

称号及び氏名 博士(獣医学) 小山田義博

学位授与の日付 平成19年9月20日

論文名 「細菌のⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング法の開発と  
新規Ⅱ型トポイソメラーゼ阻害薬の作用機序の解析」

論文審査委員 主査 山崎 伸二  
副査 小崎 俊司  
副査 竹内 正吉

## 論文要旨

### 序文

これまでに多くのワクチンや抗生物質、合成抗菌薬（以下、抗生物質及び合成抗菌薬を総称して抗菌薬と略す）が開発され、多くの細菌感染症の予防や治療が可能になった。しかし、20世紀後半から新たに出現した感染症（新興感染症）や一旦は制圧されたと思われていた感染症（再興感染症）が猛威を振るい始め、人類にとって感染症が再び脅威となりつつあることが地球レベルで問題となってきた。また、医療現場での抗菌薬の不適切な使用、家畜の成長促進や感染症予防目的での抗菌薬の使用やペットの感染症治療にヒトで使われる同種の抗菌薬の使用等が、薬剤耐性菌（以下、耐性菌と略す）の蔓延に大きく貢献し、社会問題となっている。愛玩動物由来の耐性菌の中には、ヒトの重症感染症治療の切り札的な抗菌薬であるカルバペネム薬やキノロン薬にも耐性を示す多剤耐性菌が見つかっており、これらの耐性菌が愛玩動物からヒトに感染した場合、治療が困難になることが想定される。耐性菌の増加に対し我が国を始め欧米においても抗菌薬の医療現場での適正使用や医療以外での使用の見直しの動きが出てきている。耐性菌問題を取り巻く環境を考慮すると耐性菌対策は急務である。その対策の一つとして、医学領域並びに獣医学領域から耐性菌に有効な新たな抗菌薬の開発が切望されている。

キノロン薬は広い抗菌スペクトルと強力な抗菌力を有し、ヒトの医療並びに獣医療において、種々の細菌感染症の治療に使用され、有効性及び有用性が実証されている。それ故

に、キノロン薬の標的分子であるⅡ型トポイソメラーゼ [DNA ジャイレース (以下、ジャイレースと略す) とトポイソメラーゼⅣ (以下、トポⅣと略す) ] は、臨床的に証明された魅力的な抗菌薬の標的分子であるといえる。

ジャイレースは DNA の複製・転写・組み換え・修復などに関与しており、DNA の二本鎖を一時的に切断し、再結合することにより DNA の高次構造を変化させる。この酵素は、GyrA 2 分子と GyrB 2 分子から成り、GyrA は DNA 鎖の切断・再結合に関与し、GyrB は ATPase 活性をもち、DNA 鎖の切断・再結合時に必要なエネルギーを提供している。キノロン薬はジャイレースが二本鎖 DNA を切断した時に生じる空間に入り込み、ジャイレース-DNA-キノロンの三者複合体、すなわち cleavable complex を形成し DNA 鎖の再結合を阻害する。Novobiocin (NB) に代表されるもう一つのジャイレース阻害薬であるクマリン系化合物は、ATP と競合し GyrB の ATPase 活性を阻害することによりジャイレースの活性を阻害する。トポⅣはジャイレースの類似酵素であり、分子構成 (ParC 2 分子、ParE 2 分子)、触媒機構、キノロン薬及びクマリン系化合物による阻害機序はジャイレースと同様である。キノロン薬とクマリン系化合物は同じ標的分子に作用するが、分子レベルでの作用機序が異なり、ジャイレースの耐性変異部位が異なる。実際、キノロン耐性菌に対して NB は有効であり、逆に NB 耐性菌に対してキノロン薬が有効である。このことは同じ標的分子に作用しても、作用機序が異なれば耐性菌に有効な抗菌薬を開発できる可能性を示唆している。

本研究では、新規骨格構造及びキノロン薬とは異なる作用機序を有するⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬の探索を目的として、1) 腸球菌のキノロン耐性機構の解析、2) 細菌のⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング法の開発、及び、3) 新規Ⅱ型トポイソメラーゼ阻害薬の作用機序の解析を行った。

## 第1章 腸球菌のキノロン耐性機構の解析

腸球菌 (*Enterococcus*属) はヒトや動物の腸管内に常在するグラム陽性菌である。近年、キノロン耐性腸球菌がヒト及び愛玩動物から分離され問題となっている。細菌のキノロン耐性機構は大きく分けて二つある。その一つは、標的分子の変異であり、もう一つは菌体内キノロン蓄積量の低下である。腸球菌のキノロン耐性はGyrAとParCのアミノ酸残基の変異によって惹起されることが既に報告されているが、GyrBとParEのアミノ酸変異や菌体内

キノロン蓄積量の低下については明らかとなっていない。本章では腸球菌のキノロン耐性にこれらの機構が関与するか否かを調べた。黄色ブドウ球菌において、sparfloxacin (SPX) と norfloxacin (NOR) の一次標的分子は、それぞれ、ジャイレースとトポIVであることが知られている。また、NORは薬剤排出ポンプ（以下、排出ポンプと略す）であるNorAにより菌体外に排出されることが知られている。そこで、これらのキノロン薬を使用すれば、ジャイレースやトポIVに変異を持つキノロン耐性菌やNorA類似ポンプが活性化したキノロン耐性菌を選択できると考え、*E. faecium* ATCC 19434 及び *E. faecalis* ATCC 29212 を親株として、これらのキノロン薬を用いて段階的に耐性菌を選択した。得られた耐性菌について標的分子の変異を調べた結果、既に報告のあるGyrAとParCのアミノ酸残基の変異だけでなく、GyrBとParEのアミノ酸残基の変異がキノロン耐性に関与することを明らかにした。NorAの過剰発現株に対するNORの最小発育阻止濃度（MIC）を、排出ポンプ阻害薬の存在下で測定すると、MICが低下することが知られている。そこで、腸球菌のキノロン耐性にNorA類似ポンプが関与するか否かを調べる目的で、排出ポンプ阻害薬の存在下でMICを測定した結果、数株の耐性菌においてNORのMICが低下した。また、これら耐性菌は親株よりNORの菌体内蓄積量が低下していた。これらのことより、腸球菌のNOR耐性にNorA類似ポンプが関与していることを明らかにした。一方で、SPXとNORの両方に高いMICを示す耐性菌、いわゆるキノロン高度耐性菌は、他のグラム陽性菌と同様にジャイレースとトポIVの両方にアミノ酸残基の変異を有していた。

以上のことから、II型トポイソメラーゼを、キノロン薬とは異なる機序で阻害する抗菌薬を創製すれば、キノロン耐性菌に有効で、かつ多剤耐性菌に有効な抗菌薬になる可能性を示した。

## 第2章 細菌のII型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング法の開発

多検体処理可能なII型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング系がないことがII型トポイソメラーゼを標的分子とした新規抗菌薬の開発を遅らせている。II型トポイソメラーゼが阻害されると、ある頻度で染色体のない細胞、すなわち無核細胞が生じる。本章では、無核細胞を効率よく検出できるブルーアッセイを一次アッセイに用いることにより、II型

トポイソメラーゼ阻害薬を効率よく検出できるか否かを検討した。本アッセイは、プラスミド上に *lacZ* 遺伝子を持つ大腸菌を指示菌とし、青色のコロニーの形成を指標に、無核細胞の出現を効率的に検出するものである。本アッセイを用いて、約 95,000 化合物をスクリーニングした結果、479 の陽性検体を得た。その中から、分子量や構造類似性を考慮して 138 検体を選択した。これら 138 検体の II 型トポイソメラーゼ阻害作用を調べた結果、ピラゾール系化合物など、合計 51 検体 (約 37%) が化合物濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  以下で大腸菌ジャイレースのスーパーコイリング活性と大腸菌トポIVのデカテネーション活性の両方、あるいはいずれかを阻害した。また、キノロン耐性菌、NB 耐性菌及び感受性菌に対するこれら阻害薬の MIC はすべて同じであったことから、II 型トポイソメラーゼに対する阻害機序は新規である可能性が示唆された。キノロン薬や NB を大腸菌に作用し、DNA の複製が阻害されると、一時的に DNA の複製や細胞分裂が停止し、その結果として菌が伸長することが知られている。そこで、これら 51 検体のうち大腸菌に対する MIC が 128  $\mu\text{g/ml}$  以下の化合物について伸長活性を示すかどうかを調べた。その結果、MIC の 1/2~2 倍濃度の化合物を作用させた場合、大腸菌が伸長することを確認した。以上のことから、ブルーアッセイは多検体処理可能な、II 型トポイソメラーゼ阻害薬を効率よく検出できる系であることを明らかにした。

### 第 3 章 新規 II 型トポイソメラーゼ阻害薬の作用機序の解析

第 2 章では新規 II 型トポイソメラーゼ阻害薬を 51 検体見出した。これらの中から、多剤耐性菌に有効な新規抗菌薬の創製を目指し、化合物の新規性や合成の容易さを考慮した上で、ピラゾール系化合物 (ES-0615) を選択した。ES-0615 のジャイレース阻害活性及び抗菌活性は弱かったため、様々な類縁化合物を合成し、両活性が ES-0615 より約 10 倍強くなった ES-1273 を得た。そこで、ES-1273 を用いてジャイレースに対する阻害機序を解析した。酵素アッセイにおいて、ES-1273 はキノロン薬と異なり cleavable complex を誘導せず、また、クマリン系化合物とも異なり GyrB の ATPase 活性を阻害しなかった。この結果から、ES-1273 の II 型トポイソメラーゼ阻害機序は既存阻害薬と分子レベルで異なると考えられた。そこで、ジャイレースに対する ES-1273 の阻害機序として、GyrA と GyrB との結合阻害 (ホロ酵素形成阻害) あるいはホロ酵素 (ヘテロ四量体) と DNA との結合阻害を考え、どちらの機序に基づくかを調べた。その結果、(1) ジャイレースのスーパーコイリングアッセイにおいて、ホロ酵素と DNA をプレインキュベートした後に化

物を加えた場合、ES-1273 の阻害作用が消失した。(2) ES-1273 の添加により、ジャイレース-DNA-SPX 三者複合体の形成を阻害した。(3) ゲルシフトアッセイにおいて、ジャイレース-DNA 複合体を示すバンドが ES-1273 の添加により消失した。(4) 表面プラズモン共鳴により、ES-1273 が DNA と結合することが示唆された。

以上の結果より、ES-1273 は DNA と結合することによって、酵素と DNA との結合を阻害することで、II 型トポイソメラーゼを阻害すると考えられた。

## 結語

1. 腸球菌のキノロン耐性機構には、GyrA と ParC の変異だけでなく、GyrB と ParE の変異や NorA 類似ポンプが関与していることを明らかにした。また、キノロン高度耐性菌は、他のグラム陽性菌と同様にジャイレースとトポIVの両方が変異していることを明らかにした。以上のことから、II 型トポイソメラーゼをキノロン薬とは異なる機序で阻害し、かつ排出ポンプによって排出されない新規骨格を有する化合物を創製することができれば、キノロン耐性菌及び多剤耐性菌に有効な抗菌薬を開発できると考えられた。
2. ブルーアッセイを一次アッセイに使用することにより、効率のよい II 型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング系を開発した。さらに、本研究で見出したピラゾール系化合物をはじめとする II 型トポイソメラーゼ阻害薬は、新規阻害機序を有する多剤耐性菌に有効な抗菌薬のリード化合物になる可能性を示した。
3. 新規作用機序を有する II 型トポイソメラーゼ阻害薬として、ES-1273 を見出した。ES-1273 を用いた作用機序の解析結果から、既存抗菌薬と同じ標的分子であっても異なる作用機序を有していれば、既存抗菌薬に耐性となっている耐性菌に対しても有効性を発揮できることを明らかにした。

## 審査結果の要旨

医療現場での抗菌薬の不適切な使用、家畜の成長促進や感染症予防目的での抗菌薬の使用やペットの感染症治療にヒトで使われる同種の抗菌薬の使用等が、薬剤耐性菌（以下、耐性菌と略す）の蔓延に大きく貢献し、社会問題となっている。愛玩動物由来の耐性菌の中には、ヒトの重症感染症治療の切り札的な抗菌薬であるカルバペネム薬やキノロン薬にも耐性を示す多剤耐性菌が見つかっており、これらの耐性菌が愛玩動物からヒトに感染した場合、治療が困難になることが想定される。その対策の一つとして、医学領域並びに獣医学領域から耐性菌に有効な新たな抗菌薬の開発が切望されている。キノロン薬は広い抗菌スペクトルと強力な抗菌力を有し、ヒトの医療並びに獣医療において、種々の細菌感染症の治療に使用され、有効性及び有用性が実証されている。それ故に、キノロン薬の標的分子であるⅡ型トポイソメラーゼ [DNAジャイレース（以下、ジャイレースと略す）とトポイソメラーゼⅣ（以下、トポⅣと略す）] は、臨床的に証明された魅力的な抗菌薬の標的分子であるといえる。

申請者は、新規骨格構造及びキノロン薬とは異なる作用機序を有するⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬の探索を目的として、1)腸球菌のキノロン耐性機構の解析、2)細菌のⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング法の開発、及び、3)新規Ⅱ型トポイソメラーゼ阻害薬の作用機序の解析を行った。以下はそれらの結果の概要である。

第1章では、近年、ヒトや愛玩動物から分離され問題となっているキノロン耐性腸球菌の耐性化機構を明らかにすることを目的とし、キノロン薬存在下で腸球菌を培養し、段階的に耐性菌を選択した。得られた耐性菌の耐性機構を解析した結果、腸球菌のキノロン耐性機構には、GyrAとParCの変異だけでなく、GyrBとParEの変異やNorA類似ポンプが関与していることを明らかにした。また、キノロン高度耐性菌は、他のグラム陽性菌と同様にジャイレースとトポⅣの両方が変異していることを明らかにした。以上のことから、Ⅱ型トポイソメラーゼをキノロン薬とは異なる機序で阻害し、かつ排出ポンプによって排出されない新規骨格を有する化合物を創製することができれば、キノロン耐性菌及び多剤耐性菌に有効な抗菌薬を開発できると考えた。

第2章では、ブルーアッセイをⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬スクリーニングの一次アッセイに使用することにより、効率のよいⅡ型トポイソメラーゼ阻害薬のスクリーニング系

を開発した。本アッセイを用いて約 95,000 化合物をスクリーニングし、分子量や構造類似性を考慮し、138 検体を選択した。これら 138 検体のうち、ピラゾール系化合物を含む 51 検体が 100  $\mu$ g/ml 以下の濃度で大腸菌ジャイレースのスーパーコイリング活性とトポIVのデカテネーション活性の両方、あるいはいずれかを阻害した。また、キノロン耐性菌、NB 耐性菌及び感受性菌に対するこれら阻害薬の MIC はすべて同じであったことから、II型トポイソメラーゼに対する阻害機序は新規である可能性が示唆され、多剤耐性菌に有効な抗菌薬のリード化合物になる可能性を示した。

第3章では、新規作用機序を有するII型トポイソメラーゼ阻害薬として見出したES-1273を用いて、作用機序を解析した結果、DNAの特定部位に特異的に結合し、II型トポイソメラーゼ活性を阻害する今までに報告のない新しい作用機序を有することを見いだした。これらの結果から、既存抗菌薬と同じ標的分子であっても異なる作用機序を有していれば、既存抗菌薬に耐性となっている菌に対しても有効性を発揮できることを明らかにした。

本研究において、ブルーアッセイ系を用いたII型トポイソメラーゼの阻害薬のスクリーニング系を開発し、DNAに結合するという新規作用機序に基づくピラゾール系化合物のII型トポイソメラーゼの阻害薬、ES-1273を見いだした。本研究によって得られた知見は、多剤耐性菌に有効な新規抗菌薬の発見及びスクリーニング系の開発であり、獣医学領域のみならず医学領域における化学療法及び感染症治療の発展に大きく貢献するものと評価できる。本論文の審査および学力確認の結果をあわせて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。