

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07778

研究課題名(和文) 微生物の生産するアミノグリコシド耐性酵素阻害物質の探索

研究課題名(英文) Search for inhibitors of aminoglycoside resistant enzyme produced by microorganisms

研究代表者

塩見 和朗 (Shiomi, Kazuro)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：40235502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性機構がない黄色ブドウ球菌RN4220株にpND50(E. coli-S. aureus shuttle cloning vector)を用いてプロモーター領域を含むaac(6)-Ie/aph(2)-Iaを形質転換し、二機能酵素発現株を樹立した。さらに、RN4220株にpND50ベクターを形質転換した形質転換体もコントロール検定菌として樹立した。二つの形質転換体を用いて、アルベカシンの耐性を克服する活性物質探索のシステムを構築した。3年間で微生物培養液をおよそ5,000検体をスクリーニングし、活性物質の探索を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌問題は喫緊に解決すべき課題であり、感染症における画期的な医薬リードとして人知を超えた天然物由来の新規母核発見することは世界的医療問題の解決に繋がる。また微生物代謝産物を標的とする本研究で見出される探索研究技術は、広範囲な次世代微生物利用技術の1つとなると考えられる。さらに本研究の遂行に伴う微生物資源ライブラリーおよびその代謝物ライブラリーの一層の拡充と高質化により、これ以降の天然物創薬研究や医薬以外の分野での有用物質発見に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus strain RN4220 without a drug resistance mechanism was transformed with aac(6)-Ie/aph(2)-Ia containing a promoter region using pND50 (E. coli-S. aureus shuttle cloning vector) to establish a bifunctional enzyme expressing strain. In addition, a transformant of RN4220 strain with pND50 vector was also established as a control strain for assay system. Two transformants were used to establish a system for the screening of active substances to overcome ABK resistance; approximately 5,000 samples of microbial cultures were screened and searched for active substances against the bifunctional enzyme expressing transformant in 3 years.

研究分野：天然物化学、微生物化学

キーワード：薬剤耐性酵素阻害物質 アルベカシン耐性 微生物代謝産物 薬剤耐性克服物質 アミノグリコシド耐性 抗生物質 アルベカシン修飾酵素 二機能酵素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

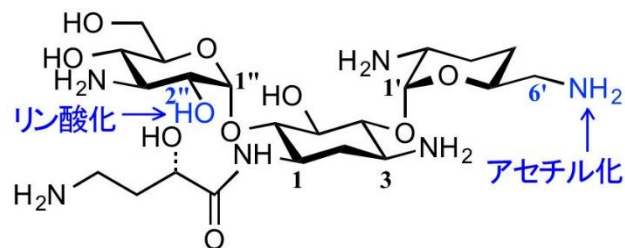
1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド系抗生物質はストレプトマイシンやカナマイシンの発見以来、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌、大腸菌などのグラム陰性菌、抗酸菌に対して強い抗菌活性を持つことで広く使用されてきた。中でもアルベカシン (ABK) はベカナマイシン (カナマイシン B) を原料としてほとんどの細菌に抗菌効果を示す誘導体として合成され、わが国ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬として重要な抗生物質である。

薬剤耐性菌の中でも MRSA は β -ラクタム系抗生物質のみならず多くの抗生物質に耐性になっており、院内感染菌の 9 割近くが本菌であることから重視されている。また最近では院内感染ではなく市中感染型の MRSA も問題になっている。MRSA の β -ラクタム系抗生物質に対する薬剤耐性は、 β -ラクタム系の標的であるペニシリン結合タンパク質 (PBP) とは別種の新たな PBP2' を MRSA が生産し、これが β -ラクタムに親和性を持たないことから β -ラクタムが無効になるという機構による。わが国では MRSA 治療薬として、グリコペプチド系のバンコマイシンとテイコプラニン、オキサゾリジノン系のリネゾリド、リポペプチド系のダブトマイシンおよびアミノグリコシド系の ABK が認可されている。それぞれの薬剤について副作用や耐性菌の出現などの問題点が報告されているが、ABK に関しては数%の MRSA が ABK に耐性となっていることが問題である。

2. 研究の目的

アミノグリコシド系抗生物質アルベカシン (ABK) はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬としてたいへん重要である。しかし一部の MRSA は ABK を修飾する二機能酵素を持つことにより ABK 耐性となり、大きな問題となっている。そこで MRSA の ABK 耐性を克服する物質 (二機能酵素を阻害する物質) をスクリーニングして発見することにより、動物実験で ABK と併用して ABK 耐性 MRSA に治療効果を示す新規物質を創製することを目的とする。



二機能酵素によるアルベカシンの不活性化

3. 研究の方法

これまでスクリーニングに用いてきた臨床分離 MRSA には、二機能酵素をコードする *aac(6)-Ie/aph(2'')*-Ia 以外にもアミノグリコシド系薬剤を修飾しうる修飾酵素が存在することが PCR により明らかとなっている。さらに、他の薬剤耐性機構の存在も示唆され、取り込み促進のような全く別の作用も考えられるため、従来の臨床分離株を直接スクリーニング株として使用する二機能酵素阻害物質の探索研究は適切でないと考えられる。したがって、真に二機能酵素を標的とした ABK 耐性克服活性物質を選抜するために、黄色ブドウ球菌の二機能酵素発現系の構築を行った。薬剤耐性機構がない黄色ブドウ球菌 RN4220 に pND50 (*E. coli*-*S. aureus* shuttle cloning vector) を用いてプロモーター領域を含む *aac(6)-Ie/aph(2'')*-Ia を形質転換し、二機能酵素発現株を樹立した。さらに、RN4220 に pND50 ベクターのみを形質転換した形質転換体も作製した。二機能酵素を導入した pND50-*aac(6)-Ie/aph(2'')*-Ia を保有する RN4220 を用いて、ABK と共存しているときに阻止円径の大きくなるサンプルを微生物培養液よりスクリーニングした。また通常の RN4220 に対しては抗菌活性を示さないことを確認することで、単なる抗菌物質は除外できた。さらに二機能酵素阻害活性を測定することで、実際に酵素を阻害するものを選択し、細胞毒性のないものを選んで、大量培養・精製を行った。

4. 研究成果

3 年間で連携研究者によって調製・供給されたおよそ 5,000 検体の微生物培養液サンプルを用いてスクリーニングを行った。糸状菌 FKJ-0069 株培養物より活性物質として citrinin を同定した。しかしながら、1 μ g/disc citrinin の条件でアルベカシン含有検定プレートに選択的に阻止円を形成したが、アルベカシンを不活性化する二機能酵素阻害アッセイの結果、アセチル化もリン酸化も阻害しなかった。他の阻害活性メカニズムにより、アルベカシン耐性克服活性が示されていると考えられる。また、土壌由来糸状菌 2 株 (FKI-8026, FKI-8147) の培養物ならびに海洋由来糸状菌 1 株 (FKJ-0154) の培養物にアルベカシン耐性克服活性が確認された。それら培養物の活性物質を精製・単離した結果、sclerotiorin, sclerotioramine, tanzawaic acid 類をそれぞれ同定した。最終年度は、糸状菌 FKJ-0040 株、FKJ-0035 株、FKJ-0169 株を培養し活性物質の単離、同定を試みた。*Penicillium* sp. FKJ-0040 株培養物からは、ABK 耐性克服活性物質として各種クロマトグラフィーにより 5 化合物を単離した。その一つを各種機器分析の結果から α -cyclopiazonic acid と同定した。本物質は筋小胞体 Ca^{2+} -ATP アーゼ可逆的阻害剤としての報告があるが、ABK 耐性克服活性の報告はない。他 4 化合物は構造解析中であるが、量上げが必要である。この 5 化合物はそれぞれ ABK 耐性克服活性を示し、3~100 倍の選択性を示した。*Penicillium* sp. FKJ-0035 株培養物からは、各種クロマトグラフィー、各種機

器分析により、ABK 耐性克服活性物質として 1 化合物を単離し、communesin B と同定した。Communesin B はアルカロイドの一種で殺虫活性の報告があるが、ABK 耐性克服活性の報告はない。*Penicillium* sp. FKJ-0169 株培養物より ABK 耐性克服活性物質として 4 化合物を単離した。うち 1 化合物を cytochalasin 類と推定した。分子量で該当する cytochalasin 類はないため新規の類縁体の可能性があるが、正確な構造解析のためには量上げが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 K. Shiomi, Y. Asami, T. Suga, M. Shiina, K. Nonaka, R. Masuma, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, H. Matsui, H. Hanaki, S. Iwamoto, H. Onodera, S. Omura
2. 発表標題 Search for circumventors of arbekacin resistance in MRSA from microbial metabolites
3. 学会等名 ASM Microbe 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江口修平, 椎名真夕, 本庄雅子, 岩月正人, 浅見行弘, 垣内 力, 松井秀仁, 須賀拓弥, 野中健一, 松本厚子, 花木秀明, 砂塚敏明, 大村智, 塩見和朗
2. 発表標題 微生物の産生するアルベカシン耐性を克服する活性物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	浅見 行弘 (Asami Yukihiro) (70391844)	北里大学・感染制御科学府・特任准教授 (32607)	
連携研究者	松本 厚子 (Matsumoto Atsuko) (20300759)	北里大学・感染制御科学府・准教授 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	野中 健一 (Nonaka Kenichi) (60421369)	北里大学・感染制御科学府・講師 (32607)	
連携研究者	花木 秀明 (Hanaki Hideaki) (60286747)	北里大学・北里生命科学研究所・センター長・部長 (32607)	