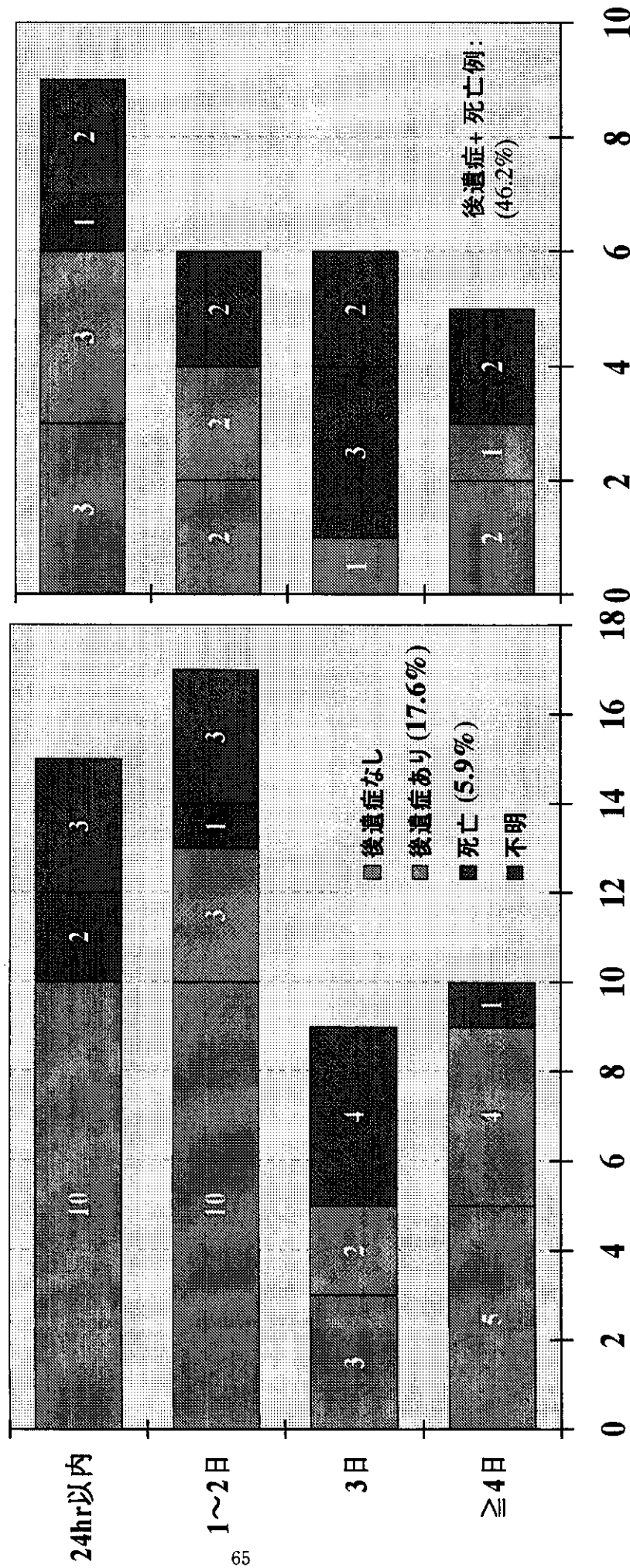


図3. 肺炎球菌性髄膜炎例：症状出現後の日数と予後との関係

小児:n = 51

成人:n = 26



症例数

図4. インフルエンザ菌性髄膜炎の年齢別耐性化状況 (n=360)

ほとんどすべてがtype b型 (小児3例,成人2例がNT)

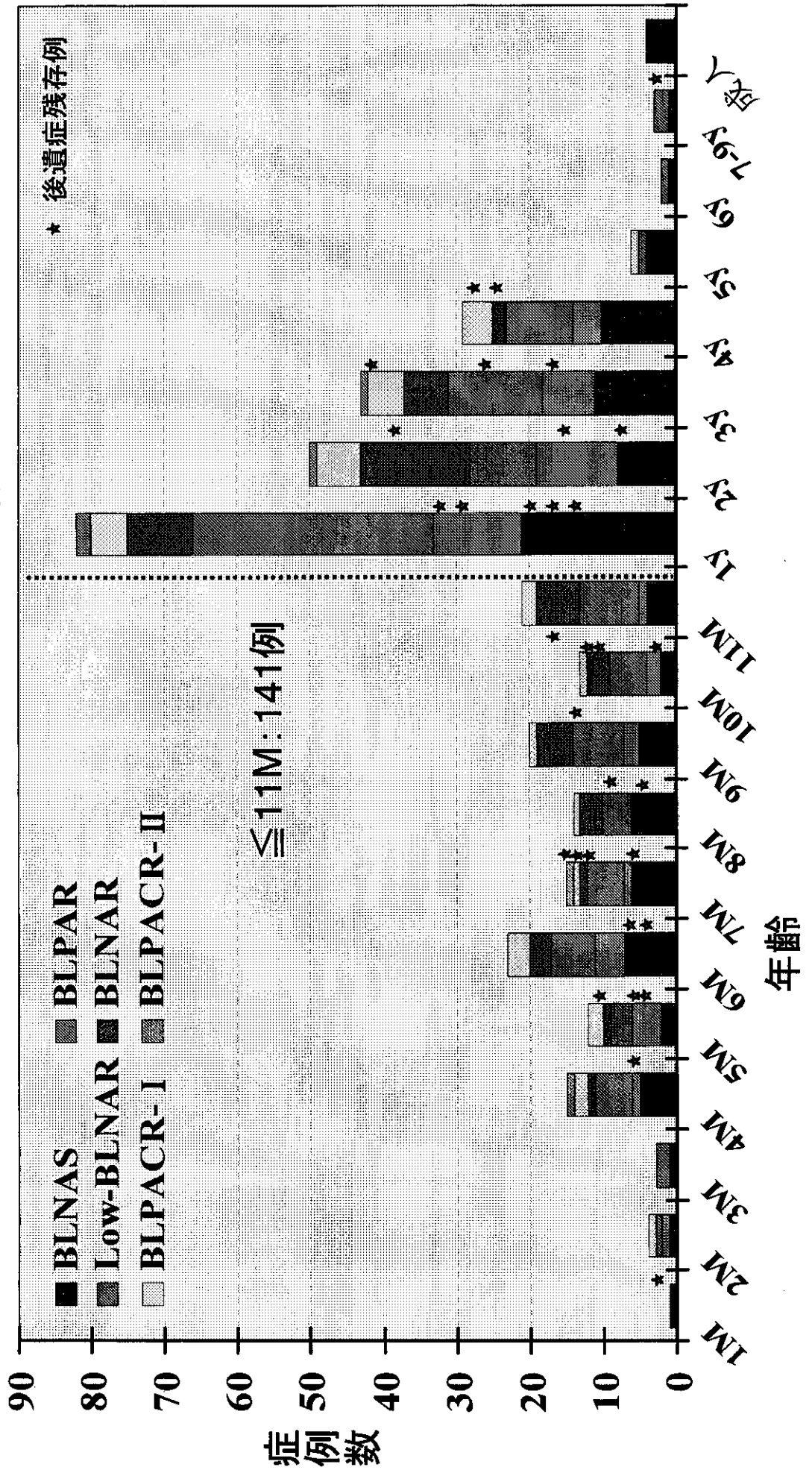


図5. 髄膜炎由来インフルエンザ菌の年次の耐性化動向

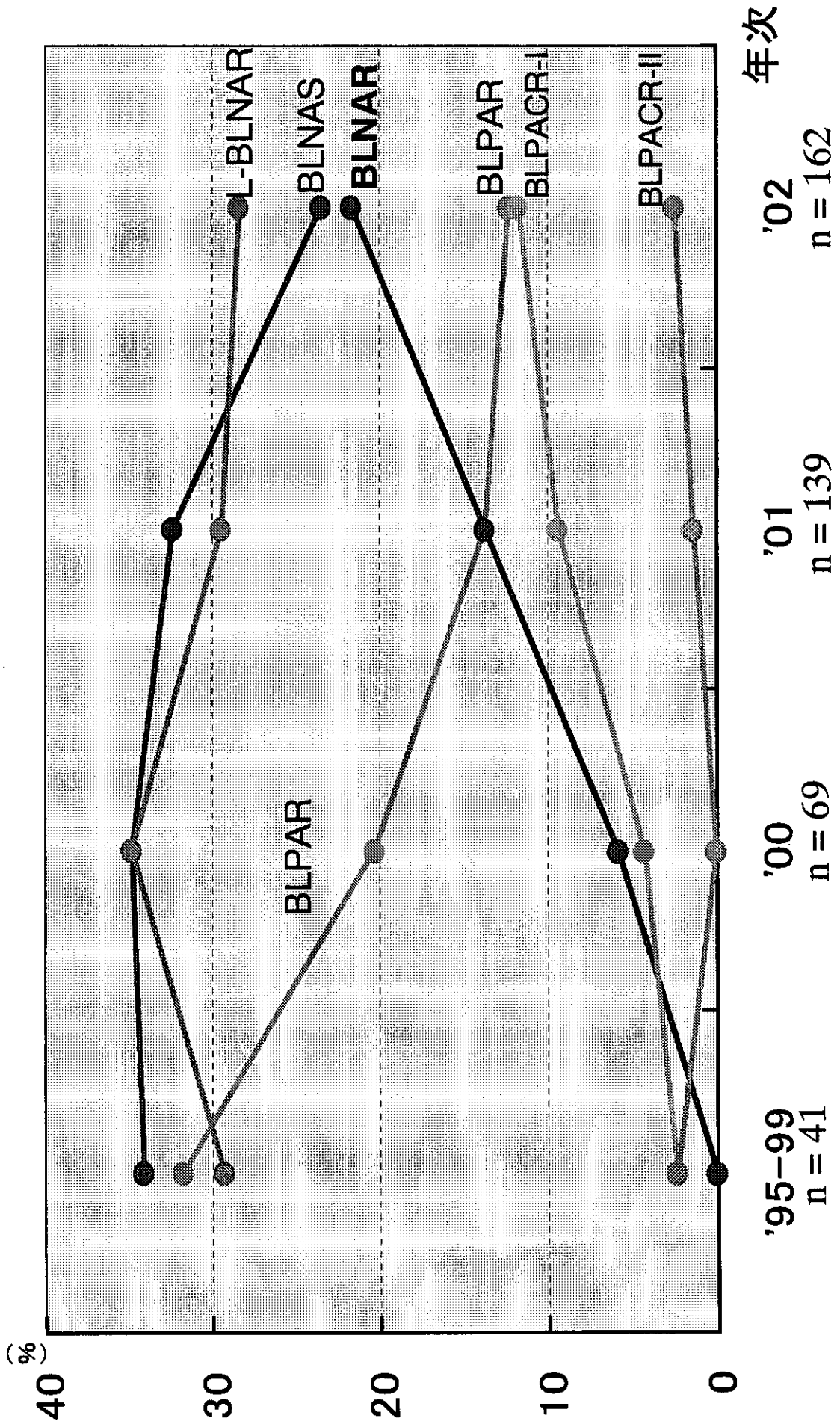
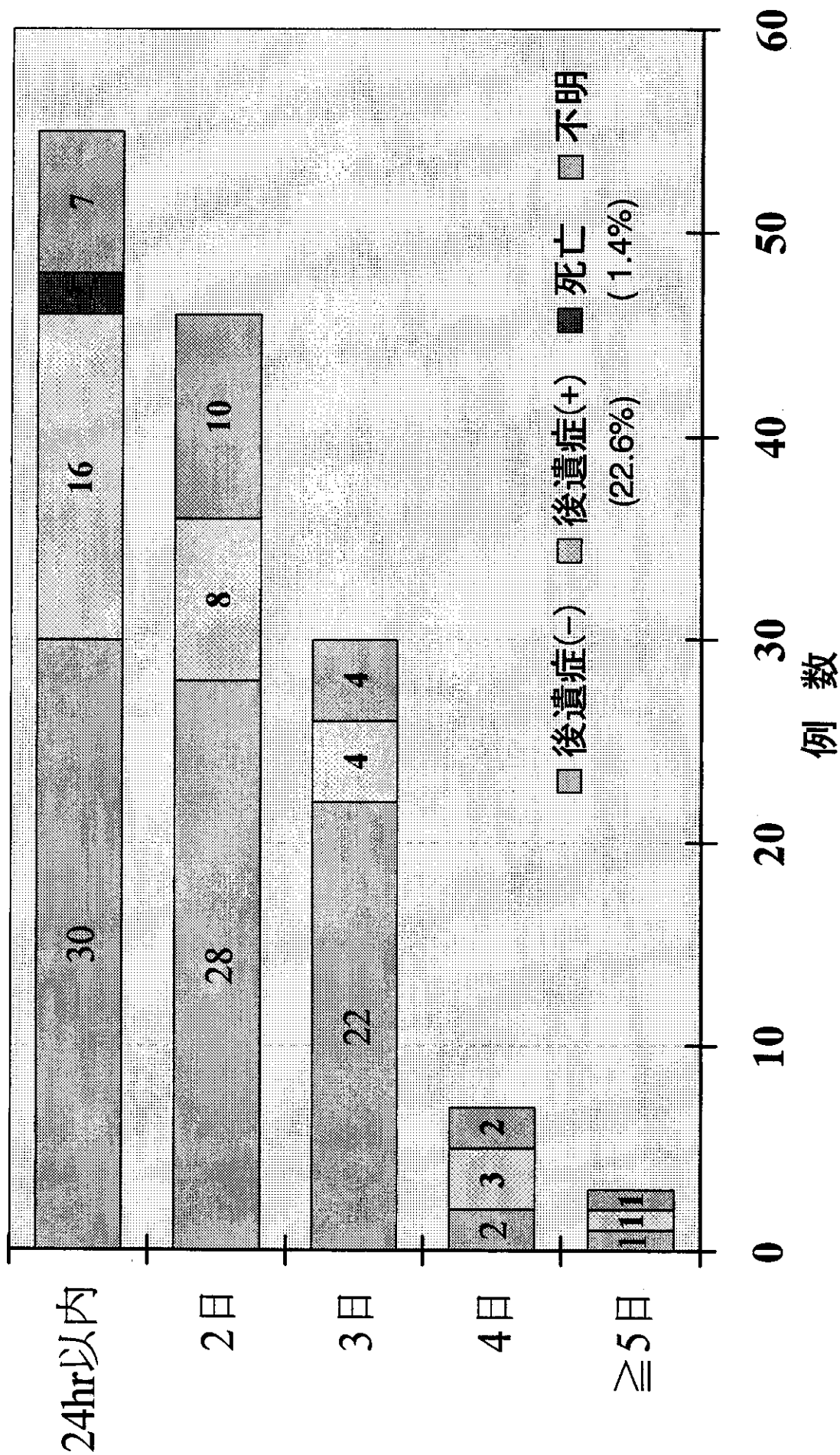


図6. インフルエンザ菌性髄膜炎:症状出現後の日数と予後との関係



臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析

分担研究者：後藤 直正；研究協力者：村田 健、西野 武志

京都薬科大学・微生物学教室

緑膿菌の多剤排出システムが関与する抗菌薬耐性機構を臨床分離株および実験室株を用いて調べ、さらに抗菌薬耐性克服のための排出システム阻害薬の創製を目指して、マルチコンポーネント型多剤排出システムの基質認識機構の研究を行い、次の結果を得た。キノロン薬耐性には MexAB-OprM と MexXY-OprM が、アミノ配糖体耐性には MexXY-OprM が重要な役割を担っていること、さらに MexAB-OprM と MexXY-OprM の高発現はカルバペネム薬耐性を引き起こすが、その程度は薬物間で異なることが分かった。また、MexD および MexB タンパク質の二次構造から予測されるペリプラスムループに基質認識のドメインがあることが分かった。

A. 研究目的

抗菌薬耐性菌の出現は抗菌薬化学療法の推進に大きな障壁となっている。抗菌薬耐性は抗菌薬の作用標的の親和性の低下、抗菌薬不活性化酵素の産生および抗菌薬の細胞内透過の阻止

によって起こると考えられてきた。さらにそれらの機構に加えて、エネルギー依存的に抗菌薬を細胞外に排出する機構の重要性が認識されるようになってきた。エネルギー依存的に基質を細胞外に逆輸送（排出）するタンパク質は生物界には広く分布し、多彩な機能を担っている。これらの排出タンパク質のひとつである ABC (ATP-binding cassette)ファミリーのホモログが真核生物のみならず、古細菌や真性細菌にまで分布していることは、排出タンパク質は細胞の基本的構造体の一つであることを示している。

緑膿菌の染色体上のポリシストン性の遺伝子群 mexA-mexB-oprM (図 1)にコードされた MexAB-OprM マルチコンポーネント型排出システムが、本菌の抗菌薬耐性、さらには多剤交差耐性の一因であることを明らかにしてきた。PAO1 株のゲノム配列プロジェクトの成果は、図 1 に示すように既知のものも含めて計 12 種類のマルチコンポーネント型排出システム遺伝子群の存在を示唆したが、現在のところ、MexAB-OprM に加えて、MexCD-OprJ、MexEF-OprN および MexXY-OprM の同定と

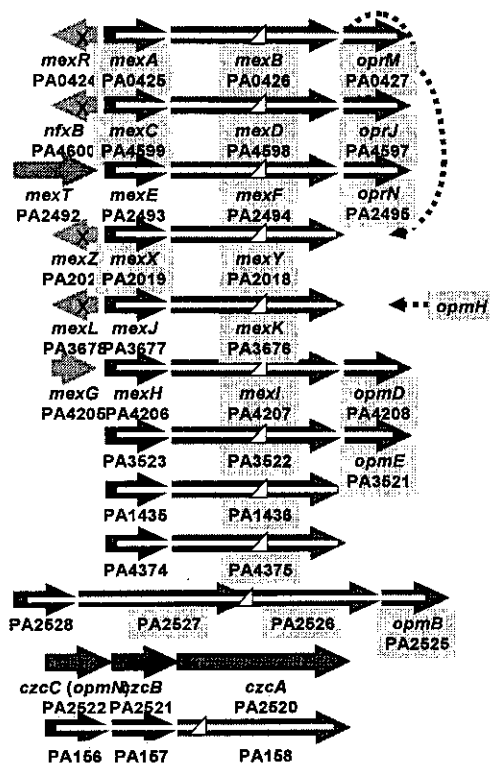


図1 緑膿菌ゲノム上にコードされる12種類のマルチコンポーネント型多剤排出システムオペロン
△, ×: 相同的組み換えによる欠失箇所

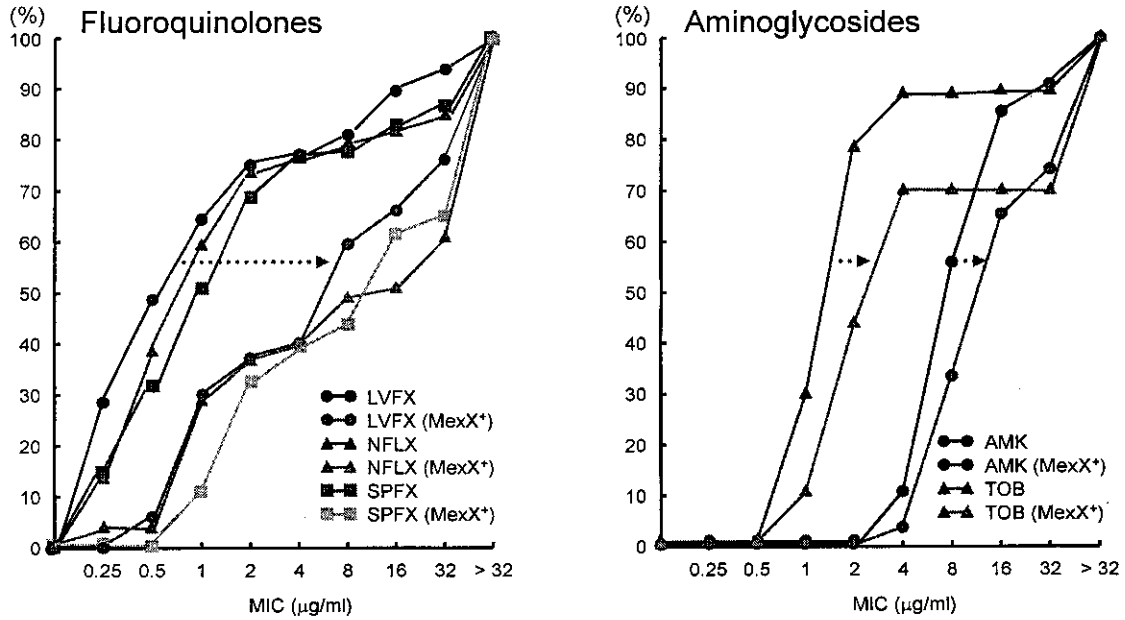


図2 MexXY-OprMの発現に伴ったキノロン薬およびアミノ配糖体薬の感受性分布の変化

性状解析が行われ、MexAB-OprMも含めた排出システムのそれぞれの発現や基質特異性が異なることが示されている。

本年度研究では、緑膿菌感染症の化学療法に欠くことのできないキノロン薬、アミノ配糖体薬およびカルバペネム薬に対する耐性への排出システムの貢献を調べ、抗菌薬耐性菌出現の現状を解析した。

B. 研究材料と方法

臨床各科から分離した緑膿菌 104 株を解析に用いた。排出システムの発現は既報のウサギ抗 MexX 特異抗血清を用いた免疫ブロット法によって検出した。また、遺伝子の破壊はすでに報告した相同的組み換え法により行った。また、抗菌薬感受性は寒天平板希釈法により測定した。

C. 結果および考察

臨床分離株における MexXY-OprM 発現の検出

MexXY-OprM は野生株では発現していないが、MexXY をコードするオペロンの上流の

mexZ 遺伝子の変異により発現し、キノロン薬やアミノ配糖体薬を排出することにより、これらの抗菌薬耐性に寄与する。この臨床的意義を調べるために、臨床各科から分離され、アミノ配糖体薬(amikacin および tobramycin)やキノロン薬(levofloxacin, norfloxacin および sparfloxacin)に種々の感受性(図 2)を示す緑膿菌株での MexXY-OprM の発現を既報の抗 MexX 抗体を用いた免疫ブロット法により調べたところ、27 株(26%)で発現が検出された。MexX の構成的発現株のキノロン薬およびアミノ配糖体薬感受性を非発現株のそれらと比較したところ、意外なことに MexX の構成的発現はキノロン薬に対する感受性を大きく減少させたが、アミノ配糖体薬に対する減少はそれに比べて小さく、両抗菌薬で異なることが分かった(図 2)。この原因を調べるために、norfloxacin や tobramycin を含む寒天培地で臨床分離株を培養し、MexX の発現を調べたところ、norfloxacin 含有培地での増殖によっては MexX の発現率は増加しなかったが、tobramycin 含有培地では非構成的発現株 77

表 1 *mexX* 遺伝子の破壊によるキノロン薬およびアミノ配糖体薬感受性の変動

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	CPFX	LVFX	AMK	TOB
PAO1	0.25	0.25	4	2
TH4240	1	2	8	4
TH4240 <i>mexX</i>	0.5	1	4	2
TH4835	8	8	32	> 64
TH4835 <i>mexX</i>	4	4	8	4
TH5159	0.5	1	16	4
TH5159 <i>mexX</i>	0.125	0.25	2	2
TH2774	0.125	0.25	4	4
TH2774 <i>mexX</i>	0.125	0.25	0.5	1

Abbreviations: CPFX, ciprofloxacin; LVFX, levofloxacin; AMK, amikacin; TOB, tobramycin.

株のうち 57 株(74%)で *MexX* の発現が検出された。これらの結果は *MexXY* の発現はアミノ配糖体薬によって誘導されるが、キノロン薬ではそれが起こらないという緑膿菌の実験室株で観察された結果と一致した。さらに、*mexX* 遺伝子の破壊による抗菌薬感受性の変動を観察することによって *MexXY* 発現の意義を調べた。*mexX* 遺伝子の破壊実験に供した臨床分離株 4 株 (TH4240, TH4835, TH5159, TH2774) でキノロン薬やアミノ配糖体薬の感受性化が観察された(表 1)。

D. 結論

これらの結果から *MexXY-OprM* 排出システムがキノロン薬やアミノ配糖体薬に対する耐性に寄与することだけでなく、従来、キノロン耐性の中心的役割を担う排出システムが *MexAB-OprM* であると考えられてきたが、それに加えて、*MexXY* 発現の動向も調べてゆくことが必要であることが示された。

研究発表 (印刷物のみに限った)

- Okamoto, K., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. Extrusion of Penem Antibiotics by Multicomponent Efflux Systems *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, and *MexXY/OprM* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2696-2699..
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* 196: 109-118.
- Murata, T., Kuwagaki, M., Shin, T., Kawai, Y., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. The substrate specificity of tripartite efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* is determined by the RND component. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 247-251.
- Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N., and Lomovskaya, O. 2002. Analysis of mutations which modulate the substrate specificity of the multidrug efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* implicates the large periplasmic loops in substrate binding. *Mol. Microbiol.* 46: 889-901.
- Okamoto, K., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. Alterations of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by overproduction of multidrug efflux systems, *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ* and *MexXY/OprM* to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *J. Infect. Chemother.* 8: 371-373.
- Murata, T., Gotoh, N., and Nishino,

T. 2002. Characterization of the deduced outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of the specific rabbit antisera to the gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:57-63.

7. Gotoh, N., Murata, T., Kimura, T., Ozaki, T., Kondo, A., and Nishino, T. 2003. Intrinsic Resistance of *Escherichia coli* to mureidomycin A and C due to expression of the multidrug efflux system AcrAB-TolC: comparison with the efflux systems of mureidomycin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.*, in press.

8. Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T., and Tuchiya, T. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.*, in press.

9. Hacquet, D., Vogne, C., Garch, F.E., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskata, O., and Plesiat, P. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, in press.

緑膿菌の RND 型排出ポンプによる薬剤選別および多剤耐性の機序

分担研究者: 中江太治

研究協力者: 江田志磨、間世田英明

東海大学医学部分子生命科学部門

研究要旨

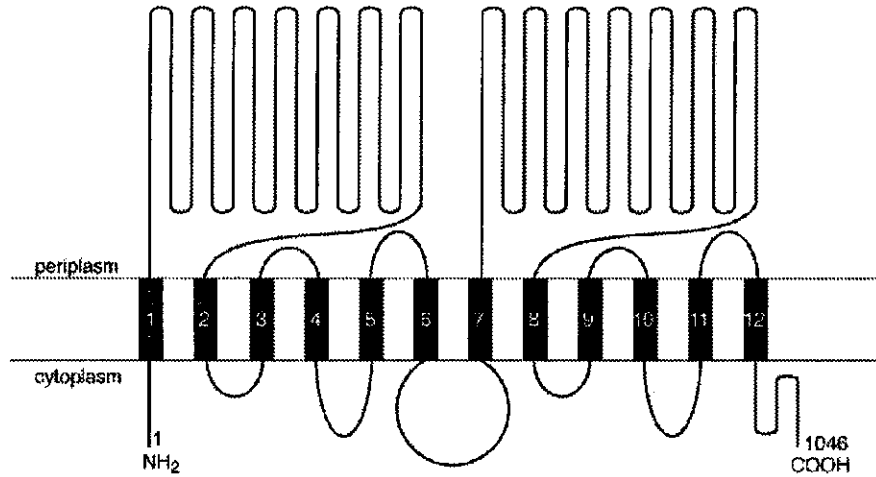
緑膿菌が発現する RND 型排出ポンプは複数の抗生物質、界面活性剤などの異物を細胞外に排出することによってこれらの物質に対する耐性を付与している。ところが界面活性剤や有機溶剤など細胞膜を破壊することなくどのようにして細胞外に輸送されるのかは明らかでない。そこでこの問題を解決すべく基質特異性を異にする2つの排出ポンプ間でポンプドメインを交換する実験を行った。MexB 排出ポンプと MexY ポンプはおのおのにβラクタム剤およびアミノグリコシドを排出する。そこで MexY の大きなペリプラズムドメインである Loop-1/2 (膜貫通領域1と2をつなぐループ) を MexB の Loop-1/2 に置換した。また同様に MexY の Loop-7/8 を MexB の Loop-7/8 で置換した。これらの雑種蛋白質の薬剤排出能を薬剤の MIC を測定することによって評価したところ、これらの雑種蛋白を含むポンプは機能を失っていた。次に MexY の Loop-1/2 および Loop-7/8 をともに相対する MexB のそれらに置換した。このモザイク蛋白質はアミノグリコシドを排出することはできなかったけれどもβラクタムを排出した。したがって RND 型排出ポンプはペリプラズム側のドメインで基質の選択を行っている可能性を強く示唆した。一方膜貫通領域の基質認識に係る可能性を検定するため MexB の膜貫通領域1から12までの1つ1つを MexY のそれに置換した雑種蛋白を構築した。これらの蛋白はすべて MexB 型であり例外なくβラクタム剤を排出したけれどもアミノグリコシドは排出しなかった。これらの結果は RND 型排出ポンプの膜貫通領域は基質選択性に関与していない可能性を示したものと解釈できた。

A. 研究目的

緑膿菌は免疫力の低下した患者等に感染を起こすため院内感染起因菌として大きな問題となっている。この比較的弱毒菌が院内感染上問題となるには大きく2つの理由が存在する。その1つはこの菌が多くの抗生物質に対して

図1. MexBの二次元膜トポロジーとMexYとの相同性

(a) MexBのマックトポロジーモデル



(b) MexBとMexYの相同配列

	TMS1	Loop1/2	
MexB	1:HGKFFIDRPIFAWVIALVEMLAGGLGSLGSLPVVAGYFAAAPPATAVCVVYFGAABSTVGDYVGVIEQQMHGIDNLDYIGSSRSDVSMYF		36
MexY	1:MARVFIDRPVFAWVIEELVPLASVIAIKPLPVAGYFDIAPVYVNGATYFGASAKVVEKAVTATIDKRMNGAPSLHYTKMTEIGSYQASG		89

MexB	91:VTYFRGGTSPDIAQVQVQKLOLATFELPQEVGPGQIIVTKAVKNFVNVVGVVSTDSGTHKLLSNYIVGNGIQDFLEPKVGVDFQVFGS		190
MexY	90:ILTFPQGVNANLAAVEVGNRLKIVESRLEBEVDRDGIYVEKADGIGQLIVLITSSGRYDAMELGSTAGSNVLQALPRVEGVGVKVTMGA		179

MexB	181:QCEMRIWLEPAKLSYQLFPGDVEBAIQMCHVGISSGQLGGLPVEGQQLNATIGETRLQTAQGFENILKVNFDGSOVRLKVDVAVGL		270
MexY	166:EVANRIIDPDAKLTSMNLGASDLVNAVRKRRARLTVGDIQNLGVPEAPISATPVKVDDELVTPEQGGELPLAHRERGGALRLPDVARVSP		269

	TMS2		
MexB	271:GGQVYSINAQVMSFASGIAHLAAGARALETAAALRDTIANLEPFVPCQMKVYVYDPTFVVGASIEHPVEYELGSAILLVPLVHYLFIQ		350
MexY	276:GQVYGVVGRVGRVMTAIGLAVKMAFDSRANATAKRRATLDELARVYPPESVSNIPFVTRAPVSLIRKVVSTLSSAMLLVFFVWYLFMSQ		359

	TMS3	TMS4	TMS5
MexB	361:INPATLIPTFAVGVVLELDFEYVIAAGVPEINTLTMPCNVVRAIGLLVDDAIVVVENYERVMAHEGLQFRAARKEEMQDQSSAVGIAKVLG		450
MexY	360:INFRALRIPFLVYSVALGQFTVMLEGLQPSINVLTPMFWLAYSLLVDDAIVVVENYERVMAHEGLQFRAARKEEMQDQSSAVGIAKVLG		449

	TMS6		
MexB	481:AVFLPMAFFGNSGVVYVQDFITIVBAMALSVIVALILVPAKCAKRLKPIEKSDRDEHKGGFTGNPNAFLSTTSCYERGVASILKRRAP		540
MexY	480:SVFVPMANFSGAVGNLYRQFAYTLAVSILQPSAALASLTPAKCATLDRPLD.KSHHEKRG.FSGNPNRAFLLRERVYRNAYAGITLAKFIR		537

	TMS7	Loop7/8	
MexB	541:YLLLYVYIVASHTWPTPFFAFLEPERLQYVPAQVQFFSGSARKVQVYVCSKRETLLEKBSGVSFVYTFVTPMTRAGQCSSGMAAIIH		630
MexY	538:WNLVYTLVIVVYVALLPVKLPQAFLEPDECDPMMVMVQSGTPTMAEAMAVGVGVBRVLAHEHP.VAYAYVGGYSLYDQSTESAMIFAT		625

MexB	631:LEPNEBRFGGERSVPELAKRAQMHFFSFKDAKVFAPAFVVELLQXATGFDLFLQDQASVGVHEVLLQRNHFPLWLAQNPALQVRVFNW		720
MexY	626:LEPNEBRERAGQVGVIVRINQRFACGLPNSVYANMSEPLFDLGSSTGDFRLODRGQVGYALVEARDCLAKAAEDPRLANVAFAGQ		715

MexB	721:SEDFQYRLEIDDEYASALGVSLADINSTVSIANGSSYVHEFIDRQYKVTYLOKSDAMNFDLLEKNTVRRDQGVNPPNAPATQKWEY		810
MexY	716:SEDFQYRLEIDDEYASALGVSLADINSTVSIANGSSYVHEFIDRQYKVTYLOKSDAMNFDLLEKNTVRRDQGVNPPNAPATQKWEY		805

	TMS8		
MexB	811:GFFKLERVYGVVAMRILGSDAPSLSGGDMAAAVERIVKGLPKGVYQVHTG.LSTYERLGGQRPRIYVLELLVVFLELAAYESWRIPPS		899
MexY	806:RPAATPLQRLSLVQPKSPQPAQLQPEBANQAMRQLMGQTARQIIPRVYKPVLRKRPVYASQAQAPALFALSIVLVEKLAALVESWSIPLR		895

	TMS9	TMS10	TMS11
MexB	900:WMLVYVLEIYQALLAVSRRGLSEVVFQVLLITTIQLSARDAIIVVYVARELSEQKXIVBAAIRACNNRLEPFTVMTSLAPILGVVPLAI		989
MexY	896:VILVYVLEIYQALLAVSRRGLSEVVFQVLLITTIQLSARDAIIVVYVARELSEQKXIVBAAIRACNNRLEPFTVMTSLAPILGVVPLAI		985

	TMS12		
MexB	990:STGAGSGGQAIGTGVIGMVTATVVAIPVVPAGYVAVETLFEKQAKQQAS.VVRFQQL1046		
MexY	986:SGSASIRQAIGTGVIGMVTATVVAIPVVPAGYVAVETLFEKQAKQQAS.VVRFQQL1046		

自然耐性を示すこと、また他の1つは抗生物質による処置がなされた結果、菌は同様のスペクトルの抗生物質に対して高度の耐性を獲得するからである。この菌の抗生物質自然耐性及び獲得耐性には抗生物質排出ポンプの発現が深く係っていることが最近の研究から明らかとなってきた。

緑膿菌の RND 型排出ポンプは複数の抗生物質を排出することが知られているが、それでも各のポンプによって抗生物質の選択性が一部異なっていることも明らかである。RND 型排出ポンプは一般に3つのサブユニットから構成されている。ポンプの本体をなすものは細胞膜を12回貫通するポリトピック型の輸送蛋白質であり、特徴的なことはペリプラズム側に大きく突出したループを有することである。Loop-1/2 および Loop-7/8 は各々に約300個のアミノ酸からなる親水性のドメインでありペリプラズム側に突出している(図1a)。その他のループは比較的短く膜貫通領域をつなぐ役目を持っている。このポリトピック型サブユニットに属するものとしては例えば MeB, MexY その他が知られている。MexBとMexYはアミノ酸の相同性が約36%あるが(図1b)、これらのポンプ蛋白の示す基質特異性には明らかな違いを見いだすことができる。RND 型排出ポンプが機能するためにはポリトピック型のポンプ本体に加えて、2種類の補助蛋白を必要とする。1つは内膜に結合したリポ蛋白で例えば MexB のパートナーとして MexA、MexY のパートナーとして MexX などがある。これらの MexA や MexY 蛋白のポンプ機能に果たす役割は明らかとされていないが、これらは内膜と外膜を連結するものと推測されている。もう1つの補助蛋白は外膜に結合したリポ蛋白で MexAB と MexXY に共通に機能する OprM サブユニットである。この外膜サブユニットは外膜を貫通することによって外膜に抗生物質透過チャンネルを形成するものと考えられている。

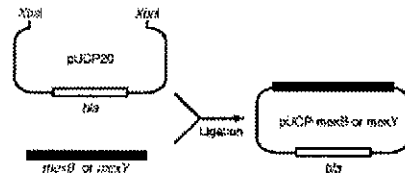
本研究ではこれらの RND 排出ポンプがどの部分で基質を認識し、異物を排出しているかを明らかとすることによって、これらの排出ポンプによる緑膿菌の多剤耐性機構を明らかとすることを目的とした。そのために我々がとった方法は次のごとくである。基質は膜貫通領域で認識されるのかあるいは膜外のドメインで認識されるのかを明らかとするため、 β ラクタムを選択する MexB とアミノグリコシドを選択する MexY の間でドメインを交換する実験を行った。

B. 実験方法

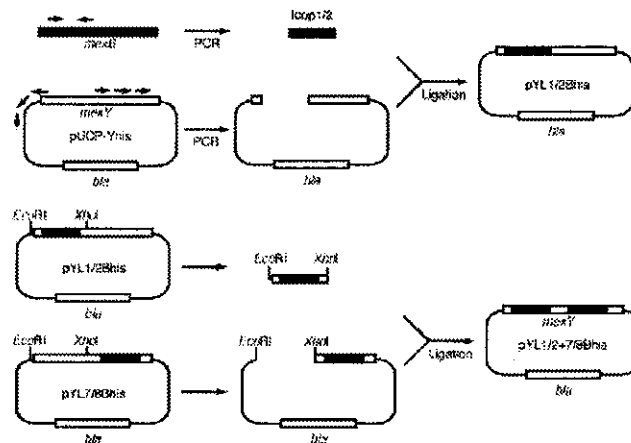
組替え DNA 方を用いた MexB と MexY の雑種蛋白構築の詳細は図2に示した通りである。

図2. プラスミド構築

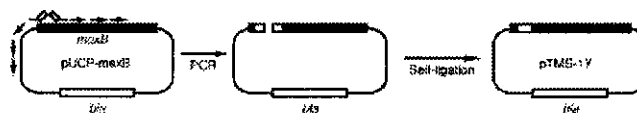
(a) MexB 及び MexYのクローン化



(b) MexBのループによるMexYループの置換



(c) MexY膜貫通領域によるMexB膜貫通領域の弛緩



(a) The *mexB* and *mexY* genes were amplified by PCR using a primer sets BU and BD and YU and YD, respectively, and cloned into *Xba*I site of pUCP20. Resulting plasmids, pUCP-mexB and pUCP-mexY, were used to construct the hybrid transporters. To ease subsequent protein analysis, the *mexB* and *mexY* genes on pUCP-mexB and pUCP-mexY, respectively, were modified by a codon for hexa-histidine at the carboxyl ends of the proteins.

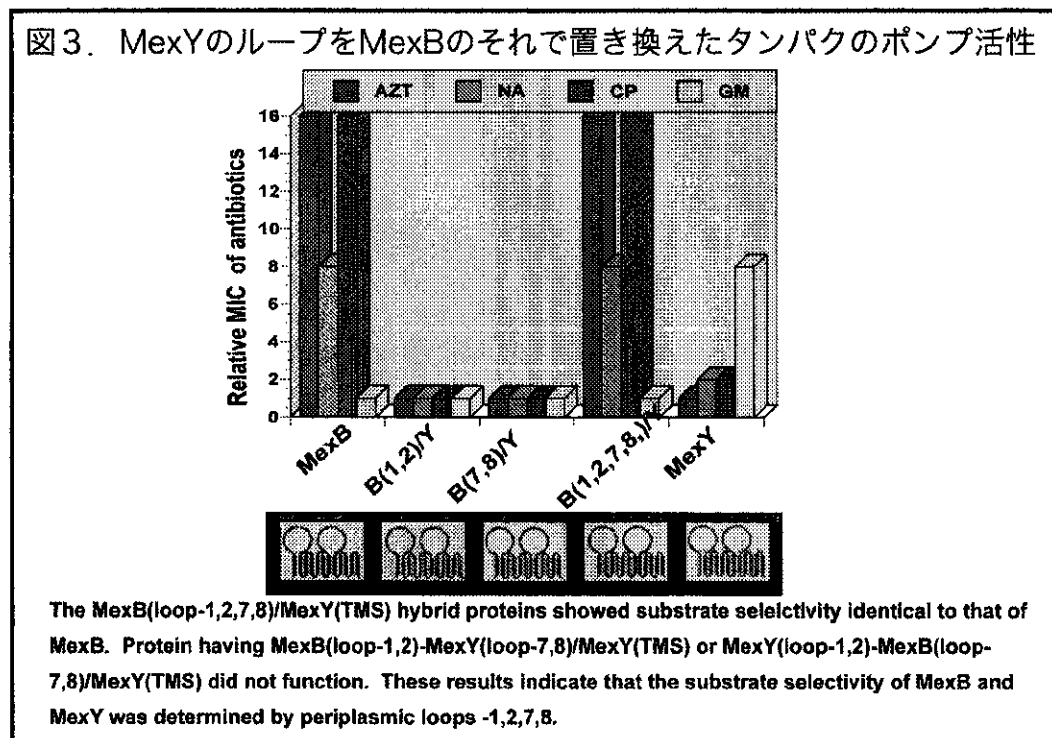
(b) Two large extramembrane loops of MexY were substituted with that of MexB as follows. The DNA segment corresponding to loop1/2 was amplified using pUCP-mexB as a template by PCR using a primer set 12BU and 12BD. The whole vector sequence including *mexY*, which has a deletion of coding region of loop1/2, was amplified by PCR using pUCP-Yhis as a template with a primer set Y12U and Y12D. The amplified DNA fragments were ligated yielding pYL1/2Bhis. Construction of pYL7/8Bhis carrying loop7/8-substituted *mexY* was carried out similar to the above except that the primer sets 78BU and 78BD and Y78U and Y78D were used for PCR. Next, pYL1/2Bhis was digested with *Eco*RI and *Xho*I and yielded 1 kb *Eco*RI-*Xho*I fragment was ligated to pYL7/8Bhis treated with *Eco*RI and *Xho*I yielding pYL1/2+7/8Bhis.

(c) One each of twelve TMS of MexB was replaced with respective TMS of MexY as follows. The *mexB* gene together with whole vector sequence was amplified using pUCP-mexB as a template by PCR using the primer sets that contained sequence coding for the target TMS. Purified PCR product was self-ligated yielding pTMS-1Y to -12Y.

C. 研究結果

1) ペリプラズムループドメインの基質選択への役割

MexBとMexYの間の基質特異性がはっきりしていること、この2つのトランスポーターのアミノ酸の相同性がある程度高いことおよびこれらは共に外膜サブユニットとしてOprMを使用することなどの点を利用してMexBとMexYの間のドメイン交換実験を行った。まずMexY蛋白のLoop-1/2を削除しこれにMexBのLoop-1/2を組み込んだ。また同様にMexYのLoop-7/8を削除し、MexBのLoop-7/8を組み込む実験を行った。これらの組替え体におけるアズトレオナム、ナリジク酸、クロラムフェニコールおよびゲンタマイシンのMICは各に0.2, 6.25, 3.13 および $0.1 \mu\text{g/ml}$ で、それらはMexB/MexY株のそれと同じ値であった。したがってこれらの組替え体ではポンプは機能していないことが明らかとなった(図3)。



そこで次にMexYのLoop-1/2およびLoop-7/8を共に削除し各々のループに対応するMexBのループを組み込んだ。すなわちLoop-1/2およびLoop-7/8はともにMexBから、それ以外の部分はすべてMexYからのドメインを用いてMexBとMexYのモザイクトランスポーターを調製した。そのような組み替え体におけるアズトレオナム、ナリジク酸およびクロラムフェニコールのMIC値は各に3.13, 50及び50 $\mu\text{g/ml}$ であったけれどもアミノグリコシドであるゲンタマイシンのMIC値は $0.1 \mu\text{g/ml}$ であった。これらの結果はMexBにおける抗生物質のMIC値と完全に一致するものであったけれ

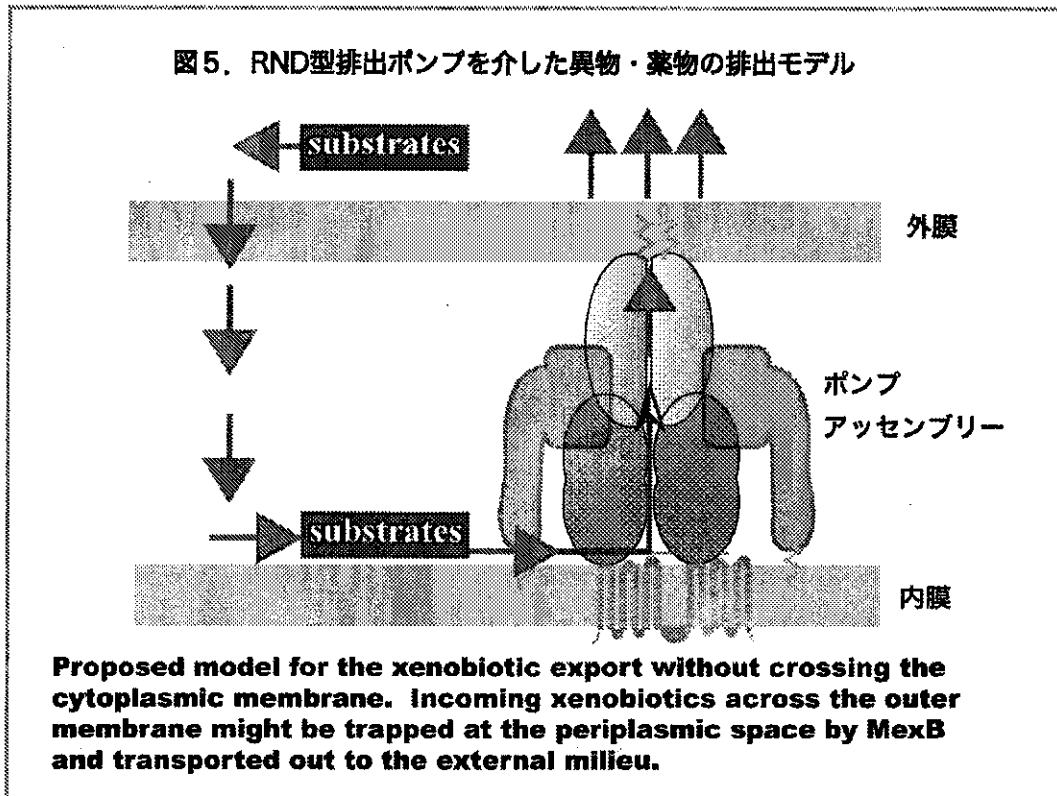
ども MexY のそれではなかった。これらの結果 RND 型排出ポンプはペリプラズムに大きく突出した2つのループで基質を認識している可能性を強く示唆するものであった。この結果と先に書いた Loop-1/2 もしくは Loop-7/8 のみを置換した場合には機能しなかったことを考え合わせると RND トランスポーターは Loop1/2 と Loop-7/8 が共同で基質を認識している可能性を示唆するものである。

上記の裏の実験として MexB の Loop-1/2 及び Loop-7/8 を削除し、各に MexY の対応するループを組み込んだ組み替え体を構築したが、この蛋白は排出ポンプとして全く機能しなかった。その理由は明らかでないが MexB と MexY の接合の位置が適当でなかった可能性は否定できない。同様に MexB の Loop-1/2 もしくは Loop-7/8 の片方ずつを MexY のそれに置換した組み替え体もポンプサブユニットとして機能しなかった。

2) 膜貫通領域の基質選択性への係り

次に膜貫通領域の基質認識への係りを明らかとするため MexB の膜貫通領域をそれに対応する MexY の膜貫通領域で置換する実験を行った。すなわち MexB の膜貫通領域 1, 2, 3, ... 12 を MexY の膜貫通領域 1, 2, 3, ... 12 で置換した。これらの組み替え体の抗生物質感受性を測定してみると驚いたことにどの置換体もポンプサブユニットとして正常に機能した。基質特異性に関してはいずれの組み替え体も MexB 型であり β ラクタマーゼを選択するものであったけれどもアミノグリコシドは選択しなかった(図4)。このことは上に述べた Loop-1/2, Loop-7/8 の組み替え体が β ラクタマーゼを排出したという結果と完全に一致した。

よって運ばれるとするならば基質は内膜を越えて基質認識ドメインまで移動しなければならぬが、それでは細胞内物質が漏れる可能性がある。



本研究から得られた知見を基に次のような異物薬物排出のモデルを提唱することができる(図5)。細胞外の異物薬物は外膜の障壁を越えてペリプラズムに達する。ペリプラズムへ達した基質は MexB や MexY などの輸送体の Loop-1/2 及び Loop-7/8 から構成される基質捕捉ポケットにとらえられる。この時膜貫通領域で生成されるエネルギーを基に MexA 及び OprM の介在によって基質は細胞外に排出される。細胞外の異物、抗生物質の濃度が低ければ外膜の障壁性と RND ポンプの働きによって異物、薬物は原形質膜や細胞質に到達することなく排出されるので細胞の内部は異物や薬物から保護されることになる。しかしながら現時点においては細胞質内からおよび細胞質内から異物、薬物が排出される可能性を否定することはできない。

以上述べてきた様に本研究では薬剤排出ポンプの機能を知る上で極めて重要な発見がなされたものと考え。将来これらの結果を基に薬剤排出ポンプの機能を阻害するような物質の探索に貢献できるものと考え。

E. 研究業績 (英文論文のみ)

Shima Eda, Maseda Hideaki, and Taiji Nakae (2003) An elegant means of

self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *J. Biol. Chem.* 278, 2085–2088

Eisaku Yoshihara, Hideaki Maseda and Kohjiro Saito (2002) The outer membrane component of the multidrug efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* may be a gated channel. *Eur. J. Biochem.* 269, 4738–4745

Hideaki Maseda, Kitao Masataka, Shima Eda, Eisaku Yoshihara and Taiji Nakae (2002) A novel assembly process of the multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 46, 667–686

Akira Nakajima, Yohko Sugimoto, Hiroshi Yoneyama, and Taiji Nakae (2002) High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol. Immunol.* 46, 391–395

Hiroshi Yoneyama, Hideaki Maseda, Taka-aki Yamabayashi, Shotaro Izumi and Taiji Nakae (2002) Secondary-site mutation restores the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 513–518 (2002)

Taiji Nakae, Lan Guan, Hiroshi Yoneyama, Monika Germ and Akira Nakajima (2002) The topological localization of the subunit proteins of the three-component RND-efflux pump, MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa*. *Progr. Biomed. Optics Imaging* 4625, 106–117

アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便検出法に関する研究

分担研究者 堀田国元 国立感染症研究所生物活性物質部
研究協力者 石野敬子、石川 淳、土崎尚史 国立感染症研究所生物活性物質部

迅速簡便な遺伝子検出・判定技術を開発し、1980～2000年に臨床分離されたMRSA約440株を対象に8種のアミノグリコシド（AG；KM系4種、GM系4種）に対する耐性と修飾不活化酵素（AME）遺伝子プロファイル、およびコアグラーゼ遺伝子型との間の相関性を調べ、以下の成果を得た。

1. 迅速簡便な耐性遺伝子プロファイルおよびコアグラーゼ遺伝子多型の検出・判定法の開発
コロニーから極微量の細胞（ $10^2 \sim 10^4$ cfu）を爪楊枝によって直接PCR反応液に添加し増幅反応を行うことによって*mecA* 遺伝子と5種のAME遺伝子[*aad(4', 4'')*, *aad(9)*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')*および*aad(6)*]を一度にチェックできるMultiplex Colony Direct-PCR法を確立した。また、コアグラーゼ遺伝子の3'末端領域の繰返し配列をPCR増幅後、*Alu I*（制限酵素）による切断パターンから型別するPCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)を確立した。
2. AME遺伝子プロファイルとAG耐性の相関性
8種のAGに対するMRSAの耐性パターンは、*aad(4', 4'')*, *aac(6')/aph(2'')* および*aph(3')*の遺伝子プロファイルとの間に以下のような相関性が認められた。
 - 1) *aad(4', 4'')*は、4'-OHをもつKM, AMKおよびISP、ならびにDKBに耐性を付与し、近年の分離株に高頻度(90%以上)に検出された。
 - 2) *aac(6')/aph(2'')*は8種のAGに耐性を付与する能力をもち、その保持とGM, SISOおよびNTLに対する耐性との間にほぼ完全な相関性が認められたが、出現頻度は経年的に低落傾向にあることが認められた。但し、ABK (Arbekacin；抗MRSA)は例外的で、ABK耐性化にこの遺伝子は必要だが必要十分ではなく、ABK耐性は*aac(6')/aph(2'')*と*aad(4', 4'')*を保持する菌株の一部に限られ(10%未満で低～中等度)、ABK耐性化も進行していないことが見出された。
 - 3) *aph(3')*は、*aad(6)*と共存し、Kanamycin耐性を付与するが、近年のMRSA株にはほとんど存在しないことが認められた。
3. コアグラーゼ遺伝子型とAME遺伝子プロファイル
 - 1) PCR-*Alu I*-RFLP解析の結果、MRSAのコアグラーゼ遺伝子型には明瞭な経年的変化が認められ、80年代には数種認められたメジャーな型が、90年代になると1つの型（L21とコード）が圧倒的になっていることが認められた。
 - 2) コアグラーゼ遺伝子型はそれぞれ特有のAME遺伝子プロファイルをもっており、MRSAのAG耐性にとっての大きな要因となることが認められた。
4. 行政施策への貢献の可能性
MRSAでは、AG耐性をAME遺伝子プロファイルから判定できるので、上記の迅速簡便な方法によるコアグラーゼとAMEの遺伝子情報の取得は、AG抗生物質（特に抗MRSA剤のABK）の適正使用のための基本情報として積極的に有効使用すべきであると思われる。

A. 目的

臨床細菌のアミノグリコシド(AG)抗生物質耐性のほとんどはAG修飾酵素(図1)に依存しており、MRSAも例外ではない。そこで、1980~2000年に臨床分離されたMRSA菌株を対象に、MRSAで知られている5種のアミノグリコシド修飾酵素(AME)遺伝子のプロフィールを昨年度の研究で開発したMultiplex Colony Direct(CD)-PCR法¹⁾により調べ、AG耐性ととの相関性を明らかにする。また、コアグラーゼ遺伝子に関して、CD-PCR増幅に続く制限酵素処理による多型解析を行ない、AME遺伝子プロフィールとの相関性を明らかにする。

B. 研究方法

1) AME遺伝子のMultiplex Colony Direct PCR

aad(4', 4''), *aad(9)*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')*-IIIおよび*aad(6)*の5種のAME遺伝子を*mecA*遺伝子とともに標的としてMultiplex CD-PCR増幅を行った。各遺伝子はプライマー設計(表1)によりPCR増幅サイズに差をつけることによってアガロース電気泳動により識別できるようにした(図2)。

PCR反応液組成(表2)は、DNAポリメラーゼとしてKOD-plus⁻を用い、*aac(6')/aph(2'')*用プライマー濃度を0.5 μM(その他は0.2 μM)としたこと以外はメーカーのプロトコルに従った。この反応液20 μlに、滅菌爪楊枝の先端をコロニー表面に触れることにより目に見えない極少量の細胞を添加し、95°C, 3分→(95°C, 30秒→50°C, 30秒)→68°C, 1分)×30回→68°C, 3分→室温という条件でPCRを行った。

2) コアグラーゼ遺伝子多型の*AluI*-RFLPによる解析

コアグラーゼ遺伝子(*coa*)の3'末端付近の繰り返し領域を標的としてCD-PCR増幅後、反応液をそのまま*AluI*処理し、その切断パターンをアガロース電気泳動によって観察することによって多型解析(PCR-*AluI* RFLP)を行った(図2)。増幅断片のサイズおよび*AluI*切断パターンに基づきコード番号を付した。

3) AG耐性

AG耐性は、Kanamycin系4種(KM, DKB, AMK, ABK)とGentamicin系4種(GM, SISO, NTL, ISP)について希釈寒天平板法により調べた。MIC 8 μg/ml以上を耐性とした。

C. 結果

1. AG耐性出現率の経年的変化

結果を図3に示した。ABKを除くKM系のAG(KM, DKBおよびAMK)に対して耐性を示す菌株が高頻度に認められた。GM系のAG(GM, SISO, NTL, ISP)に関しては、80年頃の菌株における耐性頻度が最も高く、その後漸減して2000年の分離株では40%強へ低落していることが認められた。但し、ISP(Isepamicin)は、90年を過ぎると耐性率が上昇し、KMと同様の高耐性率となった。ユニークな結果が得られたのはABK耐性で、耐性出現頻度は低率に推移し、認可された頃(1990年)の菌株の耐性率が最も高く、そのご経年的に低下する傾向が認められた。なお、ABK耐性はほとんどが*aac(6')/aph(6')*と*aad(4', 4'')*の2種のAME遺伝子を持つ菌株で、中等度耐性が低頻度に認められた。

図4は*aac(6')/aph(6')*を単独でもつ菌株のGM耐性とABK耐性のレベルを対比して示している。GM耐性の方がABK耐性よりも16~32倍高いことがわかる。

2. AME遺伝子の経年的変化

図5にAME遺伝子の出現頻度の経年変化を示した。1980年頃の分離株では*aac(6')/aph(6')*を持つ菌株の頻度が最も高く、80%を超えたが、年が経過するにつれて低落し、2000年の分離株では43%であった。この遺伝子の曲線は図3におけるGM耐性率の曲線とびつたり一致することが認められた。また、図6からも、この二機能酵素遺伝子を保持することはGMやSISOの耐性出現にとって必要十分であることが明らかとなった。ABK(抗MRSA剤)耐性因子もこの酵素であることが知られているが、保持していてもABK耐性を示すものは少ないことが明らかになった。

*aac(6')/aph(6')*と*aad(4', 4'')*の2つをもつ菌株は全体的に耐性レベルが高く出ることが認められた。

*aad(4', 4'')*をもつ菌株の頻度は経年的に急速に伸び、90年代後半の菌株において90%以上に達し、その後安定していることが見出された(図5)。この遺伝子は、4'-OHをもつISPとAMK(Amikacin)や4''-OHをもつDKB(Dibekacin)に中等度の耐性を付与することが認められた。なお、この遺伝子をもつ菌株では高頻度に*aad(9)*遺伝子が検出された。

一方、*aph(3')*遺伝子は80年頃の分離菌株に多く検出され、最近の分離菌株にはほとんど検出されなかった。なお、*aph(3')*をもつ菌株からは必ず*aad(6)*が検出された。

2. コアグララーゼ遺伝子(*coa*)多型の経年変化とAME遺伝子プロファイル

図2に示すように、*coa*の3'末端繰り返し領域を標的としたPCR-*AluI*-RFLPによって各菌株の型別を行った結果、図7に示すように、経年的に大きな変化が認められた。すなわち、80年頃の高頻度分離菌株ではL22型が多く、その後80年代後半の菌株では、L21, L31, M22の3種が割拠していたが、90年代になるとL21の頻度が突出して高くなっていることが認められた。

L21の曲線と図6の*aad(4', 4'')*の曲線が酷似していることから、L21型のMRSAのほとんどは*aad(4', 4'')*を保持していることがわかる。

また、L22型の曲線と図6の*aph(3')*の曲線に相似性がある。*aph(3')*と*aad(6)*はほぼ完全な共存性があることから予測されるように、L22型のMRSAはStreptomycin耐性である(データ省略)。

表3には、上記のコード番号の菌株のAME遺伝子プロファイルを要約して示した。特徴的なこととして以下のことが認められた。L21型の菌株では*aad(4', 4'')*を高頻度(91%)に保持するが、*aph(3')*を全く保持せず、*aac(6')/aph(2'')*の保持菌株は42%の頻度であった。これに対して、L21以外の菌株(非L21)では、L21に比べて*aac(6')/aph(2'')*が高頻度(86%)で、*aad(4', 4'')*の頻度が低い(36%)が、L21には検出されなかった*aph(3')*がかなりの頻度(19%)で検出されたことが特徴的である。

なお、コアグララーゼ遺伝子型とエンテロトキシン遺伝子プロファイルに相関性があることが図7から推測される。すなわち、L21型はCとT、L22型はA、L31型とM22型はこれらを保持しないことが特徴的である。

D. 考察

MRSAにおけるMultiplex Colony Direct PCRの開発により各種の薬剤耐性遺伝子の検出やコアグララーゼ遺伝子の多型解析を迅速簡便に行うことができるようになった。その結果、1) 短期間に多数の菌株の標的遺伝子チェック、2) 菌株の同定精度の向上、3) アミノグリコシド耐性因子判定精度の向上、4) 経年的変遷のモニタリングと予測、に有効性を発揮すると確信できる。

一方、1980~2000年に臨床分離されたMRSA菌株のAG耐性、AME遺伝子プロファイルおよびコアグララーゼ遺伝子型を調べた結果、以下のことが明らかになった。

1) MRSAにおけるアミノグリコシド耐性のレファレンス因子について： AME遺伝子プロファイルとAG耐性の高い相関性から修飾酵素が主要なAG耐性因子と判断される。すなわち、KMの耐性因子は*aph(3')*、*aad(4', 4'')*および*aac(6')/aph(2'')*、DKB, AMK, およびISPの耐性因子は*aad(4', 4'')*と*aac(6')/aph(2'')*、GM, SISO, NTLおよびABKの耐性因子は*aac(6')/aph(2'')*と判定された。ただし、ABKは、耐性化にとって*aac(6')/aph(2'')*は必要であるが、必要十分ではない。

これらの結果は、MRSAにおけるAG耐性がこれら耐性因子の基質特異性を重ね合わせることによりほぼ完全に説明することができることを示している。言い換えると、MRSAはAG抗生物質の進歩を反映するモデルということができる。

2) MRSA菌株のコアグララーゼ遺伝子型とAME遺伝子の相関性について： 80年代の菌株と90年代の菌株のコアグララーゼ型を比較すると大きな変化が認められた。80年代には少なくとも数種存在したメジャーなコアグララーゼ型が、90年代になるとL21型(コアグララーゼII型と高い相関性あり)の菌株だけに収斂し、支配的になるメカニズムが医療現場に存在すると考えられる。

3) MRSAにおけるAG耐性因子の推移予測： 臨床分離MRSAのAG耐性は、各コアグララーゼ遺伝子型に固有のAME遺伝子保持があるので、大局的にみてどのようなコアグララーゼ型の菌株が支配的になるかによって左右されることになる。AGにとって最大のリスク遺伝子は*aac(6')/aph(2'')*で、KM系およびGM系のAGに対する耐性を付与する能力をもっているが、この遺伝子をもつ菌株の頻度は、図5にみられるように80年頃が最も高く、その後長期低落傾向にある。その最大の原因は、この遺伝子をもつ頻度が低いL21型コアグララーゼ遺伝子をもつMRSAが支配的になってきたことによる。曲線の勾配からみて今後しばらくは、L21型が支配的な構図が続き、*aac(6')/aph(2'')*の出現頻度も上昇しないことが予想される。したがって、ABK耐性化も上昇しにくいと予想される。しかし、L21型株におけるABKの耐性率と高度耐性化に注意を払いつつモニタリングを行う必要性であろう。

一方、ABK高度耐性化した菌株が1株だけ見出された(図4中のPRC104株)。遺伝子解析の結果、*aac(6')/aph(2'')*のリン酸化領域の触媒モチーフのところに1塩基置換(G→A)があり、ABKのリン酸化活性が著しく上昇していることが高度耐性化の理由と分かった。コアグララーゼ遺伝子型はL31のため、直ぐには広がる