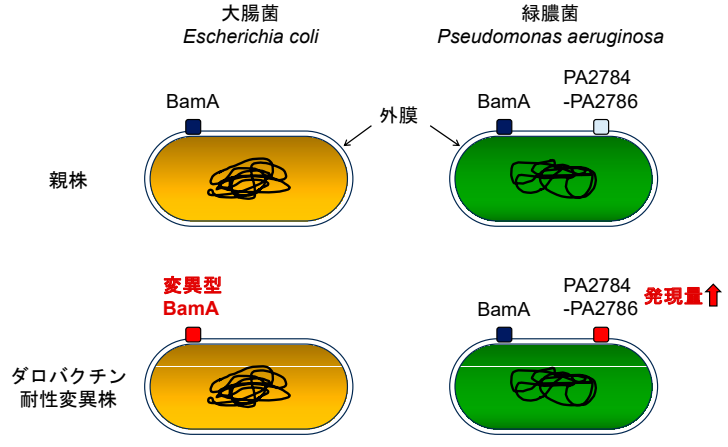
104　細胞外膜標的抗生物質に対する緑膿菌の耐性機構の解明	今井　優

【目的】近年薬剤耐性菌の出現が社会問題となっており、新しい抗生物質の開発が求められている。これまでに我々は、線虫共生細菌である *Photorhabdus khanii* から、グラム陰性細菌に特異的な活性を示す抗生物質ダロバクチンを発見している。大腸菌 *Escherichia coli* をモデルとした研究から、ダロバクチンが BamA タンパク質（新生外膜タンパク質の折りたたみと挿入に関与）に結合し、同菌を死に至らしめることを明らかにしている。また *bamA* 遺伝子における特定の変異が *E. coli* に対してダロバクチン耐性を付与することも判っている。一方興味深いことに、同じグラム陰性細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* から自然突然変異法により複数のダロバクチン耐性株を分離し、その変異点を解析したところ、全ての株が機能未知遺伝子 *PA2784* の 86 塩基上流のチミンが欠失した変異（*PA2784*-86del 変異）を有することが明らかとなった。また、タンパク質の局在予測ツール PSORTb V.3.0 による解析から、PA2784 タンパク質が細胞質膜に存在すること、そして同タンパク質が *P. aeruginosa* に固有のものであることが判った。これを背景に本研究では、*PA2784*-86del 変異が *P. aeruginosa* にダロバクチン耐性を付与するメカニズムの解析を目指した。

【方法】*E. coli* においては *bamA* 遺伝子における変異がダロバクチン耐性を付与することから、*P. aeruginosa* の *PA2784* 遺伝子破壊株から自然突然変異法によりダロバクチン耐性株の取得を試み、*P. aeruginosa* において *PA2784*-86del 変異を介さないダロバクチン耐性機構（*bamA* 変異など）が存在するか否かを検討した。また、*P. aeruginosa* PAO1（親株）、*PA2784*-86del 変異株および *PA2784* 遺伝子破壊株の外膜透過性やダロバクチン以外の抗生物質に対する耐性を評価することにより、*PA2784*-86del 変異により外膜の特性や物質の取り込み能が変化しているか否かを調べた。またこれらに加え、*PA2784*-86del 変異によるダロバクチン耐性メカニズムの全体像を明らかにするため、RNA シーケンス解析を実施し、ダロバクチン存在下で発現が変動する遺伝子を調べた。

【結果】本研究では *P. aeruginosa* の *PA2784* 遺伝子破壊株からダロバクチン耐性株を取得することができなかった。このことから *P. aeruginosa* においては *bamA* 変異を介した耐性獲得は生じず、同菌におけるダロバクチン耐性獲得機構は、*PA2784* 遺伝子および、同一オペロン上に存在すると考えられている *PA2785* 遺伝子と *PA2786* 遺伝子が必要不可欠であることが示唆された。また *PA2784*-86del 変異株の外膜透過性は親株と同様であることも判明し、*PA2784*-86del 変異株においては、外膜透過性の低下によりダロバクチン耐性を獲得したわけではないことが明らかとなった。これと一致して *PA2784*-86del 変異株においては、他抗生物質に対する感受性は変化しておらず、ダロバクチンにのみ耐性を示すことも判った。また RNA シーケンス解析から、ダロバクチン存在下の *PA2784*-86del 変異株においては、物質の輸送に関与するタンパク質や、細胞壁合成酵素 D-アラニル-D-アラニンリガーゼなどの発現量が大きく変動していることを見出した。

P. aeruginosa における BamA 変異を介さないダロバクチン耐性メカニズム



104. 細胞外膜標的抗生物質に対する緑膿菌の耐性機構の解明

今井　優

信州大学 先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所

Key words：緑膿菌，薬剤耐性，細胞外膜，抗生物質，ダロバクチン

緒　言

薬剤耐性菌が大きな社会問題となっている。近年では新薬の開発が難しく、このまま何も対策がなされない場合、2050 年には感染症による死者が 1,000 万人を上回ると推測されている。細菌性感染症の中でも特にグラム陰性細菌は治療が困難とされている。グラム陰性細菌が有する外膜は、分子量が 600 ダルトン以上の化合物の細胞内への侵入を物理的に防いでいる。またこれに加え、同菌は発達した薬剤排出ポンプ（AcrAB-TolC 系など）を有している。これによりグラム陰性細菌はほとんどの抗生物質に対して耐性を獲得している。実際に、2017 年に世界保健機関により公表された「抗生物質の開発が急がれる病原菌リスト」では、12 種の内 9 種がグラム陰性細菌であった。現在グラム陰性細菌に対する特効薬として臨床の現場に導入されている抗生物質コリスチンは、1950 年に発見された抗生物質であるが、今日までコリスチンより効果的な抗生物質は発見されていない。一方、そのコリスチンにおいても腎毒性という問題点があり、新薬の開発が早急に求められていた。

従来の抗生物質探索研究は、放線菌や糸状菌といった特定の微生物が探索源として利用されてきた。これを背景に我々は、“これまで抗生物質の探索源として見落とされてきた微生物にも、有用な抗生物質を生産する能力があるのではないか？”と考え、線虫共生細菌 *Photorhabdus* 属細菌を探索源とした抗生物質探索研究に取り組んできた。その結果、*Photorhabdus khanii* からグラム陰性細菌に特異的な活性を示す抗生物質ダロバクチンを発見している［1］。ダロバクチンはグラム陰性細菌の BamA タンパク質（新生外膜タンパク質の折りたたみと外膜への挿入に関与する）に結合し、その働きを阻害することが知られている［2］。実際に、大腸菌 *Escherichia coli* において分離されたダロバクチン耐性株は全て *bamA* 遺伝子に変異を有していた。一方、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* からダロバクチン耐性株を分離してその変異点を調べたところ、*bamA* 遺伝子に変異は認められず、機能未知遺伝子 *PA2784* の上流 86 塩基のチミンが欠失する変異（*PA2784*-86del 変異）を有することが判った。これを背景に本研究では *PA2784*-86del 変異の特性解析を行い、ダロバクチン耐性メカニズムの解明を目指した。

方　法

1. *PA2784* 遺伝子破壊株からのダロバクチン耐性株の分離

P. aeruginosa の *PA2784* 遺伝子破壊株を寒天培地に接種し、シングルコロニー化した。これを 5 mL のミューラーヒントンⅡ液体培地（MHIIB）を用いて 37℃で振とう（220 rpm）し、一晩培養した。前培養液 1 mL を 100 mL の新しい MHIIB に接種し、37℃で対数増殖期まで振とう（220 rpm）培養した。遠心分離により培養上清を除去し、10 mL の PBS バッファーに懸濁後、これを MIC の 8 倍（16 μg/mL）のダロバクチンを含むミューラーヒントンⅡ寒天培地（MHIIA）に塗布し、37℃で 4 日間培養した。

2. ダロバクチンによる *P. aeruginosa* の死滅曲線

P. aeruginosa PAO1 を 3 mL の MHIIB を用いて 37℃で振とう（220 rpm）し、一晩培養した。前培養液 5 μL を 5 mL の新しい MHIIB に接種し、37℃で 1 時間振とう（220 rpm）培養した。培養液 2 mL を新しい

カルチャーチューブ 2 本に分配し、MIC の 16 倍（32 μg/mL）のダロバクチン添加もしくは非添加条件下で培養した。各培養時点（0、0.5、1、2、4、8 および 24 時間）で培養液 100 μL を回収し、遠心分離により培養上清を取り除いた。PBS バッファーで菌体を洗浄し、遠心分離により再度上清を取り除いた。洗浄作業を 2 回行った後、PBS バッファーに再懸濁し、段階希釈サンプルを調製した。これを LB 寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養後、出現したコロニー数（CFU：コロニーフォーミングユニット）を計測した。

3. 外膜透過性の評価

P. aeruginosa PAO1、*PA2784*-86del 変異株および *PA2784* 遺伝子破壊株を 3 mL の MHIIB を用いて 37℃で振とう（220 rpm）し、一晩培養した。前培養液 50 μL を 5 mL の新しい MHIIB に接種し、37℃で振とう（220 rpm）培養した。細胞濁度（OD_{600}）が対数増殖期後期（0.8）に達するまで培養後、MHIIB を用いて OD_{600}が 0.5 となるように希釈した。MIC の 4 倍（4 μg/mL）のコリスチン添加もしくは非添加条件下で 1 時間振とう（220 rpm）培養後、遠心分離により菌体を回収した。5 mM のグルコースを添加した 5 mM HEPES バッファー（5 mM GHEPES バッファー）を添加して菌体を洗浄後、遠心分離により再度上清を取り除いた。洗浄作業を 2 回行った後、菌体を 5mM GHEPES バッファーに再懸濁し、96 ウェルプレートに分配した。終濃度が 10 μM となるように N-フェニル-1-ナフチルアミン（NTN）を添加し、プレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した（Ex350、Em460）。

4. 各種抗生物質の *P. aeruginosa* に対する最小生育阻止濃度（MIC）の評価

P. aeruginosa PAO1、*PA2784*-86del 変異株および *PA2784* 遺伝子破壊株を 5 mL の MHIIB を用いて 37℃で振とう（220 rpm）し、一晩培養した。前培養液 50 μL を 5 mL の新しい MHIIB に接種し、37℃で振とう（220 rpm）培養した。細胞濁度（OD_{600}）が対数増殖期（0.1～0.9）に達するまで培養後、MHIIB を用いて OD_{600}が 0.001 となるように希釈した。様々な濃度の各種抗生物質溶液 2 μL を含む 96 ウェルプレートに *P. aeruginosa* 細胞を含む MHIIB 98 μL を分配し、混合後、37℃で一晩培養した。*P. aeruginosa* の生育の有無を目視により確認し、生育の阻害が認められた濃度を MIC とした。

5. *P. aeruginosa* PAO1 および *PA2784*-86del 変異株の RNA シーケンス解析

P. aeruginosa PAO1 および *PA2784*-86del 変異株を 3 mL の MHIIB を用いて 37℃で振とう（220 rpm）し、一晩培養した。前培養液 50 μL を 5 mL の新しい MHIIB に接種し、37℃で振とう（220 rpm）培養した。細胞濁度（OD_{600}）が対数増殖期（0.2～0.5）に達するまで培養後、ダロバクチン添加（32 μg/mL）または非添加条件下で 10 分間培養し、遠心分離により上清を除去した後、−80℃で菌体を保存した。RNA の抽出は、FastGene RNA Premium Kit（日本ジェネティクス株式会社）を用いて行い、RNA シーケンス解析は株式会社 Rhelixa に委託した。

結果および考察

1. *P. aeruginosa* にダロバクチン耐性を付与する *PA2784*-86del 変異

上述したように *E. coli* を対象とした先行研究では、*bamA* 遺伝子における変異がダロバクチン耐性に寄与することが判っている。一方、*P.aeruginosa* において自然突然変異法により分離されるダロバクチン耐性株は全て *PA2784*-86del 変異株であった（ダロバクチン耐性株の出現頻度 4.5×10^{-9}）。このことから、*P. aeruginosa* においては *bamA* 変異よりも *PA2784*-86del 変異が高頻度で生じ、その結果 *bamA* 変異株の出現がマスクされていることが示唆された。*P. aeruginosa* の *PA2784* 遺伝子破壊株［3］（トランスポゾン変異株であるため、同一オペロン上に存在する *PA2785* 遺伝子および *PA2786* 遺伝子も機能していないと考えられる）から自然突然変異法により、ダロバクチン耐性株の取得を試みたところ、同菌からダロバクチン耐性株を分離することができなか

った（ダロバクチン耐性株の出現頻度 1.8×10^{-10}未満）。BamA タンパク質はグラム陰性細菌における生存必須タンパク質であることを考慮すると、*E. coli* とは異なり *P. aeruginosa* においては、*bamA* 変異の多くが致死変異となるため、同遺伝子に変異を有するダロバクチン耐性株が出現せず、*PA2784*-86del 変異が唯一のダロバクチン耐性獲得変異であることが示唆された。またダロバクチンで処理された *E. coli* の死滅曲線では、同菌が 3～4 度の細胞増殖後に死滅することが判っている［1］。これは BamA の働きが阻害され、外膜タンパク質の合成が滞るためと考えられている。一方 *P. aeruginosa* の死滅曲線では、細胞数が増えることなく死滅することが明らかとなった（図 1）。このことから、*P. aeruginosa* には *E. coli* とは異なるダロバクチンの作用メカニズムが存在することが示唆された。

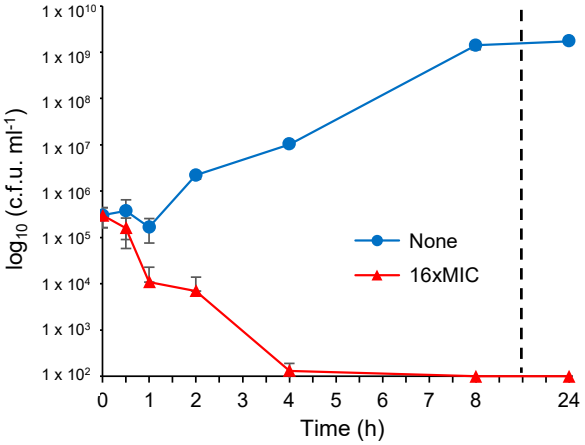


図 1. ダロバクチンで処理した *P. aeruginosa* の死滅曲線
各培養時点で *P. aeruginosa* 細胞を回収し、CFU を計測した。

2. *PA2784*-86del 変異が抗生物質耐性に及ぼす影響

PA2784-86del 変異により *P. aeruginosa* の細胞外膜の透過性が変化し、結果的にダロバクチン耐性の獲得につながったのではないかと考え、*P. aeruginosa* PAO1、*PA2784*-86del 変異株および *PA2784* 遺伝子破壊株の外膜透過性を評価した。本研究で使用した NTN は、細胞膜の疎水性領域に結合し蛍光を発する。そのため外膜の損傷などにより膜透過性が向上している細胞においてはその蛍光を強く検出することができる。コリスチン（外膜に作用する抗生物質）添加および非添加条件下で各 *P. aeruginosa* の NTN の取り込み率を調べたところ、親株の PAO1 とこれら変異株とでは同様であることが明らかとなった（図 2）。このことから、*PA2784*-86del 変異による外膜の透過性の向上は認められないことが判った。またこれを裏付けるように、*P. aeruginosa* に対する種々の抗生物質［DAR：ダロバクチン、MUR：ムレパヴァディン、POL：ポリミキシン B、COL：コリスチン（それぞれ細胞外膜を標的とする）、MER：メロペネム、VAN：バンコマイシン（それぞれ細胞壁合成を阻害する）、CIP：シプロフロキサシン（DNA 合成を阻害する）、TOB：トブラマイシン、CHL：クロラムフェニコール、ERY：エリスロマイシン（タンパク質合成を阻害する）］の MIC を評価したところ、ダロバクチン以外の抗生物質の MIC は同様であることが判った。これらの結果から、*PA2784*-86del 変異がダロバクチン耐性にのみ関与することが示唆された。

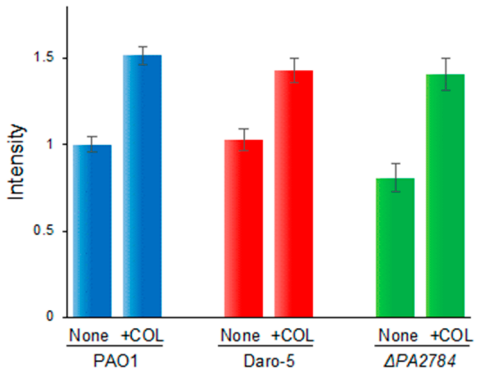


図 2. *P. aeruginosa* の膜透過性

P. aeruginosa における NTN の蛍光強度を測定した。

Daro-5：*PA2784*-86del 変異株（自然突然変異株）。

表 1. *P. aeruginosa* に対する各種抗生物質の MIC

Strain	MIC (μg ml^{-1})									
	DAR	MUR	POL	COL	MER	VAN	CIP	TOB	CHL	ERY
P. aeruginosa PAO1	2	0.5	1	1	4	>1024	0.125	0.5	128	256
P. aeruginosa ΔPA2784	2	0.5	1	1	4	>1024	0.125	1	256	512
P. aeruginosa Daro-1	32	0.5	1	1	4	>1024	0.125	0.5	128	256
P. aeruginosa Daro-5	32	0.25	1	1	4	>1024	0.125	0.5	128	256
P. aeruginosa Daro-9	32	0.25	1	1	4	>1024	0.125	1	256	512

Daro-1、Daro-5、Daro-9：*PA2784*-86del 変異株（自然突然変異株）。

3. *P. aeruginosa* PAO1 および *PA2784*-86del 変異株の RNA シーケンス解析

先行研究から、*PA2784*-86del 変異株においては、*PA2784* 遺伝子と近接する *PA2785* 遺伝子および *PA2786* 遺伝子が、*PA2784* 遺伝子とともに高発現していることが判っている（図 3a）。このことから、これら遺伝子は同一オペロン上に存在することが示唆されている。これら 3 つの遺伝子は機能未知タンパク質をコードするとされているが、PA2785 タンパク質は DNA 結合ドメインを、PA2786 タンパク質はタンパク質結合ドメインを有することが判っている。このことから、これら遺伝子の高発現により、他遺伝子の発現やタンパク質の動態が変化し、結果的にダロバクチン耐性の獲得に繋がっていることが示唆された。そこで、ダロバクチン添加および非添加条件下で *PA2784*-86del 変異株の RNA シーケンス解析を実施したところ、ダロバクチン存在下では、転写調節因子遺伝子（PA1196：transcriptional regulator DdaR）、輸送に関連する遺伝子（PA1719：typeⅢ export protein PscF）、ペプチダーゼ遺伝子（PA0277：putative Zn-dependent peptidase）、機能未知遺伝子（PA4517：conserved hypothetical protein）や細胞壁の合成に関与する遺伝子（PA4201：D-アラニル-D-アラニンリガーゼ）など数多くの遺伝子の発現が変動していることが判った（2 倍以上の発現量の上昇および減少が認められた遺伝子数はそれぞれ 484 遺伝子および 1,029 遺伝子）（図 3b）。一方、これまでの検討では遺伝子発現変動の全体像を知ることはできたものの、「*PA2784*-86del 変異により *P. aeruginosa* がいかにしてダロバクチン耐性を獲得しているのか？」を解明するまでには至っていない。そのため、これら発現変動遺伝子から、ダロバクチン耐性に関与する遺伝子を絞り込むため、今後は検体数を増やし、データの精度をさらに高めた上で、個々の遺伝子について検討していく。

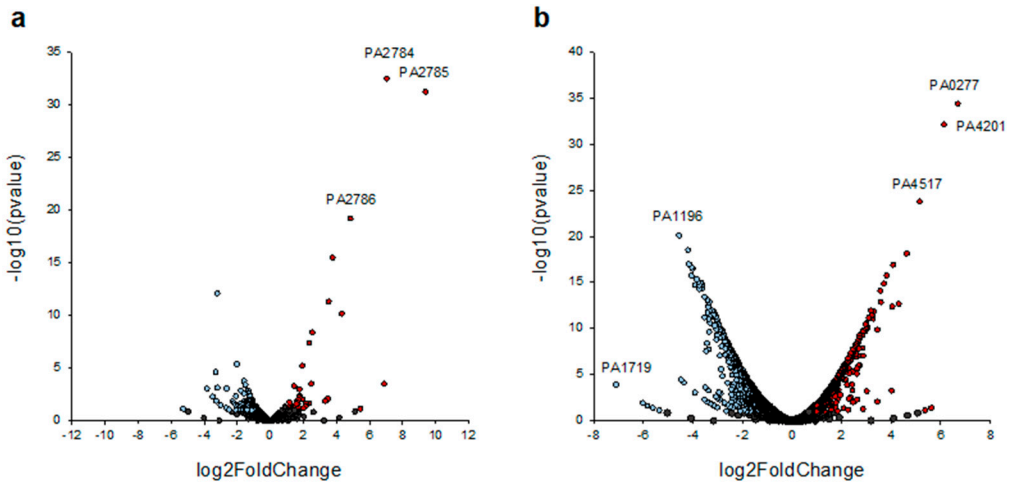


図 3. *P. aeruginosa* の RNA シーケンス解析

a) *P. aeruginosa* PAO と *PA2784*-86del 変異株の発現変動遺伝子。

b) ダロバクチン存在下または非存在下における *PA2784*-86del 変異株の発現変動遺伝子。

青丸は 2 倍以上の発現量の低下が認められた遺伝子を示し、赤丸は 2 倍以上の発現量の上昇が認められた遺伝子を示す。黒丸は顕著な変化が認められなかった遺伝子を示す。

共同研究者・謝辞

本研究は Northeastern University Antimicrobial Discovery Center との共同研究により行われたものであり、研究室主宰者の Kim Lewis 特別教授をはじめ、研究に携わってくださった博士研究員および大学院生の皆様に深く感謝いたします。また、本研究を進めるにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Imai Y, Meyer KJ, Iinishi A, Favre-Godal Q, Green R, Manuse S, Caboni M, Mori M, Niles S, Ghiglieri M, Honrao C, Ma X, Guo J.J, Makriyannis A, Linares-Otoya L, Böhringer N, Wuisan Z.G, Kaur H, Wu R, Mateus A, Typas A, Savitski M.M, Espinoza J.L, O'Rourke A, Nelson K.E, Hiller S, Noinaj N, Schäberle T.F, D'Onofrio A, Lewis K. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. Nature. 2019 Dec; 576(7787):459-464. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31747680 DOI: 10.1038/s41586-019-1791-1.

2) Kaur H, Jakob RP, Marzinek JK, Green R, Imai Y, Bolla JR, Agustoni E, Robinson CV, Bond PJ, Lewis K, Maier T, Hiller S. The antibiotic darobactin mimics a β-strand to inhibit outer membrane insertase. Nature. 2021 May; 593(7857):125-129. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33854236 DOI: 10.1038/s41586-021-03455-w.

3) Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenthner D, Bovee D, Olson MV, Manoil C. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003 Nov;100(24):14339-14344. Epub 2003 Nov 14. PMID: 14617778 DOI: 10.1073/pnas.2036282100.