

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07547

研究課題名(和文) 多剤耐性緑膿菌感染症に有効な多剤排出ポンプ阻害剤の創薬に向けた分子基盤の構築

研究課題名(英文) Building a molecular basis for multidrug efflux pump inhibitors effective against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections

研究代表者

森田 雄二 (Morita, Yuji)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00454322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：3成分型多剤排出ポンプMexXY-OprMのうち、RNDトランスポーターMexYの推定立体構造から基質と結合するアミノ酸残基を予想し、MexYの部位特異的変異導入体をいくつか構築した。薬剤感受性試験の結果から、薬剤耐性や阻害剤ベルベリン(誘導体)の阻害を軽減すると示唆されるアミノ酸残基が得られた。核酸と結合して蛍光を発する抗菌性色素を用いてMexXY-OprMの排出活性測定系を確立した。さらに緑膿菌のpyoverdine産生にMexXYが寄与することを見出した。pyoverdineは、鉄の捕捉因子でありvirulence因子である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性緑膿菌感染症の治療に有効な抗菌薬はほとんどない。一方で、緑膿菌は多くの抗菌性化合物に自然耐性を示すため、新規抗緑膿菌薬の開発は容易でない。研究代表者が発見したベルベリンは緑膿菌の多剤排出系MexXYを阻害してアミノグリコシドなどの耐性を軽減する。今回の研究でMexXYに対するアミノグリコシドやベルベリンの作用の分子機構の一端を示すことができた。多剤耐性緑膿菌感染症の治療に使用できなくなった抗菌薬を復活させる阻害剤の分子機構の解明は、阻害剤をリード化合物とした創薬に有用な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：Amino acid residues of MexY that presumed to bind to the aminoglycoside are predicted from its estimated three-dimensional structure. The results of the drug susceptibility test suggested some amino acid residues of MexY contributes to the aminoglycoside resistance. Furthermore, we found that MexXY expression decreased production of pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. Pyoverdine is a siderophore and a virulence factor for *Pseudomonas aeruginosa*. When MexY molecular docking was performed with reference to the AcrB crystal structure of *Escherichia coli* etc., both amikacin and berberine (derivative) bound to the estimated proximal binding site of MexY, and competitive inhibition of both inhibited amikacin resistance by MexY. This result was consistent with the MexY mutation sites that reduced aminoglycoside resistance and inhibition of berberine (derivative).

研究分野：微生物学

キーワード：多剤耐性緑膿菌 多剤排出ポンプ アミノグリコシド ベルベリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床で緑膿菌などブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌群と総称される菌種由来の多剤耐性菌は、ほとんどすべての抗菌薬に耐性を示すため、薬剤耐性菌の中でも新規抗菌薬開発の緊急性が最も高い。加えてブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌群は本態的に多くの抗菌性化合物に自然耐性を示すため、それらの菌種に対する新規抗菌薬の開発が難しい。研究代表者は、内因性の主要な薬剤耐性因子であり、新規抗菌薬開発の障壁となる RND 型多剤排出ポンプの阻害剤を開発できれば緑膿菌に対して使用できない抗菌薬や抗菌薬候補を一挙に復活させることができると考え、ベルベリンが RND 型多剤排出系 MexXY を阻害して多剤耐性緑膿菌のアミノグリコシド耐性を見出した。しかしながら、MexXY のアミノグリコシドに対する基質認識およびベルベリンの MexXY 阻害作用の分子機構はよく分かっていない。またベルベリンの阻害濃度は非常に高いため、より強力な MexXY 阻害剤の開発が必要である。

2. 研究の目的

緑膿菌の MexXY 多剤排出系を阻害するシード化合物の耐性阻害作用やシード化合物の構造・機能相関を分子レベルで明らかにし、ベルベリンをシードとする多剤耐性緑膿菌阻害薬開発の基盤をつくる。具体的には、以下の(1)～(3)である。

- (1) アミノグリコシドなど基質認識に関与する MexXY アミノ酸残基やベルベリンの阻害作用に関与するアミノ酸残基を同定する。
- (2) MexXY 排出活性の測定系を開発する。
- (3) ベルベリン(誘導体)より強力な MexXY 阻害剤を有機合成する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子操作の組換え大腸菌(保有済み)を用いて、MexXY のうち基質特異性に関与する MexY の C 末端に His タグを付加した *mexY* 遺伝子を持つ大腸菌と緑膿菌のシャトルベクター pMMB190(保有済み)由来のプラスミドを構築し、His タグ抗体を用いたウェスタンブロットティング法により膜画分における MexY-His 変異体の産生量を測定する系を構築する。大腸菌 AcrB や緑膿菌の MexB の結晶構造に基づいて、MexY や MexY 変異体の構造を、SWISS-PROGRAM を用いて構築する。PCR の複製エラーを利用したランダムな方法や部位特異的導入法により MexY-His 変異体を構築する。アミノグリコシドなどの薬剤耐性能が変化した変異株やベルベリン(誘導体)の阻害作用が変化した変異体を同定し、変異体の構造変化をシミュレーション解析する。

(2) 超高速液体クロマトグラフ タンデム質量分析(UHPLC-MS/MS)により菌体内のアミカシンやベルベリンの蓄積量を測定する。また蛍光を産生する抗菌性物質の菌体内蓄積量を測定する。

(3) シード化合物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う。構造活性相関のために酸素上の置換基の変換(フェノール性水酸基への変換、アルキル側鎖の伸長)、4級窒素上への置換基導入(アルキル化、オキシド化)、16族元素(酸素・硫黄)を含む複素環への変換、芳香環部分への置換基導入(アルキル化、アセチル化、ハロゲン化)、カウンターイオンの交換などを行う。

4. 研究成果

(1) *mexXY* 遺伝子を有するプラスミド pSport1-*mexXY* から C 末端に His タグを付加した MexY 変異体(MexY-His)を発現する *mexXY_{his}* 遺伝子を有するプラスミドを構築した。His タグ抗体を用いたウェスタンブロットティング法により膜画分における MexY-His 変異体の産生量を観察する系を構築した。薬剤感受性試験により MexY-His の薬剤耐性付与能は、MexY と同程度であることを確認した。大腸菌 AcrB や緑膿菌の MexB の結晶構造に基づいて、MexY の構造を、SWISS-PROGRAM を用いて構築した。PCR の複製エラーを利用したランダムな方法により薬剤耐性付与能やベルベリン阻害能の変化した MexY-His 変異体の構築を試みたが、現時点では目的とする変異体は得られていない。一方、MexY の分子ドッキングを行ったところ、アミカシン(アミノグリコシド系薬)もベルベリン(誘導体)も MexY の推定 proximal binding site に結合し、両者が競合阻害することで MexY によるアミカシン耐性が阻害されると予想された。この予想を基に部位特異的変異体を構築した。その中でアミノグリコシドを含む薬剤耐性付与能の変化したものがいくつか得られた。さらに His タグ抗体を用いたウェスタンブロットティング法により大腸菌の膜画分における MexY-His 変異体の産生量を観察した。

(2) UHPLC-MS/MS により菌体内のアミカシンやベルベリンの蓄積量を測定する系の構築を試みたが、コロナ禍による諸事情により中断した。MexXY 阻害作用を示すベルベリンは、核酸と結合することで蛍光を上昇させる性質があることから、緑膿菌の体内に蓄積したベルベリン量をマイクロプレートリーダーで測定することで、ベルベリンの MexXY による排出活性を測定した。アッセイ系に 10 倍程度のアミノグリコシドであるアミカシンを添加したが、MexXY のベルベリン

排出活性にほとんど変化は観察されなかった。次に脂質に結合することで蛍光を発する色素である Nile red で排出アッセイ系の構築を目指した。Nile red はベルベリンと比較して、蛍光が強く、H⁺ conductor である CCCP などの影響を受けなかった。CCCP で菌体を処理し Nile red を蓄積させた後、CCCP を除去しグルコースを添加することで菌の Nile red 排出を測定することが出来た。蛍光が強いため、結果も安定していた。さらに核酸に結合して蛍光を発するアクリジンオレンジ蓄積量を蛍光によりリアルタイムに測定した。H⁺ conductor である CCCP(carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone)存在下の大腸菌アクリジンオレンジ蓄積量と比較することで、エネルギー依存的な MexXY の薬剤排出活性を測定した。アクリジンオレンジは、大腸菌の簡便な多剤排出ポンプ活性測定系で使用される臭化エチジウムの代替の核酸結合色素となることが期待される。

(3) コロナ禍などによる諸事情からほとんど実験できなかったが、ベルベリンからいくつかのベルベリン誘導体を構築した。薬剤感受性試験により、多剤耐性緑膿菌に対する MexXY-OprM によるアミノグリコシド耐性阻害作用を検討したところ、既報の 13-(2-Methylbenzyl) Berberine だけでなく、13-(2-bromobenzyl) Berberine も阻害活性が増大していることが見出された。

(4) 多剤耐性緑膿菌の pyoverdine 産生に MexXY が寄与することを見出した。pyoverdine は鉄の補足因子である siderophore であり、緑膿菌の virulence 因子である。MexXY 欠損により pyoverdine 産生量の増大が観察された。特に薬剤耐性緑膿菌 PA7 において MexXY 欠損による pyoverdine 産生量の増加比が最も大きいことが分かった。緑膿菌は微量ミネラルである鉄を補足するためにピオベルジンを生産することから、MexXY 欠損株は MexXY 産生株より鉄不足に陥りやすい、または余分の鉄が必要であると予想される。緑膿菌が薬剤耐性因子の産生を亢進させることで、病原因子の産生量を減少させる実験的証拠の一例である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kotani Kenta, Matsumura Mio, Morita Yuji, Tomida Junko, Kutsuna Ryo, Nishino Kunihiko, Yasuike Shuji, Kawamura Yoshiaki	4. 巻 8
2. 論文標題 13-(2-Methylbenzyl) Berberine Is a More Potent Inhibitor of MexXY-Dependent Aminoglycoside Resistance than Berberine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 212 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics8040212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 森田雄二	4. 巻 48
2. 論文標題 緑膿菌の主要な薬剤耐性因子：RND型多剤排出ポンプ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 明治薬科大学研究紀要	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikarashi Kei, Kutsuna Ryo, Tomida Junko, Kawamura Yoshiaki, Morita Yuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Overexpression of the MexXY Multidrug Efflux System Correlates with Deficient Pyoverdine Production in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 658 ~ 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10060658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Masasuke, Yamasaki Seiji, Morita Yuji, Nishino Kunihiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB- or MexXY-OprM in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> using nucleic acid dyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 595 ~ 601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 五十嵐啓、鈴木進也、熊澤忠志、仁田美夕、鈴木虎太郎、久綱僚、富田純子、市川智恵、河村好章、森田雄二
2. 発表標題 緑膿菌のピオベルジン産生における多剤排出系MexXYの役割
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泰居龍之介、川口智史、市川智恵、西野邦彦、森田雄二
2. 発表標題 緑膿菌の多剤排出ポンプMexXY-OprMによる蛍光性色素の排出活性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒谷雪乃、中西由佳、市川智恵、森田雄二
2. 発表標題 緑膿菌におけるMg ²⁺ やCa ²⁺ による抗菌薬のアンタゴニズム：多剤排出系MexXY要求性と非要求性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷謙太、久綱僚、富田純子、森田雄二、河村好章
2. 発表標題 Pseudomonas aeruginosa のアミノグリコシド系薬の感受性を増大させるベルベリン誘導体 13-o-MBB
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊田春香、坂入孔明、鈴木虎太郎、森田雄二
2. 発表標題 緑膿菌NCGM2.S1株のピオベルジン産生における薬剤耐性系の役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂入孔明、熊田春香、鈴木虎太郎、森田雄二
2. 発表標題 緑膿菌のピオベルジン産生におけるポリアミンやアルギニンの影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡崎陽生、泰居龍之介、横塚知世、坂入孔明、西野邦彦、森田雄二
2. 発表標題 核酸結合色素アクリジンオレンジによる大腸菌の多剤排出ポンプ活性測定法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikarashi Kei, Morita Yuji
2. 発表標題 The MexXY multidrug efflux system leads reduction of pyoverdine production in Pseudomonas aeruginosa
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (ASM & FEMS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西野 邦彦 (Nishino Kunihiko)	大阪大学・産業科学研究所・教授 (14401)	
研究協力者	齋藤 望 (Saito Nozomu)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------