

環境シグナルによるサルモネラ薬剤耐性誘導と Ram 制御因子の解析

山崎 聖司

大阪大学 産業科学研究所 感染制御学研究分野

1. はじめに

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いる。化学療法が困難な多剤耐性菌の出現により、人類は多くの感染症の脅威に曝されており、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。細菌が抗生物質などの化学療法剤に対して耐性となる機構として、①修飾・分解酵素による薬剤の不活性化、②薬剤作用点の薬剤親和性の変化、③細菌細胞表層の変化による薬剤透過性の変化、④細菌細胞外への薬剤の能動的排出等を挙げることができる。多くの場合、多剤耐性化はこれらの要因が複雑に絡み合った結果もたらされるが、このうち薬剤の能動的排出は、単一の要因によって多剤耐性をもたらす。この多剤の能動的排出に関わる原因蛋白質が、薬剤排出ポンプである。特に、作用機序の異なる多種多様な抗生物質や細胞障害性異物を、基質として菌体外に排出する薬剤排出ポンプを多剤排出ポンプと呼んでいる。

ゲノム解析が進むにつれ、細菌は数多くの薬剤排出ポンプを保持していることが明らかとなってきた。また、薬剤排出ポンプ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明らかとなってきた。本研究では、細菌の病原性軽減ならびに多剤耐性化を克服する特効薬開発を目指し、サルモネラをはじめとした病原細菌の染色体上に潜む薬剤排出ポンプ制御機構解析を中心に、情報伝達による細菌のポンプ制御ネットワークを明らかにする。

2. 細菌ゲノムに潜む薬剤排出ポンプの同定と多剤耐性化における役割

本研究で注目している薬剤排出ポンプは、その構造および共役するエネルギーの違いから、ABC (ATP binding cassette)、MF (major facilitator)、RND (resistance nodulation cell-division)、MATE (multidrug and toxic compound extrusion)、SMR (small multidrug resistance) の5つのファミリーに分類することができる¹。各ファミリーには特徴的なアミノ酸配列が保存されており、配列からその細菌が保持している薬剤排出ポンプの数を推定することができる。例えば、モデル生物である大腸菌では、37種の薬剤排出ポンプ遺伝子の存在が推定された。私達の研究室において各薬剤排出ポンプを発現させて調べた結果、少なくともこれらの中20種が、大腸菌を何らかの薬剤に対して耐性化させることを実験的に証明した^{2,3}。

また、解析が進むにつれてモデル生物である大腸菌に加え、様々な病原細菌のゲノム配列が明らかになってきたため、サルモネラにおける薬剤排出ポンプの解析に着手した。サルモネラ属菌は自然界に広く存在し、急性胃腸炎やチフス・パラチフスを引き起こす原因菌が含まれている。近年、サルモネラによる食中毒事例が増えており、その多くが多剤耐性を示すことが報告されている。この病原細菌に内在する多剤耐性因子を解明するため、ポストゲノム手法を用いた薬剤排出ポンプの網羅的解析を行った。これまでに、発現させることで薬剤耐性化に寄与する薬剤排出ポンプが、サルモネラには少なくとも9種存在することを明らかにした (Fig. 1)⁴。サルモネラには、AcrAB、AcrD、AcrEF、MdtABC、MdsAB (RND 型)、EmrAB、MdfA (MF 型)、MdtK (MATE 型)、MacAB (ABC 型) が存在しており、内7種 (AcrAB、AcrD、AcrEF、MdsAB、MdtABC、EmrAB、MacAB) が外膜蛋白質 TolC と複合体を形成して機能していると考えられる (Fig. 1)⁵。

続いて、薬剤排出ポンプ欠損株を構築し、フェノタイプマイクロアレイを用いて約2000種類の異なる環境下における細菌の生育を観察したところ、欠損株は Fig. 2 に示す抗生物質・色素・界面活性剤といった様々な化合物に対して感受性化していることが分かった。

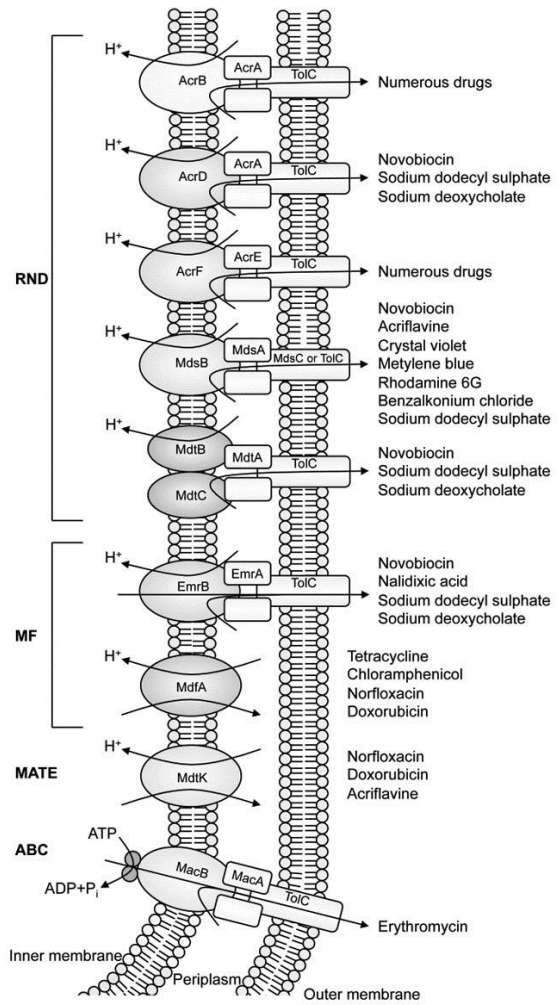


Fig. 1 サルモネラの薬剤排出ポンプ

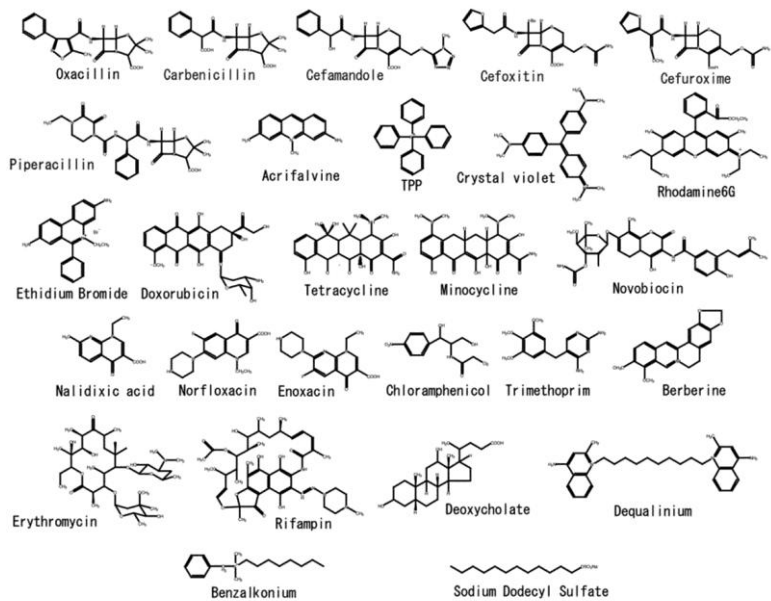


Fig. 2 薬剤排出ポンプの基質の例

3. 薬剤排出ポンプの発現制御機構

これまでに数多くの薬剤排出ポンプを同定したが、これら薬剤排出ポンプがどのようなシグナルによって発現誘導されるのかは、ほとんど知られていない。感染の場において、サルモネラは様々な宿主環境を経験する。サルモネラが感染時に定着する腸内には、大腸菌を含め、 10^{12} もの細菌が生息していると考えられている。また腸内には、多くのインドール産生菌が存在している。インドールが大腸菌から産生されることは、20世紀初頭に発見され、以来、大腸菌等を他の細菌から区別するための指標とされていた。しかしながら、最近の研究によって、微生物コミュニティにおける情報伝達物質としてのインドールの機能が注目されている。多くのグラム陰性・陽性菌が、微生物コミュニティにおける細胞間情報伝達シグナルとしてインドールを産生している。

これまでの研究から、大腸菌において、インドールは細胞内情報伝達物質として大腸菌自身の遺伝子発現を制御することを明らかにしてきた。一方で、サルモネラ等の病原性細菌は、インドール合成に必要なトリプトファン代謝酵素 TnaA を保持しないため、インドールを産生しない。しかし、腸内には大腸菌以外にも、*Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., and *Morganella* spp.等のインドール産生菌が存在しており、これら腸内フローラによって産生されるインドールが、サルモネラをはじめとした病原細菌の遺伝子発現を抑制している可能性が考えられる。感染の場において、実際に細菌がどのような形で薬剤排出ポンプを利用し、薬剤耐性化と病原性をコントロールしているのかを知ることは重要な課題である。そこで、宿主環境中に存在する化合物が、サルモネラの遺伝子発現にどのような影響を及ぼしているのか検討した。

4. 結果

共同研究グループとのマイクロアレイ・定量的 PCR を用いた実験により、インドールや宿主が産生する胆汁酸といった化合物が、制御因子である RamA を介して、AcrAB 薬剤排出ポンプの発現を誘導していることを明らかにした。インドールは RamR 抑制因子の効果を解除して RamA の発現を上昇させることにより AcrAB を誘導するのに対して、胆汁酸は RamA に直接結合して活性化させることにより、AcrAB 誘導を行っていた (Fig. 3)。すなわち、RamA はインドールや胆汁酸といった異なるシグナルインプットに対して、「過剰発現型」と「活性型」という2つの制御モードにより AcrAB を誘導しているという、新規薬剤排出ポンプ制御機構を発見した。

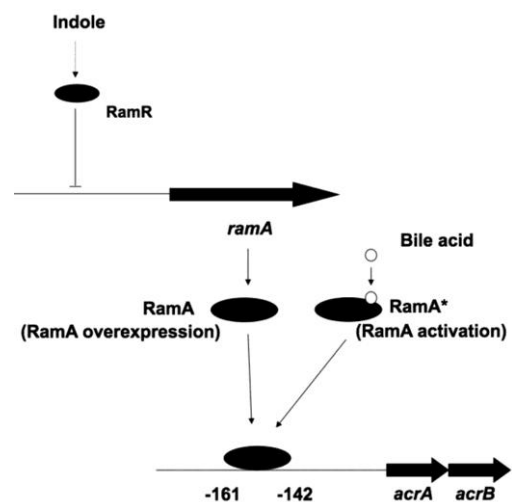


Fig. 3 Ram 制御因子による薬剤排出ポンプ誘導

また、インドールが広い範囲で、サルモネラの遺伝子発現に影響をおよぼし、その結果、病原細菌の生理機能を制御していることを明らかにした。インドールによるサルモネラ遺伝子発現の網羅的解析をマイクロアレイによって行い、予想された運動性・病原性抑制効果について、フェノタイプの解析を行った。実験の結果から、サルモネラの病原性に深く関与している *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) 領域にコードされている遺伝子発現をインドールが抑制し、また、運動性や鞭毛合成に関与している遺伝子発現の抑制にも関わっていることが明らかとなった (Fig. 4)。

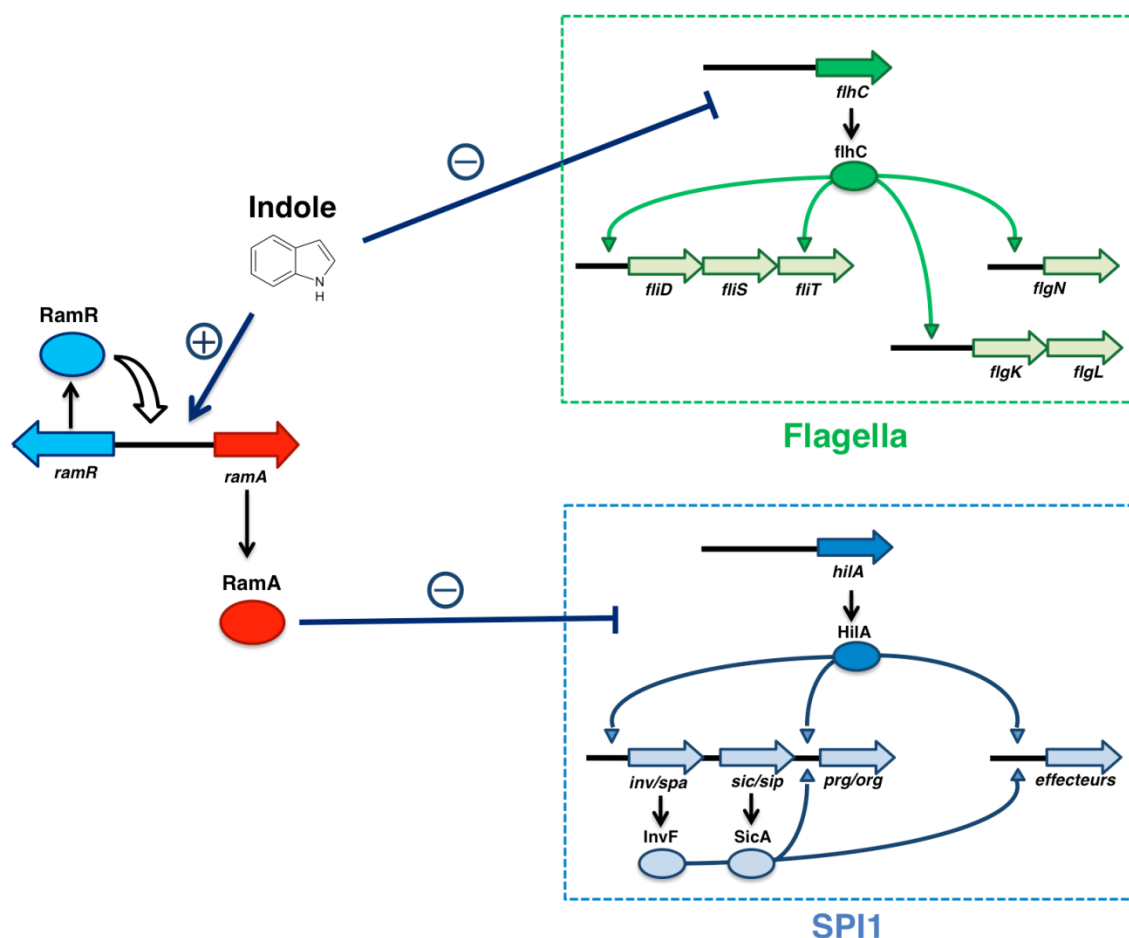


Fig. 4 インドールによる細菌病原性・運動性の制御

これまでに、腸内フローラが産生するインドールが病原細菌の病原性を抑制しているという観点から研究が行われたことはなく、本研究により、微生物間情報伝達によって、腸内フローラが病原細菌の遺伝子発現を抑制しているという新たな観点が生まれたと考えている。また現在、インドールの感知に関与する制御因子の結晶構造解析にも取り組んでおり、化合物と多剤耐性制御因子の複合体構造の詳細が明らかになれば、出現が上昇傾向にある多剤耐性菌に対する阻害剤の開発や、分子生物学的診断法の開発等に役に立つ。

5. おわりに

多剤耐性化と細菌病原性という本来結びつかなかった現象に、つながりがみえるようになってきた。多剤排出ポンプは、細菌の多剤耐性化と病原性発現という2つの重要な現象に関係していることから、感染症を克服するための新薬のターゲットとしても期待される。今後は、多剤排出ポンプによる細菌機能制御に加え、多剤排出ポンプやその生理基質が宿主細胞に与える影響も含めて研究を進めていきたいと考えている。細菌と宿主の相互作用における多剤排出ポンプ機能をさらに明らかにすることで、感染現象を理解する上での新たな観点が生まれるものと考えている。また、本研究成果をもとに新たな多剤排出ポンプ阻害剤探索を行うことで、薬剤耐性化と病原性を軽減させることのできる、新しい感染症治療法の開発を目指していきたい。

謝辞

本研究は中山科学振興財団の国際交流助成（海外渡航助成）を得て行われた。研究にご協力頂いた Institut National de la Recherche Agronomique (INRA France)の Axel Cloeckert、Baucheron Sylvie の各氏、大阪大学産業科学研究所の山口明人、西野邦彦の各氏ほか、共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A: Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1794**: 834-843, 2009
2. Nishino K, Yamaguchi A: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **183**: 5803-5812, 2001
3. Nishino K: Bacterial multidrug exporters: Insights into acquisition of multidrug resistance. *Science* (online publication): [<http://www.sciencemag.org/feature/data/prizes/ge/2004/nishino.dtl>], 2005.
4. Nishino K, Latifi T, Groisman EA: Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*. **59**: 126-141, 2006
5. Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K: TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **65**: 1372-1376, 2010