

グラム陰性菌における薬剤排出システムの役割

西野 邦彦¹⁻³⁾・山口 明人^{1,2)}

¹⁾ 大阪大学産業科学研究所生体応答科学研究部門生体情報制御学研究分野*

²⁾ 大阪大学大学院薬学研究科細胞生物学分野

³⁾ 科学技術振興機構さきがけ

(平成 20 年 2 月 20 日受付・平成 20 年 5 月 16 日受理)

薬剤排出システムは細菌細胞内から抗菌薬等、細菌にとって異物となる物質を能動的に排出する。かつてより、薬剤排出システムは薬剤耐性細菌を生み出す因子として注目されてきた。ゲノム解析の結果、細菌には薬剤排出システムをコードしていると推定される遺伝子が数多く存在していることがわかってきた。細菌ゲノム情報を入手できるようになり、われわれは、細菌が保持している薬剤耐性遺伝子資源を解析することが可能になった。一方で、近年の研究から、薬剤排出システムは薬剤耐性だけではなく、細菌病原性発現に関与していることがわかってきた。これら一連のシステムは、薬剤だけではなく、病原性に関与する生理基質を認識して排出している可能性が考えられる。薬剤排出システムが薬剤耐性および病原性に関与する点から考えて、これを阻害することができれば薬剤耐性化を克服しながら、病原性を軽減させることのできる新しい感染症治療法開発に役立つものと期待される。

Key words: drug efflux system, multidrug resistance, virulence

細菌が抗菌薬などの化学療法剤に対して耐性となる機構は、①細菌細胞外への薬剤の能動的排出、②薬剤作用点の薬剤親和性の変化、③修飾酵素・分解酵素による薬剤の不活性化、④細菌細胞表層の変化による薬剤透過性の変化、等に分類できる。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。例えば、キノロン耐性は、作用標的である DNA ジャイレースの変異と排出システムの過剰発現によって起こることが知られている¹⁾。上記耐性機構のうち能動的排出は、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かかわる原因蛋白質が、薬剤排出システムである。薬剤排出システムは細菌の自然耐性と獲得耐性に大きな役割を果たしており、例えば、大腸菌や緑膿菌といったグラム陰性菌の薬剤排出システム遺伝子を欠損させた株は、種々の抗菌薬に感受性を示すようになる²⁻⁴⁾。このように、作用機序の異なる多種多様な物質を基質として排出する薬剤排出システムを多剤排出システムと呼ぶ。

薬剤排出システムは、抗菌薬を含め生体にとって異物となる分子を細胞内から細胞外へと排出する膜輸送体である。薬剤排出システムは、原核生物からヒトの細胞にいたるまで、生物界にわたって存在することが知られている。中でも多剤排出システムはまったく構造式の異なる種々の薬剤を排出する特徴を有しており、多剤耐性を克服するためにも、排出システムの機能を明らかにし、このシステムによって認識されないような薬剤を開発すること、あるいは阻害薬を開発すること

も多剤耐性化克服のための方法であると考えられる。

近年、数多くの細菌ゲノム配列が解読され、細菌が保有している薬剤耐性遺伝子資源の全容に迫ることが可能になった。解析の結果、細菌ゲノム上には薬剤排出システムが数多く存在することが推定された⁵⁾。また、最近の研究によりこれら薬剤排出システムは細菌の抗菌薬耐性のみならず病原性発現にも関与していることがわかってきた⁶⁾。著者らは、薬剤排出システムによる細菌機能制御機構を解明すること、また、新規創薬標的となる排出システムを同定し、感染症克服の特効薬開発につなげることを目的として研究に取り組んでいる。本稿では、抗菌薬耐性における薬剤排出システムの役割に加えて、排出システムが細菌病原性に関与する機構について最近得られた知見を含めて述べさせていただきたい。

I. 細菌ゲノムに潜む薬剤排出システム

ゲノム解析の結果、ほとんどの細菌の染色体上には薬剤排出システムをコードしていると推定される ORF (open reading frame) が複数存在するということがわかってきた (Fig. 1)。これら排出システムはその構造および共役するエネルギーの違いから大きく 5 つのファミリーに分類することができる (Fig. 2)²⁻⁴⁾。① ATP の加水分解をエネルギーとして異物を排出する「ABC (ATP binding cassette) 型」、② 内膜コンポーネント、外膜コンポーネント、およびそれらをつないでいるアダプター蛋白質からなる「RND (resistance nodulation cell-division)

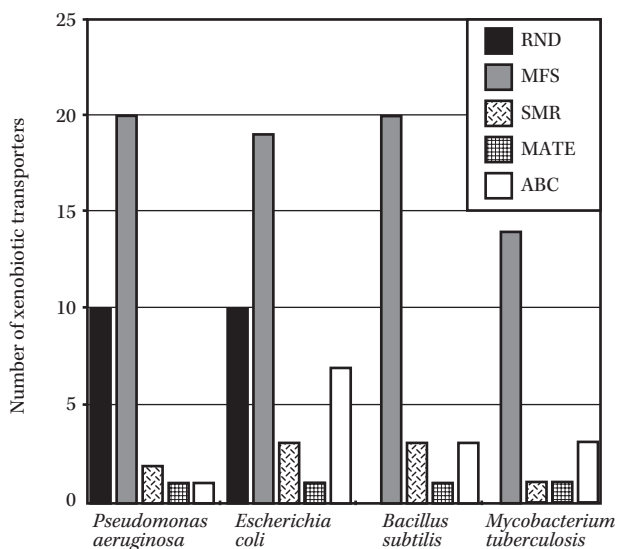


Fig. 1. Number of putative drug efflux genes identified by genomic analysis.

Putative drug efflux systems are classified into five types. The database is posted at [http://www.membranetransport.org/].

型], ③プロトン駆動型で最も主要なファミリーである「MF (major facilitator) 型」, ④4回膜貫通型構造である「SMR (small multidrug resistance) 型」, ⑤MF型とは相同性を有せず, ナトリウムもしくはプロトンを駆動力とする「MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 型」の5つである。このうち, RNDファミリーは, 細胞外膜をもつグラム陰性細菌に特有の薬剤排出システムである。種々の化学療法剤に高い耐性を示し院内感染の原因菌として临床上問題視されている緑膿菌にも, RND型排出システムが存在し, 多剤耐性に関与していることが報告されている⁷⁾。大腸菌で構成的に発現しているRND排出システムAcrAB-TolCによって認識される基質の一部をFig. 3に示す^{8,9)}。AcrAB-TolCシステムは, 抗菌薬, 消毒剤, 色素, その他毒物等の幅広い化合物を認識する。これら細菌にとって異物となる物質を排出することで, 細菌は自らを防御している。

II. 大腸菌薬剤排出システムによる耐性化

大腸菌ゲノムには約4,300個のORFが存在しているが¹⁰⁾, そのうち約270個(約6%)が膜輸送体遺伝子であり, このなかで約14%にあたる37個が薬剤排出システム遺伝子であると推定された(Fig. 1)^{8,11)}。潜在的な薬剤耐性遺伝子を含めてスクリーニングすることができれば, 新薬開発の段階で将来出現する耐性菌を予測しておくことも可能になるのではないだろうか。このような考えに基づき, 大腸菌をモデルとして, 推定薬剤排出システム遺伝子すべてをクローニングし, それらが薬剤耐性に関与しているかどうかを調べた結果, 37個中, 実に20個が薬剤耐性に関与していることが明らかになった^{8,11)}。

各薬剤排出システム強制発現株に対する薬剤MIC値をTable 1に示す。これだけ多くの未知耐性因子が一度に見つかるといえるのは, ゲノムに基づく検索の威力を示しているといえる(Fig. 4)¹¹⁾。同定した薬剤排出システムのうち, 半数は抗菌薬の耐性のみならず, 胆汁酸構成成分であるデオキシコール酸の耐性に関与していた。このことから, 薬剤排出システムは薬剤耐性のみならず, 生育環境における細菌防御という生理機能を持ち合わせていることもわかってきた。また, タイプ別に見ると, 最も高度な耐性に関与していたのはRNDタイプの排出システムであり, 同定したもののすべてが β -ラクタム系抗菌薬耐性をはじめ, 多剤耐性を与えた^{8,12)}。また, グラム陰性菌で世界初の報告となるABC型薬剤排出システム*macAB*(マクロライド耐性に関与)を発見した¹³⁾。これら同定した排出システムは製薬会社が開発中の新規抗菌薬をも認識し, 細菌に耐性化をもたらすことがわかった。ゲノム情報を用いることで, 開発の段階で将来の耐性菌を予想しながら新薬をスクリーニングすることが可能であると考えられる¹¹⁾。

III. 情報伝達による薬剤排出システム発現制御

細菌ゲノムにコードされている薬剤排出システムのほとんどが通常培養条件下では発現していない。しかし, 何らかの要因で発現誘導されると, 細菌は薬剤耐性化する可能性がある。よって, 排出システム発現制御ネットワークの解析が重要であると考えられる。細菌には環境を感知し応答するためのシステムとして, 二成分情報伝達系が存在している。二成分情報伝達系は環境感知センサー(ヒスチジンキナーゼ)と細胞内制御因子(レスポンスレギュレーター)から構成される¹⁴⁾。センサーはそれぞれに特異的な環境シグナルを感知すると, 自己リン酸化反応により分子内の特定のヒスチジン残基をリン酸化する。次いで, このリン酸基はレスポンスレギュレーターの特異的なアスパラギン酸に転移される。レギュレーターはさまざまな生体反応にかかわる活性をもつが, 一般的にはDNA結合ドメインを保持する転写制御因子であることが多い。リン酸転移を受けたレギュレーターは活性化され, それぞれ目的の遺伝子発現を促進もしくは抑制する^{15,16)}。二成分情報伝達系は細菌がさらされるさまざまな環境因子(栄養やストレス)に対するセンシングと情報伝達を担っており, 細菌が環境に適応するために欠かせないシステムである。

大腸菌の染色体上には, ゲノム解析をもとに約30種類の二成分情報伝達系が存在していると推定されている¹⁷⁾。二成分情報伝達系による薬剤耐性機構が存在しているのかどうかを検証するために, すべてのレギュレーターのおのおのを大腸菌で発現させ, 薬剤感受性に与える影響を調べた。その結果, 15個のレギュレーターが, 大腸菌の薬剤耐性化に関与していることを見出した。マイクロアレイや定量的リアルタイムPCR解析により,

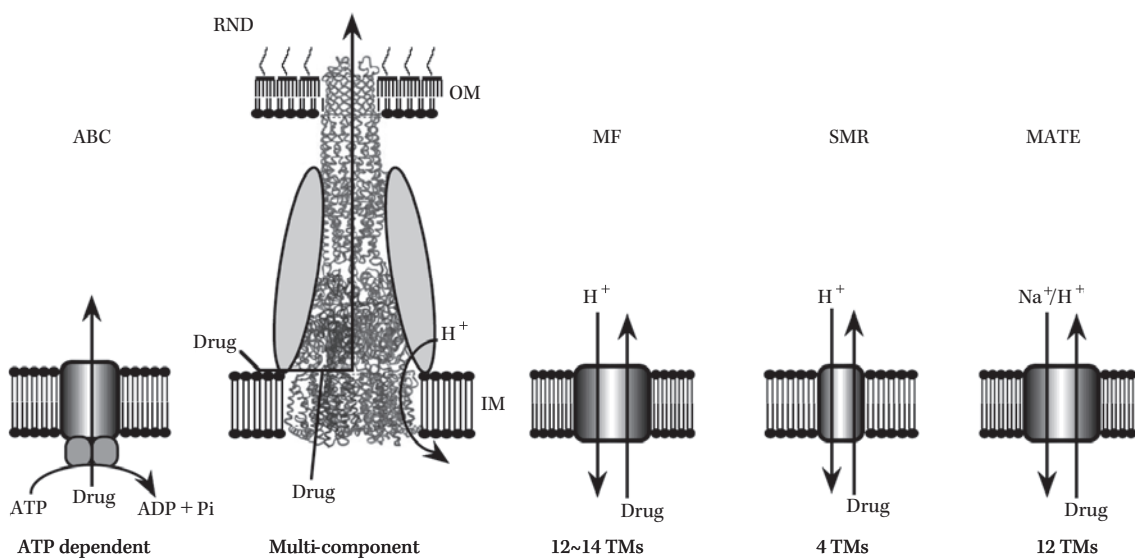


Fig. 2. Classification of drug efflux systems.

Drug efflux systems can be classified into five categories based on their structure and coupling energies.

ABC: ATP binding cassette, RND: resistance nodulation cell-division, MF: major facilitator, SMR: small multidrug resistance, MATE: multidrug and toxic compound extrusion

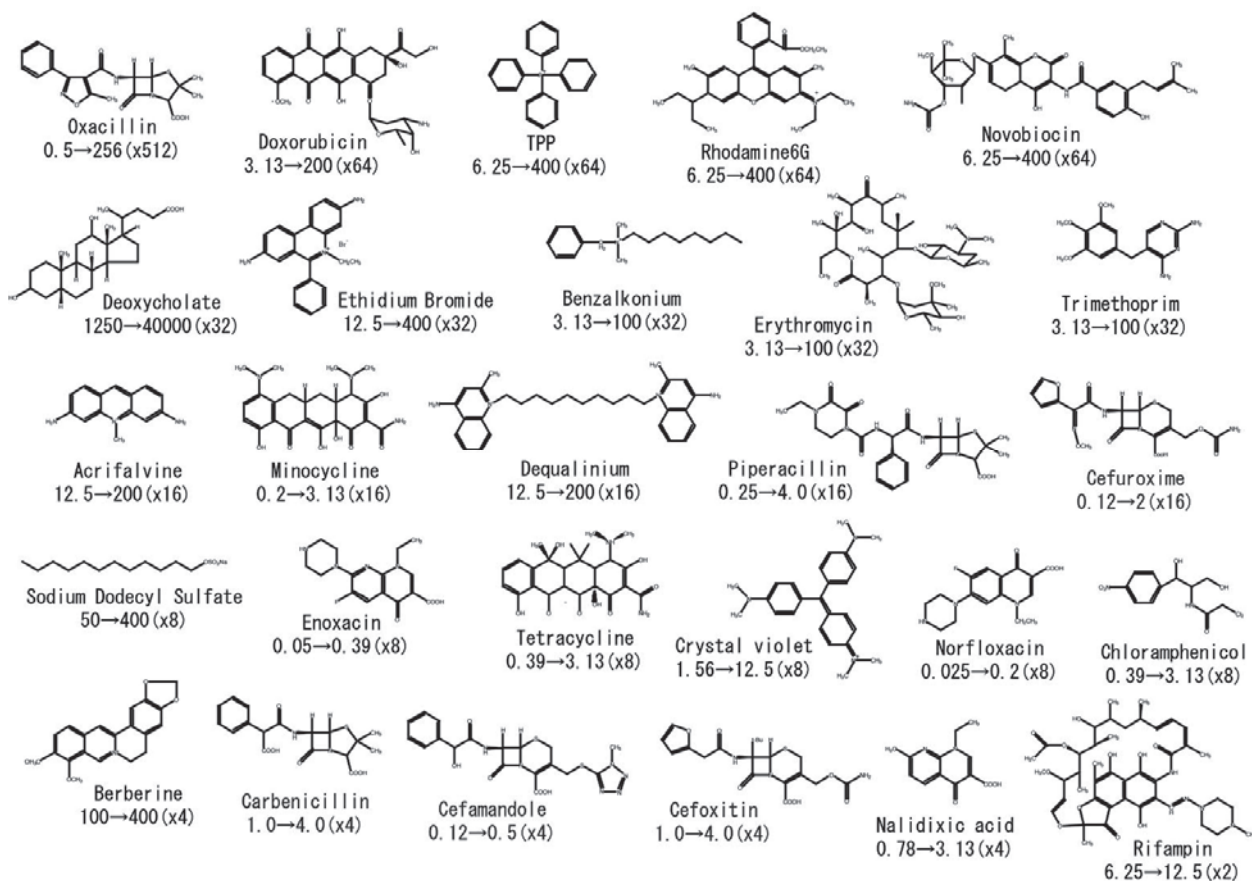


Fig. 3. Substrates of the AcrAB-TolC drug efflux system in *E. coli*.

AcrAB-TolC system enhances multidrug resistance of *E. coli*. The structures of compounds recognized by this system are shown in Figure. Number showed the changes MIC levels and their increased ratio when AcrAB-TolC is over-produced in the *acrB* mutant.

Table 1. Drug resistance profiles of efflux systems in *E. coli*

Type	Efflux System	MIC for <i>acrB</i> mutant-overproducing efflux systems ($\mu\text{g}/\text{mL}$)																																	
		CP	TC	MINO	EM	NA	NFLX	ENX	KM	FOM	DXR	NOV	TMP	ACR	BENZ	DOC	MPIPC	MCIPC	NFPC	CBPC	SBPC	CXM	CMD	CAM	OL	AZM	FO	BI	CTP						
- (Δ <i>acrB</i>)		0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	1,250	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	1.56	50	1.56	0.39	25	20						
ABC	MacAB	0.39	0.39	0.20	25	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	1,250	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	12.5	400	12.5	ND	ND	ND	ND						
MF	Fsr	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.5	ND	ND						
	MdFA	6.25	0.78	0.20	3.13	0.78	0.20	0.05	6.25	1.56	12.5	3.13	100	3.13	1,250	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND						
	MdtG	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	6.25	3.13	3.13	12.5	3.13	2,500	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	MdtH	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.05	0.10	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	Bcr	0.39	3.13	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	25	6.25	3.13	3.13	25	3.13	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	400	ND	ND					
	EmrKY	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	10,000	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	EmrAB	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	40,000	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
	EmrD	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	6.25	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
	MdtL	0.78	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	12.5	3.13	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
	MdtM	0.78	0.39	0.20	3.13	0.78	0.05	0.05	6.25	1.56	3.13	3.13	50	3.13	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
RND	AcrAB	3.13	3.13	3.13	100	3.13	0.10	0.39	6.25	1.56	> 200	100	> 400	100	> 40,000	> 100	100	100	200	1.56	1.56	1.56	0.39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	MdtABC	0.39	0.39	0.20	3.13	1.56	0.05	0.05	6.25	3.13	3.13	25	3.13	6.25	40,000	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	AcrD	0.39	0.78	0.20	3.13	1.56	0.05	0.05	12.5	3.13	3.13	6.25	3.13	3.13	> 40,000	12.5	12.5	12.5	50	25	50	0.39	0.20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	AcrEF	6.25	3.13	3.13	200	3.13	0.10	0.39	6.25	1.56	> 200	50	100	400	> 40,000	50	100	200	200	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	MdtEF	0.39	0.39	0.20	25	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	25	1.56	3.13	12.5	5,000	12.5	12.5	25	25	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
SMR	EmrE	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	1.56	3.13	200	6.25	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	MdtIJ	0.39	0.39	0.20	3.13	1.56	0.025	0.05	6.25	3.13	3.13	1.56	3.13	12.5	5,000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	SugE	0.39	0.39	0.20	3.13	0.78	0.025	0.05	6.25	1.56	3.13	1.56	3.13	12.5	1,250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MATE	MdtK	0.78	0.39	0.20	3.13	0.78	0.20	0.39	6.25	3.13	25	1.56	12.5	3.13	40,000	0.39	0.78	1.56	1.56	1.56	0.20	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Abbreviations: CP, chloramphenicol; TC, tetracycline; MINO, minocycline; EM, erythromycin; NA, nalidixic acid; NFLX, norfloxacin; ENX, enoxacin; KM, kanamycin; FOM, fosfomicin; DXR, doxorubicin; NOV, novobiocin; TMP, trimethoprim; ACR, acriflavine; BENZ, benzalkonium; DOC, deoxycholate; MPIPC, oxacillin; MCIPC, cloxacillin; NFPC, nafcillin; CBPC, carbenicillin; SBPC, subpenicillin; CXM, cefuroxime; CMD, cefamandole; CAM, clarithromycin; OL, oleandomycin; AZM, azithromycin; FO, fosmidomycin; BI, bicyclomycin; CTP, cetylpyridinium.

ND, not determined.

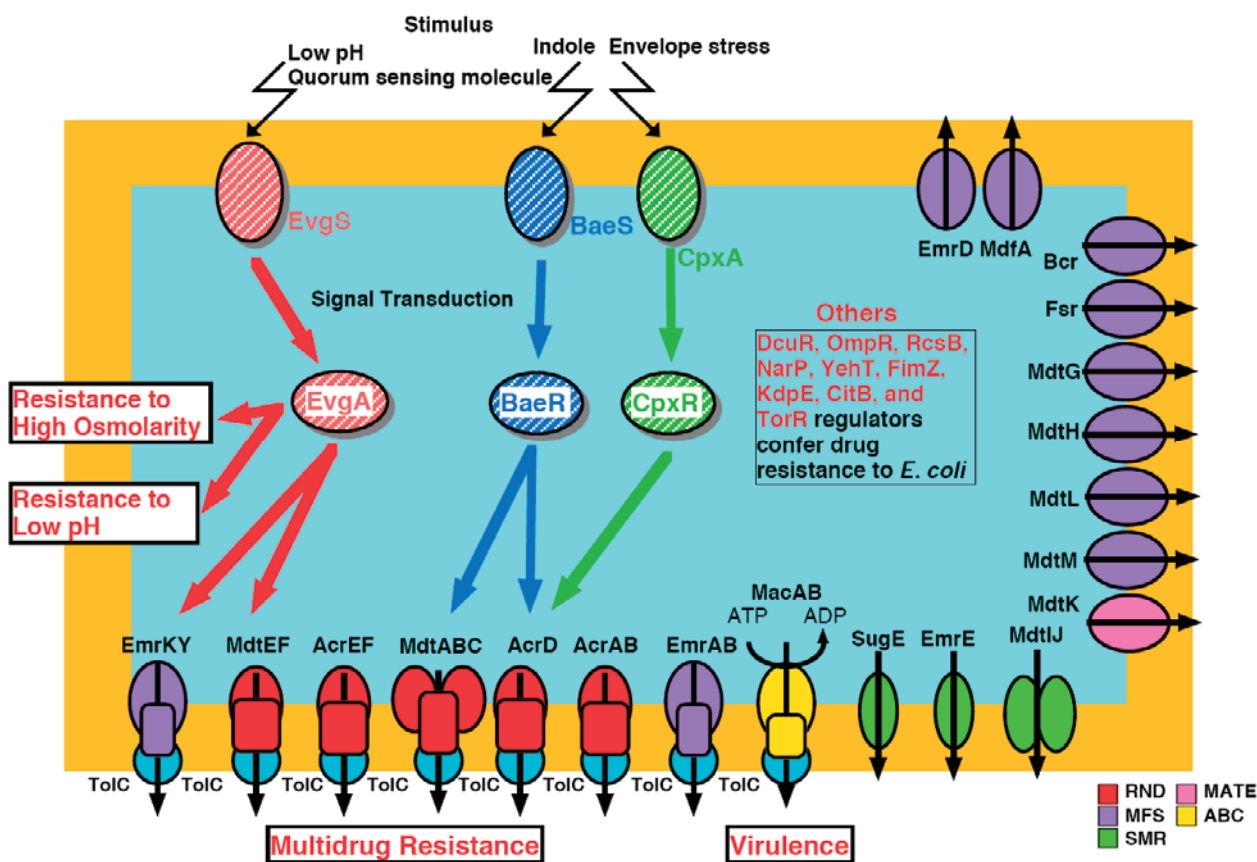


Fig. 4. Identified drug efflux systems and regulation by signal transduction systems.

We identified 20 drug efflux systems of *E. coli* by using genomic information. We also discovered a novel resistance mechanism, the two-component signal transduction system, which regulates these efflux systems.

EvgSA, BaeSR, CpxAR といった 3 個の二成分情報伝達系が薬剤排出システムの発現を誘導し、多剤耐性を引き起こすことを明らかにした (Fig. 4)¹¹⁾。二成分情報伝達系による薬剤排出システム制御は、新しい耐性制御メカニズムである。EvgSA 情報伝達系は MdtEF システムの発現を誘導し、多剤耐性をもたらす¹⁸⁻²⁰⁾。増殖定常期において MdtEF 排出システムの発現は誘導され、排出システム発現制御と quorum sensing との間には密接な関係があると考えられる。BaeSR 情報伝達系は細菌代謝産物であるインドールによって活性化され、排出システム発現を誘導し、細菌を多剤耐性化させる^{21,22)}。CpxAR システムは膜ストレスに応答する二成分情報伝達系であり、 β -ラクタム系抗菌薬耐性をはじめ、多剤耐性を引き起こす。二成分情報伝達系は、緑膿菌、サルモネラ菌など数多くの耐性細菌にも存在し、二成分情報伝達系による多剤耐性化機構は普遍的に存在していると考えられる。

以上の結果、薬剤排出システムの発現が二成分情報伝達系という環境応答による生体防御機構により調節されていることが明らかとなった。これら排出システム発現は、薬剤によって誘導されるのではなく、細菌代謝産物やストレスといった環境要因によってコントロールされ

ることがわかってきた^{20,22,23)}。これらの結果から考えると、排出システムは薬剤排出のためだけに存在しているのではなく、細菌において何らかの重要な生理的役割を担っているのではないかと考えられる。次に、最近わかってきた排出システムの新たな役割について述べる。

IV. 病原性発現における薬剤排出システムの生理的役割

これまで、薬剤排出システムは薬剤耐性に関与する因子として注目されてきた。しかし、近年これら排出システムは生理的物質を排出することで何らかの細菌機能に関与しているのではないかとということが議論されており²⁴⁾、実験的にも排出システムは薬剤耐性だけではなく細菌病原性発現に関与していることがわかってきた⁶⁾。現在、著者らは、薬剤排出システムがどのような生理基質を輸送することで、細菌病原性発現に関与しているのかを明らかにしたいと考えて研究を進めている。

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る。*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ネズミチフス菌) はネズミなど齧歯動物に感染し、ヒトのチフス症に酷似した全身感染症を引き起こす。ヒトには急性腸炎を

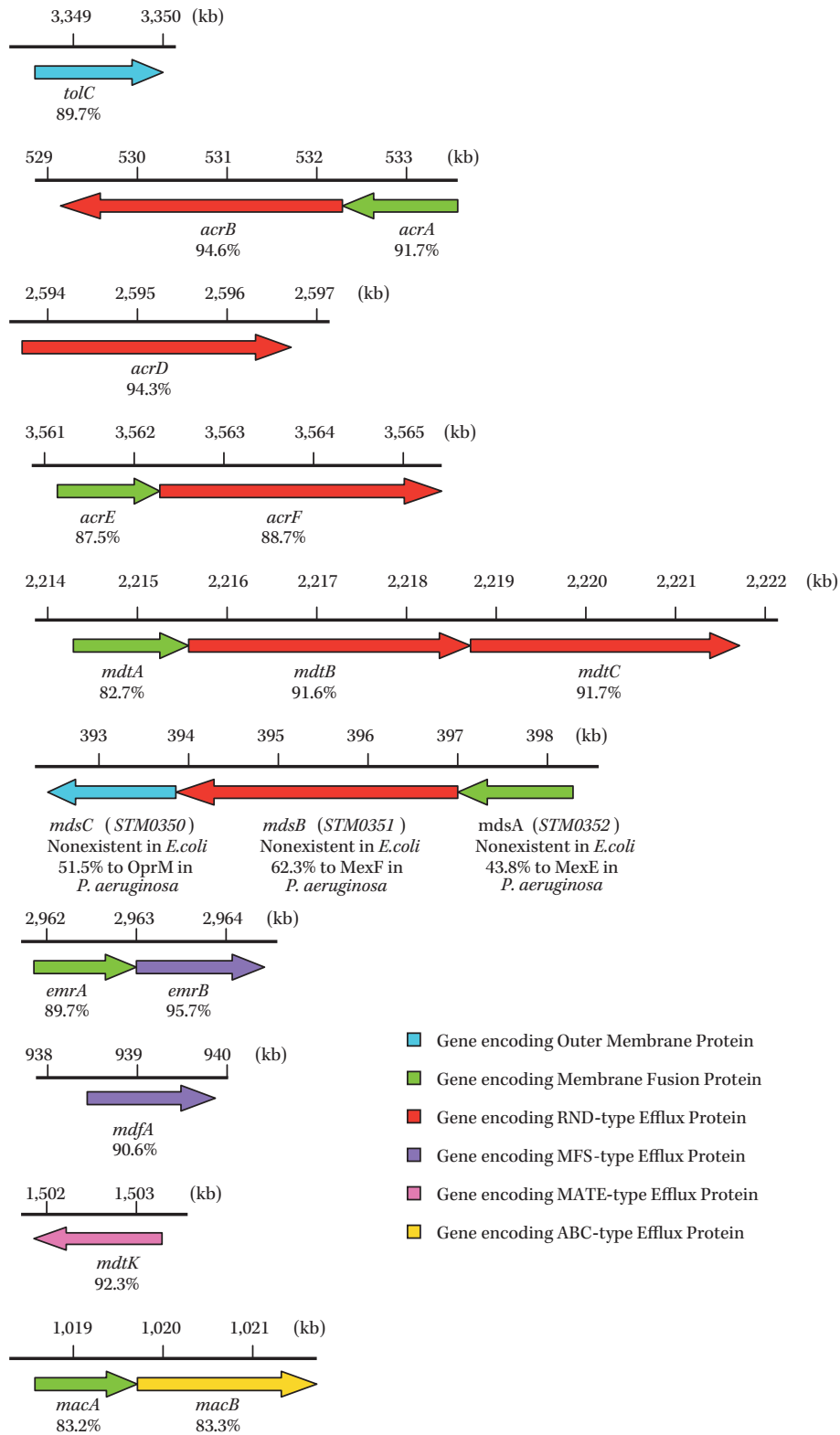


Fig. 5. Drug efflux genes encoded in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. Chromosomal positions of genes coding for putative drug efflux systems, outer membrane proteins, and membrane fusion proteins are indicated by the kb (kilobase pair) in the *S. enterica* serovar Typhimurium strain LT2 genome. Arrows correspond to the lengths and directions of the genes. Amino acid identity between homologous proteins in *S. enterica* and *E. coli* are indicated as numbers under the gene names.

Table 2. Drug resistance profiles of drug efflux systems in *Salmonella*

Efflux System	MIC for the $\Delta acrB$ mutant-overproducing efflux systems ($\mu\text{g/mL}$)																
	EM	NOV	TC	CP	NA	NFLX	DXR	ACR	CV	EBR	MB	R6G	TPP	BENZ	SDS	DOC	
- ($\Delta acrB$)	4	2	1	0.5	1	0.016	8	32	2	64	16	8	32	4	128	20,000	
AcrAB	128	256	4	4	4	0.13	> 128	> 512	128	> 512	> 512	> 512	512	64	> 512	> 40,000	
AcrD	4	64	1	0.5	1	0.016	8	32	2	64	16	8	32	4	> 512	40,000	
AcrEF	128	128	4	4	4	0.13	> 128	512	32	> 512	> 512	> 512	512	64	> 512	40,000	
MdtABC	4	16	1	0.5	1	0.016	8	32	2	64	16	8	32	4	512	40,000	
MdsABC	4	8	1	0.5	1	0.016	8	128	16	128	256	64	64	8	256	20,000	
EmrAB	4	16	1	0.5	8	0.016	8	32	2	64	16	16	32	4	128	> 40,000	
MdfA	4	2	4	8	1	0.13	32	32	2	64	16	8	32	4	128	20,000	
MdtK	4	2	1	0.5	1	0.13	64	256	2	64	16	8	32	4	128	20,000	
MacAB	8	2	1	0.5	1	0.016	8	32	2	64	16	8	32	4	128	20,000	

Abbreviations: EM, erythromycin; NOV, novobiocin; TC, tetracycline; CP, chloramphenicol; NA, nalidixic acid; NFLX, norfloxacin; DXR, doxorubicin; ACR, acriflavine; CV, crystal violet; EBR, ethidium bromide; MB, methylene blue; R6G, rhodamine 6G; TPP, tetraphenylphosphonium bromide; BENZ, benzalkonium chloride; SDS, sodium dodecyl sulfate; DOC, sodium deoxycholate.

Table 3. Susceptibility of *Salmonella* drug transporter-deleted strains to toxic compounds

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)																
	EM	NOV	TC	NA	NFLX	DXR	ACR	CV	EBR	MB	R6G	TPP	BENZ	SDS	DOC		
Wild-type	128	256	4	4	0.25	> 128	> 512	256	> 512	> 512	> 512	> 512	64	> 512	> 40,000		
$\Delta acrAB$ $\Delta acrEF$ $\Delta acrD$ $\Delta mdtABC$ $\Delta mdsABC$ $\Delta emrAB$ $\Delta mdfA$ $\Delta mdtK$ $\Delta macAB$	4	0.5	1	0.5	0.016	4	32	2	32	16	8	32	4	32	313		

Abbreviations: EM, erythromycin; NOV, novobiocin; TC, tetracycline; NA, nalidixic acid; NFLX, norfloxacin; DXR, doxorubicin; ACR, acriflavine; CV, crystal violet; EBR, ethidium bromide; MB, methylene blue; R6G, rhodamine 6G; TPP, tetraphenylphosphonium bromide; BENZ, benzalkonium chloride; SDS, sodium dodecyl sulfate; DOC, sodium deoxycholate.

MIC determinations were repeated at least three times.

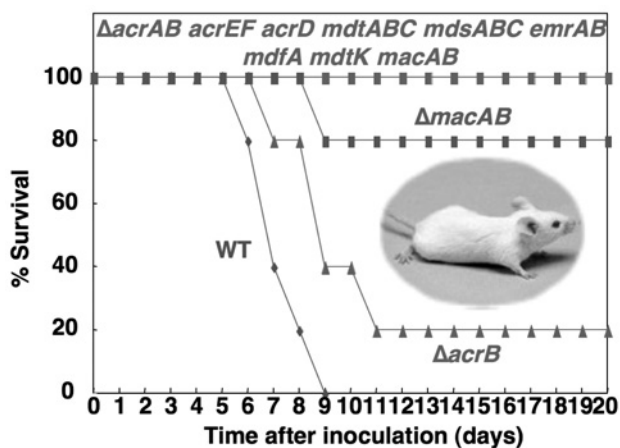


Fig. 6. Role of drug efflux systems in *Salmonella* virulence. This figure shows the survival rate of mice infected with *Salmonella* strains. BALB/c mice were inoculated orally with 10^5 colony forming unit of different *Salmonella* strains as indicated.

起こし、食中毒の原因となっている。このサルモネラには少なくとも薬剤排出システムが9個存在している (Fig. 5)⁶⁾。このうち、8個は大腸菌にも保存されている排出システムである。残り1個はサルモネラに特異的に存

在するシステムであり、著者らはこれを *mdsABC* (*mds* for *multidrug* transporter for *Salmonella*) と名付けた⁶⁾。これら合計9個のシステムは、過剰発現することによりサルモネラに多剤耐性能を与える (Table 2)。逆に、9個の排出システムを欠損させた株は種々の薬剤に感受性を示す (Table 3)。また、排出システム欠損株を用いた感染実験から、薬剤排出システムはサルモネラ病原性に関与することがわかってきた。サルモネラ野生株をマウスに経口投与すると、マウスは約6~9日で死にいたる (Fig. 6)。一方で、9個の薬剤排出システムを欠損させたサルモネラでは、マウス致死能が完全に消失している。最も病原性に関与しているものはABC型排出システムのMacABシステムであった (Fig. 6)⁶⁾。MacABはこれまで、マクロライド系抗菌薬を特異的に認識する排出システムであると考えられていたが、この結果から、細菌病原性や毒性にかかわる何らかの生理的基質を輸送していることが考えられる。また、*macAB* はサルモネラ病原性を調節するPhoPQ二成分情報伝達系によって厳密に制御され、その発現がマクロファージ内で調節されていることが明らかとなった⁶⁾。

サルモネラの薬剤排出システムであるAcrDとMdtABCは、 β -ラクタム系抗菌薬をはじめとする抗菌

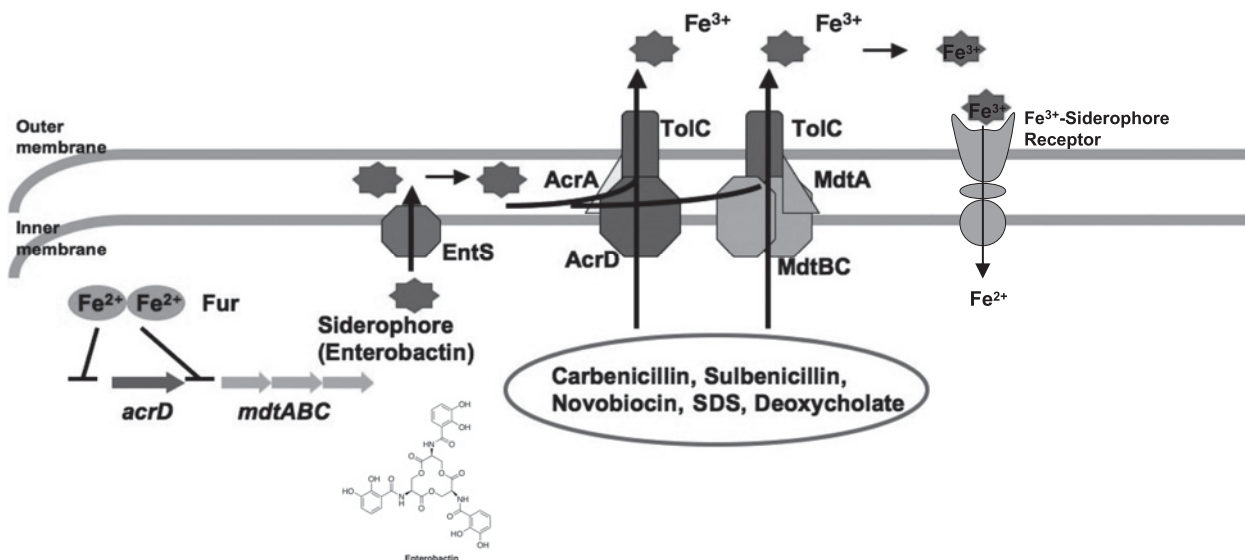


Fig. 7. Transport of drugs and iron-chelator by drug efflux systems.

The expression *acrD* and *mdtABC* drug efflux genes are regulated by Fur. Fur controls iron homeostasis in most Gram-negative bacteria. We found that these efflux systems transport not only drugs but also the siderophore enterobactin.

薬を排出し、細菌を多剤耐性化させる。一方で、この2つの排出システム欠損株はマウスに対する病原性が減弱していることがわかった。AcrDとMdtABCは通常ほとんど発現していないが、鉄欠乏条件下において誘導される。この2つの排出システムは、Furという鉄代謝にかかわる調節因子によって制御されている。また、鉄欠乏条件下において、これら排出システムが菌の生育に必要であることがわかった。鉄は病原性細菌にとって必須の微量金属であり、細菌は効率的な鉄取り込み様式をもっている。細菌はシデロフォアと呼ばれる Fe^{3+} と特異的に結合する分子(キレーター)を分泌し、シデロフォア- Fe^{3+} 複合体を取り込むことにより鉄を吸収する。解析の結果、AcrDおよびMdtABCはシデロフォアであるエンテロバクチンを排出し、菌の鉄獲得に関与していることを発見した(Fig. 7)。病原性細菌は、宿主体内に多く存在するヘムタンパク質やトランスフェリン、ラクトフェリンなどの鉄輸送タンパク質から鉄を吸収する系など、生存のために多彩な方法で宿主から鉄を取り込む。病原細菌にとって鉄は病原性を成立させるために必須の元素であり、細菌が宿主から鉄を奪うのに対して、宿主側は細菌の鉄吸収を抑制することにより、その増殖を阻害する感染防御機構を保持している。薬剤排出システムによるシデロフォア排出は、宿主内において細菌が鉄を獲得するために必要であり、この機構が病原性成立に関与していることが強く示唆される。

今後は、さらに、病原性発現に関与する他の排出システム生理基質を決定し、排出システムが本来もっている生理機能を明らかにしていきたいと考えている。排出システムが細菌病原性に関与するメカニズムとしては、①

毒素をはじめとする病原性成立に必要な因子(分泌蛋白質など)を排出している可能性、②宿主が産生する抗菌性物質(胆汁酸や抗菌ペプチドなど)を排出することにより、細菌を宿主環境から保護している可能性、③宿主内での細菌機能調節もしくは恒常性維持に関与している分子(情報伝達物質など)を排出している可能性、などが考えられる。これからは、どのような生理的基質が輸送され、細菌病原性が制御されているのかを明らかにすることが重要な課題である。

V. おわりに

ポストゲノム研究の結果、細菌は驚くほど多くの薬剤排出システム遺伝子を保持していることが明らかとなった。同定された薬剤排出システムの多くは、通常培養条件下ではほとんど発現していないと考えられる。このような排出システムは制御系因子の変異により、発現してくる可能性がある。中でも、多剤排出システムは幅広い基質を認識するので、さまざまな化合物によって排出システムの過剰発現株は分離されるであろう。その化合物のなかには、臨床の場で使用される抗菌薬だけではなく、家庭内、農場、食品加工工場などで用いられる化合物も含まれる。例えば、石鹼や液体洗剤によく配合される抗菌成分トリクロサンは薬剤排出システムによって認識されることがわかっている。これら抗菌成分の乱用は、排出システム過剰発現変異株の出現、増加を招くことになりかねない。

薬剤排出システム発現が細菌の主要な環境感知・応答システムである二成分情報伝達系によって制御されているという新しい薬剤耐性機構を著者らは発見した。このことは、薬剤排出システム発現が何らかの刺激により一

過的に誘導されるということを示している。実際に、排出システム発現は、低 pH、浸透圧変化といったさまざまなストレス環境下において誘導される。状況に応じて薬剤排出システムを発現させるという機構は重要なメッセージを含んでいる。すなわち、一見、発現していないと思われる排出システムであっても、細菌の生育環境下や感染部位において、発現誘導が起こっている可能性がある。薬剤排出システムが薬剤耐性のみならず、細菌病原性に関与していることを考えると、感染部位における発現誘導は合目的である。これからは、このような可能性を含めて細菌がもつ排出システム発現制御ネットワークを理解していく必要がある。また、病原性発現における排出システムの役割を明らかにするために、輸送されている生理的基質を決定することが重要な課題である。

現在、著者らを含めたいくつかの研究グループおよび製薬会社によって排出システムの阻害薬探索が行われている。また、著者らは排出システム阻害薬を短時間にハイスループットで検索するためのナノデバイス開発にも取り組んでいる。ナノテクノロジーを用いて作成したフェムトリッターチャンパー中に、細菌 1 細胞を閉じこめて薬剤排出活性を測定することにも成功した。この方法を、排出システム阻害候補化合物スクリーニングにも応用したいと考えている。薬剤排出システムが抗菌薬耐性および病原性発現に関与する点から考えて、排出システムは新規薬剤の魅力的なターゲットである。今後は、排出システム阻害薬が細菌病原性を抑制する効果があるかどうかといったことも検証したい。良い阻害薬が見つければ、細菌の多剤耐性を克服しながら、病原性を軽減させることのできるまったく新しい治療薬開発に役立つものと期待できる。

謝 辞

研究遂行にあたり、ご協力いただきました共同研究者の皆様には厚く御礼申し上げます。本総説内容の一部は第 55 回日本化学療法学会総会にて口頭発表したものです。投稿を推薦していただいた座長の石井良和先生に感謝いたします。また、日本化学療法学会西日本支部長賞を賜りましたことを心より感謝申し上げます。本研究は、保健医療分野における基礎研究推進事業によりサポートされています。

文 献

- Jacoby G A: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl 2): S120-6
- Alekshun M N, Levy S B: Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007; 128: 1037-50
- Nishino K, Yamaguchi A: Role of xenobiotic transporters in bacterial drug resistance and virulence. *IUBMB Life* 2008; doi:10.1002/iub.90
- Putman M, van Veen H W, Konings W N: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672-93
- 西野邦彦: 薬剤排出蛋白質遺伝子資源の解析に関する研究。日本細菌学雑誌 2003; 58: 581-94
- Nishino K, Latifi T, Groisman E A: Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2006; 59: 126-41
- Poole K: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 20-51
- Nishino K, Yamaguchi A: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; 183: 5803-12
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A: Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 2006; 443: 173-9
- Blattner F R, Plunkett G 3rd, Bloch C A, Perna N T, Burland V, Riley M, et al: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997; 277: 1453-74
- Nishino K: Bacterial multidrug exporters: Insights into acquisition of multidrug resistance. *Science* (online publication) 2005; [http://www.sciencemag.org/feature/data/prizes/ge/2004/nishino.dtl]
- Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, Hirata T, Yamaguchi A: Roles of TolC-dependent type multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3030-3
- Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A: Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; 183: 5639-44
- Hoch J A: Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 165-70
- Nishino K, Hsu F F, Turk J, Cromie M J, Wösten M M, Groisman E A: Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe (III) and Al (III). *Mol Microbiol* 2006; 61: 645-54
- Zwir I, Shin D, Kato A, Nishino K, Latifi T, Solomon F, et al: Dissecting the PhoP regulatory network of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2862-7
- Mizuno T: Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* 1997; 4: 161-8
- Nishino K, Yamaguchi A: Overexpression of the response regulator *evgA* of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters. *J Bacteriol* 2001; 183: 1455-8
- Nishino K, Yamaguchi A: EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002; 184: 2319-23
- Nishino K, Inazumi Y, Yamaguchi A: Global analysis of genes regulated by EvgA of the two-component regulatory system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003; 185: 2667-72

- 21) Nagakubo S, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A: The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J Bacteriol* 2002; 184: 4161-7
- 22) Nishino K, Honda T, Yamaguchi A: Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol* 2005; 187: 1763-72
- 23) Nishino K, Yamaguchi A: Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186: 1423-9
- 24) Piddock L J: Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 629-36

Physiological functions of drug efflux systems in Gram-negative bacteria: Their roles in bacterial drug resistance and virulence

Kunihiko Nishino¹⁻³⁾ and Akihito Yamaguchi^{1,2)}

¹⁾ Department of Cell Membrane Biology, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka, Japan

²⁾ Department of Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

³⁾ PRESTO, Japan Science and Technology Agency

Drug efflux systems produce multidrug resistance by exporting antibiotics from the cells. It is well established that drug efflux systems encoded by bacteria can confer clinically relevant resistance to antibiotics. Genomic analysis has resulted in the identification of many genes proposed to code for drug efflux systems. Bacterial genome sequences have allowed us to identify the drug-resistance gene libraries of bacteria. On the other hand, recent discoveries support the notion that at least some drug efflux systems have specific physiological substrates, because these efflux systems have been shown to have roles in bacterial virulence. Because drug efflux systems have roles in bacterial multidrug resistance and virulence, we propose that these systems have greater clinical relevance than is usually attributed to them.