

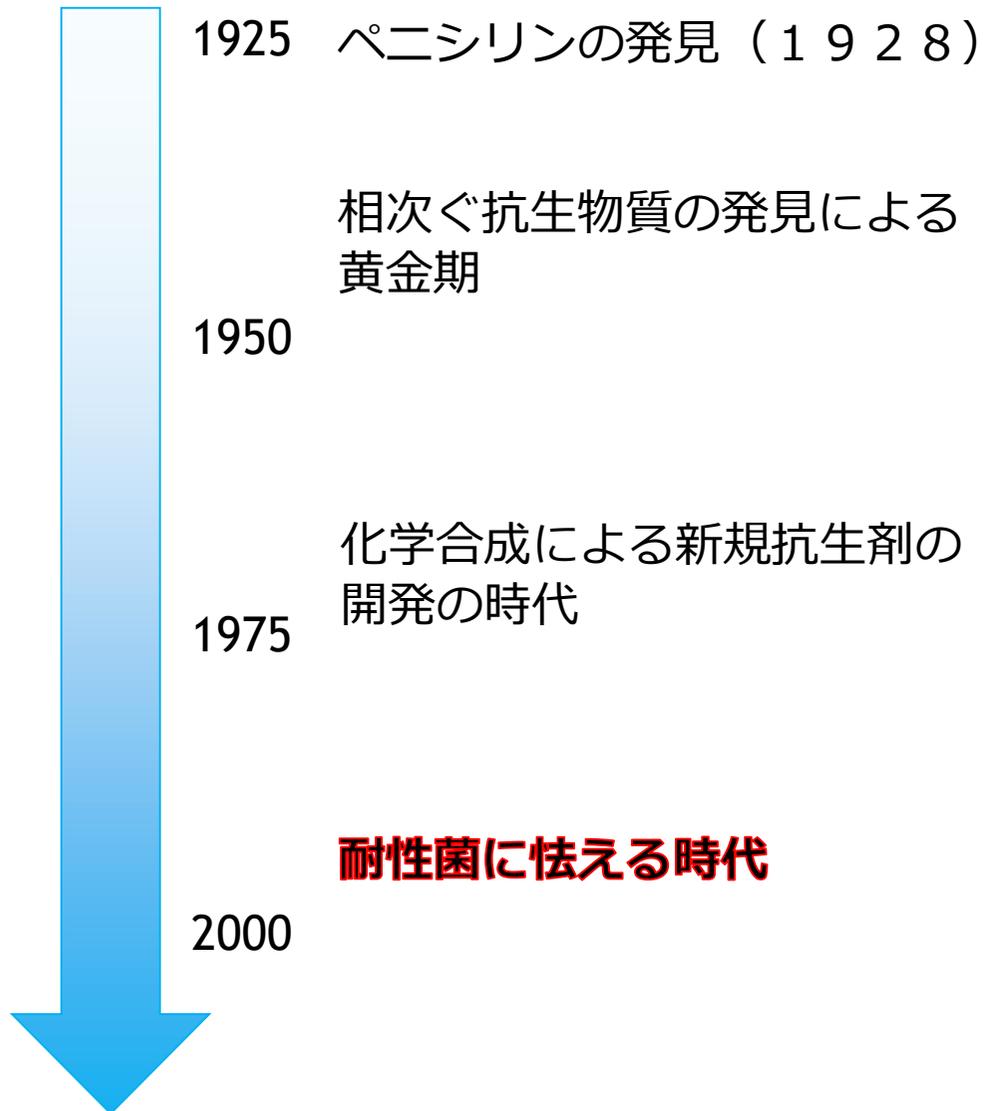
薬剤耐性遺伝子による耐性確立を 抑える新規薬剤探索法

広島大学 大学院統合生命科学研究科

講師 守口 和基

令和2年10月1日

従来技術とその問題点



新規抗生剤の開発は緊急性
が高いにも関わらず、行き詰
まってきている。

開発が耐性菌の蔓延
に追いつかない。

従来技術とその問題点

WHOが警告する緊急対応が必要な12の薬剤耐性病原菌リスト

緊急性

非常に
高い

高い

中程度

THREAT LIST

Bacterium or bacterial family (and antibiotics it resists) ranked by threat to human health

Acinetobacter baumannii (carbapenem)

Pseudomonas aeruginosa (carbapenem)

Enterobacteriaceae, extended-spectrum- β -lactamase-producing (carbapenem)

Enterococcus faecium (vancomycin)

Staphylococcus aureus (methicillin, vancomycin)

Helicobacter pylori (clarithromycin)

Campylobacter spp. (fluoroquinolone)

Salmonellae (fluoroquinolone)

Neisseria gonorrhoeae (cephalosporin, fluoroquinolone)

Streptococcus pneumoniae (penicillin-non-susceptible)

Haemophilus influenzae (ampicillin)

Shigella spp. (fluoroquinolone)

SOURCE: WHO

Nature 543, 15 (02 March 2017)
doi:10.1038/nature.2017.21550
表を引用

A. バウマニ（日和見感染菌の1種）

緑膿菌（日和見感染菌の1種）

腸内細菌科菌群（大腸菌や赤痢菌）

腸球菌（尿路感染症などの原因菌）

黄色ブドウ球菌（日和見感染菌の1種）

ピロリ菌（胃潰瘍、胃癌原因菌）

カンピロバクター（食中毒）

サルモネラ属（食中毒）

淋菌（淋病）

肺炎連鎖球菌（肺炎）

インフルエンザ菌（副鼻腔炎、気管支炎）

赤痢菌属（食中毒）

新薬開発に新たな選択肢が必要

行き詰まり感の強い新規抗生剤開発



原因である耐性菌の出現は、多くは耐性遺伝子の水平伝播による獲得に起因



こちらを抑え込むアプローチが有効なのではないか。



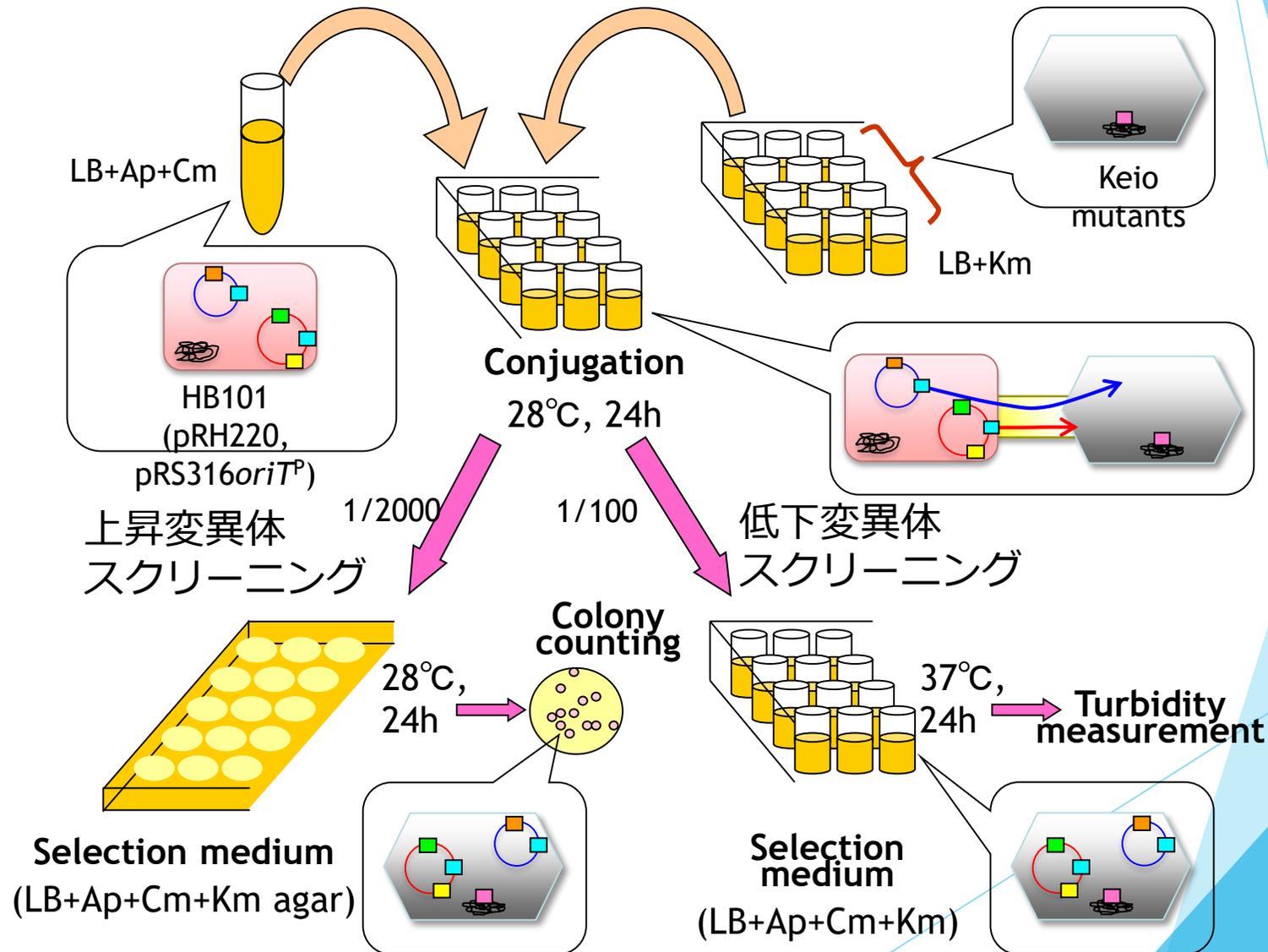
現状：抗生剤の使用をコントロールして耐性菌の蔓延を予防する取り組み（難題も多）



薬剤耐性遺伝子の水平伝播を抑える

スクリーニング法 (基本)

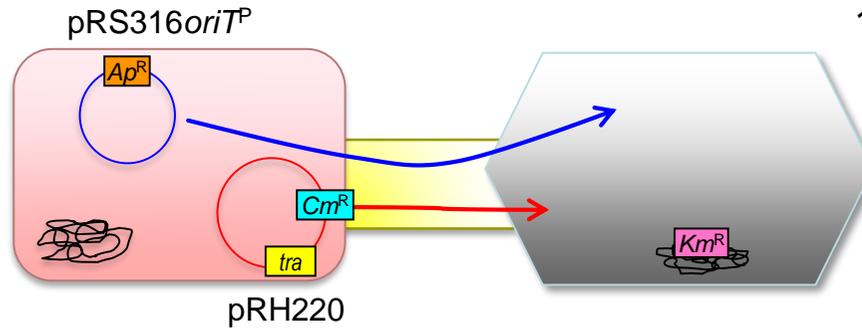
大腸菌のノックアウト変異コレクション (Keio collection: 3884株) を用いたゲノム網羅的スクリーニング



スクリーニング法

段階的
選抜

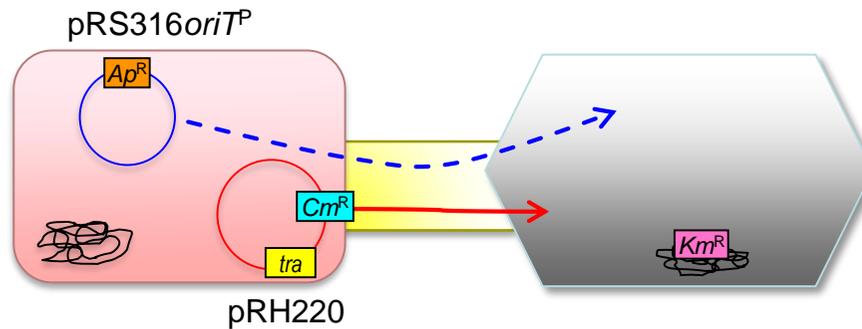
1st



選抜が期待される遺伝子

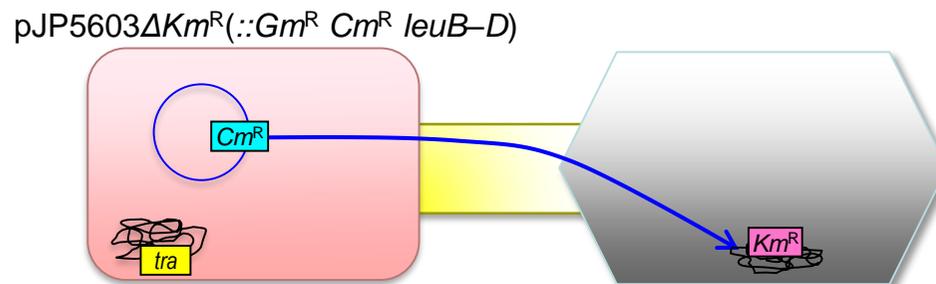
- 接合伝達
- プラスミド複製
- Cm, Ap 耐性

2nd



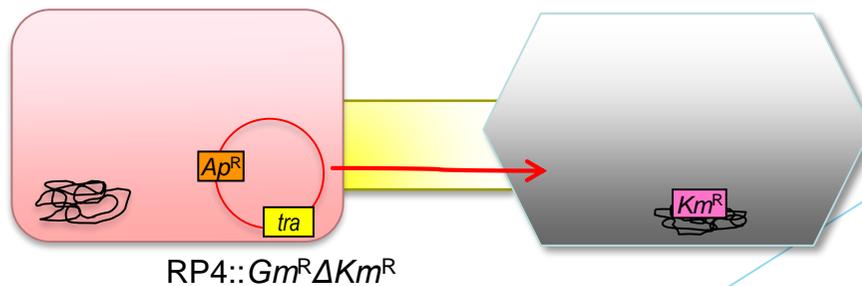
- 接合伝達
- プラスミド複製
- Cm 耐性

3rd



- 接合伝達
- Cm 耐性

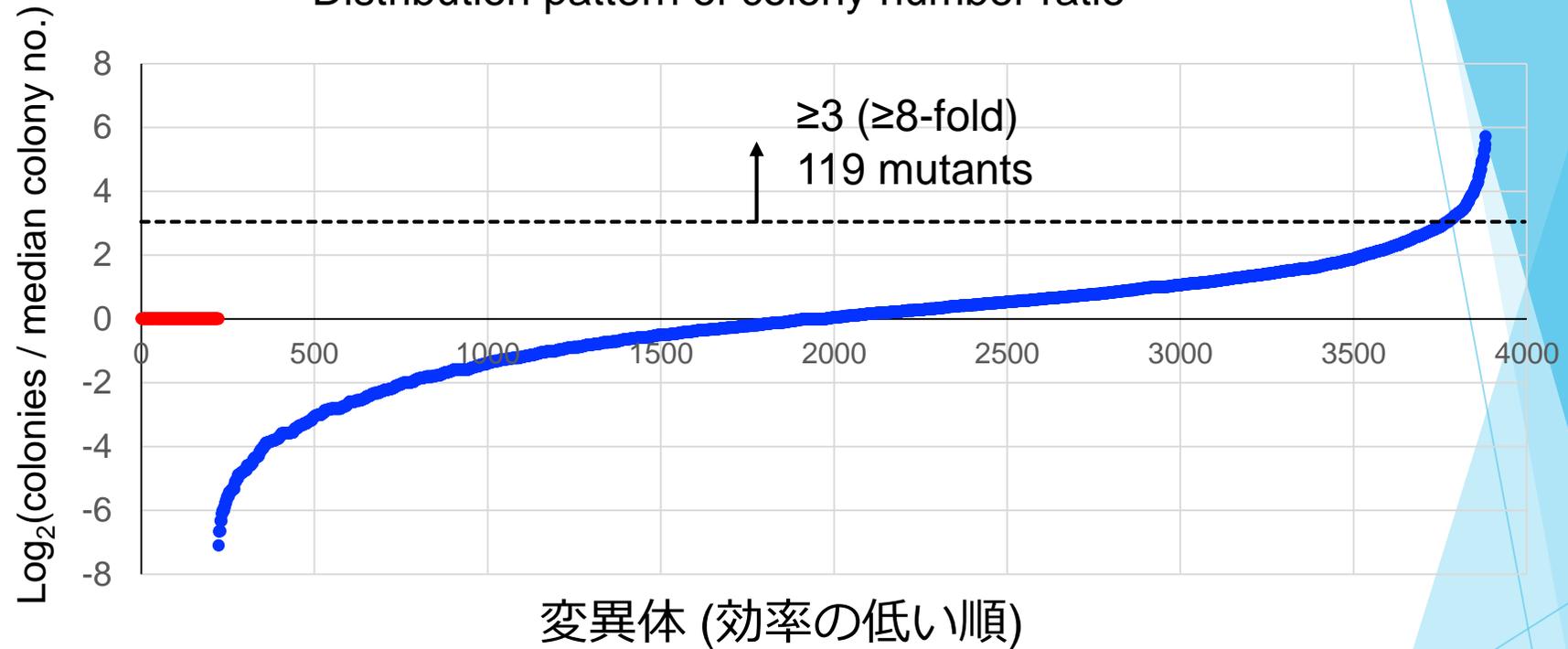
4th



- 接合伝達

接合効率“上昇” 変異体選抜 (1段階目)

Distribution pattern of colony number ratio

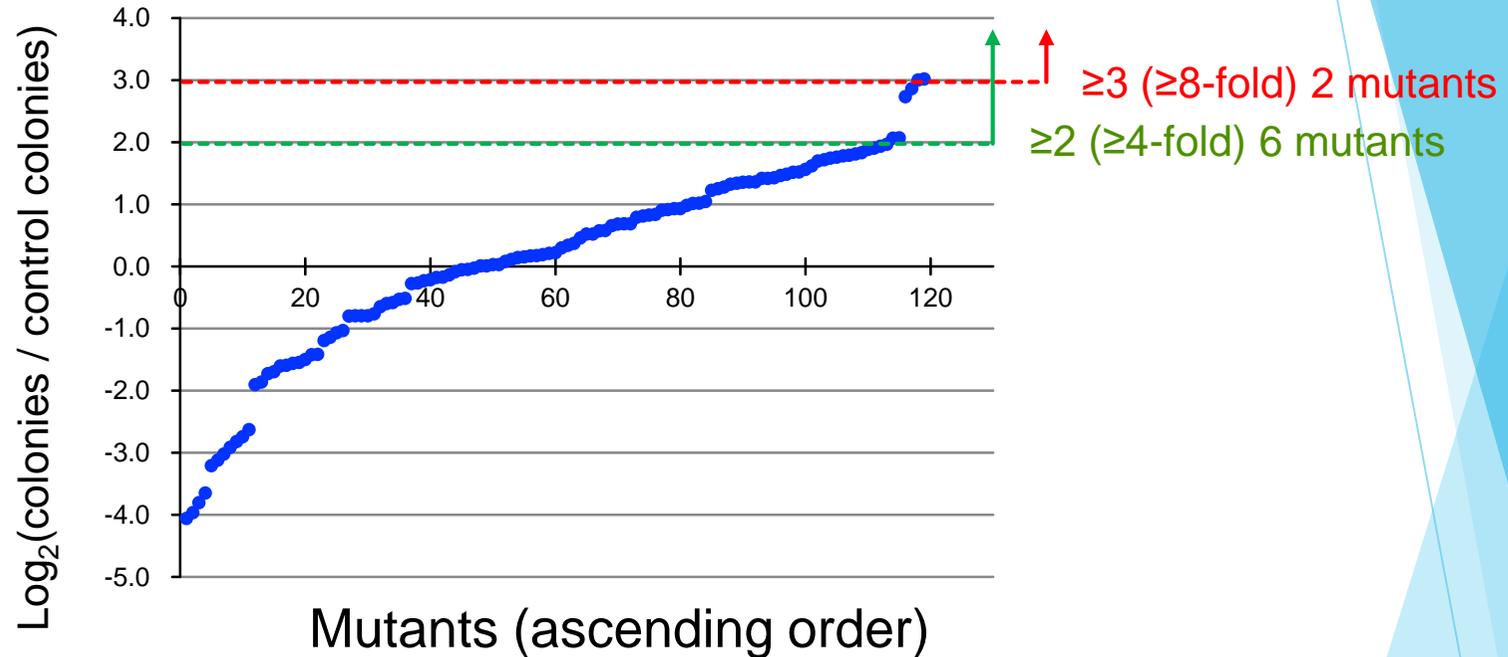


●: Less than detection limit.

$\mu = 0.13, \sigma = 1.86$ (excluding the data less than detection limit)

接合効率“上昇” 変異体選抜 (2 段階目)

Distribution pattern of colony number ratio



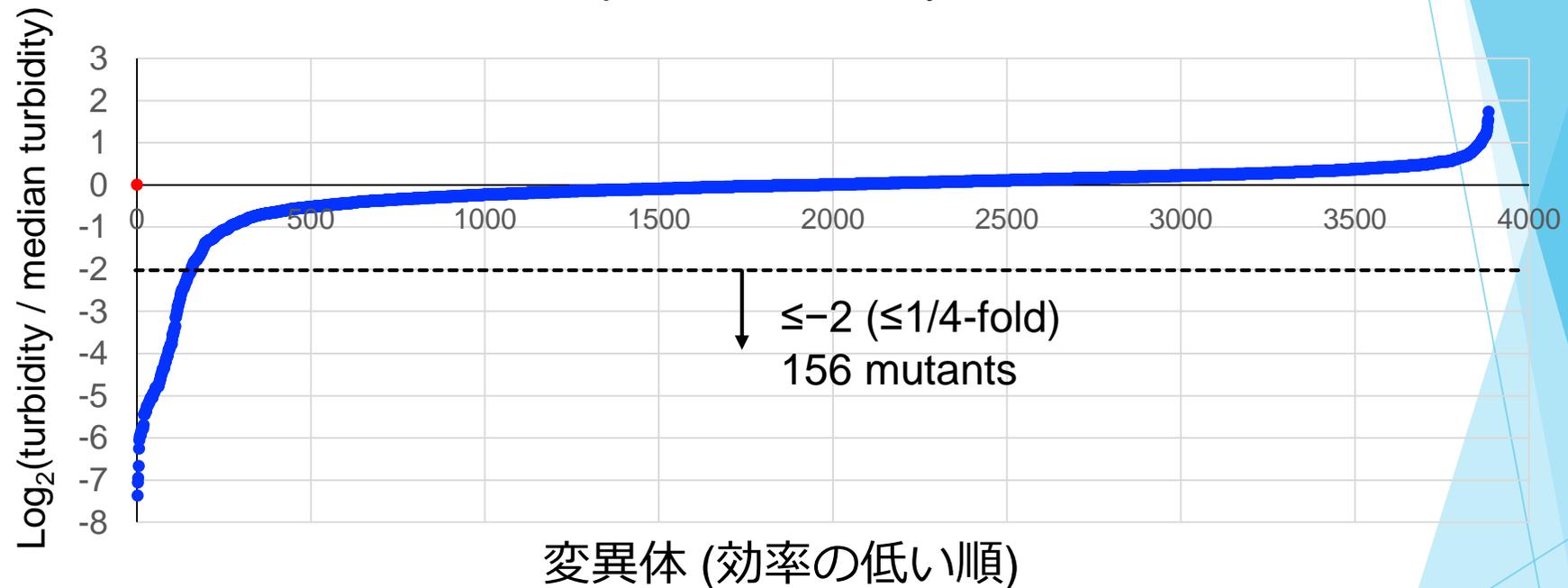
$n = 3$ (applied integrated value), $\mu = 0.12$,
 $\sigma = 1.56$

3, 4 段階目の選抜で全て外れ (< 1) であることがわかった。

明白な“上昇” 変異体は存在しない。
 ⇨ 接合伝達を抑制する因子はない。

接合効率“低下” 変異体選抜 (1 段階目)

Distribution pattern of turbidity ratio



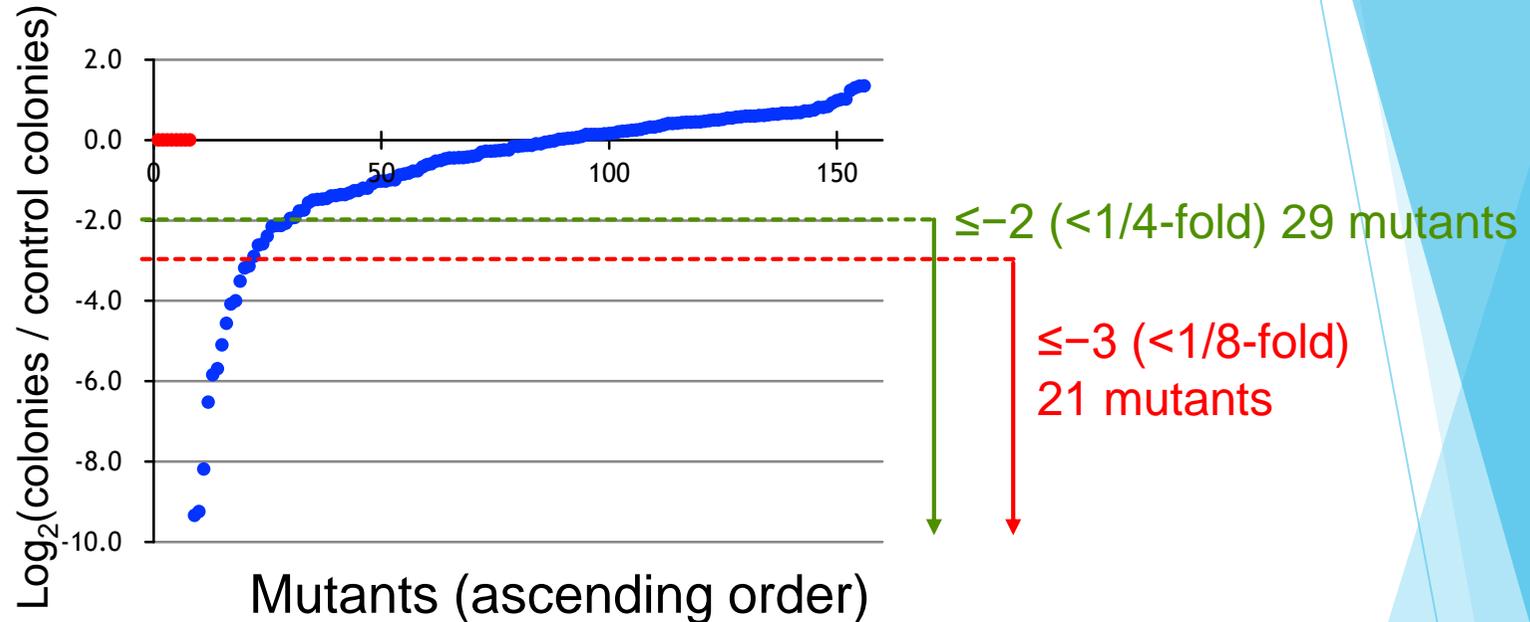
● : Less than detection limit.

$\mu = -0.20, \sigma = 0.93$ (excluding the data less than detection limit)

$\mu = -0.03, \sigma = 0.40$ ($-2 < \text{sample} < 2$)

接合効率“低下” 変異体選抜 (2 段階目) (接合体コロニー数に基づいた解析)

Distribution pattern of colony number ratio



● : Less than detection limit.

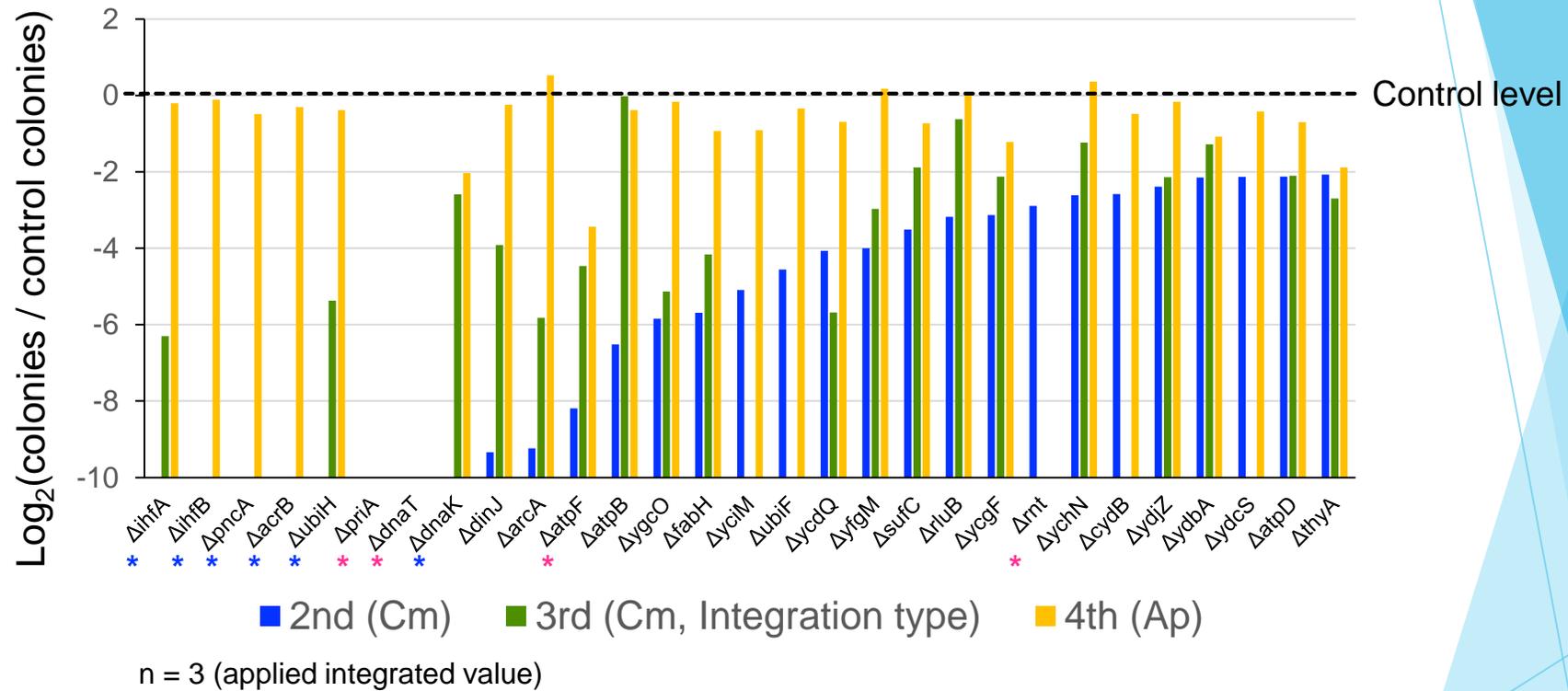
$n = 3$ (integrated value)

$\mu = -0.69, \sigma = 1.87$ (excluding the data less than detection limit)

$\mu = -0.09, \sigma = 0.78$ ($-2 < \log_2 \text{ value} < 2$)

≤-2 (<1/4-fold) を第 3, 4 段階目のスクリーニングへ

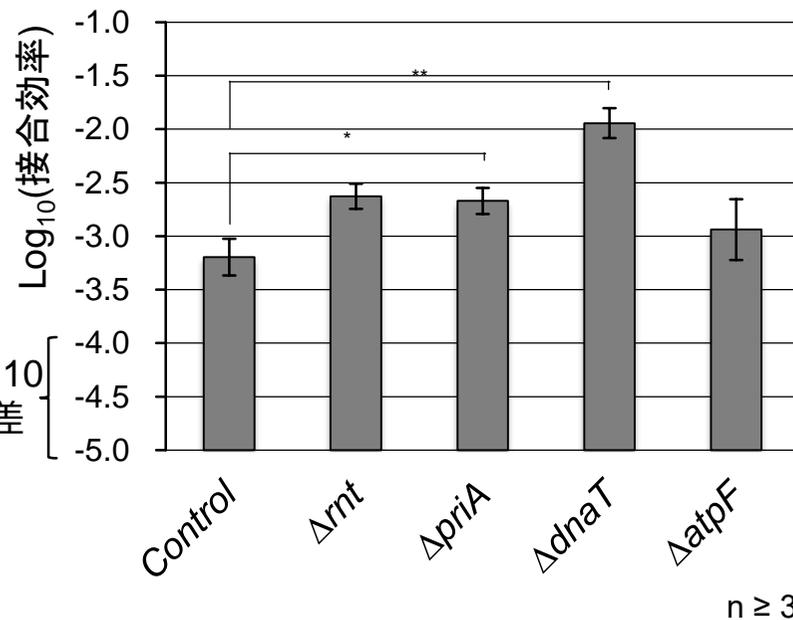
接合効率“低下” 変異体選抜 (3, 4 段階目) (接合体コロニー数に基づいた解析)



- プラスミド複製欠陥依存的な「低下」変異株は含まれなかった。
- ほとんどの候補変異株は接合変異体ではなかった。

残った $\Delta priA$ and $\Delta dnaT$ (ラギング鎖合成関連遺伝子) は本物/偽物の接合伝達変異体か？

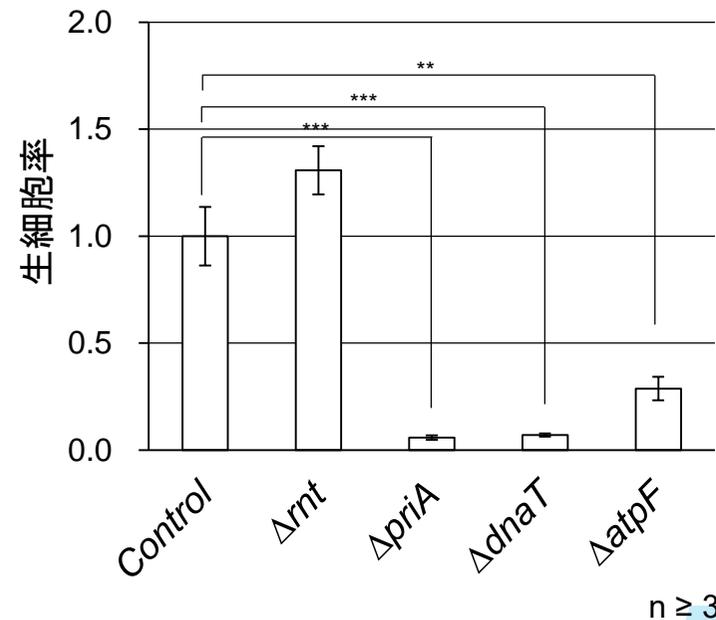
接合効率
(Transconjugant / Recipient cell)



1.0の差で10倍の効率差

より成長条件の良い環境で長く培養すると接合体が検出できた。

Living recipient cell ratio (生細胞比率)
(Mutant colony number / Control colony number)

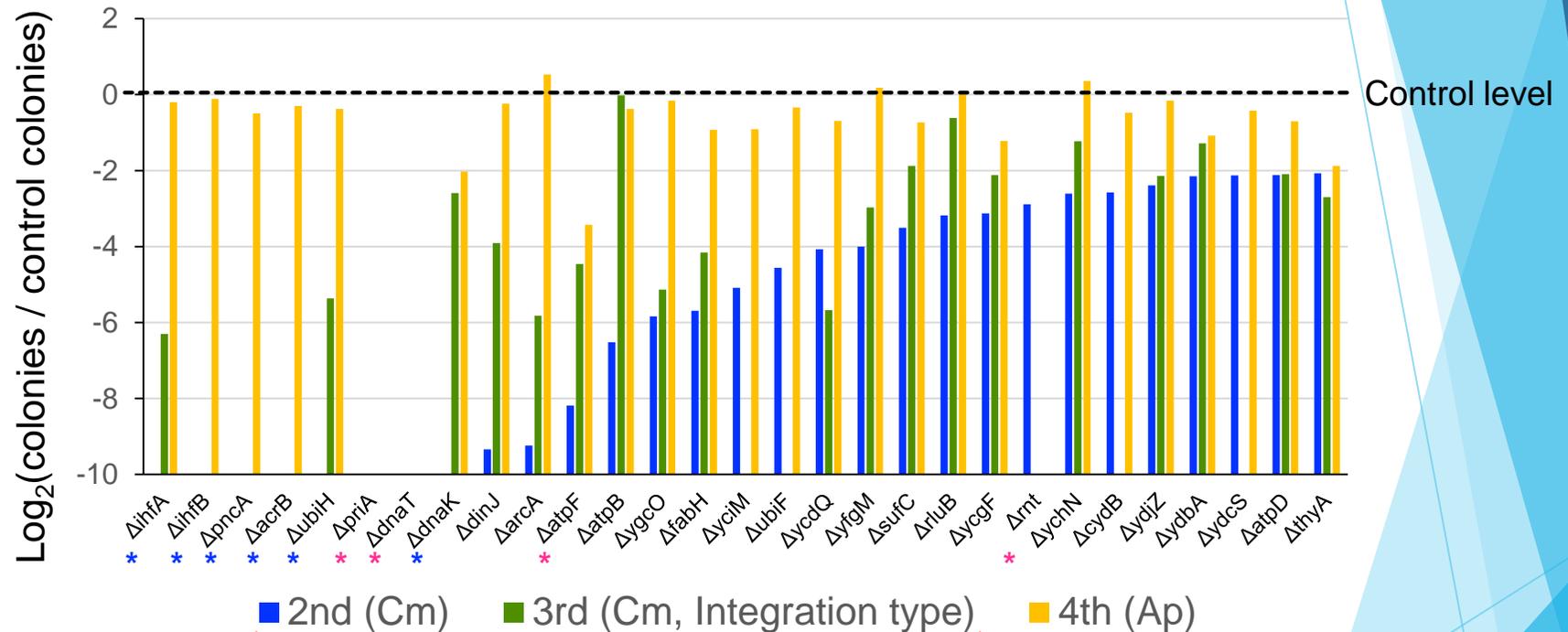


$\Delta priA$ and $\Delta dnaT$ 変異体は死細胞の割合が多い。

明白な“低下” 変異体は存在しない ⇒ 接合伝達を促進する因子はない。

上昇／低下変異体両方無し □ 接合伝達は止められない？

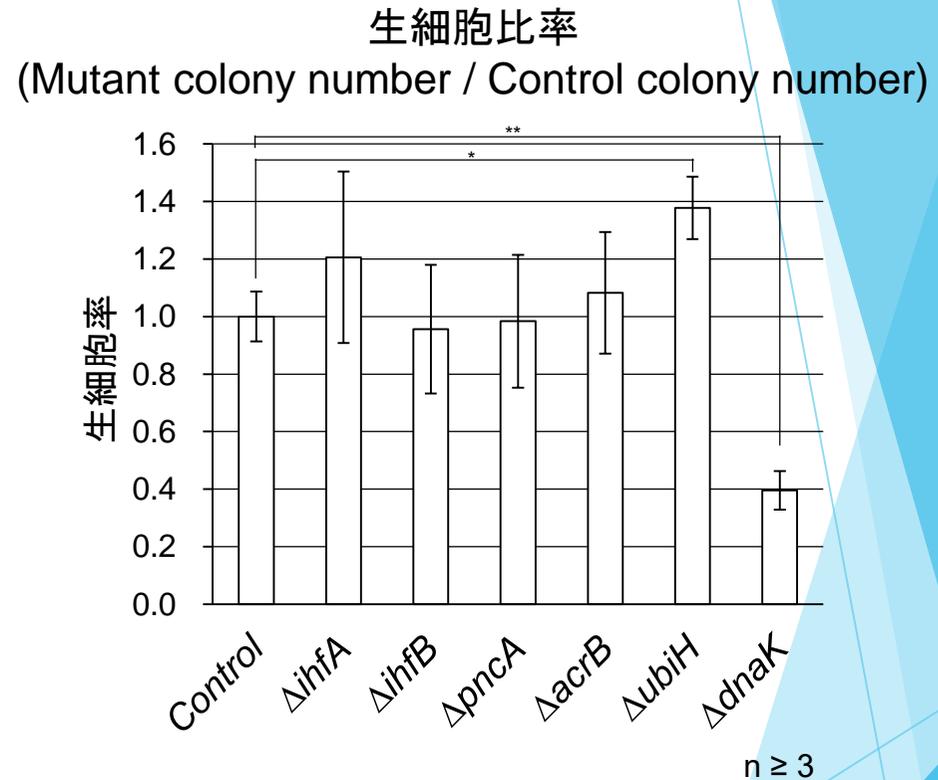
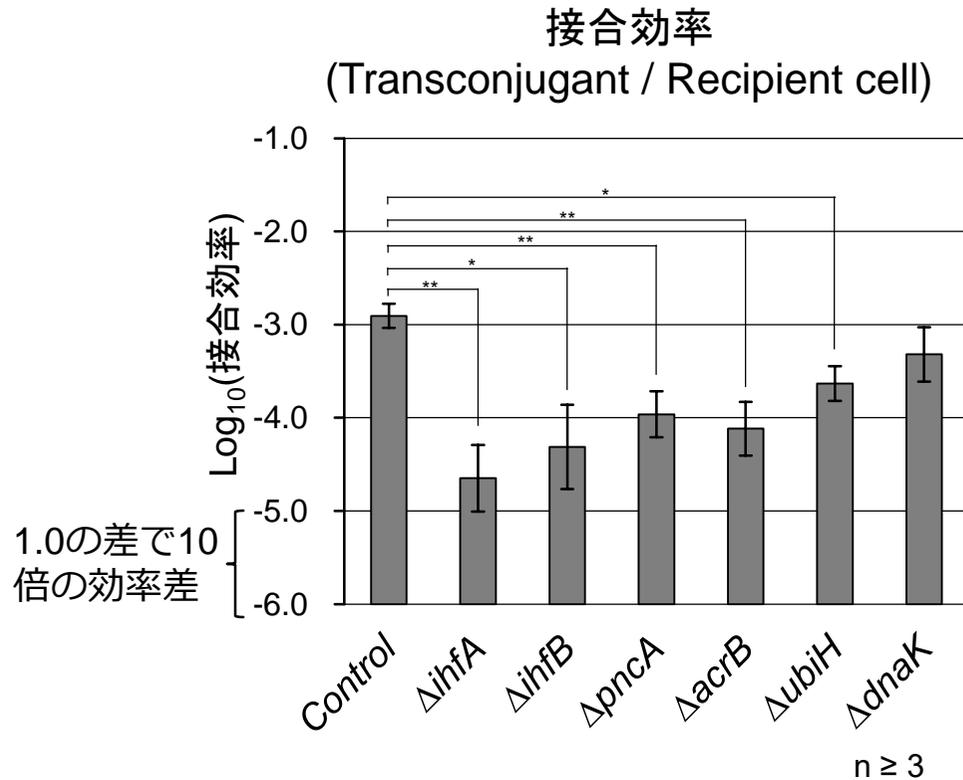
データを読み取る視点を変えてみる。



ここだけに引っ掛かるものは？

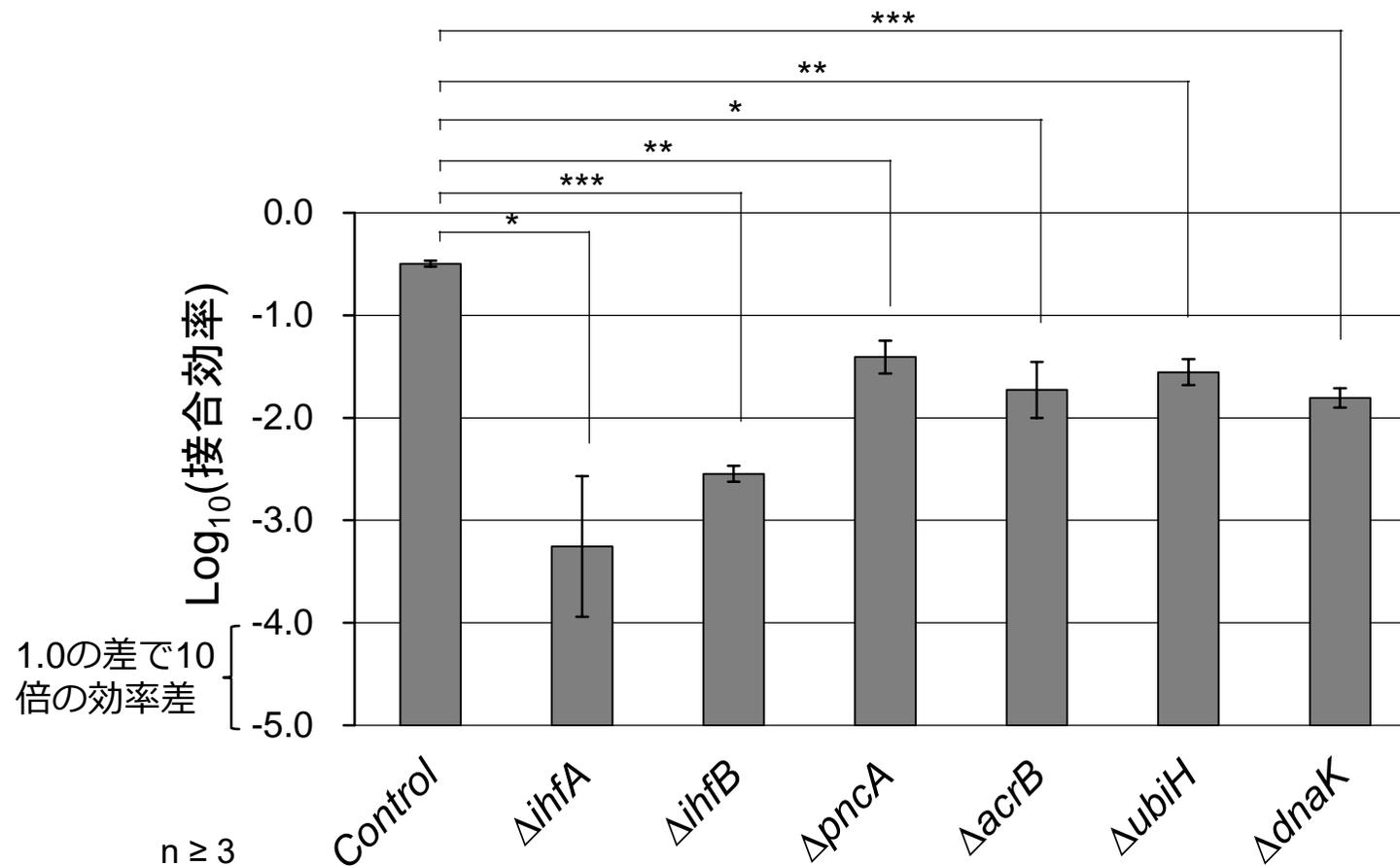
第2第3スクリーニングでポジティブで第4スクリーニングでネガティブな変異体は何を意味するのか？

抗生物質 (Chloramphenicol) 特異的な接合変異体？



- *ΔihfA*, *ΔihfB*, *ΔpncA*, *ΔacrB*, *ΔubiH* は接合効率が低下。
- *ΔdnaK* レシピエント生細胞率が低い。有意差は無いものの、接合効率も低い。

Chloramphenicol 特異的な接合変異体であることの確認 固相（ドナーとレシピエントが強制接触）での接合実験結果



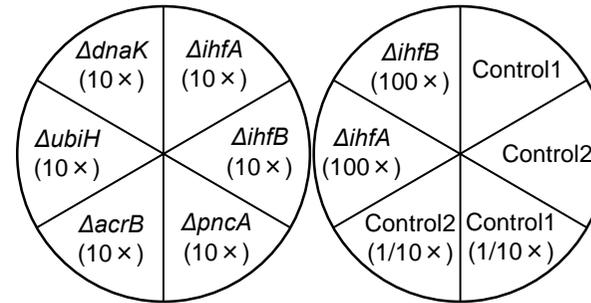
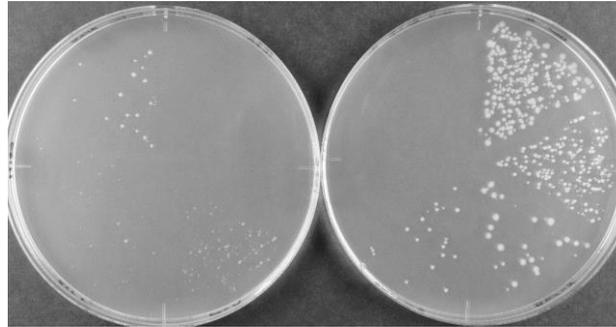
接合効率の低下はCell-Cell contact低下によるものではない。

ΔdnaK を含む 6 変異体全てで接合効率の低下を確認。

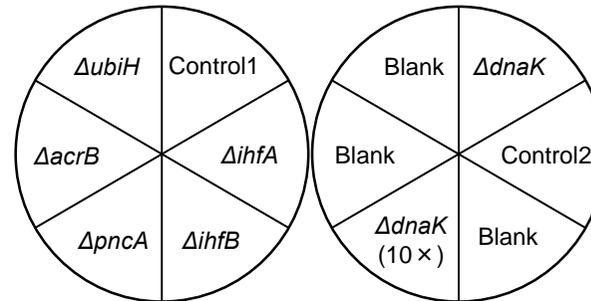
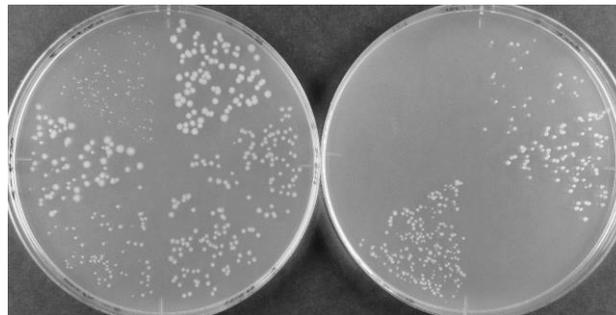
伝達そのものは抑えられない代わりに、伝達後の耐性確立を抑えることはできそう。

Chloramphenicol特異的な接合変異体の結果例

接合体 (28°C 22 h + 37°C 24 h)



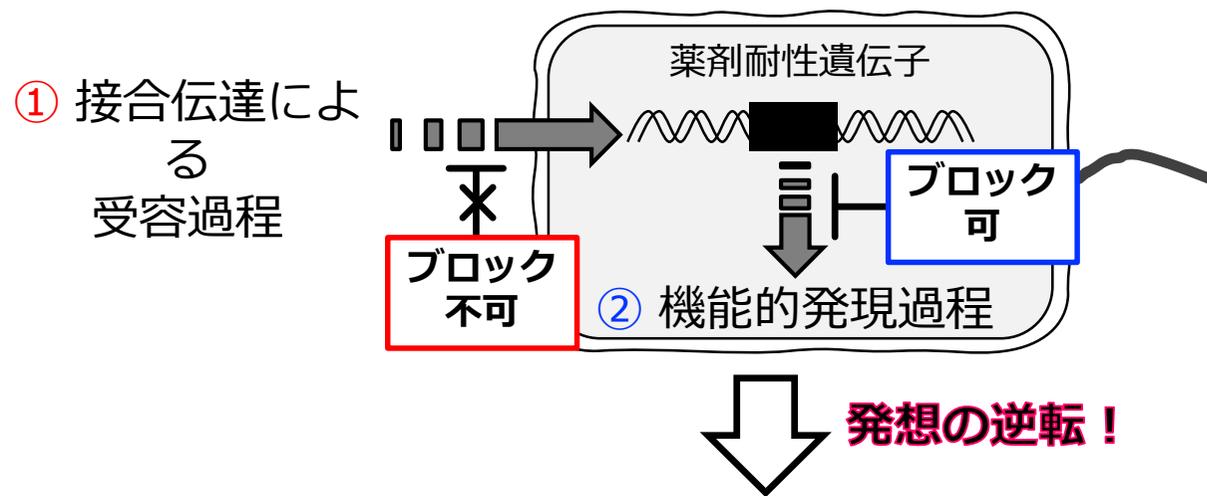
レシピエント (28°C 24 h)



接合効率が低いだけでなく、接合体のコロニー形成が遅い
(Cm感受性が保持されている)。

新薬開発に新たな選択肢を提供

IncPプラスミドによるゲノム網羅的接合受容因子探索結果



本技術の適用により可能なこと

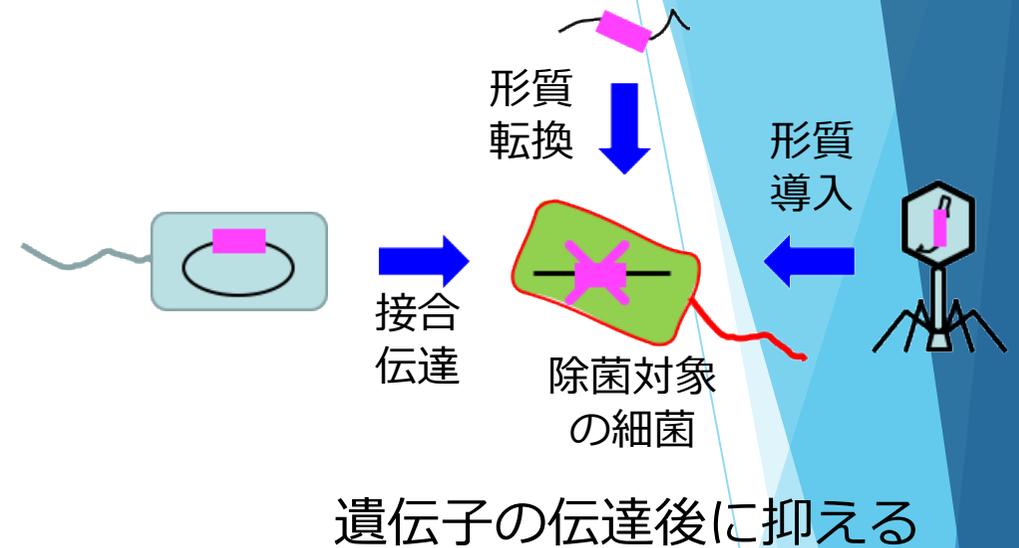
②をブロックするための標的因子探索を、①の接合系で行うと効率的にスクリーニング可能。

新技術の特徴・従来技術との比較

- ノックアウトライブラリーからのスクリーニングなので、非必須遺伝子が単離され、**従来の抗生剤とは標的が異なる。**
(従来の抗生剤は生命維持に必須なステップに作用)
- **個々の薬剤耐性遺伝子に対応した標的遺伝子が見つかる可能性が高い。**
(今回の場合ではクロラムフェニコール)

新技術の特徴・従来技術との比較

- 薬剤耐性遺伝子に対応した標的遺伝子であれば、**水平伝播の経路に関係なく効果が期待**できる。



- 最終的に出来上がる新薬は、耐性菌が問題となっている**既存品のシェアを奪うものではない**。併用することで既存品の売上を伸ばすことに貢献。

想定される用途

- ▶ 行き詰まり感のある新規抗生剤開発において、新たに標的とすべき遺伝子産物を探索する方策の一つになる。
- ▶ 上記を標的とした薬剤は、臨床現場において既存の抗生剤との併用薬として期待される。

(改変による) 想定される用途

- ▶ また、スクリーニング系を改変することにより、薬剤耐性プラスミドの供与に関与するバクテリア側染色体因子の探索にも適用可能である。
- ▶ 上記を標的とした薬剤は、院内で薬剤耐性プラスミドによる耐性病原菌が生じることを抑制する予防薬として期待される。

実用化に向けた課題

- ▶ 標的とすべき遺伝子の探索法は確立したが、薬剤探索ステップ以降は専門外である。
- ▶ Fragment-Based Drug Discovery法による薬剤探索を産総研との共同研究で計画しているが、公的研究資金の獲得には至っていない。
- ▶ 標的遺伝子スクリーニングの迅速化も必要あり（現状は全てマンパワー）。

企業への期待

- ▶ 標的遺伝子スクリーニングの迅速化については、バイオ・製薬企業が所持するような、多サンプル対応の自動培養・測定機器により克服できると考えている。
- ▶ 標的化合物スクリーニングの技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- ▶ また、新規抗生剤を開発中の企業、製薬分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- ▶ 発明の名称 : 細菌におけるクロラムフニコール耐性の確立を阻害するためのキットおよび方法
- ▶ 出願番号 : 特願2019-117496
- ▶ 出願人 : 広島大学
- ▶ 発明者 : 守口和基、鈴木克周、清川一矢

産学連携の経歴

- ▶ 2019年- アイ・メジャー社と共同研究実施

お問い合わせ先

広島大学 産学連携推進部 産学連携部門
産学官連携コーディネーター
柳 和裕

TEL 082-424-4306

FAX 082-424-6189

e-mail yanagi@hiroshima-u.ac.jp