

平成21年 6月15日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890260

研究課題名(和文) 緑膿菌の多剤排出ポンプ MexHI-OpmD の解析

研究課題名(英文) Study of multidrug efflux pump MexHI-OpmD in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

関谷 洋志 (SEKIYA HIROSHI)

松山大学 薬学部 助教

研究者番号：70454890

研究成果の概要：緑膿菌の多剤排出ポンプのひとつである MexHI-OpmD について、緑膿菌における抗菌薬耐性への寄与度を明らかにした。また、MexHI-OpmD の抗菌薬耐性以外の機能のひとつとして、酸性環境下の生育に関与していることを明らかにした。さらに、*mexHI-opmD* 大量発現変異株を用いて、どのようにクオラムセンシング関連の制御因子に制御されているのかを明らかにしつつある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,310,000	0	1,310,000
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,640,000	399,000	3,039,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：微生物、感染症、抗生物質、院内感染、多剤耐性菌

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は、院内感染の起因菌であり、新生児、高齢者、術後患者等の易感染者に感染し、髄膜炎や敗血症を引き起こす。特に、欧米では嚢胞性繊維症患者に重篤な呼吸器疾患を引き起こす起因菌として大きな問題となっている。そのため、臨床現場において、infection control を行うことが重要視されている菌のひとつである。その背景として、緑膿菌の持っている3つの性質があげられる。(1) 抗菌薬や消毒薬に抵抗性を示す。そのた

め、治療薬の選択が難しく、消毒薬を介した院内感染の起因菌となりやすい。

- (2) 抗菌薬や消毒薬に対して高度耐性を獲得しやすい。そのため、様々な治療薬に耐性を示す多剤耐性緑膿菌が出現している。
- (3) 環境常在菌であり低栄養状態でも生存可能である。そのため、医療施設、入院患者、医療従事者から広く検出され、緑膿菌の感染を完全に抑えることは難しい。

特に、多剤耐性緑膿菌の出現は、その治療に困難を来すことから医療施設での大きな脅威になっており、多剤耐性緑膿菌対策が急務である。

2. 研究の目的

これまでの研究により、緑膿菌の多剤耐性機構として最も重要な役割を果たしているのは、構造や作用機序が異なる複数の抗菌薬を細胞外に排出することができる多剤排出機構であると考えられている。この多剤排出機構を明らかにし、抗菌薬の排出を阻害することができれば、既存の抗菌薬にも感受性となり、多剤耐性緑膿菌感染症の治療に新たな道が開かれることが期待される。

ゲノム解析により、緑膿菌には複数の多剤排出機構が存在することが確認されている。現在、MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY、MexJK、MexHI-OpmD、MexVW、MexMN、MexPQ-OpmE、MuxABC-OpmB等の遺伝子がクローニングされ、様々な抗菌薬耐性に関与することが報告されている。私は、多剤耐性緑膿菌から、新規の多剤排出ポンプ MexHI-OpmD をコードする遺伝子群をクローニングし、その産物がキノロン系抗菌薬、色素系抗菌薬に対する耐性獲得に関与していることを明らかにした。本研究では、次の2つを明らかにすることを目的とする。

- (1) MexHI-OpmDの機能を明らかにし、多剤耐性緑膿菌における抗菌薬耐性への寄与度を明らかにする。
- (2) MexHI-OpmDの発現制御機構とクオラムセンシング機構との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 多剤耐性緑膿菌における MexHI-OpmD の機能解析
MexHI-OpmD と MexAB-OprM、MexCD-

OprJ、MexEF-OprN、MexXY をコードする遺伝子を様々な組み合わせで欠損させた多重欠損株を作製した。上記の遺伝子欠損株の作製方法には、緑膿菌の遺伝子欠損株作製方法として確立されている Flp-FRT recombination system を用いて行った。

そして、多重欠損株について、 β -ラクタム系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬、テトラサイクリン系抗菌薬、キノロン系抗菌薬などに対する最小生育阻止濃度を測定した。

- (2) タンパク質レベルでの MexHI-OpmD と他の多剤排出ポンプとの関連性の解析

MexHI および OpmD、さらに、これらの変異体を単独で発現させるプラスミドを作製した。これらのプラスミドを MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY、MexHI-OpmD の多重欠損株に導入し、それらの株について様々な抗菌薬に対する最小生育阻止濃度を測定した。

- (3) MexHI-OpmD の発現制御機構とクオラムセンシング機構との関連

PA01 株、YM64 株 ($\Delta mexAB-oprM$ 、 $\Delta mexCD-oprJ$ 、 $\Delta mexEF-oprN$ 、 $\Delta mexXY$) について、対数増殖期初期、中期、定常期の3点における *mexHI-opmD* の発現量の変化を測定した。また、MexHI-OpmD 大量発現変異株において、*lasR*、*rhIR* の発現量の変化を測定した。上記の *mexHI-opmD* の発現量の測定方法には、RT-PCR 法を用いた。

次に、LasR、RhIR 等のクオラムセンシングに関連する制御タンパク質と変異株で変異がみられたプロモーター領域との間でゲルシフトアッセイを行い、*mexHI-opmD* の発現制御に関連するクオラムセンシング機構を検索した。

4. 研究成果

- (1) MexHI-OpmD の抗菌薬耐性への寄与度を明らかにするために、MexHI-OpmD の単独欠損株および他の多剤排出ポンプ遺伝子 (*mexAB-oprM*、*mexCD-oprJ*、*mexEF-oprN*、*mexXY*) との多重欠損株のシリーズの作製

を行った。YM64 株 ($\Delta mexAB-oprM$, $\Delta mexCD-oprJ$, $\Delta mexEF-oprN$, $\Delta mexXY$) から *mexHI-opmD* を欠損させた PMX52 株がキノロン系抗菌薬や色素系抗菌薬に対して感受性を示したのに対して、緑膿菌の野生株 PAO1 や多剤排出ポンプ欠損株 YM24 株 ($\Delta mexCD-oprJ$, $\Delta mexEF-oprN$, $\Delta mexXY$)、YM63 株 ($\Delta mexAB-oprM$, $\Delta mexEF-oprN$, $\Delta mexXY$)、YM62 株 ($\Delta mexAB-oprM$, $\Delta mexCD-oprJ$, $\Delta mexXY$)、YM34 株 ($\Delta mexAB-oprM$, $\Delta mexCD-oprJ$, $\Delta mexEF-oprN$) から *mexHI-opmD* を欠損させた株の抗菌薬感受性はほとんど変化がみられなかった。これは、緑膿菌の主要な多剤排出ポンプである MexAB-OprM や MexXY-OprM の機能にマスキングされているためだと考えられる。このことから、緑膿菌の野生株 PAO1 や他の多剤排出ポンプが機能している株においては、MexHI-OpmD の抗菌薬耐性への寄与度は低いことが考えられた。

- (2) 次に、抗菌薬耐性とは異なる観点から、MexHI-OpmD の機能の解析を行った。その結果、PAO1 株や YM64 株が pH5.0 の酸性環境下においても十分生育できたのに対して、*mexHI-opmD* を欠損させた PMX52 株は全く生育ができなかった。このことから、緑膿菌が pH5.0 の酸性環境下で生育するために MexHI-OpmD が必要であることがわかった。多剤排出ポンプは抗菌薬耐性に関与しているが、抗菌薬耐性以外にも別の役割を担っていると考えられている。しかし、まだその役割のほとんどが明らかにされていない。MexHI-OpmD の本来の役割を明らかにすることは、多剤排出ポンプの本来の役割を明らかにする点でも重要であると考えられる。
- (3) さらに、排出ポンプ MexHI および外膜タンパク質 OpmD、さらに、これらの変異体を単独で発現させるプラスミドを作製した。このプラスミドを緑膿菌の野生株 PAO1 や多剤排出ポンプ欠損株から *mexHI-opmD* を欠損させた多重欠損株に導入し、抗菌薬感受性の変化を調べた。しかし、MexHI、OpmD を単独で発現させた多重欠損株においては、大きな抗菌薬感受性の変化は見られなかった。一方、PAO1

株において *mexHI-opmD* の発現量は対数増殖期初期、中期ではほとんど変化がないが、定常期に大きく増加した。そこで、MexHI-OpmD の発現がクオラムセンシング機構により制御されるかという点を調べた。まず、MexHI-OpmD 大量発現変異株において、*lasR*, *rhIR* の発現量の変化を調べたが、差は見られなかった。次に、LasR、RhIR 等のクオラムセンシングに関連する制御タンパク質と変異株で変異がみられたプロモーター領域との間でゲルシフトアッセイを行い、*mexHI-opmD* の発現制御に関連するクオラムセンシング機構を検索している。MexHI-OpmD の機能とクオラムセンシング機構との関連性の解明は、感染の初期段階の接着時期、バイオフィーム形成時期、慢性的な感染時期に、多剤排出ポンプがどのように関与しているかを明らかにできると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

①発表者：関谷 洋志

発表表題：酸性環境下における緑膿菌多剤排出ポンプ MexHI-OpmD の役割
学会等名：第 129 年会 日本薬学会
発表年月日：平成 21 年 3 月 27 日
発表場所：京都

②発表者：関谷 洋志

発表表題：*Pseudomonas aeruginosa* の多剤排出ポンプ MexHI-OpmD の解析
学会等名：第 81 回 日本細菌学会総会
発表年月日：平成 20 年 3 月 26 日
発表場所：京都

③発表者：関谷 洋志

発表表題：緑膿菌の多剤排出ポンプ MexHI-OpmD の解析
学会等名：第 60 回 日本細菌学会中国・四国支部総会
発表年月日：平成 19 年 10 月 14 日
発表場所：岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 洋志 (SEKIYA HIROSHI)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：70454890

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし