

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

小谷謙太

所属研究室

微生物学研究室

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

【背景・目的】

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（Hauser AR et al., *Clin Microbiol Rev.* 2011; **24**: 29-70.）。緑膿菌の治療において、緑膿菌の発育を阻害するのに不十分な濃度での抗菌薬の治療は、新たな多剤耐性緑膿菌（MDRP）を出現させ（Nair CG et al., *Lett Appl Microbiol.* 2013; **56**: 149-54.）、耐性を獲得した緑膿菌の治療は困難であり、死亡率を増加させる（Dantas RC et al., *J Med Microbiol.* 2014; **63**: 1679-87.）。

緑膿菌の薬剤耐性の主因に、薬剤排出ポンプが挙げられる（Klockgether J et al., *Front Microbiol.* 2011; **5**: 65.）。緑膿菌の薬剤耐性に関与する薬剤排出系として5つのRND型多剤排出ポンプMexAB-OprM（Poole K et al., *J Bacteriol.* 1993; **175**: 7363-72.）、MexCD-OprJ（Poole K et al., *Mol Microbiol.* 1996; **21**: 713-24.）、MexEF-OprN（Köhler T et al., *Mol Microbiol.* 1997; **23**: 345-54.）、及びMexXY-OprM（Mine T et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; **43**: 415-7.、Morita Y et al., *Microbiology.* 2012; **158**: 1071-83.）、MexVW-OprM（Li Y et al., *J Antimicrob Chemother.* 2003; **52**: 572-5.）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（Morita Y et al., *Microbiology.* 2012; **158**: 1071-83.）。従って、MexXYの阻害剤の開発により、アミノグリコシド系薬をより低濃度で使用する事ができる。

MexXY-OprMは、ペリプラズム融合タンパク質MexX、内膜成分MexY、外膜成分のOprMから構築されている（Nikaido H et al., *Biochim Biophys Acta.* 2009; **1794**: 769-81.、Blair JM et al., *Curr Opin Microbiol.* 2009; **12**: 512-9.）。MexYは、基質選択やポンプの駆動力において重要な役割を持っている。

Escherichia coli (大腸菌) にはRND型薬剤排出ポンプAcrBが発現しており、AcrBについては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 (Sulavik MC et al., *Agents Chemother.* 2001; **45**: 1126–36)。AcrBはアミノグリコシド系薬を排出する機能は持たないが、MexYと生化学的に対応する構造・機能を持っており、MexYの解析にはAcrBの構造を基盤として予測したモデルタンパク質が用いられている (Lau CH et al., *MBio.* 2014; **5**: e01068.)。予測されたMexYの構造を用いた研究で、オウレン・オウバクに含まれる生薬成分のベルベリンがMexYと高い親和性を持つことが報告された (Laudadio E et al., *J Nat Prod.* 2019; **82**:1935-44.)。

我々は、これまでの研究で、ベルベリンがMexXY系を阻害し、緑膿菌のアミノグリコシド系薬耐性を阻害することを見出した (Morita Y et al., *Front Microbiol.* 2016; **7**: 1223.)。RND型多剤排出ポンプの阻害剤については様々な報告 (Adis, *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria*, ISBN 978-3-319-39656-9, 2016, Chapter 29) があるが、未だ臨床適応できるものはない。ベルベリンはMexXY系依存的にアミノグリコシド系薬耐性を阻害する最初の例であるが、最適併用濃度が512 µg/mL以上と高くこのままでは臨床応用できない。我々は、ベルベリンに化学修飾を行い、強力なMexXY系阻害作用を持つベルベリン誘導体を合成し、その分子機構を明らかにすることを試みた。

【方法】

この研究で使用した大腸菌、緑膿菌、*Achromobacter xylosoxidans*、および *Burkholderia cepacia* の培養は、Luria (L) 液体培地もしくはL寒天培地(1.5%)を用いて 37°C で培養した。また、プラスミド pYM101 およびその誘導体を持つ大腸菌はテトラサイクリン 5 µg/mL を加えた L 寒天培地もしくは、テトラサイクリンを 2.5 µg/mL 添加した L 液体培地で維持した (Morita Y et al, *J*

Microbiol Methods. 2010; **82**: 205-13.). ベルベリン誘導体の合成は Liu らの方法で行った (Liu H et al., *ChemMedChem*. 2014; **9**: 207-16.). 合成した化合物の構造は、GC-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR により決定した。緑膿菌、*A. xylosoxidans*、*B. cepacia* の抗菌薬の感受性を測定する場合、カチオン調整 Mueller-Hinton 培地を用い、微量液体希釈法を用いて評価した (Morita Y et al., *Front Microbiol*. 2016; **7**: 1223.). 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、緑膿菌の場合 37°C で約 18~22 時間培養で行った。ベルベリン誘導体による耐性阻害作用を評価する場合、緑膿菌 PAO1 株より MexXY 系以外の 4 つの薬剤耐性に関与するとされる薬剤排出ポンプを欠損させ、MexXY 系のリプレッサー遺伝子を欠損させることで MexXY 系を過剰発現させた PAGU[§]1927 と PAGU[§]1927 から MexXY 系も欠損させた PAGU[§]1931 の 2 株を用いた (Morita Y et al., *Front Microbiol*. 2016; **7**: 1223.). また、ベルベリン誘導体の併用濃度は単剤の MIC 値の 1/2 以下の濃度とした。*A. xylosoxidans*、*B. cepacia* の培養は、35°C で約 20 時間培養とした。ゲンタマイシンの殺菌曲線は、緑膿菌より MexXY 系以外の薬剤排出ポンプを 4 種類欠損させた PAGU[§]1929 と更に MexXY 系も欠損させた PAGU[§]1933 を用いて測定した。

PAO1 の持つ MexY のアミノ酸配列より分子モデルを作成した (Lau CH et al., *MBio*. 2014; **5**: e01068.). MexY の分子モデルの薬剤結合ポケットでアミカシンもしくはベルベリンの結合を算出した。その計算に基づき、PAGU[§]1931 より MexY 変異体を構築した。構築した菌株にアミノグリコシド系薬単剤もしくはベルベリン併用下で MIC 値を測定し、MexY 変異体による感受性の変化を調べた。

【結果】

ベルベリン誘導体は 11 種類合成した。11 種の誘導体は PAGU[®]1927 に対して 128～512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC 値であった。また、PAGU[®]1931 に対しては 64～256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。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、PAGU[®]1927 と PAGU[®]1931 に対

するゲンタマイシンの MIC 値を測定した (表 1)。PAGU[®]1927 ではゲンタマイシン単剤の MIC 値が 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、ゲンタマイシンの MIC 値が 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になった。ベルベリンより強いゲンタマイシン耐性阻害作用を持っていたベルベリン誘導体は 5 種類存在した。その中で最も強く耐性を阻害した化合物は、13-(2-Methylbenzyl)berberine (13-o-MBB) であり、ゲンタマイシンの MIC 値が 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、ベルベリンの 8 倍のゲンタマイシン耐性阻害作用があった。この作用は MexXY 系の発現していない PAGU[®]1931 では確認されなかった。一方、13-o-MBB の位置異性体である 13-(3-Methylbenzyl)berberine と 13-(4-Methylbenzyl)berberine にベルベリン以上のゲンタマイシン耐性阻害作用が認められなかった。

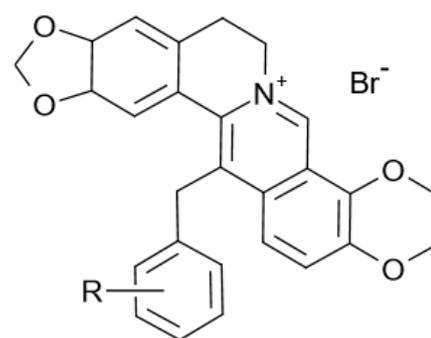


図 1. 合成したベルベリン誘導体

表 1. ベルベリン誘導体併用によるゲンタマイシン耐性の阻害

Concomitant Drug	-R	Gentamicin MIC with berberine derivative (µg/mL)											
		PAGU [§] 1927						PAGU [§] 1931					
		256*	128	64	32	16	8	256	128	64	32	16	8
Ber	-	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

*: 薬剤の併用濃度 (µg/mL)

13-*o*-MBB とその位置異性体がゲンタマイシン以外の薬剤の感受性を変化させるか、PAGU[§]1927 と PAGU[§]1931 を用いて調べた。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ベルベリンの2~4倍強く阻害した。一方、13-*o*-MBB の位置異性体は、ベルベリン以上に薬剤耐性を阻害することはなかった。緑膿菌臨床株である S1 株とその MexXY 欠損株で 13-*o*-MBB による感受性の変化を測定した。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 13-*o*-MBB はベルベリンより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なかった。さらに、PAO1、アミノグリコシド系薬に耐性を持つ緑膿菌臨床株、*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。これらの菌株に対しても 13-*o*-MBB はアミノグリコシド系薬の感受性を増大させた。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。13-o-MBB もしくはベルベリンの併用によるゲンタマイシンの殺菌作用の変化を PAGU[®]1929 と 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 100 倍ほど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 7000 倍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感受性の変化は見られなかった。

アミカシンもしくはベルベリンの MexY との結合部位を分子モデリングシミュレーションソフトウェア AutoDock Vina (Trott O et al., *J Comput Chem.* 2010; **31**: 455-61.) で予測した (図 2、3)。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間に結合している結果が予測された。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近位ポケット側に寄っており、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。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 (Nakashima R et al., *Nature.* 2011; **480**: 565-9, Lau CH et al., *MBio.* 2014; **5**: e01068.)。さらにアミカシン、ベルベリンどちらの結合部位も MexXY 系によるアミノグリコシド系薬の排出に重要だという報告 (Lau CH et al., *MBio.* 2014; **5**: e01068.) のあるアミノ酸残基 Y613 が存在した。

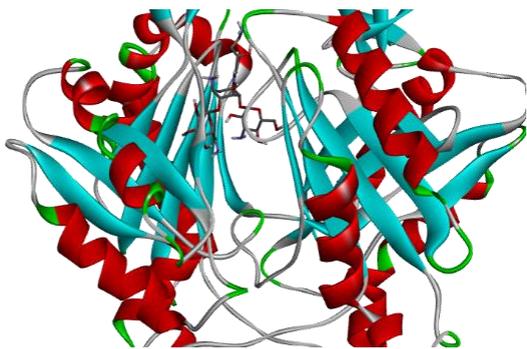


図 2. MexY とアミカシンの結合

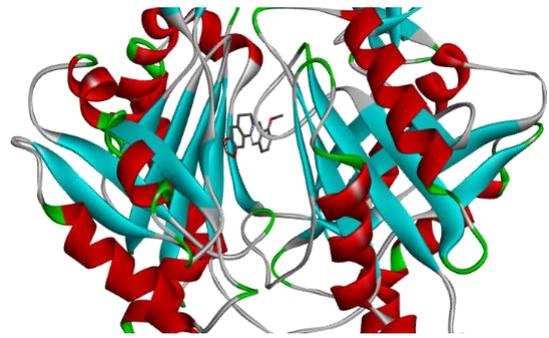


図 3. MexY とベルベリンの結合

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に組み込み、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 (表 2)、D133S の変異を持つ緑膿菌は 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。

表 2. アミノグリコシド系薬とベルベリン誘導体の作用の変化

MexY property	MIC of aminoglycoside (µg/mL)					
	Amikacin			Gentamicin		
	-	Ber	13-o-MBB	-	Ber	13-o-MBB
-	1	0.5	0.5	0.25	0.125	0.125
Wt	4	4	1	4	2	1
D133S	1	0.5	0.5	0.25	0.125	0.125
Y613A	2	2	1	1	1	1
Y613F	4	4	1	4	2	1
D615A	2	2	1	1	0.5	0.25
D668A	1	1	1	1	1	0.5

Wt: 野生型

【考察】

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た。一方、13-*o*-MBB の位置異性体の MexXY 系依存的薬剤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。

MexY に Y613F の変異を持つ緑膿菌の抗菌耐性は MexY 野生株と同じだった。D668 もしくは D615 の変異によりアミノグリコシド系薬の耐性が減少したことから 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。MexY のアミノ酸残基 D668 と Y613 の変異でアミノグリコシド系薬の耐性とベルベリン及び 13-*o*-MBB の効果が減弱したことから、ベルベリン誘導体による MexXY 系依存的アミノグリコシド系薬耐性阻害作用は、MexY とアミノグリコシド系薬の結合部位と同じ残基に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。また、これら 2 つの残基は、どちらも負電荷をもつため、アミノグリコシド系薬の持つ正電荷と相互作用をしている可能性が考察された。ベルベリン及び 13-*o*-MBB も構造中に正電荷を持っており、MexY のアミノ酸残基 D668 に含まれる負電荷との静電的相互作用により、MexY を阻害していることが推察された。

ベルベリンの 13 位へ置換基を持つベンジル基を導入することは MexXY 系阻害薬探索の有用なアプローチであり、*o* 位にメチル基を持つベンジル基を導入した 13-*o*-MBB は MexY を阻害することでベルベリンよりも強くアミノグリコシド系薬の耐性を阻害することが明らかになった。