

平成 23 年度アステラス病態代謝研究会

海外留学補助研究経過報告

マイコバクテリウムアビウム薬剤耐性の分子機構

平成 24 年 6 月 28 日

ボルステル研究所 今井博貴

アステラス病態代謝研究会の海外留学補助によりドイツ研究留学を 1 年間支援していただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げますとともに、これまでの研究経過をここにご報告いたします。

研究の目的

Mycobacterium avium における薬剤耐性の分子メカニズムを解明する。

研究の背景と意義

Mycobacterium avium はグラム不定型の真正細菌であり、咳や痰などの呼吸器症状や、病気が進行すると全身倦怠感や体重減少を引き起こす。日本国内の新規患者数は年間 8000 人とも言われているが、効果の高い薬剤がなく治療が非常に難しい病気であり、より有効な治療法の確立が期待されている。現在の臨床現場においては、クラリスロマイシン・リファンピシン(またはリファブチン)・エタンブトールの 3 薬剤による多剤併用治療が基本とされている。単剤による十分な効果はクラリスロマイシンでのみみられるが、この場合も数ヶ月以内に耐性菌が出現することが警告されている。私は、単剤では効果が不十分な薬剤に着目し、その耐性機構を明らかにすることで、現在の治療法をどのように改善できるのかについての洞察を得たいと考えた。特に今回は薬剤の作用機序が具体的に明らかとなっているリファンピシンを研究対象とすることで考察を容易にし、治療法改善の可能性を速やかに探索したいと考えた。

単剤で劇的な効果を示す新規の薬剤を開発することは容易ではないと予想されることから、効果の低い既存の薬剤を活用するアプローチ(例えば、多剤併用を前提とした他の薬剤の探索)も重要と考えられ、本研究成果を基にその様な取り組みが別のケースにも応用されることが期待される。

リファンピシンは細菌の RNA ポリメラーゼ複合体の β サブユニットに相互作用して RNA 合成を阻害する。しかし、リファンピシンは *Mycobacterium avium* の臨床検体の多くに対しては単剤では効果が薄いとされ、その理由(耐性のメカニズム)も未解明のままである。一方、他の細菌においては RNA ポリメラーゼ複合体の β サブユニットにおけるアミノ酸変異がリファンピシン耐性獲得のメカニズムとして報告されているが、先行研究及び私の行った事前の解析結果からは、*Mycobacterium avium* ではこれらとは別のメカニズムが存在していることが示唆されていた。

ポリメラーゼ以外に原因があるとする、他の先行研究などを基に下記のような仮説が立てられる。

- ① *Mycobacterium avium* の持つ酵素によってリファンピシンが化学修飾を受けその活性を失っている。

- ② *Mycobacterium avium* が持つ様々な外層の存在によりリファンピシンが細胞内に取り込まれない。または薬剤排出ポンプのようなものでリファンピシンが細胞外に効率よく排出されてしまう。
- ③ 上記以外の因子がリファンピシンに対して何らかの作用を及ぼしている。

研究の方法

①については、*Mycobacterium avium* と近縁の *Mycobacterium smegmatis* におけるリファンピシンの化学修飾について調べた Dabbs ら(1995)の方法に基づき、*Mycobacterium avium* においても同様の化学修飾が起きているか否かを確認した。*Mycobacterium smegmatis* においてリファンピシン修飾を担う遺伝子 MSMEG_1221 と配列類似性の高い遺伝子があるか BLAST 解析で調べた結果、*Mycobacterium avium* においてはそのような遺伝子は見出せなかったが、他の先行研究によれば *Nocardia brasiliensis* ではリファンピシンが別の種類の修飾を受けていることが分かっており、*Mycobacterium avium* においてもこれまでに報告のない修飾が見出せるのではないかと期待した。

また①②③の全てに関連するアプローチとして、*Mycobacterium avium* のコロニー形態とタンパク質発現量に着目した。先行研究において *Mycobacterium avium* が形成するコロニーはいくつかの異なる形態を示し、そのコロニー形態と薬剤耐性に関連性があることが報告されている。また別のいくつかの報告をもとに考えると、これらのコロニー形態の違いは周囲の環境変化などによってタンパク質の発現量が変わっていることによると推測できた。そこで、リファンピシンに対して耐性の Rough transparent (RgT)(図 1A)と感受性の Smooth opaque (SmO)(図 1B)間のタンパク質発現量の違いを調べることで、リファンピシン耐性に関与する遺伝子が同定できるのではないかと考えた。先行研究において別の目的で両者のタンパク質発現量の違いが比較され、66kDa のタンパク質が同定されているが、この因子とリファンピシン耐性に関する報告は今のところない。

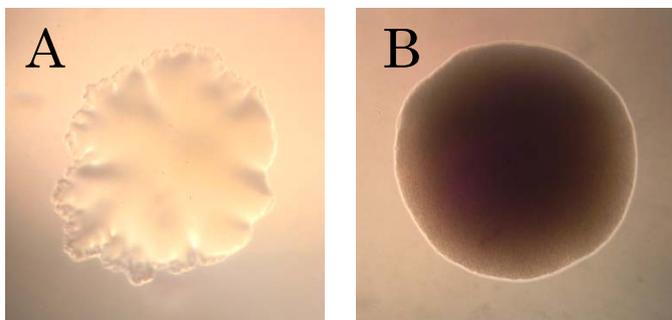


図 1. *Mycobacterium avium* の 2 種類のコロニー形態。A. Rough transparent (RgT)、B. Smooth opaque (SmO)

研究の成果

Mycobacterium avium 及び *Mycobacterium smegmatis* 培養液にリファンピシンを加えて培養を続け、3~7 日後に培養液からリファンピシンを抽出した。薄層クロマトグラフィーを用いて抽出物を展開し、リファンピシンと異なる移動度の物質が確認された場合、その物質の解析を試みた。ポジティブコントロールである *Mycobacterium smegmatis* においては Dabbs らが報告した ADP リボシル化リファンピシンと同じ分子量の物質が確認されたが、*Mycobacterium avium* においては培養条件を検討してもリファンピシンの修飾は確認されなかった。培養条件等の更なる検討によってリファンピシンの修飾が見られる可能性は否定できないが、自分が設定している培養条件においても *Mycobacterium avium* はリファンピシンに対して耐性を示しているため、少なくともこの条件においては修飾以外のメカニズムがリファンピシン耐性に関与していると考えられる。

次に 2 つの異なるコロニー形態である RgT と SmO を培養し、10 日後にタンパク質を抽出し、これらを SDS-PAGE により比較した。その結果、発現量の異なるバンドを確認した。これは先行研究において報告のある 66kDa のバンドとは異なる大きさのものであった。現在これらのタンパク質の同定解析を行っている。

今後の課題

同定したタンパク質をコードする遺伝子をノックアウトした *Mycobacterium avium* を作製し、リファンピシン耐性に対する影響を確認するとともに、その耐性メカニズムの詳細について解析を進めていきたいと考えている。その結果をもとに、どのような薬剤が併用の候補となりうるのか提案したい。