

多剤耐性菌感染症克服を目指して



研究室紹介

西野 邦彦*

Development of drug efflux pump inhibitors to overcome multidrug-resistant bacterial infections

Key Words : Bacteria, Drug efflux pump, Inhibitor, Multidrug resistance

はじめに

抗菌薬で治療することが困難な薬剤耐性菌による感染症が増加しており、世界的に大きな問題となっている。人類と耐性菌の闘いは、前世紀半ばにフレミングが発見したペニシリンが医療現場で用いられ、以来ずっと続いており、新しい抗菌薬が開発されると、それに耐性を持つ菌が生じるということが繰り返されている。特に最近では、新型コロナウイルスの感染が広がり始めた当初、細菌性肺炎に似た症状であったことから、抗菌薬が処方される場合が多くあり、抗菌薬の誤用や過剰使用が細菌薬剤耐性を促進させ、別の危機を悪化させていることが懸念されている。このまま何も対策をしなければ、2050年には薬剤耐性に起因する死亡者数が1000万人に達することが予測されている¹⁾。

細菌感染症は、ともに生物である病原菌とヒトとのいわば食うか食われるかの戦いの姿であるといえる。薬が効かなくなるのは、菌側の必死の抵抗の結果であり、ヒトがよりよい薬を開発すると、菌もやがてそれへの耐性を獲得し、その戦いはいつまでも続く。敵を知り己を知れば百戦危うからず、といわれるが、私達の研究目的は、抗菌薬を効かなくさせる病原菌について、その適応能力を明らかにし、そのうえで我々のもつ力をどのように活用させるかを考えようとするところにある。研究を進めれば進め

るほど、薬を効かなくさせてしまう病原菌のたくましい適応力と進化の仕組みが明らかになってきた。同時に手強い敵と戦う対策を考える必要がある。現在、私達は耐性菌感染症克服を目指し、日々研究に励んでいる。

細菌薬剤耐性化機構

細菌が抗菌薬に対して耐性となる機構は、①修飾酵素・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、等に分類できる^{2),3)}。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物質を基質として排出するものを多剤排出ポンプと呼ぶ。多剤排出ポンプは、その幅広い基質認識性により、菌体内に流入した構造式の大きく異なる様々な薬剤を、各々の標的部位に到達する前に、水際阻止のような形で菌体外に排出すると考えられている。排出ポンプは、細菌の自然耐性と獲得耐性の両方に貢献しており、多剤耐性分離株の解析からも、多くの耐性株において多剤排出ポンプをコードする遺伝子の発現上昇が確認されている。多剤排出ポンプは耐性菌の問題を克服することの出来る創薬ターゲットとして注視されている²⁾⁻⁴⁾。

薬剤排出ポンプのポストゲノム解析と抗菌薬輸送機構

薬剤排出ポンプには特徴的なアミノ酸配列が保存されており、相同性検索から細菌が保持している排出ポンプの数を推定することができる。私達の研究室では、ゲノム配列解析から推測された細菌の排出



* Kunihiko NISHINO

1975年12月生まれ
大阪大学 大学院薬学研究科 分子薬科学専攻 博士後期課程修了(2003年)
現在、大阪大学 産業科学研究所(薬学研究科、感染症総合教育研究拠点 兼任)教授 博士(薬学)
専門/細菌学・薬学
TEL : 06-6879-8545
FAX : 06-6879-8549
E-mail : nishino@sanken.osaka-u.ac.jp

ポンプの薬剤耐性化への関与を調べ、複数種の細菌に数多くの薬剤排出ポンプが存在することを明らかにしてきた⁵⁾⁻⁷⁾。例えば、大腸菌で20個、また、サルモネラでも少なくとも10個の薬剤排出ポンプが存在していることを実験的に証明した(図1)。その他にも、緑膿菌、アシネトバクター、インフルエンザ菌、淋菌、肺炎球菌等の薬剤排出ポンプについても解析を行っており、排出ポンプの進化的解析についても研究を進めている⁷⁾。恒常的に発現しているポンプは、細菌の抗菌薬に対する自然耐性に寄与しており、また、ポンプ遺伝子の発現が上昇する

ことにより、細菌の獲得耐性に関与することも分かってきた⁸⁾⁻¹⁰⁾。大腸菌の主要な薬剤排出ポンプであるAcrBは、ホモ三量体であり、この内、一つのモノマーだけに薬剤が結合しており、各モノマーの立体構造が互いに異なっていることが明らかになった¹¹⁾。その構造から、各々のモノマーは待機モノマー、結合モノマー、排出モノマーと名付けられ、機能的回転機構によって薬剤が排出されていることが提唱された。その後、比較的分子量が大きなエリスロマイシン(分子量734)やリファンピシン(分子量823)といった薬剤は、結合モノマーではなく、待機モノマーの薬剤の取り込み口に近い位置に結合していることが分かった(図2)^{2),12)}。それに比べて分子量が小さいミノサイクリン(分子量457)とドキソルビシン(分子量544)結合部位は、AcrB

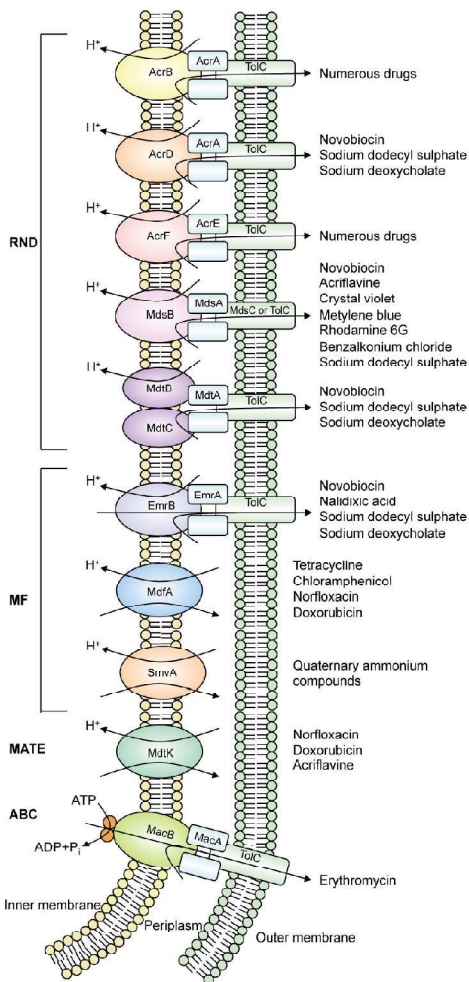


図1 サルモネラに存在する薬剤排出ポンプ群

サルモネラには10個の薬剤排出ポンプが存在している。多くの内膜ポンプがペリプラズム性タンパク質、外膜タンパク質と複合体を形成して機能していることも分かった。これら排出ポンプは、薬剤を細胞外に輸送するため細胞内の薬剤濃度が低下し、細菌の薬剤耐性化の原因となる。

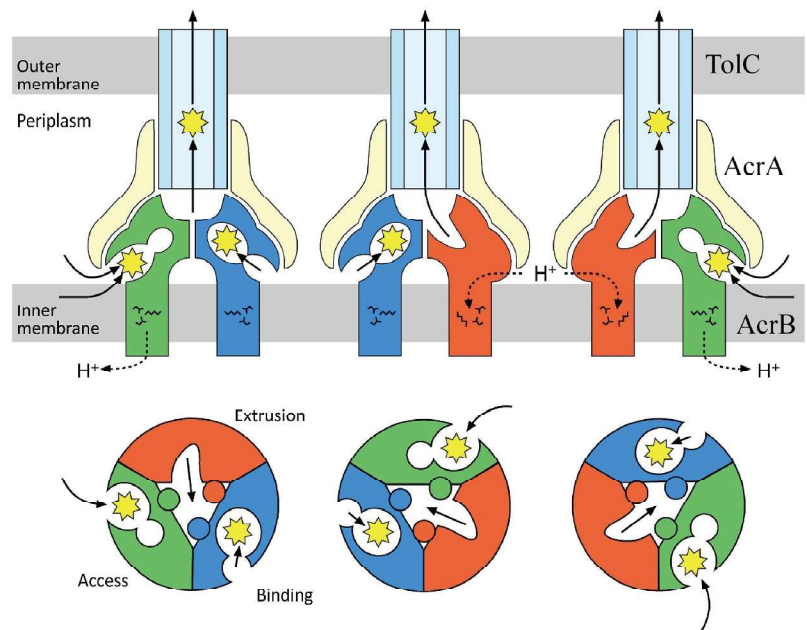


図2 薬剤排出システムAcrAB-TolCによる薬剤輸送機構

薬剤排出ポンプAcrBは大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌において機能している主要なポンプであり、複数の細菌において相同性のあるタンパク質が保存されている⁷⁾。内膜 (Inner membrane) タンパク質であるAcrBは、ペリプラズム性 (Periplasm) タンパク質AcrAおよび外膜 (Outer membrane) チャンネルTolCと複合体を形成して機能している。この内、AcrBが種々の薬剤を認識する本体であり、プロトン駆動力として薬剤をペリプラズムもしくは内膜から取り込み、排出している。AcrB三量体の各モノマーは、それぞれ異なる構造であり、待機 (Access)、結合 (Binding)、排出 (Extrusion) の順番で薬剤を輸送している。薬剤認識ポケットは入り口側に存在する近位ポケット (待機モノマー) と出口側に近い遠位ポケット (結合モノマー) の二つが存在することが分かった。エリスロマイシン (分子量734) やリファンピシン (分子量823) といった比較的分子量の大きい薬物は、一旦、近位ポケットに結合した後で、遠位ポケットに送り出されるといふペリスタポンプの機構によって輸送されていると考えられる²⁾。

モノマーのフェニルアラニン残基に富む領域であり、リファンピシンとエリスロマイシンの結合部位よりポンプ入り口から遠い部位（ポケット）に存在していた。各々の結合ポケットは、近位ポケット、遠位ポケットと名付けた¹²⁾。各ポケットの間はフェニルアラニンを先端にもつ短いループ構造により仕切られており、このループは待機モノマーから結合モノマーに移る際に大きくスイングしていることが分かった。エリスロマイシン等の近位ポケットに結合する薬剤は、ループのスイングを含む一連の構造変化により遠位ポケットに送り込まれると考えられた。大分子量の薬物は待機モノマーの段階でいったん近位ポケットに結合し、待機モノマーから結合モノマーへ移る際に遠位ポケットへと送りこまれ、最終的に排出モノマーの段階で出口から排出されることが分かった。近位ポケットから遠位ポケット、そして出口へという薬物の順送り機構が明らかになり、ペリスタポンプ排出機構により抗菌薬が排出されていることが分かった（図2）²⁾。

薬剤排出ポンプの阻害機構

現在、研究室では薬剤耐性化の問題を克服するため、ポンプ阻害機構解明と阻害剤開発の研究を進めている。既存のポンプ阻害剤としては、ピリドピリミジン誘導体 ABI-PP がある。ABI-PP は、大腸菌 AcrB ポンプや、緑膿菌の MexB ポンプの機能を阻害するが、多剤耐性緑膿菌で発現していることが認められるもう1つの薬剤排出ポンプ MexY を阻害できないため、臨床上有効では無い^{4),13),14)}。ABI-PP と AcrB ならびに MexB との共結晶構造解析の結果、トランスポーター基質であるミノサイクリンやドキシソルピシンと同様、ABI-PP は遠位ポケットに結合していることが判明した¹³⁾。しかし、基質薬剤とは異なり、ABI-PP はポケットから分岐した疎水性の狭い領域に突き刺さるような状態で結合しており、阻害剤結合ピットの存在が示唆された（図3）²⁾。ABI-PP は、遠位ポケットから分岐した疎水性ピットに強く結合することで、薬剤排出トランスポーターの機能的回転ペリスタポンプの運動を抑制していることが示唆された。AcrB および MexB の阻害剤結合ピット中腹にあるフェニルアラニンが、MexY では、より側鎖の大きいアミノ酸であるトリプトファンに置換されている。モデリング解析の結果、こ

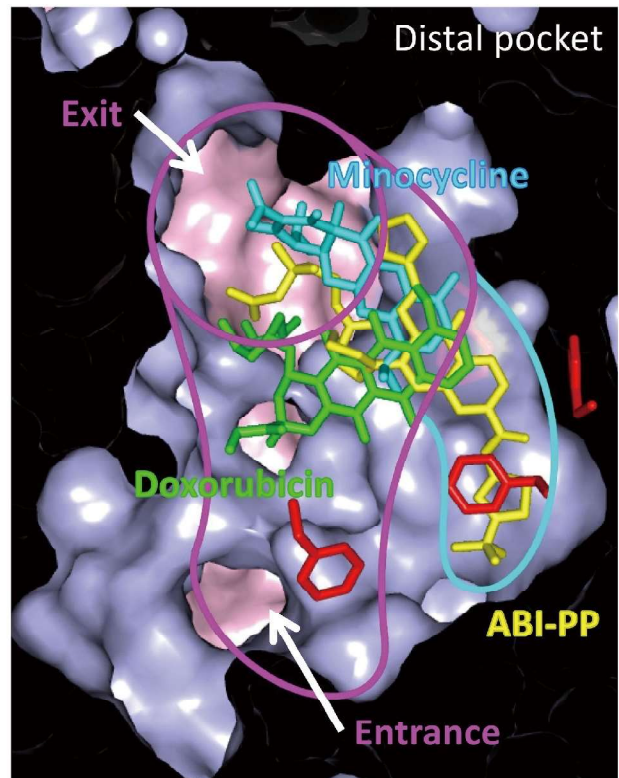


図3 薬剤排出ポンプ基質と阻害剤 ABI-PP の結合様式の違い

阻害剤 ABI-PP は、基質（図ではミノサイクリンおよびドキシソルピシンを示す）輸送経路から分岐した疎水性の狭い領域に深く入り込んで結合しており、阻害剤結合ピットの存在が確認された。阻害機構解明とともに、現在、私達の研究室では、複数のポンプを阻害することのできるユニバーサル阻害剤の開発に取り組んでいる。ポンプ機能をブロックすることで、より効率的に抗菌薬を細菌内に蓄積させることが可能になるため、多剤耐性化を軽減するだけでなく、既存抗菌薬を再活用にもつながる²⁾。

の大きな側鎖存在が、立体障害を引き起こし、ABI-PP が MexY に結合できないと考えられ、変異体を用いた結果からも、ABI-PP の阻害特異性は、結合ピット内部のごくわずかな立体障害によって決まることが示された^{13),14)}。これらの結果は、立体障害を回避する誘導体の設計に役立ち、複数の薬剤排出トランスポーターの活性を抑制することのできるユニバーサル阻害剤の開発につながると考え、現在、多剤耐性緑膿菌感染症を克服するための創薬研究を推進している。

おわりに

細菌の薬剤排出ポンプは阻害剤開発の魅力的なターゲットであり、薬剤耐性を克服し、既存の抗菌薬を再利用することにもつながる。さらに、薬剤排出

ポンプは生理的に病原性やバイオフィーム形成に関与していることも報告されており、阻害剤は、これらの現象も軽減する効果が期待できる。これまでに報告された阻害剤の代表的なものとして、PAβNとABI-PPが存在する。PAβNは真核細胞に対して毒性を示すことから、臨床的には用いられていない。また、ABI-PPは大腸菌のAcrBと緑膿菌のMexBの遠位ポケットとポケットから分岐した疎水性領域に結合し、排出ポンプの機能を阻害するが、多剤耐性緑膿菌で発現することの多いMexYポンプの機能を阻害できないため、臨床的に有効ではない。細菌には複数の薬剤排出ポンプが存在するため、臨床応用のためには、複数の主要なポンプの機能を同時に阻害できる化合物の開発が必要と考えられる。これら排出ポンプの理解は、より効果的な阻害剤の設計につながる。現在、耐性機構の研究¹⁵⁾やポンプ阻害剤開発¹⁶⁾以外にも、AI技術を用いて細菌画像から耐性菌を検出する手法の開発や¹⁷⁾、細菌生育に必須となる酵素をターゲットとした新規抗菌薬の開発にも取り組んでおり、今後も研究室の総力をあげて多剤耐性菌感染症克服を目指す。

参考文献

- 1) O'Neill J: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom, 2016
- 2) Nishino K, Yamasaki S, Nakashima R, Zwama M, Hayashi-Nishino M: Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Front Microbiol* 12: 737288, 2021
- 3) Zwama M, Nishino K: Ever-adapting RND efflux pumps in Gram-negative multidrug-resistant pathogens: A Race against time. *Antibiotics* 10: 774, 2021
- 4) Fujiwara M, Yamasaki S, Morita Y, Nishino K. Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB- or MexXY-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* using nucleic acid dyes. *J Infect Chemother* 28: 595-601, 2022
- 5) Nishino K, Yamaguchi A: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 5803-5812, 2001
- 6) Nishino K, Latifi T, Groisman EA: Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 59: 126-141, 2006
- 7) Zwama M, Yamaguchi A, Nishino K: Phylogenetic and functional characterisation of the *Haemophilus influenzae* multidrug efflux pump AcrB. *Commun Biol* 2: 340, 2019
- 8) Yamasaki S, Nikaido E, Nakashima R, Sakurai K, Fujiwara D, Fujii I, Nishino K: The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. *Nat Commun* 4: 2078, 2013
- 9) Yamasaki S, Nakashima R, Sakurai K, Baucheron S, Giraud E, Doublet B, Cloeckaert A, Nishino K: Crystal structure of the multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids. *Sci Rep* 9: 177, 2019
- 10) Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A: Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim Biophys Acta* 1794: 834-843, 2009
- 11) Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A: Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443:173-179, 2006
- 12) Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* 480:565-569, 2011
- 13) Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Hayashi K, Nagata C, Hoshino K, Onodera Y, Nishino K, Yamaguchi A. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* 500:102-106, 2013
- 14) Yamasaki S, Koga N, Zwama M, Sakurai K, Nakashima R, Yamaguchi A, Nishino K. Spatial characteristics of the efflux pump MexB determine inhibitor binding. *Antimicrob Agents Chemother*: in press, 2022
- 15) Zwama M, Nishino K. Proximal binding pocket Arg717 substitutions in *Escherichia coli* AcrB cause clinically relevant divergencies in

- resistance profiles. *Antimicrob Agents Chemother* 66: e0239221, 2022
- 16) Yamagishi A, Nakano S, Yamasaki S, Nishino K. An efflux inhibitor of the MacAB pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiol Immunol* 64: 182-188, 2020
- 17) Hayashi-Nishino M, Aoki K, Kishimoto A, Takeuchi Y, Fukushima A, Uchida K, Echigo T, Yagi Y, Hirose M, Iwasaki K, Shin'ya E, Washio T, Furusawa C, Nishino K. Identification of bacterial drug-resistant cells by the convolutional neural network in transmission electron microscope images. *Front Microbiol* 13: 839718, 2022



K. Iwa