

## 【総説】

## キノロン系薬およびエフラックスポンプ阻害薬の開発

星野 一 樹

第一製薬株式会社創薬第一研究所\*

(平成 16 年 5 月 7 日受付・平成 16 年 6 月 15 日受理)

主要な病原細菌のゲノム情報については、現在ほとんどのものが公開情報として利用可能であり、細菌関連研究において時代はすでにポストゲノムに入っている。このような環境での新規な抗菌薬開発においては、抗菌薬の標的検証、耐性化の動向把握、標的蛋白質構造と抗菌薬化合物との分子レベルでの相互作用検証、さらには標的蛋白質構造を元にした *in silico* での阻害化合物スクリーニング等の研究プロセスにおいてゲノム情報が活用されている。われわれの取り組んできたキノロン系薬あるいはエフラックスポンプ阻害薬開発研究においても、標的の菌種間分布の検証、耐性分布の検証、標的阻害の効果推定等にゲノム情報を活用してきた。近年、膜蛋白質の結晶化技術も進歩してきており、構造生物学的アプローチによる新たな阻害化合物リードの発見が期待される。

**Key words:** post-genome, quinolone resistance, efflux pump, *Pseudomonas aeruginosa*

われわれの主薬理面での研究視点は主に耐性菌対策である。キノロン系薬の標的酵素は細菌の II 型トポイソメラーゼに分類される DNA ジャイレースならびにトポイソメラーゼ IV であり、当該酵素が変異することにより菌は耐性化する。さらに、1993 年の緑膿菌における Mex 系薬剤排出ポンプの発見を引きがねに、グラム陰性菌におけるキノロン耐性機構として薬剤排出ポンプが注目されてきている。

一方、ヒトゲノム解析に並行して、臨床で問題とされる病原細菌のゲノム解析が全世界で進められた結果、1995 年のインフルエンザ菌ゲノム解析結果の公表<sup>1)</sup>を皮切りに、主要な病原細菌のゲノム情報は現時点では誰もが利用できる環境がほぼ実現した。さらに、蛋白産生技術ならびに X 線結晶解析技術・設備の飛躍的な進歩に伴い、細菌の生育に必須な蛋白質の立体構造情報が日を追うごとに明らかにされてきており、当該情報を元にしたバーチャルスクリーニングあるいはドラッグデザインが日常の研究活動の中で実現できる環境が整ってきている。

このようなポストゲノム時代での研究環境変化の中で、キノロン系薬の耐性機構を検証し創薬に活かしていく着眼点としては以下の項目が挙げられる。

- ① 標的酵素・薬剤排出耐性機構の菌種間保存性とその分布検証や耐性変異の分布解析。
- ② 標的酵素・排出蛋白の蛋白構造に基づくドラッグデザインの展開。

本稿ではキノロン系薬およびエフラックスポンプ阻害薬に関連するわれわれの研究活動経緯を振り返ることで、「ポストゲノム時代の創薬」について話題提供する。

## I. ポストゲノム時代における研究アプローチの変化

抗菌領域に関しては、市場における既存抗菌薬の充足度合いならびに薬剤コストの面から、遺伝子治療といった現時点で医療コストの高いアプローチの適用は考えにくい。そのため、抗菌薬開発においてポストゲノム時代の研究アプローチとしては、新しい特性または作用機作を有する抗菌薬の探索、あるいは臨床における耐性変異・問題菌種の解析に、ポストゲノムでの新しい技術・情報を取り入れることになる。従来の研究手法の幅を広げ、より完成度の高い治療オプション提供を実現することを目指している。

ポストゲノム時代での抗菌創薬を考えるに際し、以下の観点で整理することができる。これらトピックスのうちのいくつかにつき、われわれならびに他研究機関での研究事例を紹介する。

### 1. 情報的側面での変化

- ① 主要病原細菌ゲノム情報の公開
- ② 蛋白質立体構造情報の登録・公開の指数的増加
- ③ WEB 上での各種解析ツール提供
- ④ バイオインフォマティクスツールの充実

インターネットが瞬く間に爆発的な勢いで普及してきた現在において、公開された情報をいかに活用するか、あるいは活用できるかという点が重要である。また、構造生物学的アプローチを採る場合には、どのようなインフォマティクスツールを利用するかということによって、得られる結果の精度や選択肢がわかる。

\*東京都江戸川区北葛西 1 16 13

Organism	Amino acid sequence in the QRDR	
		<b>Polar</b>
<i>E. coli</i>	67- ARVGDVIGKYHPHGDS	83 SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQ -106
<i>P. aeruginosa</i>	67- . . . . .	83 T . . . . . -106
<i>H. influenzae</i>	68- . . . . .	87 S . . . . . -107
<i>S. aureus</i>	68- . . I . . . M . . . . .	84 SSI . EAM . . . . D . . Y . . P . . . . -107
<i>S. pneumoniae</i>	65- . . IT . . M . . . . .	81 SSI . EAM . . . . WW . Y . . . . . H -104
<i>E. faecalis</i>	68- . . I . . . M . . . . .	84 S I . ESM . . . . . Y . A . . . . H -107
		<b>Hydrophobic</b>
<i>M. tuberculosis</i>	74- . . S . AETM . N . . . . .	90 ASI . . SL . . . . . W . . . . P . . . . -113

Fig. 1. Amino acid sequence in the quinolone-resistance-determining region of GyrA in different species and its comparison with *M. tuberculosis*.

Table 1. Bacteria in which the topoisomerase IV gene was not identified in total genome sequences

Gram-positive, aerobes:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium leprae</i>
Gram-negative, aerobes:	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter jejuni</i>
anaerobes:	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>
spirochetes:	<i>Treponema pallidum</i>

## 2. 技術的側面での変化

- ① 遺伝子破壊
  - ② PCR/real-time 定量 PCR 利用による発現解析
  - ③ Oligonucleotide Ligation Assay(OLA), Non-Isotopic RNase Cleavage Assay(NIRCA™) 等による変異解析
  - ④ DNA array
  - ⑤ 2D-PAGE と Proteomics
  - ⑥ SBDD(Structure Based Drug Design)
  - ⑦ 共結晶化による阻害薬結合状態の確認 ドラッグデザイン( Virtual Screening 用ソフトウェアの進歩)
- ゲノム情報を材料に, 上記のような生化学的技術や生物物理学的アプローチを組み合わせるにより, 細菌の生理的反応・変化を迅速かつ効果的に明らかにし, ドラッグデザインに生かすことが可能となってきた。

## II. キノロン系薬研究

### 1. 公開ゲノム情報での標的分布検証

現在, ほとんどの主要病原細菌のゲノム情報は, 複数

のインターネットソースからアクセス可能である。また, 商用のインフォマティクスツールの利用により, 一度の検索で複数の公開情報の最新情報を整理することも可能である。当該環境下では, 新たな抗菌標的の蛋白を設定する際に, その標的を阻害する薬剤が存在した場合に, はたしてブロードスペクトラム型の抗菌薬になり得るのか, あるいはナロースペクトラム型の抗菌薬となるのか, 標的の蛋白のアミノ酸配列相同性を検証することにより推察することができる。さらに, 当該標的蛋白のカウンターパートがヒトに存在するか否かを遺伝子配列レベルで検証することにより, 選択性を考える際の参考となる。

ゲノム情報からの抗菌薬標的の分布検証の例を Fig. 1 に示す。結核菌のゲノム情報から, キノロン系薬の標的蛋白である DNA ジャイレースの配列を確認すると, キノロン耐性決定領域いわゆる Quinolone Resistance Determining Region(QRDR) 内の, 大腸菌では 83 位 Ser にあたるアミノ酸が Ala であることが確認される。一方, 大腸菌における GyrA 変異とキノロン系薬の MIC 値変化の関係から, Ser83 の Ala への変異が耐性を上げることが確認されている<sup>2)</sup>。すなわち, 結核菌の DNA ジャイレースは, 野生型でありながらキノロン耐性型の変異を有していることが示されているのである。また, DNA ジャイレースと並んでキノロン系薬の標的酵素であるトポイソメラーゼ IV 遺伝子の染色体上の分布を調べることにより, Table 1 に示す微生物にはトポイソメラーゼ IV 該当遺伝子が存在しないことが明らかとなる。すなわち, トポイソメラーゼ IV に特異的に作用する抗菌薬が見出された場合, これら微生物には有効性が期待できないことが推察されるのである。

### 2. 標的変異の臨床分離株における網羅的解析

次に遺伝子解析の簡便化に伴い適用されてきている手

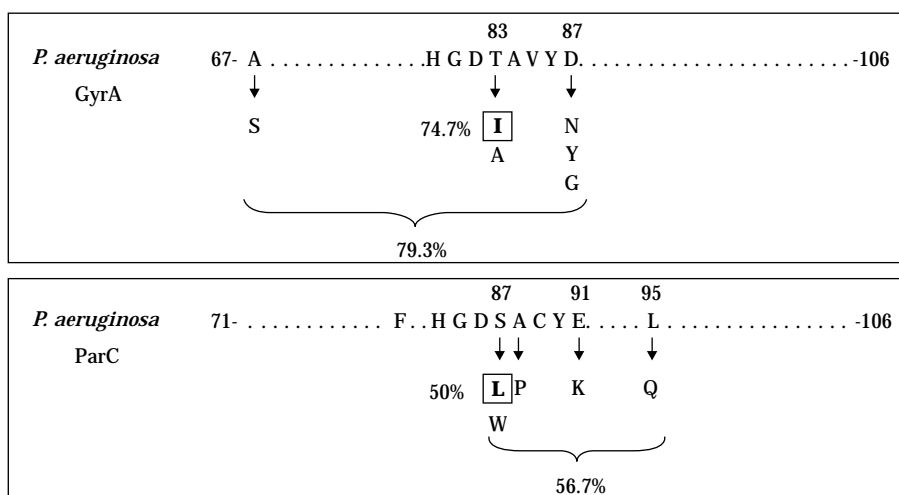


Fig. 2. Distribution of mutations in the quinolone-resistance-determining region of GyrA and ParC in clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Table 2. Inhibition of quinolone agents on DNA topoisomerases from wild-type and quinolone-resistant mutant of *P. aeruginosa*

Drug	IC <sub>50</sub> ( μg/mL )					
	DNA gyrase			Topo IV		
	Wild	T83I	Ratio*	Wild	S87L	Ratio*
Sitafloxacin	0.42	1.85	4.4	2.12	8.62	4.1
Levofloxacin	0.88	10.39	11.8	4.96	49.18	9.9
Ciprofloxacin	0.55	8.29	15.1	4.06	33.00	8.1
Sparfloxacin	0.75	17.49	23.3	6.14	52.31	8.5

\* Data is expressed as T83I/Wild or S87L/Wild ratio.

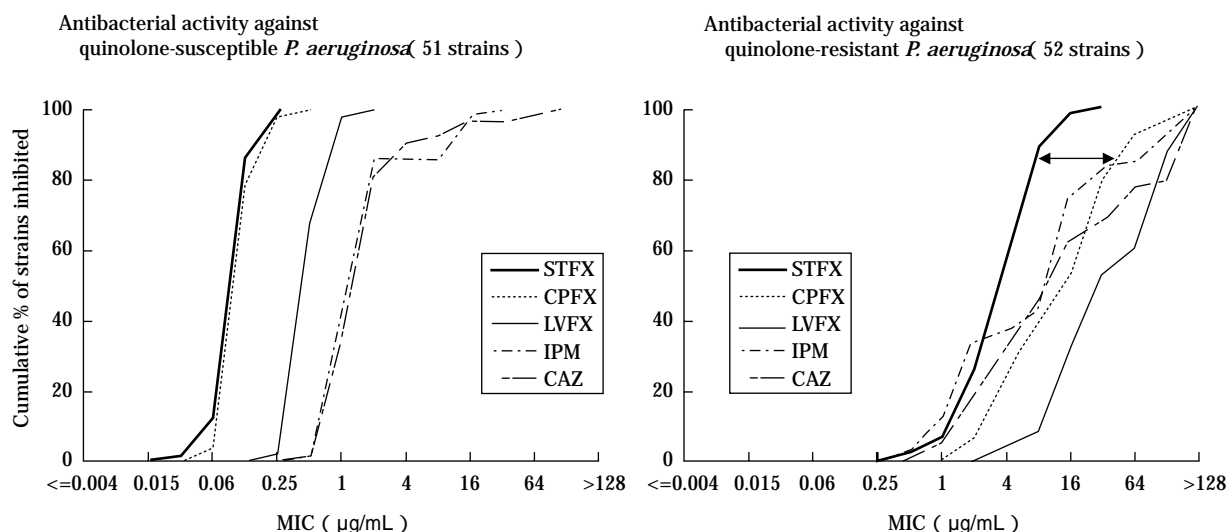


Fig. 3. Antibacterial activity of quinolone agents against clinical isolates of *P. aeruginosa*.

法として、多数の臨床分離株での標的変異分布を網羅的に解析する例を示す。第4回レボフロキサシン(LVFX)感受性調査にて分離された全513株の緑膿菌から、LVFXのMIC値が4 μg/mL以上の菌株150株を選抜し、キノ

ロン耐性決定領域内の変異を解析した例をFig. 2に示した<sup>3)</sup>。この結果より、臨床分離株において、GyrAでは83位ThrがIleに置換する変異が最も多く(74.7%)、ParCでは87位SerがLeuに置換する変異が多い(50%)こと

Table 3. Contribution of MexAB-M efflux pump for quinolone resistance in bacterial topoisomerase mutations

<i>gyrA</i> or <i>parC</i> mutation	MIC ( µg/mL ) for LVFX		
	AB-M ( +++ ) ( <i>nalB</i> mutant )	AB-M ( + ) ( wild type )	AB-M ( - ) ( <i>oprM</i> : : Hg )
None	2	0.25 ( 8 )*	0.015 ( 128 )
<i>gyrA</i> ( Thr83 Ile )	8	2 ( 4 )	0.125 ( 64 )
<i>gyrA</i> ( Thr83 Ile ) , <i>parC</i> ( Ser87 Leu )	32	4 ( 8 )	0.5 ( 64 )
<i>gyrA</i> ( Thr83 Ile ) , <i>parC</i> ( Ser87 Leu )	128	16 ( 8 )	2 ( 64 )
<i>gyrA</i> ( Asp87 Tyr )			

\* Folds increasing in antibacterial activity compared to *nalB* strain are shown in parentheses.

Table 4. Frequency of LVFX-resistant mutants in strains with efflux pump operon deletions

Strain	Pump status	LVFX MIC ( µg/mL )	Frequency of LVFX-resistant mutants*
PAM1020	wild type	0.25	$2.4 \times 10^{-7}$
PAM1554	<i>mexAB-M</i>	0.015	$2.4 \times 10^{-7}$
PAM1409	<i>mexCD-J</i>	0.25	$2.4 \times 10^{-7}$
PAM1623	<i>mexEF-N</i>	0.25	$2.4 \times 10^{-7}$
PAM1626	<i>mexAB-M</i> , <i>mexCD-J</i> , <i>mexEF-N</i>	0.015	$< 1 \times 10^{-11}$

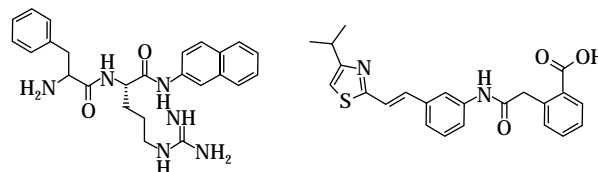
\* The frequency of resistance to LVFX was determined at 1 µg/mL.

が確認された。

当該耐性変異に対しても有効であることが耐性菌対策に通じる。Table 2 は当該変異酵素に対する各種キノロン系薬の阻害活性を比較したものである<sup>3)</sup>。変異による耐性度変化はキノロン系薬によって異なることが明らかとなっており、シタフロキサシン (STFX) では耐性変異の影響を受けにくいことが確認されている<sup>4)</sup>。この傾向は臨床分離株に対する抗菌活性に反映され (Fig. 3), キノロン感受性のポピュレーションとキノロン耐性のポピュレーションとの比較において、耐性ポピュレーションでの抗菌力の差につながる事が示された。

### 3. 標的の立体構造解析進展と応用可能性

ポストゲノム時代において遺伝子情報と並んで着目されるのは、標的蛋白の構造解析とそれに基づいたドラッグデザインの展開である。キノロン系薬の標的酵素である DNA ジャイレースは分子量も大きく、また DNA との結合も重要な要素であるため、結晶構造解析には難しさが伴う。現在までに大腸菌では GyrA の 59 kDa フラグメント、GyrB の 43kDa あるいは 24kDa フラグメントが結晶解析されており、GyrB の構造は SBDD に活用されている<sup>5-7)</sup>。解析された構造にキノロン耐性変異部位を当てはめると、キノロン系薬相互作用部位の立体構造を検証することが可能となる。興味深いことに、構造が既存のキノロン系薬と異なる誘導体において、耐性変異部位が既存キノロン系薬と立体構造上異なる部位に存在することが確認されている<sup>8)</sup>。言い換えると、既存キノロン系



Broad spectrum EPI: MC-207, 110      MexAB-M specific EPI: DA-3849

Fig. 4. Chemical structure of efflux pump inhibitors (EPIs)

薬と異なる相互作用部位に結合するキノロン誘導体をデザインすることが可能であることが示唆されている。

### 4. DNA array あるいは proteomics 解析による抗菌性物質の作用機作推定

ポストゲノムで注目されたアプローチとして、DNA array と proteomics が挙げられる。DNA ジャイレースを標的とするキノロン系薬ならびにノボピオシンでの DNA array ならびに proteomics 解析実施例が報告されている<sup>9,10)</sup>。どちらのケースにおいても、キノロン系薬の作用により DNA 修復関連遺伝子の変化が確認されるのに対し、同じ DNA ジャイレース阻害であっても、ノボピオシンでの変化は特異性を見出しにくいものであった。このように、抗菌性物質の作用機作あるいは作用様式を推定する際にこれら技術の活用は有効であり、種々の場面で応用されている。

### III. エフラックスポンプ阻害薬研究

キノロン耐性を克服する手段として、上述の標的変異に対して有効な誘導体を見出すことに加え、排出系による耐性に対する回避が有効である。われわれはそのためのアプローチとしてエフラックスポンプ阻害薬の探索を試みた。ポストゲノムの視点でエフラックスポンプ阻害薬研究の過程を整理する。

#### 1. ゲノム情報から推測する標的の多様性推定

緑膿菌のゲノム情報から RND タイプの排出系が 10 種存在することが確認されている<sup>11)</sup>。この事実は細菌の保有する耐性予備要因として考えると脅威である。しか

Table 5. Inhibitory profile of MexAB-M specific efflux pump inhibitor( ABS-EPI ) against Mex mutants

Strains	Expression			MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )					
				LVFX			AZT		
	ABM	CDJ	EFN	alone	+ ABS-EPI <sup>a</sup>	( fold MIC ) <sup>b</sup>	alone	+ ABS-EPI <sup>a</sup>	( fold MIC ) <sup>b</sup>
PAM1020	+			0.25	0.125	( 2 )	2	0.5	( 4 )
PAM1032	+++			2	0.125	( 16 )	32	1	( 32 )
PAM1723	+++			1	0.125	( 8 )	32	2	( 16 )
PAM1738		+++		2	2	( 1 )	0.25	0.25	( 1 )
PAM1753			+++	2	2	( 1 )	0.25	0.25	( 1 )
PAM1626				0.03	0.03	( 1 )	0.25	0.25	( 1 )

<sup>a</sup>ABS-EPI ( DA-3849 ) was added at 10  $\mu\text{g/mL}$ .

<sup>b</sup>Folds increasing in antibacterial activity with ABS-EPI addition are shown in parentheses.

しながら、主要ポンプとして知られている Mex 系ポンプ遺伝子のノックアウト変異株を構築し、当該株からの耐性菌出現頻度を検証した結果、主要 Mex 系を阻害する化合物が得られれば、キノロン系薬との併用により、抗菌薬の活性増強と耐性菌出現抑制双方に有効であることが予測された( Table 3, 4 )<sup>2)</sup>。標的蛋白遺伝子のノックアウトは、生育に必須な標的遺伝子でない限り適用可能であり、標的阻害の生理的意義を明らかにするために有効である。ただし、ノックアウトすなわち 100% 阻害をみていることには留意する必要があり、スクリーニングで得られる化合物でそこまでの阻害を達成し得る保証はなく、標的の質を判断する際に注意が必要である。

## 2. ポンプ阻害化合物スクリーニング

ポストゲノムの進展と並行して、最終ゴールである阻害薬獲得を目指し、製薬企業あるいはバイオベンチャーで展開されてきているのが High Throughput Screening ( HTS ) である。われわれも数十万化合物に及ぶ低分子化合物の中より、緑膿菌の排出系に阻害活性が確認される 2 系統の阻害物質を見出している( Fig. 4 )。ひとつは、その阻害が Mex 系ポンプに広く阻害を示す誘導体であり、他方は主要薬剤排出系である MexAB 系に特異的な誘導体である<sup>13,14)</sup>。MexAB 系に特異的な阻害物質の阻害特異性を確認する際にも、変異株パネル構築のため遺伝子ノックアウトの技術が活用されており、薬剤スクリーニングにおいて有効なツールとなっている( Table 5 )。

## 3. 標的の立体構造解析進展と応用可能性

近年、緑膿菌 Mex 系と同分類である大腸菌の AcrAB 系ポンプの RND コンポーネントである AcrB 蛋白の結晶構造が解明された<sup>15)</sup>。トランスポーターの生理的機構解析という点で大きな注目を集めているとともに、排出基質薬剤の認識部位の解析も進んできている。in silico でのバーチャルスクリーニングによる阻害化合物スクリーニングが検討され始めており、技術革新のスピードが着目される SBDD アプローチによる創薬が始動している。

## IV. おわりに

キノロン系薬のような化合物オリエンテッドな抗菌薬創薬におけるゲノム情報の活用は、比較的早期より浸透してきており、本稿で紹介したような活用例が多く報告されてきている。一方、新規な化合物探しという視点で考えると、ポストゲノム時代においては、遺伝子情報、遺伝子関連技術の活用とともに、HTS ならびに SBDD 技術も統合した創薬の基盤整備が肝要である。これまで人類が手にしてきた抗菌薬は多種にわたるが、それでも耐性菌問題は残されており、われわれはこのようなアンメットニーズに応え得る薬剤の開発を新しい技術を取り入れつつ推進していきたい。

## 文 献

- 1) Fleischmann R D, Adams M D, Merrick J M, et al: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269: 496 ~ 512, 1995
- 2) Yonezawa M, Takahata M, Narita H, et al: Analysis of the NH2-terminal 83rd amino acid of *Escherichia coli* GyrA in quinolone-resistance. Microbiol Immunol 39: 243 ~ 247, 1995
- 3) Akasaka T, Tanaka M, Sato K, et al: Type II Topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: Role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 45: 2263 ~ 2268, 2001
- 4) Kitamura A, Hoshino K, Sato K, et al: Contribution of the C-8 substituent of DU-6859a, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA gyrase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 39: 1467 ~ 1471, 1995
- 5) Morais Cabral J H, Jackson A P, Liddington R C, et al: Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. Nature 388: 903 ~ 906, 1997
- 6) Brino L, Urzhumtsev A, Moras D, et al: Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. J Biol Chem 275: 9468 ~ 9475, 2000
- 7) Holdgate G A, Tunncliffe A, Timms D, et al: The entropic penalty of ordered water accounts for weaker

- binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* 36: 9663 ~ 9673, 1997
- 8) Macinga D R, Renick P J, Morris T W, et al: Unique biological properties and molecular mechanism of 5,6-bridged quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2526 ~ 2537, 2003
  - 9) Gmuender H, Kuratli K, Evers S, et al: Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res* 11: 28 ~ 42, 2001
  - 10) Bandow J E, Brotz H, Hecker M, et al: Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 948 ~ 955, 2003
  - 11) Stover C K, Pham X Q, Olson M V, et al: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959 ~ 964, 2000
  - 12) Lomovskaya O, Lee A, Lee V J, et al: Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1340 ~ 1346, 1999
  - 13) Lomovskaya O, Warren M S, Lee V J, et al: Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 105 ~ 116, 2001
  - 14) Nakayama K, Ishida Y, Watkins W J, et al: MexAB-OprM-Specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: Discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 4201 ~ 4204, 2003
  - 15) Murakami S, Tamura N, Yamaguchi A, et al: Extramembrane central pore of multidrug exporter AcrB in *Escherichia coli* plays an important role in drug transport. *J Biol Chem* 279: 3743 ~ 3748, 2004

## Research on quinolones and efflux pump inhibitors in the post-genomic era

Kazuki Hoshino

New Product Research Laboratories I, Daiichi Pharmaceutical, Co. Ltd.,

1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo, Japan

Complete genome sequences of major pathogenic bacteria have been disclosed and available in the public domain for a number of years now, so we can consider ourselves in the post-genomic era. Bacterial genome information has been widely used in research to support the search for new antibacterial agents by validating new targets for antibacterial agents, by analysing the distribution of these targets among species and by surveying trends in the emergence of resistance mutants. Moreover, we can utilize information taken from bacterial genomes to analyze drug-target interactions based on structural details of the target protein deduced from its gene sequence and associated *in silico* screening for potential inhibitors against the target protein. In our research efforts on quinolones and efflux pump inhibitors, we have used genome information to assess the target distribution, to analyze trends in resistance development and to estimate the effect of target inhibition. Recently, protein crystallization technology has improved greatly, even for membrane-associated proteins, and therefore a structural biological approach may possibly assist in the discovery of new lead compounds that inhibit proteins which were impossible to study in the past.