

学位論文題名

Studies on Mechanisms of Action of and Resistance
to Quinolones in Gram-Positive Cocci

(グラム陽性球菌におけるキノロン剤の作用および耐性機作に関する研究)

学位論文内容の要旨

グラム陽性球菌の黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、および腸球菌は、臨床上重要な病原体である。特に近年、これらの薬剤耐性菌、即ち、MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*)、PRSP (Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae*)、および VRE (Vancomycin-Resistant Enterococci) の出現が問題となっている。キノロン剤は、このような耐性菌の多くに対しても有効であることが報告されており、臨床の場で使用されている。しかし、一方では、キノロン剤の使用機会の増加に伴い、他の抗菌剤と同様に各種細菌の耐性化が生じ始めていることも事実である。本研究は、グラム陽性球菌におけるキノロン剤の作用ならびに同剤に対する耐性について、標的蛋白質レベルで解析するために企図された。

キノロン剤の標的は、細菌の生育に必須な2つの酵素、DNA ジャイレースとトポイソメラーゼIVである。DNA ジャイレースは、A サブユニット (GyrA) と B サブユニット (GyrB) からなる。トポイソメラーゼIVも同様に、A サブユニットと B サブユニットからなる (それぞれ ParC と ParE ; 但し、黄色ブドウ球菌では慣習的に GriA と GriB とよぶ)。DNA ジャイレースは ATP をエネルギー源として、弛緩型の DNA 分子を超らせん型に変換する機能 (スーパーコイルリング活性) をもつ。一方、トポイソメラーゼIVは ATP 存在下、超らせん型の DNA を弛緩させる機能 (リラクシング活性) および連結体 DNA を切離する機能 (デカテネーション活性) をもつ。

著者はまず、グラム陽性球菌に対する各種キノロン剤の作用を解析するため、キノロン感受性の黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、および腸球菌の DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVの各サブユニット蛋白質を、遺伝子工学的に調製した。各菌の精製 GyrA および GyrB 蛋白質によって *in vitro* で再構成した DNA ジャイレースは、確かにスーパーコイルリング活性を示した。また、精製 ParC/GriA および ParE/GriB 蛋白質によって再構成したトポイソメラーゼIVは、確かにデカテネーション活性を示した。各菌由来のこれら酵素の活性をキノロン剤は濃度依存的に阻害し、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、スパルフロキサシン、トスフロキサシン等は、DNA ジャイレースの場合よりも低い濃度でトポイソメラーゼIVを阻害した。この結果はグラム陰性菌の場合と異なり、グラム陽性球菌におけるキノロン剤の第一標的はトポイソメラーゼIVであることを示唆している。一方、新規キノロン剤であるシタフロキサシンは、DNA ジャイレースとトポイソメラーゼIVを同程度の濃度で阻害し、かつ、その阻害濃度は他のキノロン剤と比べて最も低い値であった。このシタフロキサシンの特性は、その良好な抗菌活性と関連

するものと考えられた。

細菌の抗菌剤に対する耐性化には一般に、抗菌剤の標的となる細菌蛋白質の変異、即ち、それをコードする遺伝子の変異が関与する。大腸菌の研究によると、キノロン耐性には特に、標的酵素である DNA ジャイレースおよびトポイソメラーズⅣの A サブユニットの N 末端に位置する領域 (Quinolone Resistance-Determining Region; QRDR) の変異が関与するとされている。そこで著者は、グラム陽性球菌のキノロン耐性と標的酵素の変異の関連を検討するため、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、および腸球菌のキノロン耐性株の GyrA および ParC/GrlA の QRDR の変異を、コードする遺伝子配列の変異に基づいて調べた。

レボフロキサシンに対する感受性が野生株より 2~4 倍低下した低度キノロン耐性黄色ブドウ球菌では、GrlA 80 位のアミノ酸であるセリン (Ser) または GyrA 88 位のアミノ酸であるグルタミン酸 (Glu) の一方の置換を伴う変異が認められた。同感受性が野生株より 32 倍低下した高度耐性株では、GrlA (80 位 Ser または 84 位 Glu) および GyrA (84 位 Ser または 88 位 Glu) の両方にアミノ酸置換を伴う変異が認められた。肺炎球菌でも、低度耐性株では ParC の QRDR のみに変異が認められ、高度耐性株では ParC および GyrA の QRDR に変異が認められた。また、腸球菌では、低度耐性株で GyrA に変異が認められ、高度耐性株では GyrA および ParC に変異が認められた。以上の結果は、グラム陽性球菌においても、標的酵素の A サブユニットの QRDR 変異がキノロン耐性に関与することを示唆している。ParC/GrlA または GyrA の一方の変異が低度耐性を、そして、両蛋白質の変異が高度耐性をもたらすものと考えられた。

さらに著者は、上述のような変異と各酵素のキノロン感受性の関連を解析するため、点突然変異法を用いて黄色ブドウ球菌の野生型 GrlA および GyrA 発現ベクターにキノロン耐性株で認められた変異を導入し、あらたに変異型 GrlA および GyrA を調製後、それぞれ野生型 GrlB および GyrB を組合せる事によって変異型トポイソメラーズⅣおよび DNA ジャイレースを再構成し、キノロン剤によるそれらの活性の阻害を試験した。その結果、各種キノロン剤の 80 位あるいは 84 位変異型トポイソメラーズⅣ阻害濃度は野生型同酵素阻害の場合に比べて 9~94 倍高く、野生型 DNA ジャイレース阻害濃度よりも高くなった。84 位あるいは 88 位変異型 DNA ジャイレース阻害濃度は、野生型同酵素阻害の場合に比べて 4~50 倍以上高い値であった。実験に供したキノロン剤の中では、シタフロキサシンが最も低い濃度で両変異酵素を阻害し、その値は他のキノロン剤と比べて顕著に低かった。以上の結果は明らかに、キノロン耐性菌で認められた ParC/GrlA および GyrA のアミノ酸変異はそれぞれ、トポイソメラーズⅣおよび DNA ジャイレースのキノロン感受性を低下させることを示している。トポイソメラーズⅣ変異株では DNA ジャイレース (野生型) の方がキノロン感受性が高くなるため、それが第一標的となると考えられた。シタフロキサシンは野生型トポイソメラーズⅣおよび DNA ジャイレースのみならず、変異型両酵素に対してもかなり高い阻害活性を有しているため、酵素変異のため他キノロン剤に耐性を示す菌に対しても良好な抗菌活性を示すと考えられた。

以上のように本研究では、グラム陽性球菌のトポイソメラーズⅣおよび DNA ジャイレースに対するキノロン剤の阻害作用を解析し、前者を優位に阻害することを明らかにした。また、キノロン耐性グラム陽性球菌における両酵素の変異を同定するとともに、それらの変異が確かに両酵素のキノロン感受性を低下させることを証明した。さらに、シタフロキサシンの優れた両標的酵素阻害活性に基づき、本剤のグラム陽性球菌に対する良好な抗菌活性の発現メカニズムを考察した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 伊 藤 茂 男

学 位 論 文 題 名

Studies on Mechanisms of Action of and Resistance to Quinolones in Gram-Positive Cocci

(グラム陽性球菌におけるキノロン剤の作用および耐性機作に関する研究)

黄色ブドウ球菌、肺炎球菌および腸球菌の薬剤耐性菌、即ち、MRSA、PRSP および VRE の出現が問題となっている。キノロン剤は、これら耐性菌に有効であり、臨床で使われている。しかし、キノロン剤耐性菌が生じ始めている。本論文は、グラム陽性球菌におけるキノロン剤の作用と耐性について、標的蛋白質分子レベルで解析した成績をまとめたものである。

キノロン剤は、細菌の遺伝子複製に必須な2つの酵素、DNA ジャイレースとトポイソメラーゼIVを標的とする。何れもAおよびB 2つのサブユニットからなる。DNA ジャイレースはATPをエネルギー源として、DNA分子を超らせん型に変換する活性をもつ。一方、トポイソメラーゼIVはATP存在下、超らせん型のDNAを弛緩させる活性と連結体DNAを切り離す活性をもつ。

グラム陰性菌では、キノロンはDNA ジャイレースを優位に阻害することが判っている。著者は、グラム陽性球菌に対するキノロン剤の作用を解析するため、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、および腸球菌の両酵素蛋白質遺伝子をクローニングして、これらを発現させ、各種キノロン剤の酵素阻害実験を行った。その結果、グラム陽性球菌においては、キノロン剤がトポイソメラーゼIVを優位に阻害する、即ち、グラム陰性菌とは異なる作用機作を明らかにした。

キノロン剤に対する細菌の耐性化に標的蛋白質の変異が関与することが知られている。大腸菌では、キノロン耐性にDNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVのAサブユニットの変異が関与するとされている。著者は、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌および腸球菌のキノロン耐性株を解析し、グラム陽性球菌におけるキノロン耐性と標的酵素の変異の関連を明らかにした。即ち、グラム陽性球菌においても、耐性株の標的酵素各々のAサブユニットの変異がキノロン耐性に関与することを示した。次に著者は、黄色ブドウ球菌の変異型DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼIVをあらたに調製し、耐性株で認められた変異と各酵素のキノロン感受性の関連を解析した。その結果、キノロン耐性株で認められた各酵素の変異がキノロン感受性低下と関連することを証明した。

また、新規キノロン剤、シタフロキサシンが両標的酵素阻害活性および変異によって耐性を獲得

した酵素に対しても高い阻害活性を示すことを明らかにするとともに、本剤がグラム陽性球菌に対して優れた抗菌活性を示すメカニズムを解明した。

本研究成果は、近年、臨床において大きな問題となっている黄色ブドウ球菌、肺炎球菌および腸球菌の薬剤耐性菌感染症の予防と治療に資するところが大きいので、審査員一同は氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。