

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650135

研究課題名(和文)薬剤耐性遺伝子は太古から存在したか？

研究課題名(英文)Did drug resistant genes exist from ancient times?

研究代表者

馬場 理 (Baba, Tadashi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30317458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：キノロン耐性菌にしか奏功せず、キノロン感受性には無効な「復帰抗菌物質」の発見を機に、自然界がこのような物質を産生する理由を解き明かし、細菌の進化と人間との関わりについて考察するのを目的とした。環境中にはキノロン自然耐性菌(復帰抗生物質感受性菌)が広範に存在することを見いだしたのに加え、次世代シーケンサーを用いた同定をしたところ、ある菌の科には、キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌のどちらかが一方が偏在していること、ヒトに病原性を持つ菌は、キノロン感受性のグループに含まれることが多いことを見いだした。これは、進化過程で、キノロン感受性菌がたまたまヒトに病原性を持つよう進化したことを示している。

研究成果の概要(英文)：Our recent studies revealed that natural compounds nybomycin are only effective to quinolone-resistant bacteria with mutations in the quinolone-resistant determining regions of their type IIA DNA topoisomerases. We designated such compound as reverse-antibiotic (RA). We have been interested in why nature produces RAs, and hypothesized that there should be many quinolone-resistant, or RA-susceptible bacteria (the targets of RA) in environment. To prove this hypothesis, we screened quinolone-resistant and RA-resistant bacteria from environmental samples, and found that many quinolone resistant bacteria were present in environment. Moreover, we also found that bacterial taxonomic families are strictly categorized into (1) quinolone-resistant and (2) RA-resistant groups. We also found that bacterial families to which human pathogens belong tend to be categorized in (2). This suggests that human pathogens have evolved by chance as quinolone-susceptible, explaining utility of quinolone.

研究分野：微生物ゲノム・

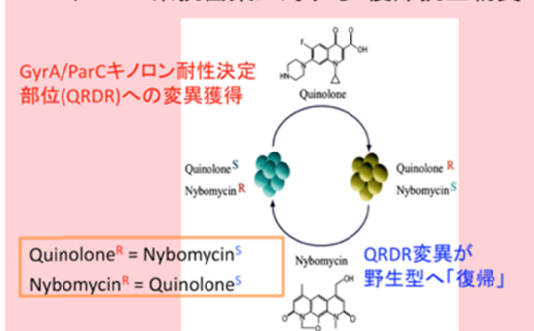
キーワード：復帰抗生物質 キノロン系抗菌薬 自然耐性

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の蔓延は全人類への脅威であり、WHOも警告を出すなか(1)、臨床現場で広範に使用されるキノロン系抗菌薬に対する耐性菌も増加している。キノロン耐性の主な機構として、細菌の DNA gyrase および DNA topoisomerase IV のキノロン耐性決定部位(QRDR)に変異を獲得するものが知られている。

申請者らは、キノロン耐性菌にしか奏功せず、キノロン感受性には無効な新たな抗菌物質ナイボマイシンを見いだした(2)。ナイボマイシン存在下でその耐性菌を選択すると、驚いたことにキノロン感受性菌に戻っており、さらに QRDR に、キノロン感受性の野生型と同じ配列を持つ、復帰変異が入ることが分かった。QRDR への変異獲得が関与している機構であれば、キノロン耐性菌 復帰抗生物質感受性菌であり、キノロン感受性菌 復帰抗生物質耐性菌なのである。そこで我々はナイボマイシンを「復帰抗生物質」と命名し、全く新しい概念に基づく抗菌薬として発表した。

1: キノロン系抗菌薬に対する“復帰抗生物質”



耐性菌のみを標的にした復帰抗生物質は、行き詰まった化学療法に突破口を与えると期待される。

2. 研究の目的

キノロン系薬剤耐性菌には奏功し、感受性菌には逆に耐性を示すという復帰抗生物質の発見は、耐性菌の蔓延により困難の度を極める化学療法に光明を与えたが、自然はなぜ復帰抗生物質を作るのか、という根本的な疑問が生じた。敵対する生物種の成育抑制という抗生物質の合目的性を考慮すると、環境中にキノロン感受性菌、すなわち復帰抗生物質耐性菌が多いのなら、自然は復帰抗生物質を産生する理由がなくなる。ならば、キノロンが合成抗菌薬であり、ほんらい自然界には存在しない事実と併せ、自然界には復帰抗生物質の感受性菌、すなわちキノロン耐性菌が普遍的に存在するのではないかと思い至った。仮にそうならば、“人為的な抗菌薬濫用が薬剤耐性菌の拡大をもたらした。”という従来の解釈を根底から覆し、億年単位の太古には、地上に耐性菌が溢れており、進化の過

程でほとんど生物界から駆逐されたものの、近年の化学療法導入が再びそれを覚醒させた可能性も否定できない。

そこで本研究では、主にキノロン耐性菌を標的とし、その自然界における普遍性を確かめること、および新規抗菌薬の発見を目指した。その過程で、数十億年にわたる細菌の歴史や、細菌と真核細胞との関わりに関する新たな知見を与え、従来認知されてきた“生命の歴史”そのものを書き換える発見につなげる可能性を模索した。

3. 研究の方法

さまざまな環境下から土壌や水を採取し、細菌を分離し、キノロンあるいは復帰抗生物質を含む、貧栄養から富栄養に至る複数種類の寒天培地上で選択し、キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌に区分し、まずキノロン耐性菌が環境中に広範に存在することを確認した。キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌それぞれに属する菌を、次世代シーケンサーを用いたクラスタ解析に供した。区分が適切である傍証を得るため、同定された菌の科に属するデータベース上に登録された全ての DNA gyrase および DNA topoisomerase IV の QRDR の配列を抽出し、キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌それぞれに特徴的な配列が、従来の知見に合致するかを併せて検証した。

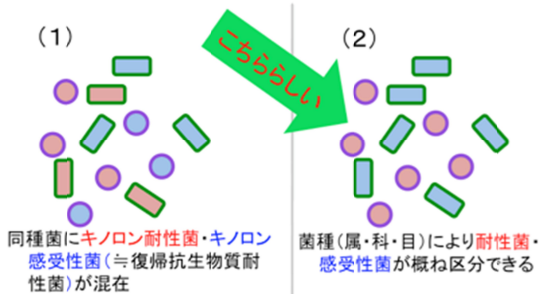
さらに、主要なヒト病原菌の成育を抑制する物質を産生する微生物が、解析に供した土壌に含まれるかどうかについても解析を進めた。

4. 研究成果

土壌および環境水を、北海道から九州に至る19箇所採取した。当初計画案では、「なるべくヒト経済活動範囲から遠いところ」を想定していたが、ヒトの影響があっても耐性菌は人体あるいは病院等の範囲に限定されて存在しており、環境中にはさほど放出されていないことも確認するため、採取地域の経済活動の度合いには濃淡を付けた。採取場所は、洞爺湖畔・倶多楽湖畔・大沼湖畔(以上北海道)・小川原湖畔・十三湖畔(以上青森県)・榛名山二ツ岳山頂(群馬県)・武蔵野雑木林・大島三原山山麓・神津島天井山山麓(以上東京都)・八景島海岸(神奈川県)・余呉湖畔・琵琶湖畔(以上滋賀県)・かずら橋付近(徳島県)・金鱗湖畔(大分県)・江津湖周辺遊水池(熊本県)・有明海干潟(佐賀県)・雲仙岳噴気地帯・大村湾岸(長崎県)・阿多カルデラ周辺(鹿児島県)を選択した。

まず、キノロン耐性菌がどの試料にも確実に含まれることを確認した。次に、キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌それぞれのクラスタ解析を行った。その結果、採取箇所によって分離される菌種には幅があるものの、

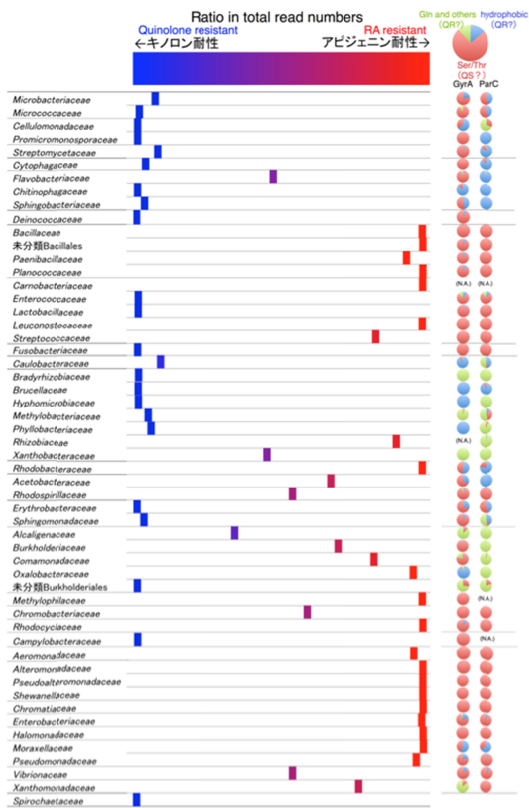
ある菌の分類学上の目（もく）にキノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌の両者が含まれるのではなく、1つの目はキノロン耐性菌のみ、あるいは復帰抗生物質耐性菌のみが含まれている例が多かった。



これは、ヒトが環境中にキノロンを拡散した結果キノロン耐性菌が広まったのではなく、むしろ進化の過程、しかも各細菌目が分化した非常に古い時期に、キノロン耐性、或いは復帰抗生物質耐性が決定されたことを強く示唆する。

なお、この研究と並行して進めた新規復帰抗生物質探索の結果、植物由来のアビジェニンがナイボマイシンと同様の活性を持つことを発見した(3)。

以下は、キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌を科（目の下流分類）別に分類した図で



ある。上述のように、各科は概ね、その中に含まれる菌種を問わず、キノロン耐性が、復帰抗生物質耐性かのどちらかに分類されることが分かった。詳細な解析の結果、復帰抗生物質耐性菌（キノロン感受性）の見られる細菌

目には、ヒト病原性を示す菌種が含まれるが、キノロン耐性を示すそれには、病原性を示すものが見いだせない傾向があることが分かった。この結果は、進化過程において、たまたまキノロン感受性を示す菌が、ヒトに病原性を持つように分化し、耐性菌蔓延以前には、临床上キノロンが奏功していたことを示唆している。

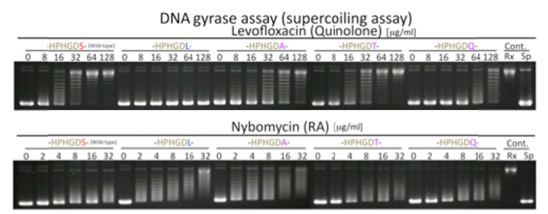
ここで、上述の実験結果が、同定された科に属する菌種の DNA gyrase および DNA topoisomerase IV の QRDR 配列に合致するが否かを網羅的に検証するため、データベースに登録された当該科に含まれる全菌種の QRDR 配列を調べた。QRDR のうち、特に保存された His-Pro-His-Gly-Glt に続くアミノ酸が Ser の場合はキノロン感受性（復帰抗生物質耐性）であり、それが Leu や Phe などの疎水性アミノ酸に変異した場合にキノロン耐性を獲得することが経験的に知られていた。

The QRDR aminoacid sequences:

it has been known that the sequences have serine residue (S) following highly conserved HPHGD motif confer Q^S (or RA^S) to bacteria, whereas hydrophobic residues leads to Q^R (or RA^R) in case of *E. coli* and *S. aureus*.

HPHGD**S** → Q^S [RA^R] HPHGD**L** → Q^R [RA^S]
 HPHGD**F** → Q^R [RA^S]

一方、採取試料による実験結果では、キノロン感受性となった菌が属する科には、His-Pro-His-Gly-Glt に続き、Ser の代わりに Thr の場合が多かった。また、クラスター解析の結果では、キノロン耐性・感受性の両者が混ざっていると判断された菌科（左頁中程の群）では、配列の相当位置に Gln がある例が目立った。これらのアミノ酸置換が、キノロン耐性度に与える影響を評価するため、黄色ブドウ球菌の DNA gyrase および DNA topoisomerase IV の変異タンパク質を作成・精製し、生化学的に活性を調べた。



その結果、Thr への置換は、明らかに Ser と同様の傾向を示し、キノロン感受性・復帰抗生物質耐性を与えた。一方 Gln は、中間的な性質を示した。このことは、クラスター解析の結果と変異タンパク質による生化学実験が、相互に矛盾しないことを示している。現在、DNA gyrase および DNA topoisomerase IV 阻害剤のデザインは、既知の酵素の立体構造を元を実施されているが、一定のルールで活性に影響する

Relative inhibition scores

DNA gyrase	DNA gyrase	
	Quinolone	RA
-HPHGDS-	*	*
-HPHGD-	*	*
-HPHGDA-	*	*
-HPHGD-	*	*
-HPHGDQ-	*	*

← inhibited ← inhibited

DNA topoisomerase IV	DNA topoisomerase IV	
	Quinolone	RA
-HPHGDS-	*	*
-HPHGD-	*	*
-HPHGDA-	*	*
-HPHGD-	*	*
-HPHGDQ-	*	*

← inhibited ← inhibited

ことなくアミノ酸を置換することが可能であることが判明したため、この情報を新規薬剤デザインに活かすことも可能だろう。

以上より、本研究結果および考察を総括する。

- ・ 環境中にはキノロン耐性菌、すなわち復帰抗生物質感受性菌が広範に存在しており、それらが存在することが、自然がナイボマイシンやアピジェニンなどの復帰抗生物質を産生する合目的性を示している。
- ・ ある菌の科には、キノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌の両方が含まれていることは希であり、どちらかが偏在している。これは、細菌進化の早い段階で、両者が分かれたことを示唆している。
- ・ クラスタ解析によるキノロン耐性菌・復帰抗生物質耐性菌の区分は、データベースに登録された菌種の配列情報に矛盾しない。これは、生化学実験によって支持される。
- ・ ヒトに病原性を持つ菌は、たまたまキノロン感受性として進化してきたことが示唆される。

現在、採取した土壌から、主要なヒト病原菌に対する生育阻害効果をもつ物質を産生する菌を分離し、放線菌属を含む複数の菌種を同定するとともに、産生物質の構造解析を進めている。土壌採取地点に火山地帯を含めたが、それは日本の国土が持つ特異性に起因する微生物種を世界に先駆けて分離したいという目標を持っているためである。今後も研究を進め、国産の生物資源開発を進めたい。

[引用文献等]

(1) Antimicrobial resistance. World Health Organization.

<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>

(2) Hiramatsu K, Igarashi M, Morimoto Y, Baba T, Umekita M, Akamatsu Y. Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature. (2012) *Int J Antimicrob Agents*. 39: 478-85

(3) Morimoto Y, Baba T, Sasaki, T and Hiramatsu K. Apigenin as an Anti-Quinolone-Resistance Antibiotic. (2015) *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46: 666-73.

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)

Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, Baba T. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. (2014) *J Infect Chemother*. 20:593-601

査読あり

Morimoto Y, Baba T, Sasaki, T and Hiramatsu K. Apigenin as an Anti-Quinolone-Resistance Antibiotic. (2015) *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46: 666-73.

査読あり

[学会発表](計 13 件)

T Baba, T Sasaki, Y Morimoto K Hiramatsu. On environmental quinolone-resistant bacteria. 第 89 回日本細菌学会総会(2016 年 3 月 大阪)

馬場 理・佐々木崇・森本ゆふ・杉山遙夏・平松啓一 環境中のキノロン自然耐性/感受性菌についての考察 第 31 回日本微生物生態学会総会 (2016 年 10 月 横須賀)

T Baba. Possible Agent for MDR Gonorrhoeae - Reverse Antibiotics for *N. Gonorrhoeae* 19th International Union against Sexually Transmitted Infections Asia -Pacific Conference. (Dec. 2016, Okayama, Japan)

[国際学会の招待講演]

馬場 理・杉山遙夏・佐々木崇・森本ゆふ・平松啓一 Did reverse antibiotics affect bacterial differentiation? 第 90 回日本細菌学会 (2017 年 3 月 仙台)

T Baba, Y Morimoto, and K Hiramatsu. On sequences of quinolone resistance-determining regions in Type IIA DNA topoisomerases from environmental bacteria. The 14th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2018 (March, 2018, Fukuoka, Japan)

[国際学会]

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 抗菌作用を有する新規化合物
発明者: 平松啓一・森本ゆふ・馬場理・早川勇夫
権利者: 学校法人順天堂
種類: 再公表公報
番号: JP2014061004

出願年月日：2014年4月18日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.infection-control.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 理 (BABA, Tadashi)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30317458