

## *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性化に寄与する薬剤排出システム

後藤直正

京都薬科大学微生物学教室\*

(平成 11 年 3 月 11 日受付・平成 11 年 3 月 24 日受理)

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のキノロン耐性の研究は、その作用標的の変異や外膜透過経路の消失では説明できなかった耐性機構を明らかにした。その機構とは、本菌染色体上にコードされ、染色体上の *nalB*, *nfxB* および *nfxC* 遺伝子座の変異により、染色体上にコードされた 3 種類の薬剤排出システム (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN) の高発現によるものである。このそれぞれのシステムは、内膜蛋白質 (MexB, MexD, MexF) と外膜蛋白質 (OprM, OprJ, OprN), さらにそれらをリンクするペリプラスム蛋白質 (MexA, MexC, MexE) によって構成され、細胞内に透過した抗菌薬を細胞外に能動的に排出することにより、抗菌薬の細胞内濃度を減少させる。さらに、緑膿菌の種々の抗菌薬に対する自然耐性が、野生株でもわずかに発現した MexAB-OprM に起因することがわかった。緑膿菌感染症の抗菌化学療法を円滑に進めるためにも本排出システムの機構のさらなる解明が望まれる。

**Key words:** 自然耐性, 獲得耐性, マルチコンポーネント, RND family, 能動的排出

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、尿路障害、呼吸器障害、重度の火傷や癌などの基礎疾患を持つ免疫不全患者に重篤な感染症を引き起こすグラム陰性菌である。本菌感染症の治療の問題点の 1 つは、本菌が種々の抗菌薬や消毒薬に対して自然耐性を示すところにある。本菌感染症の治療を目的として、セフェム、ペニシリン、フルオロキノロンやカルバペネムなどの抗緑膿菌活性の高い抗菌薬が開発されてきた。これらの抗菌薬は、緑膿菌感染症の治療に有効性を示した一方で、新たな耐性菌の出現をもたらした。

グラム陰性細菌の抗菌薬耐性は、i) 抗菌薬に対する作用標的の親和性の減少、ii) 抗菌薬を不活化する加水分解酵素や修飾酵素の産生、および iii) 抗菌薬の透過経路の消失、言い換えれば外膜透過性の減少により起こると考えられてきた。これらの機構のうち、作用標的の親和性の減少や不活化酵素産生による耐性化は、構造的に類似した抗菌薬の間での狭い交差耐性に限られている。たとえば、 $\beta$ -ラクタマーゼが高度に産生されても、その基質が $\beta$ -ラクタム薬に限られるために、他の構造的に異なる抗菌薬に対する耐性化をもたらさない。また、同じようにキノロンの作用標的である DNA gyrase や DNA topoisomerase IV の変異による耐性化もキノロンに限られる。これらの耐性機構が重なった多剤耐性株の出現は古くから研究されてきたが、キノロンに対する耐性機構の最近の研究は、従来の機構とは異なる耐性変異の機構を明らかにした。これらの耐性変異によって多剤耐性化した緑膿菌は臨床でも頻繁に分離され、本菌治療に明らかな障害となっている。本稿は、その新しい耐性機構である薬剤排出機構の発見の経緯と緑膿菌の自然耐性や耐性化への本機構の関与を著者の研究成果を中心にまとめたものである。

### I. 緑膿菌における薬剤排出機構研究の背景

Rella と Haas<sup>1)</sup> は、緑膿菌のキノロンに対する耐性機構を調べる目的で、ナリジクス酸耐性株を実験室株から分離し、その性状を調べた。その結果、DNA 生合成に関与する機構の変異により耐性化がもたらされる場合と、機構は明確ではないが DNA 生合成に関与する機構の変異では説明できない耐性機構があることを報告した。一方、Hirai らのグループ<sup>2-4)</sup> は、ノルフロキサシンの開発当初から、それに対する緑膿菌の耐性機構の研究をはじめていた。その過程で、DNA gyrase の変異により耐性化した *nalA* 変異株に加えて、新しいタイプの多剤耐性、すなわち構造的に類似性のない抗菌薬にまで広範囲な耐性化を引き起こす機構の存在の可能性を報告した (著者らが作成した変異株を使って Hirai らの結果を再現した結果を Fig. 1 および Table 1 に示した)。これらの耐性変異は、緑膿菌染色体上の異なる 3 つの遺伝子座 (*nalB*: 約 20 分, *nfxB*: 約 45 分, *nfxC*: 約 70 分) のそれぞれの変異によりもたらされ、共通してキノロン、テトラサイクリンおよびクロラムフェニコールに対する耐性をもたらす一方で、 $\beta$ -ラクタムを含む種々の抗菌薬に対して、それぞれの変異に特徴的な感受性の変化をもたらすことがわかった。すなわち、*nalB* 変異株では、ペニシリン、セフェムおよびメロベネムタイプのカルバペネムなど広い範囲の $\beta$ -ラクタムに対する耐性化が、また *nfxB* 変異株では第 4 世代セフェムに対する耐性化が観察される。しかし、*nfxB* 変異株では、逆に通常のセフェム、ペニシリン、カルバペネムおよびアミノ配糖体に対する高感受性化が見られた (この原因につ

\*京都府京都市山科区御陵中内町 5

いては後述する)。 *nfxC* 変異株では、 *nfxC* 変異に伴って起こる 46-kDa の外膜蛋白質 OprD の産生量の減少により、カルバペネムに対する耐性化が起こる。これらの耐性変異株の性状解析が行われた結果、この感受性の低下は、抗菌薬の細胞内蓄積量の減少に起因することがわかった。さらに変異に特徴的な外膜蛋白質の過剰産生が引き起こされることが観察されたが、これが蓄積量の減少とどのような関係があるのか明確な結論は得られなかった。これらの外膜蛋白質の過剰産生の現象は、のちに Masuda ら<sup>5)</sup>により *nalB* 変異によるものを OprM (Mr, 49-kDa)、 *nfxB* 変異によるものを OprJ (Mr, 54-kDa)、 *nfxC* 変異によるものを OprN (Mr, 50-kDa) と命名された。

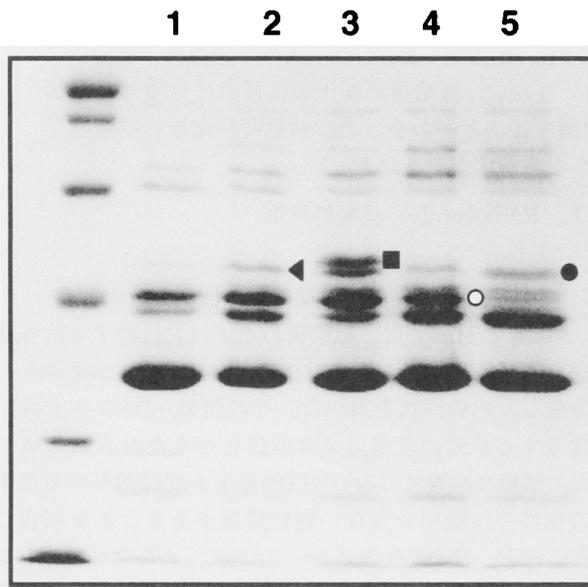


Fig. 1. Outer membrane proteins of quinolone-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and their parent strains stained with Coomassie. Lanes: 1, PAO 1; 2, OCR 1 (PAO 1 *nalB*); 3, KG 3000 (PAO 1 *nfxB*); 4, PAO 4222; 5, KG 4001 (PAO 4222 *nfxC*). Symbols: Closed triangle, OprM (49-kDa); closed square, OprJ (54-kDa); open circle, OprD (46-kDa); closed circle, OprN (50-kDa).

1つの遺伝子座の変異により、まったく系統の異なる抗菌薬に対しても耐性化が波及することは従来の薬剤耐性機構とは異なる新規な耐性機構の存在を示唆するものであり、このような多剤耐性株の蔓延は臨床的に憂慮すべき事態であると考えられた。そこで、この問題に対処するためには、まずこれらの多剤耐性化の機構の解明が必要であると考えられた。

## II. OprM の欠損株の分離

抗菌薬が作用標的に到達するためには、まず第一に外膜を透過せねばならない。その透過経路の1つは、ポーリン (pore-forming protein; 孔形成蛋白質) により形成されたチャンネルであり、比較的分子量の小さい親水性溶質、たとえば糖質、アミノ酸を取り込むために機能している一方で、 $\beta$ -ラクタムやキノロンなどの親水性の低分子量抗菌薬の外膜透過の経路でもある。したがって、このポーリンの減少や欠損は、これらの抗菌薬に対する耐性化の原因となることは、*E. coli* の実験でよく知られてきた事実である。しかし、ある種の外膜蛋白質の増加が起こる耐性の場合には、ポーリンの減少や欠損とはまったく逆であり、その機構を説明することはできない。そこで、これらの多剤耐性化に伴って過剰産生される外膜蛋白質の多剤耐性への寄与に関して、これらの外膜蛋白質が多剤耐性化には関与せず、耐性化とは関係のない機能を持つものであるという考えと、多剤耐性化機構の何らかに寄与するものであるとの2つの相反する考えがあった。しかし、もしこれらの外膜蛋白質が多剤耐性化に関与するのであるならば、これらの蛋白質の性状と機能の研究は、多剤耐性化の機構の解明のための重要な手がかりとなると考えられた。そこで、著者は、*nalB* 型多剤耐性変異で過剰産生される OprM の欠損株を分離し、OprM と多剤耐性化との関係を明らかにすることを試みた<sup>6,7)</sup>。すなわち、OprM が多剤耐性と無関係であるならば、OprM の欠損は *nalB* 変異株の多剤耐性になんら影響を与えないし、逆に OprM が *nalB* 型の多剤耐性に関与するならば、欠損により多剤耐性が消失することが予想された。この作業仮説を検証するには、

Table 1. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains to antimicrobial agents

Strain <sup>a)</sup>	Mutation	Alteration of OMPs <sup>b)</sup>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )						
			NFLX	OFLX	IPM	CBPC	CAZ	CPR	GM
PAO 1			0.78	0.78	1.56	50	1.56	0.78	6.25
OCR 1	<i>nalB</i>	OprM <sup>+++</sup>	3.13	6.25	1.56	400	12.5	6.25	6.25
KG 3000	<i>nfxB</i>	OprJ <sup>+++</sup>	12.5	12.5	0.78	25	1.56	12.5	1.56
PAO 4222			0.78	0.78	1.56	50	1.56	0.78	6.25
KG 4001	<i>nfxC</i>	OprN <sup>+++</sup> OprD <sup>-</sup>	12.5	12.5	6.25	25	1.56	0.78	1.56

<sup>a)</sup>OCR 1 and KG 3000 are spontaneous *nalB* and *nfxB* mutants, respectively, from PAO 1; and KG 4001 is a spontaneous *nfxC* mutant from PAO 4222.

<sup>b)</sup> + + +, overproduction; -, decreased production.

NFLX: norfloxacin, OFLX: ofloxacin, IPM: imipenem, CBPC: carbenicillin, CAZ: ceftazidime, CPR: cefpirome, GM: gentamicin

OprM の正確な検出法の確立が必要とされた。そこで、本蛋白質を *nalB* 変異株からイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、得られた標品を用いて抗 OprM マウス抗血清を作成した。この抗血清の反応性を調べるために行ったイムプロットから、作成した抗血清は、*nalB* 変異株 (KG 2213) 中の 49-kDa の外膜蛋白質 OprM を特異的に認識することが確認された (Fig. 2, lane 4)。さらに、OprM は、野性株でもわずかに産生されていることがわかった (Fig. 2, lane 1)。次に、トランスポゾン挿入変異により OprM 欠損株を分離することを試みた。トランスポゾン Tn5 を持つプラスミド pUW 964 を保有する大腸菌と PAO 4141 株またはその *nalB* 変異株 (KG 2113) との間の接合により、Tn5 がランダムに染色体上に転移した挿入変異株のバンクを作成した。このバンクから OprM 欠損株を、先に作成

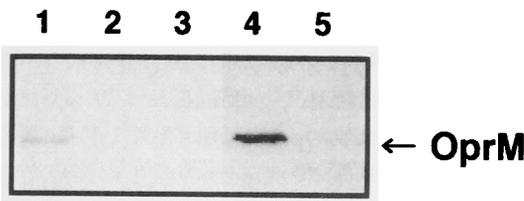
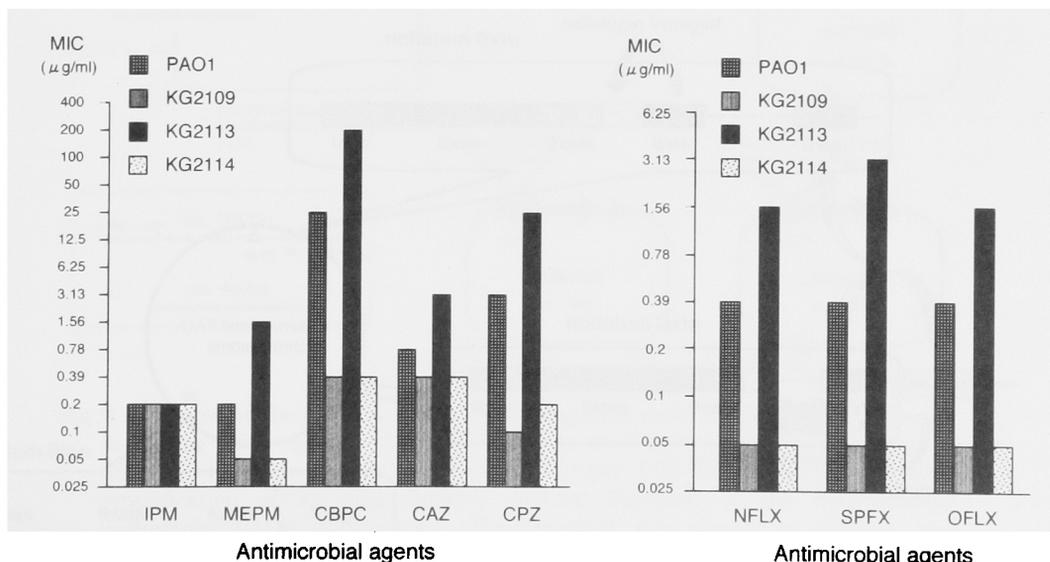


Fig. 2. Outer membrane proteins of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and their parent strains with Western immunoblots using murine polyclonal antiserum directed to OprM. Lanes 1, PAO 4141 (parent); 2, KG 2109 (OprM-deficient PAO 4141); 3, KG 2110 (OprM-deficient PAO 4141); 4, KG 2113 (PAO 4141 *nalB*); 5, KG 2114 (OprM-deficient KG 2113).

した抗血清を用いてスクリーニングしたところ、PAO 1 から 2 株 (KG 2109 および KG 2110; Fig. 2, lanes 2 および 3), KG 2113 から 1 株 (KG 2114; Fig. 2, lane 5) が得られた (Fig. 2)。これらの株とその親株の  $\beta$ -ラクタム (イミペネム, メロペネム, カルベニシリン, セフトジジム, セフォペラゾン) およびキノロン (ノルフロキサシン, スパフロキサシン) に対する感受性を測定したところ、次のことがわかった。OprM の過剰産生 (KG 2113) によっても、逆に OprM が欠損 (KG 2109 および KG 2114) してもイミペネムに対する感受性はまったく変化しなかったが、OprM の欠損はキノロンおよびイミペネムを除く  $\beta$ -ラクタムに対する耐性を消失させた (Fig. 3)。このように OprM の欠損により耐性度が減少したこと、さらにその高感受性が構造的に類似性のない抗菌薬にまで波及することは、明らかに OprM が *nalB* 型多剤耐性に関与することを示す結果である。また意外なことに、OprM の欠損は野性株 (PAO 4141) の種々の抗菌薬に対する感受性を上昇させた。一方、OprM 過剰産生株での欠損でも、同じ程度にまで高感受性化した。これは、野性株や過剰産生株で産生された OprM の欠損に起因する結果であり、OprM は多剤耐性変異だけではなく、自然耐性にも関与していることを結論させた。

### III. 緑膿菌の薬剤排出システム MexAB-OprM の同定

前述のように、OprM が緑膿菌の抗菌薬自然耐性や *nalB* 型多剤耐性の発現に関与していることが明らかになったところ、カナダの Poole らのグループは緑膿菌における鉄代謝の研究の過程で、緑膿菌染色体上に 3 種の遺伝子から構成されるオペロン *mexA-mexB-oprK* を



IPM: imipenem, MEPM: meropenem, CBPC: carbenicillin, CAZ: ceftazidime, CPZ: cefoperazone, NFLX: norfloxacin, SPFX: sparfloxacin, OFLX: ofloxacin

Fig. 3. Comparison of susceptibility of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and their parent strains. KG 2109 and KG 2114 are OprM-deficient mutants of PAO 4141 and KG 2113 (PAO 4141 *nalB*), respectively.

クローン化した<sup>8,9)</sup> (Fig. 4)。彼らは、コンピューター解析から、このオペロンの機能として次のことを報告した。それは、第1番目の遺伝子 *mexA* が、MF (膜融合蛋白質; membrane fusion proteins) ファミリー蛋白質とホモロジーの高い約 40-kDa のペリプラスムコンポーネント MexA をコードすること、第2番目の遺伝子 *mexB* が、薬剤排出や細胞代謝物の分泌や細胞分裂に参与する RND (resistance-noduration-division) ファミリーのトランスポーターとホモロジーの高い約 110-kDa の内膜コンポーネント MexB をコードすること、さらに第3番目の遺伝子 *oprK* が約 50-kDa の外膜コンポーネント OprK の遺伝子であり、3種のコンポーネントが共同して菌体内に透過した抗菌薬分子を能動的に排出するシステムである。そして、このシステムの過剰産生による細胞内抗菌薬の排出の亢進により緑膿菌は多剤耐性化するというものであった。その後、作成したノックアウト株で、キノロンをはじめ、種々の抗菌薬の細胞内蓄積量の増加と、それに伴った緑膿菌の感受性の上昇が確かめられ、また、プロトン勾配を消失させる作用を持つアンカプラーにより、この排出システムの機能が阻害されることから、プロトン依存的に機能する排出システムであると推測された<sup>10)</sup>。

Poole らのグループによって作成された *mexAB-oprK* オペロンを構成する遺伝子の破壊株での抗菌薬感受性の上昇の結果は、著者らが分離した OprM 欠損株の性状と非常に似ていた。そこで、外膜蛋白質をコードする *oprK* 遺伝子と多剤耐性化に参与する外膜蛋白質 OprM との関係について、*oprK* 遺伝子の DNA 塩基配

列をもとに合成したプライマーを用いた PCR と、さきにより作成した抗 OprM 抗血清を用いたイムノプロットにより調べた<sup>11)</sup>。もし、OprM が *oprK* とは異なる遺伝子にコードされるなら、Tn 5 挿入 OprM 欠損株で野性型の *oprK* と同じ大きさの DNA 断片の増幅が見られるはずである。そこで、Tn 5 挿入 OprM 欠損株 KG 2109, KG 2110, KG 2114 およびその親株のゲノム DNA を鋳型に *oprK* 遺伝子を増幅した。その結果、親株 PAO 4141 やその *nalB* 変異株 KG 2113 では、野性型と同じサイズの *oprK* が増幅されたが、KG 2109 と KG 2110 では増幅は観察されなかった。これは、Tn 5 の挿入の結果、*oprK* の断片が通常の PCR では増幅できないほどに巨大化したことに起因すると考えられた。一方、*mexA* および *mexB* を増幅するためのプライマーを用いた場合には、KG 2114 では *mexB* に挿入されていることがわかった。この *mexB* 遺伝子の破壊は、その下流に存在する *oprM* 遺伝子の転写を抑制すること、すなわち *mexB* と *oprM* が1つの転写単位内に並んで存在することは、*mexB* 破壊株での MexB および OprM の欠損、さらに、MexAB-OprM 発現プラスミドでの形質転換によるこれらの株での OprM の産生の復帰と *oprK* の破壊によって消失した多剤耐性化の OprM 産生の復帰による回復から明らかとなった。こうして、OprM が *mexAB-oprK* オペロンの第3番目の遺伝子 *oprK* にコードされていることがわかり、さきに命名された Mex オペロンは *mexAB-oprM* と改名された (Fig. 4)。その後の研究から、このオペロンの発現は、その上流に反対向きに存在する *mexR* 遺伝子により負に制御されてい

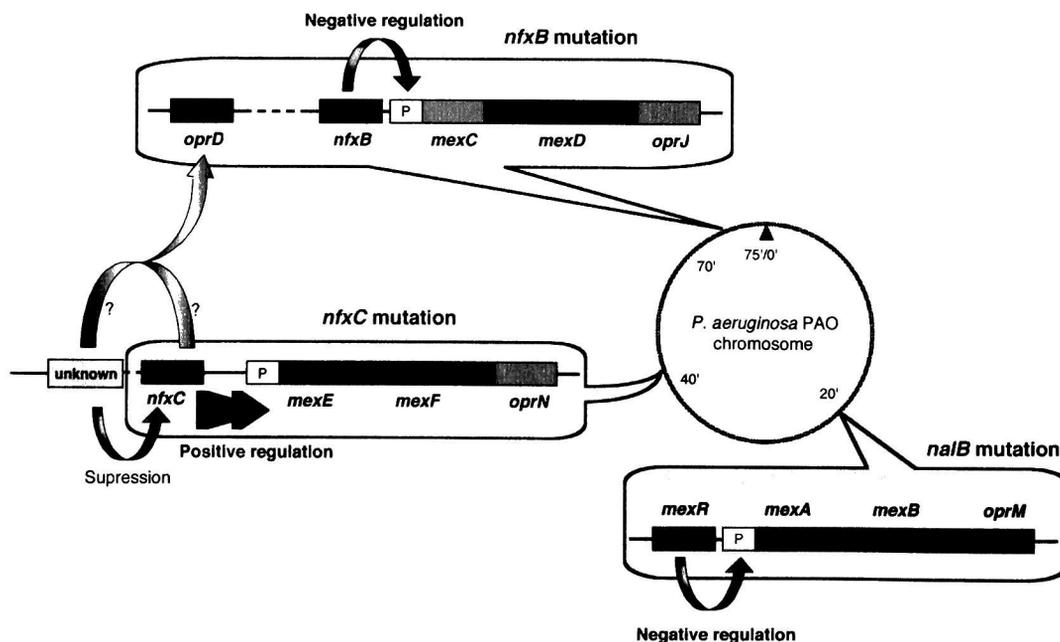


Fig. 4. Three multidrug efflux operons on the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO and their regulation.

ること、その抑制の弱さから野性株では *mexAB-oprM* がわずかに発現していること、さらに *mexAB-oprM* の高発現は *mexR* の変異により起こることがわかった。

#### IV. 緑膿菌の他の薬剤排出システム MexCD—OprJ および MexEF—OprN の同定

外膜蛋白質 OprM を構成蛋白質の1つとする多剤排出システム MexAB—OprM の存在と、*nalB* 型多剤耐性が、染色体上にコードされた高発現によって引き起こされることが示されたことは、同じように特徴的な外膜蛋白質の過剰産生をもたらす *nfxB* および *nfxC* 型の多剤耐性変異も未知の多剤排出システムと関連していることを予想させた。そこで、*nfxB* 変異により過剰産生される OprJ をもとに、*nfxB* 変異と関連した未知の多剤排出システムのクローニングを行った<sup>12)</sup>。この概要は Fig. 5 に示した。すなわち、*nfxB* 変異株で過剰産生された OprJ 蛋白質をイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、トリプシンでの消化後、得られた断片の部分アミノ酸配列を決定した。この配列をもとに混合オリゴ DNA プライマーを作成し、PAO 1 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、約 500 bp の断片が増幅された。この断片の DNA 塩基配列中に、さきに決定し

たアミノ酸配列に相当する配列が含まれていた。そこで、得られた DNA 塩基配列を基に新しく作成したプライマーを用いて PCR を行ったところ、約 450 bp の断片が増幅された。これをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、約 10 kb の *Bam* HI 断片と約 5 kb の *Kpn* I 断片とのハイブリダイズが観察されたので、それらの断片をベクター pAK 1900 上にクローニングし、プラスミド pKMJ 003 および pKMJ 002 を得た。これらの断片の制限酵素地図 (physical map) を作成したところ、*Kpn* I 断片は *Bam* HI 断片の一部であることがわかった。そこで、この *Bam* HI 断片の DNA 塩基配列を決定したところ、この断片中には、単一のプロモーターから転写されるオペロンを形成する 3 種の open reading frame (ORF) と、その上流に逆向きに制御遺伝子 *nfxB*<sup>13,14)</sup> の配列が含まれていた。また、このオペロン遺伝子の産物が、*nalB* 変異株で過剰産生される MexAB—OprM のそれぞれと約 50% のホモロジーを持つことが示された。これは、新しくクローニングしたオペロンにコードされた産物と MexAB—OprM との機能的な類似性を示唆しているので、新しくクローニングしたオペロンを *mexC-mexD-oprJ* と名づけた (Fig. 4)。

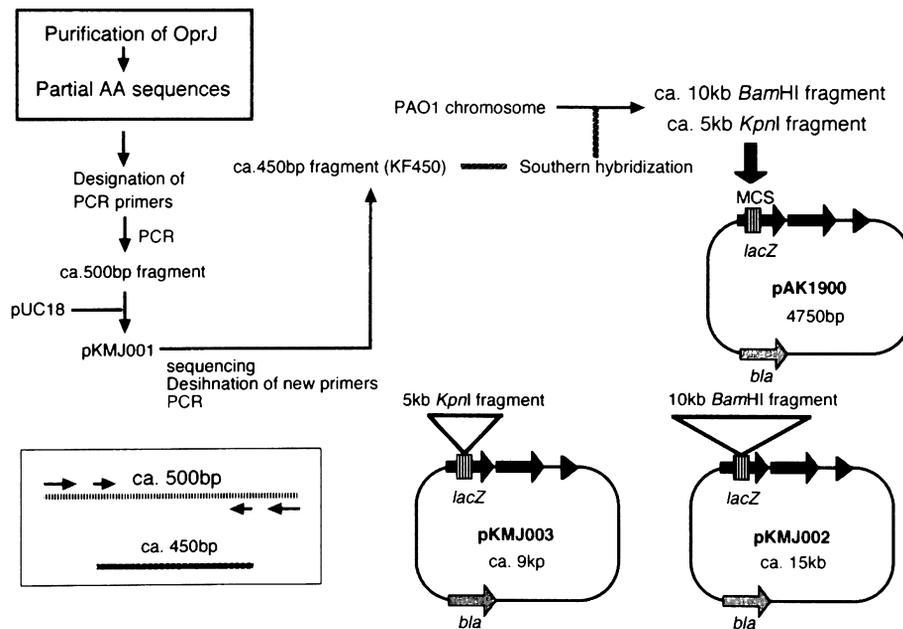


Fig. 5. Scheme of cloning of a chromosomal fragment containing *mexC-mexD-oprJ* multidrug efflux operon. Oligo-DNA primers were synthesized, based on partial amino acid (AA) sequences from the purified OprJ. PCR using those primers led to amplification of an approximately 500-bp fragment of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 chromosome. The fragment was cloned on pUC 18, and sequenced. New oligo-DNA primers were synthesized, based on the obtained sequence. PCR using those primers led to amplification of an approximately 450-bp fragment (KF 450) of the *P. aeruginosa* PAO 1 chromosome. Southern hybridization using KF 450 a probe identified approximately 10-kb *Bam* HI and 5-kb *Kpn* I fragments containing almost of a OprJ-encoding gene. These fragments were cloned at a multicloning site on *Escherichia coli*-*P. aeruginosa* shuttle vector pAK 1900 to yield pKMJ 002 and pKMJ 003.

さらに、そのオペロンの上流に逆向きに位置する *nfxB* 遺伝子が *mexCD-oprJ* オペロンの発現を負に制御し、*nfxB* 遺伝子内の変異によりその抑制が解除され、本オペロンが高発現することがわかった。また、本オペロンの発現により過剰産生された MexCD-OprJ システムが細胞内の薬物濃度を減少させる役割を担っていることが確かめられた。また、*mexCD-oprJ* オペロンの発現量は明らかに *nfxB* 型多剤耐性の程度と相関した<sup>15)</sup>。さらに、臨床分離株からも *nfxB* 変異、すなわち、*mexCD-oprJ* オペロンの高発現株が出現することも確かめられた<sup>16)</sup>。これらの結果は、緑膿菌の染色体上に第2の排出システムがコードされていること、さらにこのオペロンが緑膿菌の滞在耐性化を引き起こすものであることを示す結果であった。

次に、*nfxC* 変異における多剤耐性化の原因を探るべく、緑膿菌染色体上の第3の排出オペロンのクローニングをスイスのグループと共同で行った<sup>17)</sup>。その結果、精製した OprN の部分アミノ酸配列をコードする遺伝子断片がクローン化された。その断片上には4種の ORF が同じ向きに存在し、第2番目の ORF から第4番目の ORF までが、単一のプロモーター下で転写されるオペロンを形成し、第1番目の ORF はこのオペロンの転写を促進する機能を持つことがわかった (Fig. 4)。第2番目の ORF から第4番目の ORF がコードするアミノ酸配列は、MexAB-OprM および MexCD-OprJ のそれぞれと約 50% のホモロジーを有することがわかり、このオペロンを *mexE-mexF-oprN*、そして第1番目の ORF を *nfxC* と命名した (Fig. 4)。一方、精製した OprN をもとに作成した抗 OprN マウス単クローン抗体を用いたイムノブロットから *mexEF-oprN* オペロンは野生株では発現せず、*nfxC* 変異により過剰発現することがわかった。このことから *mexEF-oprN* オペロンの発現を負に制御する未知の遺伝子の存在が示唆されたが、そ

れらについてはまだ明らかではない。

#### V. 薬剤排出システムの多剤耐性化への役割

以上のように、緑膿菌染色体上には少なくとも3種の薬剤排出オペロンが存在することがわかった。これらのオペロンにコードされた排出システムの緑膿菌の多剤耐性への寄与を調べるために、排出システムの過剰産生株と破壊株を作成し、各種抗菌薬の感受性を測定した。それらの結果のうち、フルオロキノロンに関するものを Table 2 に示した。それぞれの排出システムの過剰産生株 (KG 2109<sup>6)</sup>, KG 3000<sup>16)</sup>, PAO-7 H<sup>18)</sup>) は、すべてのキノロンに耐性化した。一方、さきに記したように MexAB-OprM の破壊株 (KG 2109) のキノロン感受性は、野生株のそれよりも上昇したが、MexCD-OprJ および MexEF-OprN 排出システムの破壊株 (それぞれ KG 3002 および PAO-7 *mexE*<sup>17)</sup>) での上昇は、野性株 (PAO 1) のレベルまでにとどまった。これらの結果から、MexCD-OprJ および MexEF-OprN の両排出システムは緑膿菌の抗菌薬に対する多剤耐性化に関与するものであるが、自然耐性に関与するシステムではないことを示している。さらに、これらの排出システムのうち、MexAB-OprM および MexCD-OprJ は大腸菌細胞中でも多剤耐性化に貢献することがわかった<sup>23)</sup>。これらの結果は、緑膿菌の排出システムが本菌特有のものではなく、他の細菌中でも同じような排出システムによる多剤耐性株が出現する可能性を示すものである。

このような薬剤排出システムが亢進した多剤耐性変異株は、キノロン薬により特異的に選択されるのではない。カルバペネム薬であるメロペネムやトリメトプリムなどによっても同じような耐性菌が選択されることが報告されている<sup>5,18)</sup>。さらに、古くからカルベニシリンやセフェム薬などのβ-ラクタマーゼに安定な薬物に耐性を示す緑膿菌の変異株における耐性機構が調べられてきた<sup>19)</sup>。これらの株では、β-ラクタマーゼの高度産生も

Table 2. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains to antimicrobial agents

Strains <sup>a)</sup>	Mutation; Efflux system <sup>b)</sup>	MIC (μg/ml)					
		NFLX	OFLX	CPFX	TFLX	LVFX	SPFX
PAO 1	wild; ABM <sup>+</sup>	0.78	0.078	0.2	0.2	0.39	0.39
OCR 1	<i>nalB</i> ; ABM <sup>+++</sup>	6.25	6.25	1.56	1.56	3.13	3.13
KG 2109	<i>nalB</i> ; ABM <sup>-</sup>	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.1
KG 3000	<i>nfxB</i> ; CDJ <sup>+++</sup>	12.5	12.5	6.25	1.56	12.5	12.5
KG 3002	<i>nfxB</i> ; CDJ <sup>-</sup>	0.78	1.56	0.2	0.39	0.78	0.78
PAO-7 H	<i>nfxC</i> ; EFN <sup>+++</sup>	1.56	3.13	0.78	0.39	1.56	1.56
PAO 7 HmexE	<i>nfxC</i> ; EFN <sup>-</sup>	0.2	0.39	0.05	0.1	0.2	0.2

<sup>a)</sup>OCR 1, KG 3000 and PAO-7 H, spontaneous *nalB* *nfxB* and *nfxC* mutants, respectively, from PAO 1; KG 2109, Tn 5-insertion mutant from PAO 4141; KG 3002, *mexC*:: Tn 1737 KH from KG 3000; PAO-7 HmexE, *mexE*:: Hg mutant from PAO-7 H.

<sup>b)</sup>ABM, MexAB-OprM; CDJ, MexCD-OprJ; EFN, MexEF-OprN; + + +, overproduction; -, decreased production.

NFLX: norfloxacin, OFLX: ofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, TFLX: tosufloxacin, LVFX: levofloxacin, SPFX: sparfloxacin

見られず、さらに $\beta$ -ラクタム薬の作用標的であるペニシリン結合蛋白質 (PBPs) の親和性の低下も見られなかった。そこで、この耐性の原因は、トラッピング機構と呼ばれ、外膜を透過した薬物分子の $\beta$ -ラクタマーゼによる強固な捕捉によって起こるとい説が提唱されてきた。しかし、実態が不明であるトラッピング機構は、現在では排出システムの機能で説明することができるものと考えられる。

#### VI. *nfxB* 変異株で観察された一部の抗菌薬に対する高感受性化の原因

野性株から分離した *nfxB* 変異株は、キノロン薬や第4世代セフェムに対する耐性化する一方で、奇妙なことに通常のセフェム、ペニシリン、カルバペネムおよびアミノ配糖体に高感受性化する (Table 1 および Fig. 6)。前述したように、MexAB-OprM は野性株でもわずかに産生され、この野性株で *nfxB* 変異が起きると、*mexCD-oprJ* オペロンの脱抑制が起こり、MexCD-OprJ の産生が起こる。これは、*nfxB* 変異株では MexAB-OprM と MexCD-OprJ の2つの排出システムが産生されていることを示している。つまり、*nfxB* 変異株の性状として調べられてきた感受性変化は、2つの排出システムが混在した状態で観察されたものであり、*nfxB* 変異株で観察される耐性化や高感受性化が MexCD-OprJ の機能から直接的にもたらされるものとは考えられない。そこで、MexCD-OprJ の抗菌薬耐性化への寄与を調べる目的で、*nfxB* 変異株の染色体から *mexAB-oprM* 遺伝子を人工的に欠失させ、MexAB-OprM の産生がない変異株を作成した<sup>20)</sup>。また、2つの排出システムの各コンポーネントの産生を正確に検出するために、すでに作成していた OprM および OprJ に対する単クローン抗体に加えて、MexA、MexB、MexC および MexD の遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列をもとにペプチド抗体を作成した。作成した抗体を用いたイムノブロットは、*nfxB* 変異により、MexCD-OprJ の過剰産生が起きると、同時に MexAB-OprM の産生量が減少すること

を示した。一方、*nfxB* 変異株から *mexAB-oprM* を欠失させたところ、通常のセフェム薬、ペニシリン薬、カルバペネム薬およびアミノ配糖体に対する高感受性化は消失した。さらに、MexCD-OprJ が通常のセフェム薬に対する耐性に働くことがわかった。これらの結果は、機構はまだ不明ではあるが、*nfxB* 変異株における感受性変化は2つの排出システムがたがいに拮抗した状態によりもたらされるものであることを示している。

*nfxB* 変異株で見られた一部の抗菌薬に対する高感受性化と同じ現象が、*nfxC* 変異株でも観察される。この原因も *nfxC* 変異により過剰産生された MexEF-OprN とすでに産生されている MexAB-OprM との拮抗現象によるものであることが予想されるが、その研究はまだ行われていない。

#### VII. 排出システムを構成する各コンポーネントの機能

緑膿菌の *nfxB* 型の多剤耐性に MexCD-OprJ システムが貢献することをさらに確かめるために、*mexCD-oprJ* オペロンの構成遺伝子を破壊した<sup>21)</sup>。3種の構成遺伝子のどれを破壊した場合にも、モノバクタム (アズトレオナム) および通常のセフェム (セフトジディム) に対する感受性はまったく変わらなかったが、キノロン薬 (ノルフロキサシン、シプロフロキサシン) および第4世代セフェム (セフピロム、セフォゾプラン) に対する感受性は驚くほど上昇した (Fig. 7)。しかし、*oprJ* 遺伝子の破壊 (Fig. 7; KG 3071) は、*mexC* および *mexD* のいずれかの遺伝子を破壊した場合 (Fig. 7; それぞれ KG 3069 および KG 3070) ほとんど感受性の上昇をもたらさなかった。この原因は、*oprJ* 遺伝子の上流の遺伝子にコードされた MexC および MexD が他の外膜コンポーネントと共同し、OprJ のホモログであり野性株でもわずかに産生されている OprM とリンクし、排出活性を発揮したことを予想させた (Fig. 8)。この予想を確かめるべく、野性型の OprM を発現するプラスミドを作成し、別に作成した KG 3071 株由来の *mexAB-oprM* 欠損株に導入した。その結果、キノロン薬および

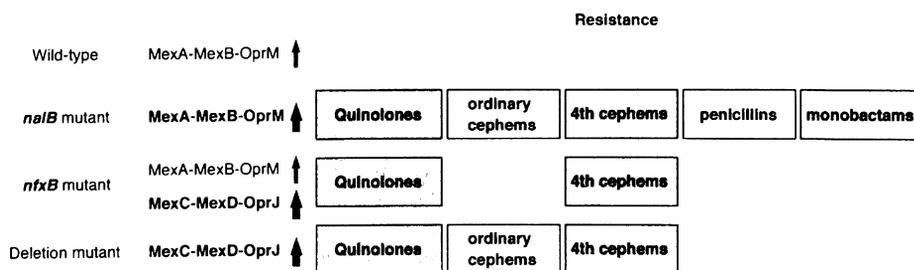
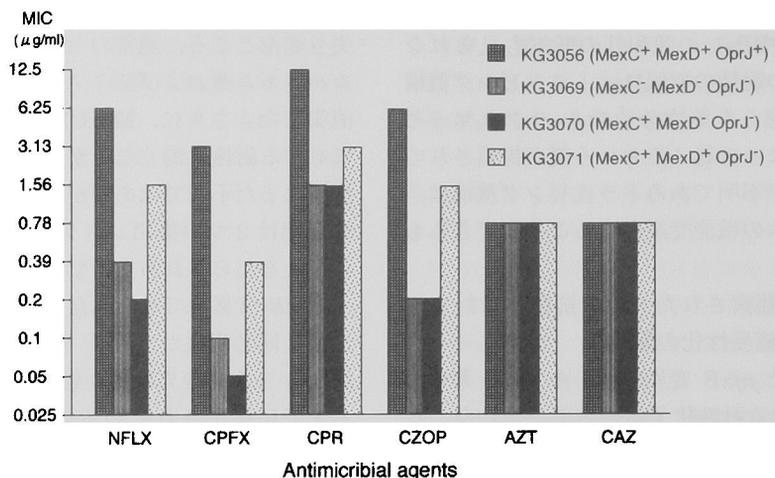


Fig. 6. Scheme of alterations of susceptibility of the wild-type strain of *Pseudomonas aeruginosa* and isogenic mutants. The MexA-MexB-OprM efflux system is slightly produced in the wild-type strains and is overproduced in *nalB* mutant. The MexC-MexD-OprJ efflux system is overproduced by *nfxB* mutation. Accordingly, both MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ efflux systems are produced in *nfxB* mutant derived from the wild-type strains.



NFLX: norfloxacin, CPFX: ciprofloxacin, CPR: ceftazidime, CZOP: ceftazidime, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidime

Fig. 7. Comparison of susceptibility of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and their parent strains. KG 3056 is a *nfxB* mutant of PAO 1. KG 3069, KG 3070 and KG 3071 are omega Sm cassette-insertion mutants of KG 3056. Each components of the MexC-MexD-OprJ efflux system in these mutants was detected by Western immunoblot assay using antibodies specific to each.

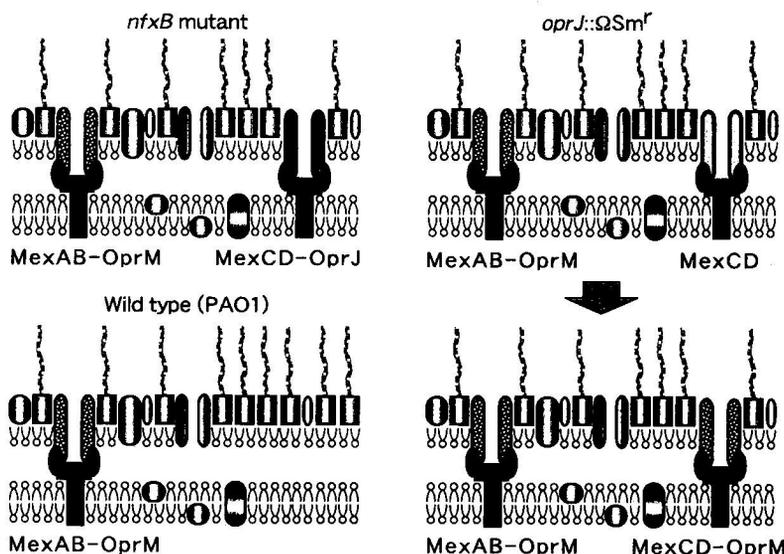


Fig. 8. Schematic model of function replacement of OprJ by OprM in MexC- the MexD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*.

第4世代セフェムに対する耐性度の上昇は観察されたが、MexAB-OprMの過剰産生がもたらすモノバクタムや通常のセフェムに対する耐性は観察されなかった。これは、明らかにMexCDとOprMが共同して機能するが、OprMの共同によってもMexCDの基質認識は変わらないことを示している。この結論は、MexAB-OprMの外膜コンポーネントをOprJで置換した場合の結果<sup>22)</sup>からも支持されるものであった。OprJとOprMの双方の置換の結果から、外膜コンポーネントは排出基質の認

識に機能していないこと、逆に、MexCDあるいはMexABが基質認識の機能を持っていることを示している。MexCがペリプラスムに位置すること、さらにMexD分子が他の排出蛋白質と同じように内膜を12回貫通した構造をとっていることが実験的に示された(後藤ら、未発表データ)。他の排出蛋白質との構造的類似性は、MexDが基質排出のためのポンプ本体としての役割を担っていることを示唆している。また、一方で、外膜コンポーネントOprMの高発現が*nalB*型多剤耐性の程度

を増加させることが報告された<sup>24)</sup>。これは、外膜コンポーネントが他の排出システムと共同作業をするという柔軟な機能を持つコンポーネントであることを示唆する。

### VIII. 薬剤耐性における排出システムの重要性

本稿で述べてきた多剤排出システムは、緑膿菌のほとんどの株の染色体上にコードされている。抗菌薬が臨床で使用されるようになって、たかだか50年の年月を考えると、排出システムの本来の生理的機能が抗菌薬の排出にあるとは考えられず、このシステムが別の重要な生理的な機能を持っていると考えるべきであろう。細菌が栄養物を取り込むために存在する透過孔を介して細胞内に侵入するβ-ラクタムのような抗菌薬を人は開発し利用してきた。それとは逆に、細菌細胞にとって必要な生理的役割を持つと考えられる排出システムに、うまく外膜を透過してきた抗菌薬が捕捉され、排出されることは皮肉な現象である。

過去に明らかにされてきた多剤耐性は、耐性機構の異なる複数の耐性遺伝子を持つプラスミドの獲得によりもたらされるものであった。しかし、このようなプラスミドを獲得した臨床株の分離頻度はさほど高くはない。一方、構造的に類似性のない抗菌薬にまで広範囲の交差耐性をもたらす薬剤排出システムが、染色体上に高度に保存された遺伝子の変異により機能発現することは、ほとんどの緑膿菌が容易に多剤耐性化する可能性を秘めている。

このような緑膿菌の多剤耐性化は、緑膿菌感染症の治療に大きな障害となることは述べるまでもないことであり、排出システムによって起こる緑膿菌の多剤耐性化の克服という新しい問題が提起された。抗菌薬の開発の歴史は、常に耐性菌の出現という問題を抱えてきたが、それは先人の努力と知恵により乗り越えられてきた。排出システムの機構を、より詳細に研究することが、排出システムに影響されない抗菌薬の開発や、その阻害剤の開発に繋がることを期待する。

### 謝 辞

本稿中の著者の研究は上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞の支援により推進されたものであることを銘記するとともに、東京慈恵会医科大学名誉教授 上田 泰先生を初め、関係諸先生に心より御礼申し上げます。また、緑膿菌の遺伝についてのご教示と PAO 系統の変異株をご提供いただきました故松本穎樹先生（元信州大学医学部）に深甚の謝意を表します。また、本研究を始めるに当たり、多くの助言をいただきました杏林製薬 平井敬二博士に感謝の意を表します。なお、本研究は京都薬科大学微生物学教室で他の研究施設との共同研究により行われたものであり、ご援助とご助言をいただきました西野武志教授、ならびにその遂行にご協力いただきました当教室の皆様へ感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Rella M, Haas D: Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of β-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 242~249, 1982
- 2) Hirai K, Suzue S, Irikura T, et al.: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 582~586, 1987
- 3) Fukuda H, Hosaka M, Hirai K, et al.: New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob Agents Chemother Sep*; 34: 1757~1761, 1990
- 4) Hideyuki F, Masaki H, Shizuko I, et al.: *nfxC*-type quinolone resistance in a clinically isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 790~792, 1995
- 5) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S: Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 645~649, 1995
- 6) Gotoh N, Itoh N, Tsujimoto H, et al.: Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: Evidence of involvement in multiple antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 267~274, 1994
- 7) Gotoh N, Itoh N, Yamada H, et al.: Evidence confirming the location of OprM in the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 309~312, 1994
- 8) Poole K, Heinrichs D E, Neshat S: Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* 10: 529~544, 1993
- 9) Poole K, Krebes K, McNally C, et al.: Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175: 7363~7372, 1993
- 10) Li X Z, Nikaido H, Poole K: Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1948~1953, 1995.
- 11) Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, et al.: The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA - mexB - oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2567~2569, 1995
- 12) Keith P, Gotoh N, Tsujimoto H, et al.: Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB* type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21: 713~724, 1996
- 13) Okazaki T, Iyobe S, Hashimoto H, et al.: Cloning and characterization of a DNA fragment that complements the *nfxB* mutation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *FEMS Microbiol. Lett.* 63: 31~35, 1991

- 14) Okazaki T, Hirai K: Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. FEMS Microbiol. Lett. 76: 197~202, 1992
- 15) Masuda N, Gotoh N, Ohya S, et al.: Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in *NfxB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 909~913, 1996
- 16) Hosaka M, Gotoh N, Nishino T: Purification of a 54-kilodalton protein (OprJ) produced in *NfxB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and production of a monoclonal antibody specific to OprJ. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1731~1735, 1995
- 17) Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, et al.: Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multi-drug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 23: 345~354, 1997
- 18) Köhler T, Kok M, Michéa-Hamzehpour M, et al.: Lasta Kocjancic Curty and Jean-Claude Pechère. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2288~2290, 1996
- 19) Livermore D M, Pitt T L: Dissociation of surface properties and "intrinsic" resistance to  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Microbiol. 22: 217~224, 1986
- 20) Gotoh N, Tsujimoto H, Nomura A, et al.: Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 165: 21~27, 1998
- 21) Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, et al.: Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in  $\Delta mexA-mexB-oprM$  mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1938~1943, 1998
- 22) Yoneyama H, Ocaktan A, Gotoh N, et al.: Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 898~902, 1998
- 23) Srikumar R, Kon T, Gotoh N, et al.: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 65~71, 1998
- 24) Won K K Y, Poole K, Gotoh N, et al.: Influence of OprM expression on multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2009~2012, 1997

## Multidrug resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*

Naomasa Gotoh

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University,  
Yamashina, Kyoto 607-8414, Japan

*In vitro* studies on quinolone-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* have identified and characterized new mechanisms such as multidrug efflux systems, MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN which express *nalB*, *nfxB* and *nfxC* mutations, respectively, on the chromosome. Each system, which is organized by a inner membrane component (MexB, MexD or MexF), a outer membrane component (OprM, OprJ or OprN) and a periplasmic component (MexA, MexC or MexE), extrudes actively antibiotic molecules which permeate into the cells and contributes to multidrug resistance in *P. aeruginosa*. Of these systems, only MexAB-OprM is slightly expressed in the wild type strain and contributes to the intrinsic multidrug resistance. To overcome multidrug resistance in *P. aeruginosa*, we must investigate the functional and molecular analyses of these efflux systems.