OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	新規な抗多剤耐性菌剤創出のための基盤技術に関する研究
Author(s)	山近, 伸一郎
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34393
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

新規な抗多剤耐性菌剤創出のための基盤技術に関する研究

山近　伸一郎

目　次

緒　論 1
本　論 4
第一章　抗緑膿菌化合物の獲得および Compound A の標的同定 4
　実験材料および実験方法 5
　実験結果 9
　考察 14
　小括 17
第二章　新規抗菌化合物の標的推定ツールの構築およびそれを用いた解析 18
　実験材料および実験方法 19
　実験結果 22
　考察 30
　小括 32
第三章　Plasmid integration 試験系の構築およびその有用性評価 33
　実験材料および実験方法 34
　実験結果 46
　考察 53
　小括 55
総　括 56
結　論 58
謝　辞 59
参考文献 60

Abbreviations

ABPC : ampicillin
AZT : aztreonam
BIPM : biapenem
CAZ : ceftazidime
CPFX : ciprofloxacin
CXM : cefuroxime
DRPM : doripenem
EM : erythromycin
HTS : high throughput screening
IPM : imipenem
LVFX : levofloxacin
MEPM : meropenem
MIC : minimum inhibitory concentration
MMR : DNA mismatch repair
PAPM : panipenem
PIPC : piperacillin
QRDR : quinolone resistance determining region
RND : resistance nodulation division

緒　論

ペニシリンの発見以後、人類は幅広い細菌種に有効なカルバペネム、キノロン、およびアミノグリコシド系抗菌剤を創出し、長年苦しめられてきた細菌感染症の治療を可能にした。この革新的な進歩は、多くの細菌感染症の根治を実現させ、人類の死亡率を著しく低下させた。しかしながら、抗菌剤の乱用により、既存の抗菌剤に対して耐性を獲得した“多剤耐性菌”が出現し、今日の臨床現場において深刻な問題を引き起こしている(25, 81)。これら耐性菌の主な感染源は、病院外での市中感染および病院内での院内感染の 2 経路に大別される。市中感染症の治療剤として、広域スペクトルな抗菌剤が比較的好まれているが、院内感染症に対しては、原因菌特定もなされ、狭域スペクトラムな抗菌剤も有効な選択肢になり得る。院内感染症の主な起因菌として、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌などが挙げられるが、今日、緑膿菌および黄色ブドウ球菌の多剤耐性化は、有効な治療剤を枯渇させ、深刻な問題となっている(27, 31, 75, 81)。

緑膿菌は、グラム陰性好気性桿菌に分類され、日和見感染症の起因菌として知られている。臨床現場においては、免疫不全の患者に感染し、院内肺炎（HAP)、複雑性尿路感染症（cUTIs)、複雑性腹腔内感染症（cIAIs)、あるいは複雑性皮膚・皮膚組織感染症（cSSSIs）を引き起こす。また、当該菌のゲノムは、全長 6.3 Mbp と長く、他菌種では認められない多くの遺伝子を有している(74)。それら遺伝子群の中には、多数の異物排出ポンプをコードする遺伝子が含まれており、これら排出ポンプが、一部の抗菌化合物・金属に対する抵抗性を緑膿菌に付与している(1, 6, 66, 75)。今日、緑膿菌は、これら多数の異物排出ポンプの高発現化に加え、薬剤との親和性を低下させる標的の変異ならびに抗菌剤を不活化する修飾酵素の産生能の獲得を通して、既存抗菌剤では治療困難な多剤耐性緑膿菌となり、臨床現場で蔓延している(6, 14, 19, 25, 27, 61)。

一方、黄色ブドウ球菌は、グラム陽性球菌に分類され、創傷部などに化膿病変を起こす菌としてかつて恐れられていた。その後、ペニシリン系抗菌剤の出現により化膿性感染症は克服されたものの、それら抗菌剤に低感受性である多剤耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）が出現し再び問題となっている(13)。臨床現場においては、緑膿菌と同じく免疫不全の患者の院内感染症を引き起こすことに加え、市中肺炎の起因菌でもある。近年、標的変異による従来の抗菌剤に対する耐性化に加え、唯一有効であったリネゾリドに対しても耐性化した MRSA が出現し、有効な特効薬が枯渇した状況が続いている(23, 70)。

各アカデミアならびに製薬企業は、多剤耐性緑膿菌および MRSA などの多剤耐性菌に有効な抗菌剤獲得を目指し、主に 3 つのアプローチによる研究開発に取り組んできた(42)。第一に、既存抗菌剤の合成展開を進め、抗菌活性の増強や有効菌種の拡大を目指した取り組みを進めてきた(42)。キノロンやβ-ラクタム系抗菌剤は、その最たる例である。第一世代であるキノロン系ナリジキシン酸はグラム陰性菌の一部にのみ抗菌活性を示す化合物であっ

たが、その後、グラム陽性菌を含む幅広い菌種に強い抗菌活性を示すシプロフロキサシン（CPFX）やレボフロキサシン（LVFX）が合成展開により生み出された(79, 84)。近年、キノロンの標的である DNA ジャイレースおよびトポイソメレース IV の両者を非常に強く阻害することで、より強い抗菌活性を示し、且つ耐性菌の出現を抑えるシタフロキサシンも生み出されている(71)。しかしながら、両標的に複数の変異の入った耐性菌に対する抗菌活性は弱く、多剤耐性株に対する使用には限界がある。

第二に、既存抗菌剤との併用、すなわち抗菌剤の耐性化に寄与する因子の阻害剤の開発である(42)。最も多剤耐性菌への効果を増強させる併用剤として、異物排出ポンプ阻害剤が挙げられる。旧 Microcide 社などにより精力的に当該研究がなされていたが、未だこの阻害剤での成功例は無い(45, 68)。一方、成功例としては、β-ラクタマーゼ阻害剤が挙げられる。β-ラクタム薬を分解する β-ラクタマーゼを阻害するクラブラン酸が、1976 年に見出された(11)。現在、クラブラン酸とアモキシシリンの合剤は、有効な治療薬として使用されている。しかしながら、カルバペネム系抗菌剤すらも分解するメタロ β-ラクタマーゼを保有するグラム陰性菌も散見されるようになり、その阻害剤の開発も求められるようになった。近年、異物排出ポンプならびにメタロ β-ラクタマーゼの結晶構造が明らかとなり、排出機構や認識機構が明らかになりつつある。今後、これらの情報を基にした新たな創薬アプローチが進められる可能性は高い。

第三に、新規作用機作を有する抗菌剤の創出である。第一および第二の戦略と比べ、当該アプローチにより得られた化合物は、新規作用機作に基づく抗菌活性を示すため、最も多剤耐性菌に対して有効であると考えられている(42)。21 世紀になると抗菌活性を指標にしたハイスループットなスクリーニングに加え、ゲノム創薬と呼ばれるゲノム解析結果を基にした創薬研究が本格化してきた。1995 年のインフルエンザ菌の全ゲノム解明を皮切りに、2000 年に緑膿菌の、続いて 2001 年に黄色ブドウ球菌の全ゲノム配列が明らかとなった(14, 20, 40)。その後 2007 年に、GlaxoSmithKline 社から黄色ブドウ球菌において増殖に必須な機能既知 70 蛋白質の阻害剤スクリーニングの成果が報告されたが、黄色ブドウ球菌およびグラム陰性菌に併せて有効な化合物は獲得されていない(63)。

先に述べたように、第一および第二のアプローチで得られた抗菌剤は、多剤耐性緑膿菌および MRSA の一部に対する効果しか示さない可能性が高い。それ故に、私は、第三のアプローチで新規多剤耐性菌剤を創出することが一番であると考えた。当該アプローチで新規抗菌剤を創出する上で最も重要な点は、緑膿菌と黄色ブドウ球菌それぞれの特性に合わせた戦略立案ならびにそれを実現するための基盤技術の確立である。本研究では、創薬プラットフォームとなり得る基盤技術を確立する目的で、第一章では、緑膿菌に対して抗菌活性を示す化合物セットの整備ならびに有望化合物の評価、第二章では、第一章で得られた抗緑膿菌化合物の標的予測を効率的に実現するための大腸菌株の作製ならびにその有用性の評価、第三章では、黄色ブドウ球菌に対する特効薬創出を実現させ得る基盤として、

新規標的となり得る黄色ブドウ球菌の増殖必須遺伝子およびその機能解析に有効な PI 試験系の構築、を行なった。

本　論

第一章　抗緑膿菌化合物の獲得および Compound A の標的同定

多剤耐性緑膿菌に対して有効な抗菌剤を創出することは、非常に難しい。その大きな要因は、低分子化合物が透過し難い緑膿菌の膜構造にある。緑膿菌などのグラム陰性菌は、外膜と内膜の 2 つの膜、およびその両膜の間に挟まれたペリプラズムと呼ばれる領域を有している(10, 56, 60)。内膜は、脂質二重層構造の膜であるため、水溶性化合物を透過させ難い性質である(10, 56, 60)。一方、外膜は、脂質二重層構造の膜に加え、その外側に様々なリポ多糖体を有しているため、水溶性および脂溶性の両化合物を透過させ難い性質である(10, 56, 60)。

加えて、緑膿菌は、細胞質内から外膜外に低分子を直接排出できる RND 型の排出ポンプを数多く有しており、それらを介した排出もまた細胞質内での低分子化合物の高濃度蓄積を阻止している(1, 7, 55)。RND 型の排出ポンプは、3 種の蛋白質が形成する複合体である(7)。緑膿菌においては、RND 型の排出ポンプとして MexA/MexB/OprM、MexC/MexD/OprJ、MexE/MexF/OprN、および MexX/MexY/OprM が良く解析されている(39, 48, 54, 65, 66, 82)。これら排出ポンプは、個々の基質認識性は異なるものの、多剤耐性緑膿菌において高発現していることが報告されている(6, 19, 41, 61, 88)。それ故に、多剤耐性緑膿菌に抗菌活性を示す低分子化合物は、菌体内への移行性・残留性が高い性質、すなわち、緑膿菌の膜構造による影響および異物排出ポンプの影響を受け難い性質を有することが望まれる。

そのような性質は、低分子化合物の骨格に依存することが多く、側鎖等の置換によって劇的に変化しにくいと考えられている。加えて、そのような性質を有する化合物を選抜するには、化合物間での比較が可能で且つ定量性が高い手法を確立することが不可欠である。残念ながら、その実現は困難であったことから、代替案による有望化合物の選抜を試みることとした。ポンプ欠損緑膿菌に対して抗菌活性を示す化合物は、膜障害作用を示す化合物を除き、緑膿菌の膜構造に対する透過性および標的阻害活性を併せ持つ可能性が高いと考えられる。本章ではまず、そのような化合物を絞り込む目的で、異物排出ポンプ欠損緑膿菌株に対して抗菌活性を示す化合物スクリーニングを実施した。続いて、その中の有望化合物について、異物排出ポンプに対する感受性を含む主薬理作用解析進めると共に、その標的同定を試みた。

実験材料および実験方法

菌株

緑膿菌野生 PAO1 株およびその異物排出ポンプ欠損 PAM1626 株（Δ*mexAB-oprM*、Δ*mexCD-oprJ*、Δ*mexEF-oprN*）(44)、N150 株（Δ*mexAB-oprM*、Δ*mexCD-oprJ*、Δ*mexXY*）(50)、黄色ブドウ球菌 ATCC 6538P（FDA-209P）株、*Acinetobacter baumannii* ATCC19606 株、および *Klebsiella pneumonia* ATCC13883 株を用いた。

薬剤／化合物

Levofloxacin（LVFX；ケムテックラボ株式会社合成品あるいは第一三共株式会社合成品）、erythromycin（EM；Sigma-Aldrich Corp.）、社内低分子化合物（1 mg/mL あるいは 2 mM）、Compound A（Fig. 1； 社内ライブラリ化合物）、および A22（Fig. 2；ナミキ商事）を用いた。尚、LVFX は滅菌超純水あるいは DMSO に、ならびに EM、Compound A、および A22 は DMSO に溶解した。A22 は、既知の MreB 阻害化合物として種々の評価において対照として用いた(34)。

培地

Mueller Hinton Broth（MHB； Becton, Dickinson and Company）および Mueller Hinton II Broth（CAMHB；Becton, Dickinson and Company）、ならびに Mueller Hinton Agar（MHA； Becton, Dickinson and Company）を用いた。

薬剤／化合物添加アッセイプレートの準備

High throughput screening（HTS）用として、384 穴プレート（Greiner bio-one GmbH）の 1 および 2 列の各ウェルに 50 μg/mL LVFX 溶液を 1 μL（終濃度 1 μg/mL； 100%増殖抑制ウェル）、3～22 列に 1 mg/mL あるいは 2 mM 化合物 1 μL（終濃度 20 μg/mL あるいは 40 μM）、23 および 24 列の一部に、DMSO を 1 μL（終濃度 2%； 100%増殖ウェル）を添加した。また、23 および 24 列には、終濃度が 8、4、2、および 1 μg/mL となるように調製した EM 溶液もそれぞれ 1 μL ずつ添加した。

再現性試験を含めた増殖阻害試験用として、96 穴プレート（旭硝子株式会社）の 1 列に 50 μg/mL LVFX 溶液を 2 μL（終濃度 1 μg/mL； 100%増殖抑制ウェル）、2～10 列の各ウェルに 1 mg/mL あるいは 2 mM 化合物を 2 μL（終濃度 20 μg/mL あるいは 40 μM）、12 列に DMSO を 2 μL（終濃度 2%； 100%増殖ウェル）添加した。また、11 列には、終濃度が 0.03、0.015、0.008、および 0.004 μg/mL となるように調製した LVFX 溶液をそれぞれ 2 μL ずつ添加した。

増殖阻害試験（384 穴プレート）

MHA 上で一晩 35°C 培養した PAM1626 株を、生理食塩水（大塚製薬工業株式会社）に OD_{600} 値が 0.08~0.10 となるように懸濁し、これを MHB で 250 倍希釈し、接種菌液とした。接種菌液を薬剤／化合物添加アッセイプレートのすべてのウェルに Multidrop（Titertek Instruments Inc.）にて 50 µL ずつ添加した。接種直後の各ウェルの OD_{600} 値を 2104 EnVision マルチラベルカウンター（Perkin Elmer Inc.）にて測定後、6 枚単位で積み重ねた状態下 35°C で 18 時間培養し、培養後の OD_{600} 値を測定した。

増殖阻害率の算出

各化合物の増殖阻害率は、プレートごとに補正した OD_{600} 値（培養後の OD_{600} 値－培養前の OD_{600} 値）を用い、以下の計算式で算出した。

増殖阻害率（%）＝100 ×［1 −（化合物ウェル OD_{600} 値－100%増殖抑制ウェル OD_{600} 平均値）÷（100%増殖ウェル OD_{600} 平均値－100%増殖抑制ウェル OD_{600} 平均値）］

Z’値の算出

以下の計算式で算出した。

Z’= 1－(100%増殖ウェル OD_{600} 値の SD の 3 倍値 + 100%増殖抑制ウェル OD_{600} 値の SD の 3 倍値) ÷ (100%増殖ウェル OD_{600} 値 − 100%増殖抑制ウェル OD_{600} 値)

増殖阻害試験（96 穴プレート）

PAM1626 株増殖阻害試験では、96 穴のアッセイプレートのすべてのウェルへの接種菌液添加量を 100 µL とした以外は、増殖阻害試験（384 穴プレート）項に準じて実施した。

抗菌活性試験

薬剤非含有 MHA にてそれぞれ 35°C で一晩培養後、OD_{600} 値が 0.01 となるように生理食塩水にて調製した菌液を、2 倍段階希釈した各薬剤／化合物を含む MHB に接種した（約 10^4 c.f.u./well）。37°C で 16-18 時間培養後、菌の発育が肉眼的に認められない薬剤最小濃度を minimum inhibitory concentration（MIC）とした。

耐性菌の獲得

N150 株を 35°C で一晩 CAMHB にて培養し、その原液ならびに生理食塩水にて 5 倍希釈した菌液をそれぞれ、Compound A あるいは A22 を 32 μg/mL で含有した MHA プレートに 100 μL ずつ塗抹し、35°C で 24 時間培養後のプレート上のコロニーをカウントした（耐性菌数）。また、培養原液を生理食塩水にて 10^5 倍希釈した菌液を MHA プレートに 100 μL 塗抹し、24 時間培養後のコロニー数をカウントして、各プレートに塗抹した生菌数を算出した。これらの値を用いて、耐性菌出現頻度（耐性菌数／塗抹した生菌数）を算出した。

塩基配列の解析

Compound A および A22 耐性菌コロニーを用い、Pa mreB F5 プライマー（5’-CCTTGCCCAAAATCCCCGTCGTTGT-3’）および Pa mreB R3 プライマー（5’-GCATTTCCGCCAGGCCGTAGAAAGG-3 ’）、ならびに Pa lolA F1（5’-GATGATCGAGGCGATGGAGA-3’）および Pa lolA R1 プライマー（5’-CACGTACTCGTCCAGGTTTG-3’）を用いた PCR［PrimeSTRA MAX Premix（タカラバイオ株式会社）を用い、98°C で 5 秒間反応後、98°C 10 秒間、55°C 5 秒間、72°C 10 秒間の一連の反応を 30 サイクル、最後に 72°C で 10 秒間の反応］で *mreB* 遺伝子を含む DNA 断片 1325bp ならびに *lolA* 遺伝子を含む DNA 断片 834bp をそれぞれ増幅した。適宜設定したプライマーを用いて thermal cycling ［BigDye Terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit（アプライド バイオシステムズ ジャパン株式会社）を用い、96°C で 1 分間反応後、96°C で 10 秒間、50°C で 5 秒間、60°C で 4 分間の一連の反応を 25 サイクル］を行なった。その後、サンプルを Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer（アプライドバイオシステムズ ジャパン株式会社）で泳動・解析し、塩基配列を決定した。

短時間殺菌性評価

短時間殺菌性評価は、96 穴プレート（旭硝子株式会社）を用いて実施した。MHA に 35°C で一晩培養した N150 株のコロニーを OD_{600} 値が 0.1 となるように CAMHB に懸濁し、CAMHB で 3000 倍希釈後、96 穴プレートに 100 μL/well 分注した。35°C で 2 時間静置培養後、Compound A および A22 それぞれの終濃度が 100、25、6.25、1.56 μg/mL および 50、12.5、3.13、0.78 μg/mL となるように添加した（DMSO 濃度 2% ; それぞれ 25、6.25、1.56、0.4MIC に相当）。増殖 control には DMSO を 2%濃度になるように添加した。化合

物添加時を 0 として、-1、0、1、2、4 時間に培養菌液 10 µL を採取し、生理食塩水にて 10 倍段階希釈系列を調製した。培養菌液あるいは希釈菌液の 50 µL を滅菌シャーレに分取し、これに約 60°C にて保温した滅菌済 MHA 10 mL を分注し、混和、固化、乾燥後、35°C で培養した。24 時間培養後のコロニー数をカウントし、生菌数を算出した。

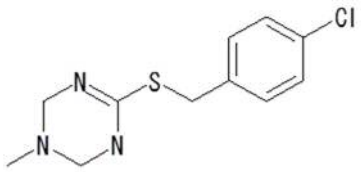
形態変化の観察

35°C で一晩、MHA で培養した菌株を CAMHB に接種し、35°C で振盪培養した。OD_{600} が 0.2～0.3 となった時点で、化合物を 1、4、および 16 µg/mL となるように添加し、更に 3 時間培養した。培養後の菌の形態を微分干渉顕微鏡（オリンパス株式会社）にて観察した。

実験結果

まず、緑膿菌の膜構造に対する透過性および標的阻害活性を併せ持つ化合物を絞り込む目的で、50,000 種以上の化合物を対象に、20 μg/mL あるいは 40 μM でのポンプ欠損緑膿菌（PAM1626 株）に対する増殖阻害 HTS を実施した。いずれの試験においても、100%増殖ウェルでの OD_{600} 値（最大値）および 100%増殖抑制ウェルでの OD_{600} 値（最小値）は安定し、Z’ 値も良好であった（Z’ >0.8）。PAM1626 株の増殖を 50%以上阻害した化合物は、1000 種以上であったが、既存骨格（キノロンなど）を除いた後、再現性が確認できたものは、500 種以上の化合物であった。これら化合物を抗緑膿菌化合物セットとした。

増殖阻害活性が強い化合物程、良好な膜透過性（含、菌体内貯留性）ならびに標的阻害活性を併せ持つ可能性が高いと考えた。そこで、異物排出ポンプ欠損 PAM1626 株の増殖を強力に阻害した化合物で、既知の知見から標的候補を選定できると考えた Compound A を選抜し、更なる解析を進めた（Fig. 1）。Compound A の緑膿菌異物排出ポンプに対する基質性および抗菌スペクトラムを明らかにする目的で、緑膿菌に加え、多剤耐性菌が問題となっている黄色ブドウ球菌、*Acinetobacter baumannii*、および *Klebsiella pneumonia* に対する Compound A の抗菌活性を評価した。緑膿菌野生株 PAO1 および PAM1626 株と異なる排出ポンプ構成因子を欠損させた N150 株に対する Compound A の MIC の結果から、LVFX (PAO1/N150 MIC 比 32) と比較して、緑膿菌排出ポンプの影響を受けにくい化合物であることが明らかとなった（同比が 1 ; Table 1）。また、その抗菌活性は緑膿菌特異的であることも明らかとなった。（Table 1）。



Compound A

Fig. 1. Structure of Compund A

Table 1. The MICs of Compound A

Strains	MICs of:	
	Compound A	LVFX
P. aeruginosa PAO1	4	0.5
P. aeruginosa N150	4	0.015
K. pneumoniae ATCC13833	128	ND
A. baumannii ATCC19606	128	ND
S. aureus FDA-209P	>128	ND

N150, *P. aeruginosa* PAO1 lacking Mex pumps; LVFX, levofloxacin; ND, not determined

社内データベースを基にした検索の結果、Compound A の構造は、A22 および MAC13243 に類似している興味深い知見を見出した（Fig. 2）。A22 は、ヒトアクチンホモログである MreB 蛋白質を阻害すること、MAC13243 は、グラム陰性菌の内膜から外膜にリポ蛋白質を輸送する媒体である LolA 蛋白質を阻害することがそれぞれ報告されている(34, 62)。それ故に、Compound A の標的は、MreB あるいは LolA 蛋白質のいずれかである可能性が高いと考えた。

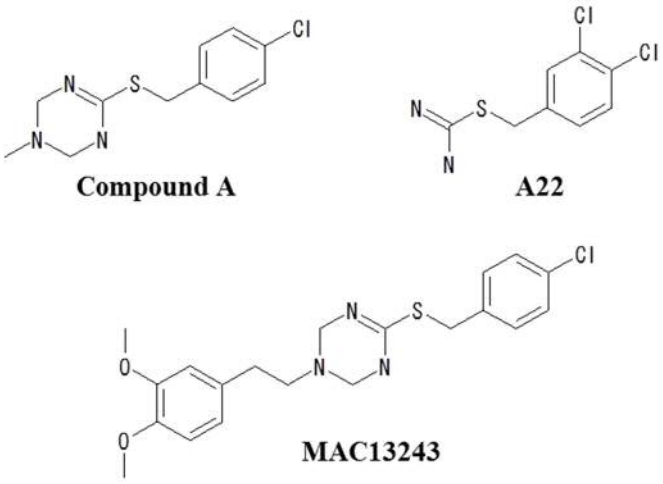


Fig. 2. Structures of A22 and MAC13243

その仮説を検証する目的で、Compound A および A22 の耐性株を獲得し、それら株の *mreB* および *lolA* 遺伝子上の変異の有無を解析した。まず、緑膿菌 N150 株を用いて、32 μg/mL の濃度下で Compound A 耐性株を無作為に 4 株獲得した。その耐性菌出現頻度は、2×10^{-8} であった。また、同濃度において、A22 耐性株を無作為に 3 株獲得した。これら耐性株に対する Compound A の MIC は、親株（N150 株）に対する MIC の 32 倍以上であっ

た（Table 2）。続いて、各々の耐性株の *mreB* および *lolA* 遺伝子の全塩基配列を解析した結果、いずれの株においても *mreB* 遺伝子上にのみ、アミノ酸変異（G293S、P113R/L、あるいは T168A）をもたらす変異が認められた。加えて、これら耐性株は、MreB 阻害剤である A22 に対しても耐性化していること（Table 2）、ならびに A22 耐性株においても *mreB* 遺伝子上にアミノ酸置換を引き起こす変異（C111R および E141G）が認められたことから（Table 2）、Compound A は MreB 蛋白質を阻害することが示唆された。

Table 2. Analysis of Compound A- and A22-resistant strains from *P. aeruginosa* N150

Strains	Selected compounds	MICs (μg/mL) of:			Amino-acid mutations in:	
		Compound A	A22	LVFX	MreB	LolA
N150		4	2	0.015		
HR39	Compound A	>128	64	0.015	G293S (GGC→AGC)	None
HR40	Compound A	>128	64	0.015	P113R (CCG→CGG)	None
HR41	Compound A	>128	64	0.015	P113L (CCG→CTG)	None
HR42	Compound A	>128	64	0.015	T168A (ACT→GCT)	None
HR43	A22	>128	64	0.015	E141G (GAG→GGG)	None
HR44	A22	>128	64	0.015	E141G (GAG→GGG)	None
HR45	A22	>128	64	0.015	C111R (TGC-CGC)	None

Compound A の主薬理特性を更に明らかにする目的で、短時間殺菌性評価および形態変化の観察を行なった。緑膿菌 N150 株に対する Compound A および A22 の作用は、それぞれ 100 μg/mL（25MIC）および 50 μg/mL（25MIC）を作用させた場合でも 4 時間後まで菌数の顕著な減少および増加は認められず、静菌的であった（Fig. 3）。また、Compound A および A22 作用 3 時間後での PAO1 株の形態変化を観察した結果、1 μg/mL（1/4MIC）、4 μg/mL（1MIC）、および 16 μg/mL（4MIC）のいずれの濃度下においても球形化が観察された（Fig. 4A）。しかしながら、そのような形態変化は、Compound A 耐性株に対しては認められなかった（Fig. 4B）。今回明らかにした Compound A の主薬理特性は、A22 のそれと非常に類似していた。

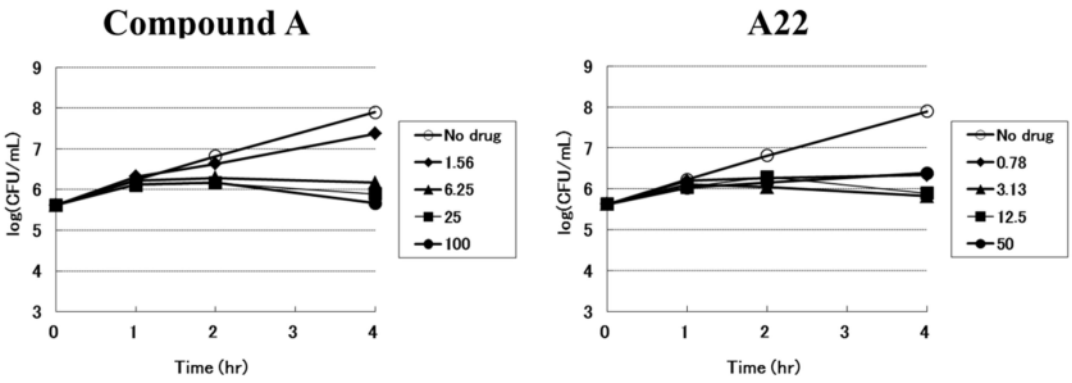
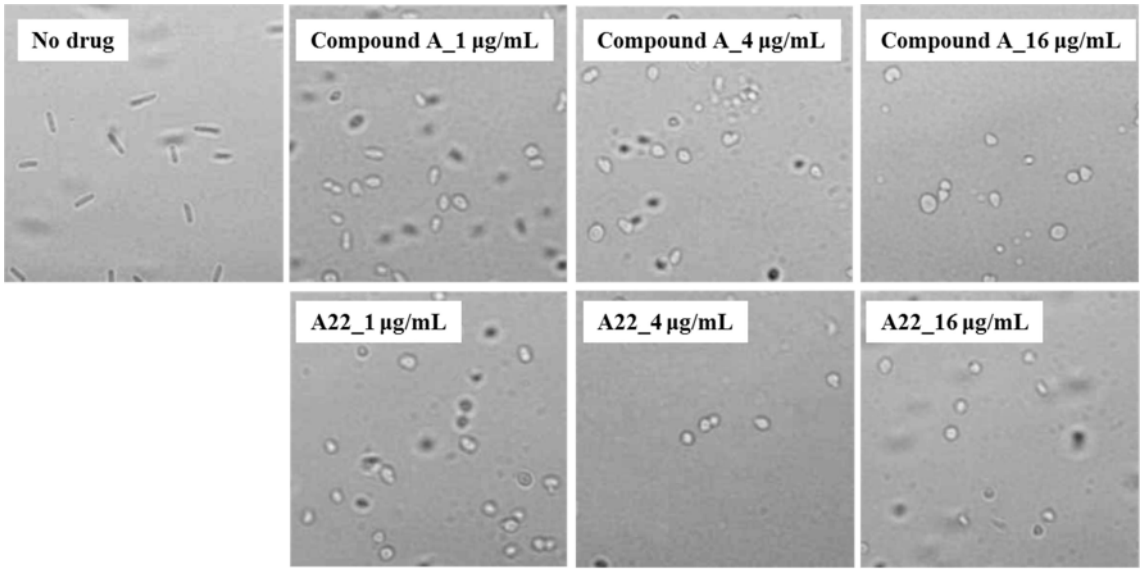


Fig. 3. Time killing curves of Compound A and A22 against *P. aeruginosa* N150 strain
The MICs of Compound A and A22 were 4 and 2 μg/mL, respectively, against N150. Compounds (μg/mL) or 2% of DMSO (no drug) were added at time 0. CFU, colony-forming unit.

A



B

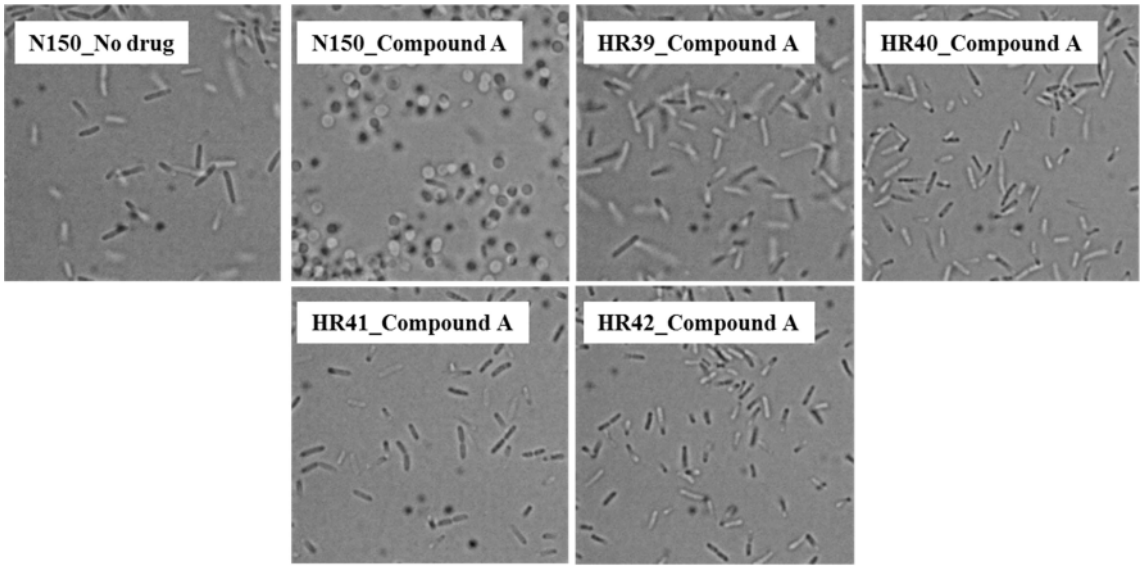


Fig. 4. Effects of Compound A and A22 on the morphology of *P. aeruginosa* PAO1 strain A) PAO1 was exposed to 2% of DMSO (no drug), 1, 4, and 16 μg/mL of Compound A or A22 for 3 hr. B) N150 and the Compound A-resistants were exposed to 2% of DMSO (no drug) or 16 μg/mL of Compound A. These treated bacteria were observed by differential interference microscope. The MICs of Compound A and A22 against PAO1 were 4 μg/mL and the MIC of Compound A against N150 was 4 μg/mL.

考察

本章において、多剤耐性緑膿菌に有効な新規作用機作の化合物獲得を目指し、RND 型異物排出ポンプ欠損緑膿菌である PAM1626 株を用いた抗菌活性スクリーニングを実施し、その結果、500 種以上もの抗緑膿菌化合物を獲得した。これら化合物は、新規の作用機作で抗緑膿菌活性を示す可能性のある抗緑膿菌化合物セットとして、有望なものであると考えられた。

さらに、その中で 1,2,3,4-tetrahydro-1,3,5-triazine derivative である Compound A に注目し、当該化合物の特性把握および標的推定を目指した研究を進めた。その結果、Compound A は、2 つの望ましい主薬理プロファイルを有していることが明らかとなった。第一の特性は、主要 4 種の異物排出ポンプ（MexA/MexB/OprM、MexC/MexD/OprJ、MexE/MexF/OprN、および MexX/MexY/OprM）の影響を受けないことである（Table 1）。緑膿菌の異物排出ポンプは、既存の抗菌剤を含めた様々な抗菌化合物を排出し、緑膿菌の多剤耐性化に寄与している(47)。これらの影響を受ける化合物は、新規作用機作のものでさえ、十分な抗緑膿菌活性を示すことができない。

第二の望ましい特性は、敗血症性ショック作用の抑制が期待できる球形化作用である。リポ多糖体 (LPS) は、グラム陰性菌の外膜に多数存在し、抗菌剤の作用により放出される。その LPS は、血球系の細胞などからインターロイキン-1、-6、および-8、ならびに tumor necrosis factor (TNFα)のような炎症性サイトカインを放出させ、敗血症性ショックを引き起こすことがある。これまでに β-ラクタム剤のうち、球形化作用を示すイミペネムは、示さないセフタジジムと比べ、LPS の遊離が少ないことが *in vitro* の実験では報告されている(32, 86)。未だこの例のみで、“球形化作用＝LPS 遊離減少”が一般化されている訳ではない。今後、Compound A においても、イミペネム同様の LPS 遊離減少作用が確認されれば、Compound A は敗血症性ショックの発生率抑制が期待できる薬剤となり得る。

また、Compound A は静菌的な作用を示した（Fig. 3）。マクロライド系抗菌剤は、静菌的な作用を示すが、臨床現場において広く使用されている薬剤の一つである。静菌的な抗菌剤は、ホストの免疫系などとの相乗的な効果により、治癒へと繋げている。当該化合物の有用性については、今後の Compound A での *in vivo* 薬効評価において正しく評価できると考えられる。

これまでの知見から、MreB および LolA 蛋白質は Compound A の標的である可能性が考えられた(34, 62)。本研究において、MreB 阻害化合物 A22 耐性株同様、すべての Compound A 耐性株において、*mreB* 遺伝子に変異を確認した（Table 2）。また、Compound A は、A22 同様に、緑膿菌に対して静菌作用および球形化作用を示した（Fig. 3 および 4）。これら結果は、Compound A の標的が MreB 蛋白質であることを示唆している。本研究で認められた Compound A の球形化作用は、*mreB* 遺伝子上に変異を有する緑膿菌株に対して認められなかったことから（Fig. 4）、MreB 蛋白質阻害に基づくものである可能性が高い。こ

の作用は、MreB 蛋白質が桿状形態維持に重要な細胞骨格蛋白質であり、その細胞骨格の破壊の結果生じたと考えられる。

A22 は、*Thermotoga maritima* MreB 蛋白質の ATP 結合ドメインである E131 および T158 残基と直接相互作用すると言われている(5)。今回同定した緑膿菌 *mreB* 遺伝子上の変異箇所のうち、E141 および T168 残基は、*Thermotoga maritima* の E131 および T158 残基にそれぞれ相当する。また、同じく同定した P113 残基は、*Caulobacter crescentu* の A22 耐性に寄与すると報告された変異箇所（P112）と一致する(26)。それ故に、本研究において見出された 3 つの変異は、Compound A の ATP 結合ドメインとの親和性を低下させ、緑膿菌を耐性化させた可能性が高い。同様に、新しい変異として見出された C111R、P113R/L、および G293S もまたその結合能を低下させ、Compound A に対する感受性を低下させる変異である可能性が考えられる。

Compound A は、大腸菌の LolA 阻害化合物である MAC13243（Fig. 2）の薬理活性を示すコア構造である可能性も示されている(62)。LolA 蛋白質は、グラム陰性菌の内膜から外膜にリポ蛋白質を輸送する媒体であり(52, 58)、MAC13243 は、このリポ蛋白質に対する結合を阻害することが示されている(62)。Compound A および MAC13243 の構造類似性を考慮すると、Compound A は、MreB 蛋白質に加え、LolA 蛋白質の機能も阻害する可能性が高い。それを確認する目的で、LolA 蛋白質の機能阻害試験系の構築を試みたが、残念ながら複数の活性因子を調製することができず、構築することができなかった。そのため、Compound A が緑膿菌 LolA 蛋白質を阻害するかについては、現時点で明らかになっていない。また、耐性株の遺伝子解析結果においても、*lolA* 遺伝子における変異を見出していない（Table 2）。DNA ジャイレースおよびトポイソメレース IV を阻害するキノロン耐性株を用いた解析などから、より強く阻害する標的をコードする遺伝子において高頻度で変異が認められる(59)。これらの知見も併せると、Compound A は、LolA 蛋白質よりも強く MreB 蛋白質を阻害する化合物であると考えられる。

緑膿菌を含めたグラム陰性菌における主な薬剤耐性機構は、標的変異、異物排出ポンプの高発現、および不活化酵素の発現である。今回の結果は、Compound A に対する主な耐性化機構が標的変異であることを示している。一般に、複数の標的を同時に阻害する化合物において、耐性菌出現頻度は低い。事実、キノロンおよびカルバペネム系（標的は、複数のペニシリン結合蛋白質）の耐性菌出現頻度は、リファンピシン（標的は RpoB 蛋白質）のような一標的を阻害する化合物よりも遥かに低い(38, 57, 59)。すなわち、MreB および LolA 蛋白質の結晶構造(67, 80)も活用しながら、Compound A の誘導体展開を進め、両蛋白質を強く阻害し得る抗緑膿菌化合物を生み出すことができれば、単剤で耐性菌出現頻度の低い薬剤を創出することは可能と考えられる。

以上より、Compound A は、魅力的な主薬理プロファイルを有し、その A22 のイソチオウレア基側の修飾により、低い耐性菌出現頻度を実現する二標的阻害化合物となることが期待できる化合物である。それを実現することで、今後の多剤耐性緑膿菌感染症に対する

有効な治療薬になり得ると考える。しかしながら、Compound A は反応性の高い構造を有しており、創薬の視点から難易度の高い骨格であると考えている。一方、Compound A は、抗緑膿菌化合物セットから見出された化合物である。すなわち、当該セットは、Compound A と同等以上の有望な化合物を含むセットであり、このセット内化合物を評価することで、新たな抗多剤耐性緑膿菌剤の創出に繋がると考える。しかしながら、標的同定には現状の技術ではコスト・時間が非常にかかるため、更なるブレークスルーが求められる。

小括

１．緑膿菌異物排出ポンプ欠損 PAM1626 株に抗菌活性を示す 500 種以上の化合物からなる抗緑膿菌化合物セットを構築した。

２．Compound A は、主要異物排出ポンプの影響を受け難い抗緑膿菌化合物であった。

３．本研究において分離したすべての Compound A 耐性株は、*mreB* 遺伝子上にアミノ酸変異をもたらす変異を有していた。

４．Compound A は、緑膿菌に対する球形化作用ならびに静菌的作用を示した。

５．Compound A の標的は、MreB 蛋白質であると考えられた。

第二章　新規抗菌化合物の標的推定ツールの構築およびそれを用いた解析

第一章では、抗緑膿菌化合物セットを構築し、更にそれに含まれた Compound A の標的を同定した。しかしながら、当該セット内の殆どの化合物について、参考となる情報がないことから、それらの標的を推察することは非常に難しい。一般に、標的を推察する方法として、過剰発現株を用いた解析、耐性株の標的変異箇所の同定、および化合物作用時の RNA レベル変動解析による推定方法などがある(22, 62, 69, 72)。そのうちの耐性株の標的変異箇所同定法については、いずれの既存抗菌剤の場合でも標的変異耐性菌の報告が何らかの菌種においてなされていることから、非常に有用であると考えられる(38, 57, 59)。しかしながら、緑膿菌などのグラム陰性菌においては、異物排出ポンプ等の他の耐性機構の寄与度が高く、標的変異株の高確率な獲得は困難である。また、カルバペネムのような複数の標的を阻害する化合物の場合、その標的変異株獲得もまたグラム陰性菌においては困難であった。それゆえに、この二つの問題点を解決することで、グラム陰性菌においても標的に変異を有する耐性株を高率で獲得可能になると考えられる。

大腸菌は、緑膿菌と同じグラム陰性菌に分類され、抗緑膿菌活性を示す低分子化合物のほとんどすべてにより高い感受性を示す。加えて、大腸菌の異物排出ポンプは、緑膿菌よりも少なく、主に AcrA/AcrB/TolC のみと考えられている(7, 8, 74)。また、細菌で最も重要な遺伝子損傷修復機構は、MMR と呼ばれる機構である。当該機構では、修復箇所を認識する MutS 蛋白質、更に MutL 蛋白質とエンドヌクレアーゼである MutH 蛋白質が複合体を形成し、ゲノムの損傷を修復する(33)。この MMR 機構の損傷により、変異発生率が高まることが知られており、実際の臨床現場のある程度の多剤耐性菌でこの機構が損傷している(9, 14, 17, 46)。

本章においては、ポンプ欠損および MMR 欠損大腸菌を作製し、標的変異株の獲得における有用性を評価すると共に、当該株を用いて、カルバペネム系薬剤に対する感受性と標的変異の関係についても解析した。

実験材料および実験方法

菌株

大腸菌 MG1655 株由来ポンプ欠損株（Δ *tolC* 株）を用いた(49)。また、プラスミド調製のため、大腸菌 DH5α 株（東洋紡績株式会社）を用いた。

薬剤

Ciprofloxacin［CPFX；第一三共合成品（lot BF910201）］を 0.1N NaOH に溶解して用いた。Levofloxacin［LVFX；自社合成品（lot AA-0740）］、doripenem［DRPM；株式会社ケムテックラボ抽出品（lot L-0256-047）］、meropenem［MEPM；株式会社ケムテックラボ抽出品（lot L-0261-125）］、biapenem［BIPM；株式会社ケムテックラボ合成品（lot L-0132-197-C）］、imipenem［IPM；株式会社ケムテックラボ抽出品（lot L-0129-166）］、panipenem［PAPM；三共株式会社合成品（lot 6163）］、penicillin V［Sigma-Aldrich Corp.（lot 016K9482）］、piperacillin［PIPC；Sigma-Aldrich Corp.（lot 60K0661）］、ampicillin［ABPC；Sigma-Aldrich Corp.（lot 069K0421）］、cefuroxime［CXM；和光純薬株式会社（lot ALQ4382）］、ceftazidime［CAZ；Sigma-Aldrich Corp.（lot 124K1247）］、aztreonam［AZT；Sigma-Aldrich Corp.（lot 124K1448）］、あるいは kanamycin（Km；ナカライテスク株式会社）を滅菌超純水に溶解して用いた。

培地

Luria-Bertani Broth（LB；Becton, Dickinson and Company）、Luria-Bertani Agar（LBA；Becton, Dickinson and Company）、MHB、CAMHB、あるいは MHA を用いて大腸菌を培養した。なお、必要に応じて ABPC を 100 μg/mL、あるいは Km を 5、25、あるいは 50 μg/mL（いずれも終濃度）となるように添加した。

プラスミド

pKD13（Km 耐性遺伝子）および pKD46（ABPC 耐性遺伝子; L-アラビノース誘導性 Red リコンビナーゼ遺伝子）は Yale University より購入したものを用いた(15)。

mutS 欠損大腸菌（Δ *mutS*Δ *tolC* 株）の作製

Fig. 5A に、欠損法の概略を示した。PCR により pKD13 由来の Km 耐性遺伝子（*kan*）およびリコンビナーゼ認識配列（FRT）の両端に大腸菌のゲノム配列（それぞれ約 50 bp）を有する断片を増幅させる。その断片を Red リコンビナーゼ（pKD46 由来）発現大腸菌に形質導入することで、当該リコンビナーゼによる高頻度相同組換えが起こる。

大腸菌 *mutS* 欠損用 DNA 断片の調製:　Ec mutS KO Fcat/kan プライマー［大腸菌 *mutS* 遺伝子の開始コドンから上流配列 50 bp（H1）と pKD13 特異的な配列 20 bp（下線）を繋

げた配列; 5'-AAAAACCATCACACCCCATTTAATATCAGGGAACCGGACATAACCCCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'）および Ec mutS KO Rkan プライマー［同遺伝子の終始コドンから下流 50 bp の相補配列（H2）と pKD13 特異的な相補配列 20 bp を繋げた配列（下線）; 5'-AGTTGTCGTTAATATTCCCGATAGCAAAAGACTATCGGGAATTGTTATTAATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'）を用い、pKD13（約 7 ng/reaction）を鋳型として PCR［AccuPrimeTM Pfx DNA Polymerase（Invitrogen Corporation）を用い、94°C で 2 分間反応後、94°C 30 秒間、50°C 30 秒間、72°C 2 分間の一連の反応を 30 サイクル、最後に 72°C で 2 分間反応］を行ない、DNA 断片（約 1.4 kbp）を増幅した。得られた DNA 断片を精製後、*Dpn*I 切断処理を 37°C で 1 時間行ない、再度精製したものを大腸菌 *mutS* 欠損用 DNA 断片とした。

pKD46 保有Δ*tolC* 株の作製：　Δ*tolC* 株を LB に接種し、37°C で OD_{600} が約 0.5 となるまで振盪培養した。5 分間氷冷した培養液を集菌後、10% Glycerol 水溶液で 4 回洗浄し、最後に同水溶液に再懸濁した菌体（100 倍濃縮）をコンピテントセルとした。コンピテントセル（50 µL）と pKD46（60 ng）を混和し、25 µF、2.5 kV、200 Ω の条件で pulse controller（Bio-Rad Laboratories, Inc.）によりエレクトロポレーションを行った。LB 1 ml を加えて 37°C で 1 時間培養後、その菌液の一部を ABPC 含有 LBA プレートに播種し、30°C で約 20 時間培養後形成されたコロニーを pKD46 保有Δ*tolC* 株として取得した。

mutS 欠損Δ*tolC* 株の獲得：　pKD46 保有Δ*tolC* 株を 0.08%アラビノース（和光純薬株式会社）および ABPC 含有 LB に接種し、37°C で OD_{600} が約 0.6 となった培養液より、先述同様にコンピテントセルを調製した。コンピテントセル（50 µL）と *mutS* 欠損用 DNA 断片（精製液 4 µL）を混和し、先述同様にエレクトロポレーションおよび培養を行ない、その菌液の一部を 5 µg/mL Km 含有 LBA プレートに播種し、30°C で約 20 時間培養した。*mutS* 欠損の検出には、形成されたコロニーを用い、*mutS* 遺伝子の外側に設計した Ec mutS F1 プライマー（p1；5'-CCCGGAACCAGCATCAAGAACTC-3'）および Ec mutS R1 プライマー（p2；5'-CGTGTAGATGGCATGGTTTTACC-3'）による PCR［PrimeSTRA MAX Premix（タカラバイオ株式会社）を用い、94°C で 2 分間反応後、94°C 20 秒間、65°C 20 秒間、72°C 20 秒間の一連の反応を 30 サイクル、最後に 72°C で 20 秒間の反応］で行った。

寒天培地による抗菌活性試験

大腸菌を MHA 上にてそれぞれ 35°C で一晩培養後、OD_{600} が 0.01 となるように生理食塩水（大塚製薬工業株式会社）にて調製した接種菌液を、2 倍段階希釈した各薬剤を含む MHA プレートに 4 µL ずつ接種した（約 10^4 c.f.u./spot）。35°C で 18 時間培養後、菌の発育が肉眼的に認められない薬剤最小濃度を MIC とした。

液体培地による抗菌活性の測定

MIC の測定は、第一章に準じた。

耐性菌出現頻度の測定

37°C で一晩、LB 培地にて培養した Δ *tolC* 株および Δ *mutS* Δ *tolC* 株を 10 倍濃縮した菌液を調製した。その原液、ならびに生理食塩水にて 10 あるいは 100 倍希釈したものをそれぞれ、2 倍段階希釈した薬剤を含む MHA プレートに 40 µL ずつ播種し、35°C で 48 時間培養後のプレート上のコロニー数をカウントした（耐性菌数）。また、生理食塩水にて 10 倍段階希釈（10^{-10}-10^{-5} 倍）した菌液を、MHA プレートに播種し、24 時間培養後のコロニー数をカウントし、各プレートに播種した生菌数を算出した。それらの値を用いて、耐性菌出現頻度（耐性菌数／播種した生菌数）を算出した。

塩基配列の解析

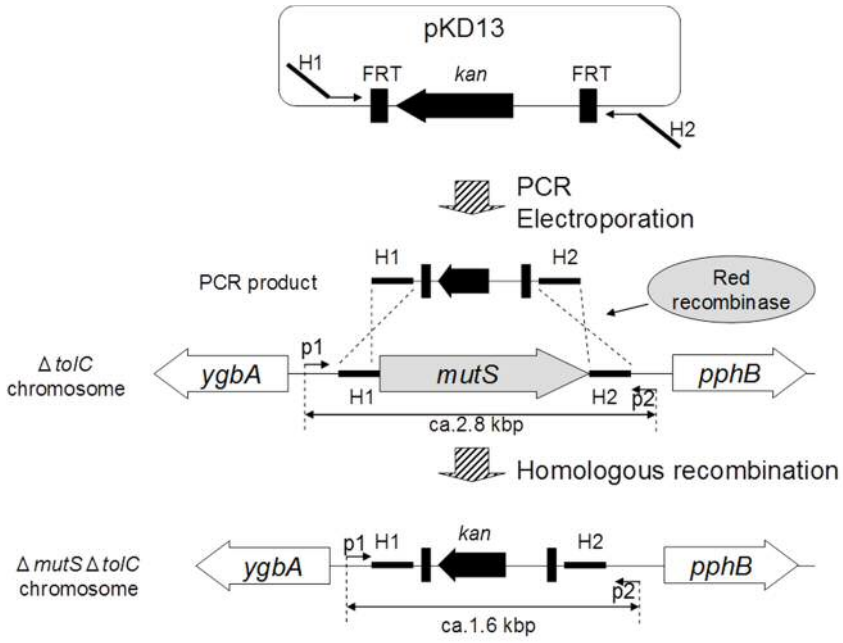
CPFX 耐性菌コロニーあるいはそのゲノムを用い、ECGA1 プライマー（5'-ATGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTACAC-3'）および ECGA4 プライマー（5'-AAGAACCGTTCACCAGCAGGTTAGG-3'）を用いた PCR［PrimeSTRA MAX Premix を用い、98°C で 10 秒間反応後、98°C 10 秒間、60°C 5 秒間、72°C 10 秒間の一連の反応を 30 サイクル、最後に 72°C で 20 秒間の反応］で *gyrA* 遺伝子の quinolone resistance determining region（QRDR）領域を含む DNA 断片 514bp を増幅した。

IPM および MEPM 耐性菌コロニーあるいはそのゲノムを用い、Ec mrdA F1 プライマー（5'-GCTGGTCGCAGAGAGTCTGT-3'）および Ec mrdA R1 プライマー（5'-GATGACCAGACCCATCGCGATT-3'）、ならびに Ec ftsI F1 プライマー（5'-GGTGGAAAGGATCGCCACGGAA-3'）および Ec ftsI R1 プライマー（5'-AGGTGTGGCTGCCATTATTGCAGAG-3'）による PCR［PrimeSTRA MAX Premix を用い、98°C で 5 秒間反応後、98°C で 10 秒間、55°C で 5 秒間、72°C で 10 秒間の一連の反応を 30 サイクル、最後に 72°C で 10 秒間の反応］で *mrdA*（*pbp2*）および *ftsI*（*pbp3*）遺伝子を含む DNA 断片（それぞれ 2,178 bp および 2,045bp）を増幅した。これら DNA 断片の塩基配列の解析は、第一章に準じた。

実験結果

大腸菌異物排出ポンプ構成因子である TolC 蛋白質および MMR 遺伝子損傷修復機構の重要因子である MutS 蛋白質を欠損させた大腸菌株（Δ*mutS*Δ*tolC* 株）の作製を目的に、既作製の Δ*tolC* 株の *mutS* 遺伝子を、one-step deletion 法により欠損させた（Fig. 5A）(15)。得られたクローンでは、*mutS* 遺伝子由来の増幅産物（約 2.8 kbp）は認められず、約 1.6 kbp の Km 耐性遺伝子由来の増幅産物が認められ、Δ*mutS*Δ*tolC* 株であると判断した（Fig. 5B）。

A



B

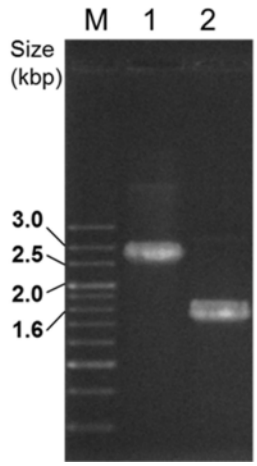


Fig. 5. Obtaining a *mutS* deficient *ΔtolC* strain (Δ*mutS*Δ*tolC*).

A) Schematic representation of one-step deletion of *E. coli* gene by λ red recombinase. λ red recombinase was produced from pKD46 in the presence of arabinose. The *mutS* coding region was replaced by a kanamycin resistance gene through homologous recombination. The p1(Ec mutS F1) and p2(Ec mutS R1) primers were used for confirming the deletion of *mutS*. The sequences were upstream (H1) and downstream (H2) of the *mutS* gene, respectively. B) Analysis of PCR using genomic DNA of *E.coli* Δ*tolC* (lane 1) and Δ*mutS*Δ*tolC* (lane 2) strains. FRT, FLP recombinase recognition target; *kan*, kanamycin resistance gene. M: size marker.

続いて、標的変異株を高確率で獲得できるかどうかについて確認する目的で、CPFX を用いて、Δ*mutS*Δ*tolC* 株の耐性菌出現頻度および標的変異頻度を測定した。その結果、CPFX では 4、8、および 16MIC において、Δ*mutS*Δ*tolC* 株が Δ*tolC* 株より高い耐性菌出現頻度を示した（Table 3)。続いて、無作為に選抜した各耐性株の標的酵素遺伝子の配列を解析し、標的変異のある耐性株の割合を算出した。CPFX 耐性株については、DNA ジャイレースの A サブユニット（GyrA）の QRDR 領域（キノロン耐性株で変異の認められる領域）をコードする遺伝子断片の塩基配列を解析した(30)。その結果、Δ*tolC* 株由来株では標的変異は低い頻度であったが（2/8 株)、Δ*mutS*Δ*tolC* 株由来株では、非常に高い標的変異株頻度であった（8/9 株)。すなわち、Δ*mutS*Δ*tolC* 株は、想定通りの高頻度で標的変異株を獲得できる株であることを確認することができた。

Table 3. Frequencies of selection and mutation analysis of CPFX-resistant mutants in *E. coli* Δ*tolC* and Δ*mutS*Δ*tolC* strains

Strain	MIC (μg/mL)	Clone No.	Frequency of selection of resistant mutants at:				Target mutation / total mutants	No. of strains with the following amino acid mutation:					
			2×MIC	4×MIC	8×MIC	16×MIC		GyrA QRDR					
								G81D	S83L	D87G	D87N	A119E	None
Δ*tolC*	0.004	#1	2.0×10^{-7}	1.4×10^{-8}	$< 2.3\times10^{-9}$	$< 2.3\times10^{-9}$	1/3			1			2
		#2	2.0×10^{-6}	1.4×10^{-7}	3.4×10^{-8}	$< 3.4\times10^{-9}$	1/2					1	1
		#3	6.7×10^{-6}	1.2×10^{-8}	$< 3.0\times10^{-9}$	$< 3.0\times10^{-9}$	0/3						3
Δ*mutS*Δ*tolC*	0.004	#1	4.8×10^{-6}	2.8×10^{-6}	3.4×10^{-7}	1.8×10^{-7}	3/3		2		1		0
		#2	NC	3.6×10^{-6}	3.6×10^{-7}	3.5×10^{-7}	3/3		2	1			0
		#3	NC	4.1×10^{-6}	4.9×10^{-7}	1.1×10^{-7}	2/3		2				1

NC, not countable

カルバペネム系抗菌剤の標的は、複数のペニシリン結合蛋白質である。これまでに、臨床のみならず実験室レベルの検討においても、当該標的コード遺伝子に変異を有する耐性株の報告はなされていない。そこで、大腸菌Δ*mutS*Δ*tolC*株が、そのような薬剤の標的変異株でさえ獲得できるツールになり得るかどうかを評価する目的で、カルバペネム系抗菌剤であるIPMおよびMEPMを用いた耐性菌出現頻度解析および標的変異株獲得頻度を評価した。その結果、MEPMでは2MIC、およびIPMでは2および4MICにおいて、Δ*mutS*Δ*tolC*株がΔ*tolC*株より高い耐性菌出現頻度を示した（Table 4）。

続いて、無作為に選抜した各種耐性株の標的酵素遺伝子の配列を解析した。IPMおよびMEPM耐性菌においては、両薬剤が特に強く阻害するPBP2およびPBP3（MEPM耐性菌のみ）をコードする遺伝子の全塩基配列を解析した。その結果、MEPMの場合では、Δ*mutS*Δ*tolC*株由来のほぼすべての耐性株でのみ、PBP2蛋白質の547番目の残基にアミノ酸変異をもたらす変異が確認された（28/30株 ; Table 4）。また、IPMの場合では、Δ*mutS*Δ*tolC*株由来の耐性株からのみPBP2蛋白質のアミノ酸変異株が8株中1株確認された（Table 4）。

Table 4. Frequencies of selection and mutation analysis of IPM- and MEPM-resistant mutants in *E.coli* Δ*tolC* and Δ*mutS*Δ*tolC* strains

Drug	Strain	MIC (μg/mL)	Clone No.	Frequency of selection of resistant mutants at:				Target mutation / total mutants	No. of strains with the following amino acid mutation:					
				2×MIC	4×MIC	8×MIC	16×MIC		PBP2					PBP3
									T547A	T547I	M574I	G601D	None	None
MEPM	Δ*tolC*	0.03	#1	$< 9.1\times10^{-10}$	$< 9.1\times10^{-10}$	$< 9.1\times10^{-10}$	NT	0/0						
			#2	$< 1.3\times10^{-9}$	$< 1.3\times10^{-9}$	$< 1.3\times10^{-9}$	NT	0/0						
			#3	$< 1.3\times10^{-9}$	$< 1.3\times10^{-9}$	$< 1.3\times10^{-9}$	NT	0/0						
	Δ*mutS*Δ*tolC*	0.03	#1	4.5×10^{-8}	$< 9.1\times10^{-9}$	$< 9.1\times10^{-9}$	NT	7/7	4	3				7
			#2	1.9×10^{-7}	$< 1.4\times10^{-8}$	$< 1.4\times10^{-8}$	NT	17/18	16			1	1	18
			#3	6.4×10^{-8}	$< 1.3\times10^{-8}$	$< 1.3\times10^{-8}$	NT	5/5	5					5
IPM	Δ*tolC*	0.25	#1	5.3×10^{-6}	8.5×10^{-9}	$< 2.8\times10^{-9}$	$< 2.8\times10^{-9}$	0/3					3	NT
			#2	1.0×10^{-5}	$< 3.4\times10^{-9}$	$< 3.4\times10^{-9}$	$< 3.4\times10^{-9}$	0/3					3	NT
			#3	6.9×10^{-6}	$< 3.0\times10^{-9}$	$< 3.0\times10^{-9}$	$< 3.0\times10^{-9}$	0/3					3	NT
	Δ*mutS*Δ*tolC*	0.25	#1	1.2×10^{-4}	7.7×10^{-8}	$< 3.1\times10^{-9}$	$< 3.1\times10^{-9}$	0/3					3	NT
			#2	NC	2.3×10^{-7}	$< 3.1\times10^{-9}$	$< 3.1\times10^{-9}$	0/2					2	NT
			#3	NC	7.9×10^{-8}	$< 3.6\times10^{-9}$	$< 3.6\times10^{-9}$	1/3			1		2	NT

NC, not countable; NT, not tested; MEPM, meropenem; IPM, imipenem

標的変異に基づく抗菌剤耐性度は、化学構造に依存することが多い。そこで、本章にて獲得した PBP2 変異と β-ラクタム剤に対する感受性変化を明らかにする目的で、β-ラクタム剤である、カルバペネム系 5 薬剤（BIPM、DRPM、IPM、MEPM、および PAPM）、ペニシリン系 3 薬剤（ABPC、Penicillin V、および PIPC）、セフェム系 2 薬剤（CAZ および CXM）、ならびにモノバクタム系 1 薬剤（AZT）を用い、各 PBP2 変異株に対する MIC を測定した（Table 5）。その結果、カルバペネム系薬剤の BIPM、DRPM、および MEPM の MIC は、親株（Δ*mutS*Δ*tolC* 株）と比べて PBP2 の T547I 変異株に対して 4 倍以上高かったが、IPM および PAPM のそれに対する MIC は同等であった。同じ変異箇所である T547A 変異株においても、感受性低下の度合いは小さいが、T547I 変異株と同様の傾向が認められた。BIPM、DRPM、および MEPM は 1 位にメチル基を保持するが、IPM および PAPM はそれを保持しない。1 位のメチル基の有無が、T547I/A 変異株の感受性に影響を与えることが示唆された。

その他の変異株に対する親株と比べた MIC 変化は、2 倍程度であったため正確な解析は困難であった。しかしながら、これらの結果は、（1）T547I/A 変異株が、カルバペネム系抗菌剤以外の多くの β-ラクタム剤に対してわずかに感受性化すること、ならびに（2）G601D 変異株および M574I 変異株は、化学構造との関係は不明であるが、幾つかの薬剤に対して低感受性化すること、を示唆するものであると考えられた。

Table 5. MICs against PBP2 mutants

Drug	MIC (μg/mL) against:									
	ATCC25922	MG1655	Δ*tolC*	Δ*mutS*Δ*tolC*	MR1 (T547I)	MR2 (T547I)	MR3 (T547A)	MR7 (T547A)	MR9 (G601D)	IRE35 (M574I)
LVFX	0.015	0.03	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
IPM	0.12	0.12	0.25	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	1
PAPM	0.12	0.12	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
MEPM	0.015	0.015	0.03	0.03	0.12	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06
BIPM	0.03	0.06	0.06	0.25	1	1	0.5	0.5	0.12	0.25
DRPM	0.03	0.03	0.03	0.06	0.5	0.25	0.12	0.12	0.06	0.06
Penicillin V	>64	>64	16	16	16	16	16	16	16	16
PIPC	8	4	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
ABPC	4	8	2	2	2	2	2	2	4	2
CXM	4	8	0.5	1	0.5	0.5	1	0.5	2	2
CAZ	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
AZT	0.25	0.25	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.25

LVFX, levofloxacin; DRPM, doripenem; MEPM, meropenem; BIPM, biapenem; IPM, imipenem; PAPM, panipenem; PIPC, piperacillin; ABPC, ampicillin; CXM, cefloxime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam. ATCC25922 is the *E. coli* control strain and MG1655 is the parental strain.

考察

抗菌活性ベースで獲得した抗菌剤の標的を推察することは、非常に難易度が高い。標的を推察する方法として、過剰発現株を用いた解析、耐性株の標的変異箇所同定、および化合物作用時の RNA レベル変動解析による推定方法などがある(22, 62, 69, 72)。近年の技術革新により、獲得した抗菌化合物耐性株の変異箇所同定は、次世代シークエンス解析などにより容易になりつつある。しかしながら、解析対象となる耐性株が標的変異を有していなければ、標的を正しく示唆する知見を得ることはできない。本章において、この問題を改善し得る排出ポンプ欠損および MMR 修復系欠損大腸菌株（Δ*mutS*Δ*tolC* 株）を作製した。実際、当該株は、抗菌剤の標的数に依らず高い標的変異耐性株の出現頻度が高い株であった（Table 3 および 4）。

グラム陰性菌の抗菌剤に対する耐性機構は、主に異物排出ポンプ、標的変異、および分解酵素の獲得である。Δ*mutS*Δ*tolC* 株は、異物排出ポンプの欠損株である。また、分解酵素獲得は、それを保有する他の菌株が共存する必要があり、実験室規模での研究において起こる可能性は非常に低い。加えて、遺伝子変異修復系（MMR）の不活化は、ゲノムに変異を導入する確率を高める。これらの要因により、Δ*mutS*Δ*tolC* 株が、抗菌剤の標的数に依らず標的変異獲得能を高めたと考えられる。

大腸菌において、MMR は MutS、MutL、および MutH 蛋白質の複合体により開始される。MutS 蛋白質は、ミスマッチの塩基および 4bp までの塩基の挿入／欠損を認識することが知られている(33)。また、MutS 蛋白質のミスマッチ認識性は、A-G および C-T の組み合わせに対して弱いとされている(33)。しかしながら、本研究において、認識性に弱い（すなわち MMR 欠損による影響が最も小さい）A-G および C-T の組み合わせでの置換が高頻度で生じていることから［例、GyrA S83L（Table 3）: T<u>C</u>G→T<u>T</u>G ;　PBP2 M547A（Table 4）: <u>A</u>CC→<u>G</u>CC］、当該株においてはすべての組み合わせの変異が生じやすいことを示している。

カルバペネム系抗菌剤は、グラム陽性菌および陰性菌に対して幅広い殺菌作用を示す薬剤である。このカルバペネム系は、複数のペニシリン結合蛋白質を同時に抑制し、強力な抗菌作用を示している。グラム陰性菌において、このカルバペネム系に対する主な耐性化機構は、外膜透過性の変化や異物排出ポンプの発現亢進である。一方、標的変異に基づく耐性獲得は、インフルエンザ菌および淋菌においてのみ報告されている(87)。大腸菌においては、変異原性を用いた PBP3 蛋白質に変異を有する β-ラクタム剤耐性菌の獲得に関する報告がなされているが、PBP2 蛋白質の変異およびその標的変異に基づくカルバペネム系薬剤に対する耐性化に関連する報告はなされていない(29, 73)。本研究において作製したΔ*mutS*Δ*tolC* 株を用いることで、非常に高い確率で PBP2 変異のメロペネム耐性大腸菌を分離した。*In vitro* 解析結果により、カルバペネム系抗菌剤は PBP2 に対する結合能が最も強く、当該抗菌剤の第一標的は PBP2 蛋白質であると言われている(16, 36, 43, 85)。この結果

は、Δ*mutS*Δ*tolC*株が、複数の分子標的を阻害する抗菌化合物の標的変異株を、非常に効率的に獲得できる有用なツールであることを示している。

PBP2 は、外膜の主要構成因子であるペプチドグリカンの合成に関わるトランスペプチダーゼである。その活性ドメインには、ペニシリン結合蛋白質で保存された 3 つのモチーフ[SXXK、(S/Y)XN、および(K/H)(S/T)G]が存在する。本研究において分離した 4 種の PBP2 変異（T547I/A、M574I、および G601D）のうち、PBP2 の 547 番目の残基は、(K/H)(S/T)G モチーフの隣に存在する。これまでに、インフルエンザ菌および淋菌などのグラム陰性菌において報告はないが、肺炎球菌などのグラム陽性菌において、ペニシリン結合蛋白質の当該モチーフ近傍の変異が、カルバペネム耐性に寄与することが報告されている(3)。その他の M574I および G601D に関連し得る報告は未だなされてはいないが、カルバペネム系抗菌剤と PBP2 の結合を解析する上での有用な知見になり得る可能性が考えられる。

また、本研究において、1-β-メチルカルバペネム（BIPM、DRPM、および MEPM）のみ PBP2 の 547 番目変異の影響を受けやすいことを明らかにした（Table 5）。当該メチル基付与により、デヒドロペプチターゼ-1 による分解がされ難くなることが知られている(64, 78)。今回の結果は、当該メチル基は、標的変異による耐性化に対しては不利に働く可能性があることを示している。

大腸菌は、緑膿菌と同じグラム陰性菌に分類され、抗緑膿菌活性を示す低分子化合物のほとんどすべてにより高い感受性を示す。また、これまでにキノロン耐性大腸菌および緑膿菌では、同じ標的（DNA ジャイレースおよびトポイソメレース IV）に変異が認められており、大腸菌での耐性に寄与する変異情報を緑膿菌においても活用できると考えられる。それ故に、Δ*mutS*Δ*tolC*株を用いて、第一章で獲得した抗緑膿菌化合物に対する耐性株を獲得し、変異箇所を同定することで、簡便かつ効率的に標的推定を実現できる基盤ができたと考える。

小括

１．異物排出ポンプおよび遺伝子損傷修復機構を欠失させた大腸菌株（Δ*mutS*Δ*tolC* 株）を作製した。

２．当該株の耐性菌出現頻度および標的変異株率は、親株に比べて明らかに高いことを示した。

３．当該株を用いて、カルバペネム系抗菌剤に低感受性の PBP2 変異株の獲得に成功した。

４．PBP2 変異と各種 β-ラクタム剤に対する大腸菌の感受性の関係を明らかにした。

第三章　Plasmid integration 試験系の構築およびその有用性評価

第一章および第二章では、低分子化合物の細胞内への透過および残留のハードルが高い緑膿菌に対する創薬基盤についての研究を進めてきた。一方、黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性球菌においては、外膜のみの膜構造で且つ RND 型排出ポンプの存在しないことから、膜透過性による障害はグラム陰性菌ほど大きくはない。それ故に、有望な標的分子を阻害する化合物を獲得し、合成展開により標的阻害活性およびそれに伴う抗黄色ブドウ球菌活性を高めながら創薬につなげるアプローチが最善の策であると私は考えた。また、既存抗菌剤は細菌の増殖抑制効果を示し、それらの標的はいずれも増殖必須遺伝子であることから、増殖必須遺伝子が有望な標的候補となり得るとも考えた。実際、バンコマイシン感受性および耐性の MRSA（N315 および Mu50）の全ゲノム配列が 2001 年に報告され、これら情報を活用した増殖必須遺伝子の探索研究が始まった(40)。以降、アカデミアや製薬企業から、アンチセンス RNA やトランスポゾン技術を活用した網羅的解析による必須遺伝子同定が継続的に報告された(4, 13, 21, 35)。しかしながら、それら結果の重複度合いは低く、必ずしも参考になるデータではなかった。その後 2007 年に、黄色ブドウ球菌の増殖に必須であり且つ機能既知である 70 蛋白質の阻害剤研究の成果が GlaxoSmithKline 社より報告されたが、機能未知の必須遺伝子に関する研究成果は今も十分になされていない(63)。

一般的に、機能未知蛋白質の機能を推定することは非常に難しい。しかしながら、ある遺伝子の欠損により生じる表現型に対して、別の遺伝子が相補可能か否かを評価できる試験系は、機能未知の蛋白質を含む様々な蛋白質や経路の機能予測に有用である(51, 76)。従来の手法は、３つの段階（相補遺伝子発現ベクターの細菌への導入、ターゲット遺伝子の欠損、ノックアウト条件下での現象改善評価）で研究を進めなければならず、不便でかつ時間を要する手法であった。

本章では、未開拓である機能未知な増殖必須遺伝子の中からの有望な標的獲得を目指し、独自の簡便な必須性解析ツールを構築し、候補遺伝子の必須性を評価した。さらに当該系の相補能解析における有用性についても評価した。

実験材料および実験方法

菌株

黄色ブドウ球菌 RN4220 株は順天堂大学医学部細菌学教室から分与された。またプラスミド調製のため、大腸菌 DH5α 株および MC1061 株を用いた。

培地

2×YT 培地（Becton, Dickinson and Company）および LBA を用いて大腸菌を培養し、Brain Heart Infusion 培地（BHI ; Becton, Dickinson and Company）およびその寒天培地（BHIA ; Becton, Dickinson and Company)を用いて黄色ブドウ球菌を培養した。尚、必要に応じて ABPC を終濃度が 100 μg/mL となるように、あるいは tetracycline（Tc ; Sigma-Aldrich Corp.)を 5 μg/mL となるように添加した。

プラスミド

大腸菌と黄色ブドウ球菌のシャトルベクタープラスミド pYT3 は、順天堂大学細菌学教室から分与された(28)。当該プラスミドは温度感受性の黄色ブドウ球菌の複製起点を有し、30°C では菌体内で複製するが、42°C では複製しない。また、本プラスミドは ABPC 耐性遺伝子および Tc 耐性遺伝子を有する。

PI 試験用 PCR 用プライマー

PI 試験用に設計したプライマー（合成オリゴヌクレオチド）を Table 6 に示した。それらの合成は外部委託した（シグマジェノシスジャパン株式会社)。

Table 6. PCR primers used in this study.

Primer[a]	Sequence[b]
RV-M	5’-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3’
sigB F1	5’-TAGGCGAAAGAGTCGAAATCAG-3’
sigB F2	5’-GACAATCAGTATGACTAAGTA-3’
sigB R1	5’-CCAACCATACCAACTTGAACTAA-3’
hla F1	5’-TAGAAAACACGTATAGTCAGCTC-3’
hla F2	5’-TTGATTATTGTTTCCTCAAATCGTT-3’
hla R1	5’-CATTAAAATACTTTTTTGTGCATGC-3’
gyrA F1	5’-TAGGCTGAATTACCTCAATCAAG-3’
gyrA F2	5’-GGAATCGAGCAGGTAAGACTGACG-3’
gyrA R1	5’-GATTTTTTATATGATTTATCCGGTG-3’
mvaD F1	5’-TAGATTAAAAGTGGCAAAGCACG-3’
mvaD F2	5’-GAGAATTTAGAAGGTTAATGCGTTG-3’
mvaD R1	5’-CCACTAACCTTTTCACCATTCAA-3’
SA0007 F1	5’-TAGGGAGGTTATATCACTATGGAAAC-3’
SA0007 F2	5’-TAATGAATTCAGAAATTTATAATAC-3’
SA0007 R1	5’-TGATTTGTTGGATGTGTAGCTACAG-3’
SA0044 F1	5’-TAGGAACAATACAAAGAAGTACAC-3’
SA0044 F2	5’-TCCGTTTTATTATACCCTCATAGG-3’
SA0044 R1	5’-TTACAATGTATATAATACGTTTTG-3’
SA0081 F1	5’-TAGAATTATGATAAAAAAATGATTAATC-3’
SA0081 F2	5’-GGTATTTGACACATTTGTGTTTATC-3’
SA0081 R1	5’-TCATCCGCAGCTACTTTTACACATTC-3’
SA0085 F1	5’-TAGAAAGAAAATTTTTGGAGTGAATTAC-3’
SA0085 F2	5’-GTTAGGCTTTTGTGGTAATATCATC-3’
SA0085 R1	5’-TCGCTAAAAGTTAAGCGTCCGC-3’
SA0266 F1	5’-TAGATAGAAATTAATAATCTTTC-3’
SA0266 F2	5’-ACTTGCTATGGGTATCGTATACTTG-3’
SA0266 R1	5’-TGATTCCATTTTTCGCCGAAATAG-3’
SA0301 F1	5’-TAGGCAAATTTACAAAAGTATATTG-3’
SA0301 F2	5’- CGATATGGAGGATTATAAAAATGG -3’
SA0301 R1	5’-CCATCTATAATGGCTATGGTTGCTG-3’
SA0306 F1	5’-TAGAAATTTGAGAATCGTGTTCAAC-3’
SA0306 F2	5’-TTTATCAATGCTTTTTACTATCTTG-3’
SA0306 R1	5’-TTTAAATCTTGGAAATTCTCATAATC-3’
SA0331 F1	5’-TAGAAAAAGTTAACAACGCTATTAT-3’
SA0331 F2	5’- GAATTTCTATAATGAGGTGTCAAAATG -3’
SA0331 R1	5’-TCGCTTTAACAAATTTTTCTGTACC-3’
SA0410 F1	5’-TAGGCTAAAATTCCAGTTACGGTAT-3’
SA0410 F2	5’- TTGAAGTGAGGGTATATATATGG -3’
SA0410 R1	5’-GAGAGTTCGACTAATTTTTCATCTG-3’
SA0412 F1	5’-TAGACAACACAGTTAAATATCAATT-3’
SA0412 F2	5’- GTATTTATAGGAGGTGAAAGGTATG -3’
SA0412 R1	5’-GTGCCACAGCGCTTTCTATTAATGC-3’
SA0449 F1	5’-TAGTTAATCGATACACATGTCCATT-3’
SA0449 F2	5’- ATTAGGAGAGATAATTATGTTAATCG -3’
SA0449 R1	5’-TCAACTGGATGCCAACCGATAATGC-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer
[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA0463 F1	5’-TAGGCACATACCATTACGATTGTTG-3’
SA0463 F2	5’- TAAGAAAGGAAGACGTTGATGGCAC -3’
SA0463 R1	5’-AGACATCTTCAAATTGGTCATGTGC-3’
SA0559 F1	5’-TAGTTCAAGGTAAGACAAGCAACTG-3’
SA0559 F2	5’- TGTTAATAAGGGGAGAAAGTCATG -3’
SA0559 R1	5’-CGATGTCATTACCTTCTTCAACGAC-3’
SA0560 F1	5’-TAGACTAACGCATATGTAGATTTAA-3’
SA0560 F2	5’-AAACGAAAAGGAGGGGAATAATGAC-3’
SA0560 R1	5’-GAATGTCCAAAGCGACTATGTTC-3’
SA0606 F1	5’-TAGAAAGTGAATGATATGAAAGCAC-3’
SA0606 F2	5’-TTATGAGGTGGCACAAATGAAAGTG-3’
SA0606 R1	5’-AATGCCATACCAGTCGATTTGAAC-3’
SA0612 F1	5’-TAGGCCCATATTATACGTAGAGTTAG-3’
SA0612 F2	5’-GTTACATATATATTATAATAGTAGC-3’
SA0612 R1	5’-TGTTCATCACTTTCAGCAACAAAGATG-3’
SA0618 F1	5’-TAGTTTAGTAAGAAAAAAGATAAGT-3’
SA0618 F2	5’-GGTGACAATCGCTTAAATGGAGG-3’
SA0618 R1	5’-AATGTTTGATTTAAATCAGTAATTA-3’
SA0624 F1	5’-TAGGGACGTAAATGGAATAACATTA-3’
SA0624 F2	5’-TAAACAGTTCGAAAGCGAGATGAC-3’
SA0624 R1	5’-GCTTTTTCAATAATATGATTCGGCA-3’
SA0673 F1	5’-TAGTCAATCATAATTGAAAAAAGTG-3’
SA0673 F2	5’-TAGAAGTAGGAGCGTTTAAAGATG-3’
SA0673 R1	5’-TCTGTAAAACGAATCGTTGCCATTT-3’
SA0707 F1	5’-TAGATTAGATTTGAAATTCATGGAG-3’
SA0707 F2	5’-GATGGTTTAAGGAGAGATTACTATG-3’
SA0707 R1	5’-GCTCTTAACGTAACATTTTTCAATG-3’
SA0720 F1	5’-TAGGATAATAATGAAAAAGAAAAAAG-3’
SA0720 F2	5’-CGTTTTGGCGGTGAAAAAATAATG-3’
SA0720 R1	5’-CAATTGCCACTTTTCTTAAGGATGG-3’
SA0722 F1	5’-TAGAGCTTTGCATCAGAAATGAAAA-3’
SA0722 F2	5’-TAAGAAAGGAATGACTGTACGATG-3’
SA0722 R1	5’-ACATTATTGACACGTTTAATCAACG-3’
SA0757 F1	5’-TAGGAATTACAACAAGCAATAGCTA-3’
SA0757 F2	5’-TCGTGGAGGAGCGATTTTAGATG-3’
SA0757 R1	5’-GCAAATTTAGAAATATCCTTACTCA-3’
SA0775 F1	5’-TAGACAACTGATATTTTGAACATTT -3’
SA0775 F2	5’-ATCAAGTAGGAGGAAAAAGTTATG-3’
SA0775 R1	5’-CATCACCTTTTACATCGTGTTGTTT-3’
SA0832 F1	5’-TAGCAACCACATTTAATATGTCTAG-3’
SA0832 F2	5’-CGCCAATAAAATGCTATGATGTATC-3’
SA0832 R1	5’-TTAAAATTAACAATTGGTGTCG-3’
SA0862 F1	5’-TAGGCAACAAATCATGAAATAGAAT-3’
SA0862 F2	5’-CTTTGTCATTCATAATATAGTTAAG-3’
SA0862 R1	5’-TTTAAAGTCATTTCATATTGATTGTC-3’
SA0865 F1	5’-TAGCGTTATACAATTTTAACTAAAG -3’
SA0865 F2	5’-CATGAAAATGATTAACGAGGTGTTA-3’
SA0865 R1	5’-ACTCCAACAAATGCCATTTTGAT-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer

[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA0908 F1	5’-TAGAATAAATTTTTAAAATACTTTTTG-3’
SA0908 F2	5’-TGAAGTTGTATAAATATCGTTCAAC-3’
SA0908 R1	5’-AAGAAAAGAATAGAGATAGGTTGTTC-3’
SA0940 F1	5’-TAGAAACAATTACATCCAAATGAAG-3’
SA0940 F2	5’-TTAGAGGGCGCACATTTAGATTACG-3’
SA0940 R1	5’-ATTTTATCTTGGTTTTGAACTAG-3’
SA0972 F1	5’-TAGCGCGTCATTGCAGGTAAAC-3’
SA0972 F2	5’-ACTAAATGAATTGGAAGTGTGAAC-3’
SA0972 R1	5’-AAGATTACCTTATCCATACCTCGAG-3’
SA0974 F1	5’-TAGAAAAGCGTTGGCTTAATCACAG-3’
SA0974 F2	5’-TTCTTAACATATCATGTTCTGTTAC-3’
SA0974 R1	5’-ATAACTAAATCAGCTGTTGATAATG-3’
SA0998 F1	5’-TAGAAAGAGATTGTTATTGCATCG-3’
SA0998 F2	5’-CGTATATCAGTGAATGACTAGGAGG-3’
SA0998 R1	5’-TCAGCTATGACAGTTTTATTCAATGC-3’
SA0999 F1	5’-TAGTCTAAATGGATTATTGTGAGTG-3’
SA0999 F2	5’-GCAAATTAGTCATAGACGAAATGCG-3’
SA0999 R1	5’-GCGACCGCTTCATTTTCAAATTCTG-3’
SA1018 F1	5’-TAGGGATATAAAAATATTTTGATAGAC-3’
SA1018 F2	5’-TACATAGACAATATAGGAGATGGG-3’
SA1018 R1	5’-GATAATACTTCAGACTTCGTTAA-3’
SA1022 F1	5’-TAGTTTCATCATATCAGCGTTATG-3’
SA1022 F2	5’-GAAAGTTTCGAAGATATTGCTGAAG-3’
SA1022 R1	5’-TCCTTTAATACCTCTTTAGCATTATC-3’
SA1031 F1	5’-TAGCGTGTGAAAGATAATTTACAAC-3’
SA1031 F2	5’-GGTCAACAGTAAACAAGGAGGAG-3’
SA1031 R1	5’-AATGCTTCTTTCTTTTGAAAAAAGCC-3’
SA1032 F1	5’-TAGAGCCACTTGGCTTTAAAAG-3’
SA1032 F2	5’-GACTAAACTTGTAGGAGAAGAGG-3’
SA1032 R1	5’-CTTTCTTCTGACGTTGTTGTATATC-3’
SA1037 F1	5’-TAGTATCATAACAGTAACGCAAAC-3’
SA1037 F2	5’-GCACAGATATTGAATTTGATAGGAG-3’
SA1037 R1	5’-TCGGACATTAAAGGTTCACGTCC-3’
SA1040 F1	5’-TAGGAGACTTATGAATTTAACATTACAG-3’
SA1040 F2	5’-ACTTCCAATAAAAAGGAGAAGGAGG-3’
SA1040 R1	5’-TTTTCAGTGACAACTATATGATC-3’
SA1061 F1	5’-TAGATAACTGCTGAAAAGAAAAAG-3’
SA1061 F2	5’-CCGCAAGACTTTAATTCAGATGG-3’
SA1061 R1	5’-TCTTTCGATAAGTTCGTCATTTCATC-3’
SA1062 F1	5’-TAGCTAGAGGCACAATTTTTTACTG-3’
SA1062 F2	5’-AAGGAACGACAAGTAGAAACGAGG-3’
SA1062 R1	5’-TCTATAAGATTTTCCGCTTCAAAACG-3’
SA1064 F1	5’-TAGAAGACAGGTCGAATAGTG-3’
SA1064 F2	5’-GCAGTAAAATTAATCGAGAGGTGC-3’
SA1064 R1	5’-TTCAACTCATTTTTCCGCTCAAAC-3’
SA1066 F1	5’-TAGCATATAAATTTATTATGTTCTAATCG-3’
SA1066 F2	5’-CACACAAGCATTGAAAGGTTGAGTG-3’
SA1066 R1	5’-TTGATTTGTAACTGTTCTGTTAGAAGTTGG-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer

[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA1068 F1	5’-TAGACATTAGAGATTTCAAATGATTACG-3’
SA1068 F2	5’-AACTTTGAAATTTAGGAGGGAC-3’
SA1068 R1	5’-ACGCCATTATTTTCAGTTACTTTG-3’
SA1069 F1	5’-TAGATTAGCAAAATTAATGGTAAAT-3’
SA1069 F2	5’-GGCAAGAAAGCTTAGGAGGACAAC-3’
SA1069 R1	5’-AATTCGCCGATATTTTTCGAC-3’
SA1079 F1	5’-TAGGGGCAAAATGATTTAGTTAAAACG-3’
SA1079 F2	5’-CAAATTGTAACAGAAGAAAAGGACG-3’
SA1079 R1	5’-TCAACTAAATCGCCAGTTCTTCTTA-3’
SA1086 F1	5’-TAGGTTATTCAATGGTATCCAGGAC-3’
SA1086 F2	5’-GAGAAAAGAATTGACGAAAGTAAGGTG-3’
SA1086 R1	5’-GACATCTCATTTAAATTAGACATATC-3’
SA1108 F1	5’-TAGAGTAAAATTACAGAACAAGTAG-3’
SA1108 F2	5’-CTCAGGCAGAAGAGTGGGAGATTC-3’
SA1108 R1	5’-GATCATTTGCATCCATAGCTTCAC-3’
SA1110 F1	5’-TAGAAAAAGAAAAAAATTCCGATGCG-3’
SA1110 F2	5’-ATCTGAATAATAGGTTGGAGTGAAG-3’
SA1110 R1	5’-TTTTCTAAAATTTCTTTTTGTTGTGC-3’
SA1118 F1	5’-TAGAGTTTAATAAAGAAAAAGAATAAAG-3’
SA1118 F2	5’-ATATGGACGGGTAACAAATTTAGG-3’
SA1118 R1	5’-TCTTTATTTTCAAGTACGTATGAAATGTC-3’
SA1125 F1	5’-TAGAAAACGGTCGGTGAAGCGC-3’
SA1125 F2	5’-GTTTCTTCGAGTAAGTGTAAGGAGG-3’
SA1125 R1	5’-TGGTTAGGTTCAATATTTACTACGC-3’
SA1129 F1	5’-TAGAATTTATTAAGCCTCCTACTC-3’
SA1129 F2	5’-GAGCAAACCCTAGAAAAGGAGGTG-3’
SA1129 R1	5’-GATTTGGTTTTCTTCTTTTGCCTCAAG-3’
SA1167 F1	5’-TAGACAAATTATAAAGTTGTCGTTTTAG-3’
SA1167 F2	5’-GTATTAAATGCAGAATAGAGAGGAG-3’
SA1167 R1	5’-GCTATGATGTTCAGGTAATTTTAAATCTC-3’
SA1223 F1	5’-TAGGCATTAGACAAAGATATAGTAG-3’
SA1223 F2	5’-GTTGTAATGATAGAATGACTCACAC-3’
SA1223 R1	5’-GCAAATAATTCACCTGAACGGTTTG-3’
SA1236 F1	5’-TAGAGACATATACATTTACAAGTATTCGG-3’
SA1236 F2	5’-CTACGTATAATAACATTATGAGG-3’
SA1236 R1	5’-GATGCTGGTGAGGCACCTTCAATTAC-3’
SA1258 F1	5’-TAGACAAAACAGATTATAGTAACAG-3’
SA1258 F2	5’-AACTAGATGAGAAAAATACAATTCC-3’
SA1258 R1	5’-CCTATGGCTGGCTGACTTGTCTTTA-3’
SA1277 F1	5’-TAGTTTCAATTACTTGCAGTTTGTC-3’
SA1277 F2	5’-AAACACAAGCTAAGAATAAAATACC-3’
SA1277 R1	5’-GTTGTTGCGTTAAAACGTCCAACAAC-3’
SA1296 F1	5’-TAGGAAGATATCTATAAATTAATAG-3’
SA1296 F2	5’-ATGCTGTAAATGTATCATTTCCAGG-3’
SA1296 R1	5’-TCACTTTCGTCTGGATATTTGTG-3’
SA1325 F1	5’-TAGGATAATCATGGTATATTAGAG-3’
SA1325 F2	5’-AATAATTAATATTGAGCAACAACG-3’
SA1325 R1	5’-TACGTTGCCGCTTCTTTTTTAGTCG-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer

[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA1326 F1	5’-TAGACGCAATACGAGGTAGATATTATG-3’
SA1326 F2	5’-CCTGTTGCATTTTGTTATCACCC-3’
SA1326 R1	5’-ACTAGGTATTCACTTGCAATATTAA-3’
SA1330 F1	5’-TAGGATTTAAATGAAAAAACAATTG-3’
SA1330 F2	5’-TACACTTTAGCTAACAAGCATAGTG-3’
SA1330 R1	5’-TCTACTGGTTTACGATACTGTTTC-3’
SA1331 F1	5’-TAGCAAAAAAATATATTAAAAAGTGG-3’
SA1331 F2	5’-GTTAGCTAAAGTGTATCGAAAGGAG-3’
SA1331 R1	5’-TGATATTTAAGAAGTGCCTTACC-3’
SA1335 F1	5’-TAGGAAGTTACATTTTTTGGAACGAG-3’
SA1335 F2	5’-CGAATTTTTAACAGATTTTGATTCAAG-3’
SA1335 R1	5’-TCGCCATGCATATGAGTAATAAATAT-3’
SA1356 F1	5’-TAGGTCAAAGTAACTGATTATTCAA-3’
SA1356 F2	5’-AAAATAGCATTATGAATGATGAAGG-3’
SA1356 R1	5’-TCTTCTTTACTCTCGATTTTTAAATC-3’
SA1363 F1	5’-TAGACTGAAACTTGGAATTTTATTAAT-3’
SA1363 F2	5’-AGTTAAATTGATTAATTAGCGAATC-3’
SA1363 R1	5’-CTTTAACCTTATCAATATCAATTTC-3’
SA1364 F1	5’-TAGAGTGCTAGTTTGTACATCGC-3’
SA1364 F2	5’-TTATCGTTTAATTAGGGAGGATGC-3’
SA1364 R1	5’-ATATTGCGAGACCCATTAATGTGAC-3’
SA1375 F1	5’-TAGAGGATTTCAAGCTTAACTTTAG-3’
SA1375 F2	5’-ATGAATGATAAACTAACATCAGTAC-3’
SA1375 R1	5’-ACTATATCATCGACTGCTCCGATATG-3’
SA1380 F1	5’-TAGACTAAAAATGAGATTAGAAAATAC-3’
SA1380 F2	5’-AATTCATCATGACAACATAATGACATG-3’
SA1380 R1	5’-TCCATTAAGGCTTGTTCAATAATAG-3’
SA1388 F1	5’-TAGAAAATAGCTGATTTAATGACATTG-3’
SA1388 F2	5’-TCAATACTGAACAACATCATCAACG-3’
SA1388 R1	5’-GAGGATGATGACTAATAATAGTATT-3’
SA1389 F1	5’-TAGATTTCGTTAAATAACCGATTAAC-3’
SA1389 F2	5’-GGTACATTGAATAATGTTCAACC-3’
SA1389 R1	5’-TCTACTAAATGATTTGCAGCTACAT-3’
SA1399 F1	5’-TAGTTTACGATAGATTTTAGCGATC-3’
SA1399 F2	5’-GATCAGAGCGATGTAGTAAGACATCC-3’
SA1399 R1	5’-ATTACATCTGTAACTTTATCTTTATC-3’
SA1406 F1	5’-TAGCAACGTTATTTCATAGACCAAAAC-3’
SA1406 F2	5’-CAGAACAACATGACAATGGTTGGG-3’
SA1406 R1	5’-TCTTTTAAATCAACTGCAATTTTATC-3’
SA1407 F1	5’-TAGAACTGGACAGAGCTTTCAATTA-3’
SA1407 F2	5’-AACCTTCGAATTTTAAAGATAGAGC-3’
SA1407 R1	5’-TAGGCTTTCAATCTTACTCCCTTATC-3’
SA1415 F1	5’-TAGAGCGACAATATTGTAGCTATTTA-3’
SA1415 F2	5’-ATGCAAGTGGTTTATAGATACAG-3’
SA1415 R1	5’-AAAATTGCTTTTTTATCTGAAAAG-3’
SA1419 F1	5’-TAGTCGCAATATGCAGAAATGAGCC-3’
SA1419 F2	5’-TTGAAAAGTTATATCAAGATGCACC-3’
SA1419 R1	5’-AACATATCAACACTTAAATCCATAC-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer

[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA1420 F1	5’-TAGAATTCACAAGAATTATTAGCAA-3’
SA1420 F2	5’-CGGTATATAATAAGACGATTGACTG-3’
SA1420 R1	5’-TTTACTTCTATATTTTGTTCATTGG-3’
SA1421 F1	5’-TAGAACATTGAAAAAGCAAAACGGC-3’
SA1421 F2	5’-GGAAATCTATCCAAGTTCTTGTTCC-3’
SA1421 R1	5’-TGTCGAACAATTTGATACATTTTAC-3’
SA1422 F1	5’-TAGAAAAAGATAGTACTTTACGGCG-3’
SA1422 F2	5’-GCAAGTGATTGGATCTATGATAGTG-3’
SA1422 R1	5’-AGCTCGTCGATAATCATCTGTATC-3’
SA1423 F1	5’-TAGCTTACTGGCAAACAAAAAAGATAC-3’
SA1423 F2	5’-AAAATTTGGACTAATAAAGATGCTG-3’
SA1423 R1	5’-TCGCTTAATGTTTCAGCTAATTCTT-3’
SA1425 F1	5’-TAGTCTGACATTTTAAAATGTATCG-3’
SA1425 F2	5’-TTAATTGAAAGACGATTATTACGTC-3’
SA1425 R1	5’-GCAAGTCCTGATAATAATTTTAAAAAG-3’
SA1426 F1	5’-TAGGGTTTAGTTCGCAAGTTTTTTATG-3’
SA1426 F2	5’-AAGTCAAACTGTTGAAGCATTAGT-3’
SA1426 R1	5’-ATAGTGATTCCTTTTTCATTAGCTTC-3’
SA1444 F1	5’-TAGGGTTGGACGGCACAAGGATTAG-3’
SA1444 F2	5’-CTCGATGTCGGTAGTAGAACGGTAG-3’
SA1444 R1	5’-AATTTTTCTTTATATGTTAACGAAG-3’
SA1454 F1	5’-TAGAGTACAGAACCATTAGCATCG-3’
SA1454 F2	5’-GAGTTAAGATAGTATAAGAAAGGTGTGAC-3’
SA1454 R1	5’-TTATATTGCGTACTGCCCGAAATTGC-3’
SA1459 F1	5’-TAGAAAGTAGTTGTACAAAGAGTTA-3’
SA1459 F2	5’-GTGAATGATGTTTATCGTGTGGTAG-3’
SA1459 R1	5’-TGTTGGATATTAAAGTTTAATTTATTA-3’
SA1472 F1	5’-TAGATTACTGTTGATATTACAGTTA-3’
SA1472 F2	5’-CAACCATACACTAAATTAACAATCG-3’
SA1472 R1	5’-AAATGACCACCATTGTCGTCATAAT-3’
SA1475 F1	5’-TAGATTGTTGTTTTATGTGCAATTATCG-3’
SA1475 F2	5’-ACATAATAGAGTGTTCTGGGTGC-3’
SA1475 R1	5’-TTTTTAGATTCTTTAGAATCTCCTTTTT-3’
SA1497 F1	5’-TAGAAAGTTAATCCTAATAATATTG-3’
SA1497 F2	5’-CAAATATTATATAATGGTAGAGTTG-3’
SA1497 R1	5’-TAAAAATTTAACGTTGCGTTTTGCC-3’
SA1509 F1	5’-TAGAAATGCCCGAAATGTAATTCTAC-3’
SA1509 F2	5’-TTGGTTAAATGAATTAAATTGAGGG-3’
SA1509 R1	5’-AGTATTTTTTCTCTTGAAAACTGCTC-3’
SA1511 F1	5’-TAGCCGAAAGTTATTGGTCTAACAG-3’
SA1511 F2	5’-AAAATCATCGCGACAAGAAATAGTC-3’
SA1511 R1	5’-CGATTCATCTCACCATTTTCATCAA-3’
SA1526 F1	5’-TAGATTAGTACTTTGAATGAAATTATG-3’
SA1526 F2	5’-ATATAGACTAATGCTTAAATTAAGC-3’
SA1526 R1	5’-TCCAACTCTCCAATAAAACTTAATGA-3’
SA1527 F1	5’-TAGACAAAACATGAACAAATTTTAG-3’
SA1527 F2	5’-GTTATAATGTAGTTAATACTGTTCG-3’
SA1527 R1	5’-TCATTACGATTACGTTTTTCGATTC-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer

[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA1532 F1	5’-TAGATTACTTACAAAAATATTTTAATCGC-3’
SA1532 F2	5’-TAATTAAGAAAGAACAAGGAGGCAC-3’
SA1532 R1	5’-AATTCTTCTGCAAAATGCTTAGATTTTTC-3’
SA1534 F1	5’-TAGGCAGAACAACAAACAATTATGG-3’
SA1534 F2	5’-TATGATTGCTAAGACCTATGGGCAC-3’
SA1534 R1	5’-CTTAAATATGCAAATTGGAATGCTT-3’
SA1540 F1	5’-TAGACAACAATTAACCCAACAAACTAC-3’
SA1540 F2	5’-TTATAAAATCTATGAAAATAAGAGG-3’
SA1540 R1	5’-GCGGGGTGTCCTTGGAAAGGTCC-3’
SA1569 F1	5’-TAGAGAGTTCGATACAAACCATGGG-3’
SA1569 F2	5’-AAATGAAGTTATGAATAGTAACATG-3’
SA1569 R1	5’-ATTGAAATATAGTTAATATGAGGAT-3’
SA1570 F1	5’-TAGGAGCAGTTTTATCAATTAGGGTG-3’
SA1570 F2	5’-TAGAATATATGGCTCTTGAAAAACC-3’
SA1570 R1	5’-GCTGTAACAACCTCGCCTGTTTCTA-3’
SA1576 F1	5’-TAGTATCAAACAATTATTATCGGAG-3’
SA1576 F2	5’-TGAATGTCCAGTAACAAATTTGGAG-3’
SA1576 R1	5’-CCATTTCCAGGAATGTTCTTAATAATTTC-3’
SA1578 F1	5’-TAGAAGTCAATTACTACAGATGAAT-3’
SA1578 F2	5’-GTAGCTAAATAATGTTTTAAGGAGG-3’
SA1578 R1	5’-ACTCCACCAGCACATACAATATAATA-3’
SA1582 F1	5’-TAGAAATTAGAACGTATACTCCC-3’
SA1582 F2	5’-GGCTTGCGTTACAAGTCTAAGGTG-3’
SA1582 R1	5’-AAATCCTTAACTTTATCACGTG-3’
SA1613 F1	5’-TAGAAAAAGATATTCTTGGCGATG-3’
SA1613 F2	5’-ATAGTTAATTACTATCGTTGGAGG-3’
SA1613 R1	5’-GGGTCAAAGCCACCTTTATGAAGC-3’
SA1668 F1	5’-TAGAAATTTAAAATACCAGAAAACTTTAAT-3’
SA1668 F2	5’-ATTTAGGAGAACTGATTTGTGATATG-3’
SA1668 R1	5’-TAATTACTTTTTTCATCGATGGTTGG-3’
SA1672 F1	5’-TAGACAAATCATATCGTTTTATATC-3’
SA1672 F2	5’-AATGATAAAAGGATTAGACACAAGG-3’
SA1672 R1	5’-AATGCTTCAATACTATCATGATACG-3’
SA1684 F1	5’-TAGGTCAGAGAATCCATACCTAAAG-3’
SA1684 F2	5’-TTATAATGGTTAAATTAACAGAAGG-3’
SA1684 R1	5’-TAAACAATTGCCGGTTCACGTGTTA-3’
SA1690 F1	5’-TAGCCGAAGATTACTAAAATAGAAG-3’
SA1690 F2	5’-ATTTGCTATAGGAAGTGGCTTATTG-3’
SA1690 R1	5’-ATTGCTTTGTTTAAACCTATGCGAT-3’
SA1714 F1	5’-TAGAGGAAACGTGCTAGAATCATTT-3’
SA1714 F2	5’-CTGTCCCACTCCCTATTAGACG-3’
SA1714 R1	5’-CCACCTGCAGCGATTAATACATC-3’
SA1737 F1	5’-TAGACAAATGGATATATTGGTTCTTAC-3’
SA1737 F2	5’-ATGATAAATGATTGTTAATTCTAGC-3’
SA1737 R1	5’-TTCAAACTCGCAACACCGCATTGTTC-3’
SA1851 F1	5’-TAGAGTGACCAAGTTAAAATTCCTC-3’
SA1851 F2	5’-CGCTCTAACTCGTTTGAATACATAG-3’
SA1851 R1	5’-TTATATCCGTACCCTTTTTTACC-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer

[b] The stop codon introduced is underlined

Table 6, continued.

Primer[a]	Sequence[b]
SA1857 F1	5’-TAGATAAAGATAAATAATTTAGATG-3’
SA1857 F2	5’-AAAGTTAGATACGATTGAACAATGG-3’
SA1857 R1	5’-CCCCTATATGATTTAATGATG-3’
SA1867 F1	5’-TAGAATAATGACAAACTTCAGCGAATG-3’
SA1867 F2	5’-GGTGATATCGTTGACGTTTGGG-3’
SA1867 R1	5’-TGCAGTATAATTTTTACAACAGC-3’
SA1868 F1	5’-TAGGACAATCAATTGATTAATTCAATC-3’
SA1868 F2	5’-GAAAATTACATTAAGTATCATACC-3’
SA1868 R1	5’-TTTTGTAAATTGACCATATATTGG-3’
SA1918 F1	5’-TAGGATACTAAAATTTGGGATGTTAG-3’
SA1918 F2	5’-GCTATGATTAGTTAAGTGCATAGC-3’
SA1918 R1	5’-TTGTCAGATGGACGGCCTTTAGC-3’
SA1957 F1	5’-TAGGATAACGTAAAAGCAATATTTTTG-3’
SA1957 F2	5’-CGATTTTCTATGGCAATGTTAGAG-3’
SA1957 R1	5’-GAACTAATGATGCCATTAACCGC-3’
SA2160 F1	5’-TAGATAGAAACATTTAAAGCGTTTG-3’
SA2160 F2	5’-AAGAGAAAAAGAGAGGATGTATCG-3’
SA2160 R1	5’-CCTGGAATCATAGGATACGATTTTACG-3’
SA2220 F1	5’-TAGCAATTACAAAAAATTGTCATCGC-3’
SA2220 F2	5’-CGACAACAGTAATGAGAGGATGTC-3’
SA2220 R1	5’-ACTGTATACTTAGTGGCACCTG-3’
SA2313 F1	5’-TAGGTTAAGGCTATTGCGGTAGATATG-3’
SA2313 F2	5’-GTGAATATAGTTTCATTGTGGTATG-3’
SA2313 R1	5’-GCACCATTTTCAGAAATAAAATAC-3’
SA2481 F1	5’-TAGAACTATCAAGTTCTTTTATATTATAAA-3’
SA2481 F2	5’-GCTTATAACATGTTTATAGAAGGAG-3’
SA2481 R1	5’-CGTTCATCGGCATGCATATGTGCC-3’

[a] F1 , forward primer ; F2 , specific primer ; R1 , reverse primer
[b] The stop codon introduced is underlined

黄色ブドウ球菌のゲノム DNA の調製

黄色ブドウ球菌 RN4220 株を BHI に接種後、37°C で 16 時間培養し、集菌した。菌体を緩衝液 TE［10mM Tris-HCl（pH 8.0）、1mM EDTA（pH 8.0）］で懸濁後、終濃度 10 μg/mL となるように Lysostaphin（和光純薬工業株式会社）を加え、37°C で 2 時間保温した。0.7% SDS 含有 TE を等量加えた後、終濃度 30 μg/mL となるように ProteinaseK（Sigma-Aldrich Corp.）を加え、55°C で 2 時間保温した。続いてフェノール処理、フェノール/クロロフォルム・イソアミルアルコール処理を行ない、エタノール沈殿によりゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA は、終濃度が 500 ng/μL となるように RNaseA（Sigma-Aldrich Corp.）を加えた TE を用い、4°C で溶解させた。

遺伝子相同組換え用プラスミドの構築

Table 6 に示した各遺伝子用 F1［開始コドン（ATG）を終止コドン（TAG）に置換］および R1 プライマーを用い、RN4220 株ゲノム DNA（400 ng/reaction）を鋳型として PCR［ExpandTM High-Fidelity PCR System（Roche）を用い、94°C で 2 分間反応後、94°C で 30 秒間、50°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間の 25 サイクル反応、最後に 72°C で 2 分間反応］を行ない、5’（開始コドン）および 3’側欠失遺伝子 DNA 断片（約 200 bp）を増幅した。得られた DNA 断片を精製後、末端に平滑化・リン酸化を施した。一方、pYT3 は BamHI 処理後、末端の平滑化および脱リン酸化（BAP 処理）を施した。尚、各処理の後には DNA 断片を精製し、適宜、溶媒を置換した。処理した DNA 断片と pYT3 をライゲーション後、大腸菌 DH5α 株に導入し、目的とするプラスミドを取得した。ここで構築するプラスミドにおける DNA 断片（欠失遺伝子）挿入方向は、RV-M プライマー（Table 6）と遺伝子の F1 プライマーを用いた PCR（30 サイクルとした以外は上述の通り）によって増幅される向きとした。

黄色ブドウ球菌へのプラスミド導入

黄色ブドウ球菌 RN4220 株を BHI に接種し、37°C で OD_{600} が 1.0 となるまで培養した。集菌後、10% sucrose 水溶液で 2 回洗浄、続いて 10% sucrose/10% glycerol 水溶液で 1 回洗浄し、最後に同水溶液で再懸濁したものをコンピテントセルとした。そのコンピテントセル（80 μl）と遺伝子相同組換え用プラスミド（1 μg）を混和し、25 μF、2.5 kV、100 Ω の条件で pulse controller（BIO-RAD）によりエレクトロポレーションを行った。10% sucrose 含有 BHI 1 mL を加えて 37°C で 1 時間培養後、その菌液の一部を Tc 含有 BHIA プレートに播種し、30°C で約 20 時間培養後形成されたコロニーをプラスミド導入体（形質転換体）として取得した。

Plasmid integration の誘起および検出

菌体内に染色体上の配列と同一の配列を有するプラスミドが存在する場合、その同一の

配列間で相同組換えが起こり、そのプラスミドが染色体内へ組み込まれることがある。この現象を plasmid integration（PI）と言う。本研究では複製温度感受性プラスミド pYT3 を用いて作為的に PI を起こさせた。

まず､遺伝子相同組換え用プラスミド導入 RN4220 株を再度 Tc 含有 BHIA プレートに播種し、30°C で 20 時間培養した。その後、形成されたコロニーを BHI に接種し、プラスミド複製非許容温度である 42°C で約 20 時間培養した（Fig. 6B ; 培養 C1 ; PI を誘起)。次いで、その菌液を Tc 含有 BHI に 1:10 希釈となるように接種し、42°C で 20 時間培養した（Fig. 6B ; 培養 C2 ; PI が非必須遺伝子で起こった場合、その PI 体は増殖)。さらに、その菌液を適宜希釈して Tc 含有 BHIA プレートに播種し、42°C で 16 時間培養した（Fig. 6B ; 培養 C3 ; PI 体のコロニーの取得)。相同組換えに基づく PI の検出は、培養 C1 および C2 由来菌体から抽出したゲノム DNA（400 ng/reaction）あるいは培養 C3 で形成されたコロニーを用い、F2 プライマーおよびベクターに特異的な RV-M プライマー（Table 6）による PCR（30 サイクルとした以外は上述の通り）で行った。予想されるサイズの産物が認められた時、相同組換えに基づく PI が起こったものと判断した。

Plasmid integration（PI）試験による遺伝子の必須性解析

原理および操作は上述に準じた。当該 PI 試験で対象遺伝子が菌増殖に必須であると判定する基準（条件）は、ｉ）培養 C3 由来コロニーを用いた CD-PCR で PI が検出されないこと、かつⅱ）培養 C2 由来ゲノムを用いた PCR でも PI が検出されない、あるいはその PCR における産物量（PI 体量を反映）が明らかに培養 C1 由来ゲノムを用いた PCR の場合よりも少ないこと、とした。

バイオインフォマティクス（遺伝子／蛋白質の *in silico* 解析）

国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究所が作成した GTOP サイト（http://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/gtop-j.html）で公開されている、ゲノムにコードされる全タンパク質の配列データを解析した結果を参照した。また、腸球菌（*Enterococcus faecalis* および *E. faecium*）に関する情報は、それぞれのゲノムデータベース（TIGR : http://www.tigr.org/および JGI : http://www.jgi.doe.gov/）を利用した解析で取得した。ヒト遺伝子／蛋白質の検索は、Ensembl Genome Browser（http://asia.ensembl.org/index.html）を用いて実施した。

ヒト NAD キナーゼ遺伝子組換え黄色ブドウ球菌の作製

hNADK(SD)プライマー（5'-GAAGGAGATATACCATGGAAATGGAACAAG-3'）および T7terminator プライマー（5'-GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'）を用い、HepG2 細胞由来のゲノムを鋳型とする PCR（Expand High-Fidelity PCR System ; 94°C で 30 秒間反応後、94°C で 30 秒間、50°C で 30 秒間、72°C で 1 分 30 秒間の反応を 5 サイクル、

次いで 94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間、72°C で 1 分 30 秒間の反応を 30 サイクル実施し、最後に 72°C で 1 分間反応）によって、ヒト NAD キナーゼ遺伝子の蛋白質コード領域（hNADK ; SD 配列を含む）を増幅した。得られた DNA 断片は精製後、末端に平滑化・リン酸化、次いで *Sal*I 処理を施した。当該遺伝子と、*Bam*HI 末端平滑化、および *Sal*I の処理を施した *SA0865* 用 PI プラスミドとをライゲーションし、遺伝子組換え用プラスミド pYT3-Δ*SA0865*::hNADK を構築した（Fig. 8）。

先述の通り、黄色ブドウ球菌 RN4220 株に遺伝子組換え用プラスミド pTY3-Δ*SA0865*::*hNADK* を導入することで、当該組換え体（RN4220Δ*SA0865*::*hNADK*）では、黄色ブドウ球菌の *SA0865* 遺伝子が不活化されているが、導入された *hNADK* 遺伝子の発現していることが期待される株となる（Fig. 8）。

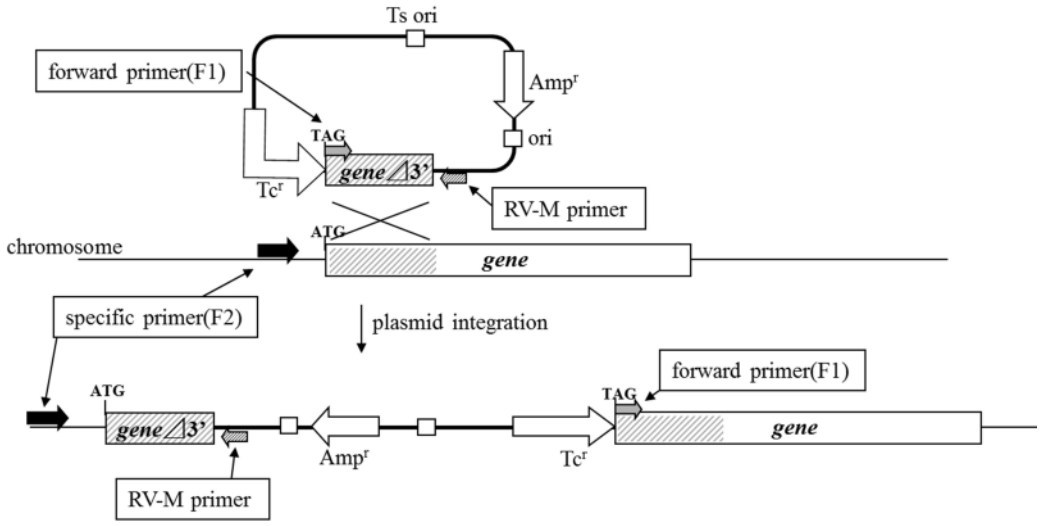
実験結果

相同組換えに基づく plasmid integration（PI）による遺伝子の不活化の可否を試験する系を考案した。Fig. 6A に、その試験系において想定される PI による遺伝子不活化の概略を示した。導入したプラスミド上の解析対象遺伝子断片と染色体上の遺伝子の間で相同組換えが起こった場合、その遺伝子は 3’末欠損体と、pYT3 配列の下流にプロモーターから分断されると同時に開始コドンが終止コドンに置換された状態となり、正常蛋白質の発現は起こらないと考えられる。

基本プラスミドとして用いた pYT3 は複製温度感受性の ori を有し、30°C 培養時には黄色ブドウ球菌内に 10 数コピー、一方、42°C 培養時には 1 コピー以下となるとされている。したがって、30°C 培養で得た形質転換体を Tc 存在下、42°C で培養した場合、Tc 耐性遺伝子を含むプラスミドが染色体へ integrate したクローンが優位に増殖すると考えられる。このような想定のもと、“実験材料および実験方法”に記載した培養条件（項：Plasmid integration の誘起および検出、培養 C1～C3）を設定した。

また、PI の検出は PCR によって可能であると考えた。即ち、Fig. 6A 中に示した F2 プライマーと RV-M プライマーを用いた PCR による特異産物は、理論上、上述のような PI がゲノム DNA 上で起こった場合にのみ認められるはずである。その産物検出の有無が PI の有無を、そして、産物量が PI 体の量を反映すると考えられる。

(A)



(B)

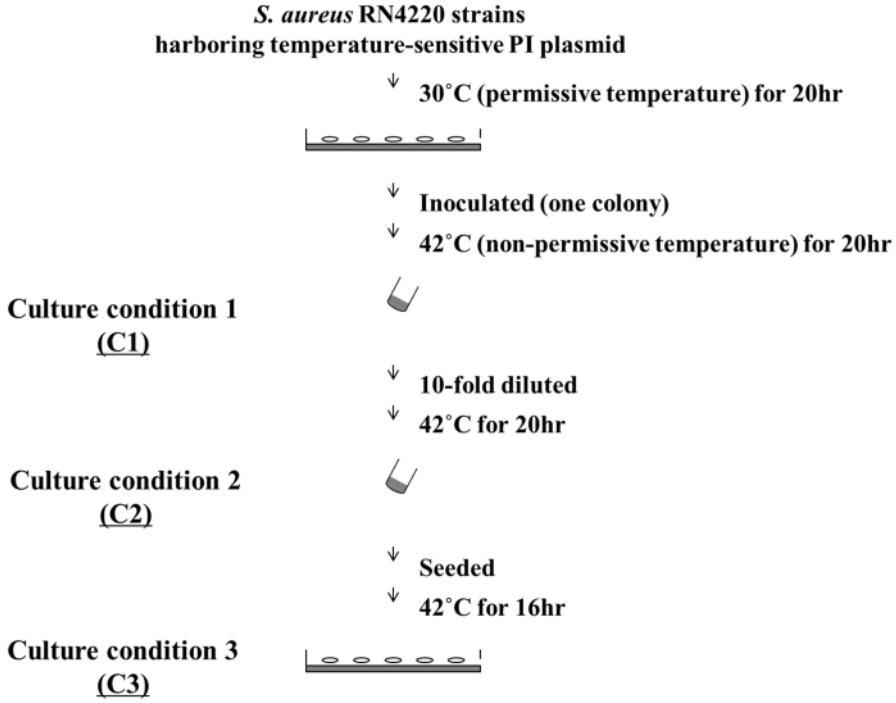


Fig. 6. Plasmid integration method. A) Schematic representation of targeted gene replacement. Plasmid Integration (PI) plasmid, which is temperature-sensitive pYT3-based plasmid, contains a 3'-truncated target gene whose start codon is exchanged to stop codon. When homologous single-crossover recombination between a 3'-truncated target gene on PI plasmid and the gene in genome, the chromosomal gene occurs, and stop codon is introduced to the target gene at the position of start codon. PI

strains were detected using PCR with gene-specific primer (F2) and plasmid-specific primer (RV-M). The positions of the primers are indicated by arrows. B) Culture conditions in PI method. *S.aureus* RN4220 strains with PI plasmid were cultured in BHI agar plate or BHI medium in the presence of tetracycline. For the PI method, three culture conditions (C1, C2, and C3) were used. As PI plasmid can be replicated at 30˚C but not at 42˚C in *S. aureus*, the only bacteria with plasmid integration into the chromosome are able to grow in C1. In C2, PI strains with growth ability were concentrated. By incubating in C3, plasmid integration mutants could be isolated as a colony.

続いて、既知遺伝子の解析による試験系の検証を行なった。上述の解析試験（PI 試験）系の有用性を検証するため、既知の必須遺伝子 *gyrA*（DNA gyrase A subunit 遺伝子）および *mvaD* (mevalonate diphosphate decarboxylase 遺伝子)、ならびに非必須遺伝子 *sigB*（sigma factor B 遺伝子）および *hla*（α-hemolysin 遺伝子）を対象として、実際にその試験を行なった(12, 18, 53, 83)。即ち、構築した各遺伝子の相同組換え用プラスミドを RN4220 株に導入し、一連の培養後に得られた菌あるいはそのゲノム DNA を用い、PCR によって PI 検出を試みた。

まず、培養 C3 により得られたコロニーと、F2 プライマーおよび RV-M プライマーを用いて PCR［colony-direct（CD-）PCR］を行ない、相同組換えによる PI の有無を検討した。その結果、*sigB* および *hla* についてはそれぞれ、89%（8/9）および 100%（9/9）の頻度で想定されたサイズの PCR 産物が検出された（Fig. 7)。一方、*gyrA* および *mvaD* については、いずれの場合も解析したすべてのコロニーで想定されたサイズの PCR 産物は検出されなかった（Fig. 7)。このように、相同組換えによる PI は、非必須遺伝子のみで観察された。尚、PI が検出されないにもかかわらず Tc 含有 BHIA プレートで形成されたコロニーでは、プラスミドが非特異的に菌の染色体に挿入している可能性が考えられた。

続いて、培養 C1 および C2 由来菌体より調製したゲノムと、F2 プライマーおよび RV-M プライマーを用いて PCR を行ない PI の有無を検討した。培養 C1 由来ゲノム DNA を用いた PCR では、どの遺伝子においても同程度の PCR 産物が検出された（Fig. 7、培養 C1)。一方、培養 C2 由来ゲノム DNA を用いた PCR の結果、*gyrA* および *mvaD* では PCR 産物がほとんど検出されないか（*gyrA*)、わずかに観察される程度（*mvaD*）であったが、*hla* および *sigB* では、培養 C1 の場合と比べて明らかに多量の PCR 産物が観察された(Fig. 7、培養 C2)。即ち、培養 C2 の時点までに、必須遺伝子では相同組換えによる PI が起こってもその PI 体は増殖しないこと、一方、非必須遺伝子では PI 体が明らかに増殖していることが示された。

以上のように、相同組換えに基づく PI を期待して設計・構築したプラスミドによる形質

転換体を、そのプラスミドの特性に基づき理論的に設定した条件で培養した場合、非必須遺伝子で PI が起こる現象を想定通り確認した。

上述のように、CD-PCR およびゲノム PCR、そのどちらかの手法のみを用いても PI による遺伝子不活化の可否（必須性）の解析および判定は可能であったが、両手法を組み合わせることにより、その判定の信頼性は高まると考えられた。そこで、当該 PI 試験で対象遺伝子が菌増殖に必須であると判定する基準（条件）は、ｉ）培養 C3 由来コロニーの CD-PCR で PI が検出されないこと、かつⅱ）培養 C2 由来ゲノムを用いた PCR でも PI が検出されない、あるいはその PCR における産物量（PI 体量を反映）が明らかに培養 C1 由来ゲノムを用いた PCR の場合よりも少ないこと、とした。

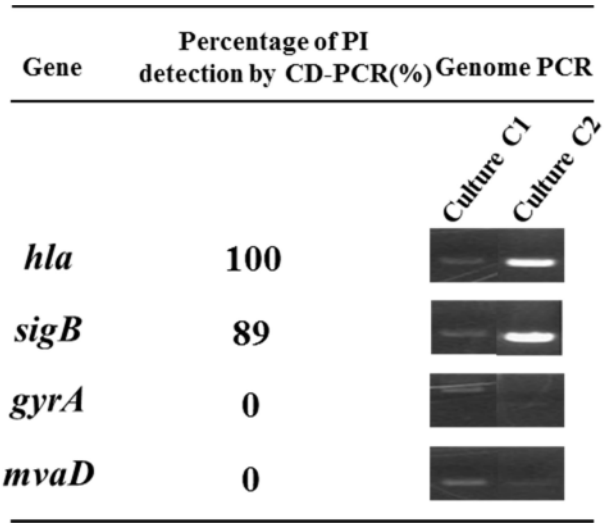


Fig. 7. Results of the PI test for known essential and non-essential genes. *S. aureus* RN4220 strains which harbor PI plasmid were inoculated to BHI containing tetracycline, and incubated at a non-permissive temperature (42˚C) for 20 hr (C1). The cultures were 10-fold diluted with BHI medium containing tetracycline, and then incubated at a non-permissive temperature (42˚C) for 20 hr (C2). Moreover, CD-PCR against about 9 colonies was performed.

公共データベース（DDBJ, DNA Data Bank of Japan）で、conserved hypothetical protein（複数の細菌種間で保存されているが機能未知な遺伝子）と定義されていた 116 遺伝子の必須性について、PI 試験により評価した（Table 7）。その結果、28 遺伝子が黄色ブドウ球菌の増殖に必須な遺伝子であると判断した。Table 8 に、本結果ならびに既報告の必須性解析結果をまとめて示した。PI 試験により必須遺伝子として判定した 28 遺伝子のうち、約 70%以上がトランスポゾンを用いた網羅的解析により必須と判定された遺伝子であった（Table 8）(4, 13)。しかしながら、PI 試験の結果は、アンチセンス法を活用した網羅的必須性解析結果とほとんど一致しなかった（Table 8）(21, 35)。また、本 PI 試験により、過去に報告の無い *SA1236*、*SA1576*、および *SA2481* 遺伝子が、新規標的候補遺伝子となり得ることが示された（Table 8）。これらの遺伝子は、幅広い菌種で保存されており、広域の抗菌スペクトラムが期待できる遺伝子である。*SA1576* 遺伝子の肺炎球菌ホモログ遺伝子も必須遺伝子と報告されており、当該遺伝子は特に有望な遺伝子と考えられる(77)。

Table 7. List of all genes validated using PI method

SA0007	*SA0044*	*SA0081*	*SA0085*	*SA0266*	*SA0301*	*SA0306*	*SA0331*	*SA0410*	*SA0412*
SA0449	*SA0463*	*SA0559*	*SA0560*	*SA0606*	*SA0612*	*SA0618*	*SA0624*	*SA0673*	*SA0707*
SA0720	*SA0722*	*SA0757*	*SA0775*	*SA0832*	*SA0862*	*SA0865*	*SA0908*	*SA0940*	*SA0972*
SA0974	*SA0998*	*SA0999*	*SA1018*	*SA1022*	*SA1031*	*SA1032*	*SA1037*	*SA1040*	*SA1061*
SA1062	*SA1064*	*SA1066*	*SA1068*	*SA1069*	*SA1079*	*SA1086*	*SA1108*	*SA1110*	*SA1118*
SA1125	*SA1129*	*SA1167*	*SA1223*	*SA1236*	*SA1258*	*SA1277*	*SA1296*	*SA1325*	*SA1326*
SA1330	*SA1331*	*SA1335*	*SA1356*	*SA1363*	*SA1364*	*SA1375*	*SA1380*	*SA1388*	*SA1389*
SA1399	*SA1406*	*SA1407*	*SA1415*	*SA1419*	*SA1420*	*SA1421*	*SA1422*	*SA1423*	*SA1425*
SA1426	*SA1444*	*SA1454*	*SA1459*	*SA1472*	*SA1475*	*SA1497*	*SA1509*	*SA1511*	*SA1526*
SA1527	*SA1532*	*SA1534*	*SA1540*	*SA1569*	*SA1570*	*SA1576*	*SA1578*	*SA1582*	*SA1613*
SA1668	*SA1672*	*SA1684*	*SA1690*	*SA1714*	*SA1737*	*SA1851*	*SA1857*	*SA1867*	*SA1868*
SA1918	*SA1957*	*SA2160*	*SA2220*	*SA2313*	*SA2481*				

Table 8. Distribution of the putative orthologs of the *S. aureus* essential genes identified in this study

Gene	Essentiality for growth in *S.aureus* reported by[a]:				Presence of the ortholog in[b]:								
	Ji	Forsyth	Bae	Chaudhuri	bsub	spne	efcl	efcm	ecol	hinf	paer	scr	huge
SA0972	NE	NE	**E**	NE	+	+	+	+	+E	+E	+		
SA1064	NE	NE	NE	**E**	+E	+	+	+	+	+	+		
SA1576	NE	NE	NE	NE	+	+E	+	+	+	+	+		
SA1613	NE	NE	**E**	NE	+	+	+	+	+	+	+		
SA0412	**E**	NE	**E**	NE	+								
SA0940	**E**	**E**	NE	**E**	+E	+E	+	(+)					
SA1032	NE	NE	**E**	**E**	+	(+)	+	+					
SA1069	NE	NE	**E**	NE	+	+	+	+					
SA1118	NE	**E**	**E**	**E**	+E	+E	+	+					
SA1389	NE	NE	**E**	**E**	+	+E	+	+					
SA1415	NE	NE	**E**	**E**	+E	+	+	+					
SA1426	NE	NE	**E**	**E**	+	+E	+	+					
SA1526	NE	NE	**E**	NE	+	+	+	+					
SA0774	**E**	**E**	**E**	**E**	+E	+			+			(+)	(+)
SA0865	NE	NE	**E**	**E**	+E	+	+	+	+	+	+		(+)
SA1022	NE	NE	**E**	NE	+	+E	+	+	+E	+	+		(+)
SA1236	NE	NE	NE	NE	+	+	+	+	+	+			+
SA1399	NE	NE	**E**	**E**	+	+E	+	+	(+E)	(+E)	(+)		(+)
SA1422	NE	NE	**E**	**E**	+E	+E	+	+	+E	(+)	+	(+)	(+)
SA1497	NE	NE	**E**	**E**	+E	+E	+	+	+E	+	+	(+)	(+)
SA1511	NE	NE	**E**	**E**	+E	+E	+	+	+E		+	+	+
SA1714	NE	NE	**E**	**E**	+E	+	+	+	(+)	(+)	(+)		(+)
SA1918	NE	NE	**E**	**E**	+E	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)
SA2481	NE	NE	NE	NE	+	+	+	(+)	+		+		(+)
SA1066	NE	NE	**E**	**E**	+	+	+	+				(+)	(+)
SA1086	NE	**E**	**E**	**E**	+E	+E	+	+				(+)	(+)
SA1110	NE	NE	**E**	**E**	+	+E	+	+					(+)
SA1425	NE	NE	**E**	**E**	+E	+E	+	+				(+)	(+)

[a] Ji(35), Ko, Forsyth(21), Bae(4), Chaudhuri(13).

[b] bsub, *Bacillus subtilus*; spne, *Streptococcus pneumoniae*; efcl, *Enterococcus faecalis*; efcm, *E. faecium*; ecol, *Escherichia coli*; hinf, *Haemophilus influenzae*; paer, *Pseudomonas aeruginosa*; scer, *Saccharomyces cerevisiae*; huge, *human genome*. +: homology of coding protein >30%; blank: no homolog; (+): low (<30%) or partial homology; E: essential*; NE: non-essential.

*The essentiality in *E. coli* (24), *B. subtilis* (37), *S. pneumonia* (77), *H. influenzae* (2).

黄色ブドウ球菌の機能未知蛋白質に対するそのホモログ蛋白質の機能相補性を解析することによって、*in silico* により予測された機能を検証できる。すなわち、機能未知の増殖必須蛋白質欠損時に、生物活性が既知の蛋白質が増殖阻害をレスキューするならば、当該機能未知蛋白質がその生物活性を有している可能性を示すことができる。PI 試験系は、この検証においても有用なツールになり得ると考えた。その仮説を検証する目的で、黄色ブドウ球菌では conserved hypothetical protein と定義されている *SA0865* 遺伝子およびそのヒトホモログであり機能既知である NAD キナーゼ遺伝子を用いた PI 試験を実施した。Fig. 8 にその概要を示した。*SA0865* 用 PI プラスミド上の *SA0865* 遺伝子下流に、ヒトの NAD キナーゼ遺伝子を挿入した。当該プラスミドを用いた組換え体では、黄色ブドウ球菌の NAD キナーゼ遺伝子 *SA0865* が不活化されており、導入された *hNADK* 遺伝子の発現（Fig. 8）、即ちヒト NAD キナーゼの機能によって生育すると考えられる。PI 試験系の結果、想定通り PI 組換え体クローン獲得に成功した。それ故に、SA0865 蛋白質は、NAD キナーゼ活性を有しているものと考えられる。また、PI 試験系が、相補能評価にも有用なツールになり得ることが示された。

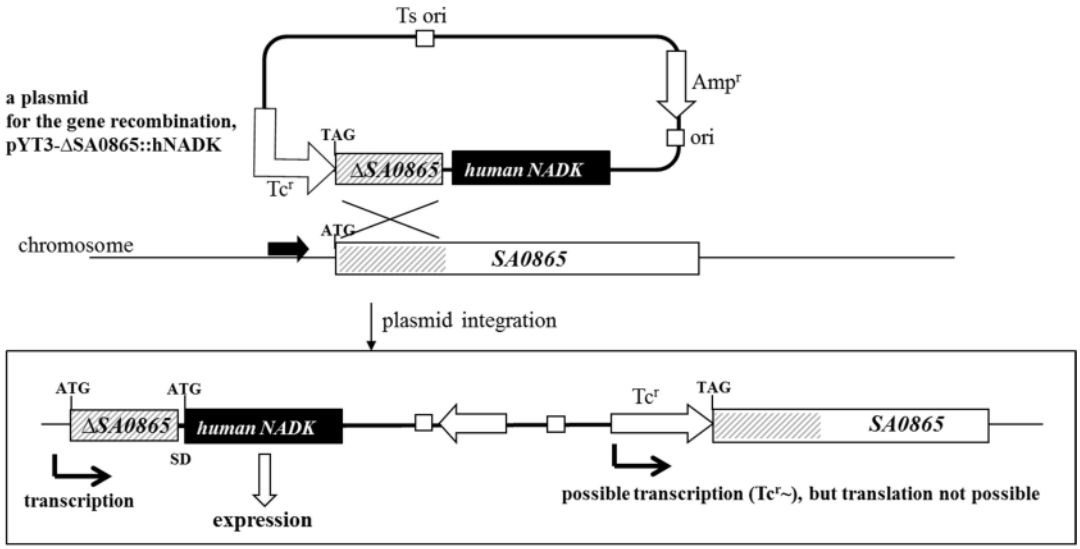


Fig. 8. PI method for evaluation of functional redundancy between *S. aureus* protein and its ortholog. PI plasmid for this purpose, which is PI plasmid for SA0865 essentiality evaluation, contains its homolog, human NAD kinase and SD sequence. When homologous single-crossover recombination between a 3'-truncated target gene on PI plasmid and the gene in genome, the chromosomal gene occurs, and stop codon is introduced to the target gene at the position of start codon and human NAD kinase is introduced downstream of a 3'-truncated target gene.

考察

本研究においては、多剤耐性黄色ブドウ球菌に有効な新規抗菌剤創出に繋がる、黄色ブドウ球菌の増殖に必須な遺伝子の同定、ならびにヒトのオルソログ等の相補能評価を簡便に実施できる手法を構築した。アンチセンス／トランスポゾン技術を活用した網羅的解析および相同組換えによる欠損株作製の手法と比べ、当該手法は以下の 4 つの強みを有していると考える。

第一に、PI 試験系の手順は非常に簡便である。網羅的解析のためのアンチセンス／トランスポゾン用ライブラリ構築および結果の解析には、経験および複雑な作業が必要である。また、相同組換え技術を活用した必須性評価においても、何段階ものプラスミド構築作業が必要であり、且つ黄色ブドウ球菌内で二回組換え（double-crossover）を起こさせる必要がある。一方、PI 試験系では、増幅した 200 bp の遺伝子断片をベクターに組み込む一律の作業で組換え用プラスミドを構築でき、一度の組換え操作のみで必須性の判断も可能である。

第二に、PI 試験系は、黄色ブドウ球菌の増殖における遺伝子の必須性解析結果の信頼性が高い。従来の手法における必須遺伝子の判定基準は、“欠損株を獲得できない”ことである。それ故に、どの程度の規模で繰り返し検証すれば十分であるか、明瞭な基準がない。しかしながら、PI 試験は、従来のコロニー形成の有無に加え、ゲノム PCR 解析を加えた新しい手法である。ゲノム PCR を加えた理由は二つある。一つは、短い期間で評価対象遺伝子の欠損直後の株全体の増殖能を評価することで、コロニー形成時に生じる変異による偽生育による誤った解釈を防ぐことができる。二つ目に、single-crossover が起こったかどうかを確認することができる。トランスポゾンによる遺伝子挿入および相同組換えが起こり難い“cold spot”による影響の可能性も除去できる。これらの優位性が、必須性解析結果の信頼性を高めると考えられる。

第三に、黄色ブドウ球菌遺伝子がコードする蛋白質の機能を予測する際にも有用である。一つの例として、機能検証の難易度が高い必須蛋白質について、機能既知の蛋白質の相補能で評価する戦略がある。しかしながら、従来の相補能試験では、遺伝子の発現ベクターの構築、当該プラスミドを有する黄色ブドウ球菌の作製、そして相同組換え（double-crossover）による遺伝子欠損の 3 工程が必要である。一方、PI 試験系では、欠損させたい遺伝子の一部が挿入された PI プラスミドに、相補能を確認したい遺伝子を挿入し、PI 試験を実施するのみである。実際、この方法により、黄色ブドウ球菌 *SA0865* 遺伝子は、ヒトの NAD キナーゼにより相補されることを確認し、SA0865 蛋白質が黄色ブドウ球菌の NAD キナーゼであることを確認した。

第四に、PI 試験系は、創薬研究の可能性を広げることができる。SA0865 蛋白質阻害剤について、*SA0865* 欠損・ヒト NAD キナーゼ発現黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を評価することで、阻害剤の選択性を評価することができる。この戦略は、他の機能既知および

未知の蛋白質においても適応可能かもしれない。更に、PI 試験系は、温度感受性プラスミドが知られている大腸菌のような菌種においても、同様に構築可能と考えられる。それ故に、今後の細菌全般の研究において、強力なツールとなり得る。

黄色ブドウ球菌の増殖必須遺伝子については、様々な研究機関・製薬企業から報告されている。驚くべきことに、PI 試験系による必須判定の結果は、アンチセンス RNA を活用した網羅的解析結果とは大きく異なっていた（Table 8）。アンチセンス RNA の中には、十分な RNA 抑制効果を示さないもの、ならびに複数の遺伝子を含むオペロン全体を抑制してしまうものも多々存在する。PI 試験との大きな乖離は、アンチセンス RNA の不十分な抑制効果に起因する可能性が高い。一方、PI 試験系の結果は、トランスポゾンを活用した網羅的解析結果とほぼ一致していた（Table 8）。この事実は、PI 試験で得られる結果が相同組換え実験で得られる結果に匹敵するものであること、を示唆している。また、この研究成果は、黄色ブドウ球菌の信頼性の高い必須遺伝子を判断する上での貴重な材料となり得る。PI 試験においてのみ必須と判定された *SA1236*、*SA1576*、および *SA2481* 遺伝子もまた、更なる検証が必要ではあるが、新しい創薬標的となり得る可能性を秘めていると考えられる。

本研究において構築した PI 試験系は、信頼性の高い判断を簡便に成し遂げる強力なツールである。今回獲得した機能未知遺伝子から、当該試験系を活用した機能解析を進めることで、複数の有望な標的を選抜し、それらに対する阻害剤を獲得することが可能になると考えられる。幾つかの標的について、更なる機能解析を進め、阻害化合物獲得に向けた研究可否を検証中である。これらの研究を進めることで、多剤耐性黄色ブドウ球菌に有効な新規抗菌剤の創出に繋がると考える。

小括

1. 黄色ブドウ球菌遺伝子の必須性および機能を解析するための有用な手法として PI 試験系を構築した。

2. 当該試験系により、既知必須遺伝子と非必須遺伝子を正しく評価できるようにした。

3. 116 の conserved hypothetical protein 遺伝子から 28 の増殖必須遺伝子を選抜した。

4. PI 試験系を活用して、SA0865 蛋白質の機能をヒト NAD キナーゼ蛋白質は相補することを明らかにした。

総　括

人類は様々な抗菌剤を創出し、多くの細菌感染症の治療を可能にしてきた。しかしながら、それら抗菌剤の乱用により生み出された“多剤耐性菌”は、新たな感染症を生み出し、再度人類を脅かしている。アカデミアや製薬企業は、これら“多剤耐性菌”に対して有効な新規抗菌剤を創出すべく研究を進めているが、十分な成果をあげていない。本研究において、私は、臨床現場において多剤耐性化が特に問題となっている緑膿菌および黄色ブドウ球菌に注目し、それらに対する有効性が期待できる新規作用機作の抗菌剤を継続的かつ効率的に創出するための基盤の構築を目指し研究を進めてきた。

第一章では、緑膿菌に対する抗菌活性を指標にしたスクリーニングを実施し、抗緑膿菌化合物のセットを構築した。このセットに含まれる化合物の一つである Compound A は、ヒトのアクチンホモログである MreB 蛋白質に対する阻害活性、および異物排出ポンプの影響を受け難い性質を有していることを明らかにした。多剤耐性緑膿菌に対して抗菌活性を示す低分子化合物は、新規作用機作で特異的に標的作用活性を示し、ならびに菌体内への移行性・残留性が高い（膜透過性および異物排出ポンプの影響を受け難い）性質を有する必要がある。Compound A は、これら性質を有する有望な化合物であり、今後の合成展開により新規の抗多剤耐性緑膿菌剤となり得るものと考える。また、この結果は、本章で構築した抗緑膿菌化合物のセットに有望な化合物が含まれることを示している。つまり、当該セットは、抗多剤耐性緑膿菌剤を効率的に創出させる基盤となり得るものである。

第二章において、排出ポンプ構成因子 *tolC* および DNA 損傷修復因子 *mutS* を欠損させた株（Δ*mutS*Δ*tolC* 株）が、抗菌化合物の標的を予測するための強力なツールになり得ることを示した。実際、DNA ジャイレースおよびトポイソメレース IV を阻害するニューキノロン系シプロフロキサシンに加えて、ペニシリン結合蛋白質をマルチ阻害するカルバペネム系メロペネムの標的変異株さえも、高確率で獲得できることを示した。これら耐性株を用いた研究は、標的変異株に対しても有効なカルバペネム系の抗菌剤研究の道を開くものと考える。また今後、当該株を活用した標的変異を有する耐性株の効率取得技術と、近年安価で活用できる次世代シークエンス解析技術を組み合わせることで、第一章で示した耐性株解析による標的推定が今以上に効率的に実施できると考える。当該株を用いたこのような技術を組み合わせた解析は、抗緑膿菌化合物セットからの抗多剤耐性緑膿菌剤の今後の開発研究を加速させるだけでなく、継続的な推進をも可能にするものである。

第三章において、黄色ブドウ球菌の増殖に必須な遺伝子を評価できる新規評価系（PI 試験系）を構築し、新規標的として有望な機能未知遺伝子を複数見出すことに成功した。当該結果と既報告結果を組み合わせることで、より信頼性の高い必須遺伝子の選抜に成功した。選抜された遺伝子の多くは幅広い菌種で保存されているが、機能未知のものがほとんどである。しかしながら、本章において PI 試験系は、相補能を指標にした機能予測におい

ても、有用であることを示した。ある機能未知必須遺伝子について、それがコードする蛋白質の機能を相補し得る既知遺伝子を、PI 試験系プラスミドをベースにした cDNA ライブラリを用いて選抜し、その結果を基に機能を予測することも可能になったと考える。当該手法は、黄色ブドウ球菌内の分子メカニズム解明、ならびに有望な標的の機能を予測させ、効率的な阻害剤獲得を可能にする強力な解析技術であると考えられる。

以上の研究を通じて、院内感染症で問題となっている多剤耐性菌に対して有効な新規抗菌剤を創出するためのシーズおよびプラットフォームを構築した。獲得・構築した抗緑膿菌化合物セット、MreB 阻害化合物、ならびに Δ*mutS*Δ*tolC* 株は、抗多剤耐性緑膿菌剤の新規創出に繋がるものである。一方、整備した黄色ブドウ球菌の増殖必須遺伝子リスト、ならびに遺伝子の増殖必須性解析および機能予測を可能にする PI 試験系は、抗多剤耐性黄色ブドウ球菌剤の新規創出に繋がるものである。これら基盤は、将来的に継続的な抗多剤耐性菌剤創出に繋がり、院内感染症の主要の耐性菌問題の根治へ貢献するものと考える。また、Δ*mutS*Δ*tolC* 株および PI 試験系の原理は、両菌種に限らず幅広く活用可能なものであり、多菌種に対する新規抗菌剤の創出、且つ細菌の分子メカニズム解析にも今後大きく貢献するものである。

結　論

1. 多剤耐性緑膿菌に対する抗菌活性が期待できる化合物セットを構築した。

2. 緑膿菌に対する有効性が期待できる MreB 阻害化合物を獲得した。

3. 標的未知抗菌化合物の標的同定を可能にさせる大腸菌Δ*mutS*Δ*tolC*株を作製した。

4. PBP2 変異株に対するβ-ラクタム系抗菌剤の効果が、1-β-メチル基の有無に依存することを明らかにした。

5. 黄色ブドウ球菌遺伝子の必須性および機能を解析するための有用な手法として PI 試験系を構築した。

6. 黄色ブドウ球菌の 28 の機能未知の増殖必須遺伝子を同定した。そのうちの SA0865 蛋白質は、黄色ブドウ球菌の NAD キナーゼ蛋白質であると推察した。

上記の結果より、阻害剤スクリーニングが可能な新規標的および合成展開により新規抗菌剤となり得る化合物セットを揃えたと共に、新規標的の機能および化合物の標的解析を可能にする大腸菌Δ*mutS*Δ*tolC*株および PI 試験系を構築し、新規抗菌剤を効率的に創出する体制を整えた。

謝　辞

本論文の執筆にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科、那須　正夫　教授に心から篤く御礼申し上げます。

本論分の執筆にあたり、熱心な御指導、御鞭撻をいただきました大阪大学大学院薬学研究科、山口　進康　准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言ならびにご協力を頂きました、第一三共株式会社　山下　誠　博士、高瀬　浩之　博士、鎌井　泰樹　博士、小野寺　宜郷　博士、村松　康範　博士、杉原　千加　研究員、辻　隼人　研究員、ならびに順天堂大学大学院医学研究科、平松　啓一　教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、様々なご協力を頂いた第一三共株式会社　安東　治　博士、玉井　馨子　博士、ならびに第一三共株式会社の関係諸氏に厚く感謝いたします。

参考文献

1. **Aeschlimann, J. R.** 2003. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Pharmacotherapy **23:**916-924.
2. **Akerley, B. J., E. J. Rubin, V. L. Novick, K. Amaya, N. Judson, and J. J. Mekalanos.** 2002. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99:**966-971.
3. **Asahi, Y., Y. Takeuchi, and K. Ubukata.** 1999. Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy **43:**1252-1255.
4. **Bae, T., A. K. Banger, A. Wallace, E. M. Glass, F. Aslund, O. Schneewind, and D. M. Missiakas.** 2004. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101:**12312-12317.
5. **Bean, G. J., S. T. Flickinger, W. M. Westler, M. E. McCully, D. Sept, D. B. Weibel, and K. J. Amann.** 2009. A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. Biochemistry **48:**4852-4857.
6. **Beinlich, K. L., R. Chuanchuen, and H. P. Schweizer.** 2001. Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS microbiology letters **198:**129-134.
7. **Blair, J. M., and L. J. Piddock.** 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. Current opinion in microbiology **12:**512-519.
8. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science **277:**1453-1462.
9. **Boe, L., M. Danielsen, S. Knudsen, J. B. Petersen, J. Maymann, and P. R. Jensen.** 2000. The frequency of mutators in populations of *Escherichia coli*. Mutation research **448:**47-55.
10. **Bolla, J. M., S. Alibert-Franco, J. Handzlik, J. Chevalier, A. Mahamoud, G. Boyer, K. Kiec-Kononowicz, and J. M. Pages.** 2011. Strategies for bypassing the membrane

barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. FEBS letters **585:**1682-1690.

11. **Brown, A. G., D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, and G. N. Rolinson.** 1976. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. The Journal of antibiotics **29:**668-669.
12. **Brown, D. R., and P. A. Pattee.** 1980. Identification of a chromosomal determinant of alpha-toxin production in *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity **30:**36-42.
13. **Chaudhuri, R. R., A. G. Allen, P. J. Owen, G. Shalom, K. Stone, M. Harrison, T. A. Burgis, M. Lockyer, J. Garcia-Lara, S. J. Foster, S. J. Pleasance, S. E. Peters, D. J. Maskell, and I. G. Charles.** 2009. Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). BMC genomics **10:**291.
14. **Chopra, I., A. J. O'Neill, and K. Miller.** 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy **6:**137-145.
15. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97:**6640-6645.
16. **Davies, T. A., W. Shang, K. Bush, and R. K. Flamm.** 2008. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy **52:**1510-1512.
17. **Denamur, E., S. Bonacorsi, A. Giraud, P. Duriez, F. Hilali, C. Amorin, E. Bingen, A. Andremont, B. Picard, F. Taddei, and I. Matic.** 2002. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Journal of bacteriology **184:**605-609.
18. **Deora, R., T. Tseng, and T. K. Misra.** 1997. Alternative transcription factor *sigmaSB* of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus sar. Journal of bacteriology **179:**6355-6359.
19. **Dubois, V., C. Arpin, M. Melon, B. Melon, C. Andre, C. Frigo, and C. Quentin.** 2001. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. Journal of clinical microbiology **39:**2072-2078.
20. **Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, and et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science **269:**496-512.
21. **Forsyth, R. A., R. J. Haselbeck, K. L. Ohlsen, R. T. Yamamoto, H. Xu, J. D. Trawick,**

D. Wall, L. Wang, V. Brown-Driver, J. M. Froelich, K. G. C, P. King, M. McCarthy, C. Malone, B. Misiner, D. Robbins, Z. Tan, Z. Y. Zhu Zy, G. Carr, D. A. Mosca, C. Zamudio, J. G. Foulkes, and J. W. Zyskind. 2002. A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. Molecular microbiology **43:**1387-1400.

22. **Freiberg, C., H. P. Fischer, and N. A. Brunner.** 2005. Discovering the mechanism of action of novel antibacterial agents through transcriptional profiling of conditional mutants. Antimicrobial agents and chemotherapy **49:**749-759.
23. **Gales, A. C., H. S. Sader, S. S. Andrade, L. Lutz, A. Machado, and A. L. Barth.** 2006. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. International journal of antimicrobial agents **27:**300-302.
24. **Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, J. W. Campbell, G. Balazsi, E. Ravasz, M. D. Daugherty, A. L. Somera, N. C. Kyrpides, I. Anderson, M. S. Gelfand, A. Bhattacharya, V. Kapatral, M. D'Souza, M. V. Baev, Y. Grechkin, F. Mseeh, M. Y. Fonstein, R. Overbeek, A. L. Barabasi, Z. N. Oltvai, and A. L. Osterman.** 2003. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. Journal of bacteriology **185:**5673-5684.
25. **Giamarellou, H.** 2010. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. International journal of antimicrobial agents **36 Suppl 2:**S50-54.
26. **Gitai, Z., N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi, and L. Shapiro.** 2005. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. Cell **120:**329-341.
27. **Gupta, V.** 2008. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Expert opinion on investigational drugs **17:**131-143.
28. **Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, H. Labischinski, and K. Hiramatsu.** 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. The Journal of antimicrobial chemotherapy **42:**199-209.
29. **Hedge, P. J., and B. G. Spratt.** 1985. Amino acid substitutions that reduce the affinity of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* for cephalexin. European journal of biochemistry / FEBS **151:**111-121.
30. **Herrera, G., V. Aleixandra, A. Urios, and M. Blanco.** 1993. Quinolone action in *Escherichia coli* cells carrying *gyrA* and *gyrB* mutations. FEMS microbiology letters **106:**187-191.
31. **Hinz, A., S. Lee, K. Jacoby, and C. Manoil.** 2011. Membrane proteases and

aminoglycoside antibiotic resistance. Journal of bacteriology **193:**4790-4797.

32. **Horii, T., S. Ichiyama, M. Ohta, and M. Kobayashi.** 1999. Relationship between morphological changes and endotoxin release induced by carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of medical microbiology **48:**309-315.

33. **Horst, J. P., T. H. Wu, and M. G. Marinus.** 1999. *Escherichia coli* mutator genes. Trends in microbiology **7:**29-36.

34. **Iwai, N., K. Nagai, and M. Wachi.** 2002. Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. Bioscience, biotechnology, and biochemistry **66:**2658-2662.

35. **Ji, Y., B. Zhang, S. F. Van, Horn, P. Warren, G. Woodnutt, M. K. Burnham, and M. Rosenberg.** 2001. Identification of critical *staphylococcal* genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. Science **293:**2266-2269.

36. **Jones, R. N., H. K. Huynh, and D. J. Biedenbach.** 2004. Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. Antimicrobial agents and chemotherapy **48:**3136-3140.

37. **Kobayashi, K., S. D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K. K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai, S. Ashikaga, S. Aymerich, P. Bessieres, F. Boland, S. C. Brignell, S. Bron, K. Bunai, J. Chapuis, L. C. Christiansen, A. Danchin, M. Debarbouille, E. Dervyn, E. Deuerling, K. Devine, S. K. Devine, O. Dreesen, J. Errington, S. Fillinger, S. J. Foster, Y. Fujita, A. Galizzi, R. Gardan, C. Eschevins, T. Fukushima, K. Haga, C. R. Harwood, M. Hecker, D. Hosoya, M. F. Hullo, H. Kakeshita, D. Karamata, Y. Kasahara, F. Kawamura, K. Koga, P. Koski, R. Kuwana, D. Imamura, M. Ishimaru, S. Ishikawa, I. Ishio, D. Le Coq, A. Masson, C. Mauel, R. Meima, R. P. Mellado, A. Moir, S. Moriya, E. Nagakawa, H. Nanamiya, S. Nakai, P. Nygaard, M. Ogura, T. Ohanan, M. O'Reilly, M. O'Rourke, Z. Pragai, H. M. Pooley, G. Rapoport, J. P. Rawlins, L. A. Rivas, C. Rivolta, A. Sadaie, Y. Sadaie, M. Sarvas, T. Sato, H. H. Saxild, E. Scanlan, W. Schumann, J. F. Seegers, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, M. Simon, P. Stragier, R. Studer, H. Takamatsu, T. Tanaka, M. Takeuchi, H. B. Thomaides, V. Vagner, J. M. van Dijl, K. Watabe, A. Wipat, H. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Yamamoto, K. Yamane, K. Yata, K. Yoshida, H. Yoshikawa, U. Zuber, and N. Ogasawara.** 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100:**4678-4683.

38. **Koga, T., C. Sugihara, M. Kakuta, N. Masuda, E. Namba, and T. Fukuoka.** 2009. Affinity of Tomopenem (CS-023) for penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and

chemotherapy **53:**1238-1241.

39. **Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechere.** 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular microbiology **23:**345-354.

40. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet **357:**1225-1240.

41. **Le Thomas, I., G. Couetdic, O. Clermont, N. Brahimi, P. Plesiat, and E. Bingen.** 2001. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. The Journal of antimicrobial chemotherapy **48:**553-555.

42. **Lewis, K.** 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nature reviews. Drug discovery **12:**371-387.

43. **Livermore, D. M., A. M. Sefton, and G. M. Scott.** 2003. Properties and potential of ertapenem. The Journal of antimicrobial chemotherapy **52:**331-344.

44. **Lomovskaya, O., A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V. J. Lee.** 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy **43:**1340-1346.

45. **Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, and V. J. Lee.** 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy **45:**105-116.

46. **Macia, M. D., D. Blanquer, B. Togores, J. Sauleda, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. Antimicrobial agents and chemotherapy **49:**3382-3386.

47. **Mahamoud, A., J. Chevalier, S. Alibert-Franco, W. V. Kern, and J. M. Pages.** 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. The Journal of antimicrobial chemotherapy **59:**1223-1229.

48. **Mao, W., M. S. Warren, A. Lee, A. Mistry, and O. Lomovskaya.** 2001. MexXY-OprM

efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy **45:**2001-2007.

49. **Masuda, N., and G. M. Church.** 2002. *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. Journal of bacteriology **184:**6225-6234.
50. **Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino.** 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy **44:**3322-3327.
51. **Matsuo, M., K. Kurokawa, B. L. Lee, and K. Sekimizu.** 2010. Shuttle vectors derived from pN315 for study of essential genes in *Staphylococcus aureus*. Biological & pharmaceutical bulletin **33:**198-203.
52. **Matsuyama, S., T. Tajima, and H. Tokuda.** 1995. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. The EMBO journal **14:**3365-3372.
53. **Maxwell, A.** 1997. DNA gyrase as a drug target. Trends in microbiology **5:**102-109.
54. **Mine, T., Y. Morita, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy **43:**415-417.
55. **Misra, R., and V. N. Bavro.** 2009. Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. Biochimica et biophysica acta **1794:**817-825.
56. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and molecular biology reviews **67:**593-656.
57. **O'Neill, A. J., J. H. Cove, and I. Chopra.** 2001. Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in *Staphylococcus aureus*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **47:**647-650.
58. **Okuda, S., and H. Tokuda.** 2011. Lipoprotein sorting in bacteria. Annual review of microbiology **65:**239-259.
59. **Okumura, R., T. Hirata, Y. Onodera, K. Hoshino, T. Otani, and T. Yamamoto.** 2008. Dual-targeting properties of the 3-aminopyrrolidyl quinolones, DC-159a and sitafloxacin, against DNA gyrase and topoisomerase IV: contribution to reducing in vitro emergence of quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **62:**98-104.
60. **Pages, J. M., C. E. James, and M. Winterhalter.** 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nature reviews. Microbiology **6:**893-903.
61. **Pai, H., J. Kim, J. H. Lee, K. W. Choe, and N. Gotoh.** 2001. Carbapenem resistance

mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy **45:**480-484.

62. **Pathania, R., S. Zlitni, C. Barker, R. Das, D. A. Gerritsma, J. Lebert, E. Awuah, G. Melacini, F. A. Capretta, and E. D. Brown.** 2009. Chemical genomics in *Escherichia coli* identifies an inhibitor of bacterial lipoprotein targeting. Nature chemical biology **5:**849-856.

63. **Payne, D. J., M. N. Gwynn, D. J. Holmes, and D. L. Pompliano.** 2007. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. Nature reviews. Drug discovery **6:**29-40.

64. **Perry, C. M., and T. Ibbotson.** 2002. Biapenem. Drugs **62:**2221-2234; discussion 2235.

65. **Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino.** 1996. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular microbiology **21:**713-724.

66. **Poole, K., K. Krebes, C. McNally, and S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. Journal of bacteriology **175:**7363-7372.

67. **Remans, K., K. Pauwels, P. van Ulsen, L. Buts, P. Cornelis, J. Tommassen, S. N. Savvides, K. Decanniere, and P. Van Gelder.** 2010. Hydrophobic surface patches on LolA of *Pseudomonas aeruginosa* are essential for lipoprotein binding. Journal of molecular biology **401:**921-930.

68. **Renau, T. E., R. Leger, E. M. Flamme, J. Sangalang, M. W. She, R. Yen, C. L. Gannon, D. Griffith, S. Chamberland, O. Lomovskaya, S. J. Hecker, V. J. Lee, T. Ohta, and K. Nakayama.** 1999. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. Journal of medicinal chemistry **42:**4928-4931.

69. **Robertson, G. T., T. B. Doyle, Q. Du, L. Duncan, K. E. Mdluli, and A. S. Lynch.** 2007. A Novel indole compound that inhibits *Pseudomonas aeruginosa* growth by targeting MreB is a substrate for MexAB-OprM. Journal of bacteriology **189:**6870-6881.

70. **Rodriguez-Aranda, A., M. Daskalaki, J. Villar, F. Sanz, J. R. Otero, and F. Chaves.** 2009. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. Diagnostic microbiology and infectious disease **63:**398-402.

71. **Sato, K., K. Hoshino, M. Tanaka, I. Hayakawa, and Y. Osada.** 1992. Antimicrobial activity of DU-6859, a new potent fluoroquinolone, against clinical isolates.

Antimicrobial agents and chemotherapy **36:**1491-1498.

72. **Silver, L. L.** 2011. Challenges of antibacterial discovery. Clinical microbiology reviews **24:**71-109.

73. **Spratt, B. G.** 1978. *Escherichia coli* resistance to beta-lactam antibiotics through a decrease in the affinity of a target for lethality. Nature **274:**713-715.

74. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrock-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature **406:**959-964.

75. **Strateva, T., and D. Yordanov.** 2009. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. Journal of medical microbiology **58:**1133-1148.

76. **Takahashi, Y., and U. Tokumoto.** 2002. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. The Journal of biological chemistry **277:**28380-28383.

77. **Thanassi, J. A., S. L. Hartman-Neumann, T. J. Dougherty, B. A. Dougherty, and M. J. Pucci.** 2002. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic acids research **30:**3152-3162.

78. **Tsuji, M., Y. Ishii, A. Ohno, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi.** 1998. In vitro and in vivo antibacterial activities of S-4661, a new carbapenem. Antimicrobial agents and chemotherapy **42:**94-99.

79. **Une, T., T. Fujimoto, K. Sato, and Y. Osada.** 1988. In vitro activity of DR-3355, an optically active ofloxacin. Antimicrobial agents and chemotherapy **32:**1336-1340.

80. **van den Ent, F., L. A. Amos, and J. Lowe.** 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. Nature **413:**39-44.

81. **Welte, T., and M. W. Pletz.** 2010. Antimicrobial treatment of nosocomial meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: current and future options. International journal of antimicrobial agents **36:**391-400.

82. **Westbrock-Wadman, S., D. R. Sherman, M. J. Hickey, S. N. Coulter, Y. Q. Zhu, P. Warrener, L. Y. Nguyen, R. M. Shawar, K. R. Folger, and C. K. Stover.** 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. Antimicrobial agents and chemotherapy **43:**2975-2983.

83. **Wilding, E. I., J. R. Brown, A. P. Bryant, A. F. Chalker, D. J. Holmes, K. A. Ingraham, S. Iordanescu, C. Y. So, M. Rosenberg, and M. N. Gwynn.** 2000. Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. Journal of bacteriology **182:**4319-4327.

84. **Wise, R., J. M. Andrews, and L. J. Edwards.** 1983. In vitro activity of Bay 09867, a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy **23:**559-564.

85. **Yang, Y., N. Bhachech, and K. Bush.** 1995. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. The Journal of antimicrobial chemotherapy **35:**75-84.

86. **Yokochi, T., K. Narita, A. Morikawa, K. Takahashi, Y. Kato, T. Sugiyama, N. Koide, M. Kawai, M. Fukada, and T. Yoshida.** 2000. Morphological change in *Pseudomonas aeruginosa* following antibiotic treatment of experimental infection in mice and its relation to susceptibility to phagocytosis and to release of endotoxin. Antimicrobial agents and chemotherapy **44:**205-206.

87. **Zapun, A., C. Contreras-Martel, and T. Vernet.** 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. FEMS microbiology reviews **32:**361-385.

88. **Ziha-Zarifi, I., C. Llanes, T. Kohler, J. C. Pechere, and P. Plesiat.** 1999. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrobial agents and chemotherapy **43:**287-291.