

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月13日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580129

研究課題名（和文）微生物の生産するアルベカシン耐性克服活性物質の探索

研究課題名（英文）Search for circumventors of arbekacin resistance in MRSA produced by microorganisms

研究代表者

塩見 和朗 (SHIOMI KAZURO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：40235502

研究成果の概要（和文）：

アルベカシンは代表的な薬剤耐性菌である MRSA の治療薬の 1 つである。そのアルベカシンに耐性な MRSA の出現は大きな問題である。この耐性菌はアルベカシンをリン酸化やアセチル化する二機能酵素という修飾酵素を持つため、耐性になっている。本研究では MRSA のアルベカシン耐性を克服するアラノロシンや新規物質ビバーラクトンを見だし、それらが二機能酵素を阻害することを明らかにした。これらの物質をアルベカシンと併用することで耐性 MRSA の生育を阻止できる。

研究成果の概要（英文）：

Arbekacin is used for MRSA, multi-drug resistant bacteria. However, arbekacin resistant MRSA emerged. It becomes resistant by possessing a bifunctional enzyme that modifies arbekacin by phosphorylation or acetylation. We found aranorosin and biverlactones as circumventors of arbekacin resistance in MRSA. Arbekacin with a combination of those compounds inhibits the growth of arbekacin resistant MRSA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学、生物有機化学

キーワード：薬剤耐性克服、MRSA、抗生物質、アルベカシン、天然物化学

1. 研究開始当初の背景

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、アミノグリコシド系のアルベカシン、オキサゾリジノン系のリネゾリドの 4 剤が認可されている。しかしグリコペプチド系薬剤はショックや腎毒性、オキサゾリジノン系では骨髄抑制による貧血や腎毒性の副作用がある。またこれらの治療薬に対する

耐性菌も報告されてきている。アミノグリコシド系抗生物質は、ストレプトマイシンをはじめとして 60 年以上も使用されてきた強い抗菌力と広い抗菌スペクトルを持つ優れた抗細菌薬である。アミノグリコシド系のカナマイシンに対する主な薬剤耐性は、耐性菌の生産するアセチル化、リン酸化などの修飾酵素によるためであり、その修飾酵素の作用を受ける部位の構造を改変した

アルベカシンは、薬剤耐性菌に有効な抗生物質として、MRSA に対して使用されている。しかし、近年ではこのアルベカシンに対しても耐性を示す MRSA が出現しており、アルベカシンの使用範囲が限定されるようになってきた。

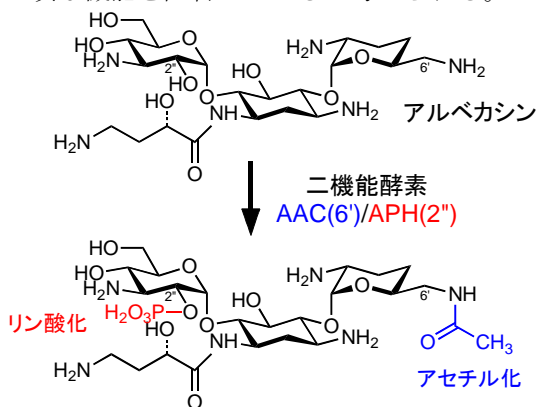
2. 研究の目的

アルベカシン耐性 MRSA の主な耐性化機構は、アルベカシンの 6'位をアセチル化するとともに 2'位をリン酸化する二機能酵素 AAC(6')/APH(2'')である。したがってアルベカシンは、この二機能酵素を阻害する物質と併用することでアルベカシン耐性 MRSA に効果を示す、すなわちアルベカシン耐性を克服できると考えた。

これまでアミノグリコシド修飾酵素の阻害物質はわずか数例しか報告されておらず (*Antimicrob. Agents Chemother.* (1982) **22**, 824-831; *Angew. Chem. Int. Ed.* (2005) **44**, 6859-6862 など)、アルベカシン耐性 MRSA の修飾酵素阻害物質に至っては全く報告がない。したがって、アルベカシン耐性 MRSA の耐性を克服する物質は MRSA 治療薬の新しい方向性の一つであると考え、そのような耐性克服活性物質の探索を目的とした。

3. 研究の方法

アルベカシン耐性 MRSA に関して、これまで二機能酵素 AAC(6')/APH(2'')のアセチル化とリン酸化のどちらが重要かはわかっていなかった。そこでアルベカシン耐性克服活性物質のスクリーニングにおいては、酵素阻害活性を示す物質を探索するのではなく、より簡便な方法を用いた。すなわち臨床分離アルベカシン耐性 MRSA の TH-1466 株を検定菌に用いて、アルベカシンと共存しているときに生育阻止円が大きくなる物質のアッセイ系を構築した。そのような作用を示すものはアルベカシン耐性克服活性物質であることから、二機能酵素 AAC(6')/APH(2'')のうちアルベカシン耐性に必須な機能を阻害していると考えられる。

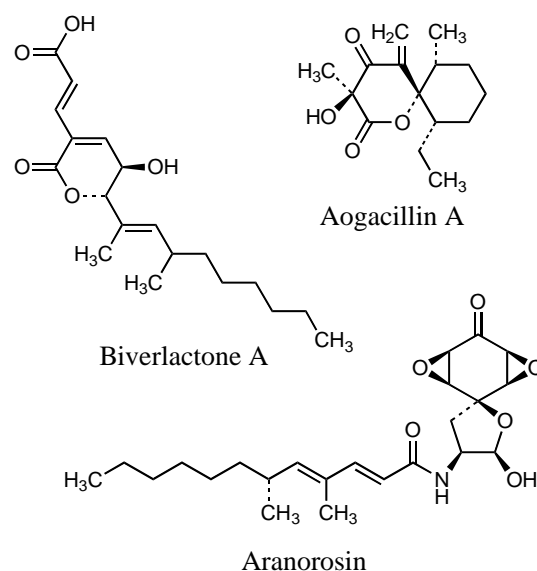


このアッセイ系を用いて、生物活性物質の宝庫である微生物培養液からのスクリーニングを開始した。由来となる微生物の分離についても、土壌、植物、海洋などさまざまな環境より珍しい微生物を分離することで、多様性をもたせるように配慮した。

4. 研究成果

2 万以上の微生物培養液よりアルベカシン耐性克服活性物質をスクリーニングした。その結果既知物質ではあるが、ペニシリウム属糸状菌の FKI-4572 株よりペニシリン酸、FKI-4685 株よりゲオジン、FKI-6226 株よりグリセオフェノン C、ペニシリウム・シトリナム FKI-4815 株よりシトリニン、フザリウム属糸状菌 FKI-6189 株よりトリコセチン、未同定糸状菌 FKI-4853 株よりメチレノラクトシンを単離し、同定した。いずれもアルベカシンの抗 MRSA 活性を 2~10 倍増強した。これらの化合物がアルベカシン耐性克服作用を示すことは、初めての知見である。

さらにペニシリウム属糸状菌 FKI-4429 株の培養液中よりビバールクトン A-D と名づけた 4 種の新規物質を単離し、いずれも 2-(2,3-ジヒドロキシ-4,6-ジメチルドデシル)グルタル酸がさまざまな形に環化した構造であることを決定した。そのうち最も活性の強いビバールクトン A は、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (この濃度では MRSA に対する抗菌活性を示さない) をアルベカシンと併用することで、アルベカシン耐性 MRSA に対するアルベカシンの MIC を 32 倍増強する優れたアルベカシン耐性克服活性を示した。



またシンプリシリウム属糸状菌 FKI-5985 株よりアオガシリン A & B と名づけた新規物質を単離することができた。アオガシリンは NMR など各種機器分析を行った結果、

エキソメチレンの結合したスピロ- δ -ラクトン-5-シクロヘキサン骨格を有するユニークな構造であることが決定できた。またアオガシリン A & B はいずれも抗 MRSA 活性を示さない 0.5 $\mu\text{g/ml}$ をアルベカシンと併用することで、アルベカシン耐性 MRSA に対するアルベカシンの MIC を 32 倍増強した。

ジムナセラ属糸状菌 FKI-6588 株の生産する活性物質は抗菌活性の報告されている既知物質アラノロシンと同定された。アラノロシンは抗 MRSA 活性を示さない 0.5 $\mu\text{g/ml}$ をアルベカシンと併用することで、アルベカシン耐性 MRSA に対するアルベカシンの MIC を 64 倍増強した。

このようなアルベカシン耐性克服活性が、二機能酵素 AAC(6')/APH(2'') の阻害に起因するかどうかを確認するため、大腸菌に AAC(6')/APH(2'') をクローニングして発現させ、それを用いてビバーラクトン A およびアラノロシンの二機能酵素阻害活性を調べた。その結果、ビバーラクトン A はリン酸化活性を 30 $\mu\text{g/ml}$ で約 50% 阻害し、アラノロシンもリン酸化活性を 3 $\mu\text{g/ml}$ で約 50% 阻害した。しかし両物質ともアセチル化活性は全く阻害しなかった。したがってアルベカシン耐性 MRSA において、二機能酵素による 2'' 位のリン酸化がアルベカシン耐性に重要であり、ビバーラクトン A やアラノロシンはそれを阻害することでアルベカシン耐性克服活性を示すことが解明できた。

今後はこれらの化合物あるいはそれらをリードとしたより高活性の化合物について、動物実験なども含めて併用効果を調べていきたい。

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 28 件)

① T. Suga, T. Ishii, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, K. Nonaka, R. Masuma, H. Matsui, H. Hanaki, S. Ōmura, K. Shiomi, Aranorosin circumvents arbekacin-resistance in MRSA by inhibiting the bifunctional enzyme AAC(6')/APH(2''), J. Antibiot., 査読有、掲載決定済 (doi: 10.1038/ja.2012.53)

② M. Iwatsuki, T. Ishimori, T. Yamamoto, K. Takata, M. Mori, K. Nonaka, R. Masuma, Y. Hayakawa, H. Hanaki, K. Shiomi, S. Ōmura, Biverlactones A-D, new circumventors of arbekacin resistance in MRSA, produced by *Penicillium* sp. FKI-4429, Tetrahedron, 査読有、Vol. 67, No. 35, 2011, 6644-6648

③ K. Kimura, M. Iwatsuki, T. Nagai, A.

Matsumoto, Y. Takahashi, K. Shiomi, S. Ōmura, A. Abe, A small-molecule inhibitor of the bacterial type III secretion system protects against *in vivo* infection with *Citrobacter rodentium*, J. Antibiot., 査読有、Vol. 64, No. 2, 2011, 197-203

④ S. Ikeda, H. Hanaki, C. Yanagisawa, Y. Ikeda-Dantsuji, H. Matsui, M. Iwatsuki, K. Shiomi, T. Nakae, K. Sunakawa, S. Ōmura, Identification of the active component that induces vancomycin resistance in MRSA, J. Antibiot., 査読有、Vol. 63, No. 9, 2010, 533-538

⑤ E. Takashima, H. Yamada, A. Yajima, K. Shiomi, S. Ōmura, K. Kiyoshi, A quinol peroxidase inhibitor prevents secretion of a leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, J. Periodont. Res., 査読有、Vol. 45, No. 1, 2010, 123~128

〔学会発表〕(計 53 件)

① 須賀拓弥, 石井貴広, 岩月正人, 山本 剛, 野中健一, 松本厚子, 増間碌郎, 高橋洋子, 花木秀明, 大村 智, 塩見和朗, 微生物代謝産物からの MRSA に対するアルベカシン耐性克服物質の探索、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都 (トピックス賞受賞)

② 塩見和朗, 新しいターゲットをもつ抗生物質の探索、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 31 日、静岡 (招待講演)

③ 高田恵子, 岩月正人, 山本 剛, 石森敏也, 野中健一, 増間碌郎, 松井秀仁, 花木秀明, 早川洋一, 大村 智, 塩見和朗, アルベカシン耐性 MRSA の耐性克服物質の探索、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 31 日、静岡

④ K. Shiomi, R. Masuma, S. Ōmura, Bioactive metabolites from tropical microorganisms, 2010 Chinese Academy of Engineering Forum in Frontiers of Medical Sciences, 2010 年 12 月 4 日、中国・広州 (招待講演)

⑤ 石森敏也, 岩月正人, 山本 剛, 高田恵子, 野中健一, 増間碌郎, 松井秀仁, 花木秀明, 早川洋一, 塩見和朗, 大村 智, アルベカシン耐性 MRSA の耐性克服物質の探索、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京

〔図書〕(計 2 件)

① 塩見和朗, 南江堂、化学療法学-病原微生物・がんと戦う-(上野芳夫, 大村 智監修)、2009、pp. 92-97 & 273-286 (総ページ 315)

② R. Masuma, K. Shiomi, S. Ōmura,

Springer-Verlag、The Mycota Vol. XV. Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects (T. Anke & D. Weber 編)、2009、pp. 247-271 (総ページ 410)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：新規 FKI-4429 物質およびその製造方法

発明者：大村 智, 岩月正人, 増間碌郎, 野中健一, 山本 剛, 花木秀明, 塩見和朗

権利者：(学)北里研究所

種類：特許

番号：特願 2010-52838

出願年月日：2010 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

名称：Novel FKI-4429 substance and method for producing same

発明者：S. Ōmura, M. Iwatsuki, R. Masuma, K. Nonaka, T. Yamamoto, H. Hanaki, K. Shiomi

権利者：The Kitasato Institute

種類：特許

番号：WO2011/111738

出願年月日：2011 年 3 月 9 日

国内外の別：外国 (PCT)

[その他]

科学新聞 (2012 年 3 月 23 日)

「アルベカシン耐性 MRSA の耐性克服物質
微生物代謝産物から発見」

日経産業新聞 (2012 年 4 月 6 日)

「院内感染の原因 MRSA 抗生物質に再び
薬効 北里大、カビの一種が一役」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 和朗 (SHIOMI KAZURO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：40235502

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 洋子 (TAKAHASHI YOKO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：80197186

増間 碌郎 (MASUMA ROKURO)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教授

研究者番号：90219353

花木 秀明 (HANAKI HIDEAKI)

北里大学・北里生命科学研究所・室長

研究者番号：60286747

岩月 正人 (IWATSUKI MASATO)

北里大学・北里生命科学研究所・上級研究員

研究者番号：70353464