

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591476

研究課題名(和文)多剤耐性菌の活性酸素除去システムをターゲットとする新規抗菌薬の開発研究

研究課題名(英文) Research for novel antimicrobial agents specifically targeting defence system of multi-drug resistant bacteria against oxidative stress.

研究代表者

柴田 洋文 (SHIBATA, Hirofumi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00093865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：感染症の治療は、適切な抗菌薬の有無がその成否を大きく左右する。したがって、耐性菌なかでも「とくに有効な抗菌薬がない」多剤耐性菌による感染症の出現は極めて重大な問題であり、多剤耐性菌に対する抗菌薬の開発は、喫緊の課題である。本研究において、細菌の活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)に対する防御システムをターゲットとした多剤耐性菌に有効な抗菌活性物質の新たなスクリーニングシステムを開発、そのシステムを用いて新規抗菌薬開発のためのリード化合物を発見した。

研究成果の概要(英文)：An appropriate antibiotic plays a crucial role in treatment of infectious diseases caused by pathogenic microorganisms. At present, antibiotics still work well for most patients. But, for some patients, their diseases have become difficult to treat because of antibiotic resistance, and they urgently need new antibiotic treatment options. In the present research, using a screening system that specifically target a defence mechanism whereby bacterial cells escape from lethal damage caused by reactive oxygen species, some iron chelators were found to be lead compounds as a potential drug target for treatment against multi-drug resistant bacteria.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：新規抗菌薬 多剤耐性菌 感染症

1. 研究開始当初の背景

大きな社会問題として新聞紙面を賑わせた多剤耐性アシネトバクターによる院内感染の発生や従来の抗生物質が効かない NDM-1 因子を保持する ESBL 産生菌の検出などの事例を挙げるまでもなく、今日私たちの生活環境は耐性菌の脅威に曝されている。感染症の治療は、適切な抗菌薬の有無がその成否を大きく左右する。したがって、耐性菌とくに有効な抗菌薬がない多剤耐性菌による感染症の出現は治療を極めて困難にすることから、重大な社会問題である。

薬剤耐性菌の蔓延に対抗するため、3つの戦略が考えられる。第一は、既存の抗菌薬を有効に使う。第二は、薬剤耐性のメカニズムを阻害する、つまり耐性の原因そのものを抑える阻害剤を開発し、既存の抗菌薬の効能効果を復活させる。第三は、未だ抗菌薬の標的となっていない新規な標的を攻撃する薬剤を開発する。しかし、細菌が新規抗菌薬に対する耐性を獲得するまでの期間は想像以上に短い。例えば、リネゾリドは発売から半年後に耐性菌が出現した (Gonzales, R.D.ら. 2001. *Lancet* 357: 1179)。このように新規抗菌薬の開発には常に耐性菌の出現という問題が立ちだかるうえに、莫大な費用と時間が必要である。投資に見合う収益採算性の問題等の理由から多くの巨大製薬企業はこの領域の研究開発から撤退した。それでもなお、私たちは蔓延する耐性菌に対して、早急に対抗しなければならない。今日では、国内国外を問わず、大学における研究がシーズ開発のうえで重要な役割を担っている。

これまで、主要な院内感染病原菌である MRSA 感染症に有効な薬物の開発を目的として、約 1,000 種の植物成分抽出物をスクリーニングし、数種のフラボノイド類やアルキルガレート類が、 β -ラクタム剤による MRSA に対する抗菌作用を高める効果を有する薬剤であることを発見し (Sato ら. 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1357-1360; Sato ら. 2004. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24: 226-33; Shibata ら. 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 549-555)、このような薬剤に対して、 β -ラクタム剤感受性増強薬 [Intensifier of β -Lactam drugs-Susceptibility of MRSA: ILSMR (アイルスマー)] と命名した (Shibata ら. 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 549-555)。

このような効果 (アイルスマー効果) は β -ラクタム系抗菌薬と併用したときにのみ認められ、他種抗菌薬との間では認められないこと、さらに、アルキルガレート類の細胞膜内での存在位置について、その移行性が疎水性と密接に関係していることや、アルキルガレート類の大部分の分子は、アルキル鎖を脂

質二重膜に結合し、ガロイル基を膜外表面に露出して存在し、その一部は内部へも侵入していることを明らかとした。この結果は、MRSA および MSSA に対するアルキルガレート類の抗菌効果やアイルスマー効果とよく相関している (Shibata ら. 2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 2218-2220)。

Kohanski ら (2007. *Cell* 130: 797-810) によれば、殺菌的抗菌薬で処理された細菌の死滅における直接の原因は抗菌薬の作用ではなく、ヒドロキシルラジカルの産生および増加である。 β -ラクタム系抗菌薬などの殺菌的に作用する抗菌薬存在下、細菌細胞内ではクエン酸回路において発生する NADH が過剰となる。この NADH が電子伝達系に電子を供給し、 O^2 が一電子還元されて $O^{2\cdot-}$ が発生する。生成した $O^{2\cdot-}$ は H_2O_2 、さらにはフェントン反応を経て OH^\cdot といった ROS へと変換される。これら ROS の除去システムには Mn^{2+} が関与する (Horsburgh, M.J.ら. 2002. *Mol. Microbiol.* 44:1269-1286)。アルキルガレート類は金属イオンとキレートを形成することから、アルキルガレート類が Mn^{2+} を捕捉することにより、ROS の除去システムが機能不全に陥り、その結果 ROS の菌体内濃度レベルが上昇し、殺菌作用が増大すると推察される。この作業仮説によれば、アイルスマー効果発現のメカニズムをよく説明することができる。そして、この仮説が妥当であるならば、十分量の Mn^{2+} を添加すると、アルキルガレート類に捕捉され低下した Mn^{2+} レベルを補償し、 Mn -SOD の賦活、さらに Mn^{2+} 自身による $O^{2\cdot-}$ 消去活性が期待できることから、アイルスマー効果は消失すると予想される。

私は、これまで、植物由来の新規抗菌活性物質の探索研究を進め、抗菌性物質および数種のアイルスマーを発見し (特許第 3979843 号; 特開 2006-124296, 2010-083758; WO2008/081901)、その作用メカニズムの解明に取り組んできた。そして、さきに述べた作業仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究においては、まず、この作業仮説の立証を目的とした。すでに述べたように、十分量の Mn^{2+} を添加すると、アルキルガレート類に捕捉され低下した Mn^{2+} のレベルを補償することになり、 Mn -SOD の賦活、さらに Mn^{2+} 自身による $O^{2\cdot-}$ 消去活性によりアイルスマー効果の消失が予想される。一方、 Fe^{3+} を添加すると Fe^{2+} が産生されフェントン反応を経て産生される OH^\cdot の作用により MIC 値はさらに低下する、すなわち、アイルスマー効果の助長が期待される。そこで、種々の条件下でアイルスマー効果を解析し、作業仮説の実証を試みる。

つぎに、ROSの除去システムをターゲットとする新規抗菌メカニズムに基づいた当該活性を有する物質を効率よくスクリーニングするためのアッセイ系を確立する。このアッセイ系により、従来の抗菌薬にはみられない新規な作用機序をもつ抗菌活性物質のスクリーニングが可能となり、新規抗感染症薬の開発に繋がるリード化合物の発見が期待される。本研究では、すでに確立しているMRSAに対するアイルスマー効果を指標としたアッセイ系をもとに、これに影響を及ぼす活性物質の高感度、高効率のスクリーニングシステムの構築を目指すとともに、他種多剤耐性菌への適用について検討する。また、構築されたスクリーニングシステムを用いて、植物成分抽出物等の当該活性をスクリーニングし、有効かつ安全な新規抗感染症薬の創製に繋がるリード化合物の発見を企図する。

3. 研究の方法

供試菌株：MRSA COL, N315, および臨床分離株 19 株, MSSA ATCC6538P, および臨床分離株 6 株は当研究室保存の株を使用した。寒天平板希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定：種々の溶媒に溶かし、ろ過滅菌したサンプルを 2 倍段階希釈法により希釈し、薬剤添加寒天平板 (10 mL) を作製した (10 ~ 15 段階)。接種菌液の調製は、培地として Mueller Hinton Broth (MHB) (DIFCO) を使用し、37 °C, 18 時間増菌培養した。ついで、培養液を生理食塩水で 1×10^6 CFU/mL に希釈し、接種用菌液とした。マイクロプランター (佐久間製作所) を用いて、接種用菌液を薬剤添加寒天平板に接種、37 °C, 24 時間培養後、判定した。完全に発育が阻止された濃度をもって MIC とした。

RT-PCR：被検菌の一晩培養 (37 °C, MHB 2 mL) を新鮮な MHB に植え継ぎ、 $OD_{570} = 0.3 \sim 0.4$ まで振盪培養した。集菌 (15,000 rpm, 15 分, 6 °C), 生理食塩水にて洗浄後、試薬を添加し、30 °C, 30 分インキュベートしたのち、Lysostaphin (Sigma) を添加して、30 °C, 30 分溶菌させた。

試験対象として *recA* を選択、サンプル間誤差を正規化するための参照遺伝子としては *16S rRNA* を用いた。使用したプライマーは、*recA* (GGTCTCGCTTTGGATAACGAT, ATGCTTCGGCGATTTCAAGA) と *16S rRNA* (CGAAAGCCTGACGGAGCAAC, AACCTTGCGGTCTACTCCC) である。

PCR 条件は、94 °C 5 分、次いで、94 °C 30 秒、50 °C 30 秒、68 °C 1 分の過程を 35 回繰り返したのち、68 °C 5 分インキュベート、最後に 6 °C で保温した。得られた PCR 産物について 100V で約 25 分間、アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、Gel Doc XR (Bio-Rad) を用いて画像を取得した。

4. 研究成果

(1) 金属イオンがアイルスマー効果に及ぼす影響

種々の金属イオン (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) の存在下における MRSA 21 株および MSSA 8 株の MIC 値を測定した。オキサシリンの抗菌活性はオクチルガレート 12.5 $\mu\text{g/mL}$ の添加により増強された。0.5 mM の金属イオンを添加すると、 Fe^{3+} の添加ではアイルスマー効果が増強された。一方、 Mn^{2+} を添加すると MIC 値の上昇が確認され、アイルスマー効果が消失した。 Mg^{2+} の添加によるアイルスマー効果への影響は観察されなかった (Table 1)。

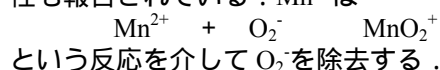
Octyl gallate mg/L	Cation (0.5 mM)	Oxacillin MIC (mg/L)					
		MRSA (19)			MSSA (7)		
		Range	MI C ₅₀	MI C ₉₀	Range	MI C ₅₀	MI C ₉₀
Control	—	64 - 512	256	512	0.125 - 64	0.25	
6.25	None	32 - 512	256	512	0.125 - 32	0.5	
	Fe^{3+}	0.25 - 256	64	128	0.125 - 4	0.5	
	Mg^{2+}	32 - 512	256	256	0.125 - 32	0.5	
	Mn^{2+}	32 - 512	256	512	0.125 - 64	0.5	
12.5	None	4 - 256	128	256	<0.06 - 4	0.25	
	Fe^{3+}	<0.06 - 32	0.25	8	<0.06 - 0.25	0.125	
	Mg^{2+}	4 - 256	128	256	<0.06 - 4	0.25	
	Mn^{2+}	64 - 512	256	512	0.125 - 64	0.5	

Table 1. オクチルガレートのアイルスマー効果に対する金属イオン (0.5 mM) の影響

つぎに、MRSA に対して、各種キレート形成・非形成化合物のさまざまな濃度の組み合わせでオキサシリンの MIC 値を測定し、アイルスマー効果に及ぼす影響を解析した。供試化合物のうち、水酸基が 1 個のアルキル *p*-ヒドロキシベンゾエート類ではアイルスマー効果が発現し、アルキルガレート類について得られた成績と同様の直鎖脂肪酸残基の炭素数に依存した構造活性相関を示した。一方、キレート形成化合物であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) では活性そのものはごく弱いもののアイルスマー効果が認められた。これに対して、オクチルガレートの水酸基を種々の置換基で置換した一群の化合物では、アイルスマー効果が減弱、3 個すべてをメトキシル基で置換した化合物では消失することを明らかとした。

スクリーニングを通じて、鉄を捕捉する化合物群のなかから、多剤耐性菌に対する新規抗菌剤として、またそのリード化合物として有望な化合物数種を見出した。

MIC, FIC の結果より、 Mn^{2+} とオクチルガレートの作用点に関連している可能性が示唆された。 Mn^{2+} は菌体内において SOD (Superoxide dismutase) や代謝、異化作用、シグナル伝達等に関わる様々な酵素の補因子として働き、細菌の生育には必要不可欠な金属である。また、 Mn^{2+} 自身による O_2 除去活性も報告されている。 Mn^{2+} は



近年、殺菌的抗菌薬で処理された細菌の死滅における直接の原因は抗菌薬の作用ではなく、ヒドロキシルラジカルの産生および増加であることが示された。-ラクタム剤やアミノグリコシド系、ニューキノロン系抗菌薬等の殺菌的に作用する抗菌薬で細菌を処理すると、クエン酸回路において発生する NADH が過剰となる。この NADH が電子伝達系に電子を供給し、複合体 や において O_2 が一電子還元されて O_2^- が発生する。生成した O_2^- は H_2O_2 , $OH\cdot$ といった活性酸素種へと変換される。ラジカルの除去には Mn^{2+} が関与していることから、 Mn^{2+} によりアイルスマー効果が消失した原因として、 Mn -SOD の賦活、 Mn^{2+} 自身の O_2^- 消去活性などのラジカルの除去が考えられる。

Fe^{3+} の添加による MIC 値の低下の原因としては、 Fe 自身の毒性およびフェントン反応などが考えられる。フェントン反応により産生したヒドロキシルラジカルにより菌が死滅したものと考えられる。

ラジカルによる菌体へのダメージが起こると DNA 修復のための防御機構として SOS 応答 (SOS response) が起こる。SOS 応答とは DNA に損傷が起こった場合に DNA 修復や細胞分裂を停止させるような遺伝子の転写がおこる反応を指し、特に大腸菌において有名である。

通常、DNA 修復に必要な遺伝子の転写は LexA リプレッサーにより制御されているが、DNA の損傷や複製阻害等が起こると一本鎖 DNA が細胞内に蓄積する。次に、RecA タンパク質が一本鎖 DNA に結合して活性化し、LexA リプレッサーの切断を引き起こす。その結果、必要な遺伝子群の転写が上昇して SOS 応答が起こり、細胞分裂が停止している間に DNA の損傷が修復される。

-ラクタム剤によりラジカルが発生すること、そして Mn^{2+} がラジカルの除去に深く関わっていることから、オクチルガレートの作用機作として SOS 応答の障害があると推察した。

(2) アイルスマー効果と SOS 応答の関係

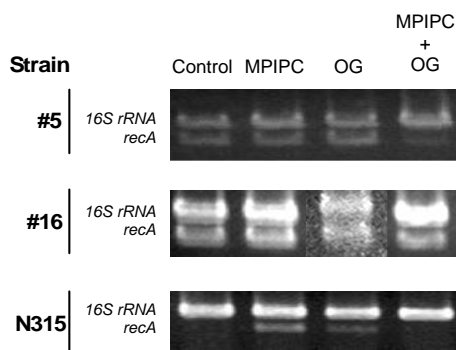


Figure 1. オキサシリン (MPIPIC) およびオクチルガレート (OG) の *recA* 発現への影響。濃度: MPIPIC 10 μ g/mL; OG 10 μ g/mL

RecA タンパク質は DNA 損傷による SOS 応答により合成が誘導される酵素である。そこで、さまざまな条件下で処理した菌体から抽出した total RNA を用いて *recA* について RT-PCR を行った。

供試菌株として、MRSA #5, #16, N315 を使用した。まず、オキサシリン (10 μ g/mL)、オクチルガレート (10 μ g/mL) をそれぞれ単独で作用させた場合と、オキサシリンとオクチルガレート (各 10 μ g/mL) を作用させた場合の結果を Figure 1 に示す。

オキサシリン、オクチルガレートをそれぞれ単独で作用させると、コントロールと比較して発現が増加する傾向が観察された。すなわち、SOS 遺伝子の転写レベルが上がり、SOS 応答が起きていることを示している。一方、オキサシリンとオクチルガレートを併用して作用させると、供試菌株によって程度に差はあるが、コントロールと同程度かそれ以下に発現が減少した。これは、オキサシリンとオクチルガレートを併用することにより、*recA* 遺伝子の転写レベルが変わらないか、あるいは下がる、すなわち、RecA タンパク質の発現が上がらず SOS 応答が誘導されていないことを示している。

つぎに、オキサシリンとオクチルガレートを併用した系に、さらに Mn^{2+} を添加し、*recA* の発現レベルについて、RT-PCR により解析した (Figure 2)。

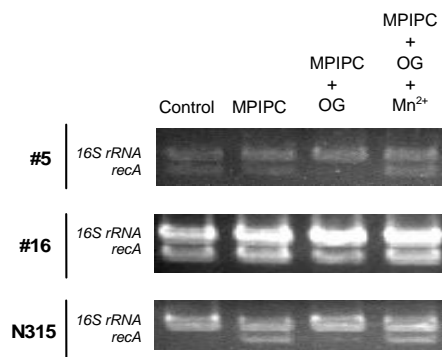


Figure 2. オキサシリン (MPIPIC) およびオクチルガレート (OG)、および Mn^{2+} の *recA* 発現への影響。濃度: MPIPIC 10 μ g/mL; OG 10 μ g/mL; Mn^{2+} 0.5 mM

Mn^{2+} を添加すると、減少していた *recA* の発現レベルがオキサシリンと同等レベルまで増加した。このことから、 Mn^{2+} はオクチルガレートの添加により障害されていた SOS 応答を回復したと考えられる。

RT-PCR の結果より、オクチルガレートが SOS 応答を障害している可能性が明らかとなった。

オクチルガレートのような没食子酸エステルは酸化防止剤として知られている。特にプロピルガレートは日本においても食品添加物として認可されている。オクチルガレートも同様に酸化防止剤であるため、オキサシ

リンとの併用で観察された *recA* の発現減少はラジカル除去のためかと考えられた。しかし、オクチルガラート単独処理において SOS 応答が起こっていることから、SOS 応答の減少はラジカル除去によるものではなく、オクチルガラートがなんらかの機構で SOS 応答を障害していることによると考えた。

また、 Mn^{2+} の添加により *recA* の発現が回復した。この原因のひとつとしてオクチルガラートが Mn^{2+} をキレートすることにより消費され、SOS 応答の障害が起こらなくなったということが考えられる。

SOS 応答は、一本鎖 DNA に RecA タンパク質が結合することによって LexA リプレッサーが開裂し、必要な遺伝子の転写が起こる、というものである。オクチルガラートにより *recA* の発現が減少していたため、SOS 応答におけるオクチルガラートの作用点として、RecA タンパク質が一本鎖 DNA に結合する段階、RecA タンパク質が活性化される段階、活性化された RecA が LexA リプレッサーを分解する段階等が考えられる。現時点では SOS 応答のどの段階においてオクチルガラートが作用しているのか不明であるため、今後更なる解析とともに、SOS 応答において誘導される他の遺伝子に関する解析が必要である。

殺菌性抗菌物質の作用による細菌の死に ROS が密接に関連しているとする説は、感染病巣における生体と細菌とのバトルにおける生体側の攻撃システムの一つとして説明されている (Kohanski ら. 2007. *Cell* **130**: 797-810 ; Corbin ら. 2008. *Science* **319**: 962-965 ; Russell D.G. 2008. *Cell Host & Microbe* **3**: 115-116)。しかし、細菌の ROS に対する防御システムに關与するカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼをともに欠損した株においても MIC 値にほとんど変化がみられず、細菌死は高濃度の抗菌剤を必要とする (Wang & Zhao. 2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 1395-1402) という点で問題がある。私が開発したアイルスマーは、MIC 値を劇的に低下させるばかりでなく、それをさらに増強するという点で世界に例をみない。したがって、一旦定着・蔓延すると長期間生息し消滅させることが難しい多剤耐性菌感染症に対する治療薬の開発が可能になると期待され、現在、拡散が懸念されている多剤耐性菌感染症に対する有効な対処法の獲得とともに、21 世紀における新たな感染症の治療戦略の開拓に大きく寄与すると確信する。

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)

[学会発表](計 2 件)

Hirofumi Shibata, Does Mn^{2+} Deprivation Turn MRSA into MSSA? 13th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection, China

National Convention Center (Beijing, China),
2013 年 10 月 25-28 日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 洋文 (SHIBATA, Hirofumi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00093865