

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05672

研究課題名(和文)多剤耐性菌制御のための原子情報プラットフォームの構築

研究課題名(英文)Development of atomic structural platform for controlling multi-drug resistant bacteria

研究代表者

和知野 純一 (Wachino, Jun-ichi)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00535651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性菌の出現が医療の現場で大きな脅威となっている。多剤耐性菌による問題を克服するため、新たな抗菌薬の開発や治療法の確立が求められている。本研究では、細菌が産生する薬剤耐性蛋白を標的とした阻害剤を開発することを目的とした。薬剤耐性タンパクの機能を阻害することができれば、本来、それらの存在によって無効化してしまうはずだった抗菌薬の効果を十分に担保できるものと期待される。本研究では、カルバペネム耐性に関与するメタロベータラクタマーゼ、アミノグリコシド耐性に関与する16S rRNAメチルトランスフェラーゼを標的とした。各種化合物について検討し、これらの薬剤耐性蛋白の阻害剤を発見することができた。

研究成果の概要(英文)：Emergence of multidrug-resistant bacteria is becoming a major clinical threat. To overcome the problem of multidrug-resistant bacteria, it needs to develop new antibacterial agents and treatment. In this study, we aimed to develop new agents targeting for antibiotic resistance proteins produced in bacteria. Inhibition of antibiotic resistance mechanism by chemical compounds is expected to revive the efficacy of already-existing antibiotics. We targeted metallo-beta-lactamases and 16S rRNA methyltransferases, which are involved in carbapenem and aminoglycoside resistance, respectively. we screened for chemical compounds using in silico and in vitro techniques and identified several inhibitor candidates of metallo-beta-lactamases and 16S rRNA methyltransferases.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性菌 メタロベータラクタマーゼ 16S rRNA メチルトランスフェラーゼ 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

病原細菌の薬剤耐性化が深刻な事態となっている。このように薬剤耐性化した細菌が感染症を引き起こした際には、その治療に難渋する。したがって、薬剤耐性菌感染症に著効する新たな抗菌薬の開発や治療法の確立が強く望まれている。地球規模で拡散・蔓延する薬剤耐性菌に対し、世界中でその対策が急がれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、薬剤耐性菌感染症の治療に資する新たな化合物を探索・創製することを目的としている。薬剤耐性菌感染症による問題を克服するためには、薬剤耐性菌に著効する新たな抗菌薬を開発することが1つの手段としてある。しかし、新しい抗菌薬の登場により、新しい耐性菌が生まれるというデメリットもあり、抗菌薬そのものの開発は昨今敬遠される傾向にある。

そこで本研究では、病原細菌が薬剤耐性を獲得したことにより一度は効力が失われた既存の抗菌薬を、再度利用できるようにするための物質や手段を資することを目的とした。細菌が持つ薬剤耐性機構を低分子化合物に阻害・抑制することができれば、既存の抗菌薬も薬剤耐性機構に妨害されず、従来通りの静菌・殺菌性を担保することができるものと考えられる。このように薬剤耐性菌に対し、従来の抗菌薬の効果を取り戻すための薬剤耐性阻害剤を開発することが本研究の最終目的である。

研究代表者はこれまでに病原細菌の薬剤耐性タンパクについて研究を行ってきた。本研究ではカルバペネム系薬剤耐性機構であるメタロ-β-ラクタマーゼ、アミノグリコシド耐性機構である16S rRNAメチルトランスフェラーゼを標的に、それらの阻害剤を開発することとした。それぞれの阻害剤を開発することができれば、メタロ-β-ラクタマーゼによるカルバペネム耐性、16S rRNAメチルトランスフェラーゼによるア

ミノグリコシド耐性の問題を克服できるものと期待される。

また、既知のβ-ラクタマーゼ阻害剤と、研究代表者が発見した基質特異性拡張型β-ラクタマーゼとの相互作用解析も行った。

## 3. 研究の方法

### (1) *in silico* Screening

200万種の化合物データベースと mypresto を用い、SBDDによる阻害剤候補化合物を探索した。

### (2) Cell-based Screening

延べ20000種類の化合物について検討を行った。各化合物をジメチルスルホキシドに溶解し、実験に使用した。96穴プレートに、被検菌の1/8MICに相当する抗菌薬を含有するミューラーヒントン液体培地を分注した。さらに、終濃度100 μg/mLとなるように、化合物を添加した。被検菌をそれぞれ接種し、35°Cで一晩培養した。

### (3) 薬剤耐性タンパクの発現・精製

該当遺伝子をpETベクターに連結し、*Escherichia coli* BL21 (DE3)にて発現させた。イオン交換カラム、アフィニティークラム、疎水相互作用カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製作業を行った。

### (4) 酵素阻害活性測定

β-ラクタマーゼについては化合物存在下におけるニトロセフィンおよびイミペネムの分解活性を指標に、酵素阻害活性を評価した。16S rRNAメチルトランスフェラーゼについては、トリチウムラベルされたS-adenosyl-L-methionineのメチル基を基質である16S rRNA (30S ribosomal subunit)に転移する活性を指標に、酵素阻害活性を評価した。

### (5) X線結晶構造解析

β-ラクタマーゼや16S rRNAメチルトラン

スフェラーゼの結晶を作製し、ソーキングにより阻害剤をタンパク結晶中に導入した。阻害剤の濃度は、結晶ドロップ中で最終濃度が1-10 mMとなるように調整した。回折データの回収は愛知シンクロトロン光センターおよびPFで行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)メタロ-β-ラクタマーゼの阻害物質探索と創製

サブクラス B1 メタロ-β-ラクタマーゼ NDM-1 を産生する大腸菌を用い、Cell-based Screening を行った。化合物 100 μg/mL のみ含む培地、または、化合物 100 μg/mL およびメロペネム 1/8MIC 値濃度を含む培地で、それぞれ菌の発育を観察した。前者で発育が確認され、後者で発育が確認されなかった化合物を1次ヒット化合物として抽出した。その結果、当該化合物は延べ20000化合物中87個であった(0.4%)。

サブクラス B3 メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 を産生する大腸菌を用い、同様に Cell-based Screening を行った。その結果、当該化合物は延べ20000化合物中14個であった(0.07%)。

次に、Cell-based Screening でヒットした化合物、精製 NDM-1、イミペネムを混和し、酵素阻害アッセイを行った。その結果、Cell-based Screening でヒットした化合物87個中、3個に強い酵素阻害効果が認められた。精製 SMB-1 を用いて同様に酵素阻害アッセイを行った。Cell-based Screening でヒットした化合物14個中、5個に強い酵素阻害効果が認められた。

さらに、先行研究にて発見された SMB-1 阻害剤 X の構造最適化とその評価を行った。阻害剤 X は IC50 が 1.1 μM と酵素学的観点からは強い阻害剤と考えられたが、細菌を用いた評価においては、阻害効果が見られなかった。これは、阻害剤 X の菌体内への流入量が少ないためと考えられた。阻害剤 X および SMB-1 の複合体の構図から、阻害効

果に必要な官能基の種類や位置が特定できたので、それ以外の部分を化学修飾することで、阻害剤の菌体移行性を改善する工夫を試みた。検討した結果、改変した阻害剤 Y に改善傾向が見られた。阻害剤 Y の IC50 は 0.4 μM と阻害剤 X と同程度であったが、64 μg/mL 化合物存在時における SMB-1 産生菌に対するメロペネムの MIC (32 μg/mL) は、化合物 X 存在時が 8 μg/mL であったが、化合物 Y 存在時は < 0.25 μg/mL となった。SMB-1 以外のメタロ β-ラクタマーゼを産生する大腸菌に対しても MIC 値の改善が見られた。

##### (2)16S rRNA メチルトランスフェラーゼの阻害剤探索

*in silico* screening により 16S rRNA メチルトランスフェラーゼ NpmA の阻害剤探索を行った。化合物結合エネルギーを順位化し、上位順位より購入可能であった化合物32種類について評価を行った。その結果、2種類について阻害効果が確認された。そのうち1種類の化合物と 16S rRNA メチルトランスフェラーゼ NpmA との複合体結晶を作製し、回折データの回収を終えた。

##### (3)基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ TLA-3 と diazabicyclooctane (DBO) との相互作用解析

TLA-3 と avibactam (AVI) ならびに OP0595 複合体の構造解析を行った。TLA-3-AVI、TLA-3-OP0595 の複合体構造をそれぞれ 1.6 Å、2.0 Å 分解能で決定した。AVI と OP0595 の TLA-3 に対する阻害定数 (Ki) は 1.71、1.49 μM であった。DBO のスルホン酸が S70、T235、S237 と相互作用し、DBO のカルボン酸が、S70 と共有結合していた。これらのアミノ酸と DBO との結合様式は class A β-ラクタマーゼに普遍的であると考えられ、このことが DBO の class A β-ラクタマーゼに対する広汎な阻害効果を説明する理由になると考えられた。

## 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4件)

(1) Wanchun Jin, Jun-ichi Wachino, Yoshihiro Yamaguchi, Kouji Kimura, Anupriya Kumar, Mototsugu Yamada, Akihiro Morinaka, Yoshiaki Sakamaki, Minoru Yonezawa, Hiromasa Kurosaki, Yoshichika Arakawa.  
Structural insights into the TLA-3 extended-spectrum beta-lactamase and its inhibition by avibactam and OP0595. Antimicrob Agents Chemother 2017 61(10) e00501-17. 査読有

(2) Doi Yohei, Jun-ichi Wachino, Yoshichika Arakawa.  
Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. Infect Dis Clin North Am. 2016 Jun;30(2):523-537. 査読有

(3)Jun-ichi Wachino, Yoshihiro Yamaguchi, Shigetaro Mori, Wanchun Jin, Kimura Kouji, Kurosaki Hiromasa, Yoshichika Arakawa.  
Structural Insights into Recognition of Hydrolyzed Carbapenems and Inhibitors by Subclass B3 Metallo- $\beta$ -Lactamase SMB-1. Antimicrob Agents Chemother 2016 60(7)4274-82. 査読有

(4) Hiroe Ohno, Jun-ichi Wachino, Ryoichi Siato, Wanchun Jin, Keiko Yamada, Kouji Kimura, Yoshichika Arakawa.

A Highly Macrolide-Resistant *Campylobacter jejuni* Strain with Rare A2074T Mutations in 23S rRNA Genes. Antimicrob Agents Chemother 2016 60(4)2580-1. 査読有

[学会発表] (計 3件)

(1)Wanchun Jin, 和知野純一、木村幸司、荒川宜親  
Avibactam-, OP0595-TLA-3 ベータラクタマーゼ複合体の X線結晶構造解析  
2018. 第91回日本細菌学会総会 (福岡)

(2)仲崇天、和知野純一、木村幸司、荒川宜親  
メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ VIM-2 の精製と阻害剤探索  
2017. 第54回日本細菌学会中部支部総会 (名古屋)

(3)金地玲生、和知野純一、木村幸司、荒川宜親  
サブクラス B3 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMB-1 の阻害剤探索  
2017. 第46回薬剤耐性菌研究会 (群馬)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等  
[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_J/laboratory/basic-med/micro-immunology/bacteriology/](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/micro-immunology/bacteriology/)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

和知野 純一 (WACHINO, Jun-ichi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 00535651

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

金地 玲生 (KANECHI, Leo)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程  
2年

金山 暁人 (KANAYAMA, Takato)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程  
2年