

研究課題別評価書

1. 研究課題名

異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明

2. 氏名

西野 邦彦

3. 研究のねらい

近年、多剤耐性細菌の出現が医療現場において大きな問題となっている。化学療法が困難な多剤耐性菌の出現により、人類は多くの感染症の脅威に曝されており、今日もなお感染症の克服は医学的重要課題の一つである。一方で、細菌ゲノム配列が次々と解読され、細菌染色体上には、異物排出トランスポーターをコードしている遺伝子が数多く潜在していることが明らかとなってきた。異物排出トランスポーターは抗菌薬や細胞障害性異物を菌体外に排出することにより、細菌を様々な化合物に対して耐性化させる。また、異物排出トランスポーターは異物排出のみならず、代謝産物の輸送、情報伝達物質の排出、および細菌病原性の発現に関与していることが明らかになってきた。本研究は、病原細菌の薬剤耐性化と病原性発現における異物排出トランスポーターの役割とその生理機能を解析し、トランスポーターによる細菌機能制御の仕組みを解明することを目的とする。研究を通して、生理的基質排出による細菌機能調節機構を理解すると同時に、多剤耐性細菌による感染症を克服するための情報基盤を構築する。

4. 研究成果

(1) 細菌ゲノムに潜む異物排出トランスポーターの同定と薬剤耐性化における役割

サルモネラ属菌は自然界に広く存在し、急性胃腸炎やチフス・パラチフスを引き起こす原因菌が含まれる。近年、サルモネラによる食中毒事例が増えており、その多くが多剤耐性を示すことが報告されている。この病原細菌に内在する多剤耐性因子を解明するため、ポストゲノム手法を用いた異物排出トランスポーターの網羅的解析を行った。その結果、サルモネラには少なくとも9個の異物排出トランスポーターが存在していることが判明した(図1)。内1個はサルモネラ特異的に存在するものであり、私達はこれを *mdsABC* (*mds* for multidrug transporter for Salmonella)と名付けた。これら異物排出トランスポーターが実際に薬剤耐性化に関与しているかどうかを調べるために、各トランスポーター遺伝子をクローニングし、発現株を構築した。これらトランスポーターの発現はいずれも、サルモネラを薬剤耐性化させることを明らかにした。また、トランスポーター欠損株を構築し、フェノタイプマイクロアレイを用いて約2000種類の異なる環境下における細菌の生育を観察したところ、欠損株は図2に示す抗菌薬・色素・界面活性剤といった様々な化合物に対して感受性化していることが分かった。これら9個のトランスポーターはサルモネラの自然耐性に深く関与していることが明らかになった。

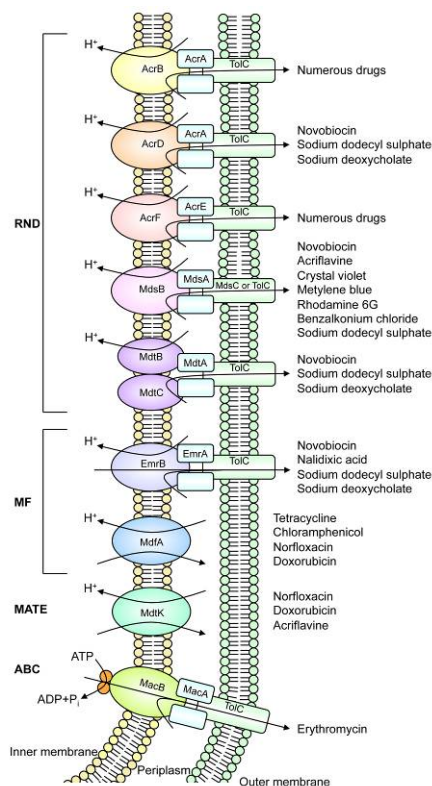


図1. サルモネラに存在する異物排出トランスポーター群

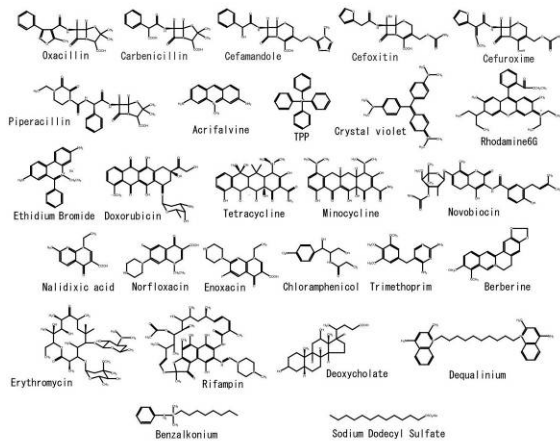


図2. 異物排出トランスポーターの基質

(2) 病原性における異物排出トランスポーターの役割

これまで、異物排出トランスポーターは、細菌の多剤耐性因子として注目されてきた。しかし、抗菌薬のほとんどが人工的に創られたものであり、細菌ゲノムにコードされている異物排出トランスポーターが抗菌薬耐性のためだけに用意されているとは考えにくい。これら異物排出トランスポーターは、薬剤耐性以外にも本来の生理機能を保有していると思われる。研究過程において、排出トランスポーター欠損株を用いた感染実験から、異物排出トランスポーターは細菌病原性発現に関与することが分かった。サルモネラ野生株をマウスに経口投与する

と、マウスは約 6~9 日で死に至る。一方で、9 個の薬剤排出システムを欠損させたサルモネラでは、マウス致死能が完全に消失している(図3)。最も病原性に関与しているものは ABC 型排出システムの MacAB システムであった。MacAB はこれまで、マクロライド抗菌薬を特異的に認識する排出システムであると考えられていたが、この結果から、細菌病原性や毒性に関わる何らかの生理的基質を輸送していることが考えられる。また、MacAB はサルモネラ病原性を調節する PhoPQ 二成分情報伝達系によって厳密に制御され、その発現がマクロファージ内で調節されていることが明らかとなった。

(3) 異物排出トランスポーター発現制御機構の解明

これまでに数多くの異物排出トランスポーターを同定したが、これら異物排出トランスポーターがどのようなシグナルによって発現誘導されるのかは、ほとんど知られていない。感染の場において、サルモネラは様々な宿主環境を経験する。サルモネラが感染時に定着する腸内には、腸内細菌が産生するインドールや、宿主が産生する胆汁酸等の環境シグナルが存在する。感染の場において、実際に細菌がどのような形で異物排

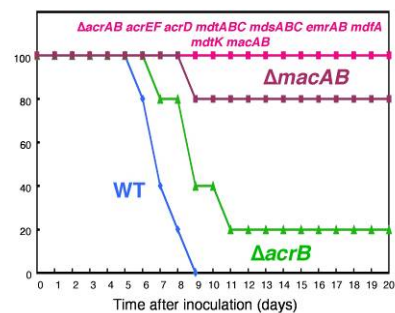


図3. サルモネラを感染させたマウスの生存率。異物排出トランスポーター遺伝子欠損株のマウス致死能力は野生株に比べ、顕著に低下している。

出トランスポーターを利用して、薬剤耐性化と病原性をコントロールしているのかを知ることは重要な課題である。そこで、宿主環境中に存在する代謝産物がサルモネラ異物排出トランスポーターの発現にどのような影響を及ぼすか検討した。その結果、インドールや胆汁酸といった化合物が、新規のレギュレーターRamA を介して、AcrAB 異物排出トランスポーターの発現を誘導していることを明らかにした。インドールは RamA の発現を上昇させることにより AcrAB を誘導するのに対して、胆汁酸は RamA に直接結合して活性化させることにより、AcrAB 誘導を行っていた。すなわち、RamA はインドールや胆汁酸といった異なるシグナルインプットに対して、「過剰発現型」と「活性型」という2つの制御モードにより AcrAB を誘導しているという、新規異物排出トランスポーター制御機構を発見した(図4)。現在、これら制御因子の構造解析にも取り組んでおり、その詳細が明らか

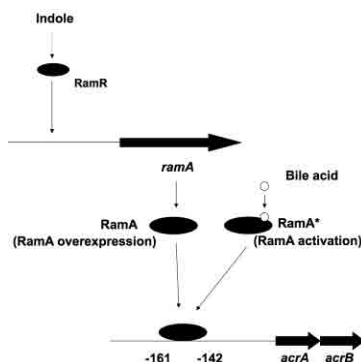


図4. RamA による AcrAB 発現調節モデル。インドールは RamR を介して RamA の発現を上昇させることにより AcrAB を誘導する。胆汁酸は RamA を活性化させることで AcrAB を誘導する。

になることで、出現が上昇傾向にある多剤耐性菌に対する阻害剤の開発や分子生物学的診断法の開発等に役に立つものと考えられる。

(4) 異物排出トランスポーター生理機能の解明

(4-A. 鉄代謝における異物排出トランスポーターの役割)

サルモネラの異物排出トランスポーターであるAcrDとMdtABCは、 β -ラクタム剤をはじめとする抗菌薬を排出し、細菌を多剤耐性化させる。一方で、この2つの排出システム欠損株はマウスに対する病原性が減弱している。これら異物排出トランスポーターは、薬剤耐性以外にどのような生理機能を担っているのだろうか。AcrDとMdtABCは通常ほとんど発現していないが、鉄欠乏条件下において誘導される。この2つのトランスポーターは、Furという鉄代謝に関わる調節因子によって制御されていることを発見した。また、鉄欠乏条件下において、これら排出トランスポーターが細菌の生育に必要であることが分かった。鉄は病原性細菌にとって必須の微量元素であり、細菌は効率的な鉄取り込み様式をもっている。細菌はシデロフォアとよばれる Fe^{3+} と特異的に結合する分子(キレーター)を分泌し、シデロフォア- Fe^{3+} 複合体を取り込むことにより鉄を吸収する。解析の結果、AcrDおよびMdtABCはシデロフォアであるエンテロバクチンを排出し、菌の鉄獲得に関与していることを発見した(図5)。病原性細菌は、宿主体内に多く存在するヘムタンパク質やトランスフェリン、ラクトフェリンなどの鉄輸送タンパク質から鉄を吸収する系など、生存のために多彩な方法で宿主から鉄を取り込む。病原細菌にとって鉄は病原性を成立させるために必須の元素であり、細菌が宿主から鉄を奪うのに対して、宿主側は細菌の鉄吸収を抑制することにより、その増殖を阻害する感染防御機構を保持している。異物排出トランスポーターによるシデロフォア排出は、宿主内において細菌が鉄を獲得するために必要であり、この機構が病原性成立に関与していることが強く唆される。

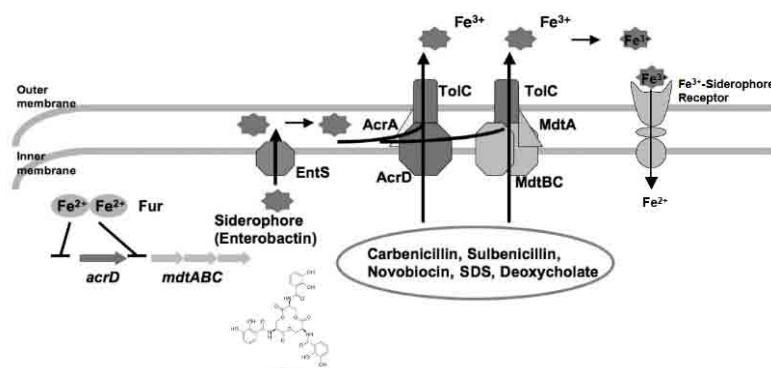


図5. 異物排出トランスポーターによる薬剤と鉄キレーター「エンテロバクチン」の排出. AcrDとMdtABCトランスポーターは、細菌の鉄ホメオスタシスに関与するFurによって制御されている。鉄欠乏状態において、外環境に存在している鉄を獲得するための鉄キレーター「エンテロバクチン」を異物排出トランスポーターが排出しているという生理機能を発見した。

(4-B. 抗菌ペプチド耐性とLPS構造維持における異物排出トランスポーターの役割)

抗菌ペプチドは自然免疫の重要な因子であり、両生類、昆虫、哺乳類など、様々な生物に保存されている感染防御システムである。ポリミキシンBはカチオン性抗菌ペプチドであり、細菌膜に対して傷害性がある。宿主内で、細菌が生存するためには、このような宿主からの攻撃因子に対して自身を防御しなくてはならない。サルモネラの全ての異物排出トランスポーターを欠損させた株は、野生株に比べ、ポリミキシンBへの感受性が100倍以上高くなっていることを明らかにした(図6)。また、トランスポーター単独欠損株を用いた解析の結果、サルモネラ特異的な排出トランスポーターであるMdsABC-TolCがポリミキシンB耐性に関与していることが明らかになった。ポリミキシンBのターゲットであるLPSの構造についてMALDI-TOFを用いて解析した結果、サルモネラ野生株とMdsABC-TolC欠損株との間で、LPSのlipidA部分に構造的な違いがあることが判明した。MdsABC-TolCトランスポーターは、lipidAのリン酸基数を調整し、外膜の負電荷を軽減させ

ることにより、抗菌ペプチド耐性化に関与していることが考えられる。異物排出トランスポーターは、薬剤耐性化だけではなく、宿主の自然免疫から逃れるという生理機能を担っていることが示唆される。

(5) 異物排出活性測定デバイスの開発

これまで、異物排出活性を簡便かつ迅速に検出する手法は確立していなかった。大阪大学・産業科学研究所・野地研究室との共同研究にて、微細加工技術を駆使して異物排出活性を細菌1細胞レベルで高感度に検出する新手法を開発した。フェムトリッターチャンバーや、マイクロ流路を用いて、1細胞での高感度検出に適用することにより、10～15分で細菌の排出活性ならびに阻害剤の効果の両方を測定することに成功した。本手法を応用することで、短時間で多剤耐性菌を検出することのできる検査キットの開発や、新しい抗菌薬のスクリーニングデバイス開発につながるものと期待される。

(6) 異物排出トランスポーター阻害剤による新規治療法確立の試み

異物排出トランスポーターは多剤耐性化に関与し臨床的に問題となっていることから、その阻害剤検索は製薬企業も注目している。上記の研究から、異物排出トランスポーターは、薬剤耐性化に加えて、細菌の病原性発現にも関与していることが明らかになった。この事実から考えると、異物排出トランスポーターを阻害することにより、細菌の病原性および薬剤耐性化が軽減される可能性がある。臨床分離株を用いて調べた結果、異物排出トランスポーター阻害剤(PAβN)には、細菌の多剤耐性化を軽減させる効果があることが分かった。これまで効かないとされていた抗菌薬も阻害剤を併用することにより、感染症を治療することが可能になると思われる。すなわち、既存薬を有効に利用することが可能になる。さらに、異物排出トランスポーター阻害剤は単独で、サルモネラの細胞侵入性低下を引き起こし(大阪大学・歯学研究科・川端研究室との共同研究)、また、カイコへの致死性を減弱させる(東京大学・薬学系研究科・関水研究室との共同研究)といった、細菌病原性を軽減させる効果もあることが分かった(図7)。

5. 自己評価

本研究により、多剤耐性化と細菌病原性という本来結びつかなかった現象に、つながりがみえるようになった。異物排出トランスポーターが異物だけではなく、細菌体内の代謝物質を輸送し、細菌の感染宿主環境適応において重要な役割を果たしていることを発見した。これまで、異物排出トランスポーターは抗菌薬耐性という観点から解析が進められてきたが、これらトランスポーターの生理基質を同定することが、病原性といった細菌機能を理解する上で重要であることが分かった。本研究成果を受け、ゴードン会議や米国微生物学会総会(ASM)をはじめとした国際会議、そして複数の国内学会から招待講演依頼があり、異物排出トランスポーターによる細菌病原性制御という新しい研究領域の発端を提示することが出来たものと考えている。

6. 研究総括の見解

サルモネラ菌の9個の異物排出トランスポーターを同定し、これらトランスポーターの病原性発現、インドールや胆汁酸などの宿主環境物質による発現制御機構、鉄代謝や抗菌ペプチド耐性

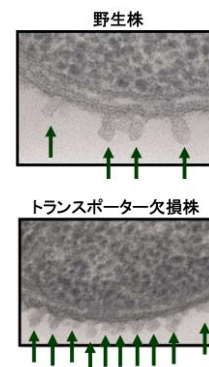


図6. 異物排出蛋トランスポーターが抗菌ペプチド耐性に与える影響. 排出トランスポーターを欠損したサルモネラは抗菌ペプチドに感受性を示す. 抗菌ペプチドで処理すると、野生株に比べて、より多くの突起状構造物(電子顕微鏡図)が外膜において観察される。

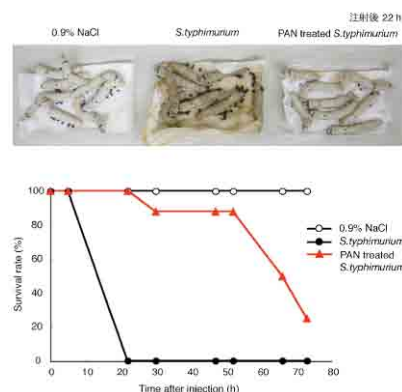


図7. 異物排出トランスポーター阻害剤(PAβN)は細菌病原性を軽減する。

における役割など順調に研究成果を得た。また、異物排出活性測定デバイスの開発や多剤耐性克服へ向けた異物排出トランスポーター阻害剤の開発など応用研究においても良好な発展がなされた。MdsABC-TolC トランスポーターによる lipidA リン酸基数の調節機構が解明されれば、lipidA 代謝におけるユニークな研究となる。細菌感染症対策に向けた研究として今後の更なる発展が期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A.* Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189, 9066–9075 (2007)
2. Nishino, K., Yamaguchi, A.* Role of xenobiotic transporters in bacterial drug resistance and virulence. *IUBMB Life* 60, 569–574 (2008)
3. 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.* 283, 24245–24253 (2008)
4. Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794, 834–843 (2009)
5. Nishino, K., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing *acrEF* multidrug efflux genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3541–3543 (2009)

②受賞

1. 第9回日本抗生物質学術協議会奨励賞 (2007年11月8日)
2. 日本化学療法学会西日本支部支部長賞 (2008年1月8日)
3. 平成20年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2008年4月15日)
4. 上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞 (2008年6月6日)
5. 第11回花王研究奨励賞 (2009年6月1日)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①特許

研究期間累積件数: 2件

1. 発明者: 飯野亮太、西野邦彦、仲田昌義、榊原昇一、山口明人、野地博行
発明の名称: 細胞検体の異物排出活性検出方法、及びその利用
出願人: 大阪大学
出願日: 2006年10月30日
2. 発明者: 加藤修雄、平岡正光、大神田淳子、河野富一、山口明人、平田隆弘、西野邦彦、恵比須繁之、ボニー・エル・バスラー
発明の名称: オートインデューサー-2受容体のモデュレーター
出願人: 大阪大学
出願日: 2007年3月6日

②招待講演

1. Nishino, K. Phenotypic analysis of multidrug efflux pumps – not just for multidrug resistance. Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms (Florence, Italy 2008/3/19–21)
2. Nishino, K. Physiological functions of multi-drug efflux systems in *S. enterica*. The Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems (Texas, USA. 2009/3/22–27)

3. Nishino, K. Unexpected role of multidrug efflux pumps in *Salmonella* virulence. 3rd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (Tours, France 2009/6/2)
4. Nishino, K. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica*. ASM American Society for Microbiology 110th General Meeting (San Diego, USA 2010/5/25)