

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

博士學位論文

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

学位申請者

大阪大学大学院薬学研究科・創成薬学専攻・細胞生物学分野
大阪大学産業科学研究所・第3研究部門・生体分子制御科学研究分野

山崎 聖司

2015年3月

主論文

1. Junko Yamada, **Seiji Yamasaki** (**The first two authors contributed equally**), Hidetada Hirakawa, Mitsuko Hayashi-Nishino, Akihito Yamaguchi and Kunihiko Nishino. Impact of the RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; **65**: 853-858.
2. Kunihiko Nishino, **Seiji Yamasaki**, Mitsuko Hayashi-Nishino and Akihito Yamaguchi. Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; **66**: 291-296.
3. **Seiji Yamasaki**, Saya Nagasawa, Mitsuko Hayashi-Nishino, Akihito Yamaguchi and Kunihiko Nishino. AcrA dependency of the AcrD efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of Antibiotics* 2011; **64**: 433-437.
4. **Seiji Yamasaki**, Saya Nagasawa, Aiko Fukushima, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino. Cooperation of the multidrug efflux pump and lipopolysaccharides in the intrinsic antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68**: 1066-1070.
5. Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, **Seiji Yamasaki**, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* 2013; **500**: 102-106.
6. **Seiji Yamasaki**, Li-yuan Wang, Takahiro Hirata, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino. Multidrug efflux pumps contribute to *Escherichia coli* biofilm maintenance. *International Journal of Antimicrobial Agents* in press (DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.005).

参考論文

1. Kunihiko Nishino, **Seiji Yamasaki**, Mitsuko Hayashi-Nishino and Akihito Yamaguchi. Effect of NlpE Overproduction on Multidrug Resistance in *Escherichia coli*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 2010; **54**: 2239-2243.
2. Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, **Seiji Yamasaki**, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* 2011; **480**: 565-569.
3. **Seiji Yamasaki**, Tomoyuki Nakano, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino. Role of multidrug efflux pumps of *Salmonella* in resistance to polymyxin B. in preparation.

目次

緒論	6
第一章 薬剤自然抵抗性における異物排出トランスポーターと LPS の関係	10
第 1 節 諸言	12
第 2 節 方法	13
2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件	13
2-2. 最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定	14
第 3 節 結果	15
3-1. 自然抵抗性における LPS の長さや枝分かれの効果	15
3-2. <i>acrB</i> 遺伝子欠損が LPS 変異体の自然抵抗性に及ぼす影響	16
3-3. AcrB 過剰発現が LPS 変異体の多剤耐性に及ぼす影響	16
第 4 節 考察	17
第二章 バイオフィーム産生・維持における異物排出トランスポーターの役割	20
第 1 節 諸言	22
第 2 節 方法	23
2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件	23
2-2. バイオフィームおよび増殖度合の測定	24
第 3 節 結果	24
3-1. 異物排出トランスポーターとバイオフィームとの間の相互作用	24
3-2. バイオフィーム形成における AcrAB および MdtABC の役割	25
第 4 節 考察	26

第三章	大腸菌多剤耐性化における RNA シャペロン Hfq の役割	28
第 1 節	諸言	30
第 2 節	方法	30
2-1.	菌株・プラスミドおよび培養条件	30
2-2.	最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定	31
2-3.	大腸菌細胞内における薬剤蓄積度合の観察	31
2-4.	レポーターアッセイ	32
2-5.	タンパク質定量	32
第 3 節	結果	32
3-1.	大腸菌の薬剤感受性における Hfq の効果	32
3-2.	大腸菌内部への薬剤蓄積における Hfq と異物排出システムの関係	33
3-3.	Hfq による異物排出システムの発現制御	34
第 4 節	考察	36
第四章	大腸菌多剤耐性化における small RNA (sRNA) DsrA の役割	38
第 1 節	諸言	40
第 2 節	方法	40
2-1.	菌株・プラスミドおよび培養条件	40
2-2.	最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定	41
2-3.	大腸菌細胞内における薬剤蓄積度合の観察	42
2-4.	定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR: quantitative real-time PCR)	42
第 3 節	結果	42
3-1.	大腸菌の多剤耐性における DsrA の役割	42
3-2.	大腸菌内部への薬剤蓄積における DsrA の役割	43
3-3.	異物排出トランスポーターと DsrA の関係	44
3-4.	DsrA による異物排出トランスポーター遺伝子の転写制御	44
3-5.	DsrA を介した多剤耐性化に関与する因子	45
第 4 節	考察	46

第五章	サルモネラ異物排出トランスポーターAcrDの機能におけるAcrAの役割	48
第1節	諸言	50
第2節	方法	51
2-1.	菌株・プラスミドおよび培養条件	51
2-2.	最小発育阻止濃度（MIC: minimum inhibitory concentration）測定	52
第3節	結果	52
3-1.	多剤耐性におけるAcrD過剰発現の効果	52
3-2.	AcrAB-TolCシステムの構成成分とAcrDの関係	53
3-3.	各遺伝子欠損株に対するAcrA過剰発現の効果	53
3-4.	各遺伝子欠損株に対するAcrDおよびAcrA共発現の効果	54
第4節	考察	55
第六章	異物排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明	58
第1節	諸言	60
第2節	方法	60
2-1.	菌株・プラスミドおよび培養条件	60
2-2.	最小発育阻止濃度（MIC: minimum inhibitory concentration）測定	61
2-3.	増殖曲線測定	62
2-4.	ドキシソルビシン蛍光を利用した排出活性測定	62
2-5.	UPLC-MS/MSを用いた排出活性測定	62
第3節	結果	63
3-1.	阻害剤ABI-PPの結合様式とその阻害メカニズムの解析	63
3-2.	変異導入による阻害剤結合ピット中央部分のアミノ酸の解析	64
3-3.	阻害剤結合ピット内部における立体障害の解析	67
第4節	考察	68

総括	70
引用文献	72
謝辞	78

緒論

薬剤耐性の歴史と現在の状況

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。抗菌薬の発見以来、人類が新たな抗菌薬を開発すると、その薬に対してまた新たな耐性菌が出現するという‘いたちごっこ’が 20 世紀半ばから続いてきたが、近年、多数の抗菌薬に対して耐性を獲得した多剤耐性菌の出現によって、人類はこの戦いに負けつつある。治療期間の短さや耐性菌の出現で収益率が低くなり、製薬会社が抗菌薬開発から相次いで撤退している。実際に、新たなクラスの抗菌薬はこの 10 年で 1 つも開発されておらず、新規抗菌薬全体の開発・承認数も年々減少している¹。その影響は、多剤耐性菌感染症に対する治療手段の減少という形で臨床現場に現れ、多くの犠牲者を伴う院内感染が各地で広がっている。特に近年では、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) などによる、化学療法が非常に困難な耐性菌感染症が多発しており、状況はますます深刻になってきている。現状の対策としては、各医療機関で限られた人員を割いて対策チームを立ち上げ、抗菌薬の適正使用の監視等によって耐性菌の出現を予防するしかない。

薬剤耐性化のメカニズム

細菌が薬剤耐性を獲得する機構としては、①作用点の突然変異による薬剤親和性の低下、②修飾酵素・分解酵素による薬剤の不活性化、③細胞膜周辺構造の変化による薬剤透過性の低下、④異物排出トランスポーターによる薬剤の能動的排出などが知られている (図 1)。多くの場合、これらの要因が複雑に絡み合った結果として多剤耐性がもたらされるが、異物排出トランスポーターは様々な抗菌薬を認識・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²。

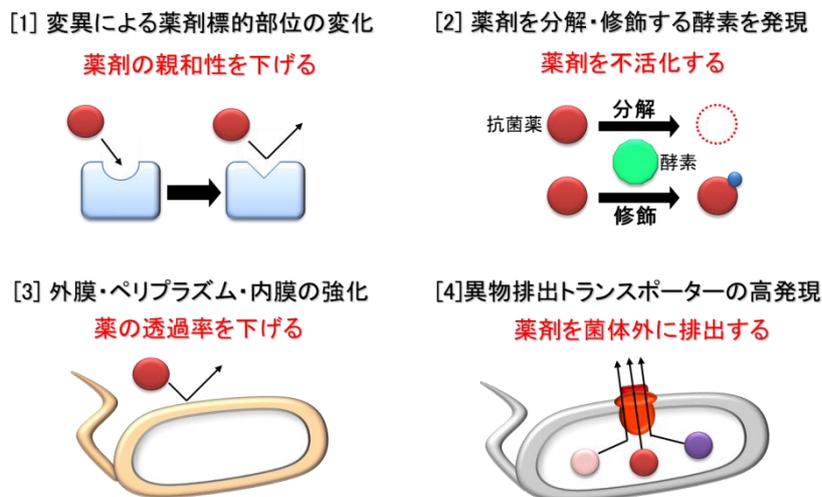


図 1. 細菌の薬剤耐性化機構

異物排出トランスポーター

異物排出トランスポーターは全ての細菌のゲノムに元々備わっているものと、プラスミドにコードされているものが存在しており、当研究室では、様々な種類の細菌が数多くの異物排出トランスポーターを保持していることを明らかにしてきた (図2)^{3,4}。また、当トランスポーターが薬剤耐性だけでなく、病原性にも関与していることが分かってきており⁴、細菌の薬剤耐性と病原性の両方を抑える重要な創薬ターゲットとして期待されている。

これらの異物排出トランスポーターは、その構造およびエネルギー共役機構の違いによって、大きく5つのファミリーに分類される。① ATPの加水分解をエネルギーとして異物を排出する「ABC (ATP binding cassette) 型」、② TolC等の外膜チャンネルおよびペリプラズム空間に存在する膜融合タンパク質と三者複合体を形成するプロトン駆動の「RND (resistance nodulation cell-division) 型」、③プロトン駆動型で最も主要なファミリーである「MFS (major facilitator superfamily) 型」、④ 4回膜貫通構造をもつプロトン駆動の「SMR (small multidrug resistance) 型」、⑤ MFS型とは相同性がなく、ナトリウムもしくはプロトンを駆動力とする「MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 型」の5つである⁵。以降、細胞膜(グラム陰性菌においては内膜)に存在し、排出過程において最も重要な異物認識を行うタンパク質を異物排出トランスポーター、外膜チャンネル・膜融合タンパク質・異物排出トランスポーターで構成される三者複合体全体を異物排出システムと呼ぶ。

このうちRNDファミリーは、その基質認識の幅広さと強力な排出能力によって、最も高度な多剤耐性化を引き起こすことが知られている³。大腸菌、サルモネラにおいては、RND型異物排出トランスポーターAcrBが、獲得耐性と細菌が元々持っている薬剤自然抵抗性の両方に関与し、他菌種においても多数ホモログが存在することから特に注目されている。

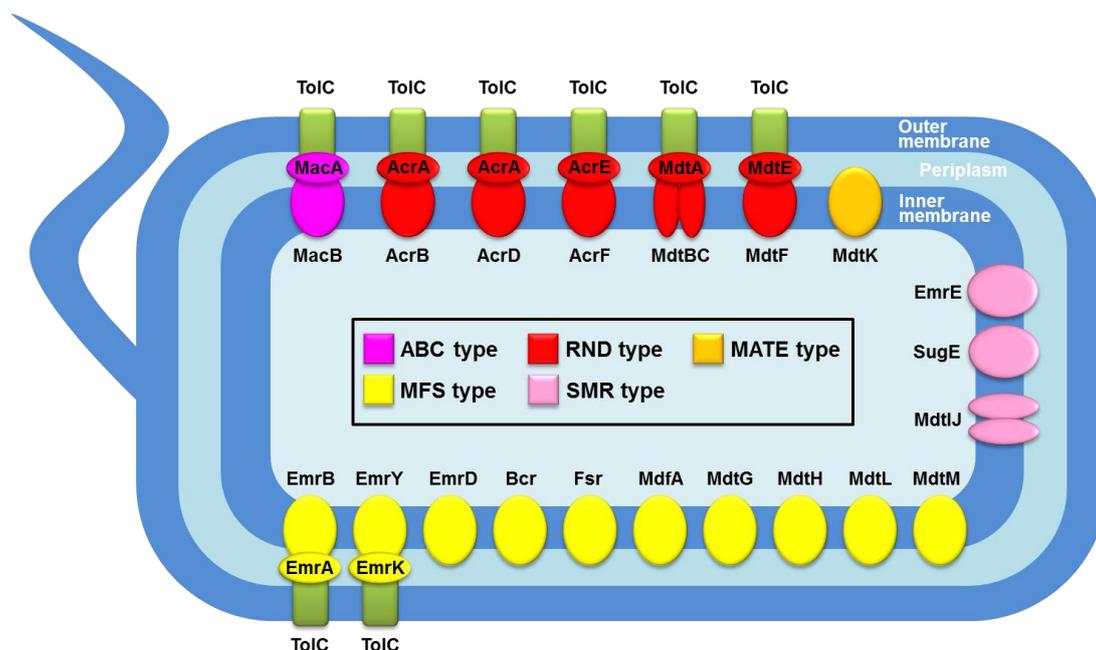


図2. 大腸菌が保持する20種の異物排出トランスポーター

これまでの異物排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析の結果より、AcrB が access・binding・extrusion モノマーからなる三量体を形成していることが明らかとなった^{2,6}。また、基質との共結晶構造情報から、AcrB は基質結合ポケットで薬剤を認識し、物理的な回転を伴わずに3つのモノマーの連動した構造変化によってその機能のみを循環させる「機能的回転」によって、薬剤を排出することが分かっている⁶。さらに、自らの修士課程における研究として、薬剤は、異物排出トランスポーター内部の基質輸送経路上に存在する近位ポケット (proximal pocket) と遠位ポケット (distal pocket) という2つの基質結合ポケットを順に通過し、その後菌体外に排出されるという蠕動機構 (Peristaltic Mechanism) の存在を明らかにし (図3) 参考論文²、異物排出トランスポーターの薬剤輸送機構の全体像が見えてきた。

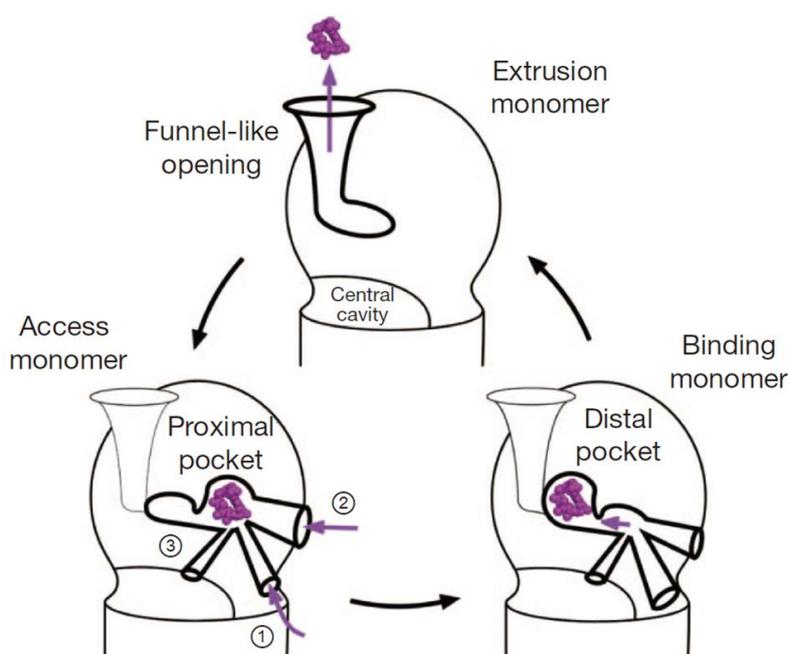


図3. 異物排出トランスポーターの蠕動機構 (Peristaltic Mechanism)

本研究の目的

しかしながら、異物排出トランスポーターの生理的役割・発現制御機構・タンパク構造の詳細については未だ不明な部分が多く、臨床的に有効な阻害剤もまだ得られていない^{7,8}。そこで本研究では、細菌の多剤耐性化機構の総合的解明とその克服に向け、異物排出トランスポーターと自然抵抗性に関わるリポ多糖 (LPS)・バイオフィルムの関係、および異物排出トランスポーター新規発現制御因子の同定とその発現制御機構の解析を行った。さらには、異物排出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、既存の阻害剤が効かない異物排出トランスポーターも阻害できる、ユニバーサルな新規阻害剤を開発するための分子基盤の構築を目指した。

第一章

薬剤自然抵抗性における 異物排出トランスポーターと **LPS** の関係

第1節 諸言

グラム陰性菌に元々備わっている薬剤自然抵抗性は、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ことが分かっている^{4, 9-11}。これまでに、胃腸炎から菌血症・腸チフスに至るまで、ヒトに様々な疾患を引き起こす病原体であるサルモネラは、10種の異物排出トランスポーターを有することが示されている(AcrB、AcrD、AcrF、MdtBC、MdsB、EmrB、MdfA、MdtK、MacB、SmvA)^{4, 12}。これらのうち、通常培養条件下で恒常的に発現しているのは、AcrBのみであることが明らかとなった⁴。

一方、外膜の表面に存在するリポ多糖(LPS)は、疎水性薬剤の菌体内への侵入を防ぐことが知られている¹³。LPS分子はLipid A、コア多糖、O抗原の3つで構成され(図1-1)、Lipid AはLPSを細菌の外膜に固定する役割を持ち、コア多糖とO抗原はLPS分子の外側の領域に位置する。これまでに、LPSの合成と修飾に必要な多くの遺伝子が同定されている(図1-1)¹³。

しかしながら、幅広い薬剤に対する自然抵抗性を同じように生み出している異物排出トランスポーターと外膜障壁が、その機能を発揮する際にお互いに関連しているかどうかは詳細に調べられておらず、ほとんど分かっていない。そこで本研究では、様々なLPS長を有する変異体を用いて薬剤自然抵抗性を調べるとともに、サルモネラの薬剤自然抵抗性における異物排出トランスポーターAcrBとLPSの関係を明らかにすることを目指した。

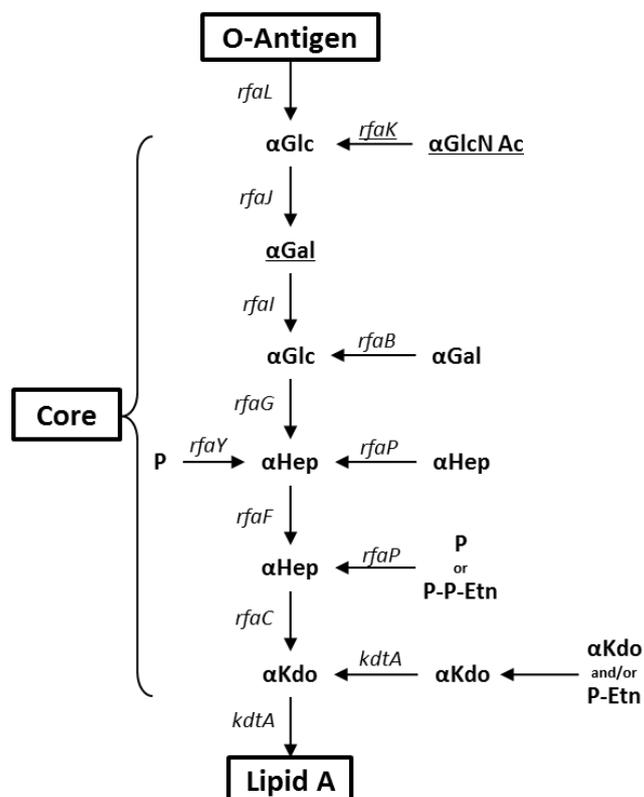


図 1-1. サルモネラの LPS 構造および合成酵素

第2節 方法

2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件

サルモネラ野生株として *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028s 株¹⁴を使用し、その他の菌株は ATCC14028s 株を親株として、Datsenko らの方法により構築した¹⁵。本章で使用した菌株およびプラスミドを、表 1-1 に示す。長期保存する菌株は、10% skim milk 溶液に保存して -80°C で保存した。長期保存するプラスミドは、滅菌 Milli-Q 水に溶解して -30°C で保存した。菌株は、LB 培地 (Difco™ LB broth, Miller: 1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.0% NaCl)¹⁶ を用いて 37°C で培養した。

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strain		
ATCC 14028s	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium wild-type	Fields <i>et al.</i> (1986)
NKS148	$\Delta acrB$	Horiyama <i>et al.</i> (2010)
NKS1325	$\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1344	$\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS375	$\Delta rfaK$	this study
NKS1269	$\Delta rfaK\Delta acrB$	this study
NKS1312	$\Delta rfaK\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1334	$\Delta rfaK\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS877	Δwzz	this study
NKS1274	$\Delta wzz\Delta acrB$	this study
NKS1322	$\Delta wzz\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1341	$\Delta wzz\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS369	$\Delta rfaJ$	this study
NKS1270	$\Delta rfaJ\Delta acrB$	this study
NKS1313	$\Delta rfaJ\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1335	$\Delta rfaJ\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS363	$\Delta rfaI$	this study
NKS1298	$\Delta rfaI\Delta acrB$	this study
NKS1324	$\Delta rfaI\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1343	$\Delta rfaI\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS365	$\Delta rfaB$	this study
NKS1267	$\Delta rfaB\Delta acrB$	this study
NKS1310	$\Delta rfaB\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1332	$\Delta rfaB\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS372	$\Delta rfaY$	this study
NKS1276	$\Delta rfaY\Delta acrB$	this study
NKS1319	$\Delta rfaY\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study

NKS1339	$\Delta rfaY\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS371	$\Delta rfaP$	this study
NKS1272	$\Delta rfaP\Delta acrB$	this study
NKS1316	$\Delta rfaP\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1338	$\Delta rfaP\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS368	$\Delta rfaG$	this study
NKS1277	$\Delta rfaG\Delta acrB$	this study
NKS1314	$\Delta rfaG\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1336	$\Delta rfaG\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS367	$\Delta rfaF$	this study
NKS1268	$\Delta rfaF\Delta acrB$	this study
NKS1311	$\Delta rfaF\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1333	$\Delta rfaF\Delta acrB/pacrB$	this study
NKS366	$\Delta rfaC$	this study
NKS1279	$\Delta rfaC\Delta acrB$	this study
NKS1349	$\Delta rfaC\Delta acrB/pTrcHis2B$	this study
NKS1350	$\Delta rfaC\Delta acrB/pacrB$	this study

Plasmids

pKD46	Red recombinase expression plasmid, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pKD3	rep _{R6Kγ[p]} Ap ^R FRT Cm ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	rep _{R6Kγ[p]} Ap ^R FRT Km ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	rep _{pSC101} ^{ts} Ap ^R Cm ^R <i>cI857</i> λ P _R / <i>l</i> p	Datsenko and Wanner (2000)
pTrcHis2B	vector; Ap ^R	Invitrogen
<i>pacrB</i>	<i>acrB</i> gene cloned into pTrcHis2B, Ap ^r	this study

表 1-1. 実験に使用した菌株およびプラスミド

2-2. 最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定

使用した菌株の各薬剤に対する MIC は、オキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、エリスロマイシン、ローダミン 6G、クリスタルバイオレット、臭化エチジウム、ノボビオシン、塩化ベンザルコニウム、SDS、デオキシコール酸のいずれかを様々な濃度で含有する LB 寒天培地を用いて測定した。寒天培地は Nishino らの方法に従い、寒天平板培地希釈法によって調製した¹⁷。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 10⁵ cfu/ μ L の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター（佐久間製作所）を用いて各寒天培地に接種し、37°C で 20 時間培養後、細菌の増殖を示すコロニーの有無を調べた。各薬剤に対する MIC は、細菌の増殖が阻害され、コロニーが観察されなかった最小の化合物濃度とした。

第3節 結果

3-1. 自然抵抗性における LPS の長さや枝分かれの効果

LPS の長さや枝分かれが、サルモネラの薬剤自然抵抗性に影響を与えるかどうか調べるため、LPS 合成酵素をコードする遺伝子 (図 1-1) を欠損させた株を構築した (表 1-1)。図 1-1 に示した遺伝子欠損株に加え、O 抗原の長さを決定する *wzz* 遺伝子の欠損株も構築した。LPS 合成に関与する遺伝子欠損の効果や、通常培養条件下で恒常的に発現している異物排出トランスポーター *acrB* 遺伝子欠損の効果と比較するために、MIC 測定に用いる薬剤として AcrB の基質薬剤を選択した。

$\Delta rfaK$ 、 Δwzz 、 $\Delta rfaJ$ 株は、試験したすべての抗菌薬と化学物質に対して、野生株と同等の薬剤自然抵抗性を示した。しかしながら、 $\Delta rfaI$ 、 $\Delta rfaB$ 、 $\Delta rfaY$ 、 $\Delta rfaP$ 、 $\Delta rfaG$ 、 $\Delta rfaF$ 、 $\Delta rfaC$ 株は、LPS の長さや枝分かれの消失とともに、ほとんどすべての薬剤に対して感受性が増加していった (表 1-2)。興味深いことに、ガラクトースを付加して LPS コア多糖の一つの枝を合成する酵素である *rfaB* の欠損は、ノボビオシン耐性に全く影響を与えなかった。一方で、コア多糖のリン酸化遺伝子 (*rfaY* または *rfaP*) を欠損した株は、 $\Delta rfaC$ よりノボビオシン耐性が低かった。リン酸基によって生ずる電荷は、アミノクマリン系抗菌薬の侵入阻害に有効なようである。これらの結果から、LPS の長さや枝分かれは、AcrB によって排出される複数の薬剤に対するサルモネラの自然抵抗性の維持に関与していることが示された。

Strain	MIC (mg/L)										
	OXA	CLO	NAF	ERY	R6G	CV	EB	NOV	BENZ	SDS	DOC
Wild-type	1024	1024	2048	512	4096	256	>2048	512	512	>32768	>32768
$\Delta acrB$	4	4	16	8	16	4	128	4	8	1024	>32768
$\Delta rfaK$	1024	1024	2048	512	4096	256	>2048	512	512	>32768	>32768
$\Delta rfaK\Delta acrB$	4	4	16	8	16	4	128	16	8	128	>32768
Δwzz	1024	1024	2048	512	4096	256	>2048	512	512	>32768	>32768
$\Delta wzz\Delta acrB$	4	4	16	8	16	4	128	8	8	2048	>32768
$\Delta rfaJ$	1024	1024	2048	512	4096	256	>2048	512	512	>32768	>32768
$\Delta rfaJ\Delta acrB$	4	4	16	8	16	4	128	16	8	128	>32768
$\Delta rfaI$	512	512	1024	512	4096	64	>2048	64	32	>32768	>32768
$\Delta rfaI\Delta acrB$	4	4	16	4	16	4	64	4	4	16384	>32768
$\Delta rfaB$	512	512	1024	512	4096	64	>2048	512	32	>32768	>32768
$\Delta rfaB\Delta acrB$	4	4	16	4	16	4	64	8	4	64	32768
$\Delta rfaY$	512	512	1024	256	4096	32	>2048	16	64	>32768	>32768
$\Delta rfaY\Delta acrB$	2	4	8	4	8	2	64	0.5	4	128	8192
$\Delta rfaP$	256	256	512	128	4096	8	2048	4	8	2048	>32768
$\Delta rfaP\Delta acrB$	2	2	8	2	8	1	32	0.125	4	32	512
$\Delta rfaG$	256	256	256	64	4096	8	2048	32	4	256	>32768
$\Delta rfaG\Delta acrB$	1	2	4	1	8	1	32	0.5	2	64	512
$\Delta rfaF$	128	128	256	16	1024	8	2048	32	8	256	>32768
$\Delta rfaF\Delta acrB$	4	8	32	8	16	4	128	16	8	256	>32768
$\Delta rfaC$	128	64	128	16	128	4	1024	32	4	128	2048
$\Delta rfaC\Delta acrB$	1	1	2	<0.5	2	<0.25	32	0.5	2	16	128

OXA, oxacillin; CLO, cloxacillin; NAF, nafcillin; ERY, erythromycin; R6G, rhodamine 6G; CV, crystal violet; EB, ethidium bromide; NOV, novobiocin; BENZ, benzalkonium chloride; DOC, deoxycholic acid. MIC determinations were repeated at least three times.

表 1-2. LPS 合成酵素および AcrB 遺伝子欠損株の MIC

3-2. *acrB* 遺伝子欠損が LPS 変異体の自然抵抗性に及ぼす影響

サルモネラでは、AcrAB-TolC 異物排出システムが通常培養条件下で恒常的に発現しており、自然抵抗性の維持に寄与している⁴。LPS 変異体における異物排出システムの機能を調べるため、LPS 合成酵素欠損株からさらに *acrB* 遺伝子を欠損させ (表 1-1)、MIC を測定した。*acrB* 単独欠損株は、どの LPS 合成酵素単独欠損株よりも、オキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、エリスロマイシン、ローダミン 6G、臭化エチジウムに対して感受性であり、 $\Delta rfaK\Delta acrB$ 、 $\Delta wzr\Delta acrB$ 、 $\Delta rfaJ\Delta acrB$ 、 $\Delta rfaI\Delta acrB$ 、 $\Delta rfaB\Delta acrB$ 二重欠損株では、ほぼすべての薬剤に対する感受性が、*acrB* 単独欠損株と同等であった (表 1-2)。 $\Delta rfaF\Delta acrB$ 株は、 $\Delta acrB$ より SDS 感受性が高かった。また、 $\Delta rfaY\Delta acrB$ 株はノボビオシン、SDS、デオキシコール酸に対して、 $\Delta acrB$ より感受性が高かった。 $\Delta rfaP\Delta acrB$ 株は、エリスロマイシン、クリスタルバイオレット、臭化エチジウム、ノボビオシン、SDS、デオキシコール酸に対して、 $\Delta acrB$ より感受性が高かった。 $\Delta rfaG\Delta acrB$ と $\Delta rfaC\Delta acrB$ 株は、ほとんどすべての薬剤に対して $\Delta acrB$ 株よりも感受性が高かった (表 1-2)。これらの結果は、AcrAB-TolC システムは、LPS が異常な状態であっても全ての薬剤に対する排出活性を保持しており、当排出システムが薬剤自然抵抗性における主要な役割を果たしていることを示している。

3-3. AcrB 過剰発現が LPS 変異体の多剤耐性に及ぼす影響

AcrB が LPS 変異体においても問題なく機能していることが示されたことから、異物排出トランスポーターAcrB の過剰発現が、LPS 変異体の多剤耐性に及ぼす影響を調べた。サルモネラ ATCC 14028s 株の *acrB* 遺伝子を pTrcHis2B ベクターにクローニングした後、構築したプラスミドを、LPS 合成酵素および *acrB* 遺伝子二重欠損株に形質転換した。形質転換の結果、AcrB の過剰発現によって、全ての二重欠損株の多剤耐性が回復した (表 1-3)。これらのデータから、異物排出トランスポーターAcrB が、不完全な LPS を有する細菌中であっても機能できることが確認できた。しかしながら、いくつかの LPS 変異体 ($\Delta rfaF\Delta acrB$ や $\Delta rfaC\Delta acrB$ 等) においては、AcrB の過剰発現で多剤耐性を野生株レベルにまで完全に回復させることができなかった (表 1-3)。これらの結果から、異物排出トランスポーターの過剰発現を以てしても、サルモネラの自然抵抗性の維持における LPS の機能を完全に補うことはできないということが明らかとなった。

Strain	MIC (mg/L)							
	ERY	R6G	CV	EB	NOV	BENZ	SDS	DOC
Wild-type	512	4096	256	>2048	256	512	>32768	>32768
$\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	8	2	32	4	4	256	32786
$\Delta acrB/pacrB$	256	4096	128	2048	256	64	>32786	>32786
$\Delta rfaK\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	16	2	64	8	4	128	>32786
$\Delta rfaK\Delta acrB/pacrB$	256	4096	128	4096	512	128	>32786	>32786
$\Delta wzz\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	8	2	32	8	4	256	>32786
$\Delta wzz\Delta acrB/pacrB$	128	4096	128	4096	512	128	>32786	>32786
$\Delta rfaJ\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	16	2	64	8	4	128	32786
$\Delta rfaJ\Delta acrB/pacrB$	256	4096	128	4096	512	64	>32786	>32786
$\Delta rfaI\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	8	2	32	4	4	256	>32786
$\Delta rfaI\Delta acrB/pacrB$	128	4096	128	4096	128	64	>32786	>32786
$\Delta rfaB\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	16	1	64	4	4	64	32786
$\Delta rfaB\Delta acrB/pacrB$	128	4096	32	4096	256	16	>32786	>32786
$\Delta rfaY\Delta acrB/pTrcHis2B$	2	4	1	32	1	4	128	4096
$\Delta rfaY\Delta acrB/pacrB$	128	4096	64	2048	32	32	>32786	>32786
$\Delta rfaP\Delta acrB/pTrcHis2B$	1	4	1	32	0.25	4	32	512
$\Delta rfaP\Delta acrB/pacrB$	64	2048	16	2048	8	8	256	>32786
$\Delta rfaG\Delta acrB/pTrcHis2B$	1	8	1	32	4	2	32	256
$\Delta rfaG\Delta acrB/pacrB$	32	2048	8	1024	16	4	128	>32786
$\Delta rfaF\Delta acrB/pTrcHis2B$	4	16	2	64	16	4	128	>32786
$\Delta rfaF\Delta acrB/pacrB$	16	256	4	512	16	4	128	>32786
$\Delta rfaC\Delta acrB/pTrcHis2B$	0.25	2	0.5	64	0.5	4	16	128
$\Delta rfaC\Delta acrB/pacrB$	8	64	2	1024	8	4	128	2048

ERY, erythromycin; R6G, rhodamine 6G; CV, crystal violet; EB, ethidium bromide; NOV, novobiocin; BENZ, benzalkonium chloride; DOC, deoxycholic acid. MIC determinations were repeated at least three times. Values in bold are larger than those of the corresponding strains harbouring the vector only.

表 1-3. 各欠損株における AcrB 過剰発現プラスミドの効果

第 4 節 考察

本章では、サルモネラの薬剤自然抵抗性における異物排出トランスポーターと外膜障壁との間の相互作用を遺伝子レベルで調べた。その結果、LPS の長さや枝分れ、および異物排出トランスポーター AcrB の両方が、サルモネラの薬剤自然抵抗性の維持に必要であることが明らかとなった。LPS 合成の抑制と AcrB の不活化によってサルモネラの自然抵抗性は低下するが、感受性が最大となったのは両方が組み合わさったときであった。複数遺伝子欠損による相加的な効果は、特に $\Delta rfaG\Delta acrB$ と $\Delta rfaC\Delta acrB$ 株において観察された。 $\Delta acrB$ と比較すると、 $\Delta rfaG\Delta acrB$ は、オキサシリン (4 倍)、ナフシリン (4 倍)、エリスロマイシン (8 倍)、クリスタルバイオレット (4 倍)、臭化エチジウム (4 倍)、ノボビオシン (8 倍)、塩化ベンザルコニウム (4 倍)、SDS (16 倍)、デオキシコール酸 (>64 倍) に感受性であった。 $\Delta rfaC\Delta acrB$ も、 $\Delta acrB$ と比較した場合、オキサシリン (4 倍)、クロキサシリン (4 倍)、ナフシリン (8 倍)、エリスロマイシン (>16 倍) ローダミン 6G (8 倍)、クリスタルバイオレット (>16 倍)、臭化エチジウム (4 倍)、ノボビオシン (8 倍)、塩化ベンザルコニウム (4 倍)、SDS (64 倍)、デオキシコール酸 (>256 倍) に感受性であった。これらのデータは、AcrAB-TolC 排出システムが、LPS コア多糖のほとんどが失われた時でも機能を保ち、自然抵抗性を維持するために重要であることを示している。AcrB の過剰発現を利用した実験で

は、全ての LPS 変異体において、AcrB 過剰発現によって多剤耐性が回復することが示されたが、自然抵抗性の維持における LPS の機能を完全に補うことはできなかった。興味深いことに、Giraud らは、*in vitro* で選択した *Salmonella enterica* serovar Typhimurium のキノロン耐性変異体では、LPS の O 抗原の密度が増加し、異物排出トランスポーター AcrB の発現レベルが上昇していたことを報告しており¹⁸、本章で私が明らかにした自然抵抗性の維持とともに、異物排出トランスポーターと LPS の両方が、獲得耐性にも重要であることを示唆している。本章の結果は、異物排出トランスポーターの阻害と外膜構造の破壊の両方が、多剤耐性菌の克服に向けた薬剤感受性の増大に有効なアプローチであるという考えを支持するものである^{9,19}。広域の耐性菌感染症に対する治療法確立に向け、引き続き、細菌に元々備わっている耐性メカニズムの詳細な解析を進めていくことが重要であると考えられる。

第二章

バイオフィルム産生・維持における 異物排出トランスポーターの役割

第1節 諸言

一部の菌株は、固体または生体表面に付着した後、細胞外多糖を分泌して強固なバイオフィルムを形成する。バイオフィルム内には、複数種の細菌が一種の生態系を形成して共存していることが知られている²⁰。成熟したバイオフィルム内では、細菌は休眠状態にあって、急速には分裂しない。古いバイオフィルムが壊れるとき、病原菌は外部環境に放出され、自由に浮遊している細菌数が増加する。バイオフィルムは宿主の免疫機構からの回避に役立ち、抗菌薬の浸透も妨げることで細菌の自然抵抗性を大幅に上昇させる。臨床では、医療用カテーテルに定着したバイオフィルム産生菌による院内感染や、薬物療法が困難な歯周病・齦蝕が大きな問題となっている。

近年、同じく自然抵抗性に寄与する異物排出トランスポーターとバイオフィルムとの相互作用の有無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。Maira-Litran らは、大腸菌のバイオフィルムによるシプロフロキサシン耐性と異物排出トランスポーターAcrB の発現には関係がないことを報告し²¹、De Kievit らは、緑膿菌異物排出システム MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM が、バイオフィルムによる抗菌薬耐性の表現型に関与しないことを示している²²。その一方、Lynch らは、異物排出トランスポーターは明らかに、大腸菌のバイオフィルムによる耐性上昇に関与していると報告し²³、Gillis らは、緑膿菌異物排出システム MexAB-OprM と MexCD-OprJ が、バイオフィルムに関連する耐性の獲得に寄与していることを明らかにした²⁴。また Baugh らは、サルモネラの全異物排出システムがバイオフィルム形成に寄与していることを明らかにするなど²⁵、研究グループごとに結果が異なり、明確な結論には至っていない。そこで本章では、これまでに着目されていないバイオフィルム形成の経時的な解析を行うことで、バイオフィルム産生・維持における異物排出トランスポーターの役割を明らかにすることを目指した。

第2節 方法

2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件

大腸菌野生株として *Escherichia coli* TG1 株²⁶ および W3104 株²⁷ を使用し、その他の菌株は TG1 株を親株として、Datsenko らの方法により構築した¹⁵。本章で使用した菌株およびプラスミドを、表 2-1 に示す。長期保存する菌株は、10% skim milk 溶液に保存して-80°Cで保存した。長期保存するプラスミドは、滅菌 Milli-Q 水に溶解して-30°Cで保存した。菌株は、LB 培地 (Difco™ LB broth, Miller: 1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.0% NaCl)¹⁶ を用いて 37°C で培養した。

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strains		
TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15]</i>	Taylor <i>et al.</i> (1985)
W3104	<i>galT12 rpoB λ⁻ F⁻</i> , rifampin-resistant derivative of W3104 (W3104 ^{rif})	Yamamoto <i>et al.</i> (1981)
<i>ΔacrAB</i>	Derivative of TG1 that lacks <i>acrAB</i>	This study
<i>ΔacrABΔacrD</i>	Derivative of TG1 that lacks <i>acrAB</i> and <i>acrD</i>	This study
<i>ΔacrABΔemrKY</i>	Derivative of TG1 that lacks <i>acrAB</i> and <i>emrKY</i>	This study
<i>ΔacrABΔmdtABC</i>	Derivative of TG1 that lacks <i>acrAB</i> and <i>mdtABC</i>	This study
<i>ΔacrABΔmdtEF</i>	Derivative of TG1 that lacks <i>acrAB</i> and <i>mdtEF</i>	This study
<i>ΔmdtABC</i>	Derivative of TG1 that lacks <i>mdtABC</i>	This study
Plasmids		
pKD46	Red recombinase expression plasmid, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pKD3	rep _{R6K7[ρ]} Ap ^R FRT Cm ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	rep _{R6K7[ρ]} Ap ^R FRT Km ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	rep _{pSC101} ^{ts} Ap ^R Cm ^R <i>cI857λP_R/flp</i>	Datsenko and Wanner (2000)

表 2-1. 実験に使用した菌株およびプラスミド

2-2. バイオフィームおよび増殖度合の測定

菌株を 37°C の LB 液体培地で一晚培養し、同じ液体培地で 10^5 cfu/ μ L の濃度に希釈した。96 ウェルのポリ塩化ビニル製のプレートにこの菌液を 200 μ L 分注し、攪拌せずに 4、8、24、36 時間、37°C で培養した。培養後、細菌の増殖度合を、Versa Max マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社) を使用して、600nm で測定した。続いて液体培地を取り除き、ウェルの底や側面に付着していないあらゆる非結合細菌を除去するため、180 μ L の滅菌蒸留水を用いてすべてのウェルを 3 回洗浄した。風乾後、バイオフィームを 180 μ L の 0.1% クリスタルバイオレットで 15 分間染色した。クリスタルバイオレットを除去し、すべてのウェルを 180 μ L の滅菌蒸留水で 3 回洗浄した。染色したバイオフィームを 180 μ L の 20% アセトンと 80% エタノールで溶解し、3 分放置後、Versa Max マイクロプレートリーダーを用いて、570 nm で測定した。

第 3 節 結果

3-1. 異物排出トランスポーターとバイオフィームとの間の相互作用

大腸菌において異物排出トランスポーターとバイオフィームとの間に相互作用が存在するかどうか調べるため、バイオフィーム産生株として TG1 野生株²⁸、非産生株として W3104 野生株を用いた。大腸菌においてもサルモネラと同様、強力な排出能力を有し、通常培養条件下で恒常的に発現しているのは AcrAB-TolC 異物排出システムであることから、最初に、バイオフィーム産生株 TG1 から *acrAB* 遺伝子を欠損させた。続いて、 Δ *acrAB* 株からさらに他の異物排出トランスポーター遺伝子を含む各オペロン *acrD*、*emrKY*、*mdtABC*、*mdtEF* を欠損させた (表 2-1)。本章では、異物排出トランスポーター EmrY や MdtBC 等が働くのに必要な膜融合タンパク質も同時に欠損させている。

24 時間培養後、全株が正常に生育していたものの、バイオフィームを crystal violet で染色し測定した結果、異物排出トランスポーターが 2 種類欠損している Δ *acrAB* Δ *mdtABC* 株においてのみ、バイオフィーム形成が著しく阻害されていた (表 2-2)。異物排出トランスポーターを 1 種類だけ欠損させた Δ *acrAB* 株および Δ *mdtABC* 株は、TG1 野生株と同程度のバイオフィームを形成できることも確認した (表 2-2)。これらの結果は、RND 型異物排出トランスポーター AcrB および MdtBC が、大腸菌のバイオフィーム形成に関係することを示唆している。

Strain	A_{570}	A_{600}
Wild-type W3104	0.135	0.691
Wild-type TG1	1.961	0.684
$\Delta acrAB$	1.941	0.824
$\Delta acrAB\Delta acrD$	1.779	0.681
$\Delta acrAB\Delta emrKY$	1.694	0.675
$\Delta acrAB\Delta mdtABC$	0.375	0.863
$\Delta acrAB\Delta mdtEF$	1.709	0.797
$\Delta mdtABC$	1.691	0.674

Values in bold indicate the significant decrease compared with the corresponding parental strains. A_{570} and A_{600} indicate the amount of biofilm and the density of bacteria at 24 hours, respectively.

表 2-2. 24 時間培養後のバイオフィーム形成量と菌液濃度

3-2. バイオフィーム形成における AcrAB および MdtABC の役割

そこで、両トランスポーターがバイオフィーム形成のどの過程に関与するのか調べるため、経時的なバイオフィーム形成量の測定を行った。TG1 野生株は、観測期間の全体を通じて一定のバイオフィーム量を示した (図 2-1)。興味深いことに、 $\Delta acrAB\Delta mdtABC$ 株においても、4 時間培養時点では十分量のバイオフィームが存在していたにも関わらず、このバイオフィームはその後時間依存的に減少し、24 時間培養時点ではほとんど消失していた (図 2-1、2-2)。これらの結果から、AcrB および MdtBC は、バイオフィームの初期の産生過程ではなく、長期間十分な量のバイオフィームを維持するのに必須であることが明らかになった。

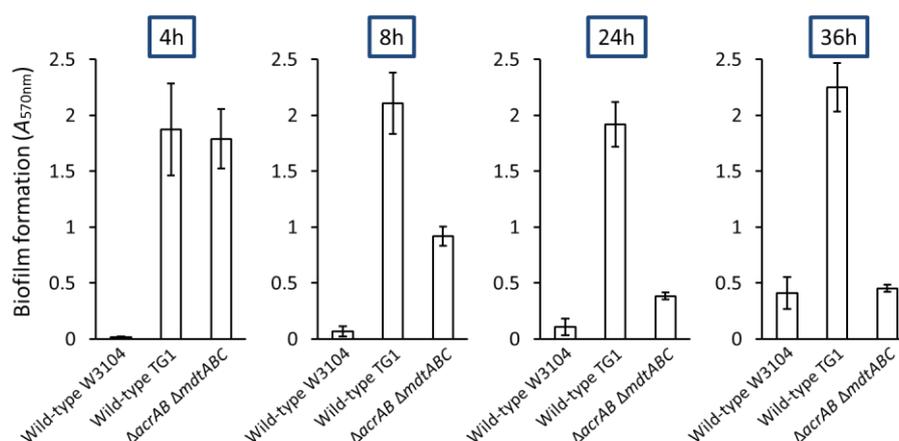


図 2-1. 各株におけるバイオフィーム形成量の経時的測定

データとエラーバーはそれぞれ、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

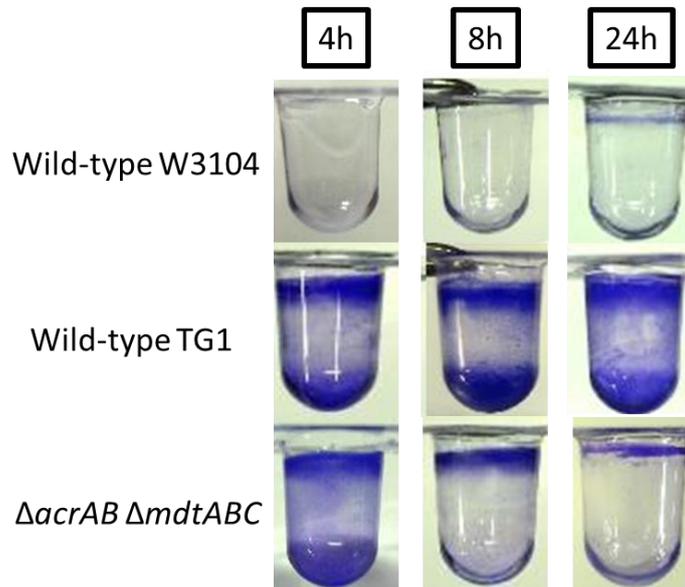


図 2-2. 各株におけるバイオフィーム形成量の経時変化

液体培地を取り除いて滅菌蒸留水で洗浄し、クリスタルバイオレットで染色後、滅菌蒸留水で十分に洗浄した際の各ウェルの外観を示す。

バイオフィームは、クリスタルバイオレットによって青色に染色される。

第 4 節 考察

本章では、バイオフィーム産生株である TG1 野生株から構築した欠損株を用いて、バイオフィーム形成に関係がある異物排出トランスポーターを探索した。また、経時的にバイオフィームの形成量を測定することによって、大腸菌のバイオフィーム形成における異物排出トランスポーターの役割を調べた。その結果、異物排出トランスポーター AcrB および MdtBC が、大腸菌のバイオフィームの維持に寄与していることが明らかとなった。バイオフィーム形成に関する研究では、経時的観測などの測定条件が特に重要であり、過去の報告において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。Δ*acrAB*Δ*mdtABC* 株において、バイオフィームの初期の産生過程には問題がないことから、両トランスポーターはバイオフィームを構成する材料ではなく、バイオフィーム維持に関わるシグナル物質を排出していると考えている。以上の結果から、優秀な異物排出トランスポーターの阻害剤が開発できれば、抗菌薬の排出抑制とともにバイオフィーム形成の抑制効果も期待できるため、非常に有用な多剤耐性菌治療薬になり得る。バイオフィーム産生が問題となっている歯周病耐性菌等の治療にも応用できると考えており、新たな治療法確立に向け、引き続き解析を続けていく。

第三章

大腸菌多剤耐性化における RNA シャペロン Hfq の役割

第1節 諸言

細菌のゲノムサイズは 4.6×10^6 bp とコンパクトであるにもかかわらず（ヒトの約 1000 分の 1）、基質スペクトルが重なり合っている異物排出トランスポーター遺伝子を複数種コードしている^{3,4}。細菌がこれら異物排出トランスポーターをいかにして利用しているかを理解する鍵は、発現制御にある。近年、異物排出トランスポーターは、正確かつ精巧な転写制御によりその発現が制御されていることが分かってきた⁵。大腸菌の主要な異物排出トランスポーター AcrB の発現は、局所的にはリプレッサーである AcrR により調節され²⁹、さらに幅広いレベルでは、ストレス状況や MarA、SoxS、Rob などのグローバルレギュレーター⁵の調節を受けていることが示されている。このように、細菌の異物排出トランスポーターの発現制御機構は非常に複雑かつ多様であり、未だその全貌の解明には至っていない。これまでも私は、異物排出トランスポーターおよびその発現制御ネットワークを網羅的に解析することで、新たな多剤耐性因子の同定を行ってきたが^{参考論文1, 参考論文3}、本章および第四章の研究により、新たに Small RNA (sRNA) を介した発現制御機構の存在が明らかとなってきた。

本章で注目した Hfq は、進化的に保存された RNA 結合タンパク質であり、Q β バクテリオファージの複製に必要な宿主因子として、大腸菌で初めて同定された³⁰。このタンパク質はリング型 6 量体の RNA シャペロンで³¹、アミノ酸をコードせずにそれ自身で機能をもつ非翻訳型 RNA である sRNA が、標的 mRNA の 1 重鎖 AU リッチ領域に優先的に結合するのを媒介する³²。細菌の sRNA は多くの場合、対応する mRNA の 5' 末端の非翻訳領域に結合し、その安定性や翻訳を調節する^{33,34}。Hfq は sRNA を介して様々なストレス誘導性遺伝子の翻訳調節を行い³²、多くの細菌において病原性への関与が知られているが^{35,36}、薬剤耐性における役割は特定されていなかった。本章では、多剤耐性に関与する遺伝子のスクリーニングにより同定した因子の 1 つである、Hfq の多剤耐性における役割について検証するとともに、多剤耐性化の主原因である AcrAB-TolC 異物排出システムとの関係を調べた。

第2節 方法

2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件

大腸菌野生株として *Escherichia coli* W3104 株²⁷ および MC4100 株³⁷ を使用し、その他の菌株は Link らの方法により構築した³⁸。本章で使用した菌株およびプラスミドを、表 3-1 に示す。長期保存する菌株は、10% skim milk 溶液に保存して -80°C で保存した。長期保存するプラスミドは、滅菌 Milli-Q 水に溶解して -30°C で保存した。菌株は、LB 培地 (DifcoTM LB broth, Miller: 1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.0% NaCl)¹⁶ を用いて 37°C で培養した。

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strains		
W3104		Yamamoto <i>et al.</i> (1981)
MC4100		Casadaban (1976)
NKE461	W3104 Δ hfq	this study
NKE19	W3104 Δ acrAB	this study
NKE451	W3104 Δ acrAB Δ hfq	this study
NKE610	MC4100 Δ hfq	this study
NKE596	MC4100 Δ acrAB	this study
NKE602	MC4100 Δ acrAB Δ hfq	this study
NKE621	MC4100/pNN387acrAB	this study
NKE641	MC4100/pNN387tolC	this study
NKE736	MC4100 Δ hfq/pNN387acrAB	this study
NKE1282	MC4100 Δ hfq/pNN387tolC	this study
Plasmids		
pKO3	repA(Ts) Cm ^r sacB ⁺	Link <i>et al.</i> (1997)
pNN387	Cm ^r ; single-copy vector containing promoterless lacZY	Miller (1972)
pNN387acrAB	pNN387 (acrAB promoter-lacZ)	this study
pNN387tolC	pNN387 (tolC promoter-lacZ)	this study
pACYC177	vector; Ap ^r , Km ^r	MBI Fermentas
phfq	0.5 kb HincII-PstI fragment containing hfq gene cloned into pACYC177, Km ^r	this study
pHSG398	vector; derivative of pUC18 containing Cm ^r in place of Ap ^r	Takara Bio Inc.
pacrAB	5.1 kb BamHI-SphI fragment containing acrAB genes cloned into pHSG398, CP ^r	this study

表 3-1. 実験に使用した菌株およびプラスミド

2-2. 最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定

使用した菌株の各薬剤に対する MIC は、クロラムフェニコール、ノボビオシン、アクリフラビン、クリスタルバイオレット、ローダミン 6G、ベンザルコニウム、オキサシリン、セファマンドール、ナリジクス酸のいずれかを様々な濃度で含有する LB 寒天培地を用いて測定した。寒天培地は Nishino らの方法に従い、寒天平板培地希釈法によって調製した¹⁷。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 10⁵ cfu/μL の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター (佐久間製作所) を用いて各寒天培地に接種し、37°C で 20 時間培養後、細菌の増殖を示すコロニーの有無を調べた。各薬剤に対する MIC は、細菌の増殖が阻害され、コロニーが観察されなかった最小の化合物濃度とした。

2-3. 大腸菌細胞内における薬剤蓄積度合の観察

ローダミン 6G を 0.5 もしくは 1mg/L の濃度で含有する LB 寒天培地を用意した。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 10⁵ cfu/μL の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター (佐久間製作所) を用いて寒天培地に接種し、37°C で 20 時間培養した。大腸菌内への薬剤の蓄積は、スキャナー (K100D Super、ペンタックス) を用いて、ローダミン 6G による細胞の染色により観察した。

2-4. レポーターアッセイ

arcAB および *tolC* 遺伝子の転写量を調べるため、これらの遺伝子のプロモーター領域を、単一コピーベクターである pNN387³⁹ の *lacZ* レポーター遺伝子上流にクローニングした。得られたプラスミドを、 β -ガラクトシダーゼ活性測定のために MC4100 株に形質転換した。構築した株を 15mg/L のクロラムフェニコールを含む 37°C の LB 液体培地で、OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養した。溶菌液の β -ガラクトシダーゼ活性測定は、2-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシドを基質とし、Miller の方法⁴⁰ にわずかな修正を加えて行った。

2-5. タンパク質定量

AcrB タンパク質の発現量は以下の手法により決定した。菌株を 37°C の LB 液体培地で、OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養した。集菌後、50mM のリン酸カリウムバッファー (pH7.0) で 2 度洗浄し、Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics 社) により 1.5 分間超音波破碎した。未破碎細胞を低速度遠心 (10,000g、10 分間) で除去した後、膜画分を超速心 (200,000g、30 分) により回収した。その後、膜画分を 50mM のリン酸カリウムバッファー (pH7.0) に懸濁した。膜画分中の 15 μ g のタンパク質を、8% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜にブロッティングした。AcrB タンパク質は、Hirakawa らの方法に従い⁴¹、ポリクローナル抗 AcrB 抗体、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体免疫グロブリン G (Bio-Rad Laboratories 社) および CDP-Star 試薬 (GE Healthcare 社) を用いて検出した。AcrB タンパク質の発現量は、LAS-3000 (富士フィルム) によりスキャンし、Science Lab 2001 Image Gauge Ver. 4.0 ソフトウェア (富士フィルム) により定量した。

第 3 節 結果

3-1. 大腸菌の薬剤感受性における Hfq の効果

薬剤感受性における Hfq の役割を調べるため、大腸菌野生株 W3104 および MC4100 を用いて、*hfq* 遺伝子欠損株を作製した。どちらの株においても、*hfq* 遺伝子欠損株は野性株に比べ、クロラムフェニコール (4 倍)、ノボビオシン (4 倍)、アクリフラビン (8 倍)、クリスタルバイオレット (4 倍)、ローダミン 6G (>4 倍)、ベンザルコニウム (8 倍)、オキサシリン (4 倍)、セファマンドール (4 倍)、ナリジクス酸 (4 倍) に対して高い感受性を示した (表 3-2)。W3104 および MC4100 のいずれにおいても、プラスミドを用いて Hfq を

再び合成できるように構築した $\Delta hfq/phfq$ 株は、野生株と同等の薬剤感受性を示した(表 3-2)。これらの結果から、Hfq が大腸菌の薬剤感受性に影響を与えることが明らかとなった。

Strain	MIC (mg/L)								
	CHL	NOV	ACR	CV	R6G	BENZ	OXA	FAM	NAL
W3104	4	128	256	32	>512	64	256	0.5	4
W3104 Δhfq	1	32	32	8	128	8	64	0.13	1
W3104 $\Delta hfq/pACYC177$	1	32	32	8	128	8	ND	ND	1
W3104 $\Delta hfq/phfq$	4	128	256	32	>512	64	ND	ND	4
W3104 $\Delta acrAB$	0.5	2	8	1	2	4	1	0.063	1
W3104 $\Delta acrAB/pHSG398$	ND	2	8	1	2	4	1	0.063	1
W3104 $\Delta acrAB/pacrAB$	ND	128	256	32	>512	64	256	0.5	4
W3104 $\Delta acrAB\Delta hfq$	0.5	1	8	1	2	4	1	0.063	1
W3104 $\Delta acrAB\Delta hfq/pHSG398 + pACYC177$	ND	1	8	1	2	4	ND	ND	1
W3104 $\Delta acrAB\Delta hfq/pacrAB + phfq$	ND	128	256	32	>512	64	ND	ND	4
MC4100	4	128	256	64	>512	64	256	0.5	4
MC4100 Δhfq	1	32	32	8	128	8	64	0.13	1
MC4100 $\Delta hfq/pACYC177$	1	32	32	8	128	8	ND	ND	1
MC4100 $\Delta hfq/phfq$	4	128	256	64	>512	64	ND	ND	4
MC4100 $\Delta acrAB$	0.5	2	8	1	2	4	1	0.063	1
MC4100 $\Delta acrAB/pHSG398$	ND	2	8	1	2	4	1	0.063	1
MC4100 $\Delta acrAB/pacrAB$	ND	128	256	64	>512	64	256	0.5	4
MC4100 $\Delta acrAB\Delta hfq$	0.5	1	8	1	2	4	1	0.063	1
MC4100 $\Delta acrAB\Delta hfq/pHSG398 + pACYC177$	ND	1	8	1	2	4	ND	ND	1
MC4100 $\Delta acrAB\Delta hfq/pacrAB + phfq$	ND	128	256	64	>512	64	ND	ND	4

CHL, chloramphenicol; NOV, novobiocin; ACR, acriflavine; CV, Crystal Violet; R6G, rhodamine 6G; BENZ, benzalkonium; OXA, oxacillin; FAM, cefamandole; NAL, nalidixic acid.

Values in bold are smaller than those of the corresponding parental strains.

MIC determinations were repeated at least three times.

ND, not determined, because vectors have a chloramphenicol or ampicillin resistance cassette.

表 3-2. Hfq および AcrAB が大腸菌薬剤感受性に与える影響

3-2. 大腸菌内部への薬剤蓄積における Hfq と異物排出システムの関係

そこで、この薬剤感受性化に異物排出システムが関与しているのかどうかを調べることにした。W3104 野生株、W3104 Δhfq 株、W3104 $\Delta acrAB$ 株を 0.5 もしくは 1mg/L のローダミン 6G を含む LB 寒天培地にスポットし、37°C で 20 時間培養した。ローダミン 6G は、この薬剤濃度で各株の増殖を阻害することはない、正常な大きさのコロニーが観察されたが(図 3-1)、各株のコロニーの色には違いが見られた。W3104 Δhfq 株および W3104 $\Delta acrAB$ 株のコロニーは、ローダミン 6G を含むプレート上で赤く見えたのに対し、W3104 野生株は白色を示した(図 3-1)。この結果は、W3104 Δhfq 株および W3104 $\Delta acrAB$ 株において、ローダミン 6G が菌体内に蓄積していることを示し、野生株と比較して薬剤排出能が低下していることを示唆するものであった。また、MC4100 株においても、同じ現象が見られた。

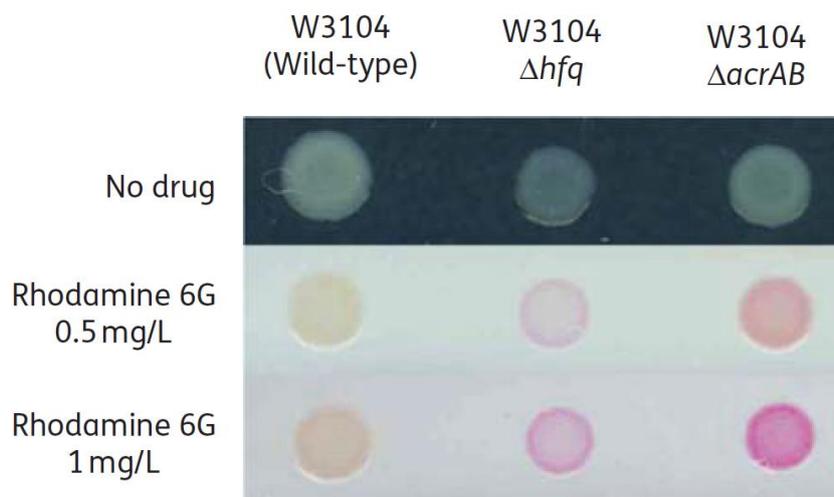


図 3-1. Hfq および AcrAB が大腸菌の薬剤蓄積に与える影響

菌株を 0.5 もしくは 1mg/L のローダミン 6G を含む LB 寒天培地にスポットし、37°C で 20 時間培養後、白色可視光のもとで観察されたコロニーを示す。

これらの結果は、*hfq* 遺伝子の欠損により大腸菌の薬剤排出能が損なわれている可能性を示しており、大腸菌が保有する異物排出システムのうち、通常培養条件下で唯一、恒常的に発現している AcrAB-TolC 異物排出システムと Hfq との関係性を調べた。*acrAB* 欠損株は野生株に比べ、試験薬剤すべてに感受性となった (表 3-2)。しかし、*acrAB* 欠損株からさらに *hfq* 遺伝子を欠損させても、さらに感受性化することはなく、MIC に変化は見られなかった (表 3-2)。また、 $\Delta acrAB\Delta hfq$ 株に、欠損させた両遺伝子を補完するプラスミド *pacrAB* と *phfq* を両方導入すると、形質転換株は野生株と同様の耐性能を示した (表 3-2)。このことから、Hfq によって調節を受ける薬剤耐性には、異物排出システムの中でも、AcrAB-TolC が関与していることが明らかとなった。

3-3. Hfq による異物排出システムの発現制御

Hfq が AcrAB の発現に転写レベルで影響を与えるのかどうかを明らかにするため、レポーターアッセイによりプロモーター活性を測定した。また外膜チャネル TolC のプロモーター活性も測定した。MC4100 野生株と比較して、MC4100 Δhfq 株の *acrAB* および *tolC* のプロモーター活性には、有意な差は見られず (図 3-2)、Hfq は *acrAB* および *tolC* の転写には影響を及ぼしていないことが明らかとなった。

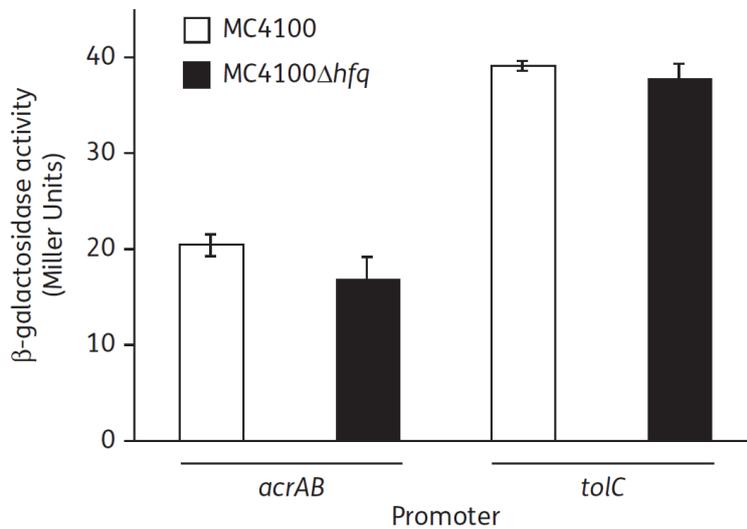


図 3-2. *acrAB*・*tolC* 遺伝子のプロモーター活性における Hfq の効果
データとエラーバーはそれぞれ、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

そこで、Hfq が異物排出システムのタンパク質発現量に影響を及ぼすか調べるため、ウェスタンブロッティングにより、MC4100 野生株および MC4100 Δ hfq 株内の AcrB タンパク質量を測定した。 Δ hfq 株の AcrB 産生量は野生株よりも低く、Image Gauge ソフトウェアを用いて定量したところ、野生株の 53%にまで減少していた (図 3-3)。これらのデータから、Hfq が AcrB 発現に翻訳レベルで影響を及ぼすことが明らかとなった。

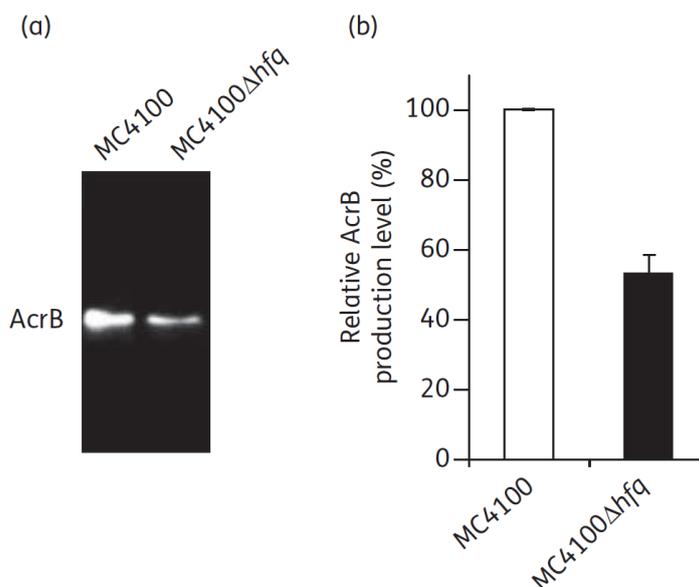


図 3-3. AcrB タンパク発現量における Hfq の効果
データとエラーバーはそれぞれ、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

第4節 考察

自然界での生存のため、外環境に対応した遺伝子発現の調整は細菌にとって重要である。環境シグナルを統合する複雑な制御ネットワークにより、多数の遺伝子が調節されている。先述の通り、AcrAB-TolC 異物排出システムは細菌の薬剤耐性に大きく寄与しており、その発現は様々なレベルでの制御を受ける。諸言で述べた AcrR、MarA、SoxS、Rob に加え、近年では、*acrEF* の発現を調節すると考えられていた AcrS の制御も受けることが示された⁴¹。さらに、菌体密度感知機構に依存して細胞分裂遺伝子を制御するタンパク質 SdiA からも、*acrAB* が正の制御を受けることが報告されている⁴²。

本研究では、Hfq が大腸菌の薬剤耐性調節因子として機能することが明らかとなった。Hfq は *acrAB* オペロンのプロモーター活性には影響を与えず、翻訳レベルでの制御を行い、異物排出トランスポーターAcrB の産生を正に調節していることが示された。このため、*hfq* 遺伝子の欠失は AcrB 発現量の減少を引き起こし、野生株と比べて *hfq* 欠損株では、様々な薬剤に対する感受性が高まった。

Hfq は、ストレス応答に関与する RNA-RNA 間の相互作用を促進し、特に非翻訳型 RNA である sRNA が、標的 mRNA の相補領域と対になるのを補助する機能を持つ。大腸菌の Hfq 変異体では、ストレス応答経路におけるシグナル伝達の混乱が起き、調節機能を持つ非翻訳型 RNA と標的 mRNA の塩基対形成に Hfq が必要であることが分かっている。これら非翻訳型 RNA と標的 mRNA の対の例としては、DsrA-*rpoS*⁴³、OxyS-*fhlA*⁴⁴、OxyS-*rpoS*⁴⁵、RprA-*rpoS*⁴⁶、RyhB-*sodB*⁴⁷、Spot42-*galETKM*⁴⁸などが挙げられ、標的 mRNA からのタンパク質産生を、正負いずれかに制御することが知られている。

Hfq はストレス応答および病原性を発揮する上で必要な因子であることに加えて、細菌が抗菌薬の影響を受けずにヒト体内での生存を可能にする役割を担い、細菌のヒト感染時における重要な因子であることが明らかとなった。現在、多剤耐性菌の克服に向け、異物排出トランスポーターの阻害剤の開発も進めているが、臨床で使用するにはまだ難しい状況である。そこで、異物排出トランスポーターの阻害剤とともに、異物排出トランスポーターの制御因子に着目した薬を開発していくという、新たな視点も重要になってくると思われる。非翻訳型 RNA である sRNA が標的 mRNA に結合するのを助ける Hfq では、Hfq と結合する特定の sRNA をミミックした形の薬が期待される。今後、この制御機構がどのような環境下で働くのかということも含め、さらに詳細なメカニズムの解析を進めることで、新規薬剤の開発につなげていきたい。

第四章

大腸菌多剤耐性化における small RNA (sRNA) DsrA の役割

第1節 諸言

HfqのようなRNAシャペロンの作用によって標的 mRNA と塩基対を形成し、転写後の遺伝子発現制御を行っているのが、非翻訳型 RNA に分類される small RNA (sRNA) である⁴⁹。制御因子としての sRNA の主な利点は、翻訳が不要であり、生産に必要なエネルギーがタンパク質より少ないという点である。また、多くの細菌 sRNA は比較的安定であり、標的 mRNA を特異的に制御し続けることができる^{50, 51}。一部の sRNA は、それらの標的 mRNA と共に分解される⁵²。

最初に莢膜多糖合成の制御因子として同定された DsrA は⁵³、細菌において最も研究が進んでいる sRNA であり、酸耐性に関与する遺伝子および腸細胞消滅遺伝子座 (LEE: locus of enterocyte effacement) 内の遺伝子を含む、多くの病原性因子を制御していることが分かっている^{49, 54}。また DsrA は、*rpoS* の mRNA に結合し、ストレス調節を担うシグマ因子 σ^S の合成を促進させることも知られている⁵⁵⁻⁵⁸。

このように、DsrA 制御ネットワークについては、これまでに幅広い研究が行われてきたにもかかわらず、薬剤耐性における DsrA の役割は未だに明らかとなっていない。本章では、多剤耐性に関与する遺伝子のスクリーニングにより同定した因子の1つである、DsrA の多剤耐性への関与、特に多剤耐性化の主原因である異物排出トランスポーターとの関係を調べた。

第2節 方法

2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件

大腸菌野生株として *Escherichia coli* MG1655 株⁵⁹を使用し、その他の菌株は MG1655 株を親株として、Datsenko らの方法により構築した¹⁵。本章で使用した菌株およびプラスミドを、表 4-1 に示す。長期保存する菌株は、10% skim milk 溶液に保存して-80℃で保存した。長期保存するプラスミドは、滅菌 Milli-Q 水に溶解して-30℃で保存した。菌株は、LB 培地 (Difco™ LB broth, Miller: 1.0%トリプトン、0.5%酵母エキス、1.0% NaCl)¹⁶を用いて 37℃で培養した。

Original name	Characteristics	Source or reference
Strains		
MG1655	wild-type	Blattner <i>et al.</i> (1997)
NKE96	$\Delta acrB$	this study
NKE154	$\Delta acrB/pHSG398$	this study
NKE197	$\Delta acrB/pdsrA$	this study
NKE128	$\Delta acrB \Delta tolC$	this study
NKE160	$\Delta acrB \Delta tolC/pHSG398$	this study
NKE202	$\Delta acrB \Delta tolC/pdsrA$	this study
NKE139	$\Delta acrB mdtEF$	this study
NKE176	$\Delta acrB mdtEF/pHSG398$	this study
NKE207	$\Delta acrB mdtEF/pdsrA$	this study
NKE1372	$\Delta acrB rpoS$	this study
NKE1373	$\Delta acrB rpoS/pHSG398$	this study
NKE1374	$\Delta acrB rpoS/pdsrA$	this study
NKE1487	$\Delta acrB hns$	this study
Plasmids		
pKD46	Red recombinase expression plasmid, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pKD3	rep _{R6Kγ[p]} Ap ^R FRT Cm ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	rep _{R6Kγ[p]} Ap ^R FRT Km ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	rep _{pSC101} ^{ts} Ap ^R Cm ^R cI857 λ P _R flp	Datsenko and Wanner (2000)
pHSG398	rep _{pMB1} Cm ^R	Takara Bio
pdsrA	dsrA cloned into pHSG398, Cm ^R	this study

表 4-1. 実験に使用した菌株およびプラスミド

2-2. 最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定

使用した菌株の各薬剤に対する MIC は、オキサシリン、クロキサシリン、エリスロマイシン、ローダミン 6G、ノボビオシンのいずれかを様々な濃度で含有する LB 寒天培地を用いて測定した。寒天培地は Nishino らの方法に従い、寒天平板培地希釈法によって調製した¹⁷。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 10⁵ cfu/ μ L の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター (佐久間製作所) を用いて各寒天培地に接種し、37°C で 20 時間培養後、細菌の増殖を示すコロニーの有無を調べた。各薬剤に対する MIC は、細菌の増殖が阻害され、コロニーが観察されなかった最小の化合物濃度とした。

2-3. 大腸菌細胞内における薬剤蓄積度合の観察

臭化エチジウムを 1mg/L の濃度で含有する LB 寒天培地を用意した。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晚培養し、同じ液体培地で 10^5 cfu/ μ L の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター（佐久間製作所）を用いて寒天培地に接種し、37°C で 18 時間培養した。大腸菌内への薬剤の蓄積は、UV トランスイルミネーター FAS-II（東洋紡）を用いて、UV 光で観察した。

2-4. 定量的リアルタイム PCR（qRT-PCR: quantitative real-time PCR）

菌株を 30°C の LB 液体培地で、OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養した。集菌後、total RNA を、RNeasy Protect Bacteria Mini Kit（Qiagen 社）および RNase-Free DNase（Qiagen 社）を用いて抽出した。DNase 処理された total RNA サンプル中にゲノム DNA が存在しないことを、非変性アガロースゲル電気泳動およびゲノム DNA を標的とするプライマーを用いた PCR の両方によって確認した。RNA 濃度は分光光度法で測定した¹⁶。cDNA サンプルは、TaqMan Reverse Transcription Reagents（PE Applied Biosystems 社）およびランダムヘキサマーを用いて合成した。特異的なプライマー対は、ABI PRISM Primer Express Software（PE Applied Biosystems 社）を用いて、Nishino らの報告に従い設計した⁶⁰。23S rRNA の *rrlA* および 16S rRNA の *rrsA* を内在性のコントロールとして選択し、リアルタイム PCR は、SYBR Green PCR Master Mix（PE Applied Biosystems 社）および ABI PRISM 7000 Sequence Detection System（PE Applied Biosystems 社）を用いて行った。SYBR Green のインターカラーションによる蛍光シグナルをモニターし、PCR サイクル毎に形成された二本鎖 DNA 産物を定量した。

第 3 節 結果

3-1. 大腸菌の多剤耐性における DsrA の役割

多剤耐性における DsrA の役割を解析しやすくするため、大腸菌が通常培養条件下で唯一、恒常的に発現している異物排出トランスポーター AcrB を欠損させた Δ *acrB* 株を構築した。多剤に対して感受性となった Δ *acrB* 株に DsrA 過剰発現プラスミドを導入した Δ *acrB*/*pdsrA* 株は、空ベクターを保有する Δ *acrB*/vector 株に比べ、オキサシリン、クロキサシリン、エリスロマイシン、ローダミン 6G、ノボビオシンに対する耐性が上昇した（表 4-2）。この結果から、DsrA の過剰発現が、大腸菌の多剤耐性化を誘導することが明らかとなった。

Strain	MIC (mg/L)				
	OXA	CLO	ERY	R6G	NOV
Wild-type	256	>512	128	>512	256
$\Delta acrB$	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ /vector	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ /pdsrA	4	4	16	16	8
$\Delta acrB$ tolC	0.5	0.25	2	2	0.5
$\Delta acrB$ tolC/vector	0.5	0.25	2	2	0.5
$\Delta acrB$ tolC/pdsrA	0.5	0.25	2	2	0.5
$\Delta acrB$ mdtEF	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ mdtEF/vector	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ mdtEF/pdsrA	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ rpoS	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ rpoS/vector	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ rpoS/pdsrA	0.5	1	4	2	2
$\Delta acrB$ hns	128	128	32	256	128

OXA, oxacillin; CLO, cloxacillin; ERY, erythromycin; R6G, rhodamine 6G; NOV, novobiocin.

Values in boldface are larger than those of the corresponding parental strain harbouring the pHSG398 vector.

MIC determinations were repeated at least three times.

表 4-2. DsrA 過剰発現が各遺伝子欠損株の薬剤耐性に与える影響

3-2. 大腸菌内部への薬剤蓄積における DsrA の役割

$\Delta acrB$ /vector 株、 $\Delta acrB$ /pdsrA 株を、1mg/L の臭化エチジウムを含む LB 寒天培地にスポットし、37°C で 18 時間培養した。1mg/L の臭化エチジウムは両株の増殖を阻害することなく、両株ともに正常なコロニーを形成したが（図 4-1）、UV 光で観察した結果、 $\Delta acrB$ /pdsrA 株の蛍光は大きく減少していた（図 4-1）。この結果は、DsrA を過剰発現している $\Delta acrB$ /pdsrA 株において、臭化エチジウムの菌体内への蓄積が抑制されていることを示し、同株の薬剤排出能が上昇していることを示唆するものであった。

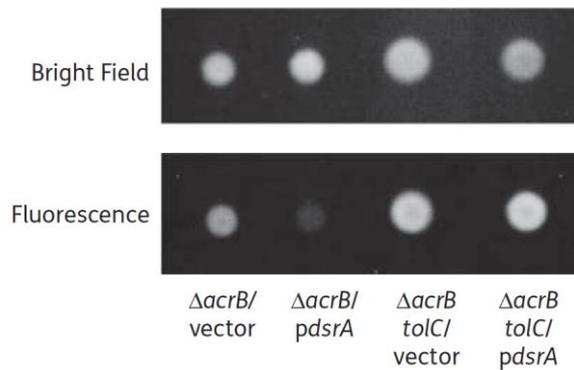


図 4-1. DsrA 過剰発現が各遺伝子欠損株の薬剤蓄積に与える影響

菌株を 1mg/L の臭化エチジウムを含む LB 寒天培地にスポットし、37°C で 18 時間培養後、白色可視光および UV 光で観察したコロニーを示す。

3-3. 異物排出トランスポーターと DsrA の関係

以上の結果は、DsrA の過剰発現によって、異物排出トランスポーターの発現が誘導される可能性を示している。DsrA を介した多剤耐性化が異物排出トランスポーターに依存しているかどうか判断するため、まず、様々な異物排出トランスポーターと相互作用して菌体外への薬剤排出に必須の外膜チャンネルである TolC 欠損の影響を調べた。 $\Delta acrB$ 株からの *tolC* 遺伝子の欠損は、Nishino らの報告同様⁶¹、クロキサシリンおよびノボビオシンへの感受性を増加させた (表 4-2)。この $\Delta acrB\Delta tolC$ 株では、プラスミドを用いて DsrA を過剰発現させても多剤耐性化は起きず (表 4-2)、臭化エチジウムの蓄積抑制も見られなかった (図 4-1)。これらの結果から、DsrA を介した多剤耐性化には、外膜チャンネル TolC を利用する AcrB 以外の異物排出トランスポーターが関与していることが明らかとなった。

3-4. DsrA による異物排出トランスポーター遺伝子の転写制御

DsrA によって発現が制御される異物排出トランスポーターを同定するため、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR: quantitative real-time PCR) を用いて、DsrA 過剰発現による各異物排出トランスポーター遺伝子の転写量変化を測定した。 $\Delta acrB$ /vector 株と $\Delta acrB$ /pdsrA 株との間で、大腸菌が保有する全 20 種の異物排出トランスポーター遺伝子を含む各オペロンおよび *tolC* の mRNA 量を比較した結果、DsrA を過剰発現している $\Delta acrB$ /pdsrA 株では、*mdtEF* 遺伝子の転写量が 10 倍以上増大した (図 4-2 において *mdtE* と記載)。通常培養条件下で唯一、恒常的に発現している *acrAB* 遺伝子の転写量には変化がなかった (図 4-2 におい

て *acrA* と記載)。また、*mdtEF* 遺伝子を欠損させた株では、DsrA 過剰発現による多剤耐性化が起こらなかったことから (表 4-2)、DsrA を介した多剤耐性化には、MdtEF-TolC 異物排出システムが関与していることが明らかとなった。

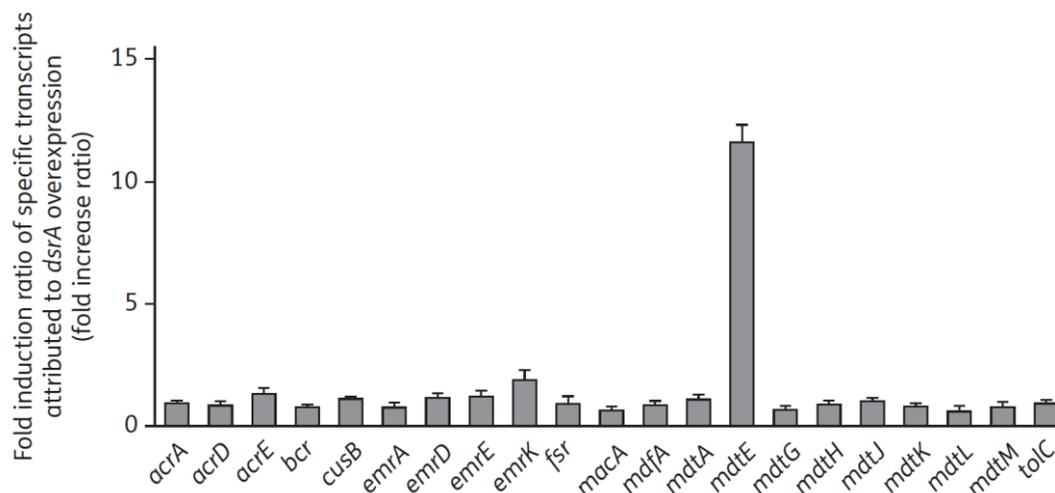


図 4-2. DsrA 過剰発現による異物排出トランスポーター遺伝子の転写量変化データとエラーバーはそれぞれ、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

3-5. DsrA を介した多剤耐性化に関与する因子

mdtEF 遺伝子は RpoS によって制御されていること^{62,63}、DsrA は RpoS の合成を促進すること⁵⁷がこれまでに報告されている。そこで、この DsrA を介した多剤耐性化において、RpoS がどのような役割を果たしているのか調べた。 $\Delta\text{acrB}\Delta\text{rpoS}$ 株では、DsrA 過剰発現による多剤耐性化は起きず (表 4-2)、*mdtEF* 遺伝子転写量の有意な増大も見られなかった (DsrA 過剰発現によって 1.6 ± 0.20 倍の増加)。これらの結果から、DsrA が RpoS を経由して多剤耐性化を引き起こしていることが示された。

DsrA は、*hns* 遺伝子の mRNA と結合し、H-NS タンパク質の発現を抑制することが報告されている⁶⁴。また、H-NS は *acrEF* および *mdtEF* 遺伝子の転写を強力に抑制していることが知られている¹⁷。*hns* 遺伝子の欠損は、Nishino らの報告同様¹⁷、 ΔacrB 株に高度な多剤耐性を与え (表 4-2)、その耐性能の上昇は DsrA 過剰発現によるものよりも大きかった (表 4-2)。DsrA 過剰発現株で *acrEF* 遺伝子の転写量増大が見られなかった結果も含め (図 4-2 において *acrE* と記載)、DsrA は H-NS の発現を抑制することが報告されているものの、DsrA の過剰発現では、H-NS による *acrEF* および *mdtEF* 遺伝子の強力な転写抑制を解除できないことが示された。DsrA 過剰発現株は、両遺伝子の転写抑制に必要な H-NS を、依然として保持しているものと考えられる。以上の結果より、DsrA 過剰発現による *mdtEF* 遺伝子の転写量の増大は、主に RpoS 経路に依存していることが明らかとなった。

第4節 考察

本章では、DsrA が RpoS (シグマ因子 σ^S) を介して MdtEF の転写を促進することで、オキサシリン、クロキサシリン、エリスロマイシン、ローダミン 6G、ノボビオシンに対する耐性を上昇させることを見出し、DsrA が多剤耐性化に寄与していることを明らかにした。DsrA は、諸言で述べた莢膜多糖合成、酸耐性、病原性への関与だけでなく、多剤耐性の制御因子としても重要な役割を果たしており、第三章で述べた Hfq 同様、病原性と薬剤耐性の両方を抑えるための注目すべき創薬ターゲットであることが明らかとなった。

また、本章および第三章の結果から、sRNA による異物排出トランスポーターの発現制御機構というものの存在が明らかとなった。異物排出トランスポーターの発現そのものを抑える新たなタイプの薬剤開発に向け、この制御機構が宿主内でどのように働いているのか解明するため、引き続き詳細な解析を進めていきたい。

第五章

サルモネラ異物排出トランスポーター AcrD の機能における AcrA の役割

第1節 諸言

基質認識の幅広さと強力な排出能力によって、最も高度な多剤耐性化を引き起こす RND 型異物排出トランスポーターは、膜融合タンパク質 (MFP) および外膜チャネルと三者複合体を形成し、外膜外への異物排出が容易に行える RND 型異物排出システムを形作っている。

細菌のゲノム配列の決定により、細菌中の推定薬剤耐性遺伝子を探索することが可能となり^{65,66}、近年の研究では、サルモネラが *AcrAB-TolC*、*AcrD-TolC*、*AcrEF-TolC*、*MdtABC-TolC*、*MdsABC* の 5 つの RND 型異物排出システムをもつことが示された (図 5-1)⁴。サルモネラにおいて、*MdsABC* 以外の RND 型異物排出システムには外膜チャネル *TolC* が必要であり、*MdsABC* は外膜チャネルとして *MdsC* または *TolC* のいずれかを必要とすることが分かっている⁶⁷。

サルモネラの 5 つの RND 型異物排出トランスポーターの遺伝子のうち、*acrB*、*acrF*、*mdtBC*、*mdsB* の 4 つは、同じオペロン上に、その機能に必要な MFP (それぞれ *acrA*、*acrE*、*mdtA*、*mdsA*) もコードしている (図 5-1)。しかしながら、*acrD* 遺伝子の近くには MFP 遺伝子が存在しておらず、*AcrD* の機能に必要な MFP は未だ分かっていない (図 5-1)。そこで本章では、多数の遺伝子欠損株および形質転換株を用いた詳細な解析を行い、サルモネラの *AcrD-TolC* 異物排出システムにおける MFP の同定を行った。

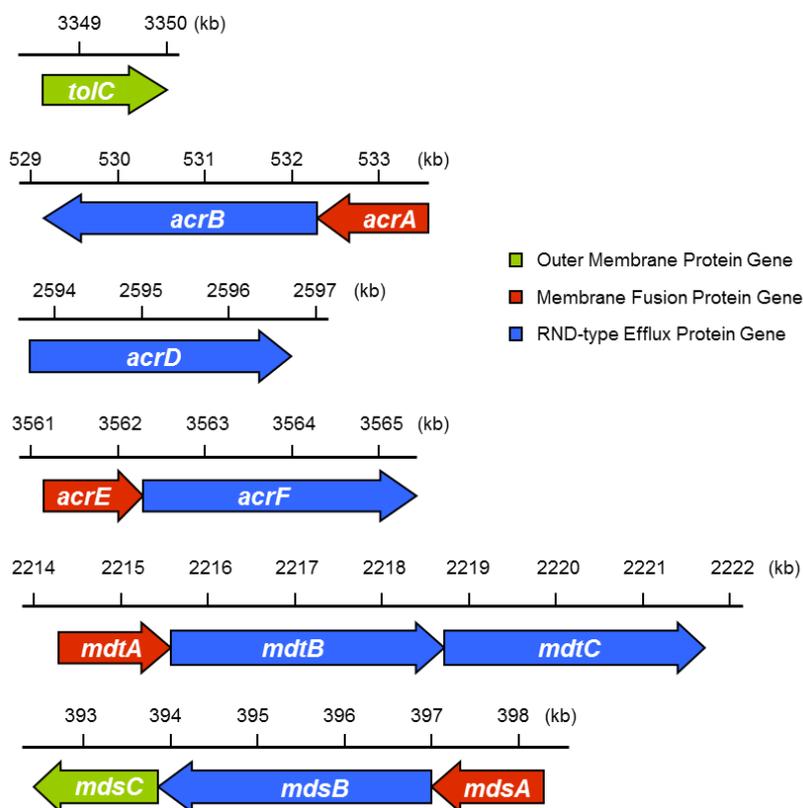


図 5-1. サルモネラ RND 型異物排出システムの遺伝子群

第2節 方法

2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件

サルモネラ野生株として *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028s 株¹⁴を使用し、その他の菌株は ATCC14028s 株を親株として、Datsenko らの方法により構築した¹⁵。本章で使用した菌株およびプラスミドを、表 5-1 に示す。長期保存する菌株は、10% skim milk 溶液に保存して -80°C で保存した。長期保存するプラスミドは、滅菌 Milli-Q 水に溶解して -30°C で保存した。菌株は、LB 培地 (Difco™ LB broth, Miller: 1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.0% NaCl)¹⁶ を用いて 37°C で培養した。

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strains		
ATCC 14028s	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium wild type	Fields <i>et al.</i> (1986)
NKS1202	Δ <i>acrB</i>	This study
NKS1254	Δ <i>acrB</i> /pACYC177Km ^R	This study
NKS1255	Δ <i>acrB</i> /p <i>acrA</i>	This study
NKS1235	Δ <i>acrB</i> /pHSG398	This study
NKS1236	Δ <i>acrB</i> /p <i>acrD</i>	This study
NKS234	Δ <i>acrAB</i>	This study
NKS1252	Δ <i>acrAB</i> /pACYC177Km ^R	This study
NKS1238	Δ <i>acrAB</i> /pHSG398	This study
NKS1253	Δ <i>acrAB</i> /pACYC177Km ^R +pHSG398	This study
NKS1240	Δ <i>acrAB</i> /p <i>acrA</i>	This study
NKS1241	Δ <i>acrAB</i> /p <i>acrD</i>	This study
NKS1242	Δ <i>acrAB</i> /p <i>acrA</i> +p <i>acrD</i>	This study
NKS1245	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i>	This study
NKS1246	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i> /pACYC177Km ^R	This study
NKS1247	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i> /pHSG398	This study
NKS1248	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i> /pACYC177Km ^R +pHSG398	This study
NKS1249	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i> /p <i>acrA</i>	This study
NKS1250	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i> /p <i>acrD</i>	This study
NKS1251	Δ <i>acrAB</i> Δ <i>acrD</i> /p <i>acrA</i> +p <i>acrD</i>	This study
NKS233	Δ <i>tolC</i>	This study
NKS1243	Δ <i>tolC</i> /pHSG398	This study
NKS1244	Δ <i>tolC</i> /p <i>acrD</i>	This study
Plasmids		
pKD46	Red recombinase expression plasmid, Ap ^R	Datsenko and Warner (2000)
pCP20	rep _{pSC101} ^t Ap ^R Cm ^R <i>cI857</i> eP _R <i>flp</i>	Datsenko and Warner (2000)
pACYC177	vector; Ap ^R , Km ^R	MBI Fermentas
pACYC177Km ^R	vector; Km ^R	This study
p <i>acrA</i>	<i>acrA</i> gene cloned into pACYC177, Km ^R	This study
pHSG398	vector; derivative of pUC18 containing Cm ^R in place of Ap ^R	Takara Bio Inc.
p <i>acrD</i>	<i>acrD</i> gene cloned into pHSG398, Cm ^R	This study

表 5-1. 実験に使用した菌株およびプラスミド

2-2. 最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定

使用した菌株の各薬剤に対する MIC は、オキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、カルベニシリン、スルベニシリン、アズトレオナム、SDS、ノボビオシンのいずれかを様々な濃度で含有する LB 寒天培地を用いて測定した。寒天培地は Nishino らの方法に従い、寒天平板培地希釈法によって調製した¹⁷。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 10^5 cfu/ μ L の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター (佐久間製作所) を用いて各寒天培地に接種し、37°C で 20 時間培養後、細菌の増殖を示すコロニーの有無を調べた。各薬剤に対する MIC は、細菌の増殖が阻害され、コロニーが観察されなかった最小の化合物濃度とした。

第 3 節 結果

3-1. 多剤耐性における AcrD 過剰発現の効果

多剤耐性における AcrD 過剰発現の効果を解析しやすくするため、サルモネラが通常培養条件下で唯一、恒常的に発現している異物排出トランスポーター AcrB を欠損させた ATCC14028s 株を構築した。多剤に対して感受性となった Δ acrB 株に、pHSG398 ベクターを用いて構築した AcrD 過剰発現プラスミドを導入した。AcrD を過剰発現している Δ acrB/pacrD 株は、空ベクターを保有する Δ acrB/pHSG398 株に比べ、オキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、カルベニシリン、スルベニシリン、アズトレオナム、SDS、ノボビオシリンに対する耐性が上昇した (表 5-2)。

2006、2010 年に AcrD 過剰発現の効果を報告した Nishino らは、耐性マーカーとして β -ラクタマーゼ遺伝子を有する pUC118 ベクターを用いて、AcrD 過剰発現プラスミドを構築していた。そのため、SDS、ノボビオシリンに対する耐性上昇は確認できたものの、オキサシリン等の β -ラクタム系抗菌薬に対する AcrD 過剰発現の効果は不明であった^{4,67}。本章では、クロラムフェニコール耐性マーカーを有する pHSG398 ベクターを用いたため、SDS、ノボビオシリンに加え、AcrD 過剰発現によってオキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、カルベニシリン、スルベニシリン、アズトレオナムのような β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性も上昇することを明らかにすることができた。

Strain	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)							
	OXA	CLX	NAF	CAR	SB	ATM	SDS	NOV
Wild type	512	512	1024	4	8	0.031	>65536	256
ΔacrB	2	4	8	1	2	0.031	256	2
$\Delta\text{acrB/pACYC177Km}^{\text{R}}$	2	4	8	1	2	0.031	256	2
$\Delta\text{acrB/pacrA}$	2	4	8	1	2	0.031	256	2
$\Delta\text{acrB/pHSG398}$	2	4	8	1	2	0.031	256	2
$\Delta\text{acrB/pacrD}$	32	64	128	16	128	0.25	65536	16
ΔacrAB	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB/pACYC177Km}^{\text{R}}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB/pHSG398}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB/pACYC177Km}^{\text{R}}+\text{pHSG398}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB/pacrA}$	2	4	8	1	2	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB/pacrD}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB/pacrA+pacrD}$	32	32	128	8	64	0.25	65536	8
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD/pACYC177Km}^{\text{R}}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD/pHSG398}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD/pACYC177Km}^{\text{R}}+\text{pHSG398}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD/pacrA}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD/pacrD}$	1	2	4	0.5	1	0.031	256	2
$\Delta\text{acrAB}\Delta\text{acrD/pacrA+pacrD}$	16	32	128	8	64	0.25	65536	4
ΔtolC	0.25	0.25	0.5	0.5	1	0.031	32	0.5
$\Delta\text{tolC/pHSG398}$	0.25	0.25	0.5	0.5	1	0.031	32	0.5
$\Delta\text{tolC/pacrD}$	0.25	0.25	0.5	0.5	1	0.031	32	0.5

Abbreviations: ATM, aztreonam; CLX, cefoxitin; CAR, carbenicillin; NAF, nafcillin; NOV, novobiocin; OXA, oxacillin; SB, sulbenicillin; SDS, sodium dodecyl sulfate. Values in bold are larger than those of the corresponding parental strains. MIC determinations were repeated at least three times.

表 5-2. DsrA 過剰発現が各遺伝子欠損株の薬剤耐性に与える影響

3-2. AcrAB-TolC システムの構成成分と AcrD の関係

RND 型異物排出トランスポーター AcrD の機能に必要な MFP を決定するため、通常培養条件下で唯一、恒常的に発現している AcrAB-TolC システムに注目した。AcrAB-TolC システムの MFP である AcrA および外膜チャネルである TolC を欠損した株を構築し、AcrD 過剰発現の効果を調べた。 ΔacrB 株の結果とは異なり、 ΔacrAB 株および ΔtolC 株では、AcrD を過剰発現させても多剤耐性化は起こらなかった (表 5-2)。これらの結果は、AcrD による薬剤排出に、AcrA および TolC タンパク質の存在が必要であることを示している。

3-3. 各遺伝子欠損株に対する AcrA 過剰発現の効果

MIC 測定において、 ΔacrAB 株は、 ΔacrB 株と比較してオキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、カルベニシリン、スルベニシリンに対する感受性がわずかに高いことが観察された (表 5-2)。AcrA 過剰発現プラスミドを導入した $\Delta\text{acrAB/pacrA}$ 株は、 ΔacrB 株と同等の耐性能を示すことも確認した (表 5-2)。この結果は、AcrA が AcrB だけではなく、他の薬剤耐性因子の MFP として機能する可能性を示している。

通常培養条件下での発現量が非常に低いとされている AcrD タンパク質⁴が、 $\Delta acrAB$ 株と $\Delta acrB$ 株との間に MIC の差を生じさせているのかどうかを判断するため、AcrA 過剰発現プラスミドを $\Delta acrAB$ 株および $\Delta acrAB\Delta acrD$ 株へ導入した。プラスミド導入前の $\Delta acrAB$ 株と $\Delta acrAB\Delta acrD$ 株の薬剤耐性能は同等であったが、 $\Delta acrAB$ 株では AcrA の過剰発現によって薬剤耐性が上昇したのに対し、 $\Delta acrAB\Delta acrD$ 株の薬剤耐性は変化しなかった (表 5-2)。これらの結果から、 $\Delta acrB$ 株に比べ $\Delta acrAB$ 株のほうが感受性になるのは、*acrA* 遺伝子の欠損に伴う、ゲノムから微量に発現している AcrD の機能喪失に起因していることが明らかとなった。

3-4. 各遺伝子欠損株に対する AcrD および AcrA 共発現の効果

AcrA が、AcrD-TolC 異物排出システムの MFP として機能するかどうかをさらに検証するため、*pacrD* および *pacrA* の 2 つのプラスミドを、 $\Delta acrAB$ 株に同時に導入した。AcrD 単独過剰発現はこの株に全く耐性を与えないのに対し、AcrD および AcrA の共発現は、試験した 8 種類全ての化合物に対する薬剤耐性を上昇させた (表 5-2)。さらに、AcrD および AcrA の共発現は、 $\Delta acrAB\Delta acrD$ 株にも多剤耐性を与えた (表 5-2)。これらの結果から、RND 型異物排出トランスポーター AcrD は、MFP として AcrB の遺伝子近傍にコードされている AcrA を利用することで、多剤耐性を引き起こすことが明らかとなった (図 5-2)。

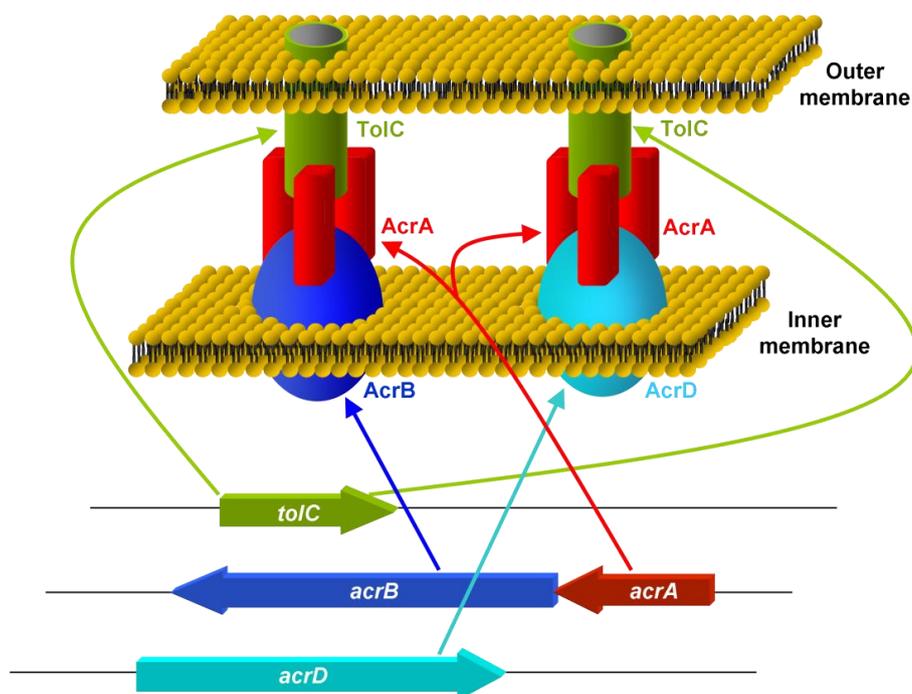


図 5-2. サルモネラにおける AcrA 利用モデル

第4節 考察

本章では、サルモネラの RND 型異物排出トランスポーター AcrD が、 β -ラクタム系抗菌薬を含む様々な化合物に対する耐性に関与し、MFP として AcrA を必要とすることを明らかにした。また、染色体から発現した AcrD が、低い発現レベルにもかかわらず、サルモネラの多剤耐性に寄与していることが示された。

AcrD が、異なるオペロンにコードされた AcrA を MFP として利用する理由の1つとして、AcrD には、恒常的に発現している AcrB に異常が起きたときの、代用トランスポーターとしての役割があるということが考えられる。AcrD の基質特異性は AcrB と多くの部分で重なっているため^{3,4,61,67}、何らかの原因で AcrB に異常が生じた場合、AcrD は速やかに AcrA および TolC と複合体を形成し、失われた AcrAB-TolC 異物排出システムの機能を補う可能性がある。

いずれにせよ、AcrA が RND 型異物排出システムの MFP として、異なる排出システム間で共通の役割を果たしていることは間違いない。このように、ゲノム上で使い回されている耐性因子の機能を阻害できれば、複数の耐性メカニズムを同時に抑制できる可能性があるため、今後創薬ターゲットとして注目していく必要があると考えている。

第六章

異物排出トランスポーターの 阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明

第1節 諸言

これまでに、複数の製薬企業・研究所において異物排出トランスポーターの阻害剤開発が行われてきたが⁶⁸、有効な阻害剤は得られておらず、未だに臨床で使用できるものは存在していない^{7,8}。ピリドピリミジン誘導体 ABI-PP (D13-9001) は、大腸菌異物排出トランスポーターAcrB および緑膿菌異物排出トランスポーターMexB を阻害できることが明らかとなったが、多剤耐性緑膿菌のもう 1 つの有力な原因である緑膿菌異物排出トランスポーターMexY を全く阻害できなかつたため^{69,70}、多剤耐性緑膿菌の治療薬として市場に出ることはなかった。私は 2011 年に、基質薬剤は、異物排出トランスポーターの基質輸送経路上にある 2 つの基質結合部位、近位ポケット (proximal pocket) と遠位ポケット (distal pocket) を順に通過して細胞外へ排出されるという蠕動機構 (Peristaltic Mechanism) を明らかにした参考論文²。そこで本章では、阻害剤である ABI-PP の結合様式を詳細に調べ、MexY に対して ABI-PP が効果を示さない理由を解明し、分子標的創薬による新規治療薬開発のための分子基盤の構築を目指した。

第2節 方法

2-1. 菌株・プラスミドおよび培養条件

大腸菌野生株として *Escherichia coli* MG1655 株⁵⁹ を使用し、その他の菌株は MG1655 株を親株として、Datsenko らの方法により構築した¹⁵。本章で使用した菌株およびプラスミドを、表 6-1 に示す。変異導入には、In-Fusion[®] Advantage PCR Cloning Kits w/NucleoSpin[®] (TaKaRa Bio 社) を用いた。長期保存する菌株は、10% skim milk 溶液に保存して-80°C で保存した。長期保存するプラスミドは、滅菌 Milli-Q 水に溶解して-30°C で保存した。菌株は、LB 培地 (Difco[™] LB broth, Miller: 1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1.0% NaCl)¹⁶ を用いて 37°C で培養した。

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strains		
MG1655	wild-type	Blattner <i>et al.</i> (1997)
NKE96	Δ acrB	This study
NKE1533	Δ acrB/pBAD33	This study
NKE1534	Δ acrB/pBADacrB	This study
NKE1579	Δ acrB/pBADacrB F178W	This study
NKE1862	Δ acrB/pBADacrB F178W V139A	This study

NKE128	$\Delta acrB \Delta tolC$	This study
NKE1629	$\Delta acrB \Delta tolC / pMMB67HE$	This study
NKE1630	$\Delta acrB \Delta tolC / pMexAB^{hisM}$	This study
NKE1631	$\Delta acrB \Delta tolC / pMexAB(F178W)^{hisM}$	This study
NKE1632	$\Delta acrB \Delta tolC / pMexXY^{hisM}$	This study
NKE1633	$\Delta acrB \Delta tolC / pMexXY(W177F)^{hisM}$	This study
NKE1854	$\Delta acrB \Delta tolC / pMexXY(I138A)^{hisM}$	This study
Plasmids		
pKD46	Red recombinase expression plasmid, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pKD3	rep _{R6Kγ[p]} Ap ^R FRT Cm ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	rep _{R6Kγ[p]} Ap ^R FRT Km ^R FRT	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	rep _{pSC101} ^{ts} Ap ^R Cm ^R <i>cI857λP_Rflp</i>	Datsenko and Wanner (2000)
pBAD33	rep _{p15A/M13} Cm ^R	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBADacrB	<i>acrB</i> gene cloned into pBAD33, Cm ^R	This study
pBADacrB F178W	F178W mutant <i>acrB</i> gene cloned into pBAD33, Cm ^R	This study
pMMB67HE	IncQ, tac promoter Ap ^R	Mokhonov <i>et al.</i> (2004)
pMexAB ^{hisM}	<i>mexA</i> , <i>mexB</i> and <i>oprM</i> genes cloned into pMMB67HE, Ap ^R	Mokhonov <i>et al.</i> (2004)
pMexAB(F178W) ^{hisM}	<i>mexA</i> , F178W mutant <i>mexB</i> and <i>oprM</i> genes cloned into pMMB67HE, Ap ^R	This study
pMexXY ^{hisM}	<i>mexX</i> , <i>mexY</i> and <i>oprM</i> genes cloned into pMMB67HE, Ap ^R	Mokhonov <i>et al.</i> (2004)
pMexXY(W177F) ^{hisM}	<i>mexX</i> , W177F mutant <i>mexY</i> and <i>oprM</i> genes cloned into pMMB67HE, Ap ^R	This study

表 6-1. 実験に使用した菌株およびプラスミド

2-2. 最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) 測定

使用した菌株の各薬剤に対する MIC は、オキサシリン、エリスロマイシン、ドキシソルピシン、ミノサイクリン、ローダミン 6G、臭化エチジウムのいずれかを様々な濃度で含有する LB 寒天培地を用いて測定した。寒天培地は Nishino らの方法に従い、寒天平板培地希釈法によって調製した¹⁷。菌株を 37°C の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 10⁵ cfu/μL の濃度に希釈した後、マルチポイント・イノキュレーター (佐久間製作所) を用いて各寒天培地に接種し、37°C で 20 時間培養後、細菌の増殖を示すコロニーの有無を調べた。MIC は、細菌の増殖が阻害され、コロニーが観察されなかった最小の化合物濃度とした。

2-3. 増殖曲線測定

菌株を 37°C の LB 液体培地で一晚培養し、同じ液体培地で OD₆₀₀ が 0.05 になるように希釈した。終濃度が 10mM になるように、希釈菌液に 1M 滅菌アラビノース溶液を加え、希釈菌液を 96 ウェルのポリ塩化ビニル製のプレートに 200μL 分注した。必要であれば、ここで様々な濃度の各薬剤を加えた。細菌の増殖度合を、Versa Max マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社) を使用して、37°C で振とうしながら 15 分おきに 600nm で測定した。

2-4. ドキソルビシン蛍光を利用した排出活性測定

菌株を 37°C の LB 液体培地で一晚培養し、10mM アラビノース含有 LB 液体培地 20mL に前培養液 100μL を接種した。菌液の OD₆₀₀ が 0.3 に達するまで 37°C で振とう培養後、菌液を 50 mL チューブに移し、遠心分離により集菌した。上清除去後、MgSO₄ 含有リン酸バッファー 20mL を加えて vortex し、遠心分離により集菌した。この洗浄操作を 2 回繰り返した。上清をデカンテーションで除去し、OD₆₀₀ が 18 となるよう同バッファーで懸濁した。洗浄後の菌液を黒色 96 ウェルプレートの各ウェルに 100μL ずつ分注し、終濃度が 10mM になるように、1M 滅菌アラビノース溶液を加えた。終濃度が 28.6μM になるようにドキソルビシンを加えた。必要であれば、終濃度が 28.6μM になるように阻害剤 ABI-PP をさらに加えた。薬剤を加えた後、素早く SH-8100 マイクロプレートリーダー (Corona Electric 社) にセットし、37°C で振とうしながら、30 秒おきに Ex 480nm-Em 600nm の条件で蛍光を測定した。

2-5. UPLC-MS/MS を用いた排出活性測定

菌株を 37°C の LB 液体培地で一晚培養し、10mM アラビノース含有 LB 液体培地 150mL に前培養液 750μL を接種した。菌液の OD₆₀₀ が 0.3 に達するまで 37°C で振とう培養後、菌液を 50 mL チューブに移し、遠心分離により集菌した。上清除去後、MgSO₄ 含有リン酸バッファー 20mL を加えて vortex し、遠心分離により集菌した。この洗浄操作を 2 回繰り返した。上清をデカンテーションで除去し、OD₆₀₀ が 18 となるよう同バッファーで懸濁した。懸濁液を 1.5mL チューブに 150μL ずつ分注し、終濃度が 10mM になるように、1M 滅菌アラビノース溶液を加え、終濃度が 28.6μM になるように測定薬剤を加えた。37°C で振とうしながら 0、10、30、60 分培養し、遠心分離後の上清を採取した。フィルター滅菌後、Waters Acquity BEH C18 column (2.1 × 100 mm i.d., 1.7 μm; Waters 社) と Waters Acquity UPLC[®] system (Waters 社) を用いてサンプルの分離を行い、Waters Quattro Premier[™] XE triple quadrupole mass spectrometer (Micromass MS Technologies 社) によって、培養上清中の薬剤を定量した。

第3節 結果

3-1. 阻害剤 ABI-PP の結合様式とその阻害メカニズムの解析

当研究室において AcrB および MexB と ABI-PP との共結晶を解析したところ、ABI-PP は基質であるミノサイクリンやドキシソルビシンとは異なり、基質輸送経路 (Substrate-translocation channel) から分岐した非常に狭い疎水性領域 (Hydrophobic trap) に深く入り込んで結合しており、異物排出トランスポーターの遠位ポケット内部に、阻害剤結合ピットの存在が示唆された (図 6-1)。

そこでまず、UPLC-MS/MS を用いた排出活性測定により、ABI-PP が AcrB の基質薬剤となり得るかどうか調べた。AcrB の基質薬剤であるドキシソルビシン (DOX) の結果 (図 6-2a) とは大きく異なり、ABI-PP (D13-9001) の培養上清中の濃度は、AcrB を発現していない $\Delta acrB/pBAD33$ 株 (図 6-2 中、 $\Delta acrB$ と表示) および AcrB を発現している $\Delta acrB/pBADacrB$ 株 (図 6-2 中、*pacrB* と表示) の両方において、時間依存的に減少していた (図 6-2c)。これは、AcrB の基質薬剤ではないカルベニシリン (CAR) の結果と同じ傾向であるため (図 6-2b)、AcrB 発現の有無に関わらず、両株の菌体内に ABI-PP が蓄積していることを示しており、ABI-PP が AcrB によって全く排出されないことが明らかとなった。

ABI-PP による AcrB の阻害メカニズムは、基質との競合阻害ではなく、私が本章で阻害剤結合ピットと名付けた部位に ABI-PP が強く結合して離れないことで、異物排出トランスポーター AcrB および MexB の蠕動機構を抑制し、基質の排出を阻害していると考えられる。

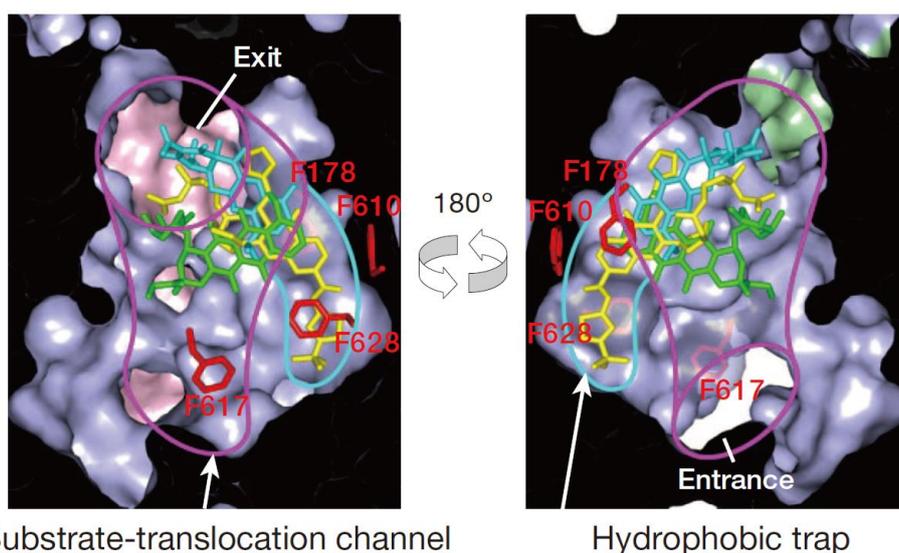


図 6-1. AcrB に対する ABI-PP・ミノサイクリン・ドキシソルビシンの結合様式
ABI-PP を黄色、ミノサイクリンを水色、ドキシソルビシンを緑色で示す。

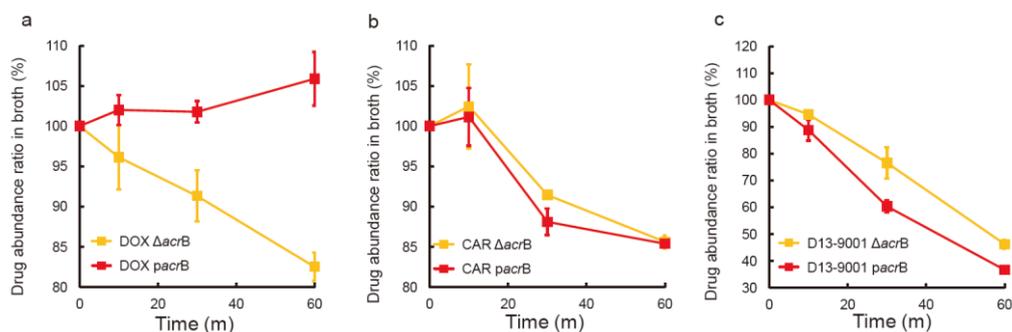


図 6-2. 培養上清中の薬剤濃度測定による菌体内薬剤蓄積量および排出活性の解析

排出活性がある場合、上清中の薬剤濃度はほぼ一定に維持されるが、活性がないと薬剤が菌体内に取り込まれ、上清中の濃度は減少する。データとエラーバーはそれぞれ、3回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

3-2. 変異導入による各異物排出トランスポーターの阻害剤結合ピットの解析

共結晶構造を用いて ABI-PP の結合部位を詳細に調べたところ、AcrB・MexB の阻害剤結合ピットの中央部分に存在するフェニルアラニン (F178) が、MexY の同位置ではトリプトファン (W177) になっており、その大きな側鎖がピットを占有することで、ABI-PP のピット内部への侵入および結合を阻止していると考えられた (図 6-3)。

そこで、阻害剤結合ピット中央部分のアミノ酸に変異を導入した各異物排出トランスポーター変異体を発現する株を、複数構築した。6μg/mL のエリスロマイシン含有 LB 液体培地中では、MG1655 野生株は正常に生育できるが、 $\Delta acrB$ 株および $\Delta acrB\Delta tolC$ 株は生育が阻害される (図 6-4a)。また、MG1655 野生株はドキシソルビシンの排出が可能であるため、培養上清中のドキシソルビシン濃度が維持されるが、 $\Delta acrB$ 株および $\Delta acrB\Delta tolC$ 株ではドキシソルビシン濃度が経時的に減少する (図 6-4f)。この測定系を用いて、*acrB* 遺伝子欠損を正常型 AcrB 発現プラスミドで補った $\Delta acrB/pBADacrB$ 株に対する ABI-PP の阻害効果を調べた。エリスロマイシン含有 LB 液体培地において、 $\Delta acrB/pBADacrB$ 株の生育は、ABI-PP の添加によって濃度依存的に強く阻害された (図 6-4b)。また、ABI-PP の添加によって同株の培養上清中のドキシソルビシン濃度も時間依存的に減少し、ABI-PP によって AcrB の薬剤排出が阻害されていることが示された (図 6-4g)。一方、ピット中央のフェニルアラニンを、大きな側鎖をもつトリプトファンに置換した AcrB_F178W 変異体発現株 $\Delta acrB/pBADacrB$ F178W では、ABI-PP による生育阻害および排出阻害がともに見られず (図 6-4c,h)、ABI-PP が効かなくなっていることが明らかとなった。

さらに、元々 ABI-PP による阻害を受けない緑膿菌異物排出トランスポーター MexY を発現する大腸菌を用いて、同様の実験を行った。ここでは、大腸菌株において緑膿菌 MexY が正常に機能するよう、緑膿菌 MexXY-OprM 異物排出システム全体を発現するプラスミド

pMexXY^{his}M を Δ acrB Δ tolC 株に導入した。また、MexY のエリスロマイシン排出能は AcrB よりも高いため、増殖曲線測定では 16 μ g/mL のエリスロマイシン含有 LB 液体培地を用いた。正常型 MexY を発現する Δ acrB Δ tolC/pMexXY^{his}M 株では、ABI-PP による生育阻害および排出阻害がともに見られないものの (図 6-4d,i)、トリプトファンをフェニルアラニンに置換した MexY_W177F 変異体発現株 Δ acrB Δ tolC/pMexXY(W177F)^{his}M は、ABI-PP による阻害を受けることが示された (図 6-4e,j)。また、MIC 測定の結果、変異導入によって AcrB・MexB・MexY の基質である各薬剤に対する耐性は変化せず、これらの変異が異物排出トランスポーターの基質認識や構造に大きな影響を与えないことを確認している (表 6-2)。

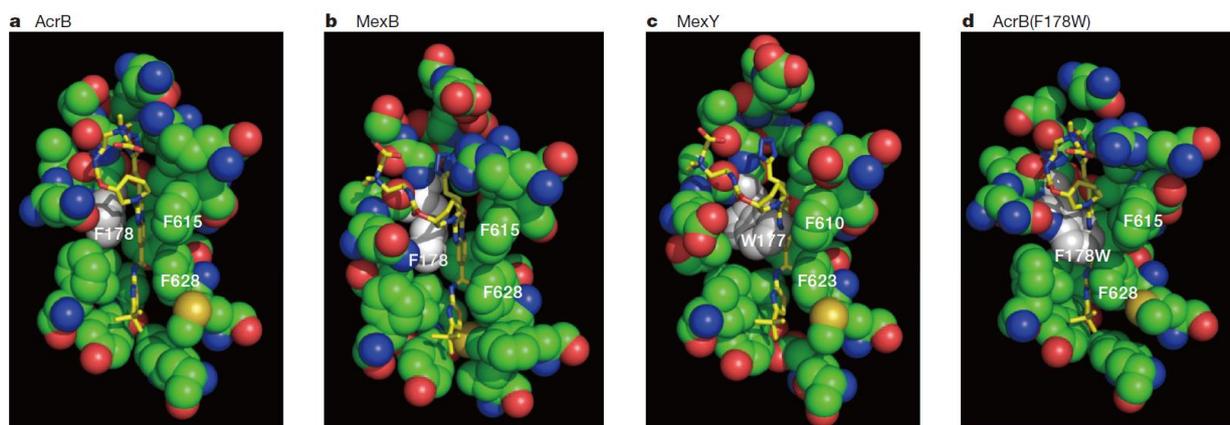


図 6-3. 各異物排出トランスポーターの阻害剤結合ピットの比較

ピット中央のフェニルアラニンとトリプトファンの側鎖を白色、ABI-PP を黄色で示す。便宜上、MexY モデルには MexB 結合型 ABI-PP を、AcrB_F178W モデルには AcrB 結合型 ABI-PP を重ね合わせている。

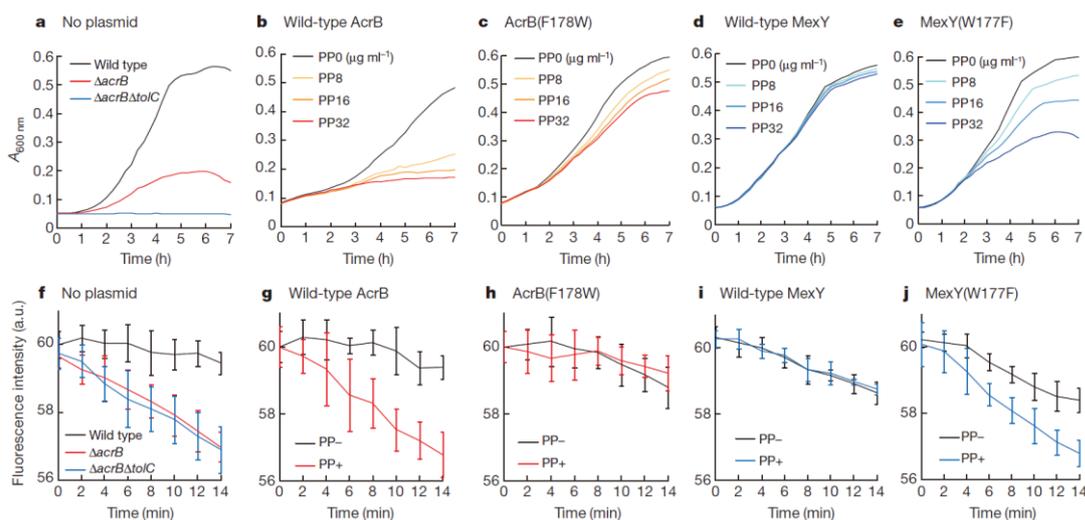


図 6-4. 各変異体発現株に対する ABI-PP の効果

上段：エリスロマイシン存在下での ABI-PP (PP) の細菌増殖抑制効果

本実験は、少なくとも 3 回繰り返した。

下段：培養上清中のドキシソルビシン濃度測定による ABI-PP (PP) の薬剤排出阻害効果
データとエラーバーはそれぞれ、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

Strain	Minimum inhibitory concentration, MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	OXA	EM	DXR	MINO	R6G	EBR
Wild type	256	64	>512	4	2048	>512
ΔacrB	1	4	4	0.25	8	8
$\Delta\text{acrB/pBAD33}$	1	4	4	0.25	8	8
$\Delta\text{acrB/pBADacrB}$	256	64	>512	4	512	512
$\Delta\text{acrB/pBADacrB F178W}$	256	64	>512	4	512	512
$\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC}$	0.25	2	1	0.25	4	4
$\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC/pMMB67HE}^*$	1024	2	1	0.25	4	4
$\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC/pMexAB}^{\text{hisM}}$	8192	32	256	4	256	128
$\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC/pMexAB(F178W)}^{\text{hisM}}$	8192	32	256	4	256	128
$\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC/pMexXY}^{\text{hisM}}$	4096	128	512	4	128	128
$\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC/pMexXY(W177F)}^{\text{hisM}}$	4096	128	512	4	128	128

OXA, oxacillin; EM, erythromycin; DXR, doxorubicin; MINO, minocycline; R6G, rhodamine 6G; EBR, ethidium bromide. Values in bold indicate the significant increase compared with the corresponding parental strains. MIC determinations were repeated at least 3 times.

*Oxacillin resistance of the transformed cells increased because the resistance marker of pMMB67HE is sulbenicillin^r, which provides resistance against β -lactams including oxacillin.

表 6-2. 各変異体発現株の薬剤感受性

これらの結果から、阻害剤結合ピット中央部分に存在するアミノ酸の大きさによって、ABI-PP に対する感受性が決まると思われたが、唯一予想に反して、フェニルアラニンをトリプトファンに置換した MexB_F178W 変異体発現株 $\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC/pMexAB(F178W)}^{\text{hisM}}$ は、依然として ABI-PP による阻害を受けていた (図 6-5b,d)。

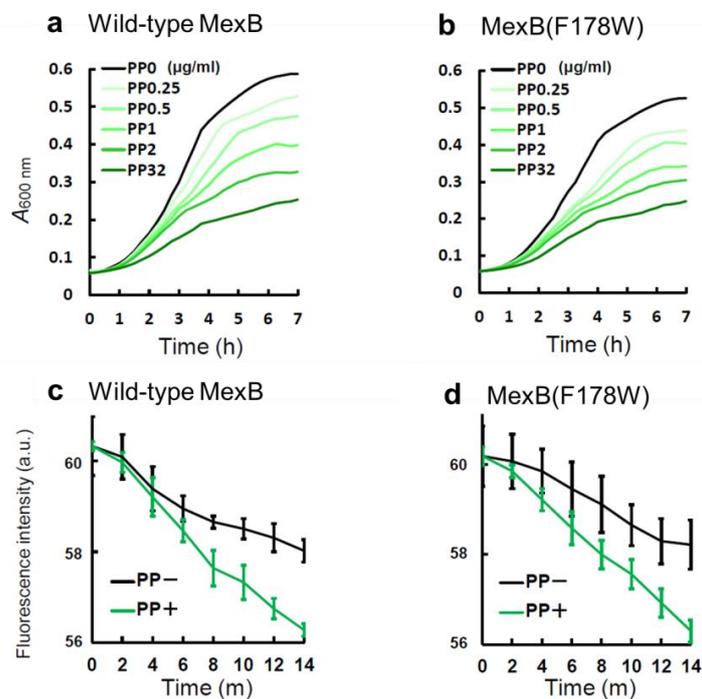


図 6-5. MexB 発現株に対する ABI-PP の効果

上段：エリスロマイシン $6\mu\text{g/ml}$ 存在下での ABI-PP (PP) の細菌増殖抑制効果
本実験は、少なくとも 3 回繰り返した。

下段：培養上清中の DOX 濃度測定による ABI-PP (PP) の薬剤排出阻害効果
データとエラーバーはそれぞれ、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。

3-3. 阻害剤結合ピット内部における立体障害の解析

この原因を調べるため、当研究室において MexB_F178W 変異体と ABI-PP の共結晶化を試した結果、実際に共結晶が得られ、ABI-PP が確かに MexB_F178W 変異体の阻害剤結合ピットに結合していることを確認した (図 6-6a)。詳細に調べると、MexB の阻害剤結合ピットは AcrB・MexY よりも少し大きく、ピット中央にトリプトファンが存在してもピットが占有されず、阻害剤が結合できる場所が残されていることが分かった。

AcrB_F178W や MexY においては、MexB_F178W のようなトリプトファンの配置は、トリプトファン近傍下部に存在する別のアミノ酸との立体障害によって不可能に思われた (図 6-6b,c)。そこで、立体障害を生み出すと考えられるアミノ酸を立体的に小さなアミノ酸アラニンに変異させ、トリプトファン周辺 (図 6-6b,c ではトリプトファンの下部) のスペースをわずかに増加させることで、トリプトファンの位置がずれ、阻害剤がピット内部に入り込んで結合できるようになるのではないかと考えた。AcrB_F178W/V139A 変異体発現株および MexY_I138A 変異体発現株を構築し、ABI-PP による阻害効果を調べた。 $\Delta\text{acrB}/\text{pBADacrB F178W V139A}$ 株および $\Delta\text{acrB}\Delta\text{tolC}/\text{pMexXY(I138A)}^{\text{hisM}}$ 株の生育は、それぞれ $6\mu\text{g/mL}$ 、 $16\mu\text{g/mL}$ のエリスロマイシン含有 LB 液体培地において ABI-PP の添加によって阻害され (図 6-7)、ピット中央にトリプトファンがあるにも関わらず、ABI-PP の阻害を受けるようになることが分かった。これらの結果から、異物排出トランスポーターの阻害剤 ABI-PP に対する感受性は、阻害剤結合ピットにおけるごくわずかな立体障害によって制御されることが明らかとなった。

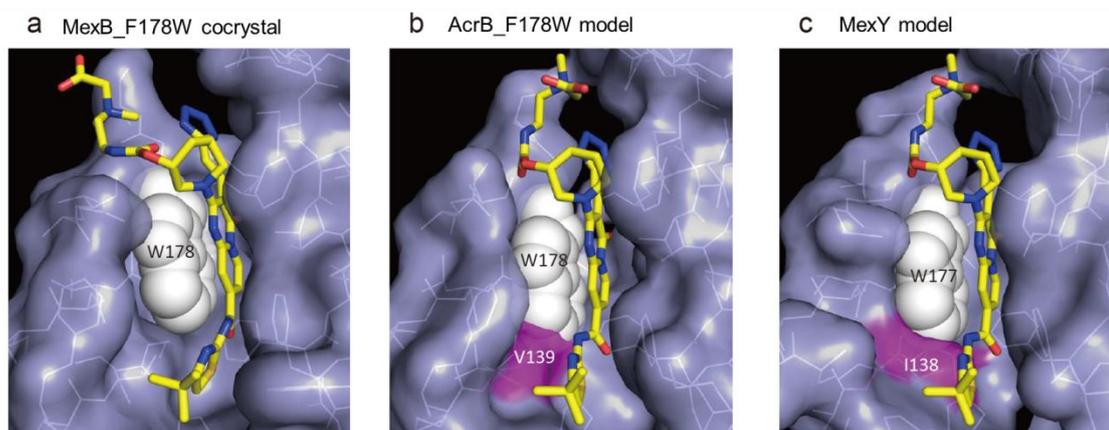


図 6-6. MexB_F178W と ABI-PP の共結晶構造および ABI-PP 強制結合モデルの比較

ピット中央のトリプトファンの側鎖を白色、ABI-PP を黄色、立体障害を生み出すと考えられるアミノ酸側鎖の電子密度表面をピンク色で示す。AcrB_F178W モデルおよび MexY モデルでは、ABI-PP が結合できるようにトリプトファン側鎖を配置しているが、下部のアミノ酸側鎖の電子密度と重なってしまっている。

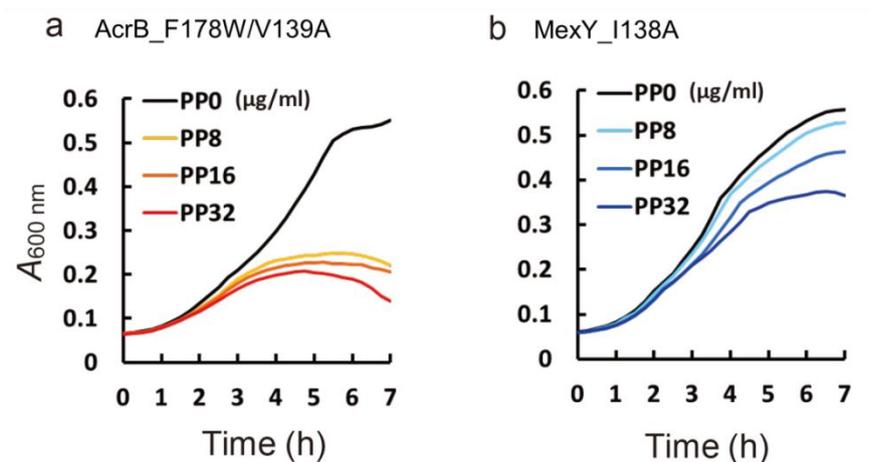


図 6-7. ピット下部のスペースを増大させた変異体に対する ABI-PP の細菌増殖抑制効果
本実験は、少なくとも 3 回繰り返した。

第 4 節 考察

本章の研究により、異物排出トランスポーター阻害剤 ABI-PP が MexY を阻害できない原因は、MexY 阻害剤結合ピット中央のトリプトファンによる立体障害にあることが明らかとなった。この立体障害を回避できるような形の化合物を設計することで、AcrB・MexB のみならず、ABI-PP が阻害できない MexY をも含めたユニバーサルな阻害剤の開発が可能となった。異物排出トランスポーター阻害剤は、耐性菌の薬剤耐性を低下させて抗菌薬による治療を可能にするだけでなく、阻害剤自身には抗菌作用がないことから、阻害剤に対する新たな耐性菌が出現する可能性は非常に低いと考えられている。実際に、長年臨床現場で抗菌薬との合剤という形で使用され、それ自身には抗菌作用がない β -ラクタマーゼ阻害剤に対する耐性菌の出現は、これまでに一例も報告されていない。

また、異物排出トランスポーターはほぼ全ての菌に備わっており、細菌が元々もっている薬剤耐性（自然抵抗性）を生み出す大きな要因となっている。実際に、各菌種の野生株において主要な異物排出トランスポーターの機能を抑えると、様々な抗菌薬に対する自然抵抗性が大幅に低下することが明らかとなっている。さらに、異物排出トランスポーターは、菌種が違っていても非常に似た構造をとっていることが知られている。以上より、優秀なユニバーサル阻害剤が完成すれば、異物排出トランスポーターの高発現とは別の耐性機構（作用点の突然変異による薬剤親和性の低下、修飾酵素・分解酵素による薬剤の不活性化等）を利用している耐性菌も含め、あらゆる菌に効く広域の耐性菌感染症薬になり得る。引き続き異物排出トランスポーター阻害剤に関する詳細な解析を続け、臨床で使える阻害剤の開発につなげていきたい。

総括

1. LPS のコア多糖部分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を明らかにした。また、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. 大腸菌異物排出トランスポーターAcrB および MdtBC は、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。経時的観測を行うことにより、異物排出トランスポーターのバイオフィルム形成維持における重要な役割が分かった。
3. RNA シャペロン Hfq は、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関与していることを明らかにした。Hfq は病原性発現に加えて、多剤耐性化にも寄与し、感染過程における重要な因子であることを示した。
4. sRNA である DsrA は、RpoS (シグマ因子 σ^S) を介して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。Hfq 同様、病原性と薬剤耐性の両方に関与する、感染時に重要な因子であることが分かった。
5. サルモネラ RND 型異物排出トランスポーターAcrD は、AcrB の遺伝子近傍にコードされている AcrA を、MFP として利用することを明らかにした。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。
6. 異物排出トランスポーターの阻害剤感受性は、阻害剤結合部位のごくわずかな立体障害によって決まることを示した。この立体障害を回避する形の化合物を設計することで、ABI-PP が阻害できない MexY をも含めたユニバーサルな阻害剤の開発が可能となった。

現在は上記の結果を踏まえ、異物排出トランスポーターに関する更なる解析を行うと同時に、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、既存の阻害剤 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おり、製薬企業との共同開発を開始した。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、薬剤自然抵抗性の低下やバイオフィルム形成の抑制といった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。今後の研究によって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。

引用文献

1. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ *et al.* Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; **52 Suppl 5**: S397-428.
2. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E *et al.* Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 2002; **419**: 587-93.
3. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5803-12.
4. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2006; **59**: 126-41.
5. Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 834-43.
6. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E *et al.* Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 2006; **443**: 173-9.
7. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**: 910-8.
8. Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 826-33.
9. Nikaido H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resist Updat* 1998; **1**: 93-8.
10. Peterson AA, Fesik SW, McGroarty EJ. Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 230-7.
11. Baucheron S, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Role of TolC and *parC* mutation in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT204. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004; **53**: 657-9.
12. Villagra NA, Hidalgo AA, Santiviago CA *et al.* SmvA, and not AcrB, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2008; **62**: 1273-6.
13. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985; **49**: 1-32.
14. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG *et al.* Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 5189-93.
15. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 6640-5.

16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
17. Nishino K, Yamaguchi A. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 1423-9.
18. Giraud E, Cloeckaert A, Kerboeuf D *et al.* Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1223-8.
19. Li XZ, Zhang L, Poole K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45**: 433-6.
20. Croxatto A, Lauritz J, Chen C *et al.* *Vibrio anguillarum* colonization of rainbow trout integument requires a DNA locus involved in exopolysaccharide transport and biosynthesis. *Environ Microbiol* 2007; **9**: 370-82.
21. Maira-Litran T, Allison DG, Gilbert P. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J Appl Microbiol* 2000; **88**: 243-7.
22. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ *et al.* Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1761-70.
23. Lynch SV, Dixon L, Benoit MR *et al.* Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3650-8.
24. Gillis RJ, White KG, Choi KH *et al.* Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3858-67.
25. Baugh S, Ekanayaka AS, Piddock LJ *et al.* Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012; **67**: 2409-17.
26. Taylor JW, Ott J, Eckstein F. The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucleic Acids Res* 1985; **13**: 8765-85.
27. Yamamoto T, Tanaka M, Nohara C *et al.* Transposition of the oxacillin-hydrolyzing penicillinase gene. *J Bacteriol* 1981; **145**: 808-13.
28. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001; **412**: 442-5.
29. Ma D, Alberti M, Lynch C *et al.* The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* 1996; **19**: 101-12.
30. Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* 1968; **219**: 588-90.
31. Moller T, Franch T, Hojrup P *et al.* Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA

- interaction. *Mol Cell* 2002; **9**: 23-30.
32. Zhang A, Wassarman KM, Ortega J *et al.* The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* 2002; **9**: 11-22.
 33. Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* 2004; **51**: 1525-33.
 34. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 2009; **136**: 615-28.
 35. Tsui HC, Leung HC, Winkler ME. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 1994; **13**: 35-49.
 36. Hansen AM, Kaper JB. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2009; **73**: 446-65.
 37. Casadaban MJ. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 1976; **104**: 541-55.
 38. Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* 1997; **179**: 6228-37.
 39. Elledge SJ, Davis RW. Position and density effects on repression by stationary and mobile DNA-binding proteins. *Genes Dev* 1989; **3**: 185-97.
 40. Miller JH. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
 41. Hirakawa H, Takumi-Kobayashi A, Theisen U *et al.* AcrS/EnvR represses expression of the *acrAB* multidrug efflux genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2008; **190**: 6276-9.
 42. Rahmati S, Yang S, Davidson AL *et al.* Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 677-85.
 43. Sledjeski DD, Whitman C, Zhang A. Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J Bacteriol* 2001; **183**: 1997-2005.
 44. Altuvia S, Zhang A, Argaman L *et al.* The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J* 1998; **17**: 6069-75.
 45. Zhang A, Altuvia S, Tiwari A *et al.* The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J* 1998; **17**: 6061-8.
 46. Majdalani N, Chen S, Murrow J *et al.* Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* 2001; **39**: 1382-94.
 47. Masse E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 4620-5.
 48. Moller T, Franch T, Udesen C *et al.* Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes Dev* 2002; **16**: 1696-706.
 49. Laaberki MH, Janabi N, Oswald E *et al.* Concert of regulators to switch on LEE expression in

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2006; **296**: 197-210.
50. Lease RA, Belfort M. Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol Microbiol* 2000; **38**: 667-72.
 51. Wassarman KM. Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* 2002; **109**: 141-4.
 52. Masse E, Escorcia FE, Gottesman S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 2003; **17**: 2374-83.
 53. Sledjeski D, Gottesman S. A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 2003-7.
 54. Lease RA, Smith D, McDonough K *et al*. The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 6179-85.
 55. Resch A, Afonyushkin T, Lombo TB *et al*. Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the *rpoS* 5'-leader. *RNA* 2008; **14**: 454-9.
 56. Lease RA, Cusick ME, Belfort M. Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple *loci*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 12456-61.
 57. Majdalani N, Cuning C, Sledjeski D *et al*. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 12462-7.
 58. Soper TJ, Woodson SA. The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* 2008; **14**: 1907-17.
 59. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA *et al*. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997; **277**: 1453-74.
 60. Nishino K, Senda Y, Hayashi-Nishino M *et al*. Role of the AraC-XylS family regulator YdeO in multi-drug resistance of *Escherichia coli*. *J Antibiot (Tokyo)* 2009; **62**: 251-7.
 61. Nishino K, Yamada J, Hirakawa H *et al*. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3030-3.
 62. Schellhorn HE, Audia JP, Wei LI *et al*. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 6283-91.
 63. Vijayakumar SR, Kirchoff MG, Patten CL *et al*. RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random *lacZ* fusion mutagenesis. *J Bacteriol* 2004; **186**: 8499-507.
 64. Lease RA, Belfort M. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 9919-24.
 65. Paulsen IT, Sliwinski MK, Saier MH, Jr. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol* 1998; **277**: 573-92.

66. Paulsen IT, Nguyen L, Sliwinski MK *et al.* Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J Mol Biol* 2000; **301**: 75-100.
67. Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1372-6.
68. Lomovskaya O, Watkins W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; **3**: 225-36.
69. Nakayama K, Ishida Y, Ohtsuka M *et al.* MexAB-OprM-specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; **13**: 4201-4.
70. Yoshida K, Nakayama K, Ohtsuka M *et al.* MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg Med Chem* 2007; **15**: 7087-97.

謝辞

本研究（博士論文題目：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）は、大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻 細胞生物学分野（西研究室）、大阪大学産業科学研究所 第3研究部門 生体分子制御科学研究分野（西研究室）、大阪大学産業科学研究所 特別プロジェクト研究部門 感染制御学研究分野（西野研究室）、大阪大学産業科学研究所 特別プロジェクト研究部門 生体防御学研究分野（山口研究室）において行われたものです。本研究を行う機会を与えてくださり、暖かい御指導をいただきました、西毅准教授、西野邦彦准教授、山口明人特任教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究に対する深い御理解と御協力を賜るとともに、様々な面で御力添えを賜りました、中島良介特任准教授、櫻井啓介特任助教に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、数多くの質問に真摯にお答えいただくとともに、様々な面でご協力いただきました、松本佳巳客員教授、西野美都子特任助教、西晶子特任研究員、谷川原瑞恵客員研究員、平田隆弘教授、原田和生講師、平川秀忠助教、小林直木助教、久野悠博士、二階堂英司博士、山田純子修士、王麗媛修士に心より感謝申し上げます。

また、ともに研究に励み、実験中様々な面でサポートしていただきました、上田珠美修士、城阪郁江修士、尾島学修士、堀山つかさ修士、大野愛子修士、奥出順也修士、山崎優修士、長澤沙弥修士、林克彦修士、河嶋啓太様にこの場を借りて御礼申し上げます。

さらに、福島愛子技術員、北川公恵技術員、韓珍珉技術員、五十嵐綾技術員、葉山浩平技術員には主に作業的な面で、松岡澄恵事務補佐員には主に事務的な面で大変な御力添えを賜りました。心から深く感謝申し上げます。

研究以外の面においても色々と支えて下さった、西研究室・西野研究室・山口研究室の皆様、この場を借りて心より厚く感謝を申し上げます。

最後に、いつも暖かく支えていただいた友人、またこのような大変恵まれた環境で学ぶ機会を与えてくださり、長きに渡りご協力いただいた家族に、心より感謝を申し上げます。

今後のみなさまの人生が充実されますことを心よりお祈り申し上げます。

2015年3月 山崎聖司

本学位論文（博士論文題目：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）の審査は、大阪大学大学院 薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査

大阪大学准教授（薬学研究科・産業科学研究所） 理学博士 西 毅

副査

大阪大学教授（薬学研究科） 医学博士 那須 正夫

大阪大学教授（薬学研究科） 薬学博士 土井 健史

大阪大学教授（薬学研究科） 薬学博士 高木 達也