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Ono, K., Jung, M., Zhang, T., Tsutsuki, H., Sezaki, H., Ihara, H., Wei, F.Y., Tomizawa, K., Akaike, T., Sawa, T. Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. **Free Radic. Biol. Med.**, 106: 69-79, 2017. [査読有り]
2. Kyaw, K., Harada, A., Ichimaru, H.,

- Kawagoe, T., Yahiro, K., Morimura, S., Ono, K., Tsutsuki, H., Sawa, T., Niidome, T. Silver Nanoparticles as Potential Antibiofilm Agents Against Human Pathogenic Bacteria. **Chemistry Letters**. 46: 594-596, 2017. [査読有り]
3. Ahmed, K.A., Zhang, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Ida, T., Akashi, S., Miyata, K., Oike, Y., Akaike, T., Sawa, T. Synthesis and Characterization of 8-Nitroguanosine 3',5'-Cyclic Monophosphorothioate Rp-isomer as a Potent Inhibitor of Protein Kinase G1a. **Biol Pharm Bull**. 40: 365-374, 2016 Dec 16. [査読有り]
4. Jung, M., Kasamatsu, S., Matsunaga, T., Akashi, S., Nishimura, A., Ono, K., Morita, M., Hamid, H. A., Fujii, S., Kitamura, H., Sawa, T., Ida, T., Motohashi, H., Akaike, T. Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. **Biochem Biophys Res Commun.**, 480: 180-186, 2016. [査読有り]
5. Tsutsuki, H., Jung, M., Zhang, T., Ono, K., Ida, T., Kunieda, K., Ihara, H., Akaike, T., Sawa, T. Endogenous occurrence of protein S-guanylation in Escherichia coli: Target identification and genetic regulation. **Biochem Biophys Res Commun.**, 478:7-11, 2016. [査読有り]
6. Akashi, S., Ahmed, K.A., Sawa, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Burgoyne, J., Ida, T., Horio, E., Prysazhna, O., Oike, Y., Rahaman, M., Eaton, P., Fujii, S., Akaike, T. Persistent Activation of cGMP-dependent Protein Kinase by a Nitrated Cyclic Nucleotide Via Site-specific Protein S-Guanylation. **Biochemistry**, 55:751-61, 2016. [査読有り]

[学会発表](計 4件)

1. 小野勝彦、津々木博康、張田力、瀬崎浩史、赤池孝章、澤智裕. チオール基とβラクタム系抗生物質の反応性に基づく新規βラクタム-タンパク質付加体形性の同定とその生物学的意義の解明. 第90回日本細菌学会総会. 2017年3月18日. 仙台.

2. 小野勝彦、Ahtesham Ahmed Khandarker、津々木博康、張田力、井田智章、宮田敬士、尾池雄一、赤池孝章、澤智裕. Rp-ニトロcGMPによるS-グアニル化を介したプロテインキナーゼG(PKG)の活性阻害. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会. 2016年8月30日. 仙台.
3. Kastuhiko Ono, Ahmed Khandarker Ahtesham, Hiroyasu Tsutsuki, Tianli Zhang, Tomoaki Ida, Keishi Miyata, Yuichi Oike, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa. Rp-isomer of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate as a potent inhibitor of cGMP-dependent protein kinase. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016. 5. 20-22, Sendai.
4. Katsuhiko Ono, Hiroyasu Tsutsuki, Tianli Zhang, Hiroshi Sezaki, Takaaki Akaike, and Tomohiro Sawa. Desensitization by Penicillin Binding Protein 5 (PBP5) Against β-lactam antibiotics via Formation of Cysteinyl-β-lactam-protein adducts. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, The 127th Summer Meeting of the Korean Society for Microbiology, 2016, 5. 12-13, Korea.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: イオウ原子を同位体標識したシステイン及びシステイン誘導体の合成法の確立
 発明者: 澤智裕、小野勝彦
 権利者: 国立大学法人熊本大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-090864
 出願年月日: 2016年4月28日
 国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

[その他]
 ホームページ等
<http://kumadai-bisei.com>

6. 研究組織
 (1)研究代表者

小野勝彦 (Ono Katsuhiko)
熊本大学大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：80573592

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし