

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 6 号	論文提出者 小谷 謙太
論文題目 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	

第一章 緒言

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌) は、院内感染の主要な原因菌の1つである。特にcystic fibrosisを有する成人患者の8割が慢性的に緑膿菌に感染している。緑膿菌の治療において、その発育を阻害するのに不十分な濃度での抗菌薬による治療は、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) を出現させる。緑膿菌の抗菌薬耐性の主因として、薬剤排出ポンプが挙げられる。緑膿菌の抗菌薬耐性に関与する薬剤排出ポンプとして5つのRND型薬剤排出ポンプ (MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexVW-OprM及びMexXY-OprM) が報告されている。その中でMexXY-OprMのみが、アミノグリコシド系薬耐性に寄与している。

薬剤排出ポンプによる抗菌薬耐性の分子メカニズムを解明するには、タンパク質を結晶化し、X線構造解析を行うことが一般的であるが、MexYに関するX線結晶構造解析は未だ成功した例はない。しかし、近年では、コンピューター上でタンパク質の構造を予測し、基質の結合や排出に関する分子メカニズムを算出する仮想シミュレーションが用いられることがある。*Escherichia coli* (大腸菌) には、RND薬剤排出ポンプAcrBが発現している。AcrBは、アミノグリコシド系薬を排出する機能を持たないが、X線結晶構造解析により様々な薬剤の排出機構が明らかになっている。また、MexYと相同性の高いアミノ酸配列と生化学的に対応する構造・機能を持っており、MexYの構造予測の際、基盤とする構造としてAcrBがよく用いられる。AcrBの薬剤結合ポケットの解析により、基質の結合に重要なアミノ酸残基が特定されており、薬剤排出の分子メカニズムも解明されつつあるが、MexYにおけるアミノグリコシド系薬の排出に関する分子メカニズムの報告は少ない。臨床現場で分離されているアミノグリコシド系薬耐性を持つ緑膿菌株の多くは、通常の緑膿菌よりMexYのmRNA発現量が10倍以上

増加している。このことから、MexXY系はアミノグリコシド系薬の耐性に大きく寄与しており、MexXY系の阻害薬の開発により、アミノグリコシド系薬をより低濃度で使用することが可能になると考えた。我々は、以前の研究でベルベリンがMexXY系依存的なアミノグリコシド系薬耐性を阻害する作用を持つことを発見した。しかし、ベルベリンがMexXY系を阻害する最適濃度は512 µg/mLと高く、このままでは臨床応用できない。そこで、我々はベルベリンから新たにMexXY系をより強く阻害する化合物を合成し、その作用機序を分子レベルで解析することを試みた。

第二章 ベルベリン誘導体によるMexY系を介した耐性阻害作用

ベルベリン誘導体は、ベルベリンの13位に置換基を持つ様々なベンジル基を導入することで11種類合成された。ベルベリン誘導体のMexXY系を介した抗菌薬耐性阻害作用は、緑膿菌PAO1株より、MexXY系を除く抗菌薬耐性に関与すると知られている4種類の薬

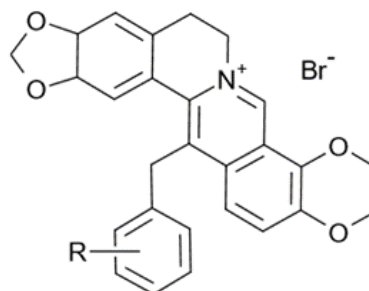


図. 合成したベルベリン誘導体の構造

剤排出ポンプ欠損をさせ、MexXY系を過剰に発現させたPAGU[®]1927 (MexXY発現株) と、PAGU[®]1927からMexXY系も欠損させたPAGU[®]1931 (MexXY欠損株) の2種類の菌株を用いた。まず、ベルベリン誘導体の併用濃度を決定するためMexXY欠損株とMexXY発現株に対するベルベリン誘導体単剤の抗菌活性を測定した。合成した誘導体は、MexXY発現株に対して128~512 µg/mLのMIC値であった。一方、MexXY欠損株に対しては64~256 µg/mLであった。また、ベルベリン誘導体のMexXY発現株に対する各MIC値は、すべてMexXY欠損株に対する

MIC値の2倍の値を示したため、ベルベリン誘導体はMexXY系の基質になることが示唆された。このMIC値の1/2、1/4、1/8の濃度でベルベリン誘導体を併用し、MexXY発現株とMexXY欠損株に対するゲンタマイシンのMIC値を測定することで、ベルベリン誘導体のMexXY依存的なゲンタマイシン耐性阻害作用を測定した。

表. ベルベリン誘導体によるゲンタマイシン耐性阻害活性

Concomitant Drug	-R	Gentamicin MIC with berberine derivative ($\mu\text{g/mL}$)											
		PAGU [§] 1927						PAGU [§] 1931					
		256*	128	64	32	16	8	256	128	64	32	16	8
Berberine	-	128	256	256	512	-	-	8	8	8	8	-	-
1	-H	-	-	32	64	128	-	-	-	8	8	8	-
2	<i>o</i> -Br	-	-	32	64	64	-	-	-	4	8	8	-
3	<i>p</i> -Br	-	-	-	128	256	512	-	-	-	4	8	8
4	<i>o</i> -F	-	32	64	128	-	-	-	4	8	8	-	-
5	<i>o</i> -Cl	-	-	32	64	128	-	-	-	4	8	8	-
6	<i>p</i> -Cl	-	-	256	256	256	-	-	-	4	8	8	-
7	<i>o</i> -CH ₃	-	16	32	64	-	-	-	4	8	8	-	-
8	<i>m</i> -CH ₃	-	-	256	256	512	-	-	-	4	8	8	-
9	<i>p</i> -CH ₃	-	-	256	256	512	-	-	-	4	8	8	-
10	<i>o</i> -NO ₂	-	128	128	256	-	-	-	8	8	8	-	-
11	2,6-Cl	-	-	-	128	256	512	-	-	-	4	8	8

*: ベルベリン誘導体の併用濃度

MexXY発現株では、ゲンタマイシン単剤のMIC値が1024 $\mu\text{g/mL}$ であった。ゲンタマイシンとベルベリン256 $\mu\text{g/mL}$ を併用した場合、ゲンタマイシンのMIC値が128 $\mu\text{g/mL}$ になった。ベルベリン誘導体の中で最も強くゲンタマイシンの耐性を阻害した化合物は、13-(2-Methylbenzyl)berberine (13-*o*-MBB) だった。13-*o*-MBBを128 $\mu\text{g/mL}$ 併用したとき、ゲンタマイシンのMIC値は16 $\mu\text{g/mL}$ となり、13-*o*-MBBのゲンタマイシン耐性阻害作用は、ベルベリン256 $\mu\text{g/mL}$ 併用したときの8倍に相当した。また、この作用はMexXY欠損株で確認されなかった。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) を最も高い濃度でゲンタマイシンと併用しても、MexXY発現株に対するゲンタマイシンのMIC値は256 $\mu\text{g/mL}$ であり、

ベルベリンを256 µg/mLで併用したときのゲンタマイシン耐性阻害作用の1/2倍しか示さなかった。次に、13-o-MBBと位置異性体の持つゲンタマイシン以外の抗菌薬耐性阻害作用をMexXY発現株とMexXY欠損株を用いて調べた。結果、13-o-MBBの128 µg/mLの併用は、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256 µg/mLのベルベリンで併用したときの2~4倍強く阻害した。一方、13-o-MBBの位置異性体は、ベルベリンと比較して抗菌薬耐性を阻害は小さかった。このことから、導入したベンジル基の*o*位のメチル基には、MexXY系の阻害を増大する作用があると考察された。

これまで複数の耐性系を欠損させた遺伝子変異株のみで耐性阻害作用を測定していたが、アミノグリコシド系薬を含む様々な抗菌薬に耐性を発現している緑膿菌臨床株であるS1株とそのMexXY欠損株に対する13-o-MBBの耐性阻害作用を測定した。結果、13-o-MBBはアミノグリコシド系薬であるアミカシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシンの耐性をベルベリンより2~4倍強く阻害した。しかし、アミノグリコシド系薬以外の薬剤耐性は変化させず、13-o-MBBの抗菌薬耐性阻害作用は臨床株において、アミノグリコシド系薬に対する選択性が高いことが明らかになった。続いて、S1株だけでなく、その他の緑膿菌臨床株3種と、それぞれのMexXY系を欠損させた株、さらに主にRND型薬剤排出ポンプによってアミノグリコシド系薬耐性を持つ*A. xylosoxidans*と*B. 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。結果、これらの菌株に対しても13-o-MBBは、MexXY系依存的にアミノグリコシド系薬の耐性を阻害した。驚くことに*A. xylosoxidans*に対しては、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。

13-o-MBBは、アミノグリコシド系薬の殺菌作用に関してもベルベリンより大きく増強しているのか、緑膿菌PAO1株由来のMexXY発現株であるPAGU[®]1929と、そのMexXY欠損株であるPAGU[®]1933を用いてゲンタマイシンの殺菌作用を経時的に測定した。結果、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は発現しなかった。一方、ベルベリンを併用下では、4時間の曝露で最初の接種菌量から1/100倍ほどに菌数が減っていることが確認された。更に、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倍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。これらの結果から、13-o-MBBは、ベルベリンよりMexXY系を介したアミノグリコシド系薬耐性阻害作用が強いことが明らかになった。

第三章 ベルベリン及びベルベリン誘導体とMexYの結合

13-o-MBBの作用機序を明らかにするため、AutoDock Vinaを用いて、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。

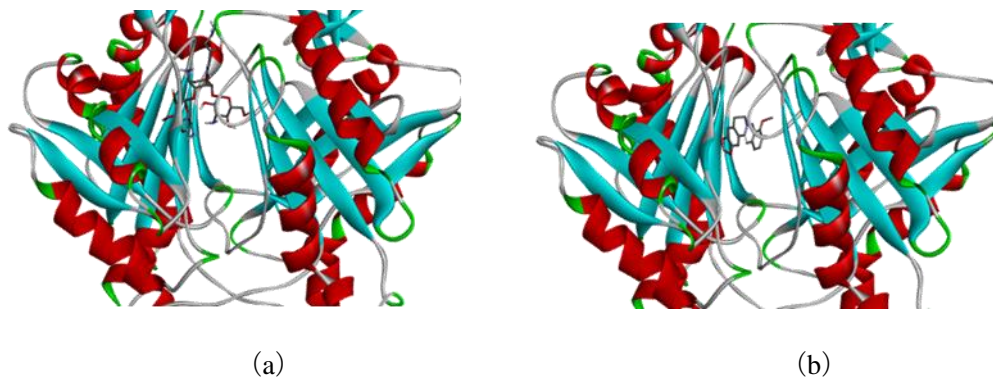


図. (a) MexYとアミカシンの計算結果 (b) MexYとベルベリンの計算結果

結果、アミカシンとベルベリンは、MexYの遠位結合ポケットと近位結合ポケットの中間に存在するループ構造に結合していることが予測された。さらに、このどちらの結合にもアミノ酸残基Y613が関与している可能性が予測された。また、予測されたアミノ酸残基であるY613は、既にアミノグリコシド系薬耐性において重要であることが明らかになっている。その他、予測されたアミカシンの結合部位付近には、負電荷を持つアミノ酸残基D615が存在した。一方、予測されたベルベリンの結合部位は、ループ構造の近位ポケット側に結合しており、結合部位の内膜側には、負電荷を持つアミノ酸残基D668が存在した。更に、アミノ酸残基D668の隣には、MexYの機能を保つための重要なアミノ酸残基D133が存在した。これらの残基の変異遺伝子を5種類（D133S、Y613A、Y613F、D615A、D668A）作成し、MexYの欠損している緑膿菌株に組み込み、変異MexY発現緑膿菌株を構築した。構築した菌株の薬剤耐性を調べた結果、D133Sの変異緑膿菌株は、MexXY系の欠損した緑膿菌と同じ抗菌耐性を示した。D615AまたはD668Aの変異緑膿菌株は、ゲンタマイシンのMIC値が減少していた。D668Aの変異緑膿菌株は、ベルベリン及び13-o-MBBのMexY阻害作用を減少させた。Y613Fの変異緑膿菌株はMexY野生型と同じ耐性を示した。Y613Aの変異緑膿菌株は、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。D133Sの変異緑膿菌株の結果は、大腸菌の持つAcrBにおいて、MexYのアミノ酸残基D133に対応する部位に変異が入るとAcrBの活性が消失するという報告あり、この結果と一致しており、MexYにおいてもアミノ酸残基D133はMexYの活性に重要な残基であることが示された。D615AとD668Aの変異によるゲンタマイシン耐性の低下により、アミノグリコシド系薬のもつ-NH₃基の正電荷とアミノ酸残基D615とD668の負電荷の静電的な引力がアミノグリコシド系

薬の認識に重要であることが考察された。また、ベルベリン及び13-o-MBBもD668Aの変異により耐性阻害作用が低下したため、ベルベリン及び13-o-MBBの構造中の正電荷を持つ窒素原子とアミノ酸残基D668の負電荷の静電的な引力がベルベリンと13-o-MBBの結合に重要であることが示唆された。アミノグリコシド系薬とベルベリン及び13-o-MBBのどちらもアミノ酸残基D668AとY613Aの作用が変化したため、ベルベリン及び13-o-MBBのアミノグリコシド系薬耐性阻害作用は、これら2つの残基による基質の認識においてアミノグリコシド系薬と競合することで可能性が示唆された。

第四章 結論

導入したベンジル基の*m*位もしくは*p*位にメチル基を持つ誘導体は、ベルベリンと比較しMexXY系を介した耐性阻害作用は小さかったが、*o*位にメチル基を持つ13-o-MBBは、今回合成した化合物で最も強いMexXY系阻害作用を持っており、*o*-メチル基はMexXY系を介した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示唆された。MexYによる薬剤の排出において、薬剤結合部位は近位ポケットと遠位ポケットに大きく分けられているが、アミノグリコシド系薬はその2つを隔てるループ構造に結合する可能性があり、13-o-MBBはこのループ構造をターゲットにMexYによるアミノグリコシド系薬耐性を阻害していることが推察された。しかし、13-o-MBBの臨床株に用いた濃度は高く実用的ではない。しかし、13-o-MBBのアミノグリコシド系薬耐性阻害作用は、多剤耐性緑膿菌臨床株のアミノグリコシド系薬耐性をそのMexXY欠損株と同程度まで軽減するほど強く、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。

【研究成果の掲載紙】

1. Morita Y, Nakashima K, Nishino K, Kotani K, Tomida J, Inoue M, Kawamura Y.
Berberine Is a Novel Type Efflux Inhibitor Which Attenuates the MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2016. **7**. 1223.
2. Kotani K, Matsumura M, Morita Y, Tomida J, Kutsuna R, Nishino K, Yasuike S, Kawamura Y. 13-(2-Methylbenzyl) Berberine Is a More Potent Inhibitor of MexXY-Dependent Aminoglycoside Resistance than Berberine. *Antibiotics (Basel)*. 2019. **8**(4). E212.