

Title	創薬ターゲットとしての細菌異物排出トランスポーター
Author(s)	山崎, 聖司
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52262
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (山崎 聖司)

論文題名

創薬ターゲットとしての細菌異物排出トランスポーター

抗菌薬が効かない薬剤耐性菌の歴史は、人類と細菌の戦いの歴史そのものである。抗菌薬を開発すると新たな耐性菌が出現するという‘いたちごっこ’が続いてきたが、近年になって人類はこの戦いに負けつつある。実際に、新規抗菌薬の開発・承認数は年々減少している。細菌の薬剤耐性機構のうち、特に異物排出トランスポーターは、様々な抗菌薬を排出し、単独で多剤耐性化を引き起こすことで注目されている。しかしながら、その生理的役割・発現制御機構・タンパク構造については未だ不明な部分が多い。そこで本研究では、異物排出トランスポーターと自然抵抗性の関係、および新規発現制御因子の同定とその制御機構の解析を行った。さらには、当トランスポーターの構成・阻害剤結合構造を解明することで、新規ユニバーサル阻害剤を開発するための分子基盤の構築を目指した。

グラム陰性菌の自然抵抗性は、主に異物排出トランスポーターと外膜障壁によるものであるが、両者の関連性については分かっていなかったため、サルモネラが唯一、恒常的に発現している異物排出トランスポーターAcrBとリポ多糖 (LPS) の関係について調べた。解析の結果、LPSの長さ・枝分かれが失われるごとに自然抵抗性が低下する一方、AcrBはLPSが異常な状態でも機能を保っていた。また、AcrBの過剰発現はLPS欠損分の耐性を完全には補うことができず、自然抵抗性の維持には、異物排出トランスポーターと外膜障壁の両方が不可欠であることが明らかとなった。

一部の菌株はバイオフィルムを形成し、抗菌薬の浸透を妨げることで自然抵抗性を上昇させる。近年、異物排出トランスポーターとバイオフィルムの関連性についての研究が盛んに行われているが、研究グループごとに主張が異なっている。そこで、これまでに着目されていない経時的な解析を行った結果、大腸菌トランスポーターAcrB・MdtBCが、バイオフィルムの初期の産生過程ではなく、その維持に寄与していることが明らかとなった。バイオフィルムの研究では、経時的観測などの測定条件が特に重要であり、研究グループごとに結果が異なっていたのも、測定方法にばらつきがあったためと考えられる。

発現制御機構の解析では、多数の遺伝子欠損株を用いたスクリーニングによって、新規耐性因子の探索を行った。本研究で注目したHfqは、small RNA (sRNA) を介して様々な遺伝子の翻訳調節を行うRNAシャペロンであり、病原性への関与が報告されている。解析の結果、大腸菌Hfq欠損株は多剤に感受性化し、薬剤排出能の低下も示唆された。実際に、Hfqは各異物排出トランスポーター遺伝子の転写には影響を与えないものの、恒常的に発現しているAcrBの翻訳調節を行っていた。Hfqは病原性発現に加え、多剤耐性化にも寄与し、感染過程の重要な因子であることが示された。

HfqのようなRNAシャペロンの作用で標的mRNAと結合し、翻訳調節を行っているのがsRNAである。最も研究が進んでいる細菌sRNAであるDsrAは、RpoSのmRNAに結合し、シグマ因子の合成を促進することが知られている。解析の結果、大腸菌DsrA過剰発現株が多剤耐性を獲得し、薬剤排出能の向上も示され、実際に異物排出トランスポーターMdtFの転写量が上昇していた。さらに、MdtF・RpoS欠損株では、DsrAによる多剤耐性化が起きず、DsrAはRpoSを介してMdtFの転写を促進することを明らかにした。Hfq同様、病原性と薬剤耐性に関与する重要な因子であることが分かった。

異物排出トランスポーターの構成・構造解析では、最も高度な耐性化を引き起こすRND型トランスポーターに着目した。サルモネラのRND型トランスポーター遺伝子は、通常同じオペロン上に、その機能に必要な膜融合タンパク質 (MFP) もコードしているが、AcrD遺伝子近傍にのみMFP遺伝子がない。そこで、恒常的に発現しているRND型排出システムAcrB-TolCに着目し、この機能に必要なMFPであるAcrAまたは外膜タンパク質TolC欠損株を作製した。これら欠損株では、AcrD過剰発現による多剤耐性化が全く起きず、AcrDが機能するにはAcrAとTolCが必要であることが明らかとなった。AcrAは異なる排出システム間で共通の役割を果たしており、重要な創薬ターゲットとなる可能性を示した。

これら異物排出トランスポーターの阻害剤開発には多くの努力が傾けられたが、未だに臨床的に有効なものはいまだに得られていない。大腸菌AcrBを阻害するABI-PPは、緑膿菌MexBも阻害できるが、多剤耐性緑膿菌のもう1つの有力な原因であるMexYを阻害できず、治療薬にはならなかった。そこで、当研究室において共結晶解析を行った結果、ABI-PPはトランスポーターの基質輸送経路から分岐した狭い領域に突き刺さっており、阻害剤ピットの存在が示唆された。さらに、AcrB・MexBの阻害剤ピット中央にあるフェニルアラニン（F178）が、MexYではトリプトファン（W177）になっており、その大きな側鎖による立体障害でABI-PPが結合できなくなっていると考えられた。実際に、AcrB_F178W変異体はABI-PPの阻害を受けなくなり、MexY_W177F変異体は逆に阻害されるようになった。一方、MexB_F178W変異体は依然として阻害されていたが、共結晶解析の結果、MexBの阻害剤ピットには少し余裕があり、トリプトファン変異が影響しないことが示された。そこで、ピット内のスペースを少し増やしたAcrB_F178W/V139A変異体、MexY_I138A変異体を構築したところ、トリプトファンがあるにも関わらず阻害を受けるようになり、ABI-PPに対する感受性は、ピット内の立体障害によって決まることが示された。

現在は上記の結果を踏まえ、構造情報を利用した新規阻害剤の探索も進めている。これまでに、ABI-PPが効かないMexYにも効果がある、新たな化合物を複数得ている。これまでの研究成果から、異物排出トランスポーターに着目した分子標的薬は、細菌の獲得耐性や病原性発現を抑えるだけでなく、自然抵抗性の低下やバイオフィーム形成の抑制等の効果も期待できるため、多剤耐性菌克服の切り札となり得る。今後の研究で耐性菌感染症の治療薬が開発されれば、当分野において分子標的創薬という新たな創薬アプローチのモデルを示すこととなり、新薬開発の迅速化にも大きく寄与できると考えている。今後も研究・新薬開発を続け、耐性菌感染症の早期克服を目指したい。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 崎 聖 司)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 准教授 西 毅
	副 査 教 授 那須 正夫
	副 査 教 授 土井 健史
	副 査 教 授 高木 達也

論文審査の結果の要旨

抗菌薬での治療が困難な薬剤耐性菌は、人類が新たな抗菌薬を開発する度に出現し、臨床現場で大きな問題となってきたが、近年では、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）や多剤耐性緑膿菌（MDRP）など、複数の抗菌薬が効かない多剤耐性菌による院内感染が各地に広がりを見せており、状況はより深刻なものとなっている。異物排出トランスポーターは、単独で多くの薬剤を排出して多剤耐性化を引き起こすことから、有力な創薬ターゲットとして期待されているが、その機能や構造については未だ不明な部分が多い。そこで本研究では、異物排出トランスポーターの自然抵抗性における役割、新規発現制御機構、構成成分および阻害剤結合構造の解明を試み、以下の結果を得た。

1. LPSの長さまたは枝分かれが失われるごとに、グラム陰性菌の薬剤自然抵抗性が低下していくこと、異物排出トランスポーターと外膜障壁の両方が、正常な薬剤自然抵抗性の維持に不可欠であることを証明した。
2. これまでに着目されていない経時的観測を行うことで、大腸菌異物排出トランスポーターAcrBおよびMdtBCが、バイオフィルムの産生過程ではなく、その維持に寄与していることを明らかにした。
3. 病原因子として知られていたRNAシャペロンHfqが、大腸菌異物排出トランスポーターAcrBの翻訳調節を行うことで、細菌の多剤耐性化にも関与していることを明らかにした。
4. 病原性発現に関与するsRNAであるDsrAが、RpoS（シグマ因子 σ^S ）を介して大腸菌異物排出トランスポーターMdtFの転写を促進することで、多剤耐性化を引き起こすことを明らかにした。
5. サルモネラRND型異物排出トランスポーターAcrDは、AcrAを膜融合タンパク質として利用することを明らかにし、別のトランスポーターAcrBの機能にも必要であるAcrAが、重要な創薬ターゲットとなる可能性を示した。
6. 異物排出トランスポーターの阻害剤感受性は、阻害剤結合部位周辺のアミノ酸による、ごくわずかな立体障害によって決まることを示し、新規ユニバーサル阻害剤を開発するための分子基盤の構築に成功した。

以上、本研究より、異物排出トランスポーターが薬剤自然抵抗性およびバイオフィルムの維持にも寄与していることが明らかとなり、これまで考えられていた以上に多面的な作用を有す創薬ターゲットであることが示された。また、既知の病原因子が、異物排出トランスポーターを介して多剤耐性化を引き起こすことが示され、複雑な発現制御機構が明らかとなった。さらには、阻害剤結合部位の立体障害の有無によって、異物排出トランスポーターの阻害剤感受性が決まることが明らかとなり、この立体障害を回避する形の化合物を設計することで、既存の阻害剤が効かない異物排出トランスポーターにも効果がある、ユニバーサルな阻害剤の開発が可能となった。

よって本論文は、異物排出トランスポーターの新たな生理機能や調節機構を明らかにすることに成功しただけではなく、多剤耐性菌克服の切り札となり得る異物排出トランスポーター阻害剤の開発に大きく貢献し、当分野において分子標的創薬という新たな創薬への道を示すものであり、極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。