

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460524

研究課題名(和文)ABC型トランスポーターによる細菌病原性制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of bacterial pathogenicity by the ABC transporter

研究代表者

西野 美都子(Nishino, Mitsuko)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30510440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：異物排出トランスポーターは抗菌薬を排出することにより細菌多剤耐性化に関与する。しかし、これらが持つ生理的役割は、そのほとんどが未知のままである。本研究では、特に、ABC型輸送体MacABに着目し、生理機能解析を行った。トランスポーターが宿主細胞表面への付着に関する事、酸化ストレスへの抵抗性に関与すること、バイオフィーム形成維持に関与すること、腸内の細菌生存に一部関与すること等の発見があった。また、阻害候補化合物の選定を行った。多くのトランスポーターの生理機能が未知な状況において、本研究成果は、その生理機能を明らかにしたものであり、新薬開発においても重要な情報が提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Xenobiotic transporter contributes to bacterial multidrug resistance by expelling antibacterial drugs. However, physiological roles of most of these transporters remain unknown. In this study, we focused on the ABC type transporter MacAB, and conducted physiological function analysis. There were findings that transporters were related with the bacterial attachment to the host cell surface, involved in resistance to oxidative stress, involved in maintenance of biofilm formation, and partly in bacterial survival in the intestine. In addition, inhibitor candidates of transporters were selected by the screening. In the situation where the physiological functions of many transporters are unknown, these results clarify their physiological functions and these are important information useful for the development of new drugs.

研究分野：細胞生物学、細菌学

キーワード：細菌 多剤耐性 病原性 トランスポーター 異物排出 薬剤排出 サルモネラ MacAB

1. 研究開始当初の背景

異物排出トランスポーターは複数の抗菌薬を細胞外へ排出することにより細菌に多剤耐性をもたらす。しかしながら、異物排出トランスポーターが本来持つ生理的役割は、そのほとんどが未知のままである。グラム陰性菌において世界で初めて発見された ABC 型異物排出蛋白質 MacAB (図 1) を発現させた菌はマクロライド系抗菌剤特異的に耐性を示す。さらに、サルモネラにおいてはマウスに対する致死性に MacAB が関与する。サルモネラ MacAB の宿主細胞感染過程における関与を検討した結果、MacAB はサルモネラ菌の宿主細胞表面への付着に関与している事が判明した。そこで、本研究では、MacAB が線毛形成にどのように機能しているのかを遺伝学的、生化学的に解析することを目的とし研究を進め、数多くの排出トランスポーターの生理機能が未知な状況において、その生理機能を明らかにし、新薬開発においてもターゲティング分子として重要な情報が提供できると考えられた。

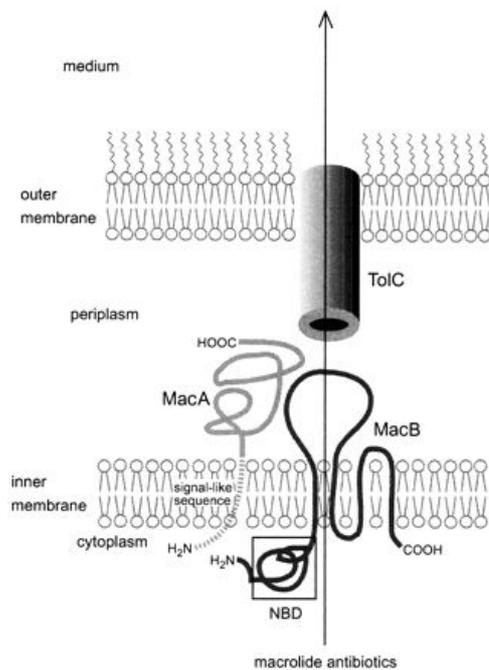


図 1. MacAB-ToIC 薬剤排出システム. 大腸菌 MacAB (YbjYZ) は、グラム陰性菌において初めて同定された ABC 型異物排出トランスポーターであり、本トランスポーターを大腸菌の主要な異物排出トランスポーター AcrB を欠損した株で発現させると、大腸菌が種々のマクロライド系抗菌薬に耐性を示すことから、MacAB と名付けられた。また、その機能に外膜タンパク質である TolC が必要であることも分かっている。(Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. J. Bacteriol. Oct. 2001 vol.193 no.19 5639-5644.)

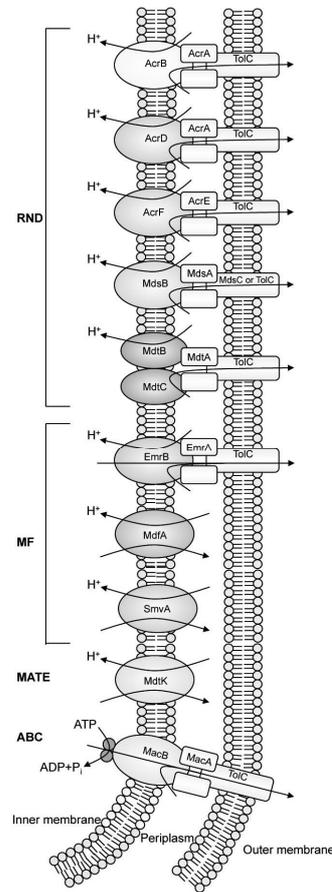


図 2. サルモネラにおいて同定された異物排出システム群. これまでに、サルモネラにおいては、少なくとも 10 個の異物排出トランスポーターが同定されており、本菌においても MacAB-ToIC 異物排出システムが唯一の ABC 型として同定されている。(図は、Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Antimicrob Chemother 65 :1372-1376, 2010 を一部改変)

2. 研究の目的

近年、多剤耐性菌の出現が医療現場において大きな問題となっており、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、異物排出蛋白質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(図 2)。これまでの研究で、異物排出蛋白質は薬剤排出のみならず、細胞間情報伝達や病原性発現制御にも関与していることが分かってきた(図 3)。本研究ではサルモネラをはじめとした病原細菌の染色体上に潜む排出蛋白質の生理機能解析を行う。特に、ATP の加水分解をエネルギー源とする ABC 型輸送体である MacAB に着目し、その生理機能を解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では、サルモネラ ATCC14028s 株、大腸菌 MG1655 株、緑膿菌 PA01 株を各々野生株として用いた。また、必要に応じて、臨床分離株を用いて、薬剤感受性試験を行った。

各細菌の野生株からゲノムを抽出し、それらを鋳型として、目的の遺伝子上流と下流にアニーリングするプライマーを用いて PCR を行った後、適切なベクターに制限酵素で切断の後、ライゲーションをすることで、遺伝子のクローニングを行った。

遺伝子欠損株の作製は、Datsenko と Wanner による One-step inactivation 法 (PNAS June 6, 2000. 97 [12] 6640-6645) により行った。

宿主細胞の付着の実験については、HeLa 細胞を培養した後、サルモネラを加え、一定時間後、一般的な方法で行った。寒天培地にて増殖してくる細菌のコロニー数をカウントすることで、付着率を求めた。

薬剤感受性試験では、寒天培地ならびに液体培地を使用し、各種抗菌性物質の各細菌株に対する最小発育阻止濃度を測定した。寒天培地使用時には、MIC 測定用装置マイクロプランター (佐久間製作所) を用いた。また、液体培地使用時には、96 穴プレートを用いて、様々な濃度の抗菌性物質を含む培地中の細菌の増殖を、プレートリーダー Infinite (TECAN) で計測して、MIC 値を求めた。

バイオフィーム形成能の測定は、クリスタルバイオレット法により行った。

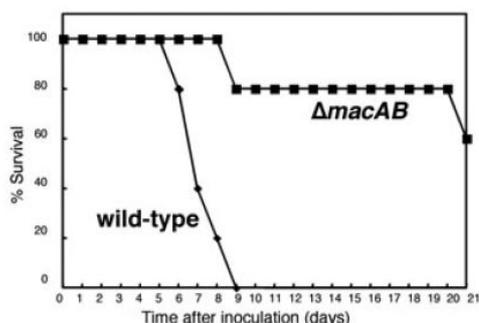


図3. MacAB 薬剤排出システム欠損がサルモネラ病原性におよぼす影響. BALB/C マウスにサルモネラ野生株ならびに *macAB* 遺伝子欠損株  $10^5$  cfu を胃内に投与した時の結果。これまでに MacAB は、サルモネラのマウスに対する致死性に関与していることが報告されている。(Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol 59 :126-141, 2006)

### 4. 研究成果

異物排出トランスポーターは、生物にとって異物となる毒物等を認識して細胞外に排出する膜輸送体である。異物排出トランスポーターは複数の抗菌薬を細胞外へ排出することで、細菌の多剤耐性化に関与しているが、その一方で、異物排出トランスポーターが有している生理的役割については未知の部分が多い。グラム陰性菌である大腸菌で初めて同定された ABC 型異物排出トランスポーターは、マクロライド系抗菌薬に対する本菌の耐性化に関与していたことから、MacAB と名付けられたが、その後、サルモネラにおいて MacAB 異物排出トランスポーターは、マウスに対する致死性に関与していることが分かり、抗菌薬耐性以外にも何からの基質輸送に関与していることが示唆された。数多くの異物排出トランスポーターの生理機能が未知である中、特に MacAB に着目して、本トランスポーターの機能を明らかにすることを目的に研究を進めた。

サルモネラの ABC 型異物排出トランスポーターをコードする遺伝子の欠損株を作製し、宿主細胞表面への付着に関する検証をおこなった。野生株と遺伝子欠損株のフェノタイプを確認したところ、異物排出トランスポーターが、サルモネラの宿主細胞表面への付着に関与していることが判明した。精製した異物排出トランスポーターについて電子顕微鏡を用いて構造解析を行った。また、蜂蜜中に含まれている抗菌性成分が異物排出トランスポーターによって認識されているかどうかについて、臨床から分離された多剤耐性緑膿菌に対して抗菌性を示すのかについて、大腸菌、緑膿菌、サルモネラの複数の異物排出タンパク質遺伝子欠損株や、臨床分離株を用いて調査を行った。

また、MacAB トランスポーターが、細菌宿主感染時においてどのような生理的役割を担っているのかを明らかにする目的で、サルモネラ野生株ならびに *macAB* 遺伝子欠損株を作製し、細胞感染実験を行った。その結果、遺伝子欠損株は宿主細胞中での増殖能力が低下しており、また、細胞内においてその発現が大きく誘導されることが明らかになった。遺伝子欠損株は野生株に比べて、酸化ストレスに対する抵抗性が低下していることも分かり、この現象がマウスに対する致死性の低下と関係していることが考えられた。さらなる解析のため、MacAB 発現株を用いた阻害剤のスクリーニングを行い、いくつかの候補化合物を得た。また、異物排出トランスポーターが細菌バイオフィーム形成維持に関与しているなど新しい発見があった。

さらには、宿主の腸内において、サルモネラの一部のトランスポーターが細菌の生存に必要なことが分かってきた。また、病原性に関与するトランスポーターの阻害剤のスクリーニングも行い、複数の阻害候補化合物を同定した。これらの阻害候補化合物を

用いて、ABC 型異物排出トランスポーターの機能におよぼす影響について調べた結果、各種マクロライド系抗菌薬に対して、細菌を感受性化させること、さらには、細胞への定着性や細胞内増殖、病原性を軽減させる等の影響があることが分かった。

これらの結果から、抗菌薬耐性因子として同定されている異物排出トランスポーターが、病原細菌が宿主に感染する過程において重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後は、阻害候補化合物をもとに、細菌の抗菌薬抵抗性と毒性を軽減することのできる創薬につなげたい。

#### 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)

##### [雑誌論文](計3件)

- 1) Katsuhiko Hayashi, Aiko Fukushima, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino. Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 5, 180, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00180.
- 2) Seiji Yamasaki, Li-Yuan Wang, Takahiro Hirata, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino. Multidrug efflux pumps contribute to *Escherichia coli* biofilm maintenance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 45, 439-441, 2015. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.005.
- 3) Seiji Yamasaki, Takuma Fujioka, Katsuhiko Hayashi, Suguru Yamasaki, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino. Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Infect. Chemother.* 22, 780-784, 2016. doi: 10.1016/j.jiac.2016.03.015.

##### [学会発表](計3件)

- 1) Mitsuko Hayashi-Nishino et.al. Electron/immuno-electron tomography of autophagosomal membranes and bacterial multidrug efflux systems. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. 米国. 2015/12/15~2015/12/20
- 2) 西野美都子 et.al. 多剤耐性病原細菌の新規治療戦略. アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト 医療材料・デバイス・システムグループ G3 分科会. 大阪. 2015/11/12~2015/11/13
- 3) Mitsuko Hayashi-Nishino et.al. Development of Novel Therapeutic Strategies to Tackle

Multidrug-Resistant Pathogens. Saint-Malo, France. 2016/6/6~2016/6/8

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

大阪大学産業科学研究所(日本語版)

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp>

大阪大学産業科学研究所(英語版)

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/en/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西野 美都子 (NISHINO, Mitsuko)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号: 30510440