



Title	II型トポイソメラーゼに対するキノロン系抗菌薬の作用および耐性機作に関する研究
Author(s)	赤坂, 高明
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43275">https://hdl.handle.net/11094/43275</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	赤坂高明
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16684 号
学位授与年月日	平成14年3月12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	Ⅱ型トポイソメラーゼに対するキノロン系抗菌薬の作用および耐性機 作に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人  (副査) 教授 前田 正知 教授 山元 弘 教授 本田 武司

#### 論文内容の要旨

トポイソメラーゼ (topoisomerase) は、DNA のトポロジーを調節するのに必須な酵素群であり、細菌からヒトに至るまで、ほとんどすべての生物に広く分布している。細菌のⅡ型トポイソメラーゼは細胞の増殖に必須であるため、感染症治療薬の優れた標的酵素となる。実際、キノロン系抗菌薬は、細菌のⅡ型トポイソメラーゼである DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼⅣ活性を阻害し、細菌の増殖を抑制する。一方、真核細胞にはⅡ型トポイソメラーゼに属するトポイソメラーゼⅡが存在する。この酵素と細菌由来のⅡ型トポイソメラーゼとの間には、生化学的特徴およびアミノ酸配列において類似点が存在する。キノロン薬によるヒト由来トポイソメラーゼⅡに対する阻害効果は、抗菌化学療法での望ましくない面であり、細菌由来の標的酵素とヒト由来酵素との選択性に関する情報が重要となる。

キノロン系抗菌薬は、1962年に発表されたナリジクス酸以来、数多くの化合物が合成され、臨床における抗菌薬の一系統を成している。現在開発中の新規キノロン薬であるシタフロキサシン (sitafloxacin ; STFX, DU-6859a) は、その強い抗菌力と広い抗菌スペクトルから、治療薬としての有用性が期待されている。1位および7位置換基内に不斉炭素有している STFX には、光学異性体 (DU-6856, DU-6857および DU-6858) が存在する。そこで、細菌および哺乳類由来のトポイソメラーゼに対する STFX およびその光学異性体の阻害活性を指標とし、キノロン薬の各種トポイソメラーゼに対する選択性を検証した。

大腸菌由来 DNA ジャイレースおよび黄色ブドウ球菌由来トポイソメラーゼⅣに対し、STFX が最も高い阻害活性を示した。また、標的酵素に対する阻害活性 ( $IC_{50}$ ) と大腸菌ならびに黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性 (MIC) の間には、正の相関関係が認められた。一方ヒト胎盤由来トポイソメラーゼⅡに対しては、STFX およびその光学異性体は、細菌由来Ⅱ型トポイソメラーゼに対する阻害活性と比較して、950倍以上低い阻害活性を示した。細菌由来Ⅱ型トポイソメラーゼに対する  $IC_{50}$  値とヒト由来酵素に対する  $IC_{50}$  値の間には、相関関係は認められなかった。以上の結果、キノロン薬は酵素レベルでも、優れた選択性を有する薬剤であることが確認された。特に、STFX はその光学異性体に比べ最も高い値を示し、その構造上の特徴が選択毒性の面から最も優れていることが明らかとなった。

難治性感染症の原因菌の一つである緑膿菌に対し、キノロン薬は抗菌活性を有する数少ない抗菌薬の一つである。しかし緑膿菌では、標的酵素の一つであるトポイソメラーゼⅣの存在自体についても明らかではなかった。そこで緑

膿菌 PAO1 のゲノムライブラリーを用いて、トポイソメラーゼIVのクローニングを行った。単離した *parC* および *parE* の全塩基配列を決定し、DDBJ に AB003428 (*parC*) および AB003429 (*parE*) として登録した。*parC* は、2265塩基のオープンリーディングフレームで構成され、754残基のアミノ酸をコードしていた。それから推定される計算上の分子量は、83.3kDaであった。*parC* の上流に存在した *parE* は、1890塩基で構成され、629残基のアミノ酸をコードしていた。それより推定される ParE の分子量は69.2kDaであった。緑膿菌トポイソメラーゼIVのアミノ酸配列を他菌種のそれと比較した結果、グラム陰性菌との間では ParC で60%、ParE で70%以上と、グラム陽性菌間(約35%) と比べ、高い相同性を示した。

マルトース結合蛋白との融合発現システムを用いて、緑膿菌 ParC および ParE を単離精製した。精製した ParC と ParE を再構成させると、ATP 依存のデカテネーション活性およびリラキシング反応は確認されたが、スーパーコイル活性は検出されなかった。このような酵素特性は、大腸菌をはじめ各菌種由来のトポイソメラーゼIVと同じであった。したがって、塩基配列の相同性だけでなく、酵素活性の特性からも、クローニングした緑膿菌遺伝子は、トポイソメラーゼIVサブユニットの *parC* および *parE* 遺伝子であることが確認された。

緑膿菌由来II型トポイソメラーゼを単離・精製したことにより、キノロン薬の作用機作研究において、酵素学的アプローチが可能となった。多くの菌種で、標的酵素である DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVのうち、キノロン薬に対しより感受性の高い酵素が菌の感受性を決定することが明らかとなっている。そこで緑膿菌由来 DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVに対する各種キノロン剤の阻害活性を測定した。今回供試したすべての検体の緑膿菌 PAO1 由来トポイソメラーゼIVに対する IC<sub>50</sub> 値は、DNA ジャイレースに対する IC<sub>50</sub> 値に比較し6~8倍の値を示した。その結果、緑膿菌の DNA ジャイレースがキノロンの第1次標的であることが酵素学的な解析から推察された。

臨床でのキノロン薬の汎用化に伴い、抗菌薬の宿命と言うべき耐性菌問題が広がっている。細菌の主要なキノロン耐性機構として、標的酵素である DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVのキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region; QRDR) でのアミノ酸置換が、キノロン耐性に寄与することが明らかとなっている。そこで、緑膿菌でのII型トポイソメラーゼ変異の広がりおよび変異とキノロン耐性との関係を検証する目的で、レボフロキサシン耐性の臨床分離緑膿菌150株における当該遺伝子の QRDR 塩基配列を解析した。その結果、124株 (82.7%) で DNA ジャイレースのアミノ酸置換が、さらにその中の89株でトポイソメラーゼIVの変異が認められた。キノロン耐性変異はまず *gyrA* で生じ、さらに *parC* 変異が付加されることにより、キノロン高度耐性となっていた。以上の結果、酵素を用いた生化学的検証、臨床分離株の遺伝学的および疫学的な検証より、緑膿菌では DNA ジャイレースがキノロン薬の一次標的酵素であり、トポイソメラーゼIVは二次標的であることが確認された。また、臨床分離緑膿菌でのキノロン高度耐性の主要な機構は、DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVのアミノ酸置換であることが示唆された。特に、*GyrA* および *ParC* でのアミノ酸置換が、キノロン耐性機構において主要な役割を果たしていることが推察された。

*GyrA* の83位 Thr が Ile へ、*ParC* の87位 Ser が Leu へ置換した2重変異株が、臨床分離株中48株と最も多く存在したことより、当該変異酵素が臨床的、疫学的に重要と考えられた。そこで、これら変異酵素を部位特異的変異導入法により作製し、各種キノロン薬の阻害活性を測定した。その結果、各種キノロン薬に対し、これらの酵素は耐性化していた。しかし、シタフロキサシンは、これら変異酵素に対し最も強い阻害活性を示した。したがって、シタフロキサシンの臨床分離キノロン耐性緑膿菌に対する強い抗菌活性は、標的酵素に対する阻害活性の強さに起因することが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

トポイソメラーゼは、DNA のトポロジーを調節するのに必至な酵素群であり、細菌からヒトに至るまでほとんど全ての生物に広く分布している。細菌のII型トポイソメラーゼは細胞の増殖に必須であるため、感染症治療薬の優れたターゲットである。II型トポイソメラーゼには、DNA 複製中生じる正のスーパーコイルを解消するための DNA

ジャイレースと、複製完了した2個の2本鎖DNAを分離するトポイソメラーゼIVがある。キノロン系抗菌薬はII型トポイソメラーゼを標的とするきわめて抗菌力の強い優れた抗菌剤であり、とくに緑膿菌に有効性を発揮する。しかし、近年、キノロン剤耐性緑膿菌が臨床分離され、問題となっている。本研究では、これまで同定されていなかった緑膿菌のトポイソメラーゼIV遺伝子 (*parC*、*parE*) を初めて同定、クローニングし、酵素を精製してその性質とキノロン剤による阻害作用をDNA ジャイレースと比較検討した。キノロン耐性緑膿菌臨床分離株多数を解析し、耐性がDNA ジャイレース遺伝子にまず起こり、次いで、*par* 遺伝子に変異することでさらに高度の耐性を獲得するメカニズムが明らかにされた。

本研究は臨床的にきわめて重要な緑膿菌の薬剤耐性を克服するという社会的に有用な目的に添った基礎的研究であり、学術的にも新しい内容を含んでいて、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。