

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15994

研究課題名（和文）多剤排出ポンプの隠された役割：その未知の基質の同定による役割の解明

研究課題名（英文）The Hidden Role of the Multidrug Efflux Pump: Understanding Its Role by Identifying Its Unknown Substrates

研究代表者

森田 大地 (Morita, Daichi)

広島大学・医系科学研究科（薬）・助教

研究者番号：80826371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：多剤排出ポンプは全ての細菌が先天的に持つ基本的な生体防御機構である。しかし多くのホモログでは抗菌薬を輸送しておらず、また抗菌薬は人工物であるため、多剤排出ポンプの持つ本来の生理的な役割は不明である。この研究では黄色ブドウ球菌の主要な多剤排出ポンプの輸送する本来の基質の探索を行った。

黄色ブドウ球菌の恒常的に発現している3つの主要な多剤排出ポンプ（norA, mdeA, mepA）の破壊は生育に影響を与えなかったが、TCAサイクルやアミノ酸を中心とした細胞内代謝物の減少が認められた。また反転膜小胞による基質濃縮の可能性を検討し、反転膜小胞中のnorAの基質であるnorfloxacinを検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤排出ポンプは薬剤耐性を中心とした研究が行われ、その生理的な役割は不明であった。本研究で黄色ブドウ球菌の恒常的に発現している3つの主要な多剤排出ポンプ（norA, mdeA, mepA）の破壊は、TCAサイクルやアミノ酸を中心とした細胞内代謝物の減少を引き起こし、恒常的に発現する主要な多剤排出ポンプの存在はプロトン駆動力の維持などによる細胞内恒常性安定に関与している可能性が示唆された。また反転膜小胞による基質濃縮によって反転膜小胞を利用した本来の基質探索の可能性が開かれた。

研究成果の概要（英文）：The multidrug efflux pump is the most basic defense system innate to all bacteria. However, since many homologues do not transport antimicrobials and antimicrobials are artifacts, the true role of multidrug efflux pumps is unknown. This study explored the original substrates transported by the major multidrug efflux pump of *Staphylococcus aureus*. Disruption of the three major pumps (norA, mdeA, and mepA), which are constitutively expressed in *Staphylococcus aureus*, did not affect growth, but decreased the intracellular metabolites, mainly TCA cycle and amino acids. In addition, the possibility of substrate enrichment by inverted membrane vesicles was investigated by detecting norfloxacin, a substrate of norA, within the inverted membrane vesicles.

研究分野：薬学

キーワード：多剤排出ポンプ 黄色ブドウ球菌 メタボローム 反転膜

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感染症に対し化学療法を行う現代医療における深刻な問題のひとつに、耐性菌の出現が挙げられる。抗菌薬耐性のメカニズムは多数知られている。中でも多剤排出ポンプはすべての細菌が先天的に持つ、もっとも基本的な生体防御機構である。また、多剤排出ポンプは幅広い基質を認識するため、ひとつのポンプが化学構造や作用機序の異なる多種多様な抗菌薬を排出することで幅広い耐性へ関与することが知られている。

多剤排出ポンプは、ひとつの細菌に多数のホモログが存在している。しかし、実際に抗菌薬耐性に関与しているものは一部だけであり、多くのホモログは抗菌薬を輸送していない。また、多剤排出ポンプが輸送する基質の大部分は合成抗菌薬などの自然界に存在しない物質である。しかし、多剤排出ポンプは細菌において広く保存されており、合成抗菌薬の出現以前から役割を有しているはずである。このため、多剤排出ポンプによる抗菌薬の輸送はその機能の一側面では無く、多剤排出ポンプは明らかとなっていない役割を持つ、より広範な物質の輸送を担うシステムと考えられる。

多剤排出ポンプの研究では、ノックアウトや過剰発現による感受性の変化や、抗菌薬の輸送活性の測定が行われてきた。これらの手法では、抗菌薬が細菌に毒性を持つことによって、基質であることが明らかとできた。しかし、抗菌薬以外の基質を同定することも重要な課題である。輸送する基質が明らかとなることで、機能が不明であった多剤排出ポンプのホモログや、抗菌薬耐性だけに焦点を当てられていた多剤排出ポンプの役割を捉え直すことが可能となる。

### 2. 研究の目的

多剤排出ポンプの本来の基質を探索するため、多剤排出ポンプの有無による基質の変化に着目する。多剤は出ポンプ破壊株での細胞内容物の変化を探索するメタボローム解析や、多剤排出ポンプを発現した大腸菌で反転膜小胞を調製し、反転膜小胞内の内容物の解析を行う。

本研究によって、多剤排出ポンプが担う抗菌薬耐性以外の生理的な役割が明らかにできる。また基質を同定することで、近年研究されている多剤排出ポンプの阻害剤に関する構造的な知見が期待される。

### 3. 研究の方法

メタボローム解析では黄色ブドウ球菌 RN4220 株から主要な多剤排出ポンプである *norA*, *mdeA*, *mepA* を破壊した抗菌薬高度感受性株である RK534 株、および *norA* 相補株を、反転膜を用いた解析では黄色ブドウ球菌の主要な多剤排出ポンプである *norA* をプラスミドで発現させた大腸菌 KAM32 株を研究に使用した。

メタボローム測定では、N 培地で培養した親株 RN4220 株、破壊株 RK534 株、*norA* を発現させた RK534/pRIT5S 株を用いてヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社(HMT)に依頼し、CE-TOFMS によって HMT 代謝物質ライブラリに登録された物質を対象として解析を行った。

反転膜小胞を用いた測定では、フレンチポンプを用いて反転膜小胞を調製し、超遠心によって反転膜小胞を精製した。反転膜小胞の活性測定には Hoechst33342(励起 355nm、蛍光 457nm)や acridine orange(励起 492nm、蛍光 525nm)の蛍光変化を観察した。また、反転膜小胞中の内容物の測定は HPLC による吸光度検出(カラム: CAPCELL PAK C18 5 $\mu$ m, 4.6mm I.D.\*250mm) 移動相 MeOH:0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:Acetonitrile=3:3:4 で実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) メタボローム解析

RK534 株の破壊では各種抗菌薬の感受性に大幅な低下が見られ、破壊したそれぞれの多剤排出ポンプは複数の基質を輸送可能な排出ポンプであった(表1)。また、これらの多剤排出ポンプの破壊によっても、生育に大きな違いは見られず、これらのポンプの輸送基質は生育に悪影響を与えない物質、または代償的にその他のポンプの発現上昇や輸送基質の代謝の抑制などが生じている可能性がある。

N 培地で培養した親株 RN4220 株、破壊株 RK534 株、*norA* を発現させた RK534/pRIT5S 株で細胞内容物のメタボローム解析を実施した(図1)。メタボローム解析での主成分分析の結果、野生株に対して、*norA* 相補株を含むポンプ破壊株では主に TCA サイクルやアミノ酸を中心とした全般的な細胞内代謝物の減少が認められた。また、破壊株株では野生株、*norA* 相補に対して一部の細胞内代謝物の増加が認められた。ポンプの破壊は生育速度に変化を引き起こさなかったが、全般的な細胞内代謝物の減少から恒常的に発現する主要な多剤排出ポンプの存在はプロトン駆動力の維持などによる細胞内恒常性安定に関与している可能性が示唆された。また、破壊株での一部の基質の増加は、これらまたは生合成過程の物質が *norA* の基質の可能性もある。

#### (2) 反転膜小胞を用いた基質探索

*norA* を発現させた大腸菌より調製された反転膜小胞は、既知の基質である norfloxacin の添加によって acridine orange の蛍光を変化させ、*norA* の活性を保ったまま反転膜小胞の調製が行

われていた。一方で norfloxacin の添加量を増加させても蛍光の変化量に大きな差異はなく、norfloxacin の蓄積による輸送活性の低下や輸送によるプロトン駆動力の低下の可能性が考えられ、使用する反転膜小胞の増量の必要性があった。また親株である RN4220 株の培養上清に対する n-ブタノール抽出を実施し、水相およびブタノール相を用いた活性測定では control の *norA* 非発現の反転膜小胞でも活性が確認され、培地中の成分による *norA* 以外のポンプの駆動等によるプロトン変化が生じておりスクリーニングとしての蛍光変化測定は不適當であった。

反転膜小胞の蛍光変化による *norA* 基質のスクリーニングに問題があったため、反転膜小胞内部の物質を直接測定するため、HPLC による解析を実施した。HPLC 測定ではまず測定条件を設定するため、既知の輸送物質である norfloxacin を用いた実験を行った(図 2)。Control および *norA* 発現反転膜小胞での CHCl<sub>3</sub> 抽出物で HPLC 測定を行った結果、*norA* 発現反転膜小胞で norfloxacin が control よりも多く検出され、norfloxacin の濃縮が示唆された。しかし、control の *norA* 非発現の反転膜小胞でも norfloxacin のピークが検出された。おそらく一部は濃度勾配に従った norfloxacin の反転膜小胞内への移動が生じた結果と推測され、実際の *norA* 基質の探索では control の検出ピークとの比較による目的ピークの推定が重要と考えられた。残念ながら、親株である RN4220 株の培養上清抽出物に対する HPLC 解析は、実験系に用いる反転膜小胞の適切な量や反転膜小胞からの抽出法の検討が必要であり、十分な結果が得られなかった。

本研究によって、主要な多剤排出ポンプの有無は生育に影響を与えないが、細胞内代謝レベルでは多数の代謝物を減少させており、細胞内恒常性の維持に關与する可能性が示唆された。また *norA* の有無によって一部の細胞内代謝物が蓄積しており、*norA* の輸送基質と関わりがある物質が推定された。反転膜小胞を用いた基質の濃縮に関する研究基盤を確立できた。メタボローム解析での候補化合物や培養上清を用いた研究によって、これを活用して多剤排出ポンプの基質探索を進め、多剤排出ポンプが担う抗菌薬耐性以外の生理的な役割と阻害剤にの探索を進めたい。

表 1 多剤排出ポンプ破壊株での抗菌薬感受性の変化

antimicrobial agent	MIC (μg/mL)			
	RN4220 (parent)	RK5 ( $\Delta mepA$ )	RK53 ( $\Delta mdeA, mepA$ )	RK534 ( $\Delta norA, mdeA, mepA$ )
norfloxacin	1	1	0.125	0.125
benzalconium Cl	2	2	0.5	0.125
acriflavine	16	16	2	2
EtBr	8	8	1	0.25
Hoechst 33342	0.5	0.25	0.25	0.125
rhodamine 6G	0.5	0.5	0.5	0.125
safranin O	8	8	2	2
TPPCl	16	16	8	4
erythromycin	0.25	0.25	0.25	0.25
triclosan	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625
chlorhexidine	1	1	0.25	0.25
streptomycin	2	2	1	1
vancomycin	1	1	1	1

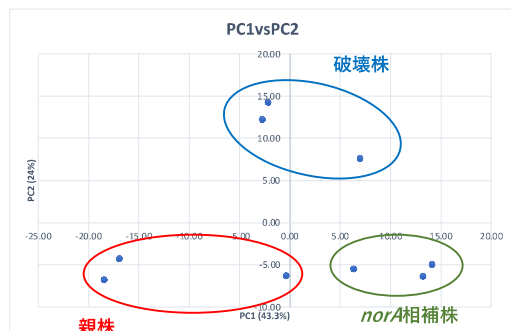


図 1 メタボローム解析での主成分分析

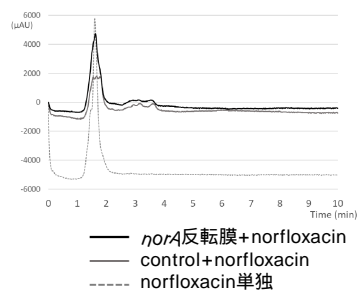


図 2 HPLCでのnorfloxacinの検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------