

**研究テーマ****感染症における細菌および宿主防御システム動作原理の解明**

## 1. はじめに

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、薬剤排出ポンプ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。薬剤排出ポンプ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、薬剤排出ポンプは薬剤の排出のみならず、代謝産物の輸送や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。本研究では、病原細菌が宿主に感染した際に、薬剤排出ポンプにより、どのような機能制御が行われるのかを解明し、感染システムの動作原理を理解する。研究を通して、薬剤排出ポンプによる病原性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。

## 2. 結果および考察

細菌ゲノムに潜む薬剤排出ポンプ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薬剤排出ポンプ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個の薬剤排出ポンプが存在していることが判明した。内1個はサルモネラ特異的に存在するものであり、これを*mdsABC* (*mds* for multidrug transporter for *S*almonella) と名付けた。これら薬剤排出ポンプ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、各遺伝子をクローニングし、発現株を構築した。これらポンプの発現はいずれも、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、ポンプ欠損株を構築し、フェノタイプマイクロアレイを用いて約2,000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個のポンプ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。

病原性における薬剤排出ポンプの役割

これまで、薬剤排出ポンプは、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薬剤排出ポンプ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。これら薬剤排出ポンプは、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、排出ポンプ欠損株を用いた感染実験から、薬剤排出ポンプ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。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情報伝達系によって制御され、その発現がマクロファージ内で調節されていることが分かりつつある。

#### 薬剤排出ポンプ発現制御機構の解明

これまでに数多くの薬剤排出ポンプを同定したが、これら薬剤排出ポンプ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薬剤排出ポンプを利用して、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薬剤排出ポンプ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 薬剤排出ポンプ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、新規薬剤排出ポンプ制御機構を発見した。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。

#### 抗菌ペプチド耐性と LPS 構造維持における薬剤排出ポンプの役割

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薬剤排出ポンプを欠損させた株は、野生株に比べ、ポリミキシン B への感受性が100倍以上上昇していることを明らかにした。また、ポンプ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ポンプがポリミキシン 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ポンプ欠損株との間で、LPS の lipidA 部分に構造的な違いがあることが判明した。このポンプは、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。薬剤排出ポンプは、薬剤耐性化だけでなく、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。

#### 薬剤排出ポンプ阻害剤による新規治療法確立の試み

薬剤排出ポンプ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。また、上記の研究から、薬剤排出ポンプは、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、薬剤排出ポンプ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、薬剤排出ポンプ阻害剤には、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、薬剤排出ポンプ阻害剤は単独で、サルモネラの細胞侵入性低下を引き

起こし(大阪大学大学院・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(東京大学大学院・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。

本研究では、細菌多剤耐性化と病原性発現における薬剤排出ポンプの重要性と新しい生理機能を明らかにした。本研究成果をもとにして、今後は、細菌の薬剤耐性と病原性の両方を克服する、多剤耐性菌感染症新規治療法確立につなげていきたい。

### 3. 謝辞

本研究に対して病態代謝研究会より研究助成金を賜りましたことに感謝申し上げます。また、第40回病態代謝研究会報告会において御指導をいただきました理事長・児玉龍彦先生をはじめとし、財団の先生方に心より厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました大阪大学・歯学研究科・川端重忠先生、東京大学大学院・薬学系研究科・関水久先生をはじめとした共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

### 4. 発表論文

研究成果の一部として、以下の論文中に財団への謝辞を記しております。

\*Nishino, K., M. Hayashi-Nishino, and A. Yamaguchi. H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing *acrEF* multidrug efflux genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3541-3543. (2009)

\*Nishino, K., M. Hayashi-Nishino, and A. Yamaguchi. The small noncoding DsrA RNA is a drug resistance regulator in *Escherichia coli*. (in revision)

\*Nishino, K., S. Yamasaki, M. Hayashi-Nishino, and A. Yamaguchi. Effect of NlpE overproduction on multidrug resistance in *Escherichia coli*. (in revision)

Horiyama, T., A. Yamaguchi, and \*K. Nishino. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. (submitted)

\*Corresponding author