

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450142

研究課題名(和文) 微生物の生産するメタロ-β-ラクタマーゼ阻害物質の探索

研究課題名(英文) Search for metallo-beta-lactamase inhibitors produced by microorganisms

研究代表者

塩見 和朗 (Shiomi, Kazuro)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：40235502

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)：メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)を産生する臨床分離大腸菌、肺炎桿菌および緑膿菌を検定菌として、1万以上の放線菌や糸状菌の培養液からMBL耐性克服活性を示す試料のスクリーニングを行った。スクリーニングはメロペネム含有培地と非含有培地における検定菌の阻止円径の差の大きいものを選択した。選択された培養液は大量培養を行い、そこからMBL耐性克服活性を示す化合物の精製を行った。その結果、ペシロミセス属一糸状菌およびペニシリウム属一糸状菌の培養物よりそれぞれ1化合物を単離した。両者とも既知化合物であったがMBL耐性克服活性は新知見であり、いずれもIMP-1型MBLを約20 μg/mlで阻害した。

研究成果の概要(英文)：We screened more than 10,000 cultured broths of actinomycetes and fungi that showed metallo-beta-lactamase (MBL) inhibition activity using MBL-producing clinically isolated strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The paper disc method with or without meropenem was used for the screening, and we selected samples that displayed larger inhibition zone in the presence of meropenem. Large-scale culture was carried out for the selected samples, and we isolated the MBL inhibitory compounds from cultured broths of a *Penicillium* strain and a *Paecilomyces* strain. Though the compounds were known ones, their MBL inhibition activity has not been reported. Both compounds inhibited IMP-1 type MBL at the IC50 values of 20 μg/ml.

研究分野：天然物化学、微生物化学

キーワード：抗生物質 薬剤耐性 天然物化学 微生物化学

## 1. 研究開始当初の背景

2010年に厚労省が「我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査」を約3ヶ月行い、全国の医療機関の診療で確認された腸内細菌科の多剤耐性菌について耐性の原因を解析した。153菌株を調べた結果、大腸菌67株中23株、肺炎桿菌35株中19株、エンテロバクター28株中22株に国内で主流のIMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(MBL)の遺伝子が確認された他、肺炎桿菌2株に国内としては2例目および3例目になるNDM-1型MBLが確認された。MBLは耐性菌に強い第3世代セフェムやカルバペネムなども分解するので有効な $\beta$ -ラクタム薬がなく、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤でも阻害されないことから、大きな問題となっている。したがってそれに対抗するために、MBLを阻害して、第3世代セフェムやカルバペネムなどの $\beta$ -ラクタム薬の耐性を克服する物質の必要性が高まっていた。

## 2. 研究の目的

抗細菌薬として重要な $\beta$ -ラクタム薬に対するグラム陰性細菌の主要な耐性機構は $\beta$ -ラクタマーゼによる。その中でも既存の $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が効かないMBL産生菌は大きな問題となっている。そこでMBL産生肺炎桿菌の薬剤耐性を克服する物質(阻害する物質)をスクリーニングして発見することにより、動物実験で $\beta$ -ラクタム薬と併用してMBL産生肺炎桿菌に治療効果を示す新規物質を創製することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、微生物の採取・分離同定 培養液の供給 スクリーニング 培養・精製 構造決定 *in vitro* 活性評価 抗菌スペクトル・作用機構の解析、の流れで進めた。

すなわち、土壌・植物・海洋などさまざまな環境から珍しい微生物を分離して培養した培養液を用いて、MBL耐性克服活性を示すものスクリーニングを行った。スクリーニングは、メロペネム含有培地と非含有培地を用いて、両培地における臨床分離MBL産生菌に対する阻止円径の差の大きなものを選択した。たとえばMBLを阻害するメルカプト酢酸は大きな阻止円径の差を示すことがわかっている。

選択された培養液はMBLを阻害することが期待できるので、大量の再培養を行い、培養液より活性物質を精製した。単離できた活性物質の構造は各種機器分析により決定した。単離物質については、MBL阻害活性を*in vitro*で評価する。阻害活性は $\beta$ -ラクタマーゼで開環することにより色調の変化するニトロセフィンを用いて、肺炎桿菌の分泌する酵素活性の阻害を測定した。よりくわしくは、実験に用いるMBL産生肺炎桿菌より酵素を大腸菌にクローニングして発現させ、それを用いて定量を行った。

## 4. 研究成果

### (1) MBL耐性克服活性物質のスクリーニング

1万検体を超える放線菌および糸状菌の培養液からMBL耐性克服活性を有する培養液のスクリーニングを行った。スクリーニングは臨床分離MBL産生菌である*Escherichia coli* KB366、*Klebsiella pneumoniae* KB365および*Pseudomonas aeruginosa* KB375を検定菌として、メロペネム含有培地と非含有培地における阻止円径の差の大きいものを選択した。選択された培養液は大量培養を行い、そこからMBL耐性克服活性を示す化合物の精製を行った。

### (2) MBL遺伝子のクローニングと発現

IMP-1型MBLを得るため、大腸菌に*bla*<sub>IMP-1</sub>遺伝子をクローニングし、リコンビナントIMP-1型MBLを大量発現させた。

### (3) 単離したMBL耐性克服活性物質

糸状菌*Paecilomyces* sp. FKI-6801および*Penicillium* sp. FKI-6957の培養物から活性物質を精製し、それぞれ1化合物を単離した。

#### *Paecilomyces* sp. FKI-6801の活性物質

*Paecilomyces* sp. FKI-6801の培養液から活性物質を精製し、1化合物を単離した。各種機器分析に基づき、その構造を3Z,5E-octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4-anhydrideと同定した。本化合物はすでに糸状菌の生産物として報告されていた(*J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1980) 2134)が、MBL耐性克服活性は新知見であった。本化合物はMBL産生大腸菌および肺炎桿菌に対して、陽性対照に用いたcaptoprilと同程度のMBL耐性克服活性を示した。本化合物のIMP-1型MBL阻害活性のIC<sub>50</sub>値は24  $\mu$ g/mlであり、拮抗阻害を示した。さらに本化合物のアシル誘導体がより強力な阻害活性を示すことも見いだした。

本化合物のMBL阻害活性の発表は、米国微生物学会ICAAC/ICC 2015に採択された。また現在、他大学医学部のMBL研究グループと共同で、本化合物を用いたマウスによる感染治療実験の準備を行っている。なお本化合物およびその誘導体については、特許出願を行っている。

#### *Penicillium* sp. FKI-6957の活性物質

*Penicillium* sp. FKI-6957培養物から活性物質を精製し、1化合物を単離した。各種機器分析より本化合物は、抗真菌活性で報告されているanhydrofulvic acidと同定した(特開平4-66508)。Anhydrofulvic acidのIMP-1型MBL阻害活性のIC<sub>50</sub>値は20  $\mu$ g/mlであった。

## 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5件)

塩見和朗, 大村 智, グローバル感染症最前線 -NTDs の先へ. Vol. 10. 抗感染症薬 - 微生物の生産する抗生物質を中心に. 医学のあゆみ 259 巻, 2016, 329-334

<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=925904>

M. Shiina, T. Suga, Y. Asami, K. Nonaka, M. Iwatsuki, S. Ōmura, K. Shiomi, Evesperins A and B, new circumventors of arbekacin resistance in MRSA, produced by *Metarhizium* sp. FKI-7236. J. Antibiot. 69 巻, 2016, 719-722, DOI:10.1038/ja.2015.140

T. Suga, M. Shiina, Y. Asami, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, K. Nonaka, R. Masuma, H. Matsui, H. Hanaki, S. Iwamoto, H. Onodera, K. Shiomi, S. Ōmura, Paraphaeosphaeride D and berkleasmin F, new circumventors of arbekacin resistance in MRSA, produced by *Paraphaeosphaeria* sp. TR-022. J. Antibiot. 69 巻, 2016, 605-610, DOI:10.1038/ja.2016.70

W. Phongsopitanun, A. Matsumoto, Y. Inahashi, T. Kudo, M. Mori, K. Shiomi, Y. Takahashi, S. Tanasupawat, *Actinoplanes lichenis* sp. nov., isolated from lichen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66 巻, 2016, 468-473, DOI:10.1099/ijsem.0.000746

T. Ishii, K. Nonaka, A. Sugawara, M. Iwatsuki, R. Masuma, T. Hirose, T. Sunazuka, S. Ōmura, K. Shiomi, Cinatrins D and E, and virgarcin B, three novel compounds produced by a fungus, *Virgaria boninensis* FKI-4958. J. Antibiot. 68 巻, 2015, 633-637, DOI:10.1038/ja.2015.45

〔学会発表〕(計4件)

塩見和朗, 微生物二次代謝産物と感染症, 理研シンポジウム: 次世代微生物化学ワークショップ, 理化学研究所(埼玉県和光市), 2017年1月6日

塩見和朗, 薬剤耐性克服作用を示す微生物代謝産物の探索, 日本薬学会第136年会シンポジウム「創薬研究における天然物化学のミッションと新潮流」S17-4, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年3月27日

K. Shiomi, Y. Kashima, T. Suga, Y. Asami, T. Ishii, M. Iwatsuki, K. Nonaka, H. Matsui, H. Hanaki, S. Ōmura, New metallo-beta-lactamase inhibitor produced by *Paecilomyces* sp. FKI-6801. ICAAC/ICC 2015, F-260, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA),

2015年9月18日

鹿島由衣, 須賀拓弥, 浅見行弘, 岩月正人, 野中健一, 大村 智, 塩見和朗, 微生物代謝産物からの metallo- $\beta$ -lactamase 阻害剤の探索. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 3E23p07, 岡山大学(岡山県岡山市), 2015年3月28日

〔図書〕(計1件)

K. Shiomi & S. Ōmura, Antibiotics for emerging and re-emerging diseases. *In* Antibiotics: Current Innovations and Future Trends. *Eds.*, S. Sánchez & A. L. Demain, Caister Academic Press, Norfolk, 2015, pp. 147-174

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 新規メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤  
発明者: 大村 智, 塩見和朗, 浅見行弘, 野中健一, 鹿島由衣, 花木秀明  
権利者: 学校法人北里研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-61943 (特開 2016-179964)  
出願年月日: 2015年3月25日  
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 和朗 (SHIOMI, Kazuro)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授  
研究者番号: 40235502

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

浅見 行弘 (ASAMI, Yukihiro)

北里大学・大学院感染制御科学府・助教  
研究者番号: 70391844

松本 厚子 (MATSUMOTO, Atsuko)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教

授

研究者番号：20300759

花木 秀明 (HANAKI, Hideaki)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：60286747

(4)研究協力者

なし