

論文審査の要旨

愛知学院大学

報告番号	甲 第 6 号	論文提出者名	小谷 謙太
論文審査 担当者	主査 古野 忠秀 古野 忠秀 副査 上井 優一 上井 優一 河村 好章 河村 好章		
論文題名	13-(2-Methylbenzyl)berberine は MexXY 系依存 的アミノグリコシド系薬耐性をベルベリンよ り強く阻害する		

インターネットの利用による公表用

本研究は、薬剤耐性菌の克服を目指し、生薬成分であるベルベリンをリード化合物として新たな薬剤耐性阻害剤を合成、その分子機構の解析を行った研究である。本研究は、主として *Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）を対象とし、緑膿菌の持つ RND型薬剤排出ポンプ MexXY系によるアミノグリコシド系薬耐性の阻害について検討した。

緑膿菌の持つ MexXY系を介したアミノグリコシド系薬耐性阻害作用の増強を目的に、ベルベリンの13位に様々なベンジル基を導入し、11種類の誘導体を合成した。MexXY系を介した抗菌薬耐性阻害作用を測定するのに使用した緑膿菌株は、①緑膿菌野生株 PAO1株、②PAO1株より抗菌薬耐性に関与しているとされている薬剤排出ポンプ4種類を欠損させ、MexXY系を過剰に発現させた緑膿菌株 PAGU⁸1927、③PAGU⁸1927より MexXY系も欠損させた PAGU⁸1933を用いた。ベルベリン及びその誘導体の MexXY系阻害活性を調べるため、PAGU⁸1927を使いゲンタマイシンおよびベルベリンまたはその誘導体併用時のゲンタマイシンの最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。ベルベリンおよびその誘導体の併用濃度は、PAGU⁸1933に対する MIC値の1/2、1/4、1/8の濃度とした。PAGU⁸1927に対するゲンタマイシン単剤の MIC値は1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。ゲンタマイシンとベルベリンを併用した場合、MIC値が128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になった。合成したベルベリン誘導体のうち MIC値が128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より低い値を示したものは5種類存在した。その中で、最も強くゲンタマイシン耐性を阻害した化合物は、13-(2-methylbenzyl)berberine（13-o-MBB）であり、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用濃度でゲンタマイシンの MIC値が16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった。これは、ベル

ベリンを256 µg/mL併用した時の8倍のゲンタマイシン耐性阻害作用に相当した。同様の方法でゲンタマイシン以外の抗菌薬耐性阻害作用も調べた。併用濃度が最も高い時の13-o-MBBとベルベリンの耐性阻害作用を比較すると、13-o-MBBは、アミカシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、ノルフロキサシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、セフェピムの耐性を2~4倍強く阻害した。これらの13-o-MBBの抗菌薬耐性阻害作用はMexXY依存的であった。これらのことから13-o-MBBはベルベリンより強いMexXY系依存的薬剤耐性阻害作用を持っていることが考えられた。一方、13-o-MBBの位置異性体である13-(3-Methylbenzyl)berberine (13-m-MBB) と13-(4-Methylbenzyl)berberine (13-p-MBB) のMexXY系依存的抗菌薬耐性阻害作用は弱かった。このことから、13-o-MBBのo位のメチル基はMexXY系依存的アミノグリコシド系薬耐性阻害作用を増大させることが考察された。

次に、13-o-MBBの持つ抗菌薬耐性阻害作用が様々な耐性系を持つ緑膿菌臨床株でも発現するか、日本で分離された代表的な多剤耐性緑膿菌株であるNCGM2. S1株 (PAGU 1606) とそのMexXY欠損株であるPAGU^Δ1659を使用して測定した。結果、13-o-MBBはベルベリンの2~4倍のアミノグリコシド系薬の耐性阻害作用を示した。しかし、アミノグリコシド系薬耐性阻害作用と比較してその他の抗菌薬の耐性阻害作用は弱かった。また、PAO1株、アミノグリコシド系薬に耐性を持つ緑膿菌臨床株、*Achromobacter xylosoxidans*と*Burkholderia cepacia*基準株に対しても13-o-MBBのアミノグリコシド系薬耐性阻害作用を測定した。13-o-MBBはこれ

らの菌株に対してもアミノグリコシド系薬の耐性を阻害し、特に *A. xylosoxidans* に対して、アミカシンとゲンタマイシンの耐性を256倍以上阻害した。更に13-o-MBBが与える殺菌活性への影響をMexXY系発現株であるPAGU[®]1929とMexXY系欠損株であるPAGU[®]1933を用いて測定した。PAGU[®]1929に対して、ゲンタマイシンを4時間曝露させても殺菌活性が見られなかった。一方、ベルベリンを併用すると、4時間の曝露で最初の接種菌量から1/100ほどに菌数が減っていることが確認された。13-o-MBBの併用では4時間の曝露で最初の接種菌量から約1/7000程度に菌数が減少しており、ベルベリンの70倍ほどゲンタマイシンの殺菌活性を増大させた。一方、MexXY欠損株であるPAGU[®]1933に対しては併用による殺菌活性の変化は見られなかった。

MexXY系阻害における分子機構を探索するため、AutoDock Vinaを用いて、構築したMexY分子モデルとアミカシン及びベルベリンとの結合部位を算出した。予測した結果を元に変異遺伝子を5種類（D133S、Y613A、Y613F、D615A、D668A）作成し、変異MexY発現緑膿菌を構築した。構築した株の薬剤耐性を調べた結果、D615AまたはD668Aの変異を持つ緑膿菌は、アミカシンとゲンタマイシンのMIC値が減少した。一方、アミノグリコシド系薬以外の感受性に変化はなかった。D668Aの変異を持つ緑膿菌は、ベルベリン及び13-o-MBBのMexY阻害作用を減少させた。Y613Fの変異を持つ緑膿菌はMexY野生型と同じ耐性を示した。Y613Aの変異はゲンタマイシンに対するベルベリン及び13-o-MBBのMexY阻害作用を低下させた。これらの結果より、D668とD615は、アミノグリコシド系薬の排出に重要であると示唆された。また、13-o-

MBBによるMexXY系依存的アミノグリコシド系薬耐性阻害作用は、MexYのY613残基付近でベルベリンが相互作用することでアミノグリコシド系薬の排出を阻害していることが推測された。

以上の事から、13-o-MBBのアミノグリコシド系薬耐性阻害作用はベルベリンより強く、MexXY系阻害薬として有用な化合物であり、13-o-MBBはMexXY系阻害薬の設計に貢献することが期待される。

本研究は、微生物学及び関連諸学科に寄与するところが多い。よって、本論文は博士（薬学）の学位授与に値するものと判定した。