

第 54 回 日本細菌学会 – ベルベリンの緑膿菌 MexXY アミノ

グリコシド排出系阻害作用の増強と分子メカニズム

○小谷謙太¹、森田雄二¹、富田純子¹、西野邦彦²、河村好章¹

¹愛知学院大学薬学部微生物学講座、²大阪大学産業科学研究所

【概要】

2017 年 10 月、名古屋大学で開催された「第 54 回 日本細菌学会」に参加し、以下の研究内容を口頭発表した。

【緒言】

抗菌薬のほとんど効かない多剤耐性緑膿菌の出現が問題となっている。その薬剤耐性の主因の一つに、多剤排出ポンプが挙げられる。我々は、我が国で分離された典型的な高度多剤耐性緑膿菌に対し、オウレン・オウバクの成分ベルベリンがアミノグリコシド系薬の感受性増大作用を示すことを見出した。その作用機序は、緑膿菌の RND 型多剤排出ポンプ MexXY-OprM 阻害であった。しかし、ベルベリンの MexXY 系阻害作用の最適濃度は、128~512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり高すぎる。また、ベルベリンの MexXY 系阻害の分子メカニズムは解明されていない。誘導体の有機合成によるベルベリンの MexXY 系阻害作用の増強と分子メカニズムの解明を目的に本研究を行った。

【方法】

ベルベリンの 13 位に様々な置換基をもつベンジル基を導入し、ベルベリン誘導体を構築した。微量液体稀釈法を用いて、ベルベリン誘導体併用下でアミノグリコシド系

薬の最小発育阻止濃度(MIC)を測定し、ベルベリン誘導体の MexXY 系阻害作用を評価した。MexY のホモログである大腸菌の AcrB の結晶構造から、SWISS-MODEL を用いて MexY の分子モデルを構築した。AutoDockVina を用いて、MexY の分子モデルとアミカシンまたはベルベリンの結晶構造とドッキングシミュレーションした。部位特異的導入により MexY の変異体を構築した。MexY 変異体の膜発現は、ウエスタン法により確認した。

【結果】

緑膿菌遺伝子組み換え体を用いて、ベルベリン誘導体併用下でゲンタマイシンの MIC を測定することで MexXY 系阻害作用を評価した結果、13 位に *o*-メチルをもつベンジル基を導入したベルベリン誘導体 13-*o*-methylbenzylberberine (13-*o*-MBB) は、ベルベリンと比較し 16 倍程度亢進した。また、その他に、*m*-位、*p*-位への置換基の導入した誘導体、置換基を二箇所を導入した誘導体、電子吸引基を導入した誘導体なども MexXY 阻害作用を評価したが、13-*o*-MBB が最も大きな MexXY 阻害作用を示した。更に、ベルベリン及び 13-*o*-MBB 併用下で MexY の基質である様々な薬剤で MIC を測定した結果、13-*o*-MBB はベルベリンと比

較して 2~4 倍アミカシン、カナマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、セフェピム、シプロフロキサシンの感受性の増大作用を示した。

緑膿菌臨床株や MexY orthlogue を持つ類縁菌基準株でベルベリンおよび 13-*o*-MBB を併用し、アミカシンの MIC を測定した結果、緑膿菌臨床株だけでなく MexY orthlogue を持つ類縁菌基準株においても、アミカシンの感受性がベルベリンで 2~4 倍、13-*o*-MBB で 4~8 倍以上増大した。低分子とタンパク質ドッキングシュミレーションの結果、多剤基質認識部位の中の近位ポケットと遠位ポケットの中間に存在するループ付近の空間にベルベリン及びアミカシンが結合していると算出された。MexY 変異体 Y613A、D615A、D668A の緑膿菌遺伝子組み換え体は、野生型の MexY と比べ、アミカシンとゲンタマイシンの感受性が 2~4 倍増大した。更に Y613A、D668A の MexY 変異体の緑膿菌遺伝子組み換え体は、ベルベリンや 13-*o*-MBB のアミカシンとゲンタマイシンの薬感受性増大がほとんど観察されなかった。更に、ノルフロキサシンとシプロフロキサシンでも抗菌活性を測定したところ、野生型の MexY と MexY 変異体の緑膿菌遺伝子組み換え体の MIC に変化がなかった。また、ベルベリンまたは 13-*o*-MBB を併用した結果、2~4 倍ノルフロキサシンとシプロフロキサシンの感受性が増大した。

【考察】

ベルベリン及び 13-*o*-MBB は、アミカシン及びゲンタマイシンの MexY との結合を Y613 付近で競合阻害している可能性が示唆された。加えて MexY のアミノ酸残基の近くにある D615 と D668 は酸性残基であるため、アミカシンとベルベリンの窒素原子の正電荷とイオン結合する可能性が考えられた。一方、ノルフロキサシン及びシプロフロキサシンとベルベリン及び 13-*o*-MBB は、MexY のアミノ酸残基 Y613A、D615A、D668A 以外の残基との相互作用でキノロン系抗菌薬の感受性を増大させていることが示唆された。今後、13-*o*-MBB のベンジル基に結合した *o*-メチル基による MexY 阻害増強の分子メカニズムを明らかにしたい。

【感想】

第 54 回 日本細菌学会は、学会の中でも特にアカデミックな内容が多く、より細かな研究の世界を知れて非常に勉強になりました。どの演題も興味深く刺激的でしたが、学会の運営などのディスカッションもあり、学会を運営することの難しさや本学会の特性を知ることができ、これも非常に勉強になりました。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。