

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担課題 グラム陽性菌の新型耐性機構に関する研究

研究分担者 山本友子（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学・教授）
研究協力者 高屋明子（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学・准教授）
佐藤慶治（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学・助教）

研究要旨

この研究では、肺炎球菌の新型のテリスロマイシン耐性機構を明らかにした。すなわち、従来よく知られた外来性メチル化酵素 ErmB による 23S rRNA の修飾に加えて、内因性メチル化酵素 RlmA と RlmCD の欠損によりテリスロマイシン耐性をもたらすことを見出した。rRNA と薬剤の結合安定性を構造エネルギー計算により導きだし、耐性化の分子基盤を明らかにした。一方、リネゾリドは日本ではじめて承認された VRE 感染症薬、4 番目の抗 MRSA 薬である。本研究では、国内の臨床より分離されたリネゾリド耐性ブドウ球菌の耐性機構について研究を行い、rRNA の変異の蓄積が耐性の上昇をもたらすこと、さらに内因性メチル化酵素 RlmN の欠損が耐性に関連することを明らかにした。

A. 研究目的

呼吸器感染症の主要な起因菌である肺炎球菌の多剤耐性化が進行し、なかでも繁用されるマクロライド系抗菌薬に対する高度耐性化が深刻な問題となっている。テリスロマイシン (TEL) はマクロライド高度耐性菌にも有効なケトライド系抗菌薬で、マクロライド耐性肺炎球菌性肺炎の治療に使用されてきたが、既に欧米では TEL 低感受性肺炎球菌の増加と高度耐性菌が報告されている。一方、リネゾリド(LZD)は日本ではじめて承認された VRE 感染症薬(2001 年)、4 番目の抗 MRSA 薬(2007 年)である。欧米ではすでに高度耐性を含む耐性菌の分離が報告されていることから我が国での出現と増加が懸念されている。これらの耐性菌の増加を防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる事が急務となっている。本研究では、肺炎球菌の TEL 耐性化と広範なグラム陽性菌の LZD 耐性化の現況を明らかにし、新型耐性機構と耐性

因子の伝播機構の解明をめざす。

B. 研究方法

1. 薬剤：TEL は、ケテック錠（サノフィ・アベンティス）から抽出後、再結晶化した。構造は C-13NMR により確認し、力価は、ATCC29213 株を用いて MIC 測定とディスク拡散法によって評価した LZD は Pfizer より提供された。その他の薬剤は市販のものを用いた。
2. PCR, DNA 塩基配列決定は定法に従った。
3. Primer extension 法による rRNA メチル化の検討は、我々の確立した方法を用いた(Antimicrob. Agents Chemother. 2013, **57**:3789-3796)。

倫理面への配慮

本研究で得られる菌株は、分離した医療機関において、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。また、研究成果の発表にあたっては、患者の氏名などは一切公表しないこととする。

C. 研究結果

(1) 新型のテリスロマイシン高度耐性機構

先行した2年間の研究により肺炎球菌において内因性23S rRNA修飾酵素RlmAによる748位のグアニン(G748)のメチル化がケトライド系抗菌薬テリスロマイシン(TEL)の抗菌活性に深く関与することを見出した(Takaya et al., 2013, AAC 57: 3789-3796)。さらにG748に隣接するU747を修飾するRlmCDメチル化酵素の欠損がTEL耐性をもたらすことを見出した。そこで今年度はRlmAとRlmCDメチル化酵素のTEL耐性における役割を解明した。図1に示したように、RlmCDによるU747のメチル化は、RlmAによるG748のメチル化を促進した。

図2に構造エネルギー計算により算出したメチル化rRNAとTELの結合安定性を示した。この結果に基づき、内因性rRNAメチル化酵素によって修飾された23SrRNAとTELとの結合について下記のように推論することができた。

TELのアルキル-アリアル基はA752と結合する。

RlmAはG748を修飾する。付加されたメチル基はアルキル-アリアル基を押し出し、A752との相互作用をより安定化する。

RlmCDはU747をメチル化する。これはRlmAによるG748メチル化を促進するRlmA変異によるメチル化の喪失は、TELとA752との結合を弱め、耐性をもたらす。

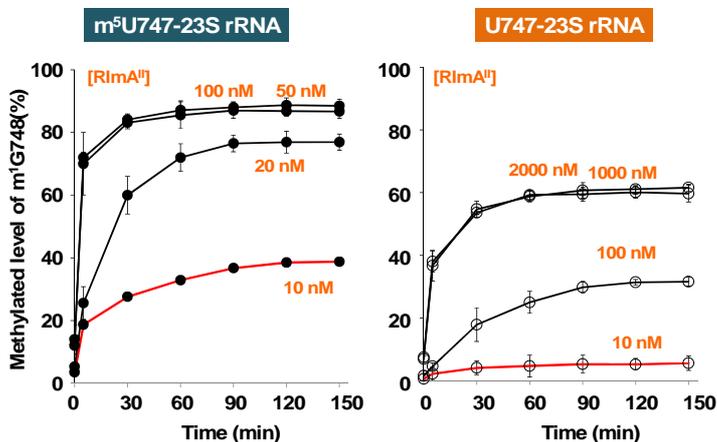


図1 RlmCDによるU747メチル化は、RlmAによるG748メチル化を促進する

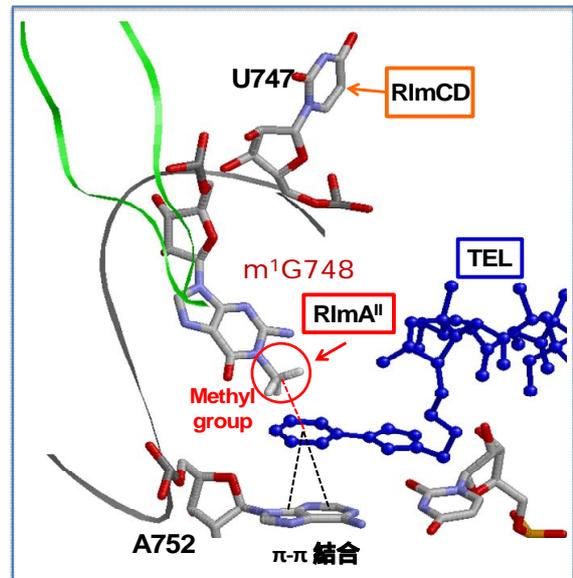


図2 RlmA^{II}とRlmCDによる23S rRNAのメチル化とTELの結合

(2) ブドウ球菌のリネゾリド耐性機構

先行研究において2014年に国内の1臨床機関において分離された6株のLZD耐性coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS)について耐性関連因子を解析し、rRNAの変異G7526Uの蓄積が耐性の高度化をもたらすことを明らかにした。今年度は、新たに内因性rRNA A2503をメチル化する酵素RlmNの欠損がLZD耐性に関連することを明らかにした。図3に構造エネルギー計算より算出したメチル化rRNAとLZDの結合安定性を示した。これに基づき、内因性rRNAメチル化酵素によって修飾された23SrRNAとLZDとの結合について下記のように推論することができた。

LZDはU2506と結合する。

内因性メチル化酵素RlmNはA2503を修飾する。

この修飾はLZDのU2506との相互作用に影響する。

RlmNの変異はLZDと標的U2506との結合を弱め、耐性をもたらすと考えられる。

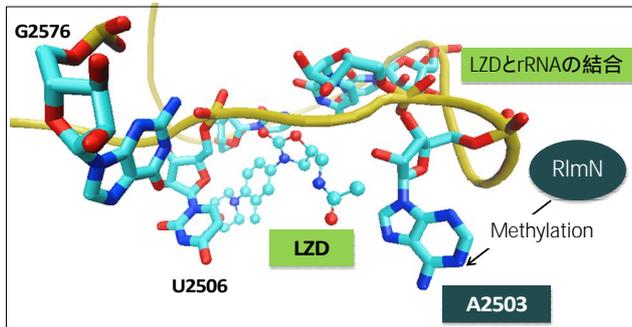


図3 ブドウ球菌のRlmNによりメチル化されたrRNAとリネゾリド(LZD)の結合安定性

D. 考察

(1) RlmCD とそれに続く RlmA^{II} による段階的な rRNA 修飾が TEL の標的への結合を強め、肺炎球菌の TEL 感受性に寄与すると推論できる。

(2) 臨床より分離された CNS の LDZ 耐性は、標的の rRNA の変異に蓄積と RlmN の欠損によりもたらされたと考えられた。内因性 RlmN による rRNA の修飾が、LZD の結合すなわち LZD 感受性に関与すると推論できる。

E. 結論

肺炎球菌は先行研究で明らかにした外来性 *ermB* メチル化酵素遺伝子の獲得と、本研究で明らかにした 23S rRNA の Hairpin35 領域の RlmCD と RlmA メチル化システムの欠損によってもたらされることが明らかとなった。本年度の研究で解明した TEL の新型耐性機構の解明は、ケトライド耐性肺炎球菌の出現の予知情報の提供に貢献するものである。さらに本研究結果は、国内の臨床において LDZ 耐性化が進行していることを明らかにした。23S rRNA を標的とする抗菌薬の作用には、内因性の修飾酵素による rRNA のメチル化が深くかかわっていることを明らかにした。本研究結果はリボソーム標的抗菌薬に共通する新型耐性機構を明らかにしたと同時に、新規リボソーム標的抗菌薬開発に重要な理論を提供するものである。

F. 健康危険情報

国内の臨床において LDZ 耐性化が進行している。それらを防止する為に調査と監視を継続しつつ、実効ある対策が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Molecular characterization of linezolid-resistant CoNS isolates in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(11) Doi:10.1093/jac/dku443

2. 学会発表

- 1) 高屋明子．グラム陽性菌の内因性 rRNA 修飾と薬剤耐性. *感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2014*, 2014
- 2) 高屋明子, 木村旭, 佐藤慶治, 石和田稔彦, 渡辺正治, 松井真理, 柴山恵吾, 山本友子. 臨床由来コアグラウゼ陰性ブドウ球菌のリネゾリド耐性機構. *第43回薬剤耐性菌研究会*, 2014
- 3) 庄司竜麻, 高屋明子, 木村聡, 鈴木勉, 佐藤慶治, 山本友子. 肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する rRNA 内因性修飾. *第97回日本細菌学会関東支部総会*, 2014
- 4) Takaya A, Kimura Y, Sato Y, Yamamoto T: Genetical Assessment of Linezolid Resistance Mechanisms in *Staphylococcus capitis* Isolated Clinically. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014
- 5) 庄司竜麻, 高屋明子, 佐藤慶治, 山本友子. 肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する rRNA 段階的修飾. *第87回日本細菌学会総会*, 2014
- 6) 庄司竜麻, 高屋明子, 鈴木勉, 木村聡, 佐藤慶治, 山本友子. 肺炎球菌の rRNA 段階的修飾によるテリスロマイシン感受性. *インターラボセミナー*, 2014