

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590120
 研究課題名（和文）多剤耐性菌における多剤耐性系の系統的解析と耐性菌に有効な医薬品の開発
 研究課題名（英文）Analysis of multidrug resistance systems in multidrug resistant bacteria and development of drugs effective on the resistant bacteria
 研究代表者
 土屋 友房（TSUCHIYA TOMOFUSA）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：80012673

研究成果の概要（和文）：

人類の死亡原因の第一位は微生物感染症である。わが国や欧米諸国などの先進諸国では、特に多剤耐性菌による感染症が大きな問題になっている。多剤耐性菌には多くの抗菌薬や消毒薬が効かないが、なぜ効かないのか、その耐性の理由を明らかにすると共に、耐性菌に有効な医薬品の開発を目指してこの研究を行った。そして、臨床現場で大きな問題になっているいくつかの多剤耐性菌について、耐性系を詳しく解析すると共に、耐性菌の生育を抑える物質など大変興味深い物質をいくつか見出した。

解析研究成果の概要（英文）：

The worst 1 of cause of human death is infectious disease by pathogenic microorganisms. In developed countries, such as our country and countries in Europe and North America, infectious diseases by multidrug-resistant bacteria are serious problems. Many drugs used at clinical sites are not effective on the multidrug resistant bacteria. Aims of this research are to analyze multidrug resistant systems in multidrug resistant bacteria and to develop drugs effective on such resistant bacteria. In fact, we analyzed multidrug resistant systems in several multidrug resistant bacteria, and found several seed compounds effective on such multidrug resistant bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：多剤耐性菌、耐性系、多剤排出ポンプ、医薬品開発、抗菌薬、バイオフィルム形成阻害

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関(WHO)の統計によると、人類の死亡原因の第一位は依然として微生物感染症であり、毎年1500万人もの人々が微生物感染症で亡くなっている。わが国をはじめとする先進諸国においては、特に薬剤耐性菌による院内感染や日和見感染が大きな問題になっている。耐性菌の中でも、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、多剤耐性緑膿菌(MDRP)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)などが問題になっている。これらの菌は、臨床現場で使用されている抗菌薬の多くに耐性を示す多剤耐性菌である。これらの多剤耐性菌による感染症の場合、治療に使用できる抗菌薬が限られ、多くの場合難治化することになる。このような状況のもとで、多剤耐性菌による感染症を克服するための研究を行うことが急務である。人類にとって脅威となりつつある多剤耐性菌問題を克服するために、代表者らは次の2つの方向からの研究を行うことが大切であり、有効であると考えた。1)多剤耐性菌の耐性系の解析、2)多剤耐性菌に有効な医薬品の開発、の2つである。細菌の抗菌薬耐性においてはいくつかの耐性機構が知られているが、上記各耐性菌においてどの耐性機構が多剤耐性に重要なのか、よくわかっていない。現在多くの細菌においてゲノムシーケンスが決定され、データベースに登録されている。ゲノム情報から、どの細菌にはどのような耐性系がいくつあるのか、といったことが解析可能である。上記黄色ブドウ球菌、緑膿菌、腸球菌などについては、ゲノムプロジェクトが完了しており、ゲノム情報が実際に利用可能である。そのような情報と、実際の遺伝学的、生化学的、細菌生理学的研究を組み合わせれば、MRSA、MDRP、VREなどの多剤耐性菌の耐性系の全体像の解析が可能である。さらに、各細菌においてどの耐性系が実際の耐性にどの程度寄与しているのか明らかにすることができる。それぞれの細菌における耐性系が明らかになれば、それぞれの細菌にはどのような耐性系

の遺伝子が用意されており、どのような抗菌薬をどの程度使うと変異などによりそれらが働き出して耐性になるか、あるいは耐性度が増すか、といったこともわかってくる。したがって、抗菌薬の適正使用に関する事前予測も可能になる。一方、耐性菌による感染症を治療するための新たな抗生物質や合成抗菌薬の開発が望まれるが、新規抗菌薬の開発は極めて難しいのが現状である。しかし、薬剤耐性菌における耐性系の全体像を詳しく解析することにより、耐性系を阻害する手だてが生まれると思われる。実際代表者らはすでにいくつかの有効物質を見出しており、この研究を速やかに発展させることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、多剤耐性緑膿菌(MDRP)、セラチア(もともと多剤耐性を示す)、肺炎桿菌などに加え、欧米で問題になっているバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)を対象とし、次の諸点を明らかにすることを目指した。

1)ゲノム情報に基づく抗菌薬耐性系の系統的解析。

公表されている MRSA、MDRP、セラチア、肺炎桿菌、VRE のゲノム情報を活用し、これらの細菌には各種耐性系遺伝子に分類されるものがいくつ含まれているかを明らかにする。

2)耐性系遺伝子の系統的クローニングと解析。

遺伝子レベルで推定された耐性系遺伝子を、系統的にクローニングし、宿主細胞で発現させ、機能と性質を解析する。こうして、上記細菌において、耐性系の全体像を明らかにしたい。

3)多剤排出ポンプの系統的解析と全体像の理解。

多剤排出ポンプは作用機構や構造の異なる複数の抗菌薬を細胞外に排出するため、多剤耐性に最も深く関与している。本研究では、上

記耐性菌が持っている多剤排出ポンプについて、それらの構造、生化学的性質、発現制御機構の解析を詳細に行う。代表者らはすでいくつかの細菌において50近い多剤排出ポンプの解析を行っているので、この項目の研究もスムーズに進むと考えている。

4) MRSA や VRE を、耐性となった抗菌薬に対して感受性化させる物質の探索。代表者らは MRSA、VRE に対してこのような活性を持つ有効物質を、植物からすでいくつか見出している。これらの有効成分について、詳細な解析を進める。

5) 耐性菌に有効な抗菌薬・消毒薬の探索と開発。

代表者らはすでいくつかの重要な基礎実験に成功しており、MRSA に有効な植物由来物質などを見出している。3年の年限内にさらに多くの有効物質を見だし、薬剤耐性菌問題解決への道を切り開くことを目指す。

3. 研究の方法

ゲノム情報を活用して、MRSA、PRSP、MDRP、セラチア、肺炎桿菌、VRE などの多剤耐性菌の耐性系遺伝子の全体像を推定する。それらについて系統的に遺伝子クローニングを行い、それらの耐性系の性質を解析する。また、それらが実際どの程度発現し耐性に関与しているのかを明らかにする。さらに機能の強い耐性系の遺伝子破壊を行い、それらの耐性への関与を調べる。一方で、耐性系の阻害物質と耐性菌に有効な抗菌物質の探索を進める。

4. 研究成果

まず、ゲノム情報を活用し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、肺炎桿菌、セラチアなど、臨床現場で大きな問題になっている多剤耐性菌の多剤排出ポンプを中心とする耐性系遺伝子を推定し、それらの中で、主要と考えられるものについて系統的遺伝子クローニングと解析を行った。3年間の研究により、いくつ

もの新たな耐性遺伝子をクローニングすることができ、それらの生化学的な解析を進めた。また MRSA については、新規解析用宿主が構築できたので、それを用い、全推定多剤排出ポンプ (37 個) すべての詳細な解析ができた。また、MDRP、肺炎桿菌、セラチアについてもそれぞれからいくつかの新しい多剤排出ポンプのクローニングと解析ができた。また、新しい解析法も開発することができた。セラチアについては、病院で問題となる消毒薬耐性について、特に深く関与している耐性系 (多剤排出ポンプ) を明らかにすることができた。またどのような消毒薬をどの程度使うとそのような多剤排出ポンプの遺伝子発現がどの程度上がるかということも明らかにできた。これは病院における上手な消毒薬使用について極めて有用な情報となる。また、緑膿菌については、我が国で緑膿菌感染症の治療に使われている3系統の抗菌薬をどのように使うと3系統全てに耐性を示すいわゆる多剤耐性緑膿菌 (MDRP) が生じやすいか、逆に言うとどのような抗菌薬をどのような順番で使うと MDRP が出現しにくいかを明らかにすることができた。これも医療現場で MDRP を生じさせない賢い抗菌薬の使い方に関する極めて有用な情報となる。

一方、耐性菌に有効な抗菌物質について非常に興味深い物質を見つけた。MRSA とバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に対して、まず大変興味深い抗菌物質を見出した。さらに研究を続けることにより、これまでに我々が見出した抗菌物質の効力を上回る抗菌物質を見つけた。これらの物質は植物由来物質であるが、植物由来物質としてはこれまでに報告された物質の中で極めて強力な効果を示すものである。さらに、我々が見出したこの化合物の構造類似体を有機合成し、さらに効力

の上回る物質の合成を目指した。実際、共同研究者が多数の物質を合成した結果、それらの中に元の化合物を上回る抗菌効果を示す物質があった。この物質については、さらに検討を重ね、動物実験に持って行く予定である。

さらに、医療現場で問題となるブドウ球菌によるバイオフィルムの形成を阻害する物質を見出した。さらにその類縁化合物について検討を行い、当初の物質を上回る効果を示す物質を見出した。これについては特許申請中である。

得られた成果を基に、多剤耐性菌問題を克服するため、さらに詳細な耐性系の研究と、我々が見出した耐性菌に有効な物質を本当に医薬品として開発すべく、この研究をさらに大発展させたい。

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 15 件) 全て査読有り

1. Hossion, A. M., N. Otsuka, R. K. Kandahary, T. Tsuchiya, W. Ogawa, A. Iwado, Y. Zamami, and K. Sasaki. 2010. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of quercetin diacylglucosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20:5349-52.
2. Liu, M. H., N. Otsuka, K. Noyori, S. Shiota, W. Ogawa, T. Kuroda, T. Hatano, and T. Tsuchiya. 2009. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* 32:489-92.
3. Nishioka, T., W. Ogawa, T. Kuroda, T. Katsu, and T. Tsuchiya. 2009. Gene cloning and characterization of EfmA, a multidrug efflux pump, from *Enterococcus faecium*. *Biol. Pharm. Bull.* 32:483-488.
4. Mima, T., N. Kohira, Y. Li, H. Sekiya, W. Ogawa, T. Kuroda, and T. Tsuchiya. 2009. Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 155:3509-3517.
5. Hatano, T., M. Kusuda, M. Tsugawa, S. Taniguchi, T. Tsuchiya, and T. Yoshida. 2008. Effect of natural polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in relation to their chemical and physical properties. *Phytochem. Res.* 31-47.
6. Minato, Y., F. Shahcheraghi, W. Ogawa, T. Kuroda, and T. Tsuchiya. 2008. Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 31:516-519.
7. Hatano, T., M. Tsugawa, M. Kusuda, S. Taniguchi, T. Yoshida, S. Shiota, and T. Tsuchiya. 2008. Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. *Phytochemistry* 69:3111-3116.
8. Otsuka, N., M. H. Liu, S. Shiota, W. Ogawa, T. Kuroda, T. Hatano, and T. Tsuchiya. 2008. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. *Biol. Pharm. Bull.* 31:1794-1797.

[学会発表] (計 33 件)

- 1、保田菜美他、多剤耐性緑膿菌の分離及びその耐性系の解析、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- 2、芳賀仁美他、*Serratia marcescens* 消毒薬耐性変異株の分離と耐性系の解析、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡

3、森田大地他、Staphylococcus aureus の多剤排出ポンプ破壊株の作製と多剤耐性sh通ポンプの網羅的解析、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡

4、塩田澄子他、黄色ブドウ球菌の付着因子およびバイオフィルム形成に対する各種テルペノイドの影響、2009年、6月4日、東京
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：バイオフィルム形成阻害剤

発明者：土屋友房、塩田澄子

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第2009-097207号

出願年月日：2009年4月13日

国内外の別：国内

○出願状況(計1件)

名称：バイオフィルム形成阻害剤

発明者：土屋友房、塩田澄子

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2010/002477

出願年月日：2010年5月4日

国内外の別：外国

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 友房 (TSUCHIYA TOMOFUSA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80012673

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし