

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590533

研究課題名(和文) アシネトバクター属のキノロン薬耐性メカニズムの解明と新規創薬ターゲットの探索

研究課題名(英文) Mechanisms of quinolone resistance in Acinetobacter spp. and screening of a novel antibacterial drug target

研究代表者

山岸 純一 (YAMAGISHI, JUNICHI)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00589559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アシネトバクター バウマニを用いて、レボフロキサシン(LVFX)とナリジクス酸(NA)の感受性パターンの異なる自然突然変異株を分離した。多くの変異株は、NAよりもLVFXの方が感受性が低かったが、NAに超感受性を示す変異株も認められた。一段階変異株はDNA gyraseのgyrA遺伝子に点変異が認められたことより、アシネトバクターに対するLVFXの一次標的酵素はDNA gyraseであることが明らかとなった。変異株の解析から、DNA gyraseの変異や未知の排出ポンプの変化、更にその他のキノロン耐性に関与する未知のメカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanisms of quinolone resistance in Acinetobacter spp., spontaneous mutants with various patterns of resistance to levofloxacin(LVFX) and nalidixic acid(NA) were isolated from Acinetobacter baumannii ATCC19606 by stepwise selection with LVFX. Most mutants were less resistant to LVFX than to NA, and some mutants resistant to LVFX were hypersusceptible to NA. The first-step mutants had a point mutation only in gyrA. These results indicate that the primary target of LVFX are DNA gyrase, but not DNA topoisomerase. The characterization of the spontaneous mutants demonstrates that in addition to the previously reported alterations in GyrA and ParC, an unknown efflux pump and probably other unknown mechanisms contribute to quinolone resistance in A. baumannii.

研究分野：化学療法学

キーワード：薬剤耐性機構 キノロン薬 アシネトバクター 耐性変異 DNA gyrase DNA topoisomerase レボフロキサシン ナリジクス酸

1. 研究開始当初の背景

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) などによる院内感染、大腸菌 0157 などが起因菌となる新興感染症、更には結核などの再興感染症が社会問題となり、細菌感染症の重要性が再認識されている。また、臨床での抗菌薬の不適切な使用や畜産、水産分野における抗菌剤の大量使用により、耐性菌が増加すると共に複数の系統の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌が増加している。多剤耐性アシネトバクター属やニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ 1 (NDM-1) 産生多剤耐性菌などは、最近、注目されている多剤耐性菌である。耐性菌は医療機関だけでなく、家畜、ペット、食品、環境中からも分離され、グローバル化とも相俟って地球規模での広がりが進行している。抗菌剤に対する耐性菌の出現と蔓延は世界的な問題となっている。このような状況下、人が健康で快適な社会を維持するためには、耐性菌に対する更なる理解を深めると共に、耐性菌に有効かつ新たな耐性菌を出現させない薬の開発が社会より強く要望されている。

私は約 30 年前よりキノロン薬の耐性機構の研究を続けてきた。キノロン耐性を示す大腸菌や黄色ブドウ球菌の解析から、標的酵素 DNA gyrase (Gyrase と略) の変異部位を明らかにすると共に (Yamagishi et al. *Mol Gen Genet* 1986)、新たな標的酵素 DNA topoisomerase (Topo と略) を見出した (Yamagishi et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1996)。これによりキノロンの作用点が two targets であることが分かり、両酵素のうちキノロンにより感受性の高い酵素が菌のキノロン感受性 (MIC) を決定するという、キノロンの作用機構や耐性機構に新しい考え方を示した。キノロンの two targets に関する発見を契機として、世界中で活発にキノロン耐性機構に関する研究が標的酵素を中心として行われた。現在、キノロン耐性

機構として、標的酵素である Gyrase ならびに Topo の変異によるキノロンとの結合親和性の低下および排出ポンプの亢進による菌体内キノロン濃度の低下により起こること、更に細菌は、それら耐性要因の段階的重複により、キノロン薬に高度耐性化することが明らかになっている。

近年、多剤耐性菌の増加傾向に伴い、抗菌剤の作用機構や耐性機構の研究が世界中で盛んに行われており、キノロン薬についてもプラスミド性の耐性遺伝子などの新しい耐性機構が見つかった。しかし私共が大腸菌、黄色ブドウ球菌、腸球菌を用いて明らかにしたクロモゾーム性の耐性遺伝子変異 (Gyrase 変異や Topo 変異) は依然としてキノロン耐性機構における中核的な位置づけである。応用面として、Gyrase 阻害剤のスクリーニングが多くの製薬会社や研究機関で行われているが、今のところ、上市できた成功例はない。

このように、キノロン耐性機構の研究は多くの研究者によって進んでいるが、まだまだ未解明の問題が多く残されている。研究を進めていく上で、私共は今までに次のような研究成果を得ている。

黄色ブドウ球菌や腸球菌からも Gyrase 変異、Topo 変異、排出ポンプ亢進などの既知の耐性変異を有しない自然突然変異キノロン耐性菌を分離している (未発表)。

キノロン薬の作用機構は、菌種およびキノロン化合物に特異的なメカニズムが存在する。例えば、大腸菌の場合、全てのキノロンの一次標的酵素は Gyrase である。しかし、黄色ブドウ球菌の場合、スパルフロキサシンの一次標的酵素は Gyrase と Topo であり、ノルフロキサシンでは Topo である (Yamagishi et al.

Antimicrob Agents Chemother 1996)。

すなわち、キノロン耐性機構も菌種やキノロン化合物に特異的なメカニズムがあること

が予想される。したがって、キノロン耐性化の全体像を把握するためには種々の菌種についての詳細な検討が必要である。キノロン耐性機構を詳細に解析することにより、新たな耐性遺伝子から新しい抗菌剤標的分子の発見に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、キノロン薬を含む多剤耐性菌に有効な抗菌剤の標的分子を見つけることを目指し、キノロン薬の耐性化が著しいアシネトバクター属のキノロン薬耐性機構を詳細に解析する。未だ明らかにされていない耐性機構の問題点を解決し、その耐性要因について抗菌ターゲットの可能性を探る。本研究により得られた知見は、新規抗菌剤の開発に役立つだけでなく、多剤耐性菌の出現・蔓延の予防などの多剤耐性菌感染症を克服する新しい治療法の確立に寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

- (1)耐性菌の分離は、LVFXの2~8倍のMIC濃度を含む平板培地に、約 10^9 個の菌量を塗抹し、37℃で3日間培養することにより行った。
- (2)一段階目の耐性菌の分離は、感受性株である *A. baumannii* ATCC19606 株を親株として用いた。二段階および三段階目は、それぞれ一段階変異株(LR109, LR108)および二段階変異株(LR218, LR201)を親株として使用した。
- (3)耐性度は、寒天平板培地法により求めた。
- (4)キノロン耐性変異の解析は、標的酵素をコードする遺伝子(*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*)のキノロン耐性決定領域をPCR法により合成し、得られたDNA断片をPCR clean-up法で精製した後、塩基配列を決定することにより行った。
- (5)キノロン排出ポンプの機能は、キノロン感受性に及ぼすPA Nなどの排出ポンプ阻害剤の影響を調べることにより予測した。

4. 研究成果

アシネトバクターから実験室内で段階的に自然突然変異キノロン耐性菌を選択し、耐性パターンから2つのGroupに分類することができた。

Group 1 は、シプロフロキサシンやレボフロキサシンなどのニューキノロンに耐性を示すがナリジクス酸やオキシリン酸などのオールドキノロンに超感受性を示すユニークな耐性菌(LR109, LR218, LR303)である。このようなキノロン薬間で不完全な交叉耐性を示すキノロン耐性菌は未だ見出されていない。例えば、一段階耐性菌 LR109 は、排出ポンプの機能亢進は認められず、標的酵素 Gyrase のサブユニット A(GyrA と略)の 81 番目のグリシンからアスパラギン酸の変化が認められた。このことから、アシネトバクターに対する LVFX の一次標的酵素は Gyrase であることが明らかになった。しかし、この変化(Gly81Asp 変異)が不完全交叉耐性を引き起こすかどうかは不明である。このようなキノロン化合物間で交差耐性を示さないキノロン耐性菌は、未だ見出されていない。

表 1. Group 1 耐性菌のキノロン感受性と耐性変異

段階	Strains	MIC (µg/ml)		アミノ酸変異	
		LVFX	NA	GyrA	ParC
	ATCC19606	0,25	4	No	No
1	LR109	2	0,5	G81D	No
2	LR211	8	1	G81D	No
	LR218	32	0,5	G81D	E84K
3	LR303	64	2	G81D	E84K

Group 2 は、ニューキノロンとオールドキノロンの両方に耐性を示す耐性菌(LR108, LR201)である。これらの耐性菌は従来より知られている GyrA 変異は認められたが、Topo のサブユニット C(ParC と略)変異は認められなかった。排出ポンプ亢進の可能

性も少ないことから、未知のキノロン耐性遺伝子の関与が示唆された。

表 2. Group2 耐性菌のキノロン感受性と耐性変異

段階	Strains	MIC (µg/ml)		アミノ酸変異	
		LVFX	NA	GyrA	ParC
	ATCC19606	0,25	4	No	No
1	LR108	2	>128	S83L	No
2	LR201	8	>128	S83L	No
3	LR322	16	>128	S83L	No

アシネトバクター バウマニの自然突然変異耐性菌を用いた解析から、私共は、二つの興味ある事象を見出した。一つは、レボフロキサシンに耐性を示すがナリジク酸に超感受性を示すという不完全交差耐性である。二番目は従来の耐性機構とは異なる要因が関与している可能性である。これら二つの現象の実体はまだ明らかになっていない。

今後、これらの実体を分子レベルで解明することにより、キノロン耐性機構や作用機構の全体像が明らかになるとと思われる。更に、新しい抗菌標的分子の発見に繋がると考えられる。

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)

[学会発表](計 18 件)

山岸純一、住本千明、西野邦彦、賀来満夫、*Acinetobacter baumannii* のレボフロキサシン耐性獲得機構、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日(神戸市)。

鈴浦 杏、松島恭平、山岸純一、アシネトバクターのキノロン耐性菌出現頻度、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014 年 10 月 4 日(東京都)。

住本千明、酒寄夏希、山岸純一、アシネトバクターのキノロン耐性獲得機構、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014 年 10 月 4 日(東京都)。

中谷博晃、矢野寿一、山岸純一、臨床分離 *Acinetobacter* 属のキノロン耐性機構、第 62 回日本化学療法学会総会、2014 年 6 月 18 日(福岡市)。

住本千明、西野邦彦、山田作夫、賀来満夫、山岸純一、*Acinetobacter baumannii* のレボフロキサシン高度耐性獲得機構、第 62 回日本化学療法学会総会、2014 年 6 月 18 日(福岡市)。

照沼 修、西野邦彦、賀来満夫、山岸純一、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日(熊本市)。

酒寄夏希、西野邦彦、賀来満夫、山岸純一、*Acinetobacter baumannii* のキノロン耐性機構の解明、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日(東京都)。

照沼 修、林 雅樹、山岸純一、アシネトバクターのレボフロキサシン耐性機構 (2) キノロン標的酵素の遺伝子変異の解析、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013 年 10 月 26 日(東京都)。

酒寄夏希、今井 愛、山岸純一、アシネトバクターのレボフロキサシン耐性機構 (1) 高度耐性菌の分離とキノロン排出ポンプの解析、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013 年 10 月 26 日(東京都)。

今井 愛、井上京子、川井真好、山田作夫、矢野寿一、賀来満夫、山岸純一、*Acinetobacter soli* の薬剤感受性とキノロン耐性機構、第 61 回日本化学療法学会総会、2013 年 6 月 5 日(横浜市)。

林 雅樹、今井 愛、川井真好、山田作夫、矢野寿一、賀来満夫、山岸純一、*Acinetobacter baumannii* のキノロン耐性機構、第 61 回日本化学療法学会総会、2013 年 6 月 5 日(横浜市)。

林 雅樹、今井 愛、川井真好、山田作夫、矢野寿一、賀来満夫、山岸純一、*Acinetobacter baumannii* のキノロン耐性機構の解明、日本薬学会 133 年会、

2013年3月27日(横浜市).

今井 愛、井上京子、市塚智哉、矢野寿一、賀来満夫、山岸純一，臨床分離 *Acinetobacter soli* の薬剤感受性とキノロン耐性機構，日本薬学会 133 年会，2013年3月27日(横浜市).

市村公敏、川井真好、山田作夫、矢野寿一、賀来満夫、山岸純一，*Acinetobacter baumannii* のキノロン耐性機構の解明，q 第 86 回日本細菌学会総会，2013年3月18日(千葉市).

野口紀子、林 雅樹、栗原万里子、賀来満夫、山岸純一，臨床分離アシネトバクターの薬剤感受性ならびにキノロン耐性機構，第 56 回日本薬学会関東支部大会，2012年10月13日(東京都).

今井 愛、賀来奈々子、早川 優、賀来満夫、山岸純一，アシネトバクターのレボフロキサシン高度耐性獲得機構の解明，第 56 回日本薬学会関東支部大会，2012年10月13日(東京都).

栗原万里子、賀来奈々子、山田作夫、賀来満夫、山岸純一，臨床分離アシネトバクターの薬剤感受性ならびにキノロン耐性機構，第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会，2012年10月10日(東京都).

今井 愛、早川 優、賀来満夫、山岸純一，アシネトバクターのレボフロキサシン高度耐性獲得機構の解明，第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会，2012年10月10日(東京都).

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40224357

山田 作夫 (YAMADA SAKUO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00122458

川井 真好 (KAWAI MAKU)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：40533922

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 純一 (YAMAGISHI JUNICHI)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00589559

(2) 研究分担者

賀来 満夫 (KAKU MITSUO)