

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のアルベカシン耐性化に関する研究

所 属 国立感染症研究所

研究者 石野 敬子

要旨

抗 MRSA 剤であるアミノグリコシド系抗生物質・アルベカシンの耐性化機構を検討した結果、高度耐性化にはアミノグリコシド修飾二機能酵素活性が必要であるが、それだけでは十分ではなく、MRSA 内に存在する別の因子が必要であることが示唆された。

1. 研究目的

アルベカシンは、日本国内で抗 MRSA 保険適用抗菌剤として、使用されている半合成アミノグリコシド系抗生物質である。アルベカシンは抗 MRSA 第一選択薬であるバンコマイシンの耐性 MRSA に対しても有効であるため、アルベカシンに対する高度耐性化は非常に大きな問題になることが予想される。そこで、MRSA 内でのアルベカシン不活性化因子の同定と耐性化機構を解明することを目的とする。

2. 研究方法

アルベカシン耐性因子の探索のため、以下の3つの実験を行なった。

(1) 臨床分離アルベカシン感受性および低度耐性 MRSA の in vitro アルベカシン濃度勾配による高度耐性化実験：臨床由来 MRSA のうち、アミノグリコシド修飾酵素として、アセチル化リン酸化二機能酵素 *aac(6')aph(2'')*のみ、*aac(6')aph(2'')* + アミノグリコシドリソニル化酵素 *aph3'A*、*aac(6')aph(2'')* + アミノグリコシドアデニル化酵素 *aad4'4''*、およびこれら3種類の修飾酵素をもたない株をアルベカシン濃度 0-200 μ g/ml のプレートで4回選択し、高度耐性を示したコロニーの耐性度と増殖能を検討した。耐性試験は、ミューラーヒントン培地を用いて寒天希釈法で試験した。また、増殖能として、OD600 の吸光度を測定した。

(2) MSSA および MRSA への二機能酵素 *aac(6')aph(2'')* の強制発現：*aac(6')aph(2'')* を PCR クローニングし、ベクター pAW8 (感染研・細菌部・和田博士より供与) に組み込み、MSSA である RN4220 および MRSA へエレクトロポレーションで導入した。これらについて耐性試験を行なった。アルベカシン修飾活性は、粗酵素を調製しアセチル CoA あるいは ATP 存在下 37 $^{\circ}$ C で反応させ、TLC でモニターすることにより、アセチル化活性およびリン酸化活性とした。

(3) 臨床分離アルベカシン高度耐性株の解析: アルベカシンに対し 100 μ g/ml 以上の耐性を示す臨床由来 MRSA を用い、粗酵素によるアセチル化活性およびリン酸化活性の測定および RT-PCR により *aac(6')aph(2'')* および *aph3'A* の発現を検討した。

研究成果

(1) *in vitro* アルベカシン高度耐性化実験の結果、*aac(6')aph(2'')* 単独あるいは *aac(6')aph(2'')* と *aph3'A* を持つ MRSA は最高で 25 μ g/ml の耐性を示したが、*aac(6')aph(2'')* および *aad4'4''* を持つ MRSA は最高で 100 μ g/ml 以上の耐性を示した。*aac(6')aph(2'')* を持たない MRSA は耐性を示さなかった。また、*in vitro* アルベカシン高度耐性化株のアセチル化およびリン酸化活性は同程度であったが、増殖能は低下していた。

(2) 正常型 *aac(6')aph(2'')* をクローニングし、RN4220 に強制発現した結果、ゲンタマイシンに対しては 100 μ g/ml 以上耐性を示したが、アルベカシンに対しては 3 μ g/ml 耐性であった。このとき、ゲンタマイシンに比べ、アルベカシンのリン酸化活性が顕著に低下していた。また、*aad4'4''* を持つ MRSA に強制発現させた場合でも、*aad4'4''* を持たない MRSA 株に発現させた場合と比べ、耐性レベルに変化は認められなかった。

(3) アルベカシンに対し 100 μ g/ml 以上の耐性を示す臨床由来 MRSA の解析を行なった。この株は *aac(6')aph(2'')* と *aph3'A* を持ち、アルベカシンに対するアセチル化能に変化は認められなかったが、リン酸化能が顕著に増加し、抗菌活性の低下が認められた。このとき、*aac(6')aph(2'')* および *aph3'A* の発現量に変化は認められなかった。

3. 考察

黄色ブドウ球菌におけるアミノグリコシド系抗生物質の耐性機構として、アミノグリコシド修飾酵素が知られている。アルベカシンは、その構造からゲンタマイシン高度耐性因子である二機能酵素 *aac(6')aph(2'')* のターゲットとなることが考えられるが、実際、二機能酵素を有するだけでは修飾反応の進行は非常に遅く、耐性は低レベルである。臨床分離 MRSA において、他の修飾酵素である *aph3'A* あるいは *aad4'4''* は、それ単独ではアルベカシンに耐性を付与しないが、*aac(6')aph(2'')* との組み合わせで耐性度がかさ上げされる傾向が伺える。しかし、アルベカシンの耐性レベルは、単純に強制的に修飾酵素を組み合わせで発現させても付与されないこと、そして、*in vitro* アルベカシン高度耐性 MRSA のアルベカシン修飾活性は親株と同レベルであることから、二機能酵素以外の MRSA 内に存在する別の因子あるいは環境が必要だと考えられる。また、臨床分離アルベカシン高度耐性株はリン酸化能のみが亢進しており、これが耐性化の原因の1つであると考えられる。現在、この MRSA によるアルベカシンリン酸化物の構造決定を行なうと同時に、*aac(6')aph(2'')* および *aph3'A* 遺伝子構造の解析および菌株の生化学性状に

についての解析を行なっている。以上のことより、MRSA のアルベカシン高度耐性化の条件は必ずしも1通りではなく、複数の条件が必要であることが示唆される。今後は、耐性遺伝子だけでなく、これらの可能性因子の同定、解析を行なっていく予定である。

4. まとめ

MRSA のアルベカシンの高度耐性化にはアミノグリコシド修飾二機能酵素 *aac(6')aph(2'')* 活性が必要であるが、それだけでは十分ではなく、MRSA 内に存在する別の因子が必要であることが示唆された。

5. 研究発表

1. Shibamura, M., Ishino, K., Sakamoto, N., Nose, K. : Accumulation of focal adhesion protein Hic-5 in the nucleus by hydrogen peroxide. *Acta Histochemical Cytochemistry* 34:259-264, 2001.

6. 知的所有権の取得状況

なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社