

【総 説】

キノロン系薬の作用機序と耐性機構研究の歴史

平 井 敬 二

杏林製薬株式会社創薬研究本部*

(平成 17 年 2 月 4 日受付・平成 17 年 4 月 7 日受理)

ニューキノロン薬の先駆けとなったノルフロキサシンが臨床現場で使用され始めて 20 年以上が経つが、その後も数多くのニューキノロン薬が開発されてきている。これらの新薬の開発と並行してキノロン薬の作用機序、耐性機構の研究も飛躍的に進歩してきた。本総説ではわれわれの研究内容も含め、キノロン薬の作用機序、耐性機構研究の約四半世紀の歴史を紹介する。

①作用機序：標的酵素(DNA ジャイレース, トポイソメラーゼ IV)研究：われわれがキノロン研究を開始した 1975 年当時ではキノロン薬の詳細な作用メカニズムはまだ不明であったが、ノルフロキサシンを発見したのと同時期にキノロン薬が DNA ジャイレースに作用することが報告された。その後 DNA ジャイレースの研究が進み、作用様式(キノロン・DNA・酵素の 3 者複合体)、抗菌力との相関、耐性化機構(耐性決定領域での変異)などが明らかとなった。さらに DNA ジャイレース以外に新たな標的酵素としてトポイソメラーゼ IV が 1990 年に見出され、その研究からグラム陽性菌に対する抗菌力、高度耐性化との関連が明確となった。

②膜透過性(排出機構)研究：ノルフロキサシンを用いた研究から、大腸菌をはじめとする腸内細菌では外膜のポーリンと呼ばれる透過孔を介してキノロン薬が菌体内に透過することを明らかにした。一方、緑膿菌におけるノルフロキサシン耐性機構の解析から膜透過性に関与する *nfxB*, *nfxC*, *nalB* 変異遺伝子を見出したが、この耐性機構についてはその後多くの研究者により精力的な研究が行われ、キノロン薬に限らず緑膿菌の薬剤耐性に排出ポンプが大きく関与していることが明らかにされた。

最近、プラスミド性のキノロン耐性(*qnr* 遺伝子)が中国や米国で報告された。この発見は新たなキノロン耐性として今後の課題となりそうである。

Key words: drug-resistance, mode of action, DNA gyrase, efflux pump

1962 年に Nalidixic Acid(NA)が発見されて以来、キノロン薬と呼ばれる合成抗菌薬の歴史が始まった。その後キノロン薬研究が活発に行われ、抗菌活性、体内動態・代謝、および安全性に関する改良が進められた。1978 年に見出されたノルフロキサシン(NFLX)は、キノロン環の 6 位にフルオロ基、7 位にピペラジニル基を有し、強い抗菌力と良好な組織移行性を示すことから各種感染症に幅広く使われるようになった。ニューキノロン薬の先駆けとなった NFLX の発見以来、いわゆるニューキノロン(フルオロキノロン)薬と呼ばれる抗菌薬の開発が世界レベルで行われ、数多くの優れたキノロン薬が世の中に登場してきた。このようなキノロン薬の開発とともにその作用機序・耐性機構研究も多くの研究者によって進められてきた。これらの研究結果はより優れたキノロン薬の開発研究のみならず細菌学などの基礎研究に大きな影響を及ぼしてきた。

I. キノロン薬の開発

NA は 1962 年に Leshner により、抗マラリア薬であるクロロキン合成の副生成物が細菌の増殖抑制効果を有

することをヒントにして合成された新規抗菌薬である。NA は当時有効な抗菌薬のないグラム陰性菌に抗菌活性を示すこと、経口投与で有効ということから注目された。しかし、グラム陽性菌に対する活性が低いことや代謝的に不安定であることなどから、その使用は尿路、腸管、胆道感染症などの局所感染に限定されたものであった。また NA は耐性菌出現頻度が高いということも欠点の一つとして挙げられていた。NA の開発以降種々の改良を試みたキノロン薬が合成されてきていたが、1978 年にキノロン環にフッ素とピペラジニル基を導入し抗菌力が飛躍的に高まった NFLX が杏林製薬の研究陣により見出され、その後のキノロン薬研究開発に大きな影響をもたらした。NFLX は NA と比較して抗菌活性が増強されるとともに緑膿菌や黄色ブドウ球菌にまで及ぶ広い抗菌スペクトルを有していた。代謝的にも安定で良好な組織移行性を示すことから尿路、腸管、胆道感染症のみならず上気道感染など全身性の感染にまで適応できるようになった。NFLX の開発以降数多くのニューキノロン(また

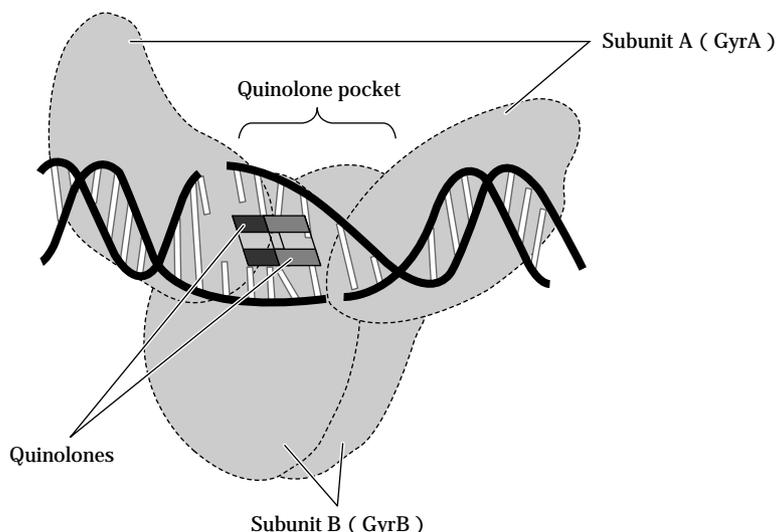


Fig. 1. Model of Quinolone-DNA-DNA gyrase interaction.

Table 1. Effect of substituents at the 6-position on DNA gyrase inhibitory activity (IC_{50}) and antibacterial activity (MIC)

R6	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
F (NFLX)	0.64	0.05
Cl	0.88	0.10
Br	3.58	0.78
H	4.61	0.78
NO_2	5.13	0.78
OH	8.09	12.50
NH_2	16.3	3.13

はフルオロキノロン)薬と呼ばれる新規抗菌薬が開発され、臨床の場で使用されており、さらに新たな薬剤の開発も続いている。次々と新規化合物が開発される一方でニューキノロン薬のもつ中枢作用、関節障害、光毒性、血糖への影響、QT延長、薬剤相互作用などの安全性に関する課題も明らかになってきた。1990年代に入るとこれまでのニューキノロン薬の効果が十分とはいえない肺炎球菌や非定型菌もカバーできる抗菌力をもつガチフロキサシン(GFLX)のようなレスピラトリーキノロン薬が開発されてきた。このように当初尿路感染症治療薬と考えられていたキノロン薬も多くの改良、工夫を重ね呼吸器感染症までカバーできる抗菌薬として進化してきた。最近では、既存のキノロン薬の耐性菌にも有効でMRSAやVREにも効果が期待できる新しいキノロン薬の開発も始まっている。このようなキノロン薬の抗菌力、抗菌スペクトルの改良には作用機序および耐性機構研究が大

きく貢献している。

II. 作用機序：標的酵素 (DNA ジャイレース, トポイソメラーゼ IV) 研究

1. 標的酵素：DNA ジャイレースの発見とその作用

キノロン薬の作用機序の研究は、1960年代にNAを用いてGossらにより活発に行われ、NAが大腸菌のDNA複製を特異的に阻害することを明らかにした¹⁾。しかし標的酵素など詳細なメカニズムは不明であった。キノロン薬の標的酵素が、DNAの立体構造を変換するDNAジャイレースであるという発見は、1977年にGellertらとSuginoらによりほぼ同時期に行われた^{2,3)}。DNAジャイレースは、2本鎖DNAを同時に切断・再結合することによりDNAの高次(立体)構造を変化させ、DNAの複製・転写・組み換え・修復などに重要な役割を果たしている。この酵素は *gyrA* 遺伝子産物であるサブユニットA(GyrA)2分子と *gyrB* 遺伝子産物であるサブユニットB(GyrB)2分子からなるホロ酵素で、サブユニットAはDNA鎖の切断・再結合作用、サブユニットBはATPase活性をもちエネルギー変換を担っている。キノロン薬はサブユニットAに作用しDNAジャイレース活性を阻害することも明らかになった。その後Shenらは、NFLXを用いた研究からキノロン薬は2本鎖DNAがDNAジャイレースによって切断された切断面にはまり込み、DNA DNAジャイレース キノロンの3者によるCleavable Complexを安定化させDNA鎖の再結合を阻害することによって抗菌力を発揮するというモデル(Fig. 1)を提唱した⁴⁾。われわれもキノロン薬の抗菌力とDNAジャイレースの阻害作用との関係を検討し、酵素阻害、抗菌力とキノロン薬の構造との関連からノルフロキサシンで導入した6位のフッ素が抗菌力、DNAジャイレース阻害作用に大きく関与することを明らかにした(Table 1)。キノロン薬の構造活性相関研究はDNAジャ

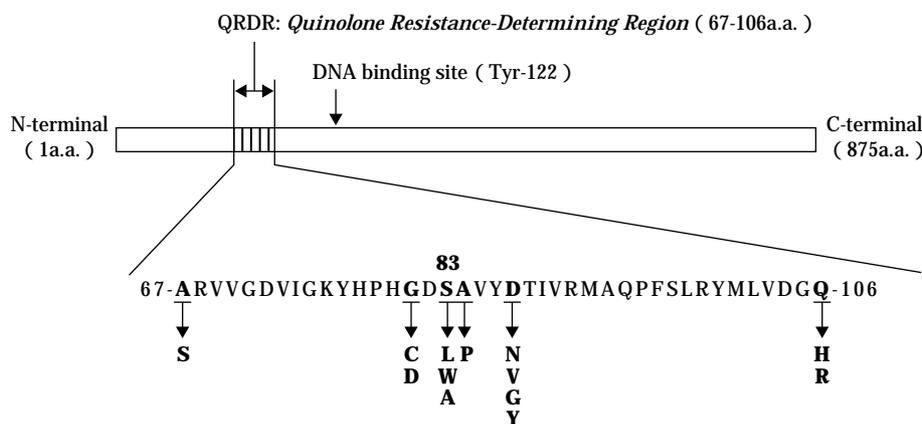


Fig. 2. Schematic representation of *E. coli* GyrA amino acid sequences with mutations associated with quinolone resistance.

イレース阻害作用と抗菌力をベースに発展していき、より優れたキノロン薬の開発研究に役立てられた。

2. 第二の標的酵素：トポイソメラーゼ IV の発見

1990年に染色体複製の最終段階の分配に働く新たな酵素を Kato らが見出した。この酵素のサブユニットのアミノ酸配列が DNA ジャイレースのサブユニット A, B と高いホモロジーがあることから Topoisomerase IV (TopoIV) と名づけた⁵⁾。TopoIV は DNA ジャイレースと同様に細菌にとって必須の酵素であり、ParC (または GrlA) および ParE (または GrlB) の 2 つずつの計 4 つのサブユニットからなっている。TopoIV は複製後に絡み合った 2 本鎖 DNA の切断と再結合を行うことによって、分裂後の細胞に DNA を効率よく分配する役割を担っている。TopoIV もキノロン薬により阻害されることがデカテネーションアッセイ法により明らかとなった。大腸菌においては、キノロン薬は DNA ジャイレースに対する阻害活性のほうが TopoIV に対する阻害活性より強く、DNA ジャイレースに対する阻害がキノロン薬の抗菌活性に反映されているものと考えられた。しかし、1994年に Ferrero らはブドウ球菌の TopoIV のクローニングと同時に、シプロフロキサシン (CPFX) に対する感受性の異なるブドウ球菌の遺伝子解析を行い、ブドウ球菌では DNA ジャイレースよりも TopoIV がプライマリーターゲットになっていると報告した⁶⁾。当時はキノロン薬研究の方向性がグラム陽性菌、特に肺炎球菌に向かっていたので、キノロン薬のグラム陰性菌とブドウ球菌における第一標的酵素が異なるというこの発見は大変興味深いものであった。Takei らもブドウ球菌の TopoIV と DNA ジャイレースに対する各種キノロン薬の阻害作用を調べ、キノロン薬によってターゲット指向性 (主たる標的酵素) が異なることを酵素レベルで確認した⁷⁾。肺炎球菌に強い抗菌力を示すいわゆるレスピラトリーキノロン薬は従来のキノロン薬に比べてグラム陽性菌の DNA ジャイレースに対する阻害作用が強くなってきており、

両標的酵素に対して同レベルで阻害作用を示すデュアルインヒビターとして働いていることも明らかにされた^{8,9)}。デュアルインヒビターとして働くキノロン薬は耐性変異株の選択性が低いという現象もこれらの研究から見出された^{8,9)}。

III. 耐性機構の研究

キノロン薬の耐性研究は、主に大腸菌 K-12 株を用いた耐性変異株の遺伝子解析、生化学的解析が行われていた。1980年われわれがノルフロキサシンの耐性機構研究を始めた当初は標的酵素の DNA ジャイレース変異と、メカニズムは不明であったが膜透過性変化によるものが知られていた。一方緑膿菌でも 2 つのタイプの耐性機構が知られていたが詳細な機構は不明な状況であった。われわれは、大腸菌 K-12 株と緑膿菌 PAO 株を用いてノルフロキサシン耐性変異株を分離し、それらの株の遺伝子解析と生化学的解析を進め、標的酵素の変異、膜透過性変化 (取り込み低下、排出系の亢進) を明らかにした¹⁰⁻¹²⁾。その後キノロン薬の耐性研究は多くの研究者により行われ、多くの新しい知見をもたらした。

1. 標的酵素 (DNA ジャイレースおよび TopoIV) 変化による耐性

1) DNA ジャイレースの変異による耐性

大腸菌 K-12 株のキノロン耐性遺伝子として見出された *nfxA*, *norA*, *nalA* は DNA ジャイレースのサブユニット A をコードする *gyrA* 遺伝子上に変異が起きたものである^{10,13)}。これらの変異株から分離精製した DNA ジャイレースはキノロン薬の阻害を数十倍から数百倍受けにくくなっていた。緑膿菌 PAO 株でも *gyrA* 遺伝子変異 (*nfxA*, *cfxA*, *nalA*) が見出され、大腸菌と同様これらの変異株から分離精製した DNA ジャイレースのサブユニット A, B の再構成酵素の解析からサブユニット A の変異による耐性化が確認された¹⁴⁾。

DNA ジャイレースの変異に関しては、遺伝子変異部位とアミノ酸変異との関係の詳細な研究が進められた。

Table 2. Properties of norfloxacin-resistant mutants in *E. coli* K-12

Strain	Characteristics	MIC (µg/mL)					
		NFLX	CPFX	OFLX	NA	CFX	CP
KL-16	Wild type	0.05	0.025	0.05	3.31	3.13	6.25
KEA12	<i>norA</i> : GyrA mutation	0.39	0.20	0.39	100	3.13	6.25
KEA13	<i>norB</i> : OmpF decrease	0.20	0.10	0.20	12.5	25	12.5
KEA16	<i>norC</i> : OmpF and LPS decrease	0.20	0.05	0.05	0.78	6.25	3.13

Yoshida らの解析によると、大腸菌における *gyrA* 変異部位は 875 個のアミノ酸からなる GyrA 蛋白の N 末端から 67~106 番目までの比較的狭い領域 (キノロン耐性決定領域: QRDR) のアミノ酸に局在していた¹⁵⁾ (Fig. 2)。QRDR は DNA ジャイレースの作用により切断された DNA の 5' 末端と共有結合する部位である Tyr-122 に近傍している。QRDR の中でも 83 番目のアミノ酸である Ser-83 の近くに変異が集中しており、Ser-83 近傍がキノロン感受性に大きく関与する部位と考えられ、この領域が DNA と共有結合する部位に近いことから、サブユニット A, DNA, キノロンの 3 者が相互作用を示す部位と推定された¹⁶⁾。その後発表された DNA ジャイレースの X 線解析データから推定した分子モデルでもこの考えが裏づけられた。大腸菌以外の細菌においても *gyrA* 遺伝子におけるキノロン耐性変異部位が明らかにされているが、ブドウ球菌、肺炎球菌、緑膿菌、結核菌、リン菌などでも大腸菌同様 QRDR はよく保存されており、変異部位、アミノ酸変異もきわめて類似している¹⁶⁾。

2) TopoIV の変異による耐性

ブドウ球菌でのキノロン耐性研究から、ブドウ球菌では大腸菌や緑膿菌とは異なりキノロン薬による耐性変異は最初に TopoIV に変異が起こることが明らかにされた⁶⁾。このように分離されたキノロン耐性株では、TopoIV の ParC 蛋白のキノロン耐性決定領域に変異 (Ser-80, Glu-84) がみられた。ブドウ球菌では *parC* (*grlA*) 変異の後に DNA ジャイレース変異が高頻度に起こることが報告された⁶⁾。Fukuda らは、段階的にキノロン薬で選択を行い高度耐性化したブドウ球菌の遺伝子解析から、第 1 段階では *grlA* (*parC*) に変異が起こり、第 2 段階では *gyrA*、第 3 段階では再び *grlA* (*parC*)、第 4 段階では *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域に点変異が認められ、これら遺伝子の 2 サイクルに及ぶ交互変換に基づく標的酵素の変異がキノロン耐性上昇化に関与していることを見出した¹⁷⁾。肺炎球菌でもブドウ球菌と同様にキノロン薬による第 1 段階の選択で得られた TopoIV (*parC* 遺伝子) 変異株では、第 2 段階において DNA ジャイレースの *gyrA* 遺伝子変異が加わることで高度耐性化することが認められている。大腸菌でも高度耐性株の中に *gyrA* 変異以外に TopoIV (*parC*) に変異を起こしている株も見出されており TopoIV 変異と

キノロン耐性との関連は大腸菌でも考えられる。

DNA ジャイレースのサブユニット B (GyrB), TopoIV のサブユニット (ParE) の変異もキノロン耐性化に關与することが報告されており¹⁶⁾、キノロン薬と DNA ジャイレース, TopoIV および DNA との相互作用全体で耐性化メカニズムを考える必要がある。

2. 透過性に関する耐性機構の研究

1) 薬剤取り込み低下による耐性

大腸菌 K-12 株におけるキノロン薬の膜透過性低下を引き起こす耐性遺伝子として、われわれと Hooper らは NFLX, CPFX 耐性変異株の解析から *nfxB*, *norB*, *norC*, *cfxB* 変異を見出した^{10,13)} (Table 2)。これらの変異株では NFLX や CPFX の菌体内への取り込み量が野生株に比べて 1/2~1/3 に低下していた。また OmpF と呼ばれるポーリンを形成する外膜蛋白質の減少もみられ、OmpF ポーリンを介して菌体膜を透過する薬剤として知られていたテトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), セフォキシチン (CFX) に対しても耐性化していた。さらに *norC* 変異株では OmpF 蛋白質の減少以外に LPS (リポ多糖体) にも変化がみられ、NFLX には低度の耐性を示すが NA や疎水性抗生物質、色素、界面活性剤に高感受性を示した¹⁰⁾。これら大腸菌での解析から OmpF ポーリンの減少がキノロン薬の膜透過性低下を引き起こし、LPS の変化もキノロン薬の透過性に影響を及ぼすと考えられた。肺炎桿菌、セラチア菌から分離した膜透過性変異株では大腸菌の OmpF ポーリン蛋白に相当すると思われる分子量 40K 前後の外膜蛋白質の減少が観察され、キノロン薬以外に TC, CP およびセファロsporin にも交差耐性を示した¹⁸⁾。このように腸内細菌ではキノロン薬の膜透過性低下と大腸菌における OmpF ポーリンと類似の働きをすると考えられる外膜蛋白質の欠損または減少がキノロン耐性に関与することが推定された。

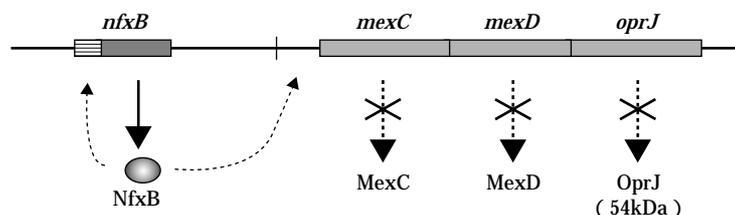
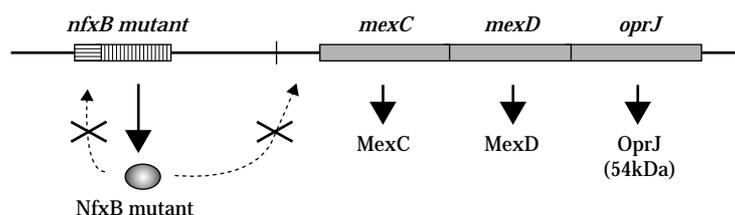
2) 薬剤の排出 (汲み出し) 亢進による耐性

腸内細菌での研究と併行してわれわれは緑膿菌 PAO 株を用いて NFLX 耐性変異株の分離と解析を進め、外膜に変化が起きた *nfxB*, *nfxC* および *nalB* 変異株を見出した^{11,12)} (Table 3)。*nfxB*, *nfxC*, *nalB* 遺伝子は PAO 株の染色体地図上異なる位置にあり、これらの変異株はキノロン薬以外の薬剤 (β ラクタム薬, CP など) に対す

Table 3. Properties of norfloxacin-resistant mutants in *P. aeruginosa* PAO

Strain	Characteristics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
		NA	NFLX	CPFX	CBPC	CAZ	IPM	CP
PAO4009	Wild type	50	0.39	0.1	50	1.56	0.78	100
KH4023	<i>nfxA</i> : GyrA mutation	> 1600	3.13	0.78	50	1.56	0.78	50
KH4013	<i>nfxB</i> : 54K OM(OprJ) expression	200	6.25	0.78	12.5	0.78	0.78	50
KH4014a	<i>nfxC</i> : 50K OM(OprN) expression OprD decrease	800	12.5	1.56	25	0.78	6.25	> 200
PAO6006	<i>nalB</i> : 49K OM(OprM) increase	800	3.13	0.78	200	6.25	0.78	> 200

A. Wild-type

B. *nfxB* mutantFig. 3. Regulation mechanisms of *mexC-mexD-oprJ* operons of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by NfxB.

る感受性に変化がみられた。NFLXの菌体内蓄積量を測定すると野生株(親株)に比べてこれらの変異株では1/2~1/3に低下しており、腸内細菌と同様キノロン薬の透過性減少によるものと当初考えたが、腸内細菌とは異なり*nfxB*, *nfxC*, *nalB*変異株では外膜蛋白質の減少は認められず、逆に外膜蛋白質の増加、新生が観察された^{11,12,18}。その後、これらの変異株における菌体内取り込み量の低下はアンカプラーであるカルボニルシアナイド m クロロフェニルヒドラゾン(CCCP)添加により回復することが確認され、菌体内蓄積量の低下は透過性低下ではなく、菌体外への排出(汲み出し)機能の亢進によるということが明らかにされた。

nfxB, *nalB*, *nfxC*変異株ではいずれも外膜蛋白質に変化がみられ、*nfxB*変異株では54Kの蛋白質の新生、*nalB*変異株では49Kの蛋白質の増加、*nfxC*変異株では50Kの蛋白質の新生が確認された¹⁸が、その機能は不明であった。1995年にGotohら¹⁹は*nalB*変異株の解析を行い、MexA-MexB-OprMのRND(Resistance-Nodulation-Cell Division)タイプの蛋白質がキノロン薬の排出に関

与していることを明らかにした。*mexA-mexB-oprM*オペロンにコードされた内膜から外膜に連なる3つの蛋白質(MexA-MexB-OprM)の協力作用によりキノロン薬を菌体外に排出するモデルは、*nfxB*, *nfxC*変異株でも明らかになり、それぞれ排出システムMexC-MexD-OprJとMexE-MexF-OprNの発現亢進によりキノロン耐性が起きていると考えられた。このように*nfxB*, *nalB*, *nfxC*変異株で新生もしくは増加した54K, 49K, 50K蛋白質はそれぞれOprJ, OprM, OprNと呼ばれるようになった。われわれは1992年に*nfxB*遺伝子のクローニングを行い、遺伝子解析結果から*nfxB*はDNA結合蛋白質としてある種の遺伝子の発現制御に関係しており、*nfxB*遺伝子に変異が起これるとDNA結合能が失われRegulatorとして機能しなくなることを報告していたが²⁰、その後の研究結果から*nfxB*変異株では、*nfxB*が抑制因子として機能しないため*mexC-mexD-oprJ*遺伝子が発現し、汲み出しポンプが働くようになり、その結果キノロン薬が菌体外に排出されるというメカニズムが明らかとなった(Fig. 3)。なお、緑膿菌での薬剤排出機構の詳細な研究内

容については後藤の優れた総説²¹⁾にまとめられている。

最近では、緑膿菌ゲノムの全塩基配列が決定され、ホモロジー解析によって RND タイプの排出機構が緑膿菌内に少なくとも 10 個存在することが示唆されている。このような緑膿菌の RND 型排出蛋白質は、大腸菌の RND 型排出蛋白である AcrA-AcrB-TolC との相溶性が高い。AcrA-AcrB-TolC 排出システムに関しては、排出蛋白質の本体である AcrB²²⁾と外膜蛋白質の TolC²³⁾に関する結晶解析も報告され、さらに排出蛋白質の本体である AcrB と CPFY との共結晶も得られており²⁴⁾、排出蛋白質の基質認識に関する解析が進められている。緑膿菌においても大腸菌の AcrA のホモログである MexA の結晶解析が進んでおり²⁵⁾、こうした研究の進展によってキノロン薬の排出機構についての理解がさらに深まり排出ポンプに影響を受けない薬剤の創製が可能になるものと期待している。

IV. 伝達性キノロン耐性遺伝子の発見

従来キノロン薬に対する耐性はいずれも染色体上に存在し、耐性遺伝子が菌から菌へ伝播することはないものと考えられてきた。ところが 1998 年に Martinez らはプラスミドにコードされる伝達性のキノロン耐性因子が存在することを明らかにした²⁶⁾。耐性遺伝子は *qnr* と命名され、インテグロンと呼ばれるモバイルエレメント内に存在することも示された。*qnr* がコードする蛋白質 Qnr のアミノ酸配列からこの蛋白質は Pentapeptide Repeat Family に属していることが明らかとされた。Qnr はキノロン薬の DNA DNA ジャイレースとの Cleavable Complex 形成を何らかの形でブロックし、*qnr* 保有株にキノロン耐性を付与しているものと考えられている。

臨床での *qnr* 遺伝子の分離状況については、いくつかの報告がなされており、上海において分離されたキノロン高度耐性大腸菌においては約 8%、米国内で分離されたキノロン耐性の肺炎桿菌においては約 11% に *qnr* の存在が確認されている^{27,28)}。*qnr* による耐性は新たなキノロン耐性機構として注意しておく必要がある。

V. 終わりに

抗菌化学療法において最大の課題は耐性菌対策である。NFLX をはじめとしたニューキノロン薬を用いた作用機序、耐性機構の解析を進めることにより標的酵素である DNA ジャイレース、TopoIV の変異、外膜変化による取り込み変化と排出機構の亢進などが明確となり、より優れたキノロン薬の創製にも役立ち、さらにこれらの耐性機構を克服する研究も進められている。キノロン耐性克服の戦略として、キノロン耐性 DNA ジャイレース、TopoIV にもデュアルに強い阻害作用を有する化合物、排泄機構に影響されない化合物の創製、またはエフラックスポンプ阻害薬の創製²⁹⁾が考えられている。しかし、これらの研究スピード以上に細菌は進化し耐性を獲得してきている。耐性化の問題は古くて新しい課題であり、それ

らを克服するためには今回紹介した耐性機構研究の成果などをもとに新たな薬剤創製への努力も重要ではあるが、現在使用できる抗菌薬を適正に使用し耐性菌をつくらないように対応はもっと重要な課題であると考えている。

謝辞

今回まとめた研究は、著者が群馬大学・医学部・微生物学教室と杏林製薬株式会社中央研究所（現：創薬研究所）で行ったもので、この研究に対しいつも貴重なご指導とご助言をいただいた故三橋進元教授、橋本一前教授、井上松久前助教授（現：北里大学医学部教授）、伊予部志津子前助教授に感謝いたします。またこの研究は杏林製薬株式会社の福田秀行博士、保坂雅喜博士、岡崎隆博士、青山博博士をはじめ多くの研究者のご協力による成果であり、ここに深く感謝の意を表します。

本稿は 2004 年に開催された第 51 回日本化学療法学会東日本支部総会（会長：青木信樹先生）での「教育講演」において、キノロン薬の作用機序および耐性機構研究の歴史に関して講演した内容を中心にまとめたものである。

文 献

- 1) Goss W A, Deitz W H, Cook T M: Mechanism of Action of Nalidixic Acid on *Escherichia coli* II. Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *J Bacteriol* 89: 1068 ~ 1074, 1965
- 2) Gellert M, Mizuuchi K, O 'Dea M H, et al: Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4772 ~ 4776, 1977
- 3) Sugino A, Peebles C L, Kreuzer K N, et al: Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4767 ~ 4771, 1977
- 4) Shen L L, Mitscher L A, Sharma P N, et al: Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug DNA binding model. *Biochemistry* 28: 3886 ~ 3894, 1989
- 5) Kato J, Nishimura Y, Imamura R, et al: New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63: 393 ~ 404, 1990
- 6) Ferrero L, Cameron B, Manse B, et al: Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol* 13: 641 ~ 653, 1994
- 7) Takei M, Fukuda H, Kishii R, et al: Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3544 ~ 3547, 2001
- 8) Takei M, Fukuda H, Kishii R, et al: Contribution of the 8-methoxy group of gatifloxacin to inhibition of type II topoisomerases of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3337 ~ 3338, 2002
- 9) Kishii R, Takei M, Fukuda H, et al: Contribution of the 8-methoxy group to the activity of gatifloxacin against

- type II topoisomerases of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 47: 77 ~ 81, 2003
- 10) Hirai K, Aoyama H, Suzue S, et al: Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob Agents Chemother 30: 248 ~ 253, 1986
 - 11) Hirai K, Suzue S, Irikura T, et al: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 31: 582 ~ 586, 1987
 - 12) Fukuda H, Hosaka M, Hirai K, et al: New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Antimicrob Agents Chemother 34: 1757 ~ 1761, 1990
 - 13) Hooper D C, Wolfson J S, Souza K S, et al: Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 29: 639 ~ 644, 1986
 - 14) Hirai K, Mitsuhashi S: Mechanisms of resistance to quinolones. Progress in Drug Research 38: 107 ~ 120, 1992
 - 15) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 34: 1271 ~ 1272, 1990
 - 16) 吉田博昭: 細菌におけるキノロン耐性メカニズム. 日本細菌学会誌 51: 973 ~ 992, 1996
 - 17) Fukuda H, Hori S, Hiramatsu K: Antibacterial activity of gatifloxacin (AM-1155, CG 5501, BMS-206584) a newly developed fluoroquinolone, against sequentially acquired quinolone-resistant mutants and the *norA* transformant of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 42: 1917 ~ 1922, 1998
 - 18) Hirai K: Quinolone-resistance mechanisms involved in outer membrane. In Quinolones (Fernandes P B ed), P. 187 ~ 201, JR Prous Science Publishers, Barcelona, 1989
 - 19) Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, et al: The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. Antimicrob Agents Chemother 39: 2567 ~ 2569, 1995
 - 20) Okazaki T, Hirai K: Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. FEMS Microbiol Lett 97: 197 ~ 202, 1992
 - 21) 後藤直正: *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性化に寄与する薬剤排出システム. 日化療会誌 47: 319 ~ 328, 2004
 - 22) Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, et al: Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature 405: 914 ~ 919, 2000
 - 23) Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, et al: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. Nature 419: 587 ~ 593, 2002
 - 24) Yu E W, McDermott G, Zgurskaya H I, et al: Structural Basis of Multiple Drug-Binding Capacity of the AcrB Multidrug Efflux Pump. Science 300: 976 ~ 980, 2003
 - 25) Akama H, Matsuura T, Kashiwagi S, et al: Crystal Structure of the Membrane Fusion Protein, MexA, of the Multidrug Transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 279: 25939 ~ 25942, 2004
 - 26) Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G A: Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 351: 797 ~ 799, 1998
 - 27) Wang M, Tran J H, Jacoby G A, et al: Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother 47: 2242 ~ 2248, 2003
 - 28) Wang M, Saham D F, Jacoby G A, et al: Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother 48: 1295 ~ 1299, 2004
 - 29) 星野一樹: キノロン系薬およびエフラックスポンプ阻害薬の開発. 日化療会誌 52: 355 ~ 360, 2004

History of mode of action and resistance mechanisms of quinolones

Keiji Hirai

Discovery Research Headquarters, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.,
2-5 Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

Many new quinolones, namely fluoro-quinolones, have been developed since norfloxacin (NFLX) was discovered in 1978. These drugs became useful medicine for various infectious diseases including pneumonia. The researches on mode of action of quinolone and resistant mechanisms have been made great advances with the progression of these new quinolones. In this review, I would like to introduce the progress of studies on mode of action of quinolones and mechanisms of quinolone-resistance in bacteria from mid 1970s.

1. Mode of action: Target enzymes: DNA gyrase and Topoisomerase IV:

It was known that quinolones inhibit DNA replication in *Escherichia coli*, however, detailed mode of action was not clarified when we started the research and development of new quinolones. DNA gyrase was identified as the target enzyme of quinolone in 1977. Afterward, researches on mechanism of actions of quinolones have been made a remarkable progress using various new quinolones such as norfloxacin. Consequently, interesting findings were reported such as formation of cleavable complex (DNA gyrase-DNA-Quinolone) by quinolone, quinolone resistance-determining region (QRDR), and structure-activity relationship for various DNA gyrase in bacteria. In 1990, new target, namely Topoisomerase IV, of quinolone other than DNA gyrase was identified. This enzyme was showed to involve with antibacterial activity of quinolones especially respiratory quinolones and quinolone-resistance mechanisms in Gram-positive bacteria.

2. Quinolone-resistance mechanisms involved in membrane:

We found that quinolone-resistant mechanisms were due to alterations in DNA gyrase and in cell permeability of outer membrane proteins in *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In *E. coli*, it was suggested that quinolone might penetrate through the OmpF porin, and alterations in permeability to quinolones in members of the *Enterobacteriaceae* have been associated with the decrease of specific outer membrane proteins. We isolated three types of norfloxacin resistant mutants, *nfxB*, *nfxC*, and *nalB*, showed alteration in membrane permeability associated with the appearance and/or increase of outer membrane proteins. Using these mutants, it was found that these mutations activated efflux pumps in *P. aeruginosa*, and these data suggested efflux pumps might play an important role in resistance for various antibacterial agents in *P. aeruginosa*.

More recently, plasmid-mediated quinolone-resistance in Gram-negative bacteria was found in US and China. These finding might be very critical for spread of quinolone-resistant genes by plasmids, therefore we will have to keep watch on this type quinolone-resistance.