

第 29 回 微生物シンポジウム – ベルベリン誘導体の緑膿菌

MexXY 多剤排出系阻害と抗黄色ブドウ球菌活性のメカニズム

○小谷謙太¹、齋藤康平¹、富田純子¹、森田雄二¹、西野邦彦²、河村好章¹

¹愛知学院大学大学院薬学研究科、²大阪大学産業科学研究所

【概要】

2017年8月、広島国際大学で開催された「第29回 微生物シンポジウム」に参加し、以下の研究内容を口頭発表した。

【緒言】

近年、アミノグリコシド系薬、カルバペネム系薬、キノロン系薬に同時に耐性を持つ多剤耐性緑膿菌 (MDRP) や様々な薬剤に耐性を持つ黄色ブドウ球菌が出現し、治療の問題となっている。薬剤耐性の原因の一つは薬剤排出ポンプである。我々は、以前の研究でRND型薬剤排出ポンプ MexXY 依存性な緑膿菌のアミノグリコシド系薬の感受性増大作用を強めたベルベリン誘導体の 13-*o*-methylbenzylberberine (13-*o*-MBB) の合成に成功した。しかし、ベルベリン及び 13-*o*-MBB の MexXY に対する分子メカニズムは分かっていない。我々は、その作用機序を明らかにするため研究を行った。

また、ベルベリンには、黄色ブドウ球菌への抗菌が確認されている。しかし、ベルベリンは黄色ブドウ球菌の持つ MFS 型薬剤排出ポンプの NorA の基質であるため、抗菌活性は弱く、このまま治療に用いることはできない。我々は、以前の研究でベルベリン誘導体に強い抗黄色ブドウ球菌活性を

見出した。ベルベリン誘導体の抗黄色ブドウ球菌活性増大の要因を明らかにするため研究を行った。

【方法】

ベルベリン誘導体は 13-*o*-MBB、13-*o*-phehylbenzylberberine (13-*o*-PBB)、13-*m*-methylbenzylberberine (13-*m*-MBB)、13-*p*-methylbenzylberberine (13-*p*-MBB) の 4 種類を用いた。MexY の分子モデルは SWISS-MODEL を用いて構築した。MexY へのベルベリンの結合は AutoDockVina を用いてドッキングシミュレーションを行った。検証のため部位特異的導入により MexY の変異体を構築した。MexY 変異体発現緑膿菌株に対しベルベリン誘導体を併用し、抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。*S. aureus* に関してはメチシリン感受性の黄色ブドウ球菌 (ATCC 25923)、病院で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌臨床株、NorA 発現株である RN4220、RN4220 から NorA を欠損させた株の 4 種類に対してベルベリン誘導体の MIC を測定した。

【結果と考察】

AutoDockVina を用いて、MexY の分子モデルにベルベリンもしくはアミカシンの結

合させた結果、どちらの化合物もアミノ酸残基 Y613 に結合している可能性が示唆された。さらにアミカシンはアミノ酸残基 D615 との結合の可能性が示唆された。また、ベルベリンは MexY との計算結果上で結合はしていないもの、ベルベリンの結合部位のすぐ近くに負電荷をもつアミノ酸残基 D668 が存在した。

アミノ酸残基 Y613A、D668A、D615A の 3 種類の変異緑膿菌株を作成し、これら変異株及び変異のない native 株でゲンタマイシン、アミカシン、シプロフロキサシンの MIC をベルベリン及び 13-*o*-MBB 併用下もしくは抗菌薬単独で測定した。結果、アミカシンは MexY により 4 倍、ゲンタマイシンは 16 倍耐性が上昇していた。アミノ酸残基 Y613A、D668A、D615A の 3 種類の変異緑膿菌株では、変異のない緑膿菌と比較して、アミカシン耐性は 2~4 倍、ゲンタマイシンの耐性は低下していた。このことから、アミノ酸残基 Y613、D668、D615 はアミカシンやゲンタマイシンとの結合に関与していることが考察された。一方、シプロフロキサシンでは native 株と各変異株の MIC に差はなく、これらのアミノ酸残基は結合に関与していない可能性が示唆された。ベルベリンおよび 13-*o*-MBB を併用すると、native 株の MIC はアミカシンとゲンタマイシンの感受性を 4 倍増大させたが、アミノ酸残基 Y613A と D668A においてはこの感受性増大作用が 2~4 倍低下した。よって、AutoDockVina の計算結果を元に予想した通り Y613 と D668 はベルベリンおよび 13-

o-MBB の結合に関与していることが考察された。一方、アミノ酸残基 Y613、D668、D615 はアミノグリコシド系薬特異的に結合に関与している可能性が示唆された。

4 種類の黄色ブドウ球菌に対してベルベリン及び 4 種類のベルベリン誘導体(13-*o*-MBB、13-*m*-MBB、13-*p*-MBB、13-*o*-PBB) の MIC を測定した結果、NorA が発現していない RND4220 Δ norA で MIC が 16 μ g/mL となり、NorA の発現している 3 種類の株で MIC が 128~256 μ g/mL であった。一方、13-*o*-MBB、13-*m*-MBB、13-*p*-MBB では、NorA の有無による差がほとんど消失し、すべての株で MIC が 2~4 μ g/mL となった。さらに、13-*p*-MBB はすべての株で MIC が 1 μ g/mL となった。よって、ベルベリン誘導体は NorA の基質になりにくくなることで黄色ブドウ球菌の抗菌活性が増大したと考察された。

【感想】

第 29 回 微生物シンポジウムでの発表は、前回の学会発表の続きのデータを発表するという初の経験であり、以前までの研究に関するデータの発表の仕方や、前回の内容をさらに深く掘った内容のため、話が難しくなりすぎないかなど、すごく慎重になったが、とてもいい経験になりました。最後に愛知学院大学薬学会の支援により、本学会に参加させていただき誠にありがとうございました。