

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19590458  
 研究課題名（和文） 緑膿菌多剤排出ポンプを阻害する抗体および有機低分子化合物の開発  
 研究課題名（英文） Development of antibodies and small molecules as inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps  
 研究代表者 良原 栄策（YOSHIHARA EISAKU）  
 東海大学・医学部・准教授  
 研究者番号：70167063

## 研究成果の概要：

緑膿菌の多剤耐性化因子の一つは多剤排出ポンプ (MexAB-OprM) にある。このポンプを阻害して、多剤耐性の抑制を試みた。

(1) OprM の細胞外ループに対する抗体を作成し緑膿菌に作用させると、菌は薬剤に感受性となった。

(2) ポンプサブユニットの集合を阻害するためのペプチドを合成した。このペプチドを作用させると、菌は感受性となった。

これらの結果は抗体とペプチドはポンプ阻害剤として働くことを示す。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：緑膿菌、多剤排出ポンプ、阻害剤、抗体、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

ペニシリンを代表とする抗生剤が細菌感染症に劇的な効果を現わしたことから、20世紀初頭までは恐ろしい病気であった感染症も克服されたように思われていた。ところが、近年、多剤耐性菌が出現するようになり、その頻度が大きくなっている。多剤耐性菌は現在使用されている抗生剤のほとんどに耐性を示すので、化学療法の有効性が失われ、临床上深刻な問題となっている。その一例として、世界の多くの地域でいまだに重要な感染症となっている結核においても、多剤耐性結核菌の出現が大きな問題となっている。

緑膿菌は日和見感染症や院内感染症の主要原因菌で、もともと抗生剤に耐性を示すので、その治療に使われる抗生剤も限定されている。さらに、近年、本菌でも多剤耐性菌が出現するようになり、ほとんどの抗生剤が効かれないような状況となり、深刻な問題となっている。

緑膿菌の多剤耐性化に大きく関与するのが RND 型の多剤排出ポンプである。このポンプは三つのサブユニットからなり、細胞内に侵入してきた薬剤を能動的に細胞外に排出する。それによって細胞内の薬剤の濃度が減少し、薬剤に耐性となる。さらにこのポンプは構造が異なる種々の薬剤を認識して排出するので、菌が多剤耐性化するようになる。

緑膿菌で主要な役割を担っているのが、MexAB-OprM である。MexB は菌の内膜に存在するトランスポーター、OprM は外膜にあって薬剤通過のためのチャンネル、および MexA はこれら二つのタンパクをリンクするペリプラズムタンパクである。このような構造は薬剤の細胞外への排出に大変適しており、効率よく薬剤を排出することができる。我々はこのポンプの構造と機能に関する研究を行い、この中で、OprM がチャンネル形成タンパクであることを *in vitro* 系で証明し、さらにこのサブユニットの性質を明らかにしてきた。

このような研究成果をもとにして、我々は新たな多剤排出ポンプの阻害剤を開発することで、緑膿菌の多剤耐性化を抑えることを試みた。

## 2. 研究の目的

緑膿菌の多剤排出ポンプである MexAB-OprM の機能を抑えることで、本菌の多剤耐性を薬剤感受性に変える。それによってこれまで使用できなかった抗生剤を有効に使えるようにし、緑膿菌感染症の治療に役

立てることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) モノクローナル抗体の作成

OprM には細胞外ループが二か所ある。それぞれ10アミノ酸残基からなる小さな領域であるが、そのうちの一か所の部分に対する抗体の作成を行った。そこでこの部分のアミノ酸配列と同じ配列をもつペプチドを合成し、それを抗原としてマウスに免疫した。その後、通常の方法を使って、抗体産生ハイブリドーマを調製した。そして細胞上清に特異的にペプチドを認識できる抗体があるかを ELISA で検討した。目的とする抗体が醸成にあるとわかった場合、アフィニティークロマト法を用いてモノクローナル抗体を精製した。

### (2) タンパク間相互作用を阻害するペプチドの合成

MexAB-OprM ポンプでまず MexA と OprM 間の相互作用を阻害することができると期待されるペプチドをつくる。そのためには MexA と相互作用し接触している領域が OprM のどこにあるのかを知る必要がある。これまでの研究で OprM の赤道ドメインと呼ばれるがそれに相当すると推定されているので、その部分のアミノ酸配列を基にしてペプチドを合成する。

次に、同じようにして MexB と OprM 間の相互作用を阻害するためのペプチドを合成する。この時に使ったアミノ酸配列は、OprM でペリプラズムに突出した先端部を構成する部分のアミノ酸配列と同じものである。

### (3) 抗体およびペプチドのポンプ阻害活性の測定

ほとんど抗菌活性を発現しない低濃度の抗生剤を緑膿菌に添加した環境で菌を培養する。一方、この系に抗体あるいはペプチドを添加し培養する。一定時間の後に菌を寒天プレートに撒き、一晚培養し、コロニー数をカウントして、生菌数を見積もる。抗体あるいはペプチドを添加した時に、生菌数がどのように減少するかを調べることで、ポンプの機能をどの程度阻害するのかを明らかにする。

### (4) ポンプタンパク質の精製

MexA, MexB および OprM タンパクを精製するため、これらタンパクにヒスチジンタグを付加する。その方法はタンパク遺伝子の3'側にポリヒスチジンをコードする塩基配列を挿入し、この改変遺伝子を大腸菌で発現させるものである。次に、大腸菌を破碎し、得られたタンパク質の混合液をコバルトカラ

ムを用いたアフィニティークロマトで精製した。

(5) タンパク間相互作用の検出

Native PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)を用いて、ポンプサブユニット間の相互作用を調べた。二種類の精製したタンパク質を混合して電気泳動にかけると、もとのタンパク質のバンド以外にタンパクバンドが見られた場合、これがタンパク間相互作用の結果生じた複合体であるとわかる。この系にペプチドを添加して複合体のバンドの変化を調べることで、ペプチドの複合体形成を阻害するのかがわかる。

4. 研究成果

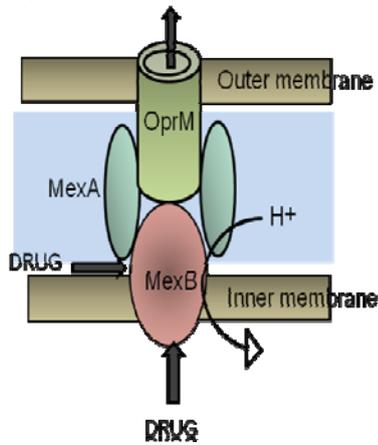


図 1

緑膿菌の主要な多剤排出ポンプである MexAB-OprM を図 1 に示す。本ポンプは細胞内にある薬剤あるいはペリプラズムにある薬剤を内膜を介して形成されたプロトン濃度勾配を利用して、能動的に細胞外に排出する。このとき、内膜と外膜の二つの膜を一度に乗り越えて細胞内にある薬剤を排出するという特徴を持っているので、非常に効率の良いポンプである。また、本ポンプは構造が異なる種々の抗生剤を認識するので、ポンプが働くだけで菌は多剤耐性化する。従って、このようなポンプの機能が阻害できれば、多剤耐性を抑えることができ、そうなれば耐性菌には使用できなかった抗生剤が緑膿菌感染症の治療に使えるようになる。

(1) そこで我々はどのようにすれば排出ポンプの機能を阻害できるかを考えて、研究と続けてきた。その過程で排出ポンプの外膜成分で薬剤透過のチャンネルを形成する OprM の構造の中で、細胞外に露出しているループがあるが、これがただ単に膜貫通領域をつなぐコネクションとして働くだけでなく、ポンプの機能で重要な役割を果たす可能性を考えてその検証を行った。

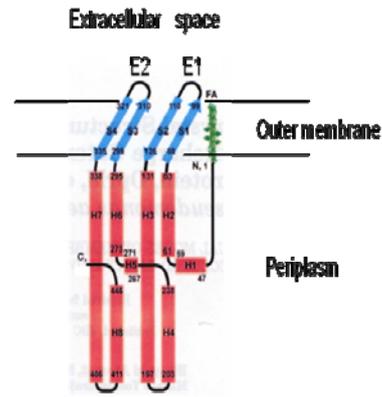


図 2

図 2 は OprM の二次構造を示している。これから明らかなように OprM はそれぞれ 10 アミノ酸残基からなる小さな領域である。これらループがポンプの機能に関与しているかどうかを調べるために、これらループに対してシステインスキャンニングを行った。このうちの E2 のアミノ酸配列を以下に示す。

Arg-Gln-Lys-Ser-Gly-Leu-Phe-Asp-Ala-Gly

この配列で端から順に一つづつ Cys 残基に置換した変異体を構築した。そのためにプラスミドに挿入されている OprM 遺伝子に部位特異的変異導入法により変異を導入した。塩基配列を決定し、正確に変異が導入されていることを確認した。次に、この変異 OprM 遺伝子をもつプラスミドを OprM 欠損緑膿菌株に導入し、その結果、タンパク質が発現しているかどうかを、抗 OprM 抗体を用いたウエスタンブロット法で調べた。すべての変異株で正常に OprM タンパク質が発現されていることが確認された。

次に、このようにして作成した 10 種類の変異株のポンプ機能が変化して以下を検討した。その方法として菌の抗生剤感受性試験を用いた。もし薬剤排出ポンプの機能が損なわれていた場合、薬剤を排出できず、その結果、薬剤が効くようになるので、菌の薬剤感受性を指標にすれば、ポンプの機能変動を知ることができる。

感受性試験として 2 倍希釈系列の抗生剤を含む寒天培地に菌を殖える方法を用いた。抗生剤の濃度が下がるにつれて、ある濃度から菌の発育が見られた時、その濃度より 2 倍の抗生剤が最小発育阻止濃度 (MIC) となる。MIC が高くなると、抗生剤に耐性になっていることを示す。この方法を用いて、モノバクタム系抗生剤であるアズトレオナムに対する変異株の感受性変化を調べ、その結果を図 3 に示す。図から明らかなように、311, 312, 317, 318, 319, 320 番目のアミノ酸が置換されたときに、菌は感受性化していることがわかる。特に Arg311, Gln312, Asp318 の変異が顕著

な感受性化をもたらした。この原因の一つは荷電をもつアミノ酸の変異によってその荷電が消失する効果が甚大であったことが示唆される。これらの結果は、OprM の細胞外ループは単に膜貫通領域をジョイントするだけでなく、ポンプが排出機能を果たす上で、重要な役割を担っていることを示す。どのような役割を持つかはこれからの研究によって明らかになると思われるが、一つの可能性としてこれらループは薬剤透過の際のゲートとして機能し、必要な時にゲートを開くことが考えられる。

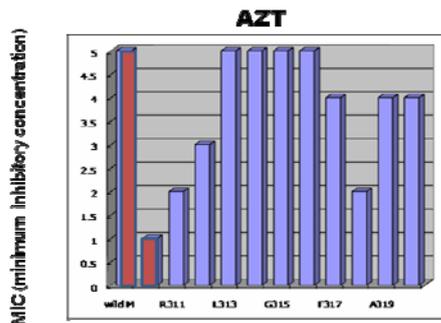


図 3

そこで考えたことは、このループの働きを抑えることができれば、ポンプの機能を阻害できるのではないかということである。ではどのようにすればその働きを抑えることができるのか。我々は抗体を用いれば、それが可能であると考えた。抗体は生体高分子であるので細胞膜を通過できないが、この場合、ループは細胞外に露出しているため、抗体は問題なく標的に到達できるという特徴がある。そして抗体がループに特異的に結合することで、ループの動きが制限され、その働きが抑えられるのではないかと期待した。

そこで我々はOprMのループE2に対するモノクローナル抗体の作成を試みた。その際、E2のアミノ酸配列と同じ配列をもつペプチドを合成し、それを抗原とした。このペプチドをマウスに抗原として投与し、免疫した。その後、通常の方法を用いてハイブリドーマを作成し、目的とする抗体を産生しているか、ELISAでチェックした。これによって陽性反応を示す細胞を数株得ることができた。それら細胞を大量に培養し、培養上清を得た。それをprotein G カラムにかせ、抗体を精製した。

次に、このモノクローナル抗体のポンプ阻害活性を調べた。それには低濃度の抗生剤を添加した緑膿菌臨床分離株を培養する。このような濃度では菌は問題なく生育する。一方、この状態のものにモノクローナル抗体を加えて、同じように培養し、菌の生育がどのように変化するかを調べる。このときに、生菌数を調べることで、抗生剤の殺菌作用を検討した。モノクローナル抗体を加えていない場合の生菌数を、モノクローナル抗体を加えた

時の生菌数を比較してその効果を検討した。その結果を図4に示す。

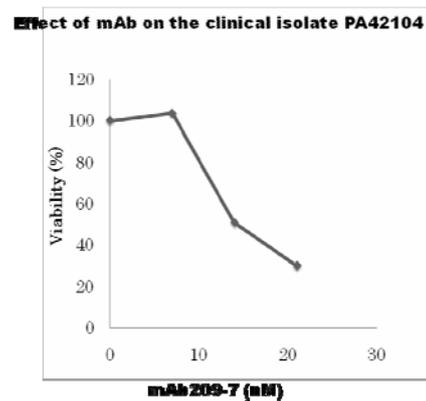


図 4

図の結果は、臨床分離株 PA2104 にモノクローナル抗体 209-7 を加えた時の、生菌数の減少を示したものである。これから明らかなように、抗体の添加によって、菌の発育は減少し、その活性は抗体の濃度に依存して大きくなるのが分かった。この結果から、モノクローナル抗体はOprMに結合することでポンプの機能を阻害し、その結果、菌は抗生剤に感受性化したことを示唆している。

従って、OprMの細胞外ループに対する抗体は、薬剤排出ポンプの阻害剤として作用するということが示されたと考えている。

(2) 次にペプチドをポンプ阻害剤として使用できるのではないかということに関して成果が得られたので、報告する。

**MexAB-OprM** ポンプは三つのサブユニットが一つのユニットを形成したときにはじめて、ポンプとして排出機能を発揮することができる。従って、サブユニット間相互作用が阻害されて、正常なユニット形成に至らないと、ポンプとして機能しないことになる。それならば、サブユニット間相互作用を外から積極的に阻害するようなことを起こせば、ポンプ阻害になるはずである。ではどうすればそのような相互作用を阻害できるか。我々はペプチドを使用すれば、それが可能になると考えた。その原理を図5に示す。

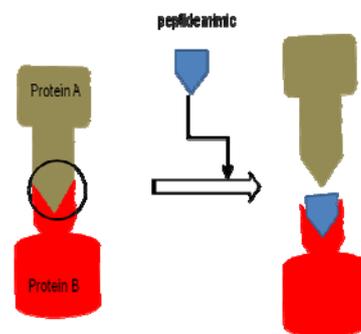


図 5

この場合のタンパク間相互作用において protein B と相互作用している protein A の領域を丸で示しているが、その領域の構造を形成しているアミノ酸配列と同じ配列をもつペプチドを作用させた時、このペプチドは protein B に結合すると考えられる。そうした時には protein A はもはや protein B と相互作用できなくなることから、ペプチドはタンパク間相互作用の阻害剤となり得る。

そこでまず MexAB-OprM ポンプでの MexA と OprM 間の相互作用を阻害することを考えた。

ここでまず必要となる情報は、タンパク間相互作用部位のアミノ酸配列である。MexA と相互作用する部位はこれまでの研究から OprM の赤道ドメインと呼ばれる部位 (239 番アミノ酸から 272 番アミノ酸までの部位) であることが推定されている。この部位は 34 アミノ酸残基からできているので、これと同じペプチドではあまりに長すぎるので、図 6 に示すような形のペプチドをつくって、その作用を調べることにした。それぞれのペプチドは 10 から 11 アミノ酸残基からできているので、これらペプチドで赤道ドメインをすべてカバーするようにした。この図では省略した MA1 と MA2 を含めると全てこの領域はカバーされている。

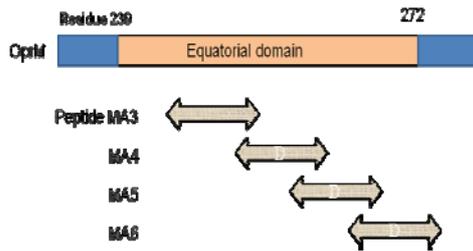


図 6

次に、これらペプチドが実際に MexA と OprM の相互作用を阻害しているかを調べた。その方法としてヒスタグを付加した MexA と OprM タンパクを精製し、その相互作用を native PAGE で検出する方法を用いた。両方のタンパク質を混合すると、複合体形成にもなって見られるタンパク質のバンドが観察された。そこでこの系にペプチドを加えた時に、そのバンドがどのように変化するかを調べた。その結果、MA1, MA2, MA3 ペプチドでは、複合体の形成量に変化は認められなかった。一方 MA4, MA5, MA6 ペプチドを添加したとき、複合体のバンドはほぼ消失するのが観察された。すなわちこれらペプチドが MexA と OprM 間相互作用を阻害できるといことが示された。

そこで次に、このようなペプチドが緑膿菌に作用し、そのポンプの集合を阻害できるのかを検討した。ペプチドの標的部位は緑膿菌

のペリプラズム領域にあるので、そこに到達するためには、外膜を通過することが必要である。一般には、ペプチドは膜を通過しにくいことが分かっているため、何らかの方法で外膜を通過できるようにすることが必要となる。ここではキレート剤である EDTA を添加することによって外膜の物質透過性を上昇させる方法を用いた。実験系として、まず低濃度の抗生剤と EDTA を加えた状態で緑膿菌を培養する。一方、この系にさらにペプチドを加えた条件で、菌を培養した。そしてそれぞれで生菌数を数え、比較検討した。その結果を図 7 に示す。ここではペプチドとして MA6 を用いた結果で、その濃度を変えて緑膿菌の生菌数がどのように変化するかを調べたものである。図から明らかのように、MA6 ペプチドの濃度に依存して緑膿菌が殺菌されていることがわかる。すなわち、はポンプの集合を効率的に阻害して、その機能を阻害する。その結果ポンプの機能は低下し、薬剤を効率的に排出できなくなるので、抗生剤の感受性となり殺菌されたことを示している。

Effect of MA6 on the viability of *P. aeruginosa*

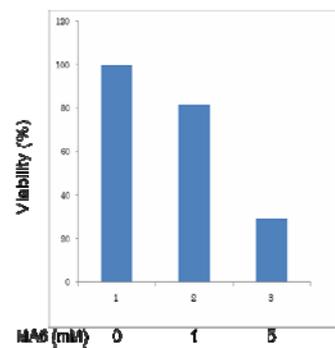


図 7

この結果は、ポンプ機能を阻害するうえで、MexA と OprM 間相互作用部位は有効な標的になることを明瞭に示したものと考えられる。

次に、MexB と OprM 間相互作用の阻害を考えた。MexB と相互作用する OprM の部位は、その構造の特徴から図 8 に示した領域であると推定された。この二つの領域はそれぞれ 4 アミノ酸残基からなる非常に小さな部位である。

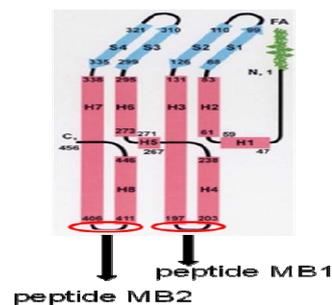


図 8

これら部位のアミノ酸配列と同じ配列をもつペプチド MB1 と MB2 を合成して、その活性を先と同様にして調べた。その結果、MB1 ペプチドには何ら効果が見られなかった。一方、MB2 ペプチドでは顕著な活性が認められた (図 9)。この図から明らかなように、MB2 ペプチドの濃度に依存して殺菌作用の増強が見られた。この結果は MexB と OprM 間相互作用を MB2 が阻害し、その結果、ポンプが機能不全に陥り、抗生剤に感受性になったことを示している。従って、MexB と OprM 間相互作用部位もポンプ阻害剤と開発する上で、非常に良い標的になると考えられる。

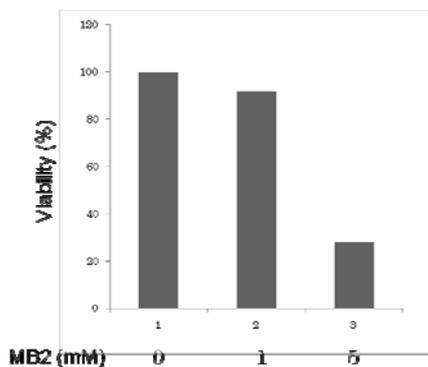


図 9

以上の結果から以下のようなことが結論できる。緑膿菌の多剤耐性因子の一つである多剤排出ポンプを直接阻害することで、本菌の多剤耐性を抑制することができ、これにともなってこれまでの抗生剤の有効性が回復され、緑膿菌感染症の治療が可能となる。このためのポンプ阻害剤として、OprM に対するモノクローナル抗体を使用できることが明らかとなった。将来的にはこのような抗体はヒト化することで臨床応用につなげるものと大いに期待できる。一方、ポンプサブユニットの相互作用に的を絞って、それを阻害するペプチドはやはりポンプの機能を阻害することが明らかとなった。将来的にはこのようなペプチドが外膜を透過できるようなことができれば、臨床応用が可能になると期待できる。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Modification of a human monoclonal antibody Fab fragment specific for *Plasmodium falciparum* 19-kDa C-terminal merozoite surface protein 1 by site-directed

mutagenesis

Tao, Y.-L., Chen, X.-J., Fu, Y.-F., Tsukamoto, H., Yoshihara, E., Tachibana, H. (2008)

Parasitol. Res. 103, 429-433 (査読有)

- (2) Diversity in the oligomeric channel structure of the multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*

Yoshihara, E., Eda, S. (2007)

Microbiol. Immunol. 51, 47-52 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Novel peptidyl inhibitor of MexAB-OprM, a multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*

良原 栄策

日本細菌学会総会

名古屋国際会議場 (2009)

- (2) 緑膿菌多剤排出ポンプ MexAB-OprM の外膜チャネルである OprM が関与する基質認識

良原 栄策

日本細菌学会総会

アジア太平洋トレードセンター (2007)

[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]

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

良原 栄策 (YOSHIHARA EISAKU)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70167063

- (2) 研究分担者

なし

- (3) 連携研究者

なし