

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460080

研究課題名(和文)多剤耐性緑膿菌のアミノ配糖体耐性阻害剤の作用機序に関する分子基盤研究

研究課題名(英文)Molecular basis research on the mechanism of action of aminoglycoside resistance inhibitors of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性緑膿菌のアミノ配糖体耐性をRND型多剤排出系MexXY依存的に阻害するベルベリンの作用機構を解析し、さらにベルベリンの作用を増強するベルベリン誘導体を構築した。ベルベリンは、1) MexXY系の基質であること、2) MexXY系依存的にアミノ配糖体と相乗的に作用すること、3) アミノ配糖体とベルベリンのMexYに対する推定結合部位は近接していることが示唆された。ベルベリン誘導体XとYが、ベルベリンと比較して4から16倍低濃度で多剤耐性緑膿菌のアミカシン耐性を阻害した。化合物XのMexXY系阻害活性はベルベリンと同程度であり、化合物YのMexXY系阻害活性はベルベリンの約16倍であった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of action of berberine, which inhibits aminoglycoside resistance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a manner dependent on RND-type multidrug efflux system MexXY, and further berberine derivative which enhances the action of berberine was constructed. We suggested that 1) berberine seems a substrate of the MexXY pump, 2) berberine acts synergistically with aminoglycoside depending on the MexXY system, 3) the putative binding site of berberine to MexY is close to aminoglycoside. Berberine derivatives (X and Y) inhibited amikacin resistance of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations as low as 4 to 16 times lower than berberine. The MexXY inhibitory activity of compound X was about the same as that of berberine, and the MexXY system inhibitory activity of compound Y was about 16 times that of berberine.

研究分野：微生物薬品科学

キーワード：多剤耐性緑膿菌 多剤排出系阻害 ベルベリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 多剤耐性緑膿菌感染症は、有効な抗菌薬がほとんどないため、治療は非常に難渋し死亡例も報告されており、新規治療薬の開発が社会的に急務である。しかしながら緑膿菌は本態的に抗菌性物質に耐性を示す。その主因の一つに多剤排出ポンプによる抗菌薬の能動的排出が挙げられる。

(2) 研究代表者は、生薬であるオウレンやオウバクおよびそれらの主成分であるベルベリンが多剤耐性緑膿菌のアミノ配糖体耐性を、MexXY 多剤排出ポンプ依存的に軽減することを見出した。しかしながら耐性阻害に必要な濃度は非常に高く、臨床応用できるとは考えられない。

2. 研究の目的

ベルベリンをリード化合物として MexXY 阻害剤を開発するための基盤研究を行う。

(1) MexXY は、親水性が極めて高い抗菌薬であるアミノ配糖体を基質とする点で、ユニークな resistance nodulation cell division (RND) 型多剤排出ポンプである。しかしながら、MexXY によるアミノ配糖体排出機構は、タンパク質の分子構造レベルではほとんど分かっていない。アミノ配糖体耐性に関与する MexXY のアミノ酸残基を同定し、MexXY のアミノ配糖体基質認識機構を分子レベルで理解する。

(2) ベルベリンは、植物由来のイソキノリンアルカロイドであり、抗菌活性を含むさまざまな生物学的活性を有する。MexXY 阻害活性の増強したベルベリン誘導体を合成する。またはベルベリンの MexXY 阻害活性に関する構造・機能相関を調べ、MexXY 阻害剤開発の基盤とする。

3. 研究の方法

(1) ベルベリンとアミノ配糖体の併用作用を最少発育阻止濃度 (MIC) から算出 fractional inhibitory concentration (FIC) やベルベリンの菌体内蓄積量の測定により評価した。

突然変異処理またはシミュレーションに基づく部位特異的変異導入により構築した MexXY 変異体を産生する緑膿菌変異株のうち、アミノ配糖体耐性を消失したものの、アミノ配糖体耐性は保持するが、ベルベリンによるアミノ配糖体耐性阻害作用の消失したものを寒天培地上で選択した。

(2) ベルベリンの構造を基軸に類縁体を活用しながら有効母核構造ならびに官能基の探索を行った。さらに、構造活性相関から得られる情報を基に有効母核構造・官能基を活用しながら、新しい化合物ライブラリーをデザイン・合成した。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌 PAO1 株から *mexXY* 遺伝子のリプレッサー遺伝子 *mexZ* と *mexXY* 以外の 4 つの RND 型多剤排出系遺伝子 (*mexAB*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexVIII*) を破壊した株 PAGU<sup>#</sup>1929 と PAGU<sup>#</sup>1929 株から *mexXY* 遺伝子を破壊した株 PAGU<sup>#</sup>1933 を構築した。さらに両株にアミノ配糖体アセチル化酵素遺伝子 (*aacC1*) 遺伝子を導入した株 PAGU<sup>#</sup>1927 及び PAGU<sup>#</sup>1931 を構築した。以上 4 つの緑膿菌遺伝子改変株を用いて、ベルベリンとゲンタマイシンの FIC を測定したところ、*mexXY* 遺伝子を持つ株のみ 0.5 以下の FIC 値を示すことから、ベルベリンは MexXY 依存的なゲンタマイシン耐性を相乗的に阻害することが分かった (Table 1)。

Table 1 Berberine synergistically inhibits MexXY-mediated gentamicin resistance.

	<i>mexXY</i>	<i>aacC1</i>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				FIC
			Gen	Ber added	Ber	Gen added	
PAGU <sup>#</sup> 1927	+	+	1024	256	>512	128	<0.5
PAGU <sup>#</sup> 1931	-	+	8	16	>512	>512	>2.0
PAGU <sup>#</sup> 1929	+	-	8	2	>512	128	<0.5
PAGU <sup>#</sup> 1933	-	-	0.025	0.25	>512	>512	>1.0

Gen: gentamicin, Ber: berberine

主要な RND 型多剤排出系遺伝子 *acrB* を欠損した大腸菌変異株に *mexXY* 遺伝子を導入した遺伝子改変株を用いて、ベルベリンの大腸菌細胞内蓄積量を測定したところ、MexXY のベルベリン排出活性は、ゲンタマイシンにより濃度依存的に阻害された。大腸菌の主要な多剤排出ポンプ AcrB の結晶構造を参考に、MexY の分子モデルを構築した。分子モデルからもベルベリンとアミノ配糖体の相互作用が確認された。以上の結果から、ベルベリンは、MexXY のアミノ配糖体排出を競合的に阻害すると考えている。現在部位特異的変異導入法により MexY 変異体を構築し、分子構造

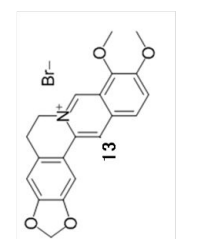
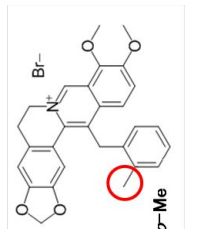
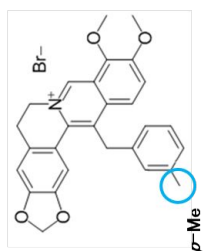
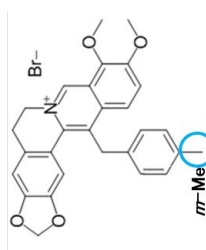
モデルの妥当性を検証している。

(2) ベンジル塩酸塩を水素化ホウ素ナトリウムで還元したのち、ヨウ化カリウム存在下、種々のベンジルプロミド誘導体を作用させ、13位に各種のベンジル側鎖の導入を検討したところ、新規化合物6種を含めて計12種類の誘導体を系統的に合成することができた。得られた化合物のうち、5種類はベルベリンより強い MexXY 阻害活性を示した。特にベンジル基の側鎖として *o*-methyl 基を置換基として導入したものは、多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 のアミカシン耐性を4倍低濃度でベルベリンと同程度阻害し、ベルベリンより約16倍強い MexXY 阻害活性を示した (Table 2)。これは、*p*-methyl 基や *m*-methyl 基を置換基とした場合には観察されなかったことから、MexXY 阻害活性増強の原因は単純な疎水性の増大ではないと考えられた。*o*-phenyl 基を置換基とした誘導体が最も低濃度 (ベルベリンの16倍) で多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 のアミカシン耐性を阻害したが、MexXY 阻害活性はベルベリンと同程度であった。*o*-phenyl 基を置換基とした誘導体は、MexXY 以外の活性を阻害することで、緑膿菌のアミカシン耐性をベルベリンより強く阻害したと考えられる。

Table 2 13-*o*MMBer is a better inhibitor of the MexXY system

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of Ger in the presence of			
	<i>mexXY</i>	Ber	13- <i>o</i> MMBer	13- <i>m</i> MMBer
PAGU <sup>®</sup> 1927	+	512	32	>1024
PAGU <sup>®</sup> 1931	-	>1024	8	8
GM: gentamicin				

Concentration of each concomitant agent was 128  $\mu\text{g/ml}$ .



興味深いことに、*o*-methyl 基や *o*-phenyl 基を置換基として導入したものは、メチシリン黄色ブドウ球菌 (MRSA) や主要な多剤排出ポンプを欠損した緑膿菌変異株に強い抗菌活性を示した。今後、さらにベルベリン誘導体の MexXY 阻害作用を分子レベルで解明したい。

#### 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 1件)

Yuji Morita, Ken-ichi Nakashima, Kunihiko Nishino, Kenta Kotani, Junko Tomida, Makoto Inoue, Yoshiaki Kawamura. Berberine Is a Novel Type Efflux Inhibitor Which Attenuates the MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 査読有 Volume 1223, Article 7, 2016, 1-10 DOI: 10.3389/fmicb.2016.01223

[学会発表](計 10件)

森田 雄二、富田 純子、河村 好章。ベルベリンは緑膿菌の排出によるアミノ配糖体耐性を軽減する。第90回日本細菌学会総会。2017年3月19~21日。仙台国際センター(宮城県仙台市)。

小谷 謙太、森田 雄二、松村 実生、富田 純子、安池 修之、河村 好章。ベルベリン誘導体の緑膿菌 MexXY 多剤排出系阻害活性と抗 MRSA 活性。第28回微生物シンポジウム。2016年9月2~3日。愛知学院大学薬学部(愛知県名古屋市)。

小谷 謙太、森田 雄二、松村 実生、富田 純子、安池 修之、河村 好章。ベルベリン誘導体による *Pseudomonas aeruginosa* 多剤排出系 MexXY の阻害活性。第62回日本薬学会東海支部大会。2016年5月7月9日。愛知学院大学薬学部(愛知県名古屋市)。

森田 雄二、深谷 詩織、小谷 謙太、富田 純子、河村 好章。ベルベリンとアミノ配糖体の緑膿菌に対する多剤排出系 MexXY 依存的な相乗作用。日本薬学会 第136年会。2016年3月26~29日。パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

森田 雄二、富田 純子、河村 好章。緑膿菌の多剤排出系 MexXY に関する研究。第52回日本細菌学会中部支部総会。2015年10月23~24日。

名古屋市立大学医学部（愛知県名古屋市）。

森田 雄二、深谷 詩織、小谷 謙太、  
富田 純子、河村 好章。  
ペルベリンは緑膿菌の MexXY 多剤排出系依存的なアミノ配糖体耐性を相乗的に阻害する。  
第 27 回微生物シンポジウム。  
2015 年 9 月 4～5 日。  
就実大学薬学部（岡山県岡山市）。

森田 雄二、中島 健一、富田 純子、田邊 宏樹、井上 誠、河村 好章。  
多剤耐性緑膿菌に対する生薬由来抗菌薬耐性軽減薬の探索。  
日本薬学会 第 135 年会。  
2015 年 3 月 25～28 日。  
神戸学院大学等（兵庫県神戸市）

森田 雄二、中島 健一、富田 純子、田邊 宏樹、井上 誠、河村 好章。  
多剤耐性緑膿菌の排出系阻害作用を有する天然物。  
第 49 回緑膿菌感染症研究会。  
2015 年 2 月 6～7 日  
昭和大学医学部（東京都品川区）。

森田 雄二、富田 純子、河村 好章。  
排出ポンプ阻害による多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性軽減。  
第 26 回微生物シンポジウム。  
2014 年 9 月 19～20 日。  
都市センターホテル（東京都千代田区）。

森田 雄二、楠 亜佳音、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 RND 型多剤排出トランスポーター MexXY 阻害剤の探索。  
第 9 回トランスポーター研究会。  
2014 年 6 月 14～15 日。  
名古屋市立大学薬学部（愛知県名古屋市）。

〔その他〕

ホームページ等

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

## 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) 連携研究者

西野 邦彦 (NISHINO, Kunihiko)  
大阪大学・産業科学研究所・教授  
研究者番号：30432438

安池 修之 (YASUIKE, Shuji)

愛知学院大学・薬学部・教授  
研究者番号：10230210

松村 実生 (MATSUMURA, Mio)  
愛知学院大学・薬学部・助教  
研究者番号：20712037

川崎 達也 (KAWASAKI, Tatsuya)  
愛知学院大学・薬学部・助教  
研究者番号：70722073

### (3) 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

富田 純子 (TOMIDA, Junko)  
愛知学院大学・薬学部・講師  
研究者番号：10454323

小嶋 悠希 (KOJIMA, Yuki)

楠 亜佳音 (KUSU, Akane)

小谷 謙太 (KOTANI, Kenta)

深谷 詩織 (FUKAYA, Shiori)