The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	新規な抗多剤耐性菌剤創出のための基盤技術に関する研究
Author(s)	山近, 伸一郎
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34393
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　山近　伸一郎　）	
論文題名	新規な抗多剤耐性菌剤創出のための基盤技術に関する研究

論文内容の要旨

今日の臨床現場において、既存の抗菌剤に対して耐性を獲得した“多剤耐性菌”が出現し、深刻な問題となっている。特に、病院内での感染を介して発症する院内感染症においては、主要起因菌である緑膿菌および黄色ブドウ球菌の多剤耐性化に対する新しい治療オプションが望まれている。その問題の解決を目指し、多くの製薬企業は、主に幅広い菌種に有効な抗菌化合物に注目し、様々な研究を進めてきた。しかしながら、院内感染症の場合、治療の過程で原因菌が同定されることが多く、ある原因菌にのみ有効な抗菌剤もまた有望な治療剤となり得る。本研究では、臨床で大きな問題となっている多剤耐性緑膿菌ならびに黄色ブドウ球菌、それぞれに有効な新規作用機作の抗菌剤創出を目指し、その実現のための基盤技術について研究を進めた。

緑膿菌は、外膜と内膜の二層構造による異物流入阻止能ならびに豊富な異物排出ポンプによる高い排出能を有している。この特性のために、有望な標的を強く*in vitro*で阻害する化合物でさえ、十分な抗菌活性を示すことができない。また、この特性を回避するための合成展開も非常に難しいと考えられている。それ故に、緑膿菌感染症を指向し得る化合物は、これらの特性を回避できる性質を予め有している必要がある。このような性質を有する化合物を選抜するには、緑膿菌を用いた抗菌活性スクリーニングが最善の方策と考えられた。そこでまず、当該スクリーニングを実施し、50,000種以上の化合物から、新規の抗緑膿菌薬となり得る複数の候補化合物を獲得した。その中で特に強い抗緑膿菌活性を示し、且つ標的候補を他の知見を基に絞れる可能性が高かったCompound Aについて、更に評価を進めた。その結果、当該化合物は、異物排出ポンプの影響を受けず、球形化作用ならびに静菌的な作用を有する化合物であることが明らかとなった。また、既知情報を参考にしたCompound A耐性菌の変異解析ならびに主薬理作用の結果を基に、当該化合物の標的がヒトアクチンホモログであるMreB蛋白質である可能性が高いことを示した。この結果は、本章で選抜した抗緑膿菌化合物セットに有望な化合物が含まれることを示している。つまり、当該セットから、新たな抗多剤耐性緑膿菌剤を創出させる基盤となり得るものであると考えられる。

残念ながら、抗緑膿菌化合物セットのほとんどの化合物については、標的候補の絞込みができない。これら化合物の標的を推察できることができれば、化合物の特異性の保証、ならびに標的阻害試験系を活用した効率的な合成展開の推進が可能となる。そこで、次に標的予測を可能にする基盤技術の研究を開始した。今日、標的予測の一つの手段として、耐性菌の変異箇所同定が知られている。しかしながら、多くの菌種において標的変異株の獲得率が低いことから、効率的な変異箇所同定は困難である。そこで、抗菌化合物に対する感受性が緑膿菌と類似している大腸菌を用いて、標的変異の入った耐性菌を高確率で獲得できる有用な株の創出を目指した。まず、そのような特性を示す可能性が高い株として、異物排出ポンプ構成因子TolCおよび修復因子MutSのコード遺伝子を欠損させた株（Δ*mutS*Δ*tolC*株）を考え、作製した。次に、キノロン系抗菌剤（シプロフロキサシン）に対する耐性菌出現性を解析したところ、当該株は想定通りに、標的（DNAジャイレースのGyrAサブユニット）変異を有する耐性菌を、高い頻度で出現させることを明らかにした。更に、Δ*mutS*Δ*tolC*株は、未だ報告の無いカルバペネム系抗菌剤であるメロペネムの標的（PBP2）変異株でさえ容易に獲得させる株であった。すなわち、Δ*mutS*Δ*tolC*株は、複数の標的を阻害する抗菌剤（キノロンおよびカルバペネム）の場合でも、標的変異耐性菌を高頻度で出現させる、期待通りの株であった。今後、当該株ならびに次世代シークエンス解析を活用した標的変異解析により、抗緑膿菌化合物の標的同定を実現させ、新規の抗多剤耐性緑膿菌剤の創出を実現できると考える。また、主に院内感染症治療に用いられているカルバペネム系抗菌剤のうち、1位にメチル基を有するもののみPBP2の547番目のアミノ酸変異の影響を受ける興味深い知見も得た。

一方、黄色ブドウ球菌に対する低分子化合物の菌体内貯留性は、緑膿菌のそれに比べて高い。また、抗菌活性を指標にする場合、外膜の性質から脂溶性の高い化合物ばかり濃縮される可能性が高い。それ故に、有望な標的候補を見出した後に、その阻害化合物を見出すことが最善のアプローチであると考えられる。そこで、未だ十分な解析がされ

ていない黄色ブドウ球菌の機能未知遺伝子に着目し、その増殖必須性を評価するためのPlasmid Integration（PI）試験系を考案した。当該試験系は、相同組換えに基づくPIにより生じる対象遺伝子の不活化体の増殖能を、コロニー形成能評価およびゲノムPCR解析を通じて、簡便に且つ信頼性高く評価する系である。既知の必須遺伝子（*gyrA*および*mvaD*）ならびに非必須遺伝子（*sigB*および*hla*）を用いて、このPI試験系の有用性を検証した結果、非必須遺伝子でのみPIが起こる現象を想定通り確認した。次いで、機能未知で菌種間で保存されたconserved hypothetical proteinコード113遺伝子について、それらの黄色ブドウ球菌での必須性をPI試験系により評価した。その結果、28の必須遺伝子を同定した。しかしながら、同定した遺伝子の機能を予測することは非常に難しい。その解決策の一つとして、PI試験系の応用を考案した。この試験系は、評価対象遺伝子の不活化により増殖能を消失した菌株に、再び増殖能を付与する機能既知遺伝子を同定することで、対象遺伝子の機能を予測する系である。当該試験系により、本研究で必須と判定されたSA0865遺伝子を、ヒトのNADキナーゼ遺伝子が相補することを明らかにした。すなわち、SA0865蛋白質は、黄色ブドウ球菌のNADキナーゼであることが示された。

以上の研究を通じて、院内感染症で問題となっている多剤耐性菌に対して有効な新規抗菌剤を創出するためのシーズおよびプラットフォームを構築した。獲得・構築した抗緑膿菌化合物セット、MreB阻害化合物、ならびにΔ*mutS*Δ*tolC*株は、抗多剤耐性緑膿菌剤の新規創出に繋がるものである。一方、整備した黄色ブドウ球菌の増殖必須遺伝子リスト、ならびに遺伝子の増殖必須性解析および機能予測を可能にするPI試験系は、抗多剤耐性黄色ブドウ球菌剤の新規創出に繋がるものである。これら基盤は、将来的に継続的な抗多剤耐性菌剤創出に繋がり、院内感染症の主要の耐性菌問題の根治へ貢献するものと考える。また、Δ*mutS*Δ*tolC*株およびPI試験系の原理は、両菌種に限らず幅広く活用可能なものであり、多菌種に対する新規抗菌剤の創出、且つ細菌の分子メカニズム解析にも今後大きく貢献するものである。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　山近　伸一郎　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	那須　正夫
	副 査	教授	八木　清仁
	副 査	教授	平田　收正
	副 査	教授	高木　達也

論文審査の結果の要旨

これまでに様々な抗菌剤が創出され、細菌感染症の多くが克服された。しかしながら、抗菌剤の乱用により多剤耐性菌が出現し、今日の臨床現場において深刻な問題を引き起こしている。本研究は、院内感染において主要な起因菌である多剤耐性緑膿菌および黄色ブドウ球菌のそれぞれに有効な新規作用機作の抗菌剤創出を目指し、その実現のための基盤技術を作成したものである。

まず、緑膿菌株を用いた抗菌活性スクリーニングによって、新規の標的阻害活性および菌体内貯留性能を有する可能性の高い化合物セットを構築した。次に、抗緑膿菌化合物の標的予測を可能にする基盤技術として、修復因子MutSおよび異物排出ポンプ構成因子TolCのコード遺伝子を欠損させた大腸菌株（*ΔmutSΔtolC*株）を作製し、既知抗緑膿菌剤に対する標的変異耐性菌を高確率で獲得できる有用な株であることを示した。さらに、抗黄色ブドウ球菌剤創出に向けてPlasmid Integration（PI）試験系を考案・構築することにより、機能未知であった113の遺伝子から28の増殖必須遺伝子を同定するとともに、本法により有望な標的蛋白質を見出せることを示した。

以上の様に、本研究では院内感染症で問題となっている多剤耐性菌に対して有効な新規抗菌剤を創出するためのシーズおよびプラットフォームを構築した。また、*ΔmutSΔtolC*株およびPI試験系の原理は、緑膿菌や黄色ブドウ球菌に限らず幅広い菌種で活用可能であり、他菌種での新規抗菌剤の創出や薬剤耐性獲得の分子メカニズム解析にも貢献するものである。よって本論文は、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。