

## 多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性を阻害するリード化合物の作用機序と最適化を指向した構造・機能相関に関する研究

研究代表者：森田雄二

研究分担者：安池修之、松村実生、川寄達也

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、病原性は低いが、菌交代症や日和見感染を起こし、院内感染の原因菌となる。緑膿菌感染症に使用される3系統 ( $\beta$ -ラクタム、フルオロキノロン、アミノ配糖体) の抗緑膿菌薬に耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌は、院内感染対策上問題となる。

我々は多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性を阻害する天然物を探索したところ、resistance nodulation cell division (RND) 型多剤排出系 MexXY に依存してアミノ配糖体耐性を阻害する天然物としてオウレンやオウバクの主要成分であるイソキノリンアルカロイドであるベルベリンが得られた。ベルベリンは主要な RND 型多剤排出系の欠損した緑膿菌変異株においてアミノ配糖体だけでなくマクロライド系薬や  $\beta$ -ラクタム系薬であるセフェピムなどの耐性も MexXY 依存的に阻害した。

今回、ベルベリンの MexXY 阻害作用メカニズムを解析した。またベルベリンの13位に様々なベンジル側鎖を導入した誘導体を合成し、ベルベリンより強い MexXY 阻害活性をもつ化合物を探索した。

### 1. MexXY 阻害作用のメカニズム

ベルベリンの MexXY 阻害作用のメカニズムを解明するため、最小発育阻止濃度におけるベルベリンとゲンタマイシンの併用作用を fractional inhibitory concentration (FIC) index により評価した。その結果、ベルベリンは、ゲンタマイシンと相乗的に作用して MexXY 阻害作用を示すことが分かった。また大腸菌細胞を用いて MexXY のベルベリン排出活性を測定したところ、MexXY のベルベリン排出活性は、ゲンタマイシンにより濃度依存的に阻害された。大腸菌の主要な多剤排出ポンプ AcrB の結晶構造を参考に、MexY の分子モデルを構築した。分子モデルからもベルベリンとゲンタマイシンの相互作用が確認された。(実施者：森田、川寄)

### 2. ベルベリン誘導体の合成と MexXY 阻害活性と抗菌活性

ベルベリン塩酸塩を水酸化ホウ素ナトリウムで還元したのち、ヨウ化カリウム存在下、種々のベンジルプロミド誘導体を作用させ13位に各種のベンジル側鎖の導入を検討した。その結果、新規化合物6種を含めて計12種類

の誘導体を系統的に合成することができた。得られた化合物群のうち、5種類はベルベリンより強い MexXY 阻害活性を示した。特にベンジル基の側鎖として *o*-methyl 基を置換基として導入したものは、ベルベリンより16倍強い活性を示した。これは、*p*-methyl 基や *m*-methyl 基を置換基とした場合には観察されなかったことから、MexXY 阻害活性増強の原因は単純な疎水性の増大でないと考えられた。興味深いことに *o*-phenyl 基を置換基として導入したものは、メチシリン黄色ブドウ球菌 (MRSA) や主要な多剤排出ポンプを欠損した緑膿菌に強い抗菌活性を示した。(実施者：森田、安池、松村)

今後さらにベルベリン誘導体の MexXY 阻害作用を分子レベルで解明し、創薬を目指した基礎研究を展開したい。

本研究成果は、多剤耐性グラム陰性菌感染症を克服する上で、基礎的知見になると考えられる。最後になりましたが、医療薬学生命研究所に深く感謝申し上げます。

## 研究成果

### 論文発表

#### 1. Yuji Morita, et al.

Berberine is a novel type efflux inhibitor which attenuates the MexXY-mediated aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.  
Front Microbiol (2016), 7(1223): 1-10  
doi: 10.3389/fmicb.2016.01223

### 学会発表

#### 1. 森田雄二、楠亜佳音、小嶋悠希ら

多剤耐性緑膿菌の RND 型多剤排出トランスポーター MexXY 阻害剤の探索  
第9回 トランスポーター研究会年会、名古屋、平成26年6月

#### 2. 森田雄二、富田純子、河村好章

排出ポンプ阻害による多剤耐性緑膿菌の抗菌薬耐性軽減  
第26回微生物シンポジウム、東京、平成26年9月

#### 3. 森田雄二、中島健一、富田純子ら

- 多剤耐性緑膿菌の排出系阻害作用を有する天然物  
第49回緑膿菌感染症研究会、  
東京、平成27年2月
4. 森田雄二、中島健一、富田純子ら  
多剤耐性緑膿菌に対する生薬由来抗菌薬耐性軽減薬の探索  
日本薬学会 第135年会、  
神戸、平成27年3月
5. 森田雄二、深谷詩織、小谷謙太ら  
バルベリンは緑膿菌のMexXY多剤排出系依存的なアミノ配糖体耐性を相乗的に阻害する  
第27回微生物シンポジウム、岡山、平成27年9月
6. 森田雄二、富田純子、河村好章  
緑膿菌の多剤排出系MexXYに関する研究  
第52回日本細菌学会中部支部総会、  
名古屋、平成27年10月
7. 森田雄二、深谷詩織、小谷謙太ら  
バルベリンとアミノ配糖体の緑膿菌に対する多剤排出系MexXY依存的な相乗作用  
日本薬学会第136年会、  
横浜、平成28年3月
8. 小谷謙太、森田雄二、松村実生、富田純子、安池修之、河村好章  
バルベリン誘導体による*Pseudomonas aeruginosa* 多剤排出系MexXYの阻害活性  
第62回日本薬学会東海支部大会、  
名古屋、平成28年7月
9. 小谷謙太、森田雄二、松村実生、富田純子、安池修之、河村好章  
バルベリン誘導体の緑膿菌MexXY多剤排出系阻害活性と抗MRSA活性  
第28回微生物シンポジウム、名古屋、平成28年9月