

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790085

研究課題名（和文）多剤耐性と病原性発現に關与する薬剤排出トランスポーターの機能解明と阻害剤開発

研究課題名（英文）Inhibitor development and the functional elucidation of the drug efflux transporter which participates in multidrug resistance and pathogenic revelation

研究代表者

西野 美都子 (NISHINO MITSUKO)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：30510440

研究成果の概要（和文）：近年、抗生物質が効かない多剤耐性菌の出現・感染拡大が医療現場において、国際的に大きな問題となっており、感染症の克服は極めて重要な課題となっている。我々は、サルモネラのゲノム情報をもとに、数多くの多剤排出トランスポーター遺伝子を同定してきた。さらに、これらトランスポーターが、病原性発現制御にも関与していることを明らかにした。本計画では、病原細菌に潜む排出トランスポーターによる多剤耐性化と病原性の制御機構を明らかにすることができた。本成果は、薬剤耐性化を克服しながら病原性を軽減することのできる、新しい感染症治療法の開発に、繋がると強く期待される。

研究成果の概要（英文）：A number of drug-resistant bacterial strains are now appearing in the clinical field, and infectious diseases originating from these strains have become a major problem. Genomic analysis has resulted in the identification of many genes which have been proposed as drug efflux pumps, and bacterial genome sequences have allowed us to identify the drug-resistant gene libraries of bacteria. We have identified a number of multidrug transporter genes in Salmonella based on its genomic information. Moreover, we found the roles of these drug efflux transporters in bacterial virulence. In this study, we have succeeded in discovering the mechanism which regulate both bacterial drug resistance and virulence phenotypes modulated by the multidrug efflux transporters. Because drug efflux transporters have roles in bacterial multidrug resistance and virulence, we propose that drug efflux transporters have greater clinical relevance than is usually attributed to them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：感染制御学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：多剤耐性、薬剤排出、トランスポーター、細菌、感染症、サルモネラ、化学療法、病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、抗生物質が効かない多剤耐性菌の出現・感染拡大が医療現場において、国際的に大きな問題となっており、感染症の克服は極めて重要な課題となっている。我々は、サルモネラのゲノム情報をもとに、数多くの多剤排出トランスポーター遺伝子を同定してき

た（図1）。しかしながら、これらゲノム上にコードされているトランスポーターがどのような組み合わせで機能して多剤耐性化に関与しているのかは不明であった。

(2) これまでに薬剤排出トランスポーターが、病原性発現制御にも関与していることを

明らかにしている。しかしながら、これらトランスポーターの宿主環境中での発現制御や、生理機能、生理基質などについては殆どが未知のままであった。

(3) 細菌のゲノム上に見出された数多くの多剤排出トランスポーター遺伝子がどのようにして発現制御されているのかは、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) わが国におけるサルモネラ食中毒事例はここ数年間常に、腸炎ビブリオと一、二を争う代表的食中毒菌である。サルモネラによる食中毒は大型の事例が多く、学校、福祉施設、病院で多発している。また、多剤耐性化も増加しており、世界的にその予防対策が公衆衛生上の大きな問題となっている。我々は、サルモネラのゲノム情報をもとに、数多くの多剤排出トランスポーター遺伝子を同定してきたが、これらのトランスポーターがどのようにして組み合わせられて多剤耐性化が引き起こされるのかを明らかにすることを目的に研究を推進した。

(2) 薬剤排出トランスポーターが、病原性発現制御にも関与していることがこれまでに明らかになっているが、本研究では、これらの病原性発現に関与するトランスポーターの宿主環境中での発現制御を解析し、さらには、生理基質を同定することを目的として研究を進めた。

(3) 細菌のゲノム上に見出された数多くの多剤排出トランスポーター遺伝子がどのようにして発現制御されているのかは、明らかになっていなかった。

3. 研究の方法

(1) サルモネラゲノム上の薬剤排出トランスポーター (図 1) の性質を調べるため、野生株として *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028s 株を使用した。AcrA, AcrB, AcrD 遺伝子の欠損株は、Datenko & Wanner による One-Step Inactivation の方法により構築した。菌株の種々の抗菌薬に対する感受性を測定するために、段階希釈により調整した抗菌薬を含む寒天培地に菌液を接種し、各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

(2) 宿主環境中におけるサルモネラ薬剤排出トランスポーターの発現制御を調べるため、培養したマクロファージ細胞にサルモネラを感染させた後、RNA を回収し、定量的リア

ルタイム qRT-PCR の方法により、各トランスポーターの発現量の変化を観察した。また、生理的基質同定のため、本計画では蛋白質に注目し、2次元電気泳動の方法により、トランスポーター発現上昇株、野生株、トランスポーター遺伝子欠損株の上清中に含まれる蛋白質組成の違いについて調べた。

(3) 細菌において、アミノ酸をコードせず、自身で機能をもつ非翻訳型 RNA の存在が知られている。特に、500 塩基以下の低分子非翻訳型である small RNA (sRNA) が、標的 mRNA と塩基対を形成することにより翻訳を抑制または促進したり、mRNA 分解を引き起こすことで、転写後の遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが分かってきた。

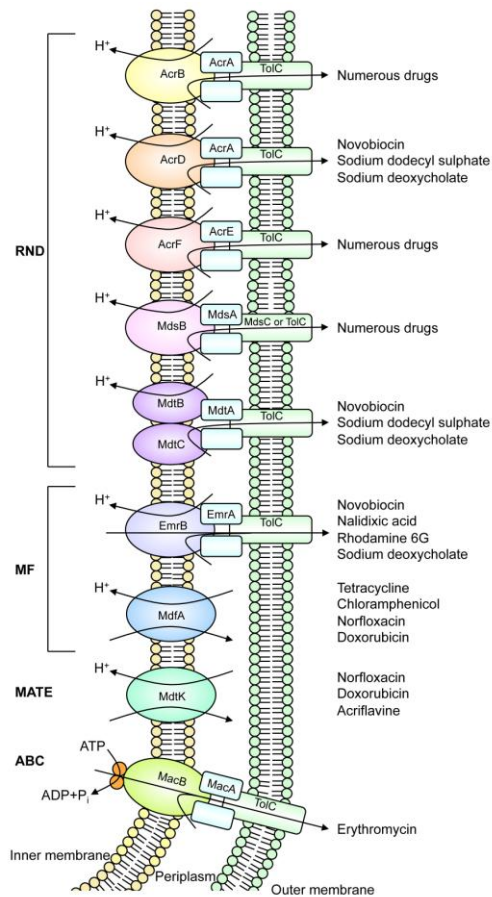


図 1. 病原細菌サルモネラゲノムに潜在する薬剤排出トランスポーター群。これら薬剤排出トランスポーターは複数の抗菌薬を細胞の中から外に排出する活性を保持しており、発現が上昇することで、細菌の多剤耐性化が誘導される。

これら sRNA が細菌のストレス応答、クオラムセンシングや病原性の調節に関与してい

ることが報告されていたが、長らく sRNA と細菌の多剤耐性との関係については不明であった。本計画では、RNA シャペロンである Hfq に注目し、本因子と多剤耐性制御との関係について調査した。

4. 研究成果

(1) 特に強力な RND 型排出ポンプは、サルモネラに 5 種類存在しており、通常、その機能に必要な膜融合蛋白質 (MFP) も同じオペロン上にコードされていることが知られている。しかしながら、RND 型排出ポンプ AcrD 遺伝子の近傍には MFP がコードされておらず、AcrD の機能に必要な MFP については未だ分かっていない。そこで本研究では、サルモネラの AcrD 排出システムにおける MFP の同定を行った。通常培養条件下で唯一、常に発現している RND 型薬剤排出システムである AcrB に着目し、このシステムの機能に必要な MFP の AcrA ならびに外膜蛋白質 TolC の遺伝子欠損株を作製した。TolC は、AcrB や AcrD を含む様々な薬剤排出ポンプと相互作用する外膜輸送蛋白質である。各種プラスミドをこれらの欠損株に形質転換し、作製した様々な菌株の薬剤感受性を測定した。AcrD 過剰発現株は、oxacillin、cloxacillin、nafcillin、carbenicillin、sulbenicillin、aztreonam、sodium dodecyl sulphate、novobiocin に対する多剤耐性を示した。その耐性化は、*acrA* または *tolC* 遺伝子を欠損させることで完全に抑えられた。また、*acrA* 遺伝子欠損株においても、プラスミドを用いて AcrA および AcrD の両方を過剰発現させることで、多剤耐性化が引き起こされることを確認した。以上の結果から、RND 型排出ポンプ AcrD は、MFP として AcrB の遺伝子近傍にコードされている AcrA を利用することで、サルモネラ多剤耐性化を引き起こすことが明らかとなった。こ

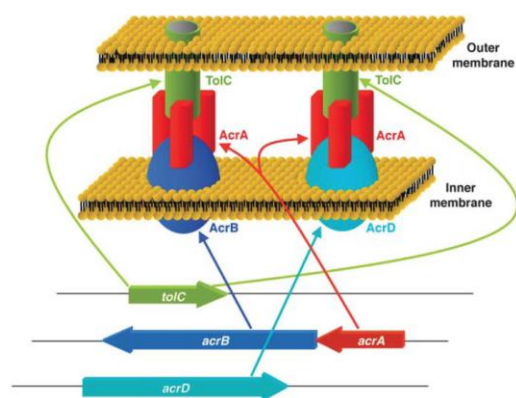


図 1. 食中毒原因菌のサルモネラにおいて、AcrA は、AcrB ならびに AcrD 薬剤排出トランスポーターと複合体を形成し、細菌の多剤耐性化に関与していることを発見した。

れは、AcrA が RND 型薬剤排出システムの MFP として、多面的な役割を果たしているこ

とを示すものである (図 2)。

(2) サルモネラには 9 種類の薬剤排出トランスポーター遺伝子が存在している。この中でも、ABC 型トランスポーターの発現が宿主環境のマクロファージ内において誘導されることが明らかとなった。宿主環境内において、強く発現誘導され、病原性に深く関与しているトランスポーターに着目し、薬剤排出トランスポーターの生理基質の同定を目指して研究を進めた。トランスポーター発現株の培養上清中には、糖に関与するタンパク質、特にリボースに関与するタンパク質が多く同定された。マルトース類縁体である ADP-リボースは多くの細菌において病原性発現に関与していることが知られている。薬剤排出トランスポーターがリボースを介して病原性発現に関与している可能性が示唆された。

(3) sRNA は、標的 mRNA の翻訳開始部分と部分的な塩基対を形成することで、翻訳の抑制や mRNA の安定性を調節するが、sRNA の作用には RNA 結合性蛋白質 Hfq が必要となる。本研究において、*hfq* 遺伝子欠損株は、クロラムフェニコール、ノボビオシン、塩化ベンザルコニウム、オキサシリン、セファマンドール、ナリジキス酸等の抗菌薬に対し、野生株に比べて感受性化していることが分かった。Hfq は転写後のレベルで AcrB 多剤排出システムの発現調節を行い、細菌多剤耐性制御に関与していることが明らかになった。

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 5 件)

- ① K. Tabata, M. Hayashi-Nishino, T. Noda, A. Yamamoto, T. Yoshimori, Morphological analysis of autophagy, *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 931, 2013, 449-466, DOI: 10.1007/978-1-62703-056-4_23
- ② H. Niu, Q. Xiong, A. Yamamoto, M. Hayashi-Nishino, Y. Rikihisa, Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 109, 2012, 20800-20807, DOI: 10.1073/pnas.1218674109
- ③ M. Hayashi-Nishino, A. Fukushima, K. Nishino, Impact of Hfq on the intrinsic drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Front. Microbiol.*, 査読有, 3, 2012, 205, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00205

- ④ Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A, Small RNA-mediated bacterial multidrug resistance, *Jpn J Chemother*, 査読無, 59, 2011, 1-7
- ⑤ Yamasaki S, Nagasawa S, Hayashi-Nishino M, Yamaguchi A, Nishino K, AcrA dependency of the AcrD efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *J Antibiot* (Nature Publishing Group), 査読有, 64, 2011, 433-437

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① Nishino, K., K. Hayashi, S. Yamasaki, S. Yamasaki, Y. Matsumoto, M. Hayashi-Nishino, A. Yamaguchi, Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens, *New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences*, 2012年09月27日, Tokyo
- ② Hayashi-Nishino, M., A. Yamaguchi, and K. Nishino, Immuno-electron tomography for elucidation of localization of the multidrug efflux pump in *Salmonella*, 第85回日本細菌学会総会, 2012年3月29日, 長崎
- ③ 大野愛子, 尾島学, 西野美都子, 山口明人, 西野邦彦, サルモネラ薬物排出トランスポーターの生理機能解析, 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011年11月24日, 岡山
- ④ Hayashi-Nishino, M., R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi, and K. Nishino, Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens, *France-Japan Workshop (Bio-inspired approaches: Micro- & Nano- Architectures, Materials & Imaging)*, 2011年10月11日～12日, Bordeaux, France
- ⑤ 山崎聖司, 西野一林美都子, 山口明人, 西野邦彦, Small RNAによる細菌多剤耐性化メカニズムの解明, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日, 京都
- ⑥ Yamasaki, S., S. Nagasawa, M. Hayashi-Nishino, A. Yamaguchi, K. Nishino, AcrA dependency of the AcrD efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*, 2011年9月9日, Sapporo, Japan
- ⑦ Yamasaki, S., S. Yamasaki, S. Nagasawa, M. Hayashi-Nishino, A. Yamaguchi, and K. Nishino, Role of AcrA on the function of the AcrD multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *4th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment*, 2011年6月27日～29日, Tours, France

(招待講演)

- ⑧ 西野美都子, 電子線トモグラフィーによる細胞小器官の3D解析, 第37回組織細胞化学講習会, 2012年08月02日, 大阪
- ⑨ Hayashi-Nishino, M., A. Yamaguchi, and K. Nishino, Immuno-electron tomography for elucidation of localization of the multidrug efflux pumps in *Salmonella*, *7th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium*, 2011年11月11日, Osaka, Japan

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 西野一林美都子, 日本組織細胞化学会, 組織細胞化学技術プロトコール 組織細胞化学の挑戦 -臨床応用研究への飛躍- 見る! -電子顕微鏡の基礎と応用- 「電子線トモグラフィーによる細胞小器官の3D解析」、2012, 213-217
- ② 西野一林美都子 (水島昇・吉森保/編)、化学同人, オートファジー「電子顕微鏡を用いたオートファジー解析」、2012, 14章担当

〔その他〕

ホームページ等

- ① 大阪大学産業科学研究所
<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp>
- ② アナプラズマ症原因細菌によるオートファジー誘導の仕組みを解明 -新規治療法開発への応用に期待! -
http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/jp/operation/research_activities.html#hot_20130115

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・
特任助教 (常勤)
研究者番号: 30510440

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし