

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20759

研究課題名（和文）肺炎球菌における多剤排出ポンプの機能解析

研究課題名（英文）Functional Analysis of multidrug efflux pumps in Streptococcus pneumoniae

研究代表者

田口 厚志（TAGUCHI, Atsushi）

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20908686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では肺炎球菌薬剤排出ポンプ過剰発現ライブラリを作成し、薬剤感受性試験を行うことで抗菌薬耐性に関わるポンプ因子の同定を行うことに成功した。耐性に関与するポンプ因子のうち、一つは未知のABCトランスポーターであったことから生化学的手法を用いた機能解析を行うための蛋白質サンプルの精製を行い、精製されたサンプルにATPアーゼ活性があることを確認した。今後はこのポンプ因子の構造解析や機能解析をさらに行うことで基質輸送メカニズムの解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌は先進国の死因の中核を占める肺炎の原因菌として広く認知されており、近年多剤耐性を持った肺炎球菌の蔓延が臨床現場において大きな問題となっている。多剤耐性肺炎球菌感染症に対する治療法を確立させるためには薬剤耐性機構の解明及び新規抗菌剤の標的の発見が喫緊の課題となっている。今回の研究は肺炎球菌の膜輸送体がどのように抗菌薬耐性に関与しているかを解明しており、本研究成果は革新的な感染症治療法の開発に応用できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study I constructed an efflux pump overexpression library in *Streptococcus pneumoniae* and tested this library against a variety of antimicrobial compounds to identify efflux pumps that are directly involved in antibiotic resistance. We identified several of these pumps of which one efflux pump turned out to be a previously uncharacterized ABC transporter. I purified this transporter to biochemically examine its activity and succeeded in measuring ATPase activity in vitro. I plan to structurally characterize this transporter in order to elucidate the mechanism of substrate transport.

研究分野：微生物学

キーワード：肺炎球菌 薬剤耐性 薬剤排出ポンプ 膜輸送体 ABCトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

近年薬剤耐性菌による感染症の拡大が大きな社会問題となっている。肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)は肺炎の原因菌として知られており、従来は細胞壁合成を阻害するペニシリン系抗菌薬や転写・翻訳を阻害するニューキノロン・マクロライド系抗菌薬が肺炎球菌感染症に使用されてきた。しかし、これらの抗菌薬への耐性を持つ肺炎球菌の蔓延が臨床現場で確認されており、これら耐性菌感染症に対する治療法を確立するためには薬剤耐性機構の解明および新規抗菌薬の標的の発見が喫緊の課題となっている。

耐性菌が持つ薬剤耐性機構のうち、菌体内から生体異物や抗菌薬を排出する薬剤排出ポンプの研究はグラム陰性菌において大きく進展している。薬剤排出ポンプは構造や輸送メカニズムの違いによって複数のファミリーに分類されており、特に AcrAB に代表される RND 型ポンプはグラム陰性菌の高度な薬剤耐性に関与していることが明らかになった。こうした基礎研究の成果は多剤耐性化したグラム陰性菌を RND 型排出ポンプの阻害剤と既存の抗生物質を組み合わせることで治療するといった新たなアプローチの開発につながると期待されている。また多剤排出ポンプは抗菌薬等の異物の他、生理的基質を輸送する役割も担っており、細胞機能の制御において排出ポンプが果たす役割を解明することも重要な課題である。

ゲノム解析により肺炎球菌をはじめとするグラム陽性菌にも薬剤排出ポンプの遺伝子が多数存在することが分かっているが、それらの役割についての研究は初期段階にある。肺炎球菌の特徴として ABC 型、MF 型、MATE 型、DMT 型などの薬剤排出ポンプを保持しているのに対し、グラム陰性菌にみられる RND 型ポンプが存在しないことがあげられる。このうち一部の ABC 型ポンプ(例: PatAB)は薬剤耐性化に寄与していることが示唆されているが、その他の排出ポンプについては薬剤認識機構や薬剤耐性への寄与度がほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では肺炎球菌の多剤耐性化における薬剤排出ポンプの役割および基質輸送メカニズムの解明を目指した。薬剤排出ポンプとしての機能が確認できたポンプ因子に関しては、どのようなメカニズムで薬剤を菌体外へ排出しているかを理解することでその作用を阻害する低分子化合物の開発につながられる。また、多剤耐性化が進んでいる他のグラム陽性細菌(例: 腸球菌・黄色ブドウ球菌)には相同体排出ポンプが数多く存在し、肺炎球菌のポンプ因子と同等の働きを持つことが多いことから、肺炎球菌以外の耐性菌の理解にも貢献できる。特に ABC トランスポーターに関しては細菌だけではなく、ヒト細胞にも数多くの疾患に関与していることから、ABC トランスポーターの基質輸送がどのように行われているのかを検証することは細菌学以外の分野の学問の発展に寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

ゲノム解析により肺炎球菌には 30 種類以上の薬剤排出ポンプがあると推定されているが、薬剤耐性への寄与度を網羅的に解析した先行研究は存在しない。本研究では薬剤耐性に関わるポンプ因子の新規同定を目指し、薬剤排出ポンプを過剰発現させるプラスミドが挿入された肺炎球菌ライブラリを作成した。このライブラリを抗菌薬や有害物質に対する感受性試験に用いることでこうした化合物を菌体外に排出するポンプ因子の同定を行った。

感受性試験において同定されたポンプ因子のうち、先行研究で報告されていない因子については、薬剤耐性への関与を詳細に検討するために過剰発現株・欠損株の発育を阻害する薬剤の最低濃度(MIC: Minimum inhibitory concentration)を測定した。また、同因子を大腸菌で過剰発現させて精製することで生化学的な機能解析を進めた。

4. 研究成果

作成した薬剤排出ポンプ過剰発現ライブラリを用いた抗菌薬感受性試験から、既知の多剤排出ポンプである ABC トランスポーター PatAB がテトラサイクリン・シプロフロキサシン等の抗菌薬の排出に関与していること、および既知 ABC トランスポーター BceAB が抗菌薬バシトラシン耐性に寄与していることを確認することができた。この実験結果は薬剤排出ポンプ過剰発現ライブラリが様々な薬剤に対する耐性に寄与するポンプ因子の同定に有用であることを示している。本研究では上記の既知耐性因子の他に薬剤耐性に関する新規の ABC トランスポーター X を同定した。X を過剰発現させた株は野生株に比べて抗菌薬 A の MIC が 4 倍上昇した。なお、X を欠損させた株では野生株と比較して MIC の変化は見られなかったことから、実験環境下では X の発現量は高くはないと考えられる。

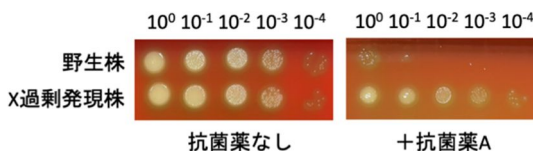


図 1: X を過剰発現させた肺炎球菌株は抗菌薬 A に対する耐性が上昇する

本研究では X の機能解析に向けて X の精製を試みた。発現・精製プロトコルを最適化することで、大腸菌 1L から約 0.5 mg の収量を得ることに成功し、単一ピークが見られたことから構造解析にも適したサンプルを調整することができたといえる。また界面活性剤中での ATP アーゼ活性に測定することにも成功した (図 2)。今回測定した条件下では基質を添加することによる ATP アーゼの活性変化は見られなかったことから、今後は X をリポソームに再構成することでより菌体膜環境に近い条件で ATP アーゼ活性の測定および基質輸送アッセイ系の構築を行う予定である。

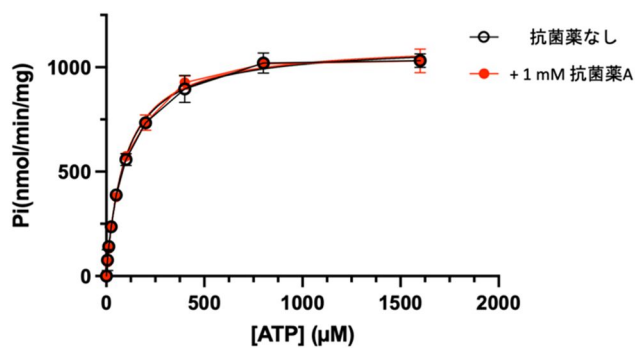


図 2 : X の ATP アーゼ活性測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Weaver Anna, Taguchi Atsushi, Dorr Tobias	4. 巻 205
2. 論文標題 Masters of Misdirection: Peptidoglycan Glycosidases in Bacterial Growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00428-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Atsushi Taguchi
2. 発表標題 Pyruvate kinase mediates fosfomycin resistance in Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 Molecular Genetics of Bacteria and Phage Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Taguchi
2. 発表標題 Pyruvate kinase mediates fosfomycin resistance in Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 Gordon Conference Streptococcal Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Taguchi
2. 発表標題 Pyruvate kinase mediates fosfomycin resistance in Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 第15回日韓国際微生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口厚志
2. 発表標題 Pyruvate kinase mediates fosfomycin resistance in Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔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