



Title	緑膿菌RND型多剤排出トランスポーター新規阻害剤の合成・評価と作用機序解析
Author(s)	井上, 雄太
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61476
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名(井上 雄太)	
論文題名	緑膿菌 RND型多剤排出トランスポーター新規阻害剤の合成・評価と作用機序解析
論文内容の要旨	
<p>薬剤耐性菌の増加は世界的に深刻な問題となっており、効果的な解決方法が求められている。グラム陰性細菌の RND 型トランスポーターは侵入した薬剤を排出する事で薬剤耐性化に関与している。緑膿菌は抗菌薬に対して自然耐性が高く、多剤耐性緑膿菌となると効果的な抗菌薬はほとんどない。緑膿菌は遺伝子上に 12 種類の RND 型トランスポーターを保有しているが、特に MexAB-OprM と MexXY-OprM (MexB, MexY) は自然株でも恒常に発現しており、自然耐性の高さに寄与している。また、多剤耐性緑膿菌では MexB と MexY は高確率で過剰発現している。したがって、MexB・MexY の阻害剤は、自然耐性の高い緑膿菌に対して効果的な投薬治療を可能にするだけでなく、薬剤耐性化した緑膿菌に対する抗菌薬の感受性を向上させる効果が期待できる。よって、本論では多剤耐性菌感染症、特に多剤耐性緑膿菌感染症の克服を指向して、緑膿菌多剤排出トランスポーター MexB および MexY の機能阻害剤を開発し、その有用性を示す事を研究目的とした。</p> <p>第 2 章では新規骨格を有する MexY 特異的阻害剤の合成と構造活性相関研究・作用機序の解明研究を行った。その結果、6-oxa-2-azaspiro[3.4]octane や 2,6-diazaspiro[3.4]octane を中心骨格とした化合物群を新規な MexY 特異的阻害剤として見出した。構造活性相関研究の結果、最も強い MexY 阻害活性を持つ J-46(EC₅₀=18 μM) の発見に至った。また、作用機序解析を行った結果、既存の排出トランスポーター阻害剤 D13-9001 や PAβN とは異なる作用機序を持つ阻害剤である事が示唆された。</p> <p>第 3 章では MexB 特異的阻害剤 H-8 の結合構造の特定を行った。H-8 は結合サイトが明らかとなっている既知の MexB 阻害剤 D13-9001 をリードとして開発された化合物である。したがって、D13-9001 結合サイト周辺に変異導入を加える事で H-8 の結合構造の特定を行った。その結果、H-8 は D-13-9001 と同じ結合サイトに作用しており、MexB の 151 番目のリシン残基との静電相互作用が阻害活性を維持するために必須である事を明らかにした。</p> <p>第 4 章では MexB・MexY 双方を同時に阻害できる化合物の開発と効果を検証した。阻害剤の設計は、先行研究によって明らかとなっている阻害剤結合サイトの情報と、第 3 章で得られた知見に基づいて行い、MexB 特異的な阻害剤である H-8 を改良する方針で行った。その結果、MexB・MexY 双方を同時に阻害できる化合物として H-31 (MexB : EC₅₀=7.6 μM, MexY : EC₅₀=8.3 μM) 及び、周辺化合物を見出した。さらに、国内医療機関で臨床分離された多剤耐性緑膿菌 55 株に対する H-31 の有効性を調べた。その結果、H-31 は多剤耐性緑膿菌の抗菌薬への抵抗性を軽減させ、複数の抗菌薬の効果を顕著に増強させるという、トランスポーター阻害剤に期待される効果を發揮することを確認した。</p> <p>第 5 章では新規阻害剤 H-31 の作用機序解析を行った。その結果、H-31 は予想に反し D-13-9001 や H-8 とは異なる機構で薬剤排出を阻害している事が示唆された。そこで詳細な阻害活性評価や細菌の膜に与える影響を調べたところ、既知の MexB・MexY 阻害剤 PAβN と同様の作用機序を有している事が示唆された。PAβN は排出される薬剤に対する競合阻害剤だと言われているが、その作用機序の詳細は明らかとなっていない。そこで、H-31 と PAβN を比較する事で、作用機序の詳細な解明を試みた。その結果、グラム陰性菌の外膜に対する障害作用とトランスポーター阻害効果に関係性を見出す事ができ、阻害効果が外膜障害作用に起因するものである事を明らかにした。この結果は、PAβN の真の作用機序と共に、新しい排出トランスポーター阻害機構を提案するものである。</p> <p>以上の結果は多剤排出トランスポーター阻害剤の開発、並びに薬剤耐性菌克服に繋がる重要な知見である。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (井上 雄太)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 加藤 修雄 副査 教授 笹井 宏明 副査 教授 村田 道雄

論文審査の結果の要旨

薬剤耐性菌の増加は世界的に深刻な問題となっている。本論文は、薬剤を排出することで薬剤耐性化に関与しているグラム陰性細菌の RND 型トランスポーターに着目し、その排出能を阻害することがグラム陰性細菌感染症に対する新たな治療戦略になるとの基本概念に基づき展開した研究成果を纏めたものである。特に、多剤耐性綠膿菌に過剰発現している MexAB-OprM と MexXY-OprM の薬剤排出システム中の内膜局在型トランスポーターである MexB 及び MexY の排出能を同時に阻害する阻害剤を開発し、その有効性を示す事を研究目的とした。

まず、MexB と既知 MexB 阻害剤 (D13-9001) の共結晶構造をもとに、化合物ライブラリーに対するスクリーニングを経て見出された 6-oxa-2-azaspiro[3.4]octane 及びその不斉炭素を三級アミンに置換えた 2,6-diazaspiro-[3.4]octane を中心骨格とした化合物群を合成し、新規な MexY 特異的阻害剤を見出した。作用機序解析を行った結果、D13-9001 や、MexB および MexY の双方に阻害能を示す既知阻害剤 PABN とは異なる作用機序を持つことを明らかにした。MexY 選択的阻害剤としては初例である。

ついで、学位申請者が修士論文研究において見出していた MexB 選択的阻害剤 (**H-8**) の結合様式解析を行った。D13-9001 の MexB 結合サイト周辺に変異導入し、数種の MexB 点変異体を作成した。それら変異体に対する **H-8** の薬剤排出阻害能を評価した結果、**H-8** が D13-9001 と同一結合サイトに作用していること、MexB の Lys151 との静電相互作用が **H-8** の阻害活性発現に必須である事を明らかにした。

上記で得られた知見から、**H-8** の基本骨格を持ちながら MexY に対する阻害能を持つためには、MexY の仮想的阻害剤結合サイト周辺の酸性アミノ酸との静電相互作用を考慮すべきとの分子設計指針を提出した。この指針に沿った合成研究を展開した結果、MexB 及び MexY 双方を同時に阻害できる化合物として **H-31** (MexB: EC₅₀ = 7.6 μM、MexY: EC₅₀ = 8.3 μM) を見出した。この **H-31** と数種の抗菌薬との併用効果を国内医療機関で臨床分離された多剤耐性綠膿菌 55 株に対して評価した結果、特にキノロン系及びモノバクタム系抗菌薬に対する耐性菌の薬剤感受性を顕著に向上させることを確認した。トランスポーター阻害剤を抗菌薬と併用させるという多剤耐性菌に対する治療戦略が有効であることを示す結果である。

しかしながら、**H-31** は予想に反し D-13-9001 や **H-8** とは異なる機構で薬剤排出を阻害している事が示唆された。そして、**H-31** や、これまで競合阻害剤であるとされてきた PABN の薬剤排出阻害効果が、グラム陰性細菌の外膜障害作用に起因する事を明らかにした。すなわち、内膜局在型トランスポーターによる薬剤排出は、外膜チャンネルとの複合体形成によって完結するが、**H-31** 及び PABN は外膜障害によって複合体形成を阻害し、結果としてトランスポーターの薬剤排出能を阻害していると結論した。このような薬剤排出システムに対する複合体形成阻害は、原理的に全ての内膜局在型排出トランスポーターの機能を阻害すると考えられ、綠膿菌のみならず、多くのグラム陰性細菌に対して有効であると期待される。

以上の研究成果は、多剤排出トランスポーターの機能阻害及び薬剤耐性菌克服に対して重要な知見を与えていけると評価できる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。