



Title	黄色ぶどう球菌テトラサイクリン排出蛋白Tet(K)分子構造の解明と阻害剤の探索
Author(s)	平田, 隆弘
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41117
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	平田 隆弘
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第14795号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	黄色ぶどう球菌テトラサイクリン排出蛋白Tet(K)分子構造の解明と阻害剤の探索
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人
	(副査) 教授 前田 正知 教授 馬場 明道 教授 真弓 忠範

論文内容の要旨

薬剤排出による抗菌剤耐性は、1980年 Levy らがテトラサイクリン (TC) で初めて明確に示した。現在ではキノロン剤、マクロライド剤など他の薬剤でも発見され、また緑膿菌においては内在性多剤排出ポンプの報告もあり、排出メカニズムの解明は重要課題である。本研究では黄色ぶどう球菌の TC 排出蛋白 Tet (K) を用いた。Tet (K) はメチシリン耐性黄色ぶどう球菌 (MRSA) にも検出され、多剤耐性を示す MRSA の TC 耐性の原因のひとつである。Tet (K) は、グラム陰性菌にみられる Tet (B), Tet (C) などと比較すると、TC・二価金属錯体と H⁺とのアンチポーターという輸送機構が共通だが、ハイドロパシー解析でそれぞれ14回、12回の異なる膜貫通構造が推定されている。後者の12回膜貫通構造はほぼ確立されているが、Tet (K) での研究は遅れておりその解明を試みた。

ループの局在性を調べるレポーター酵素としてシグナルペプチドを除去した β -lactamase (Amp) および chloramphenicol acetyltransferase (Cat) を用いた。Tet (K) 分子の推定各親水性ループにレポーター酵素を融合させるプラスミドを計32種構築した。Amp 融合株は、 β -ラクタム剤の作用点の PBP があるペリプラズム側に融合位置がある場合にアンピシリン (APC) 耐性を示す。逆に Cat 融合株は、基質アセチル CoA が細胞内に存在するため、細胞質側に融合位置がある場合にクロラムフェニコール (CP) 耐性を示す。control 株に対する APC の MIC は 4 μ g/ml に対し、Tet (K) の 48, 106, 218, 224, 292 および 346 の Amp 融合 6 株では 10-20 倍耐性が上昇した。一方、82, 111, 140, 169, 255, 323, 383, 433 および 459 位の Amp 融合 9 株では control と同じだった。201 位融合は 10 μ g/ml と中間的な耐性上昇を示した。Cat 融合株は原理的に Amp 融合株と逆の挙動を示す。control 株に対する CP の MIC は APC と同じ 4 μ g/ml だった。APC 耐性を示した 6 株と同じ位置に Cat を融合した株では、control 株と同じ MIC だった。一方、Amp 融合株で APC 耐性が変化しない 9 株と同じ位置に Cat を融合した場合は、6-10 μ g/ml で、1.5-2.5 倍の CP 耐性上昇を示した。以上の結果は前者 6 株の融合位置が細胞質膜外側、後者 9 株の融合位置が内側に配向していることを示している。201 位融合株のみ中等度の APC 耐性上昇が認められたが、CP でも 12 μ g/ml という最高の耐性上昇が認められたので、この位置は細胞膜の内側にあると考えると10回膜貫通モデルが導かれた。レポーター酵素融合法は一般的なトポロジー決定法だが、融合位置以降が除かれたトポロジーがもとの構造を反映しない場合がある。Tet (C) やラクトース輸送体で融合位置直前の膜貫通領域内に荷電アミノ酸が存在すると本来外側にあった融合位置でもレポーター酵素の膜透過が阻止され細胞質内に留まることが報告されている。そこで 169 位および 433 位直前疎水性領域内の Glu152 と Glu397 を Ala に置換した融合蛋白を作成し解析した。その結果 169

位および433位の Amp 融合蛋白で APC 耐性がそれぞれ $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ と上昇した。これは Glu の存在が Amp の膜透過を阻止したと考えられた。この結果を考慮して14回膜貫通トポロジーが導かれた。レポーター酵素融合法の特性を考慮したこの構造が確からしいと考えている。

次に *tet (K)* 遺伝子をもつ TC 耐性 MRSA 株 *Staphylococcus aureus* 743を用いて TC 排出ポンプ阻害剤のスクリーニングを行った。本株の $[^3\text{H}]\text{-TC}$ 菌体内濃度は外部濃度に近い低い濃度で、排出による耐性と考えられた。TC の輸送を拮抗的に阻害すると考えられるミノサイクリンを添加すると菌体内 TC 濃度が著しく上昇した。同様に菌体内 TC 量を増加させる化合物をスクリーニングし Ro07-3149を得た。脱共役剤は排出活性を阻害するかもしれないが、同時に TC のエネルギー依存的菌体内蓄積も阻害するため本スクリーニング系では検出されない。このようなエネルギー阻害剤を除ける点も本法の利点である。従って Ro07-3149は脱共役作用を持たない阻害剤と考えられた。Ro07-3149は、743株に対して MIC $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ の比較的弱い抗菌活性を示したが、その4分の1濃度の $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で TC の MIC 値を $64 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ に半減させ弱い抗菌併用効果を示した。Tet (K) 活性の阻害機序を解析するために *tet (K)* 発現大腸菌から反転膜 (ISO) ベシクルを調製し、*in vitro* で $[^3\text{H}]$ -TC 輸送活性に対する Ro07-3149 の作用を調べた。Tet (K) による TC の輸送は ΔpH に依存していた。 ΔpH の形成は $[^{14}\text{C}]$ -メチルアミンの取り込みで調べた。Ro07-3149は、ベシクル内蛋白質で標準化した値で、 $0.92 \mu\text{mole}/\text{mg protein}$ ($650 \mu\text{M}$) の濃度まで ΔpH 形成を阻害しなかったが、 $0.25 \mu\text{mole}/\text{mg protein}$ で TC 輸送を 50% 阻害した。すなわち膜エネルギーの形成を阻害せずに TC 輸送のみを阻害したと考えられる。これはキナクリンの蛍光を利用した H^+ 移動の測定でも示された。ISO ベシクルに NADH を加えると呼吸鎖が働いて H^+ を取り込み内部 pH が低下する。同時にキナクリンも取り込まれて蛍光が消光する。さらに TC を加えると TC 取り込みと共に H^+ 排出が起こり、キナクリン蛍光が部分的に回復する。 $41 \mu\text{M}$ の Ro07-3149は NADH 依存の蛍光消光を阻害せずに TC 依存の蛍光回復のみ阻害した。すなわち ΔpH 形成を阻害せずに TC 輸送と共に H^+ 排出のみ阻害したと考えられる。この阻害の IC_{50} 値は $0.43 \mu\text{mole}/\text{mg protein}$ であり、 $[^3\text{H}]$ -TC 輸送活性測定法から得た $0.25 \mu\text{mole}/\text{mg protein}$ と近い値だった。高濃度の Ro07-3149は ΔpH にも影響を与えたが、その IC_{50} 値は $7.3 \mu\text{mole}/\text{mg protein}$ で、TC 輸送と共に H^+ 排出阻害より 17 倍高い濃度を必要としたので Ro07-3149は Tet (K) 選択的な阻害剤であるといえた。酵素反応速度論的に非拮抗阻害を示し、Tet (K) 上の結合部位は TC 結合部位とは異なると示唆された。Ki 値は $0.32 \mu\text{mole}/\text{mg protein}$ だった。このような阻害剤の作用の解明も実際の治療応用への期待と同時に、将来的な分子排出メカニズムの解析に対して有用な情報を与えるものと考える。

論文審査の結果の要旨

最近、薬剤排出蛋白を始めとする異物排出蛋白が、高等動物でも細菌でも抗生物質や化学療法剤の耐性因子として注目されてきている。テトラサイクリン排出蛋白は最も早く同定された薬剤排出蛋白であり、グラム陰性細菌のテトラサイクリン排出蛋白は、薬剤排出蛋白研究のモデル系として研究が進んでいる。本論文で取り扱っている Tet (K) はグラム陽性細菌のテトラサイクリン排出蛋白であり、臨床感染で話題になった多剤耐性黄色ブドウ球菌のテトラサイクリン耐性因子である。グラム陽性細菌のものと全く同じく、テトラサイクリン 2 倍カチオンキレート体をプロトンとの 1 : 1 交換で排出するアンチポーターであるが、アミノ酸配列のハイドロパシー解析から推定されるトポロジーは、14回膜貫通型であり、グラム陰性細菌の12回とは異なっている。そこで、本論文ではまず、レポーター蛋白融合法を用いて、実験的に Tet (K) のトポロジーを決定した。その結果、確かに14回膜貫通型構造であることがはじめて証明された。次に、Tet (K) に対する阻害剤の探索と、阻害機構の解明を行った。細菌の薬剤排出蛋白の有効な阻害剤が開発されるならば、これらに起因する耐性の克服に決定的に有効であるとは言うまでもないことがある。しかし、今まで、細菌薬剤排出蛋白に特異的な阻害剤は発見されていない。本論文では、まず、排出蛋白阻害剤のスクリーニング法を確立し、それを用いてトリメチルインダン誘導体の一つが阻害剤として有効であることを見いだした。この阻害剤は、膜のエネルギー共役に影響を与えることなく、テトラサイクリンの排出だけを阻害することがわかった。

本研究は、細菌の新しい薬剤耐性の克服という社会的に有用な目的に添った、しかしきわめて基礎的な研究であり、トポロジー決定法ならびに排出蛋白阻害剤スクリーニング法に新しい方法を確立するところから取り組んだ意欲的な研究であり、今後の同分野の研究に寄与することが多く、本学の博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認められる。