

## 生薬由来化合物あるいは生薬エキスをソースとした多剤耐性菌に有効な 新規DNAジャイレース阻害剤の探索研究

(申請代表者)	山岸 純一	帝日本薬科大学 薬学部 薬学科 生命分子薬学分野	教授
(研究分担者)	賀来 満夫	東北大学 医学部 感染制御・検査診断学分野	教授
(研究分担者)	和地 正明	東京工業大学大学院生命理工学研究科	教授

【背景・目的】近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)などによる院内感染、大腸菌O157などが起因菌となる新興感染症、更には結核などの再興感染症が社会問題となり、細菌感染症の重要性が再認識されている。また、臨床での抗菌薬の不適切な使用や畜産、水産分野における抗菌剤の大量使用により、耐性菌が増加すると共に複数の系統の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌が増加している。多剤耐性アシネトバクター属菌やニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ1 (NDM-1)産生多剤耐性菌などは、最近、注目されている多剤耐性菌である。耐性菌は病院内だけでなく、家畜、ペット、環境中からも分離され、グローバル化とも相俟って地球規模での広がりが進行している。この様な状況下、人が健康で快適な社会を維持するためには、耐性菌に対する更なる理解を深めると共に、耐性菌に有効かつ新たな耐性菌を出現させない薬の開発が社会より強く要望されている。

耐性菌を克服するために従来より進められてきた創製手段の一つは、既存抗菌薬の構造変換である。現在、臨床使用されているβ-ラクタム薬、キノロン薬、アミノグリコシド薬、マクロライド薬、テトラサイクリン薬なども、この手法により、さらに抗菌活性が増強し、数多くの抗菌薬を生み出してきた。しかし、この手段により開発された抗菌薬は、プロトタイプである抗菌薬とターゲット分子に対する阻害メカニズムが同一であるため、程度の差はあるものの、同系統の薬剤と交叉耐性を示すことが知られている。すなわち、既存抗菌薬の構造変換は、耐性菌を克服するための根本的な解決にはならないと言える。さらに、抗菌薬の構造変換には限界が来ている状況である。このような状況を克服する最善の手段は、新規骨格を有し、かつ(1)既存抗菌薬とは異なる新規なターゲットに作用する抗菌薬を創製する、あるいは、(2)既存抗菌薬と同じターゲットに作用するが、分子レベルでの新規メカニズムによりターゲットを阻害する抗菌薬を創製することである。

手段(1)の場合、当初は選択したターゲット酵素に対する阻害実験など*in vitro*が中心となるため、たとえ*in vitro*において強力な阻害物質を見出したとしても、その物質がマウス感染モデルなど*in vivo*で有効性を示すかは疑問である。つまり、*in vivo*において、抗菌薬のターゲットとして妥当かを判断するために長時間を要することが懸念される。一方、手段(2)の場合は、既に臨床で使用されている抗菌薬と同一のターゲット分子を新規抗菌薬の作用点として選択しているため、*in vivo*で有効である可能性が高く、ターゲット分子そのものをvalidateする必要がないという利点がある。

臨床使用されている抗菌薬のうち、キノロン薬はβ-ラクタム薬と並び最も繁用される抗菌薬の一つである。キノロン薬は広い抗菌スペクトルと強力な抗菌力を有し、種々の細菌感染症の治療に使用され、臨床的に有効性及び有用性が実証されている。それゆえに、キノロン薬のターゲット分子であるII型トポイソメラーゼ[DNAジャイレースとトポイソメラーゼIV]は、臨床的に証明された魅力的な抗菌ターゲットであるといえる。

以上のような理由より、私共は、耐性菌に有効な新規抗菌薬の創製として、II型トポイソメラーゼをターゲット分子とした探索研究を進めることにした。本研究で用いた1次スクリーニング系(blue assay)は、製薬会社研究所に勤めていた時に、10万検体の化合物ライブラリーから数十個の新規DNAジャイレース阻害化合物を見つけた実績(Microbiol Immunol, 2007, 51: 977-984)があり、スクリーニング系のvalidateは検証済と考えている。

本研究は、富山大学和漢医薬学総合研究所より分与された生薬エキスおよび生薬由来化合物をリソースとし、多剤耐性菌に有効な新規ノキノロンII型トポイソメラーゼ阻害剤の探索を目指したものである。

### 【結果・考察】

#### 1. 一次スクリーニング (blue assay)の原理と方法

II型トポイソメラーゼは、細菌に特有かつ細菌間で広く保存されているため、この酵素をターゲットにした阻害剤は選択性が高く、抗菌スペクトルの広い抗菌薬になると考えられる。しかし、II型トポイソメラーゼをターゲットとした新規抗菌薬の探索は、一般にII型トポイソメラーゼが有望な抗菌ターゲットと認識されているにもかかわらず進展していない。この原因は、多検体処理可能なスクリーニング系が開発されていないことによる。II型トポイソメラーゼの活性測定法は、酵素反応後に基質のDNAをアガロース電気泳動で分離する段階がある。このため、蛍

光標識試薬を用いた酵素活性測定やアイソトープ標識を利用した結合試験などのようにロボットによるハイスループトスクリーニング系の構築は不可能である。

そこで、私共はⅡ型トポイソメラーゼが阻害されると、ある頻度で染色体のない細胞、すなわち無核細胞が生じることに着目し、無核細胞を効率よく検出できるblue assayを新規Ⅱ型トポイソメラーゼ阻害物質のハイスループトスクリーニング系として使用した。blue assayの原理は、以下の通りである。β-ガラクトシダーゼをコードする*lacZ*遺伝子を持つプラスミドを有する*E. coli*を指示菌として使用した。正常に染色体が分配された場合、プラスミド上の*lacZ*遺伝子の発現は、宿主細胞の染色体上に存在する*lacI* 遺伝子より発現している*lacI*リプレッサーにより抑制される。しかし、無核細胞が生じると、染色体が存在しないために*lacI*リプレッサーによる抑制を受けなくなり、プラスミド上のβ-ガラクトシダーゼが発現し、培地中にX-galを添加しておく、β-ガラクトシダーゼによりX-galが分解され青色を呈色する。本アッセイは指示菌及びX-galを混合した寒天培地上に被験物質を含ませた円形ろ紙を置き、一晚培養後に円形ろ紙の周りに青色円が認められた場合を陽性とした。本アッセイ系の特徴は、多検体処理が可能で、かつ無核細胞の形成(青色円)と抗菌活性(阻止円)の有無を同時に確認できる点である。

具体的な方法は、Wachiらの方法 (Biochimie, 1999, 81 : 909-913)に準じて実施した。指示菌である*E. coli* SH3210は、1% Bacto peptone, 0.5% NaCl, 1%Bacto yeast extract (pH 7.4)を含む液体培地に接種し、30°Cで一晩培養した。指示菌(10<sup>4</sup> cells/ml)及びX-gal (40 μg/ml)を混合した寒天培地上(1% Bacto peptone, 0.5% NaCl (pH 7.4), 1.25% Bacto agar)に被験物質10 μlを含ませた円形ろ紙(直径6 mm)を置き、42°Cで24時間培養した。判定は目視により行い、培養後のアッセイプレートに置いた円形ろ紙の周りにできた阻止円とその周りにできた青色円の直径(mm)を測定した。青色円が認められた場合をアッセイの陽性とした。

## 2. 生薬エキスおよび生薬由来化合物のblue assayスクリーニング

富山大学和漢医薬学総合研究所より分与された生薬エキスセット(112検体)および生薬由来化合物セット(95検体)についてblue assayを実施した。その結果、生薬エキスセットのすべての検体がblue assay陰性であった。しかし、生薬由来化合物セットの場合、化合物Xは阻止円は認められなかったが、非常に薄い青色円が認められた。この化合物は、Ⅱ型トポイソメラーゼ阻害作用を示すものと考えられた。

## 3. 化合物Xの抗菌作用

*In vivo* 抗菌力は、CLSIが推奨する微量液体希釈法に準じて測定した。標準株として、*Escherichia coli* NBRC3992, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275, *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Staphylococcus aureus* NBRC13276を使用した。*A. baumannii* D26 (多剤耐性臨床分離株), *S. aureus* MW2 (臨床分離MRSA)および*S. aureus* KMP9 (臨床分離キノロン耐性MRSA)は、東北大学大学院医学系研究科、広島大学大学院医歯薬保健学研究科および北里大学医学部から分与された。シプロフロキサシンは和光純薬から購入した。*E. coli* NBRC3992, *P. aeruginosa* NBRC13275, *A. baumannii* ATCC19606に対する化合物XのMICは、いずれも>128 μg/mlであったが、*A. baumannii* ATCC19606のMBCは64 μg/mlであった。これは菌体が伸長化した後、溶菌に至らず死滅したものと考えられた。*S. aureus* NBRC13276のMICは16 μg/mlであった。更に、*S. aureus* MW2 および*S. aureus* KMP9のMICも標準株と同一の16 μg/mlであった。*S. aureus* KMP9のシプロフロキサシンのMICは>128 μg/mlであり、標準株(*S. aureus* NBRC13276のMIC : <0.25 μg/ml)に比べ高度耐性化していた。化合物Xの*S. aureus* NBRC13276に対するMBCはMICと同一であり、強い殺菌作用を有することが明らかになった。化合物Xは、キノロン高度耐性菌(*S. aureus* KMP9)に対して標準株と同じMICを示したことより、化合物Xは新規作用メカニズムを有するⅡ型トポイソメラーゼ阻害物質であることを示唆している。

## 4. 化合物X作用時の*A. baumannii*および*S. aureus*の形態変化

対数増殖期の*A. baumannii* ATCC19606と *S. aureus* NBRC13276に、化合物XをMIC周辺濃度作用させた後、シントウ培養した。経時的にサンプリングし、光学顕微鏡で観察した。*A. baumannii*の場合、時間の経過とともに菌体の伸長化が認められた。また、伸長化した菌体を核染色すると、細胞の中央部にのみ核が認められ、隔壁は観察できなかつた。この抗菌像は、キノロンなどのⅡ型トポイソメラーゼ阻害剤の抗菌像と一致した。*S. aureus*の場合には、菌体が膨化した抗菌像が認められた。

## 5. 耐性菌出現頻度

*S. aureus* NBRC13276の化合物X耐性菌の出現頻度について検討した。

耐性菌の分離は、化合物Xの1～4倍のMIC濃度を含む平板培地に適切な菌量をspreadし、37°Cで2日間培養した。耐性菌出現頻度は薬剤を含まない平板培地上の生菌数をもとにして算出した。

化合物Xの場合、×1 MIC～×4 MIC濃度で選択しても耐性菌の出現頻度は、約 $1 \times 10^{-10}$ 以下であり、シプロフロキサシンの約 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ に比べて耐性菌の出現頻度は低いことが明らかになった。

**【結論】**生薬由来化合物からノンキノロンⅡ型トポイソメラーゼ阻害剤を見つけることができた。この化合物Xは、多剤耐性MRSAにも有効であり、かつ耐性菌出現頻度も低いことから、多剤耐性菌を克服するための有望なリード化合物になる可能性が示唆された。