

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 生物活性物質部

研究者 石野 敬子

要旨

臨床分離アルベカシン高度耐性 MRSA の二機能酵素のリン酸化酵素触媒部位内にアルベカシン 2"リン酸化の促進、ゲンタミシンのリン酸化を抑制する変異を見出した。in vitro アルベカシン高度耐性株は増殖能の顕著な低下を示し、増殖、代謝系との関連が示唆された。

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4つの実験を行なった。

(1) 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 pAW8 ベクターに組み込み、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。これらについてミューラーヒントン II 培地を用い寒天希釈法により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℃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。また、*B.subtilis* を用い、修飾物の抗菌活性の測定を行なった。

(2) 臨床分離アルベカシン高度耐性株の解析 1：アルベカシンに対し 128μg/ml 耐性を示す臨床由来 MRSA の解析として、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 *B.subtilis* を用いた修飾物の抗菌活性の測定、NMR による修飾物の構造決定、シーケンスによる *aac(6')**aph(2'')* 遺伝子の塩基配列の決定、変異型二機能酵素の pAW8 内クローニングおよび RN4220 への発現、Northern 法により *aac(6')**aph(2'')* および *aph3'A* の mRNA レベルを検討し

た。耐性試験は、ミューラーヒントン II 培地を用いて寒天希釈法で試験した。また、GST 融合正常型および変異型二機能酵素の大腸菌内大量発現系を構築し、蛋白精製を行なった。

(3) 臨床分離アルベカシン高度耐性株の解析 2 : 同一患者同一部位由来の 2 種類の MRSA のうち一方がアルベカシン耐性を示した菌株の解析を行なった。SmaI 消化によるパルスフィールド電気泳動パターンによる遺伝子背景の比較、および二機能酵素遺伝子をプローブとした Southern ハイブリダイゼーション、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、Northern 法により *aac(6')aph(2'')* の発現を検討した。

(4) 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ン酸化酵素 *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 種類の修飾酵素を有さ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 II 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。

3. 研究成果

(1) 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 128 μ g/ml 耐性を示したが、アルベカシンに対しては 4 μ g/ml 耐性とどまった。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。両者に対するアセチル化活性は同等レベルを示した。しかし、アルベカシンリン酸化物は抗菌活性を完全に喪失するのに対し、アルベカシンアセチル化物は 10% の抗菌活性を有していた。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。

(2) アルベカシンに対し 128 μ g/ml 耐性を示す臨床由来 MRSA の解析を行なった。この菌株はゲンタマイシンに対しては 256 μ g/ml 耐性に留まった。アルベカシンおよびゲンタマイシンに対する修飾活性を検討した結果、アセチル化活性は共に通常レベルであったが、アルベカシンに対するリン酸化活性が増加し、ゲンタマイシンに対しては減少していた。アルベカシンリン酸化物を NMR により構造解析を行なった結果、2'' リン酸化物であることが示された。そこで *aac(6')aph(2'')* の塩基配列を決定したところ、2'' リン酸化酵素触媒領域内の保存された Ser-376-Asn へのアミノ酸置換を伴う点変異を見出した。さらにこの変異型 *aac(6')aph(2'')* をクローン化し正常型とリン酸化活性および耐性レベルを比較した結果、アルベカシンに対しては増加、ゲンタマイシンに対しては減少していた。現在、GST 融合二機能酵素の精製蛋白における基質特異性の確認を行なっている。また、クローンの耐性レベルはアルベカシンに対しては正常型 4 μ g/ml に対し変異型は 8 μ g/ml に上昇し、ゲンタマイシンに対しては 128 μ g/ml から 8 μ g/ml へと減少した。アルベカシンの耐性が親株レベルに達しなかったため、mRNA レベルを比較したところ発現の増加が認められた。

(3) 同一患者同一部位由来でアルベカシン耐性化を示した2種類のMRSA株の解析を行なった。両者は共にアデニル化酵素遺伝子 *aad4'4''* および二機能酵素遺伝子 *aac(6')aph(2'')* を有しているが、アルベカシンに対する耐性が4 μ g/mlと32 μ g/mlと全く異なっていた。そこで、アルベカシンに対する修飾能を検討した結果、アセチル化能およびリン酸化能の顕著な増強および二機能酵素の発現の上昇を示した。SmaI消化によるパルスフィールドゲル電気泳動パターンを比較したところ遺伝子背景はほぼ同じであることが示された。二機能酵素遺伝子をプローブとしたSouthernハイブリダイゼーションを行なったところアルベカシン耐性株ではサイズの異なる2箇所二機能酵素遺伝子の存在が認められた。現在、二機能酵素遺伝子挿入部位の同定およびプロモーター領域の解析を行なっている。

(4) *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、増殖能は減少していた。

4. 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、かつアセチル化物は抗菌活性を残存していることより、低レベルの耐性であると考えられる。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、MRSA内の特異な因子あるいは環境が必要だと考えられる。

今回、臨床由来のアルベカシン128 μ g/ml耐性MRSAの解析を行なった。多くの場合、アルベカシンの耐性レベルとゲンタマイシンの耐性レベルは相関するが、この菌株はゲンタマイシンに対する耐性は中程度に留まる特異なパターンを示した。結果、二機能酵素リン酸化酵素触媒部位内にアミノ酸置換を伴うような点変異が見出された。この変異は本来進行しにくいアルベカシンの2''リン酸化を促進し、容易なゲンタマイシンのリン酸化を低下させることが示され、耐性レベルはこれを反映したものであることが示された。このように臨床由来の二機能酵素においてアミノグリコシド間の基質特異性を変化させるような変異は初めての報告である。同時に二機能酵素遺伝子の過剰発現が認められ、その原因についても検討中である。

同一患者の同一患部から得られたアルベカシン耐性化MRSAは二機能酵素遺伝子の発現および活性が上昇していた。これらの菌株は遺伝子背景は同一であると考えられるが、異なる領域

に二機能酵素の挿入が確認された。発現上昇のレベルが 1 コピーの遺伝子の増加であるとは考えにくい。現在、二機能酵素遺伝子挿入領域をクローニングし、転写制御を中心に解析中である。

in vitro によりアルベカシン耐性化した MRSA 株は共通して増殖能の顕著な低下を示した。このことはアルベカシン耐性と増殖あるいは代謝系との関連を示唆している。今後、増殖、代謝に関わる遺伝子機能との相関を検討する予定である。

以上のことより、MRSA における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予想された。今後は、既知の耐性遺伝子に限らず、これらの可能性因子の同定、解析を行なう予定である。

5. まとめ

今回、アルベカシン耐性因子として、アルベカシンの 2" リン酸化を亢進させるような変異型二機能酵素の存在が示された。これは、臨床分離株において 2 種類のアミノグリコシドに対するリン酸化活性を変化させる変異としては初めての報告である。また、MRSA における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予想される。

6. 研究発表

誌上発表

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.
2. 堀田国元、土崎尚史、石野敬子。MRSAのアルベカシン耐性化はなぜ進行しないのか。月刊薬事、44, 1263-1267、2002
3. Ishino, K., Fukazawa, H., Shikano, M., Ohba, M., Kuroki, T., Uehara, Y. : Enhancement of anchorage-Independent Growth of Human Pancreatic Carcinoma MIA PaCa-2 Cells by Signaling from PKC to MAP Kinase. *Molecular Carcinogenesis*, 34, 180-186, 2002
4. Shibamura M., Kim-Kaneyama JR., Ishino K., Sakamoto N., Hishiki T., Yamaguchi K., Mori K., Mashimo J. and Nose K. Hic-5 Communicates between Focal Adhesions and the Nucleus through Oxidant-Sensitive Nuclear Export Signal. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 1158-1171, 2003

口頭発表

1. 石野敬子、深澤秀輔、福田恵子、上原至雅：ホルボールエステルによる Ki-ras 変異ヒト膵臓癌由来 MIA-PaCa 細胞の足場非依存性増殖の促進機構、日本薬学会第 121 年会、札幌、2001 年 3 月
2. 石野敬子、堀田国元：MRSA の ABK 耐性化はなぜ進行しないか：耐性因子 aac(6)/aph(2") の MSSA へのクローン化による検討、第 49 回日本化学療法学会総会、横浜、2001 年 5 月
3. 石野敬子、深澤秀輔、大場基、黒木登志夫、上原至雅：ヒト膵臓癌におけるホルボールエステルによる足場非依存性増殖のシグナル伝達、日本癌学会第 60 回総会、横浜、2001 年 9 月
4. 堀田国元、土崎尚史、石野敬子、朴春成、菊池賢、戸塚恭一：黄色ブドウ球菌におけるアミノグリコシド修飾酵素遺伝子と耐性の相関性からみたアルベカシンの特異性、第 50 回日本化学療法学会総会、神戸、2002 年 5 月
5. Hotta,K., Tsuchizaki,N., Ishino,K., Saito,F., Wada,A., Arakawa,Y. Arbekacin, a semisynthetic aminoglycoside, continues to be a good anti-MRSA drug in Japan? 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, U.S.A. 2002 年 9 月
6. Ishino,K., Tsuchizaki,N., Hotta,K. Relationship between Aminoglycoside(AG) Resistance and AG Modifying Enzyme Gene Profiles in MRSA. 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Tsukuba, Japan 2002 年 10 月
7. 知的所有権の取得状況
なし