

Title	薬剤排出ポンプの生理的機能における役割の解明
Author(s)	米田, 智廣
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89570
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

薬剤排出ポンプの生理的機能における 役割の解明

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

米田 智廣

2022年9月

主論文

 <u>Tomohiro Yoneda</u>, Hiroki Sakata (<u>The first two authors contributed equally</u>), Seiji Yamasaki, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino. Analysis of multidrug efflux transporters in resistance to fatty acid salts reveals a TolC-independent function of EmrAB in *Salmonella enterica*. PLoS One 2022; 17(4):e0266806.

参考論文

 <u>Tomohiro Yoneda</u>, Seiji Yamasaki <u>(The first two authors contributed equally)</u>, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino. Investigating multidrug efflux pumps associated with fatty acid salt resistance in *Escherichia coli*. Submitted to Frontiers in Microbiology.

目	次

緒論		5
tuta -ta		
第一章	序論 薬剤排出ボンプの生理的機能	8
第1節	諸言	10
第2節	サルモネラ菌における薬剤排出ポンプの役割	11
2-1.	AcrAB-TolC	12
2-2.	AcrAD-TolC	13
2-3.	MdsAB-MdsC/TolC	13
2-4.	MacAB-TolC	13
第3節	大腸菌における薬剤排出ポンプの役割	15
3-1.	AcrAB-TolC	16
3-2.	AcrAD-TolC	16
3-3.	AcrEF-TolC	16
3-4.	MdtEF-TolC	16
3-5.	MacAB-TolC	16
3-6.	MdfA	17
3-7.	EmrAB-TolC	17
第4節	緑膿菌における薬剤排出ポンプの役割	18
4-1.	MexAB-OprM	18
4-2.	MexCD-OprJ	19
4-3.	MexEF-OprN	20
4-4.	MexXY-OprM	20
4-5.	MexGHI-OpdM	20
第5節	考察	22

第二章 糖への耐性における大腸菌特異的薬剤排出ポンプ MdtEF の発現誘導機構の 解析 24

第1節	諸言	26
第2節	実験材料及び方法	27
2-1.	菌株、プラスミド、及び培養条件	27
2-2.	定量的リアルタイム RT-PCR	28
2-3.	cAMP 定量	29
2-4.	Survival Rate Assay	29
第3節	結果	29
3-1.	crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での PTSsugar 添加による MdtEF の)発現
誘導		29
3-2.	crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での PTSsugar 添加による cAMP 量	:の変
化		31
3-3.	crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での GlcNAc 添加による薬剤耐性化	32
3-4.	crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での PTS 糖存在下における cAMP	添加
時の	薬物耐性への影響	33
第4節	考察	34
第三章	脂肪酸塩への耐性における薬剤排出ポンプの役割の解明	36
第1節	諸言	38
第2節	菌株、プラスミド、及び培養条件	38
3-1.	菌株・細胞株およびプラスミド	38
3-2.	最小発育阻止濃度(MIC: minimum inhibitory concentration)測定	41
3-3.	β-galactosidase assay	41
3-4.	細菌の増殖実験	41
第3節	結果	41
3-1.	薬剤排出ポンプ欠損株又は過剰発現株の各種脂肪酸塩に対する感受性	41
3-2.	脂肪酸ナトリウムによる emrAB 転写活性の変化	45

3-3.	サルモネラ菌における薬剤排出ポンプの段階的遺伝子欠損株における	ドデカン
酸ナ	トリウムに対する感受性	46
3-4.	薬剤排出ポンプ EmrAB の TolC 非依存的な寄与	47
3-5.	各薬剤排出ポンプの TolC 依存性	49
3-6.	薬剤排出ポンプ EmrAB における各基質添加時の TolC 依存性	50
第4節	考察	51
総括		53
引用文南	犬	55
謝辞		66

緒論

薬剤排出ポンプの薬剤耐性における機能

細菌はヒトを含む宿主に感染し寄生することで自身の生存を維持してきた。一方の宿主 側においても 20 世紀半ばより、細菌の攻撃から身を守るべく、人類は抗菌薬を次々と開発 し対策を講じてきた。結果として、人類が新たな抗菌薬を開発すると、それほど間を置か ずに抗菌薬が効かない薬剤耐性菌が出現し、新たな火種を生む、という構図が現在まで続 いている。近年、多数の抗菌薬に対して耐性を獲得した多剤耐性菌が出現し、その強靭か つ狡猾な生存能力がヒトを含む環境に多大な影響を及ぼしており、大きな社会問題となっ ている。

細菌が薬剤耐性を獲得する機構としては、①薬剤排出ポンプによる薬剤の能動的排出、 ②作用点の突然変異による薬剤親和性の低下、③修飾酵素や分解酵素による薬剤の不活性 化、④細胞膜周辺構造の変化やバイオフィルム形成による薬剤透過性の低下、等が知られ 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、薬剤排出ポンプ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1。



細菌の薬剤排出ポンプは、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。①ATP 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」、②TolC 等の外膜チャネルおよびペリプラズム空間に存在する 膜融合蛋白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」、④4 回膜貫通構造をもつプロトン駆動の「SMR (small multidrug resistance) 型」、⑤MFS 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²。このように細菌は、それぞれ の種ごとに固有の薬剤排出ポンプ群を有しており、薬剤排出ポンプの各々が様々な抗菌薬 に対する基質認識性並びに排出能力を発揮することで、自身の生存優位性を獲得する役割 を担っている。

薬剤排出ポンプの生理的機能

細菌が有する薬剤排出ポンプは、菌自身が生存するために細胞内に取り込まれた抗菌薬 を細胞外へ排出する重要な働きを担っており、薬剤耐性化を引き起こす原因の一つと位置 付けられている。一方で、薬剤排出ポンプは抗菌薬が世の中に広まるよりはるか昔より細 菌自身が有する細胞膜蛋白質として存在していることから、薬剤耐性における役割に加え て、細菌自身が様々な環境下において有利に生存するために必要な生理学的な機能を担っ ていることが明らかとなりつつある。例えば、細菌が宿主に寄生するためには、宿主細胞 への接着及び侵入が必要である。また、細菌は様々な厳しい外部環境に順応しながら、自 身の生存を確立し続ける必要がある。このように、細菌は外部を攻撃するための機能及び 自身を守るための機能と関連して、薬剤排出ポンプの生理学的機能を発揮していると考え られる。

本研究の目的

様々な菌種の各薬剤排出ポンプの生理的な機能については、これまでに主に細菌学分野 の研究者らにより報告されてきた。しかしながら、それぞれの知見を合わせて、各細菌の 薬剤排出ポンプの生理的役割について包括的にまとめた近年の報告はない。自身の研究を 始めるにあたり、まず初めにこれまでに報告されている最新の知見を精査し、当研究室の 専門であるグラム陰性菌のサルモネラ、大腸菌及び緑膿菌における薬剤排出ポンプの生理 的な機能について知識を集約した(第一章)。

その上で、本研究では、細菌の生存にとって必須の糖への耐性(第二章)、並びに脂肪酸塩 への耐性(第三章)に着目し、それぞれの生理的機能における薬剤排出ポンプの同定及び 役割の解明を試みた。

第一章

序論

薬剤排出ポンプの生理的機能

第1節 諸言

薬剤排出ポンプは、菌体内から細胞外へ抗菌薬を排出する主要な蛋白質として働き、薬 剤耐性を獲得することで、細菌の生存維持に寄与している。一方で、薬剤排出ポンプは抗 菌薬が出現する以前より、細菌に備わり遺伝学的に維持されている蛋白質ファミリーであ ることを踏まえると、薬剤排出ポンプとしての役割とは別に、感染宿主細胞内の厳しい環 境下で生存優位性を獲得するために重要な役割を担っていると考えられる。近年、薬剤排 出ポンプは、自身の生存優位性を獲得するために外部への攻撃並びに自身を外的環境から 防御するための機能と関連して働くことが明らかとなってきている。

菌が外部を攻撃するための機能との関連としては、毒性物質の産生及び放出に必要な多数の病原性因子を有すること、宿主への細胞接着及び侵入を促すこと、等が挙げられ、その都度で外部環境に応じた反応が可能となるように複雑な調節をおこなっている。また、菌が自身を守るための機能との関連としては、自律的な運動能を保持すること、秩序化した三次元構造のバイオフィルムを形成すること、生理的作用物質を排出すること、等が挙げられ、厳しい外的環境から逃れるための機能を有している。また、さまざまな細菌種が、広範囲のクオラムセンシング(QS)システムを用いて細胞間コミュニケーションの場を確立しており、薬剤排出ポンプがQSシステムの調節に関与していることも報告されている。

ゲノムプロジェクトの進行により種々の生物のゲノム配列が解読され、薬剤排出ポンプが原核生物から真核生物まで幅広い生物のゲノム上にコードされていることが推定されている。サルモネラ菌、大腸菌及び緑膿菌は、細菌研究のモデル生物としてよく使用されるグラム陰性菌であり、これらグラム陰性菌においても、数々の薬剤排出ポンプの存在が報告されてきた。現在までに、サルモネラ菌では10種類^{3,4}、大腸菌では20種類⁵、緑膿菌では12種類⁶の薬剤排出ポンプが同定されている。

様々な菌種の各薬剤排出ポンプの生理的な機能については、これまでに主に細菌学分野 の研究者らにより報告されてきた。しかし、それぞれの知見を合わせて、各細菌の薬剤排 出ポンプの生理的役割について包括的にまとめた近年の報告はないことから、今回私はこ れまでに報告されている最新の知見を精査し、我々の研究室の専門であるグラム陰性菌の サルモネラ、大腸菌及び緑膿菌における薬剤排出ポンプ(図 1-1)の生理的な機能について、 知識の集約に努めた。

10



図 1-1. サルモネラ菌、大腸菌及び緑膿菌における薬剤排出ポンプ

第2節 サルモネラ菌における薬剤排出ポンプの役割

サルモネラ菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)は、ヒトを含む動物に常在する通 性嫌気性の腸内細菌である。サルモネラ菌は、細菌胃腸炎から生命を脅かす全身感染症ま で様々な疾患を引き起こす。サルモネラ菌の10種類の薬剤排出ポンプのいくつかにおいて、 これまでに報告されている生理学的機能について以下に記す。また、サルモネラ菌の生理 学的機能及び基質については表1-1に要約を示す。

2-1. AcrAB-TolC

acrAB-tolCは、サルモネラ菌において定常状態で発現がみられる最も主要な薬剤排出ポン プである。このポンプは、acrA、acrB及び tolCの3つの蛋白質を構成要素にもつ。acrAは、 外膜と内膜を架橋する膜融合蛋白質として分類されるペリプラズムリポ蛋白質である。acrA は脂質のモチーフを介して内膜に固定されている⁷。acrBは、12本の膜貫通αヘリックスを 有する内在性膜蛋白質であり、細胞膜に位置する⁸。tolCは、エンベロープ蛋白質のファミ リーに属する外膜蛋白質であり、すべてのグラム陰性菌に発現がみとめられている⁹。

これまでに、このポンプの生理的役割を調べるために、遺伝子操作によって遺伝子ノッ クアウト株又は過剰発現株を構築し、表現型を解析する実験が行われてきた。

Salmonella SL1344 の tolC 欠損株では、ヒト腸上皮細胞(hEC)及びマウス単球マクロフ アージへの接着能及び浸潤能が低下した。acrB 欠損株では、正常な接着がみられる一方で、 hEC 及びマクロファージへの浸潤能が低下していた。In vivo において、acrB 欠損株及び tolC 欠損株では、鳥類の消化管におけるコロニーの形成及び維持が低下し、サルモネラ菌数の 低下が認められた¹⁰。acrB 欠損株及び tolC 欠損株を用いた転写解析においては、走化性及 び運動性遺伝子が広範囲に抑制され、acrB 欠損株では運動性の低下がみられた¹¹。また、 acrA はヒト腸管細胞への細胞浸潤にも必要であったが、その寄与は acrB 及び tolC の寄与よ りも小さいと考えられた¹²。

acrAB-tolC システムは宿主細胞に対する病原性にも影響を与えている。*acrB* 欠損株及び tolC 欠損株では、III 型分泌系毒性因子の様々な構成要素に関与する SPI-1 遺伝子の遺伝子 発現の低下が認められている¹¹。一方で、tolC 欠損株では毒性関連因子の発現低下がみられ るが、*acrB* 欠損株では影響がなく hEC への浸潤能の低下もみられなかったという報告もあ る¹³。このように結果に差が生じるのは、用いた細胞株により感受性が異なることが要因の 一つと考えられている。

バイオフィルム形成は、サルモネラ菌を含む細菌種において頻繁にみられる現象であり、 多剤耐性を引き起こす要因となる。Baugh らは、10の薬剤排出ポンプ欠損株では、バイオ フィルムを形成できないことを示した¹⁴。バイオフィルム形成不全を引き起こす一つの要因 として、細胞外マトリックスの主要成分である繊毛(Curil)遺伝子の転写抑制が挙げられ ている¹⁵。

サルモネラ菌に acrAB-tolC が存在しない状態にすると、代償性調節機構として他の薬剤 排出ポンプが働くことが知られている。*acrAB* 欠損株では、他の薬剤排出ポンプである *acrF*、 *acrD、mdsB、mdtB、macA、emrA* 及び *mdfA* 遺伝子の発現亢進がみられた^{16,17}。しかしなが ら、近年、acrAB 遺伝子のアミノ酸 D408 点変異を与えた株においては、マウス及び Galleria mellonella モデルにおいて腸管上皮細胞及びマクロファージへの浸潤能及び生存能の低下が 認められたが、他の薬剤排出ポンプの発現には影響を及ぼしていなかった¹⁸。このように、 遺伝子欠損モデルと遺伝子変異モデルでは得られる表現型が異なる可能性があり、臨床的 観点から発生確率が高い遺伝子変異株を用いた研究の進展が望まれている。

acrAB-tolCは、宿主のストレス化環境で生存優位性を獲得するために、胆汁酸塩、脂肪酸、 インドール、パラコート及びステロイドホルモンなどの宿主内生理活性物質の排出におい ても役割を果たしている¹⁹。胆汁及びインドールによって acrB 及び tolC の発現が亢進する ことが報告されている¹⁹⁻²¹。

2-2. AcrAD-TolC

acrD が機能するためには、acrB と同様に acrA と tolC が必要であるが、*acrA* は *acrB* と同 じオペロンに位置しており、*acrD* の遺伝子座とは隣接していない²²。

acrAD-tolCは acrAB-tolCとは異なる生理的機能を有する。acrD 欠損株では、代謝、毒性 及びストレス反応に関わる遺伝子発現の変化を生じた。例えば、鞭毛回転の方向転換に必 要な因子である代謝産物のフマル酸の産生が低下し、細胞運動性の低下がみとめられた。 一方で、acrD 欠損株は野生型株と同等以上の生存優位性がみられたことから、薬剤排出ポ ンプがないことによって環境に適応するために消費するエネルギーを節約でき、結果とし て好都合となる場合もあることが示唆された²³。

acrAD-tolC は生理活性物質として、インドール、銅、亜鉛を基質として認識し、他ポンプ mdtABC と協働してストレス環境下での適応に寄与した²⁴。

2-3. MdsAB-MdsC/TolC

mdsAB はサルモネラ菌特異的な蛋白質であり、mdsC 又は tolC と協調して働く⁴。サルモ ネラ菌に感染したマクロファージでは、*mdsABC* の発現が亢進し、細菌数の増加にともなう 宿主の細胞死がみられた。一方で、*mdsABC* 欠損株では、感染マクロファージにおける細菌 数が低下した。*mdsABC* が過剰発現すると 1-パルミトイル-2-ステアロイル-ホスファチジル セリン (PSPS) の分泌増加を引き起こし、宿主細胞への侵入能及び生存能が高くなること が示された²⁵。

mdsAB-mdsC/tolCの生理活性物質における役割としては、金及び酸化ストレスに対する耐性化に寄与していると考えられている²⁶。

2-4. MacAB-TolC

macAB-tolC は、サルモネラ菌の各薬剤排出ポンプの欠損株を BALB/c マウスの胃内に播 種した我々の研究において、最も高い致死作用を示した³。macAB と毒性の関連性について の詳細は未だ解明されていないが、マウスの炎症腸細胞及びマクロファージを用いた実験 により、macAB は H2O2 によってアップレギュレートすることが示され、H2O2 減少因子で あるエンテロバクチンの代謝物を放出することによって活性酸素種 ROS の解毒に寄与する ことが報告されている^{27,28}。

排出ポンプ	生理学的機能	基質
AcrAB-TolC	・細胞接着 ^{10,17} 、細胞浸潤 ^{10,17} 、細胞浸潤 ^{10,12,17,18} 、毒性 ^{11,12,18,3} 、バイオ フィルム形成 ¹⁴ 、インドール耐 性 ^{19,21,29} 、胆汁耐性 ^{20,21}	ACR, ETBR, CIP, NAL, CHL, TET, NOV, FUS, ATM, CAZ, CTX, ERY, FLU, OXA, MIN, NOR, AMX, CRO, AMP, TRIC, CYC, CLO, NAF, LVX, TMP, R 6 G, CV, BENZ, DOC, DXR, FAM, RIF, LZD, TRC, CAR, TPP, MB, SDS, Triton X-100, anti-histamine agent, plant alkaloids, anti-depressants, anti-psychotic drugs, anti-protozoal drugs ³ , 12, 18, 30-36
AcrAD-TolC	・細胞接着 ¹⁷ 、細胞浸潤 ¹⁷ 運動性 ²³ 、バイオフィルム形 成 ¹⁴ 、生存優位性 ²³ 、銅耐性 ²⁴ 、亜鉛耐性 ^{24,}	OXA, CLO, NAF, CAR, SB, ATM, SDS, NOV ²²
AcrEF-TolC	・細胞接着 ¹⁷ 、細胞浸潤 ¹⁷ 、毒 性 ³ 、バイオフィルム形成 ¹⁴	ERY, NOV, TET, CHL, NAL, NOR, DXR, ACR, CV, ETBR, MB, R6G, TPP, BENZ, SDS, DOC ³
MdsAB-MdsC/TolC	 ・細胞接着¹⁷、細胞浸潤^{17,25}、 毒性^{25,3}、バイオフィルム形成 ¹⁴、金耐性^{26,37} 	CV, MB, ACR, R6G, NOV, ETBR, TPP, BENZ, SDS ^{3, 25}
MacAB-TolC	 ・細胞接着¹⁷、細胞浸潤¹⁷、毒 性³、バイオフィルム形成¹⁴ 	-
MdtABC-TolC	 ・細胞接着¹⁷、細胞浸潤¹⁷、毒 性³、バイオフィルム形成¹⁴ 	NOV, SDS, DOC ^{3, 36}
EmrAB-TolC	・細胞接着 ¹⁷ 、細胞浸潤 ¹⁷ 、バ イオフィルム形成 ¹⁴	NOV, NAL, R6G, DOC, TRC ^{3, 36}

表 1-1. サルモネラ菌における多剤排出ポンプの生理的役割及び基質

Mdfa	・細胞接着 ¹⁷ 、細胞浸潤 ¹⁷ 、バ	TET CHI NOP DVD ^{3, 36}	
MulA	イオフィルム形成14	TET, CHL, NOK, DAK	
MdtK	・バイオフィルム形成 14	NOR, DXR, ACR ^{3, 36}	
SmvA	-	ACR ³⁸	

ACR, acriflavine; AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; ATM, aztreonam; BENZ, benzalkonium
chloride; CAR, carbenicillin; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CLO, cloxacillin; CRO, ceftriaxone; CTX, cefoxitin; CV, crystal violet; CYC, cyclohexane, DOC, deoxycholic acid; DXR, doxorubicin; ERY, erythromycin; ETBR, ethidium bromide; FAM, cefamandole; FLU, fluoroquinolone; FUS, fusidic acid; LVX, levofloxacin; LZD, linezolid; MB, methylene blue; MIN, minocycline; NAF, nafcillin; NAL, nalidixic acid; NOR, norfloxacin; NOV, novobiocin; RIF, rifampicin; OXA, oxacillin; R6G, rhodamine 6G; SB, sulbenicillin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; TPP, tetraphenylphosphonium bromide; TRIC, triclosan

第3節 大腸菌における薬剤排出ポンプの役割

大腸菌(Escherichia coli)は、細菌研究のモデル生物としてよく使用される細菌である。 大腸菌の特定の菌種は、特定の菌株は消化管、尿路等で感染症を引き起こす。大腸菌の20 種類の薬剤排出ポンプのいくつかにおいて、これまでに報告されている生理学的機能につ いて以下に記す。また、大腸菌の生理学的機能及び基質については表1-2に要約を示す。

3-1. AcrAB-TolC

acrAB-tolCは、大腸菌における主要な薬剤排出ポンプである。

acrB 欠損株では、運動性及び鞭毛生合成関連遺伝子の発現が亢進し、運動性が高くなった³⁹。また、*acrB* 欠損株では野生型株より増殖速度が増加し、結果としてより高い細胞密度となり、静止期への移行が遅延した。逆に、*acrB* 過剰発現株では、低い細胞密度のまま 定常状態に入った⁴⁰。これは、*acrAB* の過剰発現で QSS を細胞外に放出することで、細胞 増殖の定常状態を制御する定常期σ因子 RpoS の早期の発現亢進を誘導して低細胞密度の定 常期の状態に導いていると考えられた。

acrB単欠損株では、正常なバイオフィルム形成がみとめられている⁴¹。ところが、我々の研究室は acrB に加えて mdtABC を欠損させた株においては、それぞれの単欠損株においてはみられないバイオフィルムの維持能の低下を見出した⁴²。この acrB mdtABC 両欠損株では、バイオフィルム形成期においては正常なバイオフィルムを形成するが、時間が経過するにつれてバイオフィルムが消失するこ

とを示した。

acrB は、隣接細菌細胞に結合して細胞増殖を阻害する蛋白質毒素を送達する接触依存性 増殖阻害(CDI)にも関与する。CDIの機序において、acrB は低分子を細胞外環境に排出す る機能を有していた⁴³。

また、近年、*acrAB-tolC*の発現増加によって、修復遺伝子 *mutS*の発現を低下させることで DNA ミスマッチによる細菌の突然変異をきたす可能性を増加させて薬剤耐性を獲得する ことが報告されている⁴⁴。

acrAB-tolCは、胆汁酸、脂肪酸、ステロイドホルモンなどの内因性生理活性物質の排出ポンプとして作用すると考えられている⁴⁵。

3-2. AcrAD-TolC

acrD 欠損株では、*emrD*, *emrE*, *emrK*, *acrE* 及び *mdtE* 欠損株と同様にバイオフィルム形成 を顕著に低下した⁴⁶。また acrD は、コール酸及びプロゲステロンを排出し、インドールや 小胞体ストレスによって発現誘導されることが明らかとなっている^{45,47,48}。

3-3. AcrEF-TolC

acrEF は、acrAB と高い相同性を有している。*acrEF* 欠損株では、*acrA* の発現が増加し、 細胞分裂における形態学的異常がおこる⁴⁹。*acrEF* は正常な増殖条件下で発現し、acrAB と 協調して細胞分裂を正常に維持する上で重要な役割を果たしていると考えられる。acrEF は、 acrAB と同様に QS 受容体である sdiA を過剰に発現する細胞において、遺伝子発現が亢進 するため、QS システムへの関与も示唆されている⁵⁰。

3-4. MdtEF-TolC

mdtEF は、ほ乳類の腸内環境等の嫌気性環境下において発現が亢進し、ニトロシルインド ール誘導体を菌体外に放出することによってニトロソ化損傷から自身を保護し、嫌気性条 件下での正常な細胞増殖に寄与している⁵¹。また、酸性条件下においても *mdtEF* の発現は 上昇し、酸への耐性に寄与し細菌のホメオスタシスを調節している^{52,53}

mdtEF-tolC の生理活性物質における役割としては、インドール及び糖類に対する耐性化に寄与していると考えられている^{47,54}。

3-5. MacAB-TolC

macAB 欠損株では、水溶性下痢を引き起こす毒性物質エンテロトキシンの排出が低下す

る ⁵⁵。また、*macAB* 欠損株では、宿主細胞への侵入時に鉄バランスを保つために菌自身から産生される PPIX が細胞内に蓄積し、光環境下で活性酸素 ROS を生成して細胞死してしまう ⁵⁶。macAB-tolC は生理活性物質として、リポ多糖を基質として認識し、環境適応に寄与する ⁵⁷。

3-6. MdfA

mdfA は、Na⁺又は K⁺依存性プロトン輸送を触媒する。mdfA は、増殖や細胞死の停止が 起こりやすい極端なアルカリ性環境 (pH 10) においても抵抗性を示し、苛酷な外部環境下 で内部 pH を安定化させることにより、形質転換細胞の増殖を可能にする⁵⁸。さらに、*mdfA* の過剰発現株では、内膜蛋白質を損失するほどのプロトン駆動ストレス下において、高温 度への抵抗性を獲得し、細胞分裂異常から自身を保護した⁵⁹。

3-7. EmrAB-TolC

emrBはH⁺流入により駆動されるMFSトランスポーターであり、emrAはペリプラズム膜融合蛋白質である。emrAB-tolCは、強酸性条件下 (pH 2)における抵抗性に寄与しており、 宿主の胃を通過する必要がある大腸菌にとって重要な役割を果たしている⁶⁰。また、 emrAB-TolCは、過酸化時において正常な細胞増殖を保つために必要であることが知られている⁶¹。emrAB-TolCは、胆汁酸、エストラジオール及びプロゲステロンなどの内因性生理 活性物質の排出ポンプとして作用すると考えられている^{45,5}。

排出ポンプ	生理学的機能	基質	
	・細胞増殖 ^{40,62} 、運動性 ³⁹ 、バイオフ	CHL, TET, MIN, ERY, FLU, NAL,	
A or A P. TolC	ィルム形成 ⁴² 、QS システム応答 ⁶³ 、	NOR, ENO, DXR, CIP, NOV, RIF,	
ACIAD-TOIC	脂肪酸耐性 ⁶⁴ 、胆汁酸耐性 ⁶⁴ 、突然	TMP, ACR, CV, ETBR, R6G, TPP,	
	変異誘発 44	BENZ, SDS, DOC ^{5, 40, 65}	
A or A D TolC	・バイオフィルム形成 46、インドール	Aminoglycosides, KAN, NOV, SDS,	
ACTAD-TOIC	耐性 ⁴⁷ 、銅耐性 ⁴⁸	DOC ⁵	
A or FE TolC	・細胞増殖 49、バイオフィルム形成	DOC ACP ETRP PGC SDS DOCS	
ACIEP-TOIC	⁴⁶ 、QS システム応答 ⁵⁰ 、	DOC, ACR, EIBR, ROG, SDS, DOC	
MdtEF-TolC	・細胞増殖 ⁶⁶ 、バイオフィルム形成	TPP, ERY, NOV, DOX, CV, ETBR,	
	46、インドール耐性 47、ニトロソ化スト	SDS, DOC, BENZ, R6G, OXA, CLO ^{5,}	
	レス耐性 51、酸耐性 53	52, 67	

表 1-2. 大腸菌における薬剤排出ポンプの生理的役割及び基質

MacAB-TolC	•毒性 ^{55, 56} 、活性酸素耐性 ⁵⁶	Macrolide ERY, oleandomycin 57
EmrE	・バイオフィルム形成 ⁴⁶ 、浸透圧スト レス耐性 ⁶⁸	ACR, CV, ETBR, BENZ, MET⁵
MdfA	・細胞増殖 ⁵⁹ 、アルカリ性 pH 環境耐 性 ⁵⁸	Flu, chl, tet, doc, tmp, acr, etbr, tpp ^{5,} ⁴⁰
EmrAB-TolC	・細胞代謝 ^{45,} 酸性 pH 環境耐性 ^{60,} 過酸化ストレス耐性 ⁶¹	R6G, MET, CCCP, SDS, DOC⁵
MdtABC-TolC	・バイオフィルム形成 ⁴² 、インドール 耐性 ⁴⁷ 、銅耐性 ⁴⁸ 、亜鉛耐性 ^{69, 70}	NOV, DOC ⁵
CusCBA	•銅耐性 ^{71,} 銀耐性 ⁷²	-
EmrKY-TolC	・バイオフィルム形成 46	-
emrD	・バイオフィルム形成 46	SDS ⁵
bcr	-	TET, KAN, ACR, Fosfomycin ⁵
MdlAB	-	-
YdgEF	-	-
YjiO	-	-
YidY	-	-
YceL	-	-
YdhE	-	-
YceE (mdtG)	-	-

第4節 緑膿菌における薬剤排出ポンプの役割

緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)は、AIDS、嚢胞性線維症、全身性関連肺炎、カテーテル又は火傷による慢性尿路感染症に罹患した免疫不全患者において日和見感染症を引き起こす病原細菌である。緑膿菌は臨床株において高頻度に変異を起こすため、治療抵抗性を獲得しやすく、特に肺への感染が大きな問題となっている。緑膿菌の12種類の薬剤排出ポンプのいくつかにおいて、これまでに報告されている生理学的機能について以下に記す。また、緑膿菌の生理学的機能及び基質については表1-3に要約を示す。

4-1. MexAB-OprM

mexAB-oprM は、RND ファミリーに属しており、緑膿菌において唯一常時発現している 主要な薬剤排出ポンプである。 mexAB-oprM は、QS の 3OC12-HSL 因子の受動拡散による細胞間コミュニケーションを 媒介し、細胞毒性及びバイオフィルム形成を制御する⁴⁰。nalB 変異により誘導される mexAB の過剰発現株では、3 OC12-HSL の生産が低下することで、ピオシアニン、カゼインプロテ アーゼ及びエラスターゼといった毒性因子の発現が低下して Caenorhabditis elegans モデル における毒性を減弱した^{73,74}。mexAB 欠損株又は mexAB 阻害剤で処理した株では、イヌ腎 臓 (MDCK) 細胞への浸潤能又は遊走能が有意に低下し、その寄与は他ポンプである mexXY 欠損株よりも大きかった。また、野生型株に感染した MDCK 細胞の培養上清を mexAB 欠損 株に添加したところ、細胞への浸潤能が回復したことから、緑膿菌は mexAB-oprM システ ムを介して浸潤能に関連する因子を菌体外に排出していることが示唆された⁷⁵。さらに、マ ウス敗血症モデルでは、野生型株で感染による致死がみられたが、mexAB 欠損株では宿主 の生存が維持された⁷⁶。

緑膿菌のバイオフィルム形成は、抗菌薬耐性を促して、ヒト組織における緑膿菌の慢性 的なコロニー形成に必要とされる。2000年頃には、遺伝子欠損株及び過剰発現株を用いた 実験により、mexAB-oprM を含む薬剤排出ポンプはバイオフィルムの形成能には影響を及ぼ さないと考えられていた⁷⁷。しかし、近年、*mexAB*及び*mexEF*の両欠損株においてバイオ フィルム形成時の薬剤感受性が増加し、どちらかの遺伝子の過剰発現により、耐性を再獲 得することが示された⁷⁸。

4-2. MexCD-OprJ

mexCD-oprJ は、RND 成分である mexD、外膜貫通チャンネル oprJ 及び膜融合蛋白質 mexC から構成される。

mexCD-oprJ 及び mexEF-oprN のいずれかの過剰発現株では、pcrv、exoT 及び exoS などの T3SS 関連遺伝子の転写が減少し、病原性化合物を宿主哺乳類細胞の細胞質に直接運ぶため に必要な III 型分泌系 T3SS の発現が低下した⁷⁹。

nfxB 変異により誘導される mexCD の過剰発現株では、野生株と混合培養したところ、野 生型よりも生存優位性を示し、運動能及び毒性物質の産生低下がみとめられた⁸⁰。さらに、 nfxB 変異により誘導される mexCD の過剰発現株では、マウス肺における菌感染時に、宿主 の補体活性化 (C3 オプソニン化)により感受性を示し、生存能が低下したことから、mexCDoprJ が哺乳類による宿主免疫反応に対抗していたことが示唆された⁸¹。

mexCD-oprJ 及び mexGHI-opmD は、宿主防御免疫ペプチドから保護するための防御的役 割を果たす。ヒトの主要な宿主防御ペプチドの一つである外因性 LL-37 を添加した株では、 *mexCD-oprJ* 及び *mexGHI-opmD* の発現が亢進し、毒性代謝物及びプロテアーゼなどの毒性 因子の産生を高め、環境に適応することが明らかとなった⁸²。

AZM は CF における慢性緑膿菌感染に対するマクロライド系抗生物質の1つであるが、 その耐性はしばしば観察される。*mexAB-oprM* 又は *mexCD-oprJ* がある程度発現している株 では、AZM の存在下においてバイオフィルムが形成された。一方で、mexAB-oprM 及び mexCD-oprJ の両欠損株では AZM の存在下においてバイオフィルムが認められず、両薬剤 排出ポンプはバイオフィルム形成時に AZM に対する耐性を付与できることが示された⁸³。

4-3. MexEF-OprN

nfxC 変異により誘導される mexEF の過剰発現株では、QS 因子である C4-HSL、並びに毒 性因子であるピオシアニン、エラスターゼ、ラムノリピドの産生が低下した⁸⁴。また、別の 実験系において nfxC 変異により誘導される mexCD の過剰発現株では、T3SS 及び T6S など の病原性因子の転写発現が抑制され、Caenorhabditis elegans において感染宿主の生存率を向 上した⁸⁵。mexEF-oprN の抑制遺伝子である mexS に変異を有する株では、mexEF-oprN が発 現が亢進し、運動性、ピオシアニン産生及びバイオフィルム形成がそれぞれ低下した⁸⁶。こ の条件では、mexEF-oprN による QS 因子の排出が毒性低下の理由の一つであることが示唆 された。

mexEF-oprN の発現は、LysR ファミリー転写調節因子である機能的活性化因子蛋白質 mexT によって増強される。mexT 欠損株では、mexEF-oprN の発現抑制がみとめられ、野生 型よりも生存優位性を獲得することが示された⁸⁷。また、mexT の上位シグナルである parS 又は parR の欠損株においても同様に mexEF-oprN の発現抑制がみられ、運動性の向上及び ピオシアニンの発現亢進がみとめられた⁸⁸。

mexEF-oprNは、ジスルフィド、低酸素、ニトロソ化といった様々なストレス環境下において菌自身を守るために中心的な役割を果たしている。例えば、低酸素条件下では、緑膿菌の臨床株において mexEF-oprN が発現亢進し、mexAB-oprM 及び mexCD-oprJ の発現亢進は認められなかった⁸⁹。

4-4. MexXY-OprM

mexXY-oprMは、リボソーム機能又は蛋白質合成の障害、あるいはリボソーム機能を阻害 する抗菌薬に応答して発現が亢進し、リボソームへの攻撃に対する防御のために重要な役 割を果たす^{90,91}。また、mexXY-oprMは、酸化ストレスによっても誘導される。緑膿菌感染 に起因する嚢胞性肺線維症等の活性酸素過剰存在下において、mexXYの発現が亢進し、ア ミノグリコシドなどの抗菌薬に対する耐性に寄与する⁹²。

4-5. MexGHI-OpdM

mexGHI-opmD は、バナジウム耐性を付与する排出ポンプとして発見された。*mexI* 又は *opmD* 欠損株では、C4-HSL 及び 3OC12-HSL といった QS の排出能、細胞増殖及び運動能、

エラスターゼ、ラムノリピド及びピオシアニンなどの毒性物質産生がそれぞれ低下した^{93,94}。 さらに、*mexI*又は *opmD* 欠損株を感染させた植物及びラットにおいて毒性の減弱が確認さ れた。mexGHI-opmD は、生理活性物質として、毒性物質バナジウム及びヒト宿主防御因子 LL-37 を基質として認識し、環境適応に寄与する⁸²

排出ポンプ	生理学的機能	基質
MexAB-OprM	 ・細胞浸潤^{75,76}、バイオフィル ム形成⁸³、QSシステム応答^{40,} ^{73,74,95,96,}、毒性^{73,74,76}、生存 優位性⁹⁷ 	quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, sulphonamides, trimethoprim, β-lactams except imipenem ¹¹¹
MexCD-OprJ	 ・運動性⁸⁰、バイオフィルム形成^{83,98}、QSシステム応答⁴⁰、 毒性^{79,80,81,99}、生存優位性^{78,97,98,100}、宿主免疫ペプチド耐性⁸²、酸化ストレス耐性¹⁰¹ 	quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, CHL, NOV, penicillins except CAR and SB, cephems except CAZ, flomoxef, meropenem, S-4661 , biocides, dyes, detergents, organic solvents ^{111,112}
MexEF-OprN	 ・運動性⁸⁶、バイオフィルム形成¹⁰²、QSシステム応答^{40,83,85,86}、毒性^{79,84,86,87,103}、生存優位性^{97,104}、ニトロソ化ストレス耐性¹⁰⁵、低酸素ストレス⁸⁹、ジスルフィドストレス耐性¹⁰⁶ 	CIP, LVX, EtBR, ACR, CHL, TET, TRI, TMP ¹¹³
MexXY-OprM	・細胞浸潤 ⁷⁶ 、生存優位性 ⁹⁷ 、 リボソーム阻害耐性 ^{90,91} 、酸 化ストレス耐性 ⁹²	quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, aminoglycosides, penicillins exceptcarbenicillin, sulbenicillin, cephems except cefsulodin and ceftazidime, meropenem, S-4661 ¹¹¹
MexGHI-OpdM	 ・細胞増殖^{93,94,107,108,}、運動 性^{93,94}、バイオフィルム形成 ^{107,108}、QS システム応答^{40,93,94}、 ⁹⁴、毒性^{93,94}、宿主免疫ペプチ ド耐性⁸² 	NOR, ETBR, ACR, R6G ¹¹⁴
CzcCBA	•亜鉛耐性、銅耐性 ^{109,110}	-
MexPQ-OpmE	-	-

表 1-3. 緑膿菌における薬剤排出ポンプの生理的役割及び基質

MexVW-OprM	-	FQ, TET, CHL, ERY, ETBR, ACR ¹¹⁵
MexJK-OprM/OpmH	-	TRC, ERY ¹¹⁶
MexMN	-	CHL, THI ¹¹⁷
MuxABC-OpmB	-	-
TriABC	-	-

第5節 考察

今回私はこれまでに報告されている最新の知見を精査し、我々の研究室の専門であるグ ラム陰性菌のサルモネラ、大腸菌及び緑膿菌における薬剤排出ポンプ(図1-1)の生理的な 機能について、知識の集約に努めた。その結果、それぞれの菌における薬剤排出ポンプに おいて、菌が外部を攻撃するための機能との関連(宿主への細胞接着及び侵入、毒性物質 の産生及び放出、クオラムセンシングによる細胞間コミュニケーションの促進、等),並び に菌が自身を守るための機能との関連(自律的運動能の獲得、バイオフィルムの形成、生 理的物質の代謝、外部環境変化への適応力の獲得、等)を支持する事実を抽出・整理する ことができた。生理学的な機能の側面から細菌をみたとき、arcAB や mexAB などの主要な 薬剤排出ポンプだけでなく、他の薬剤排出ポンプも、宿主の生体内における厳しい環境を 生き延びるために機能を発揮していることがわかった。

結論として、各細菌は各薬剤排出ポンプの発現を調節することで、さまざまな環境に応 答・適応して菌自身の生存優位性を獲得していると考えられた。今後の研究においても、 生理学的機能を発揮するメカニズムの解明や未だ不明な点が多いいくつかの薬剤排出ポン プにおける機能解析を進めることで、薬剤排出ポンプにおける生理学的機能の包括的な知 識が得られることを強く望む。

第二章

糖への耐性における大腸菌特異的薬剤排出 ポンプ MdtEF の発現誘導機構の解析

第1節 諸言

大腸菌における薬剤排出ポンプ mdtEF-tolC は、通常の実験室条件下ではほとんど発現し ていないが、様々な抗生物質、抗腫瘍薬、色素及び界面活性剤に対する薬剤耐性獲得に寄 与している^{5,118,119}。さらに、嫌気性環境下でのニトロソ化ストレス⁵¹ や酸⁵³から菌自身を 守るために必要であること、生理活性物質としてインドール⁴⁷、糖類⁵⁷ を認識し、環境適 応に寄与することを第一章で述べた。嫌気性条件下にある哺乳類の腸環境では、*mdtEF* の発 現が亢進し、ニトロシルインドール誘導体を放出することによりニトロ化ストレスから菌 自身を保護する役割を果たしている⁵¹。酸条件下においては、細菌の二成分シグナル伝達系 *evgSA* を介して *mdtEF* の発現が亢進することが知られている⁵²。また、大腸菌が自己産生す るインドールによって、*gadX* 依存的に *mdtEF* 遺伝子の発現が誘導され、Rhodamine 6G (R6G) に対する薬剤耐性を獲得する⁴⁷。さらに、細胞増殖期においては、rpoS 並びに *hfq、gadY* 及 び *gadX* 等の rpoS 依存性シグナル伝達経路を介して *mdtEF* の転写発現亢進がみとめられて いる⁶⁶。

我々の研究室では、糖類により *mdtEF* の発現が誘導されることを報告した ⁵⁷。この研究 では、糖類の一つである N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) による *mdtEF* の誘導に関与する 因子としてサイクリック AMP (cAMP) -cAMP 受容体蛋白質 (CRP) 複合体が *mdtEF* とオ ペロンを形成している *gadE* のプロモーター領域に結合することによって *mdtEF* 遺伝子発現 を負に制御していることを同定した。GlcNAc は nagE により細胞内に取り込まれるが、こ れまでに cAMP を制御するアデニル酸シクラーゼは glucose (Glc) の糖取り込み機構に必須 の PTS (Phosphotransferase system) for glucose (PTS^{Glc}) を介して活性化されることが報告さ れていたため、GlcNAc による *mdtEF* 発現誘導シグナルにおいても nagE から PTS^{Glc} へとリ ン酸化カスケードが伝達されてアデニル酸シクラーゼが活性化するという仮説を立ててい た (図 2-1)。

本研究では、その制御機構の詳細についてさらなる解析を進め、仮設の検証を試みた。



図 2-1. 本研究室がこれまでに報告した糖類による mdtEF の遺伝子発現誘導機構の概要図

第2節 実験材料及び方法

2-1. 菌株, プラスミド, 及び培養条件

E. coli K-12 株由来の大腸菌を使用した。生菌体を用いた解析には KAM3 株および KAM3 から遺伝子を欠損させた株を用いた。これらの大腸菌株の遺伝子型を表 2-1 に示した。なお長期保存する菌株はグリセロールストック(菌の培養液 1 mL + sterilized 80% glycerol 0.2 mL)にして-80℃で保存した。一部の菌株については 20% skim milk に保存した。本実験では PCR の DNA template として E. coli MG1655 のクロモソームを調製して用いた¹²⁰。図 2-1 の IIA^{Glc}をコードする crr 変異株の作成には、ファージをベクターとして細菌の遺伝物質を供与菌から受容菌へ受け渡す形質導入(transduction)法により、普遍形質導入を行った。本実験におけるプラスミド DNA の調製としてアルカリ-SDS 法、ノックアウトプラスミドの構築確認時に SV Minipreps DNA Purification System (Promega)をそれぞれ使用した。本実験におけるコンピテントセルの調製として、高効率マンガン法を用いてコンピテントセルを作成しプラスミドの構築に使用した。また、エレクトロポレーション法を用いて作成したコンピテントセルはその他の形質転換に用いた。本実験における形質転換 の方法として、Heat Shock 法および Electroporation 法を用いた。TaKaRa Ligation Kit Ver2 (I)(タカ

ラバイオ)又は 2×Ligation Mix(和光純薬)を用いたライゲーションの後に行う形質転換では高効 率マンガン法コンピテントセルを用いた Heat Shock 法により行った。その他の形質転換については Electroporation 法を用いた。DNA の増幅を目的とした PCR 反応に用いる DNA polymerase は TaKaRa LA Taq(タカラバイオ)および KOD polymerase(TOYOBO)を用いた。抗生物質としては、 プラスミドの薬剤耐性マーカーとしてアンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン(いずれもナ カライテスクより購入)を使用した。アンピシリンは 100 µg/mL、カナマイシンは 25 µg/mL、クロラムフ ェニコールはプラスミドの構築と遺伝子のノックアウトの場合には 20 µg/mL の濃度で使用した。

表 2-1:実験に使用した大腸菌の遺伝子型

Strain	Relevent characteristics	Reference or source
E.coli strains		
TG1	F', [traD36, lacI ^q Δ (lacZ)M15, proAB+] /supE Δ (hsdM-mcrB)	Taylor et al., 1985
	5, (rK- mK- $McrB$ -), thi, $\Delta(lac-proAB)$	
KAM3	Derivative of TG1 that lacks a restriction system and acrB	Morita et al., 1998
KAM3∆nagE	Derivative of KAM3 that lacks <i>nagE</i>	Hirakawa et al., 2006
$KAM3 \Delta m dt EF$	Derivative of KAM3 that lacks <i>mdtEF(yhiUV)</i>	Nishino and Yamaguchi, 2002
KAM3 crr::kan	Derivative of KAM3 that mutant crr	This study
KAM3 ptsG::Tn5	Derivative of KAM3 that mutant ptsG	Hirakawa et al., 2006

2-2. 定量的リアルタイム RT-PCR

大腸菌を LB broth にて 37℃で OD = 0.3 になるまで培養し、その後 Glc 又は GlcNAc を終 濃度 10 mM になるように添加しさらに 2 時間培養を行った。大腸菌の total RNA 抽出にお いて, SV total RNA Isolation System (Promega)を使用した。抽出した RNA を cDNA へ逆転写す るために、MultiScribe Reverse Transcriptase (PE Applied Biosystems)を用いて cDNA を調製した。 定量的リアルタイム PCR には SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems)を使用し、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems)により測定した。反応に用いた プライマーの塩基配列を表 2-2 に示した。

表 2-2. RT-PCR で用いたプライマー

Gene name	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (3' to 5')
rrsA	cggtggagcatgtggtttaa	gaaaacttccgtggatgtcaaga
mdtE	cccccggttcggtcaa	ggacgtateteggeaactteat

2-3. cAMP 定量

大腸菌をLB broth にて 37℃で OD = 0.3 になるまで培養し、その後 Glc 又は GlcNAc を終 濃度 10 mM になるように添加しさらに 2 時間培養を行った。菌体内の cAMP 量測定のため に cAMP Biotak Enzymeimmunoassay System (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。分光光度 計 VERSA max microplate reader (Molecular Devices) で 450nm の吸光度を測定し、検量線か ら cAMP 量を測定した。

2-4. Survival Rate Assay

大腸菌を LB broth にて 37℃で OD = 0.3 になるまで培養し、その後 Glc 又は GlcNAc を終 濃度 10 mM になるように添加しさらに 2 時間培養を行った。大腸菌の薬剤に対する感受性 の指標として、DNA とのインターカレーションにより毒性を発揮する Rhodamine 6G (R6G) (150 μ g/mL)に 30 分間暴露させた後の生菌数(cfu)を測定した。

第3節 結果

3-1. *crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株での PTSsugar 添加による *mdtEF* の発現誘導

本研究室では、大腸菌において PTS sugar の GlcNAc、Glc 及び glucosamine (GlcN) が CRP-cAMP 複合体の減少を介して *mdtEF* の発現を誘導することを示した。また、*crp* 遺伝子 欠損変異体において *mdtEF* の発現が特異的かつ顕著に上昇することを明らかにした。

大腸菌において GlcNAc の添加による *mdtEF* 発現誘導は、cAMP レベルの減少により調節 されている。これまでの本 cAMP 減少メカニズムの仮説は以下の通りである。まず、GlcNAc はトランスポーターである nagE によって大腸菌の細胞内スペースに取り込まれる。次に、 GlcNAc がリン酸化される際に GlcNAc の感作及び取り込みを担う酵素である IIC^{Nag}が脱リ ン酸化され、続いて IIB^{Nag}が脱リン酸化される。これまでに Glucose の PTS 系である ptsG の IIA^{Glc} のみがアデニル酸シクラーゼと直接相互作用してその調節を行う分子として知ら れており ¹²¹、かつ IIA^{Glc} は他の PTS システムともクロストークしていることが報告されて いることから ¹²²、脱リン酸化された IIB^{Nag}が IIA^{Glc} の脱リン酸化を誘導していると推測した ¹²³。脱リン酸化された IIB^{Nag} が IIA^{Glc} の脱リン酸化を誘導していると推測した 濃度が低下し、CRP-cAMP 複合体量が減少することで、*mdtEF* が発現誘導されると考えら れた。つまり、GlcNAc による *mdtEF* 発現誘導は、脱リン酸化カスケード (IIC^{Nag}→IIB^{Nag} →IIA^{Glc})によって Glucose の PTS sugar を活用していることが推測されていた。本研究では、 本仮説を確かめるために、GlcNAc による *mdtEF* 発現誘導における Glucose PTSsugar システムの関与を調べた。

GlcNAc による *mdtEF* の発現誘導にIIA^{Glc} が必要であるかどうか検討する目的で、IIA^{Glc} をコードしている *crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株を用いて、Glc 又は GlcNAc の 存在下での *mdtEF* 発現レベルの変化を検討した (図 2-2)。*crr* 欠損株及び *ptsG* 欠損株では、 Glc 添加時に *mdtEF* の発現がほぼ完全に抑制された。この結果から、Glc による *mdtEF* の誘導はIIA^{Glc} に依存するアデニル酸シクラーゼの活性化の低下によって引き起こされることが 示された。一方で、*crr* 欠損株及び *ptsG* 欠損株に GlcNAc を添加した場合、予想と反して野 生株と同様に *mdtEF* の発現量が顕著に上昇した。したがって、GlcNAc による *mdtEF* の誘導は、IIA^{Glc} に依存しないことが明らかになった。さらに *nagE* 欠損株では、Glc を添加する と *mdtEF* の発現は観察されたが、GlcNAc を添加すると *mdtEF* の発現はほとんど抑制され ていた。以上のことから、GlcNAc と Glc による *mdtEF* の発現誘導はIIA^{Neg} 及びIIA^{Glc} がそれ ぞれ独立に制御していると考えられる。



図 2-2. crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での PTS sugar による mdtEF の発現量の変

化

野生株、*crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株を 10 mM PTSsugar 存在下で培養した時の *mdtEF* の発現量の変化を定量的リアルタイム RT-PCR により測定した。*crr* 欠損株及び *nagE* 欠損株の

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. *crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株での PTSsugar 添加による cAMP 量の変化

次に、GlcNAc と Glc による *mdtEF* の発現誘導がIIA^{Nag} 及びIIA^{Glc} がそれぞれ独立に制御し ていることを検討するために、野生株、*crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株に Glc お よび GlcNAc を添加した場合の cAMP 量を測定した(図 2-3)。野生株では Glc および GlcNAc を添加すると、何も添加していない場合と比較すると、いずれも菌体内の cAMP 量は約半 分まで減少した。*crr* 欠損及び *ptsG* 欠損株に対して、Glc を添加した場合は、何も添加して いない場合と比較して cAMP 量の減少は観察されなかったが、GlcNAc を添加した場合には cAMP 量はそれぞれ約 4 分の 1 程度まで減少した。*nagE* 欠損株に Glc を添加すると cAMP 量は何も加えてない時の約 10 分の 1 まで減少したが、GlcNAc を添加した場合は cAMP 量 の減少は認められなかった。以上のことから、IIA^{Glc} とIIA^{Nag} はそれぞれ独立にそれぞれの PTSsystem を介して独立にアデニル酸シクラーゼの活性低下をもたらすことが示された。



図 2-3. crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での PTS sugar による cAMP 量の変化 野生株、crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株を 10 mM の PTSsugar 存在下で培養した時の cAMP 量の変化を cAMP Biotak Enzymeimmunoasay システムにより測定した。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. *crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株での GlcNAc 添加による薬剤耐性 化

crr 欠損株及び*ptsG* 欠損株では、GlcNAc を添加しても*mdtEF*の発現量は増加した(図2-2)。 次に、*crr* 欠損株及び*ptsG* 欠損株では GlcNAc による *mdtEF* の発現誘導が薬剤耐性に影響を 及ぼすかを調べる目的で、薬剤を用いた Survival Rate Assay により生菌数を測定した(図 2-4)。 薬剤としては、mdtEF の基質であり、*mdtEF* を過剰発現させた大腸菌において高度な耐性を示 す Rhodamine 6G(150 μ g/mL)を用いた。

野生株、crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株に Glc および GlcNAc を添加しない場合の Rhodamine 6G の生存率は薬剤処理前に比べるとほとんど 0%で薬剤感受性であった。野生株に Glc および GlcNAc を添加した場合の生存率は増大し、各実験において 50%以上であった。crr 欠損株及び ptsG 欠損株では、GlcNAc を添加した場合の生存率は野生型株と同様に高くなり薬 剤耐性を示した。一方で、Glc を添加した場合の生存率は、10%程度と低く薬剤感受性であった。 また、nagE 欠損株では、Glc を添加した場合の生存率は野生型株と同様に高くなり薬剤耐性を示 した。一方で、GlcNAc を添加した場合の生存率は野生型株と同様に高くなり薬剤耐性を示

結果として、GlcNAcとGlcによる *mdtEF*の発現誘導はIIA^{Nag}及びIIA^{Glc}がそれぞれ独立に 制御し、mdtEFの基質に対する薬剤耐性を誘導することが明らかとなった。



図 2-4. crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株での PTS sugar による薬剤耐性への影響 野生株、crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株を 10 mM PTSsugar 存在下で培養した時の Rhodamine 6G(150 μg/mL)による薬剤耐性に及ぼす影響を評価した。

3-4. *crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株での PTS 糖存在下における cAMP 添加時の薬物耐性への影響

Glc 及び GlcNAc 添加によって菌体内 cAMP 量が低下することで mdtEF が誘導されること を確認した。最後に、cAMP の強制添加により mdtEF 依存的な薬剤耐性が打ち消されるの かを調べる目的で、crr 欠損株、ptsG 欠損株及び nagE 欠損株に外因性の cAMP を添加し、 Rhodamine 6G に対する薬剤耐性への影響を検討した (図 2-5)。その結果、crr 欠損株及び ptsG 欠損株では、GlcNAc 添加時にみられていた Rhodamine 6G に対する薬剤耐性が、cAMP 添加群 において薬剤感受性となった。また、nagE 欠損株では、Glc 添加時にみられていた Rhodamine 6G に対する薬剤耐性が、cAMP 添加群において薬剤感受性となった。なお、野生株において、Glc 及び GlcNAc 添加時にみとめられた mdtEF 依存的な Rhodamine 6G に対する薬剤耐性能につい ても、cAMP を添加した場合にそれぞれ消失した。以上より、cAMP の強制添加により mdtEF 依存的な薬剤耐性が打ち消されることが示された。



図 2-5. PTS 糖存在下での *crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株における cAMP によ る薬剤耐性の消失

野生株、*crr* 欠損株、*ptsG* 欠損株及び *nagE* 欠損株を 10 mM PTSsugar 存在下で cAMP 添加培養した時の Rhodamine 6G(150 μg/mL)による薬剤耐性に及ぼす影響を評価した。

第4節 考察

本研究はモデル微生物として大腸菌を用い、RND型薬剤排出ポンプである mdtEF の発現 制御機構の解明を目指して行われたものである。本研究室では mdtEF の発現誘導物質は薬 剤ではなく、細胞壁の構成成分である GleNAc が誘導物質であることを明らかにし、その制 御機構についての研究を進め、CRP-cAMP 複合体によって mdtEF 遺伝子の発現が制御され ていることを見出してきた。私は、CRP-cAMP 複合体を介した Gle 及び GleNAc による mdtEF 発現誘導の詳細な機構を解明することを目的に研究を進めた。前提として、GleNAc による mdtEF 発現誘導の詳細な機構を解明することを目的に研究を進めた。前提として、GleNAc 添加に よる菌体内の cAMP 量の減少は、Gle の PTSsystem であるIIA^{Gle} を介してアデニル酸シクラ ーゼの活性の低下を引き起こすことによって生じるというこれまでの知見を踏まえて、 GleNAc による mdtEF 発現誘導にはIIA^{Gle} が関与していると仮説を立て、本研究において検 証を進めた¹²¹⁻¹²³。それぞれのトランスポーター欠損株を用いて実験をおこなった結果、Gle 及び GleNAc による mdtEF の発現誘導は、IIA^{Gle}及びIIA^{Nag}がそれぞれ独立に制御している ことが明らかとなった。得られた結果から推定されるモデル図について図 2-6 に示す。 GleNAc による mdtEF の発現誘導過程において、IIA^{Nag}が直接的にアデニル酸シクラーゼを 活性化しているのか、今後の研究の発展が望まれる。 mdtEF の生理的役割については全く解明されていないが、本研究より mdtEF はその役割 として、糖代謝で産出される有害な代謝産物を排出し、糖の添加による代謝亢進によって 有害産物が蓄積されることを防ぐ働きをしている可能性を支持するものと考える。



図 2-6. Glc 及び GluNAc 活性化による mdtEF 発現調節モデル

第三章

脂肪酸塩への耐性における薬剤排出ポンプ の役割の解明

第1節 諸言

両親媒性を有する脂肪酸塩は抗菌活性を示すことが報告されている。生体系において、 脂肪酸塩は典型的には 4~28 の炭素原子の鎖長を有する¹²⁴。脂肪酸塩のうち、炭素数 8 未 満のものを短鎖脂肪酸とし、炭素数 8~12 のものを中鎖脂肪酸、炭素数 12 超のものを長鎖 脂肪酸とする¹²⁵。ラウリン酸やミリスチン酸は飽和脂肪酸で、強力な抗菌活性をもってい ることが報告されている¹²⁶。脂肪酸塩の抗菌活性は、主として細菌細胞膜を不安定化する ことで、細胞透過性の増加、細胞の増殖阻害及び溶解誘導を引き起こす¹²⁷。

一方で、それぞれの細菌は、脂肪酸塩の抗菌作用に対して耐性を有していることが知ら れている。例えば、グラム陰性菌種は、細胞膜をより強く帯電させ、細胞表面の疎水性を 変化させることによって、脂肪酸塩の細胞内膜への浸透を防ぐことが知られている。また、 細菌の膜に局在するカロチノイドは抗酸化物質であり、流動性を低下させることにより細 胞膜を安定化させる¹²⁸。しかしながら、脂肪酸塩の抗菌活性に対する細菌の耐性機構はま だ完全に解明されておらず、薬剤排出ポンプの役割についても不明である¹²⁹。

薬剤排出ポンプは、胆汁酸塩と脂肪酸塩に消化される胆汁塩が細胞内に蓄積するのを防 ぐために必要であることが報告されている^{130,131,132,133,134}。私は、脂肪酸塩の抗菌作用に対 する細菌の耐性機構としても、薬剤排出ポンプが重要な役割を果たしているのではないか と考え、サルモネラ、大腸菌、緑膿菌における薬剤排出ポンプが脂肪酸塩耐性に及ぼす影 響を調べるために、本研究を進めた。

第2節 実験材料及び方法

3-1. 菌株, プラスミド, 及び培養条件

Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC14028s をサルモネラ菌野生型株として用いた¹³⁵。*E. coli* strain MG1655 を大腸菌野生型株として用いた¹³⁶。*P. aeruginosa* PAO1 を緑膿菌 野生型株として用いた¹³⁷。これらの遺伝子欠損株の遺伝子型を表 1-1 に示した。長期保存 する菌株は 10% skim milk (Difco skim milk、BD) 溶液に保存した。また、長期保存するプラ スドは Tris-HC1(EB buffer、QIAGEN)に溶解し-30°Cで保存した。サルモネラ菌及び大腸菌の 遺伝子欠損株の作成は、Datsenko らの方法に準じた^{3,22,138,139}。pKD46 vector を有する *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028s 及び *E. coli* strain MG1655 からエレクト ロコンピテントセルを得て、PCR 反応を行った。PCR 生成物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いてクリーンアップを行った。制限酵素処理後、アガロースゲル電気泳動 及び QIAEX II Gel Extraction Kit による PCR 産物の精製を行った。最終的にクロラムフェニ コール及びアンピシリンによる菌の選択を行った。*P. aeruginosa* PAO1 由来の遺伝子欠損株 は、土屋友房 教授(岡山大学)から分与していただいた株を用いた¹⁴⁰。サルモネラ菌のプラ スミド構築は、Horiyama らの方法に準じた⁴。大腸菌のプラスミド構築は、Nishino らの方 法に準じた¹¹⁸。緑膿菌のプラスミド(*pMMB67HE* and *pmexABM*)は、中江太治 教授(東海 大学)から分与いただいた。抗生物質としては、プラスミドの薬剤耐性マーカーとしてアンピシリ ン、クロラムフェニコール、カナマイシン(いずれもナカライテスクより購入)を使用した。アンピシリン は 100 µg/mL、カナマイシンおよびクロラムフェニコールは 25 µg/mL の濃度で使用した。

Strains	Characteristics	Source or reference				
S. enterica						
ATCC 14028s	S. enterica serovar Typhimurium wild-type	Nishino et al., 2006				
NKS175	$\Delta acrAB$	Nishino et al., 2006				
NKS181	$\Delta acrAB\Delta acrEF$	Nishino et al., 2006				
NKS183	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD$	Nishino et al., 2006				
NKS185	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC$	Nishino et al., 2006				
NKS186	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC::Cm^{R}$	Nishino et al., 2006				
NKS188	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC\Delta emrAB::Cm^{R}$	Nishino et al., 2006				
NKS190	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC\Delta emrAB::Cm^{R}\Delta mdfA::Km^{R}$	Nishino et al., 2006				
NKS195	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC\Delta emrAB\Delta mdfA\Delta mdtK::CmR$	Nishino et al., 2006				
NV S106	$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC\Delta emrAB\Delta mdfA\Delta mdtK::CmR$	Nishino et al. 2006				
NK3190	$\Delta macAB::Km^{R}$	Nisimio et al., 2000				
NKS174	$\Delta tol C$	Nishino et al., 2006				
NKS133	$\Delta emrAB$::Cm ^R	This study				
NKS825	$\Delta tolC\Delta emrAB::Cm^{R}$	This study				
NKS845	$\Delta tolC\Delta emrAB::Cm^{R}/vector (pUC118)$	This study				
NKS846	$\Delta tolC\Delta emrAB$::Cm ^R /pemrAB	This study				
NKS148	$\Delta acrB::Km^{R}$	Nishino et al., 2006				
NKS442	$\Delta acrB::Km^{\mathbb{R}}/vector (pUC118)$	Nishino et al., 2006				
NKS773	$\Delta acrB::Km^{\mathbb{R}}/pacrAB$	Nishino et al., 2006				
NKS757	$\Delta acrB::Km^{R}/pacrD$	Nishino et al., 2006				
NKS756	$\Delta acrB::Km^{R}/pacrEF$	Nishino et al., 2006				
NKS484	$\Delta acrB::Km^{\mathbb{R}}/pmdsAB$	Nishino et al., 2006				
NKS758	$\Delta acrB::Km^{R}/pmdtABC$	Nishino et al., 2006				
NKS443	$\Delta acrB::Km^{R}/pemrAB$	Nishino et al., 2006				
NKS759	$\Delta acrB::Km^{\mathbb{R}}/pmdfA$	Nishino et al., 2006				

表 3-1:実験に使用したサルモネラの遺伝型

	NKS447	$\Delta acrB::Km^{R}/pmdtK$	Nishino et al., 2006
	NKS446	$\Delta acrB::Km^{R}/pmacAB$	Nishino et al., 2006
	EG15129	$\Delta emrAB-lacZY^+$ Km ^R	Nishino et al., 2006
E.	coli		
	MG1655	Escherichia coli wild-type	Horiyama et al., 2010
	NKE96	$\Delta a cr B$	This study
	NKE126	$\Delta a cr B \Delta a cr D$	This study
	NKE1316	$\Delta acr B \Delta acr D \Delta m dt ABC$	This study
	NKE1326	$\Delta acr B \Delta acr D \Delta m dt A B C \Delta m dt E F$	This study
	NKE1328	$\Delta a cr B \Delta a cr D \Delta m dt A B C \Delta m dt E F \Delta a cr E F :: Km^{R}$	This study
	NKE95	$\Delta tolC::Cm^{R}$	This study
	NKE128	$\Delta acrAB\Delta tolC$	This study
	NKE1529	$\Delta acrAB\Delta tolC/vector (pMMB67HE)$	This study
	NKE1530	$\Delta acrAB\Delta tolC/pmexAB-oprM$	This study
	NKE348	$\Delta acrAB$	Horiyama et al., 2010
	NKE473	$\Delta acrAB$ /vector (pHSG399)	Horiyama et al., 2010
	NKE386	$\Delta acrAB/pacrAB$	Horiyama et al., 2010
	NKE388	$\Delta acrAB/pacrD$	Horiyama et al., 2010
	NKE390	$\Delta acrAB/pacrEF$	Horiyama et al., 2010
	NKE391	$\Delta acrAB/pmdtABC$	Horiyama et al., 2010
	NKE474	$\Delta acrAB/pmdtEF$	Horiyama et al., 2010
	NKE393	$\Delta acrAB/pemrAB$	Horiyama et al., 2010
	NKE395	$\Delta acrAB/pmacAB$	Horiyama et al., 2010
	NKE397	$\Delta acrAB/pemrE$	Horiyama et al., 2010
	NKE396	$\Delta acrAB/pmdfA$	Horiyama et al., 2010
	NKE399	$\Delta acrAB/pmdtK$	Horiyama et al., 2010
	NKE398	$\Delta acrAB/pydgEF$	Horiyama et al., 2010
P.	aeruginosa		
	PAO1	Pseudomonas aeruginosa wild-type	Horiyama et al., 2011
	NKP4	$\Delta mexAB$ -oprM	Horiyama et al., 2011
	NKP5	$\Delta mexAB$ -opr $M\Delta mexXY$	Horiyama et al., 2011
	NKP12	$\Delta mexAB$ -opr $M\Delta mexXY\Delta mexCD$ -opr J	Horiyama et al., 2011
	NKP14	$\Delta mexAB$ -opr $M\Delta mexXY\Delta mexCD$ -opr $J\Delta mexEF$ -opr N	Horiyama et al., 2011
	NKP16	$\Delta mexAB$ -opr $M\Delta mexXY\Delta mexCD$ -opr $J\Delta mexEF$ -opr $N\Delta mexHI$ -opm D	Horiyama et al., 2011
	NKP6	$\Delta mexAB$ -oprM	Horiyama et al., 2011
	NKP25	$\Delta mexAB$ -oprM/vector (pMMB607HE)	This study

3-2. 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、sodium hexanoate (C6)、sodium octanoate (C8)、 sodium decanoate (C10)、及び sodium dodecanoate (C12) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO、USA) 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¹⁴¹。菌株を 37℃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℃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。

3-3. β -galactosidase assay

β-galactosidase assay は目的の遺伝子のプロモーター活性を、プロモーターに lacZ を連結することで測定するものである。本実験では Miller の方法を一部改変して行った¹⁴²。

3-4. 細菌の増殖実験

96well-plate (Tissue culture plate、Falcon、BD)の各ウェルに、適切な薬剤を含む 200 µL の LB 培地をアプライし、37℃で一晩振とう培養した菌液を加えた。細菌の増殖は VERSA MAX (Molecular Devices)を用いて 600 nm の吸光度で菌の濁度を測定し、培養液中の菌量の指標と

第3節 結果

して用いた。

3-1. 薬剤排出ポンプ欠損株又は過剰発現株の各種脂肪酸塩に対する感受性

サルモネラ菌、大腸菌及び緑膿菌において、脂肪酸塩耐性に対する各薬剤排出ポンプの 関与を調べる目的で、薬剤排出ポンプ欠損株又は過剰発現株の各種脂肪酸塩に対する感受 性を MIC により検討した。脂肪酸塩としては、炭素数が6、8、10、12のヘキサン酸ナトリ ウム、オクタン酸ナトリウム、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウムを用いた。 なお、炭素数14以上の脂肪酸塩は希釈が困難であった。 MIC の結果を表 3-1 に示す。各菌種において脂肪酸塩に対する薬剤感受性は、脂肪酸塩の 炭素数が増加するにつれて高くなった。

サルモネラ菌では、acrAB 遺伝子の欠失により、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナト リウムに対する感受性が増加した。また、ΔacrAB acrEF acrD mtdABC 変異株から emrAB 遺 伝子を欠失させると、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウムに対する感受性が増 加し、ドデカン酸ナトリウムに対してはその増加が顕著であった。一方で、emrAB 単欠損 株においては、野生型株と比較して脂肪酸塩に対する感受性の増加は認められず、EmrAB は AcrAB が存在しない状態のときにデカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウムに対す る耐性に寄与していることが示唆された。tolC 欠損株は、炭素数の増加に依存して感受性が 高くなった。また、tolC emrAB 両欠損株では tolC 単欠損株よりも高い感受性がみとめられ た。さらに、emrAB 遺伝子の過剰発現株では、tolC emrAB 両欠損による高感受性株の脂肪 酸塩に対する耐性の回復がみられた。acrB 欠損株に acrAB、acrEF 又は emrAB 遺伝子を過 剰発現させた株では、acrB 欠損株と比較してデカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウ ムに対してそれぞれ 4 倍及び 8 倍の耐性をもたらすことがわかった。また、acrB 欠損株に acrD 又は mdfA 遺伝子を過剰発現させた株では、acrB 欠損株と比較してドデカン酸ナトリ ウムにして 4 倍の耐性がみとめられた。

大腸菌では、acrAB 遺伝子の欠失により、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウム に対する感受性が高くなることが示された。ΔacrB acrD mtdABC 変異株から mdtEF 遺伝子 を欠失させると、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウムに対する感受性がわずか に増加した。tolC 欠損株では、炭素数の増加に依存して感受性が高くなった。大腸菌の tolC 欠損株はサルモネラ菌の tolC 欠損株よりもデカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウム に対してより高感受性であり、大腸菌では脂肪酸塩に対する耐性には TolC の寄与が大きい ことが示唆された。acrAB tolC 両欠損株では、tolC 欠損株よりデカン酸ナトリウム及びドデ カン酸ナトリウムに対するさらなる感受性の増加はみられなかった。acrAB tolC 両欠損株に mexAB-oprM を過剰発現させた株では、acrAB tolC 両欠損による高感受性株の脂肪酸塩に対 する耐性の回復がみられた。acrAB 欠損株に acrAB, acrEF, mdtABC,又は emrAB 遺伝子を それぞれ過剰発現させた場合、acrB 欠損株と比較してドデカン酸ナトリウムに対する 4~8 倍の耐性がみとめられた。最も耐性の回復がみとめられたのは、emrAB 遺伝子過剰発現株 であった。また、acrAB 欠損株にインフルエンザ菌由来の acrAB 遺伝子を過剰発現させた大 腸菌株についてもその影響を検討したが、見かけ上の変化は認められなかった(データ非 表示)。

緑膿菌では、mexAB-oprM 遺伝子の欠失により、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナト リウムに対する感受性が増加した。mexAB-oprM 欠損株に mexAB-oprM を過剰発現させた株 では、耐性の回復がみとめられた。緑膿菌の mexAB-oprM 欠損株における脂肪酸塩に対する 感受性増加の程度はサルモネラ菌及び大腸菌の主要な薬剤排出ポンプである acrAB 欠損株 における脂肪酸塩に対する感受性増加よりも小さく、緑膿菌においては脂肪酸塩に対する 耐性への薬剤排出ポンプの影響は大きくないことが示唆された。

サルモネラ菌	MIC (µg/mL)			
	C6	C8	C10	C12
野生型	10000	10000	10000	< 5000
$\Delta a cr A B$	10000	10000	1250	1250
$\Delta a crAB \Delta a crEF$	10000	10000	1250	1250
∆acrAB∆acrEF∆acrD	10000	10000	1250	1250
$\Delta a crAB\Delta a crEF\Delta a crD\Delta mtdABC$	10000	10000	1250	1250
$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC$	10000	10000	1250	1250
$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC$	10000	10000	313	39
$\Delta emrAB$				
$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC$	10000	10000	313	39
$\Delta emrAB\Delta mdfA$				
$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC$	10000	10000	313	39
$\Delta emrAB\Delta mdfA\Delta mdttK$				
$\Delta acrAB\Delta acrEF\Delta acrD\Delta mtdABC\Delta mdsABC$	10000	10000	313	39
$\Delta emrAB\Delta mdfA\Delta mdtK\Delta macAB$				
$\Delta tolC$	10000	2500	313	156
$\Delta emrAB$	10000	10000	10000	> 5000
$\Delta tolC\Delta emrAB$	5000	2500	156	20
$\Delta tolC\Delta emrAB/pBR322$	5000	2500	156	20
$\Delta tolC\Delta emrAB/pemrAB$	5000	2500	1250	156
$\Delta a cr B$	10000	5000	625	625
ΔacrB/pBR322	10000	5000	625	625
Δ <i>acrB</i> /p <i>acrAB</i>	10000	5000	2500	5000
∆acrB/pacrD	10000	10000	1250	2500
Δ <i>acrB</i> /p <i>acrEF</i>	10000	10000	2500	5000
$\Delta a cr B/pm ds A B$	10000	5000	1250	625
$\Delta a cr B/pm dt ABC$	10000	5000	1250	625
$\Delta a cr B/pemrAB$	10000	5000	2500	5000
$\Delta a cr B/pmdf$	10000	10000	1250	2500
$\Delta acrB/pmdtK$	10000	5000	625	625

表 3-1. 各種薬剤排出ポンプの変異を有する細菌株の界面活性剤に対する感受性

$\Delta a cr B / pmac A B$	10000	5000	625	625
大腸菌	MIC (µg/mL)			
	C6	C8	C10	C12
野生型	20000	10000	10000	< 5000
$\Delta a cr B$	10000	10000	2500	2500
∆acrB⊿acrD	10000	10000	2500	2500
$\Delta a cr B \Delta a cr D \Delta m dt A B C$	10000	10000	2500	2500
$\Delta a cr B \Delta a cr D \Delta m dt A B C \Delta m dt E F$	10000	10000	1250	1250
$\Delta a cr B \Delta a cr D \Delta m dt A B C \Delta m dt E F \Delta a cr E F$	5000	10000	1250	1250
$\Delta tolC$	5000	625	39	10
$\Delta a crAB\Delta tolC$	5000	625	39	10
∆acrAB∆tolC/pMMB67HE	N.D.	N.D.	39	10
$\Delta a crAB\Delta tolC/pmexAB-oprM$	N.D.	N.D.	2500	5000
Δ <i>acrAB</i>	5000	5000	1250	625
Δ <i>acrAB/</i> pHSG399	5000	5000	1250	625
∆acrAB/pacrAB	5000	5000	2500	2500
∆acrAB/pacrD	5000	5000	1250	1250
∆acrAB/pacrEF	5000	5000	1250	2500
$\Delta a crAB/pmdtABC$	10000	10000	2500	2500
$\Delta a crAB/pmdtEF$	5000	5000	1250	1250
$\Delta a crAB/pemrAB$	5000	5000	2500	5000
$\Delta acrAB/pmacAB$	5000	5000	1250	1250
$\Delta a crAB/pemrE$	10000	5000	1250	1250
$\Delta a crAB/pmdfA$	5000	5000	1250	1250
$\Delta a crAB/pmdtK$	5000	5000	1250	1250
∆acrAB/pydgEF	10000	10000	1250	1250
緑膿菌	MIC (µg/mL)			
	C6	C8	C10	C12
野生型	20000	20000	10000	< 5000
$\Delta mexAB$ -oprM	20000	20000	5000	5000
$\Delta mexAB$ -opr $M\Delta mexXY$	20000	20000	2500	5000
$\Delta mexAB$ -oprM $\Delta mexXY\Delta mexCD$ -oprJ	20000	20000	2500	5000
$\Delta mexAB$ -oprM $\Delta mexXY\Delta mexCD$ -oprJ	20000	20000	2500	5000
$\Delta mexEF$ -oprN				
	• • • • • •	• • • • • •		-

$\Delta mexAB$ -oprM	N.D.	N.D.	2500	5000
ΔmexAB-oprM/pMMB607HE	N.D.	N.D.	2500	5000
$\Delta mexAB$ -oprM/pmexAB-oprM	N.D.	N.D.	5000	< 5000

C6 ヘキサン酸ナトリウム; C8 オクタン酸ナトリウム; C10 デカン酸ナトリウム; C12 ドデカン酸ナトリウム 太字の値は、対応する親株の値より有意に大きいか小さい。

MIC 測定は少なくとも3回繰り返した。

N.D., not determined

3-2. 脂肪酸ナトリウムによる emrAB 転写活性の変化

次項以降は、脂肪酸塩に対する細菌の耐性能を検討するにあたり、表 3-1 で最も顕著な感 受性の変化を示したサルモネラ菌における *emrAB* 遺伝子に焦点を当てて研究を進めた。

我々の研究室はこれまでに、*emrAB*遺伝子の発現は実験室条件下において何らかの刺激 によって誘導する必要があることを報告した³。また、大腸菌において CCCP、Nalidixic acid 及び他の化学物質が *emrAB*遺伝子の発現を誘導することが知られている¹⁴³。表 3-1 のとお り、emrAB が脂肪酸塩への耐性を与えることが明らかとなったが、脂肪酸塩が *emrAB*の発 現を誘導するかは不明である。

そこではじめに、脂肪酸塩がサルモネラ菌における *emrAB* 遺伝子の発現誘導を制御する かを調べる目的で、emrAB レポータープラスミドを担持している野生型のサルモネラ菌を 培養し、脂肪酸塩添加後に β-ガラクトシダーゼアッセイにより *emrAB* 発現誘導能を評価し た(図 3-1)。脂肪酸塩としては、表 3-1 のとおり MIC 測定において最も高い抗菌活性を示 した炭素数 12 のドデカン酸ナトリウムを用いた。その結果、*emrAB* はドデカン酸ナトリウ ムによって転写が誘導され、その発現誘導能は脂肪酸塩を添加しない場合の約 3 倍であっ た。

45



emrAB transcriptional activity

図 3-1. 脂肪酸ナトリウムによる emrAB 転写活性の変化

ドデカン酸ナトリウム (C12) の存在下及び非存在下での *emrAB* 遺伝子の染色体コピーを *lacZY* 遺伝子に置換したサルモネラ菌の β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。データとエラーバーは それぞれ、5回の独立した実験の平均値と標準偏差に対応している。^{*}P<0.01.

3-3. サルモネラ菌における薬剤排出ポンプの段階的遺伝子欠損株におけるド デカン酸ナトリウムに対する感受性

次に、脂肪酸塩に対する耐性について *emrAB* を含む各薬剤排出ポンプの寄与をさらに調 べる目的で、ドデカン酸ナトリウムを用いたサルモネラ菌の薬剤排出ポンプを 9 つ段階的 に欠損させた株について細胞増殖活性を測定した(図 3-2)。その結果、*AacrB acrD mtdABC mdsABC* 変異株から *emrAB* 遺伝子を欠失させると、ドデカン酸ナトリウムに対して顕著に感 受性化することが明らかとなった。この結果は、表 3-1 の MIC 測定結果とも一致しており、 emrAB がサルモネラ菌におけるドデカン酸ナトリウムに対する耐性維持に大きく寄与して いることを示していた。



図 3-2. サルモネラ菌における異物排出トランスポーター段階欠損株のドデカン酸ナトリウ ム添加による細胞増殖への影響

ドデカン酸ナトリウム存在下及び非存在下でのサルモネラ菌の薬剤排出ポンプ段階的欠失株の 増殖を測定した。データは同様の結果が得られた3回の独立した実験のうちの1回を示す。

3-4. 薬剤排出ポンプ EmrAB の TolC 非依存的な寄与

表 3-1 のとおり MIC 測定において、サルモネラ菌の *AacrB acrD mtdABC mdsABC* 変異株か ら *emrAB* 遺伝子を欠失させた株においてみられたデカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナト リウムへの感受性は、*tolC* 欠損株でみられた同脂肪酸塩への感受性と同等または高かった。 emrAB は膜融合蛋白 emrA を持つことから、emrAB-tolC として薬剤排出を行うとされてい る異物排出トランスポーターである³。しかしながら、*tolC emrAB* 両欠損株は、*tolC* 単欠損 株又は *AacrB acrD mtdABC mdsABC* 変異株から *emrAB* 遺伝子を欠失させた株よりも高感受性 を示した。本結果は、emrAB-tolC として機能する emrAB が、デカン酸ナトリウム及びドデ カン酸ナトリウムに対する耐性化にあたっては tolC とは独立して作用する可能性を示唆し ている。

*emrAB*が tolCと独立して作用するかを検討する目的で、tolC単欠損株、emrAB単欠損株及び tolC emrAB 両欠損株を用いて、ドデカン酸ナトリウム存在下における細胞増殖活性を

測定した(図 3-3)。その結果、tolC 欠損株は細胞増殖活性を示したが、tolC emrAB 両欠損 株は細胞増殖活性を示さなかった。さらに、tolC emrAB 両欠損株に emrAB 遺伝子を過剰発 現させた株では、ドデカン酸ナトリウムに対する感受性が回復し、細胞増殖活性を示した。 以上のことから、tolC 非存在下でも emrAB がドデカン酸ナトリウム耐性を与えることが明 らかとなり、emrAB が脂肪酸塩の存在下で tolC と独立して作用していることが示された。





(a) ドデカン酸ナトリウム存在下及び非存在下でのサルモネラ菌の野生型株、tolC 欠損株、
 emrAB 欠損株及び tolC emrAB 両欠損株の増殖を測定した。(b) ドデカン酸ナトリウム存在下及び非存在下でのサルモネラ菌の tolC emrAB 両欠損株、tolC emrAB 両欠損株に pBR322 遺伝子
 又は emrAB 遺伝子を過剰発現させた株の増殖を測定した。データは同様の結果が得られた 3
 回の独立した実験のうちの1回を示す。

3-5. 各薬剤排出ポンプの TolC 依存性

tolC は多機能外膜チャネルとして機能し、RND ファミリー薬剤排出ポンプの内膜及び膜 融合蛋白質と複合体を形成することが知られている¹⁴⁴。そこで、サルモネラ菌の tolC 欠損 株が emrAB を含む各薬剤排出ポンプと協働しているかを検討する目的で、tolC 及び各薬剤 排出ポンプの両欠損株を用いて、ドデカン酸ナトリウム存在下における細胞増殖活性を測 定した (図 3-4)。その結果、ドデカン酸ナトリウム存在下において tolC emrAB 両欠損株の みが顕著な感受性を示し、他の薬剤排出ポンプとの両欠損株において感受性の増加は認め られなかった。以上より、これはサルモネラ菌の薬剤排出ポンプの中で emrAB のみが脂肪 酸塩の存在下で tolC と独立して作用していることを強く支持する結果であると考える。



図 3-4. tolC 及び各薬剤排出ポンプの両欠損株におけるドデカン酸ナトリウム添加時の細胞 増殖への影響

ドデカン酸ナトリウム存在下及び非存在下でのサルモネラ菌の野生型株、tolC 欠損株及び tolC 及び各薬剤排出ポンプの両欠損株の増殖を測定した。3 つの実験のうち、同様の結果が得られた1 つの実験結果を示す。データは同様の結果が得られた3 回の独立した実験のうちの1 回を示す。

3-6. 薬剤排出ポンプ EmrAB における各基質添加時の TolC 依存性

上述のように、emrAB は tolC 非依存的にドデカン酸ナトリウムに対する耐性を付与する ことが明らかとなった。最後に、ドデカン酸ナトリウム以外の基質に対する耐性への emrAB の影響並びに tolC への依存性を検討する目的で、tolC 単欠損株、emrAB 単欠損株及び tolC emrAB 両欠損株を用いて、emrAB の各基質の存在下における細胞増殖活性を測定した(図 3-5)。emrAB の基質としては、大腸菌 emrAB の耐性化に寄与することがわかっているナリ ジクス酸、ノボビオシン及び胆汁酸ナトリウムを用いた。その結果、ナリジクス酸やノボビオ シン存在下においては tolC 欠損株と tolC emrAB 欠損株の感受性がほとんど同じであった。 一方で胆汁酸ナトリウムについては、tolC 欠損株と比較して tolC emrAB 欠損株でより高い感 受性を示した。

胆汁酸ナトリウムは、コリン酸ナトリウム及びデオキシコールナトリウムの混合物である。 tolC emrAB 両欠損株を用いてデオキシコール酸に対する感受性を MIC により検討した結果、 tolC 単欠損株よりも高い感受性がみられ、tolC emrAB 両欠損からの emrAB 遺伝子の過剰発 現株において耐性の回復がみとめられた (MIC:野生株> 40000 μg/mL、tolC 欠損株 156 μg/mL、 tolC emrAB 両欠損株 39 μg/mL、tolC emrAB 両欠損上での emrAB 過剰発現株 156 μg/mL)。



図 3-5. 様々な薬剤存在下での toIC 及び emrAB 欠損株の細胞増殖への影響

ナリジクス酸、ノボビオシン又は胆汁酸ナトリウム存在下でのサルモネラ菌の野生型株、emrAB

欠損株、tolC 欠損株、tolC emrAB 両欠損株の増殖を測定した。データは同様の結果が得られた3回の独立した実験のうちの1回を示す。

第4節 考察

グラム陰性細菌であるサルモネラ菌、大腸菌及び緑膿菌の各薬剤排出ポンプ変異株を用 いて、炭素数 6~12 の脂肪酸塩に対する感受性を MIC にて測定した(表 3-1)。ヘキサン酸 ナトリウム及びオクタン酸ナトリウムの存在下では、tolC 欠損株を除くすべての菌株で感受 性の差はみとめられなかった。一方で、デカン酸ナトリウム及びドデカン酸ナトリウムで は菌株ごとに感受性の差がみられた。特に、サルモネラ菌の emrAB tolC 両欠損株並びに大 腸菌の tolC 単欠損株において、デカン酸ナトリウムと比較してドデカン酸ナトリウムにお いてより高い感受性がみとめられた。そこで、ドデカン酸ナトリウム存在下での emrAB と tolC の耐性活性を明らかにすることを目的に研究を進めることとした。

いくつかの細胞増殖アッセイの結果、サルモネラ菌の emrAB がドデカン酸ナトリウムに 対する耐性化に大きく寄与していることが示された。さらに、ドデカン酸ナトリウムに対 する耐性化への emrAB の関与は、tolC 非依存的に働いていることが明らかとなった。サル モネラ菌では、tolC の欠失により多くの抗菌薬及び化学物質に対する高い感受性をもたらす と報告されている^{3,145}。

MFS 型異物排出トランスポーターである emrAB は、外膜蛋白である tolC と共役して機能 すると考えられてきた⁴。近年、大腸菌においては emrAB-tolC 薬剤排出ポンプの結晶構造 解析も明らかにされている¹⁴⁶。しかしながら本研究より、ラウリン酸ナトリウムや胆汁酸 ナトリウムといった界面活性化合物種では tolC 非依存的、ナリジクス酸やノボビオシンとい った抗菌剤では tolC 依存的であることが示され、サルモネラ emrAB の tolC 依存性は基質と する化合物によって異なることが明らかとなった。emrAB の tolC 依存性については、細胞 質で毒性を示す化合物の薬剤排出ポンプとして機能するためには emrAB-tolC 複合体として 働くことが必須である一方、脂肪酸塩のような細胞膜上の膜傷害性物質に対する保護作用 に対しては、tolC が必須ではないと考えられる。脂肪酸塩添加時の emrAB の転写発現誘導 の結果(図 3-1)を踏まえて、emrAB は、脂肪酸塩による膜傷害性に備えるために脂肪酸塩 の存在下で発現が亢進すると推察される。以上の結果より、emrAB が基質に依存して外膜 蛋白質 tolC の利用可能性を選択し、機能を発揮することが示唆された。

本研究では、サルモネラ菌において emrAB が tolC 非依存的な機能により脂肪酸塩の抗菌 活性からの生存に役割を果たすことを示した。今後の課題として、emrAB が脂肪酸塩に対 してどのような機構で耐性の獲得に寄与しているかについては不明なままであり、薬剤排 出ポンプの生理的役割を見出すために意義があると考え、今後の研究の発展に期待したい。

総括

薬剤排出ポンプは様々な物質への耐性を細菌に与えることにより、様々な環境下で生育 することを可能にするシステムであるといえる。しかし近年では、薬剤排出ポンプの薬剤 耐性における機能にくわえて、様々な生理機能を持つということが明らかにされつつある。 本研究では生理機能の解明を目的として、細菌の糖耐性及び脂肪酸耐性に着目し、これら の過程における薬剤排出ポンプの役割を中心に解析を行った。

1章より、サルモネラ、大腸菌及び緑膿菌における薬剤排出ポンプの生理的な機能につい てこれまでに報告されている知見を包括的にまとめた結果、各薬剤排出ポンプは菌が外部 を攻撃するための機能並びに菌が自身を守るための機能と関連した生理学的機能の発揮を サポートしていることが明らかとなった。また、3種のグラム陰性菌が保持する薬剤排出ポ ンプは、それぞれに特異的な働きをしていた。このことは、たとえ同じ蛋白ファミリーに 属する薬剤排出ポンプであっても、各菌種の生育環境に適応する形で各薬剤排出ポンプが 進化を遂げてきたことを推察できる知見であると考える。

2章より、細菌の糖耐性の解明を目的として、Glc 及び GlcNAc といった糖類による mdtEF 遺伝子発現シグナル経路の詳細について解析した結果、Glc 及び GlcNAc はそれぞれ独立し たシグナル経路により mdtEF の発現を誘導することが明らかとなった。本研究は、mdtEF の役割として、糖代謝で産出される有害な代謝産物を排出し、糖の添加による代謝亢進に よって有害産物が蓄積されることを防ぐ働きをしている可能性を支持するものと考える。 mdtEF の遺伝子の周辺には酸耐性に関与して遺伝子が多く、また、培地に糖を添加して培養 すると培地の pH は酸性に傾くことから、mdtEF は酸性の代謝産物を排出している可能性が 考えられる。今後の研究により、mdtEF の生理的な意義の解明がさらに進むことを望む。

3 章より、細菌の脂肪酸塩耐性の解明を目的として、炭素数が 8~12 の脂肪酸塩の対する 各グラム陰性菌における薬剤排出ポンプの寄与について解析した結果、いくつかの薬剤排 出ポンプは脂肪酸塩に対する耐性において重要な役割を果たすことが明らかとなった。特 に、薬剤排出ポンプの寄与が大きいドデカン酸ナトリウムに対する耐性において、emrAB がその耐性化に重要な役割を果たしていることを示した。また、ドデカン酸ナトリウムに 対する耐性化への emrAB の関与は、tolC 非依存的に働いていることが明らかとなり、emrAB は基質に依存して最適な機能を保つために、複合体形成を使い分けて環境適応に寄与して いることが示唆された。今後の研究により、emrAB の生理的な意義の解明がさらに進むことを 望む。

これまでに、薬剤排出ポンプの生理的機能について多くのことが明らかとなったが、未 だに機能が全く明らかとなっていない薬剤排出ポンプも存在する。薬剤排出ポンプに着目 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、今後より詳細に生理的 機能を解析することで、最良の耐性菌感染症の治療薬の開発に貢献することができると考 える。近年の遺伝子工学技術の発展により、より簡便に遺伝子発現系を制御した研究がお こなえるようになりつつある。今後の網羅的な解析により、遺伝子制御の引き金となる原 因因子の同定、遺伝子制御メカニズムの解明などが進み、薬剤排出ポンプの生理的機能の 解明につながることを期待する。

引用文献

- 1. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E *et al.* Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 2002; **419**: 587-93.
- 2. 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.
- 3. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 2006; **59**(1):126-41.
- Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K. TolC dependency of multidrug efflux systems in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(7):1372-6.
- Nishino K and Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2001; 183(20):5803-12.
- 6. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001; **3**(2):255-64.
- Ma D, Cook DN, Alberti M *et al.* Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of Escherichia coli. *J Bacteriol.* 1993; 175(19):6299-313.
- 8. Zgurskaya HI and Nikaido H. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96**(13):7190-5.
- 9. Eswaran J, Hughes C, Koronakis V. Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. *J Mol Biol.* 2003; **327**(2):309-15.
- Buckley AM, Webber MA, Cooles S *et al.* The AcrAB-TolC efflux system of Salmonella enterica serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2006; 8(5):847-56
- Webber MA, Bailey AM, Blair JM *et al.* The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in Salmonella enterica includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. *J Bacteriol.* 2009; **191**(13):4276-85.
- Blair JMA, Ragione RML, Woodward MJ *et al.* Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*: 2009; **64**(5):965-72.
- Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J *et al.* TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness
 of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium by increasing type III secretion
 system-1 expression. *Int J Med Microbiol.* 2008; 298(7-8):561-9.
- 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. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(10):2409-17.
- 15. Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS *et al.* Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2014; **69**(3):673-81.

- Blair JMA, Smith HE, Ricci V et al. Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: implications for efflux and virulence inhibitor design. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(2):424-31.
- Zhang C, Chen P, Yang L *et al.* Coordinated Expression of acrAB-tolC and Eight Other Functional Efflux Pumps Through Activating ramA and marA in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microb Drug Resist.* 2018; 24(2):120-125.
- Wang-Kan X, Blair JMA, Chirullo B *et al.* Lack of AcrB Efflux Function Confers Loss of Virulence on Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *MBio.* 2017; 8(4). pii: e00968-17
- Nikaido E, Shirosaka I, Yamaguchi Akihito *et al.* Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in Salmonella enterica serovar Typhimurium in response to indole and paraquat. *Microbiology*. 2011; 157(Pt 3):648-55.
- Baucheron S, Nishino K, Monchaux I *et al.* Bile-mediated activation of the acrAB and tolC multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of ramA in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(9):2400-6.
- Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in Salmonella enterica serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem.* 2008; 283(35):24245-53.
- 22. Yamasaki S, Nagasawa S, Hayashi-Nishino M *et al.* AcrA dependency of the AcrD efflux pump in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Antibiot (Tokyo).* 2011; **64**(6):433-7.
- Buckner MMC, Blair JMA, Ragione RML *et al.* Beyond Antimicrobial Resistance: Evidence for a Distinct Role of the AcrD Efflux Pump in Salmonella Biology. *MBio.* 2016; 7(6). pii: e01916-16.
- Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium *J Bacteriol*. 2007; 189(24):9066-75.
- 25. Song S, Lee B, Yeom J *et al.* MdsABC-Mediated Pathway for Pathogenicity in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 2015; **83**(11):4266-76.
- Pontel LB, Audero MEP, Espariz M *et al.* GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of Salmonella-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. *Mol Microbiol.* 2007; 66(3):814-25.
- 27. Bogomolnaya LM, Andrews KD, Talamantes M *et al.* The ABC-type efflux pump protects Salmonella enterica serovar typhimurium from oxidative stress. *MBio.* 2013; **4**(6):e00630-13
- Bogomolnaya LM, Tilvawala R, Elfenbein JR *et al.* Linearized Siderophore Products Secreted via MacAB Efflux Pump Protect Salmonella enterica Serovar Typhimurium from Oxidative Stress. *MBio.* 2020; **11**(3):e00528-20
- 29. Ricci V, Attah V, Overton T *et al.* CsrA maximizes expression of the AcrAB multidrug resistance transporter. (Piddock LJV1. Nucleic Acids Res. 2017; **45**(22):12798-12807.

- Fàbrega A, Merle L, Bouguénec CL *et al.* Repression of invasion genes and decreased invasion in a high-level fluoroquinolone-resistant Salmonella typhimurium mutant. *PLoS One.* 2009; 4(11):e8029.
- Barchiesi J, Castelli ME, Soncini F *et al.* mgtA Expression is induced by rob overexpression and mediates a Salmonella enterica resistance phenotype. *J Bacteriol.* 2008; **190**(14):4951-8.
- Yamasaki S, Nagasawa S, Fukushima A *et al.* Cooperation of the multidrug efflux pump and lipopolysaccharides in the intrinsic antibiotic resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(5):1066-70.
- Yamasaki S, Fujioka T, Hayashi K *et al.* Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Infect Chemother*. 2016; 22(11):780-4.
- Lawler AJ, Ricci V, Busby SJW et al. Genetic inactivation of acrAB or inhibition of efflux induces expression of ramA. J Antimicrob Chemother. 2013; 68(7):1551-7.
- 35. Li L, Yang Y, Lioa X *et al.* Development of ceftriaxone resistance affects the virulence properties of Salmonella enterica serotype Typhimurium strains. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; **10**(1):28-34.
- Rensch U, Nishino K, Klein G et al. Salmonella enterica serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. Int J Antimicrob Agents. 2014; 44(2):179-80.
- Cerminati S, Giri GF, Mendoza J *et al.* The CpxR/CpxA system contributes to Salmonella gold-resistance by controlling the GolS-dependent gesABC transcription. *Environ Microbiol.* 2017; 19(10):4035-44.
- Hayashi-Nishino M, Fukushima A, Nishino K. Impact of hfq on the intrinsic drug resistance of salmonella enterica serovar typhimurium. *Front Microbiol.* 2012; 3:205.
- Ruiz C and Levy SB. Regulation of acrAB expression by cellular metabolites in Escherichia coli. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(2):390-9. doi: 10.
- 40. Yang S, Lopez CR, Zechiedrich EL. Quorum sensing and multidrug transporters in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103**(7):2386-91.
- 41. Maira-Litrán 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**(2):243-7.
- 42. Yamasaki S, Wang L, Hirata T *et al.* Multidrug efflux pumps contribute to Escherichia coli biofilm maintenance. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; **45**(4):439-41.
- 43. Ruhe ZC, Wallace AB, Low DA *et al.* Receptor polymorphism restricts contact-dependent growth inhibition to members of the same species. *MBio.* 2013; **4**(4). pii: e00480-13.
- 44. Meouche IE and Dunlop MJ. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. Science. 2018; **362**(6415):686-90.
- 45. Elkins CA and Mullis LB. Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2006; **188**(3):1191-5.

- 46. Matsumura K, Furukawa S, Ogihara H *et al.* Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of Escherichia coli K-12. *Biocontrol Sci.* 2011; **16**(2):69-72.
- 47. Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T *et al.* Indole induces the expression of multidrug exporter genes in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 2005; **55**(4):1113-26.
- 48. Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M *et al.* Effect of NlpE overproduction on multidrug resistance in Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother*: 2010; **54**(5):2239-43.
- 49. Lau SY and Zgurskaya HI. Cell division defects in Escherichia coli deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. *J Bacteriol.* 2005; **187**(22):7815-25.
- 50. Wei Y, Lee JM, Smulski DR *et al.* Global impact of sdiA amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2001; **183**(7):2265-72.
- 51. Zhang Y, Xiao M, Horiyama T *et al.* The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in Escherichia coli. *J Biol Chem.* 2011; **286**(30):26576-84.
- Hirakawa H, Nishino K, Yamada J *et al.* Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother*: 2003; **52**(4):576-82.
- 53. Masuda N and Church GM. Escherichia coli gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J Bacteriol.* 2002; **184**(22):6225-34.
- Hirakawa H, Inazumi Y, Senda Y *et al.* N-acetyl-d-glucosamine induces the expression of multidrug exporter genes, mdtEF, via catabolite activation in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2006; 188(16):5851-8.
- 55. Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E *et al.* MacAB is involved in the secretion of Escherichia coli heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol.* 2008; **190**(23):7693-8.
- Turlin E, Heuck G, Brandão MIS *et al.* Protoporphyrin (HPPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in Escherichia coli. *Microbiologyopen*. 2014; 3(6):849-59.
- Lu S and Zgurskaya HI. MacA, a periplasmic membrane fusion protein of the macrolide transporter MacAB-TolC, binds lipopolysaccharide core specifically and with high affinity. *J Bacteriol*. 2013; 195(21):4865-72.
- Lewinson O, Padan E, Bibi E. Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(39):14073-8.
- Sikdar R, Simmons AR, Doerrler WT. Multiple envelope stress response pathways are activated in an Escherichia coli strain with mutations in two members of the DedA membrane protein family. J Bacteriol. 2013; 195(1):12-24.
- 60. Deininger KNW, Horikawa A, Kitko RD *et al.* A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in Escherichia coli. *PLoS One.* 2011; **6**(4):e18960.
- 61. Sakamoto A, Terui Y, Yoshida T *et al.* Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA).

PLoS One. 2015; 10(4):e0124883.

- Aoki SK, Malinverni JC, Jacoby K *et al.* Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol Microbiol.* 2008; **70**(2):323-40.
- 63. Rahmati S, Yang S, Davidson AL *et al.* Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol.* 2002; **43**(3):677-85.
- Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML *et al.* Bile salts and fatty acids induce the expression of Escherichia coli AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol.* 2003; 48(6):1609-19.
- 65. Su C, Nikaido H, Yu EW. Ligand-transporter interaction in the AcrB multidrug efflux pump determined by fluorescence polarization assay. *FEBS Lett.* 2007; **581**(25):4972-6.
- Kobayashi A, Hirakawa H, Hirata T *et al.* Growth phase-dependent expression of drug exporters in Escherichia coli and its contribution to drug tolerance. *J Bacteriol.* 2006; 188(16):5693-703.
- 67. Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M *et al.* Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother.* 2011; **66**(2):291-6.
- Bay DC and Turner RJ. Small multidrug resistance protein EmrE reduces host pH and osmotic tolerance to metabolic quaternary cation osmoprotectants. *J Bacteriol*. 2012; **194**(21):5941-8.
- Wang Da and Fierke CA. The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in E. coli. *Metallomics*. 2013; 5(4):372-83.
- Leblanc SKD, Oates CW, Raivio TL. Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of Escherichia coli. J Bacteriol. 2011; 193(13):3367-75.
- 71. Kim E, Nies DH, McEvoy MM *et al.* Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol.* 2011; **193**(10):2381-7.
- 72. Long F, Su C, Zimmermann MT et al. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature*. 2010; **467**(7314):484-8.
- Evans K, Passador L, Srikumar R *et al.* Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol.* 1998; 180(20):5443-7.
- Sánchez P, Linares JF, Ruiz-Díez B *et al.* Fitness of in vitro selected Pseudomonas aeruginosa nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50(5):657-64.
- 75. Hirakata Y, Srikumar R, Poole K *et al.* Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of Pseudomonas aeruginosa. *J Exp Med.* 2002; **196**(1):109-18.
- Hirakata Y, Kondo A, Hoshino K *et al.* Efflux pump inhibitors reduce the invasiveness of Pseudomonas aeruginosa. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; **34**(4):343-6.
- 77. Kievit TRD, 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(6):1761-70.

- Liao J, Schurr MJ, Sauer K. The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *J Bacteriol.* 2013; 195(15):3352-63.
- Linares JF, López JA, Camafeita E *et al.* Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol.* 2005; **187**(4):1384-91.
- Stickland HG, Davenport PW, Lilley KS *et al.* Mutation of nfxB causes global changes in the physiology and metabolism of Pseudomonas aeruginosa. *J Proteome Res.* 2010; 9(6):2957-67.
- Martínez-Ramos I, Mulet X, Moyá B et al. Overexpression of MexCD-OprJ reduces Pseudomonas aeruginosa virulence by increasing its susceptibility to complement-mediated killing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4):2426-9.
- Strempel N, Neidig A, Nusser M et al. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in Pseudomonas aeruginosa. PLoS One. 2013; 8(12):e82240.
- 83. Gillis R, White KG, Choi K *et al.* Molecular basis of azithromycin-resistant Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*: 2005; **49**(9):3858-67.
- 84. T Köhler, Delden C, Curty LK *et al.* Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol.* 2001; **183**(18):5213-22.
- 85. Olivares J, Alvarez-Ortega C, Linares JF *et al.* Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair Pseudomonas aeruginosa fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environ Microbiol.* 2012; **14**(8):1968-81.
- Lamarche MG and Déziel E. MexEF-OprN efflux pump exports the Pseudomonas quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One.* 2011; 6(9):e24310.
- Tian Z, Aogáin MM, O'Connor HF *et al.* MexT modulates virulence determinants in Pseudomonas aeruginosa independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb Pathog.* 2009; 47(4):237-41.
- Wang D, Seeve C, Pierson LS *et al.* Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in Pseudomonas aeruginosa. *BMC Genomics.* 2013; 14:618.
- Schaible B, Taylor CT, Schaffer K. Hypoxia increases antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(4):2114-8.
- Jeannot K, Sobel ML, Garch FE *et al.* Induction of the MexXY efflux pump in Pseudomonas aeruginosa is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol.* 2005; 187(15):5341-6.
- Caughlan RE, Sriram S, Daigle DM *et al.* Fmt bypass in Pseudomonas aeruginosa causes induction of MexXY efflux pump expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12):5015-21.
- 92. Fraud S and Poole K. Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and

promotion of aminoglycoside resistance development in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; **55**(3):1068-74.

- Aendekerk S, Diggle SP, Song Z et al. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in Pseudomonas aeruginosa via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology*. 2005; 151(Pt 4):1113-25.
- Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P *et al.* Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from Pseudomonas aeruginosa that confers resistance to vanadium. *Microbiology*. 2002; 148(Pt 8):2371-81.
- 95. Moore JD, Gerdt JP, Eibergen NR *et al.* Active efflux influences the potency of quorum sensing inhibitors in Pseudomonas aeruginosa. *Chembiochem.* 2014; **15**(3):435-42.
- Minagawa S, Inami H, Kato T *et al.* RND type efflux pump system MexAB-OprM of Pseudomonas aeruginosa selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* 2012; 12:70.
- Pacheco JO, Alvarez-Ortega C, Rico MA *et al.* Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant Pseudomonas aeruginosa Mutants Overexpressing Efflux Pumps. *MBio.* 2017; 8(4). pii: e00500-17.
- Zaborskyte G, Andersen JB, Kragh KN *et al.* Real-Time Monitoring of nfxB Mutant Occurrence and Dynamics in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Exposed to Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(3). pii: e02292-16.
- Jeannot K, Elsen S, Köhler T *et al.* Resistance and virulence of Pseudomonas aeruginosa clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(7):2455-62.
- 100. Mandsberg LF, Maciá MD, Bergmann KR *et al.* Development of antibiotic resistance and up-regulation of the antimutator gene pfpI in mutator Pseudomonas aeruginosa due to inactivation of two DNA oxidative repair genes (mutY, mutM). *FEMS Microbiol Lett.* 2011; **324**(1):28-37.
- 101. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N *et al.* Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2483-91.
- Lamarche MG and Déziel E. MexEF-OprN efflux pump exports the Pseudomonas quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One.* 2011; 6(9):e24310.
- 103. Olivares J, Alvares-Ortega C, Linares JF *et al.* Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair Pseudomonas aeruginosa fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environ Microbiol.* 2012; 14(8):1968-81.
- 104. Oshri RD, Zrihen KS, Shner I et al. Selection for increased quorum-sensing cooperation in Pseudomonas aeruginosa through the shut-down of a drug resistance pump. ISME J. 2018; 12:2458-2469.

- 105. Fetar H, Gilmour C, Klinoski R *et al.* mexEF-oprN multidrug efflux operon of Pseudomonas aeruginosa: regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(2):508-14.
- 106. Fargier E, Aogáin MM, Mooij MJ et al. MexT functions as a redox-responsive regulator modulating disulfide stress resistance in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 2012; 194(13):3502-11.
- 107. Sporer AJ, Beierschmitt C, Bendebury A *et al.* Pseudomonas aeruginosa PumA acts on an endogenous phenazine to promote self-resistance. *Microbiology*. 2018; 164(5):790-800.
- 108. Sakhtah H, Koyama L, Zhang Y et al. The Pseudomonas aeruginosa efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that controls gene expression and biofilm development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113(25):E3538-47.
- Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol.* 2007; 189(13):4561-8.
- 110. Perron K, Caille O, Rossier C *et al.* CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem.* 2004; **279**(10):8761-8.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S *et al.* Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(12):3322-7.
- 112. Fraud S, Campigotto AJ, Chen Z et al. MexCD-OprJ multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12):4478-82.
- Wolloscheck D, Krishnamoorthy, Nguyen J et al. Kinetic Control of Quorum Sensing in Pseudomonas aeruginosa by Multidrug Efflux Pumps. ACS Infect Dis. 2018; 4(2):185-95.
- 114. Sekiya H, Mima T, Morita Y *et al.* Functional cloning cmp, mexHI-opmD, from a Pseudomonas aeruginosa mutant. *Antimicrob Agents Chemother*: 2003; **47**(9):2990-2.
- 115. Li Y, Mima T, Komori Y et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(4):572-5.
- 116. Chuanchuen R, Murata T, Gotoh N *et al.* Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the Pseudomonas aeruginosa MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*: 2005; **49**(5):2133-6.
- 117. Mima T, Sekiya H, Mizushima T *et al.* Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from Pseudomonas aeruginosa. *Microbiol Immunol.* 2005; **49**(11):999-1002
- Nishino K, Yamada J, Hirakawa H *et al.* Roles of TolC-dependent multidrug transporters of Escherichia coli in resistance to β-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:3030-33.
- 119. Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C et al. Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli

strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45:1126-36.

- Jensen KF. The Escherichia coli K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. J. Bacteriol. 1993; 175:3401-7.
- Veen HW, Venema K, Bolhuis H *et al.* Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; **93**:10668-72.
- Saier MH, Chauvaux S, Deutscher J *et al.* Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in gram-negative versus gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20(7):267-71.
- Kotra P, Inui M, Yukawa H. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 2001; **92**(6):502-17.
- 124. Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME. Effect of α-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbio* 2009; **129**, 288–294.
- Yoon BK, Jackman JA. Valle-González *et al.* Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 1114.
- Shapiro S. The inhibitory action of fatty acids on oral bacteria. Oral Microbial Immunol 1996; 5: 350-5.
- Villagra NA, Hidalgo AA, Santiviago CA *et al.* Inhibitory action of fatty acids on the growth of Neisseria gonorrhoeae. J Antimicrob Chemother 1997; 17: 303-12.
- Chamberlain NR, Mehrtens BG, Xiong Z et al. Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z. *Infect Immun* 1991; **59**: 4332-37.
- 129. Desbois AP and Smith V. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; **85**: 1629-42.
- 130. Gunn JS. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect* 2000; 2: 907-13.
- 131. Prouty AM, Brodsky IE, Falkow S. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* typhimurium.. *Microbiology* 2004; **150**: 775-83.
- 132. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of Escherichia coli. Mol Microbiol. 1995; 16: 45-55.
- 133. Wotzka SY, Kreuzer M, Maier L, Arnoldini M, Nguyen BD, Brachmann AO, *et al.* Escherichia coli limits Salmonella Typhimurium infections after diet shifts and fat-mediated microbiota perturbation in mice. Nat Microbiol. 2019; 4: 2164-74.
- Henderson PJ, Maher C, Elbourne LDH, Eijkelkamp BA, Paulsen IT, Hassan KA. Physiological Functions of Bacterial "Multidrug" Efflux Pumps. Chem Rev. 2021; 121: 5417-78.

- 135. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG *et al.* Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; **83**: 5189-93.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997; 277: 1453-62.
- 137. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000; **406**: 959-64.
- Datsenko KA and Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6640-5.
- 139. Horiyama T, Nikaido E, Yamaguchi A *et al.* Roles of Salmonella multidrug efflux pumps in tigecycline resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2011; **66**: 105-10.
- 140. Sekiya H, Mima T, Morita Y *at al.* Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, *mexHI-opmD*, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2990-2.
- Nishino K, Yamaguchi A. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli. J Bacteriol* 2004; **186**: 1423-9.
- Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY. 1972; 352–5.
- Lomovskaya O, Lewis K. Matin A. EmrR is a negative regulator of the Escherichia coli multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol* 1995;177: 2328-34.
- 144. Eswaran J, Hughes C, Koronakis V. Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. *J Mol Biol* 2003; **327**: 309-15.
- 145. Baucheron S, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Role of TolC and parC mutation in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT204. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 657-9.
- 146. Yousefian N, Ornik-Cha A, Poussard S et al. Structural characterization of the EmrAB-TolC efflux complex from *E. coli. Biochim Biophys Acta Biomembr* 2021; **1863**: 183488.

謝辞

本研究(博士論文題目:薬剤排出ポンプの生理的機能における役割の解明)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(西野研究室)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、西野 邦彦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、山崎聖司准教授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、西毅准教授、西野美都子准教授、Martijn Zwama 特任助教、中島良介 特任准教授、田口厚志助教、西晶子特任研究員、西村巌特任研究員、平川秀忠博士、千田 靖子修士、坂田博樹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、藤原将祐博 士、古閑修輝修士、中野草平修士、ワイズ健修士、井川創太学士にこの場を借りて御礼申 し上げます。

さらに、北川公恵技術員、阿字地佳納子技術員、岡野英代技術員、河上祥子技術員には 主に作業的な面で、鳥取千春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、西野研究室の皆様に、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。

2022年9月 米田智廣

66

本学位論文(博士論文題目:薬剤排出ポンプの生理的機能における役割の解明)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

大阪大学教授(薬学研究科・産業科学研究所) 博士(薬学) 西野 邦彦

副査

大阪大学教授	(薬学研究科)	薬学博士	辻川 和丈
大阪大学教授	(薬学研究科)	理学博士	大久保 忠恭