

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790106

研究課題名(和文)メタゲノムアプローチによる多剤耐性緑膿菌克服薬の探索：排出ポンプ欠損株の活用

研究課題名(英文) Metagenomic approach to identify agents to restore anti-pseudomonas drugs against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP): use of MDRP mutants lacking multidrug efflux pumps.

研究代表者

森田 雄二 (MORITA, Yuji)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：00454322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の典型的な多剤耐性緑膿菌である NCGM2. S1 から主要な多剤排出ポンプを欠損した遺伝子改変株は、アミノ配糖体修飾酵素を持つにも関わらずアミカシン等アミノ配糖体に感受性を示した。さらに標的遺伝子に典型的な変異を持つにもかかわらず、シプロフロキサシン等フルオロキノロンに感受性を示した。

抽出した土壌由来の微生物DNAを用いて構築したメタゲノムライブラリーを用いて、NCGM2. S1由来の排出ポンプ欠損株の抗菌薬耐性を阻害するクローンDNAを探索したが現時点で候補DNAは得られていない。一方漢方方剤常用生薬を用いた場合、多剤耐性緑膿菌の排出によるアミカシン耐性を阻害する化合物を発見した。

研究成果の概要(英文)：A mutant lacking major multidrug efflux pumps derived from highly multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM2. S1, a representative strain of a cluster endemic to Japan showed enhanced susceptibilities to amikacin and ciprofloxacin although the strain harbors an aminoglycoside 6'-N-acetyl transferase gene and the typical mutations within gyrA, gyrB, parC, and parE, which encode DNA gyrase or topoisomerase IV.

We constructed a library of bacterial genomic DNA extracted from soils and tried and failed to a clone DNA encodes a drug resistance inhibitor against the strain or its mutants lacking major multidrug efflux pumps. However we discovered a compound that inhibits efflux-mediated amikacin resistance against the strain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：多剤耐性緑膿菌 多剤排出ポンプ

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性緑膿菌 (MDRP) など多剤耐性グラム陰性桿菌に有効な抗菌薬はない場合が多く、治療は難渋し死亡例も報告されており、MDRP 感染症に対する新規治療薬の開発が急務である。緑膿菌は作用機構や構造の異なる複数の抗菌薬や消毒薬を菌体外へ排出するトランスポーター(多剤排出ポンプ)を持ち、外膜不透過性と協同して多くの抗菌性物質に自然耐性を示す性質を持つため、新規抗緑膿菌薬を開発するのは難しい。

一方で製薬会社は、新薬開発の重点をコストパフォーマンスの高い慢性疾患治療薬などへと移す傾向にある。

2. 研究の目的

MDRP から多剤排出ポンプ欠損株を構築し、その株の抗菌薬耐性に関する表現型を解析する。MDRP および多剤排出ポンプ遺伝子改変株を用いて有効な新規抗菌薬、耐性系阻害剤等を薬用資源から探索する。

本研究結果によって MDRP 感染症克服を目指した医薬品開発に向けた研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

2000 年代に我が国で分離された典型的な高度 MDRP である NCGM2.S1、1980 年代にアルゼンチンで分離された当時の MDRP(ただしその当時使用されていなかったカルバペネムには感受性)である PA7、2000 年代にカナダで分離された汎アミノ配糖体耐性緑膿菌である K2162、また陰性コントロールとして抗菌薬感受性である PAO1 等の緑膿菌を研究に使用した。

緑膿菌の抗菌薬耐性に関与する主要な多剤排出ポンプである MexXY(-OprA)、MexAB-OprM に関して一連の遺伝子破壊株を構築した。また必要に応じて他の多剤排出ポンプ遺伝子も破壊した。遺伝子破壊は levansucrase をコードする枯草菌の *sacB* 遺伝子を利用した相同組換え法を用いた。

名古屋市東山総合公園の植物園の土壌から土を採取し、eDNA (培養過程を経ずに得た微生物由来の DNA) を抽出した。pWEB™ コスミドクローニングキット(エピセンター社)を用いて抽出した eDNA のメタゲノムライブラリーを構築した。メタゲノムライブラリーのうち、MDRP 由来の多剤排出ポンプ欠損株の生育や抗菌薬耐性を阻害するものを選択した。その際の抗菌薬として、カルバペネム系であるイミペネム、フルオロキノロン系であるシプロフロキサシン、アミノ配糖体系であるアミカシンの何れかを用いた。またメタゲノムライブラリーの代わりに漢方方剤常用生薬を用いて MDRP の抗菌薬耐性を阻害するものを探索した。また候補生薬の含有化合物を用いた。

薬剤感受性は微量液体希釈法による最小生育阻止濃度(MIC)を測定することにより判

定した。

4. 研究成果

MDRP である NCGM2.S1 株から *mexXY* 遺伝子を欠損した遺伝子改変株は、アミカシン等抗緑膿菌用のアミノ配糖体に感受性化した(表1)。NCGM2.S1 だけでなく、PA7 や K2162 由来の *mexXY* 遺伝子欠損株もアミノ配糖体に感受性化した。NCGM2.S1 や PA7 は外来性のアミノ配糖体修飾酵素の獲得した株である(これは我が国の分離される多くの MDRP で観察される)。多剤排出ポンプ MexXY 系を阻害する化合物は、MDRP のアミカシン等アミノ配糖体耐性を克服できるかもしれない。一方、NCGM2.S1 株から *mexAB* 遺伝子を欠損した遺伝子改変株の各種薬剤感受性は、NCGM2.S1 株とほぼ同程度であった(表1)。PA7 由来の *mexAB* 遺伝子欠損株でも同様の結果が得られた。MexAB 系の抗菌薬耐性が欠損しても他の耐性因子により耐性が相補されるようである。さらに NCGM2.S1 株から *mexXY* と *mexAB* 両方が欠損した遺伝子改変株は、アミノ配糖体だけでなくシプロフロキサシン等ニューキノロン系薬にも感受性化した(表1)。また同様に PA7 株から *mexXY*, *mexAB*, *mexEF* の3つの排出系を欠損した遺伝子改変株もニューキノロン薬に感受性化した。NCGM2.S1 や PA7 は、フルオロキノロン系薬の一次作用点である DNA ジャイレースと DNA トポイソメラーゼ IV のキノロン耐性決定領域に典型的な変異を持つフルオロキノロン耐性高度耐性変異株である。複数の多剤排出ポンプを同時に阻害する化合物は、MDRP のフルオロキノロン耐性を克服できるかもしれない。主要な多剤排出ポンプをすべて欠損させた NCGM2.S1 や PA7 由来の遺伝子改変株も依然としてイミペネム等広域ラクタムの耐性を親株とほぼ同程度保持していた。多剤排出ポンプはラクタム耐性因子の1つであるが、排出ポンプ阻害剤だけでラクタム耐性を克服することは難しいようである。

表1 MDRP NCGM2.S1から構築した多剤排出ポンプ遺伝子欠損株の薬剤感受性

	MIC (µg/ml)				
	IPM	FEP	CIP	AMK	GEN
NCGM2.S1	128	>128	64	256	32
NCGM2.S1 ΔXY	128	>128	64	8	0.5
NCGM2.S1 ΔAB	128	>128	64	256	32
NCGM2.S1 ΔXYΔAB	128	>128	1	8	0.5
PAO1	0.5	4	0.25	2	2

IPM: imipenem, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacin, AMK: amikacin, GEN: gentamicin
赤字は感受性と判定されるMIC値

残念ながら現時点でメタゲノムライブラリーから多剤排出ポンプを欠損した NCGM2.S1 由来の遺伝子改変株の生育や抗菌薬耐性を阻害するクローンは得られていない。今回ライブラリー構築に用いた宿主大腸菌 DH5 株から得られた形質転換株をそのまま目的のクローンの選択に用いた。目的のク

ローンが存在しても大腸菌ではうまく機能発現しなかった可能性も考えられる。この点は、様々なシャトルベクターを用いて他の細菌（例えば枯草菌）でメタゲノムライブラリーを構築することにより改善できる。幸運なことにメタゲノムライブラリーの代わりに用いた漢方剤製生薬からアミカシン等アミノ配糖体耐性を阻害する生薬が得られた（イミペネムやシプロフロキサシンの耐性を阻害するものは得られなかった）（表2）。

表2 化合物Aは緑膿菌のMexXY排出系依存的によりアミカシン耐性を阻害する

化合物A (0.5 mg/ml)	MIC (μg/ml)			mexXY expression	
	AMK	CIP	IPM		
NCGM2.S1	-	256	128	128	+
	+	32	128	128	-
NCGM2.S1 ΔmexXY	-	8	64	64	-
	+	8	64	64	-
PA7	-	32	128	1	+++
	+	4	64	2	-
PA7 ΔmexXY	-	1	64	1	-
	+	2	64	2	-
K2162	-	256	0.5	1	+
	+	32	0.5	1	-
K2162 ΔmexXY	-	32	0.5	1	-
	+	32	0.5	1	-
PAO1	-	4	0.25	0.5	+
	+	1	0.25	1	-
PAO1 ΔmexXY	-	1	0.125	0.5	-
	+	0.5	0.125	0.5	-

AMK, amikacin, CIP, ciprofloxacin, IPM, imipenem

その生薬による同様の阻害活性がアミノ配糖体耐性菌である PA7 や K2162 に対しても観察された。薬剤感受性である PAO1 株に対しても弱冠の阻害活性が観察された。この生薬のある成分でも同様の活性が観察された。非常に興味深いことに、これらの活性は、mexXY 遺伝子欠損株では全く観察されなかった。これらの結果は、私が今回発見したシード化合物が MexXY 系を阻害するものであることを強く示唆する（図1）。

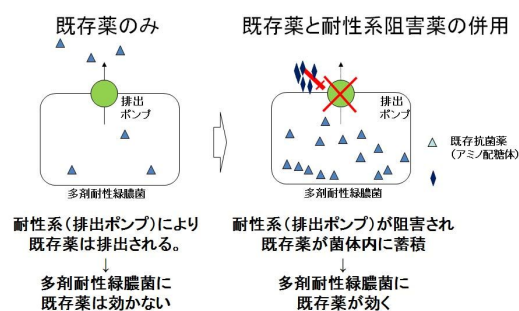


図1 化合物AがMDRPのアミカシン耐性を阻害する推定分子機構

さらにこの化合物は、アミノ配糖体だけでなく、マクロライドやリンコマイシンの耐性も阻害した。ただし、マクロライド・リンコマイシン耐性阻害機構は、MexXY 系だけでなく、他の排出系（例えば MexVW 系）を含む複数の排出系阻害によることによることが分かった。今回発見した化合物の阻害濃度は大変高く、臨床応用するにはさらなる検討が必要である。

本研究結果によって、MDRP 感染症克服を目指した医薬品開発に向けた研究基盤を確立できた。今後さらにこれを活用して MDRP 感染症克服薬の開発を進めたい。

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 2 件)

Yuji Morita, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura, Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials, *Frontiers in Microbiology*, 査読有、4 巻、2014、1-8

DOI: 10.3389/fmicb.2013.00422

Yuji Morita, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura, MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Frontiers in Microbiology*, 査読有、3 巻、2012、1-13

DOI: 10.3389/fmicb.2012.00408.

〔学会発表〕(計 12 件)

小嶋悠希, 森田雄二, 中島健一, 富田純子, 田邊宏樹, 井上 誠, 河村好章, 生薬由来成分による緑膿菌のマクロライド・リンコマイシン系薬耐性阻害とそのメカニズムについて、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本

森田雄二, 小嶋悠希, 中島健一, 富田純子, 田邊宏樹, 井上 誠, 河村好章, 多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性系阻害物質の探索とその解析、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本

森田雄二, 緑膿菌の排出ポンプによる抗菌薬耐性誘導、第 2 回サイエンスフォーラム（愛知学院大学薬学部 医療生命薬学研究所）、2014 年 3 月 17 日、名古屋

森田雄二, 多剤耐性グラム陰性菌感染症克服に向けた新規感染症治療薬の天然資源探索と分子標的候補多剤排出ポンプの評価解析、第 2 回サイエンスフォーラム（愛知学院大学薬学部 医療生命薬学研究所）、2014 年 3 月 17 日、名古屋

森田雄二, 多剤耐性緑膿菌に対してアミノ配糖体耐性阻害作用を示すシード化合物、中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会、2014 年 1 月 14 日、名古屋

森田雄二, 多剤耐性緑膿菌に対してアミノ配糖体耐性阻害作用を示すシード化合物、近畿中部地区医系大学知的財産管理ネットワーク 新技術説明会、2014 年 1 月 12 日、東京

森田雄二, 緑膿菌のアミノ配糖体耐性に関与する排出ポンプ、外来講師講演会（大阪大学産業科学研究所）、2013 年 11 月 29 日、茨木（大阪府）

森田雄二, 富田純子, 河村好章, 薬剤耐性緑膿菌 PA7 の推定酸化還元酵素遺伝子 mexS 変異による RND 型多剤排出オペロン mexEF-oprN の発現、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、横浜

森田雄二, 多剤耐性グラム陰性菌感染症克服に向けた新規感染症治療薬の天然資

源探索と分子標的候補多剤排出ポンプの評価解析、第1回サイエンスフォーラム（愛知学院大学薬学部 医療生命薬学研究所）2013年3月26日、名古屋
森田雄二、富田純子、河村好章、薬剤耐性緑膿菌 PA7 の多剤排出オペロン *mexEF-oprN* 過発現に關与する遺伝子変異部位の同定、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日、千葉
森田雄二、富田純子、河村好章、緑膿菌 PA7 の RND 型多剤排出ポンプに關する逆遺伝学的解析、第49回日本細菌学会中部支部総会、2012年11月10日、金沢
森田雄二、富田純子、河村好章、薬剤耐性緑膿菌 PA7 のキノロン耐性機構に關する分子遺伝学的解析、第58回日本薬学会東海支部総会・大会、2012年7月7日、静岡

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：抗菌薬耐性阻害剤

発明者：森田雄二、中島健一、富田純子、田邊宏樹、井上誠、河村好章

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-160441

出願年月日：2013年8月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

森田雄二 愛知学院大学 教員情報

<http://aris.agu.ac.jp/aiguhp/KgApp?kyoinId=ymdoyooggy&sessionId=2037825023>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 雄二 (MORITA, Yuji)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：00454322

(2) 研究協力者

河村 好章 (KAWAMURA, Yoshiaki)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80262757

井上 誠 (INOUE, Makoto)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50191888

田邊 宏樹 (TANABE, Hiroki)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：10415606

富田 純子 (TOMIDA, Junko)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：10454323

中島 健一 (NAKASHIMA, Kenichi)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70635135

小嶋 悠希 (KOJIMA, Yuki)
愛知学院大学薬学部 学部生

楠 亜佳音 (KUSU, Akane)
愛知学院大学薬学部 学部生