

## 細菌の異物（薬剤）排出蛋白質と抗菌薬耐性

後藤直正

京都薬科大学微生物学教室\*

（平成12年3月9日受付・平成12年4月10日受理）

多くの生物の細胞質膜（内膜）には抗菌薬や制癌剤を含めた有害物質をエネルギー依存的に排出する蛋白質が存在し、それらの細胞内侵入を阻止することにより自己防衛に関与している。これらの排出蛋白質は、そのエネルギー源からATP駆動型とプロトン駆動型に大別できる。細菌で発見されてきた排出蛋白質には、ATP駆動型よりもプロトン駆動型が多い。これらのプロトン駆動型排出蛋白質は、アミノ酸配列の相同性からさらにsmall multidrug resistance (SMR) family, major facilitator superfamily (MFS) and resistance-nodulation-cell division (RND) familyの3つのファミリーまたはスーパーファミリーに分けられている。これらの排出蛋白質のほとんどは、*Escherichia coli* のテトラサイクリン排出蛋白質 TetA のように基質域が狭いが、なかには、構造的に類似性のない抗菌薬を排出し、細菌の多剤耐性に貢献するものもあり、それは多剤排出蛋白質と呼ばれている。*Pseudomonas aeruginosa* のキノロンや $\beta$ -ラクタムに対する耐性機構の研究からこれらの排出蛋白質と他の耐性機構とが共同して働いていることが明らかとなった。

**Key words:** 細菌, 排出蛋白質, 抗菌薬耐性, ABC, SMR, MFS, RND

生物細胞を囲む生体膜は基本的には、リン脂質二重層に単純蛋白質、糖蛋白質およびリポ蛋白質が浮遊したような構造である。この膜を越える溶質分子の輸送は、エネルギー依存型（能動的輸送）とエネルギー非依存型（拡散などの受動的輸送）に分けることができる。この能動輸送に関与する蛋白質は輸送担体（transporters）とも呼ばれ、細胞質中に普遍的に存在し、特有のアミノ酸や糖分子の細胞内への輸送や細胞内から細胞外への代謝産物の輸送など、それぞれの輸送担体が種々の生理的機能を担っている。これらの担体は特徴的な基質域をもち、その基質域が酵素のように基質認識域が狭いものや、逆に、基質の化学構造に一定の類似性が見られないほど広いものもある。排出蛋白質（efflux proteins, extrusion proteins）は、これらの輸送担体のうち、特に細胞内に透過した基質分子を能動的に細胞外に排出する担体のことをいい、“ポンプ（pumps）”とも呼ばれている。

生物は、その生存環境（生物体内を含めての自然界）から有用な栄養物を摂取すると同時に、その環境中に存在する有機溶媒、重金属、細胞傷害性化合物などの有害な化学物質、すなわち異物（xenobiotics）から自分を守らねばならない。この防衛機構の1つが排出機構である。さらに、このシステムは自然界に存在する異物以外に、抗菌薬や制癌剤なども排出し、それらに対する耐性にも関与している。そこで、この異物排出蛋白質は、薬物やその耐性を意識する時には薬剤排出蛋白質とも呼ばれている。本稿は、細菌の薬剤排出蛋白質の分類とその構造、排出機構、さらに病原細菌の排出蛋白質の特徴および抗菌薬耐性への貢献についてまとめたものであ

る。

### I. 細菌の薬剤排出蛋白質と抗菌薬耐性

#### 1. 細菌の薬剤排出蛋白質の分類

細菌の薬剤排出蛋白質は、そのエネルギー源からATPの加水分解により生じたエネルギーを利用するグループと膜の内外に形成されたプロトン(H<sup>+</sup>)勾配により生じた駆動力を利用するグループに大別する<sup>1)</sup>ことができる(Fig. 1)。前者はABC (ATP binding cassette superfamily) と呼ばれ、アミノ酸配列の相同性は低いものまで包括しているが、蛋白質分子内にATPの結合領域特有のコンセンサス配列(Walker AおよびB配列)をもつ排出蛋白質のグループである(Fig. 1A)。一方、プロトン駆動力を利用して機能する排出蛋白質<sup>2,3)</sup>は、アミノ酸配列の相同性から、排出蛋白質のなかではもっとも小さく、アミノ酸数が100~200の膜を4回貫通した排出蛋白質のSMR (small multidrug resistance family; Fig. 1B)、アミノ酸数が400~500であり、膜を12回貫通するタイプと14回貫通するタイプの場合があるMFS (major facilitator superfamily; Fig. 1C, 1D, 1E)、およびアミノ酸数が約1,000にもおよび排出蛋白質のなかではもっとも大きな蛋白質が属するRND (resistance-nodulation-cell division; Fig. 1F)の3つのグループに大別される。

また、これらのプロトン駆動力型排出蛋白質はホモオリゴマーの場合も含めて単一の蛋白質で機能するもの(ホモコンポーネント型)と他の蛋白質との共同作業に

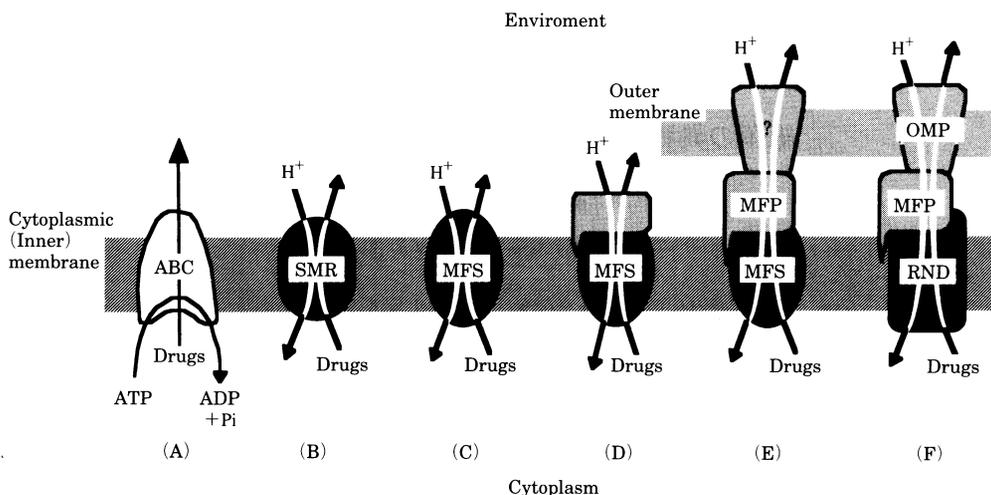


Fig. 1. Models demonstrating translocation of substrates by bacterial efflux proteins (systems).

ABC: ATP-binding cassette superfamily proteins (A), SMR, small multidrug resistance family proteins (B), MFS: major facilitator superfamily proteins (C, D, E), RND: resistance-nodulation-cell division family proteins (F): MFP, membrane fusion proteins (F), and OMP: outer membrane proteins (F).

より機能するもの（マルチコンポーネント型）とに分けることができる。RNDは、ペリプラスム・コンポーネント（MFP; membrane fusion proteins）と外膜コンポーネント（OMP; outer membrane proteins）との共同作業により機能しているマルチコンポーネント型排出システムを構成している。その他、MFSやSMRのなかにもマルチコンポーネント型の排出システムを構成するものも知られているが、それらについては3.項で論述する。

## 2. 排出蛋白質の生物界での分布

ヒトも含めた真核生物では、p-glycoproteins<sup>4-6)</sup>やcMOAT<sup>7)</sup>などのように重要な生理的機能をもつATP駆動型排出蛋白質が多数発見され、その性状解析が行われている。細菌の場合は、逆に、ATP駆動型排出蛋白質は数種のものが発見されているに過ぎず、ほとんどがプロトン駆動力型である。これらの違いが何に由来するのかはわからないが、細菌のゲノム配列データベースを相同検索しても、プロトン駆動力型のホモログが見いだされることが多く、ATP駆動型のものとはそれに比べて少ない。プロトン駆動力型では、MFSがグラム陽性、陰性を問わず、広い菌種から発見されている。一方、マルチコンポーネント型排出システムを構成するRNDの発見はグラム陰性菌に限られている。これは、外膜の存在に由来すると考えられる。すなわち、外膜構造をもつグラム陰性菌では、細胞質または細胞膜にまで侵入した異物の排出は、外膜を越えて行われなければならない。そこで、RNDのようにマルチコンポーネント型の排出システムがグラム陰性菌に特有に分布するのであろうと推測される。

細菌ではATP駆動型の排出蛋白質としてMDR1 (p-gp)のホモログであるLmrA<sup>8)</sup>の存在が知られている。

LmrAはヒト線維芽細胞 (human lung fibroblast cells)のなかで、MDR1と同様に制癌剤の排出に関与し、線維芽細胞に制癌剤耐性を付与する<sup>9)</sup>。これは、明らかにLmrAとMDR1との機能的相同性を示している。MDR1 (p-gp)のホモログが真核生物 (Eukaryote)のみならず真性細菌 (Eubacteria) および古細菌 (Archae bacteria) に広く分布することと、たがいに進化的にかけ離れた生物に存在するMDR1とLmrAとの機能的相補性を考えあわせると、ATP駆動型の排出蛋白質が原始生命体にすでに存在したことを想像させる。

## 3. 病原細菌の薬剤耐性に関与する排出蛋白質

病原細菌の薬剤耐性に関与する代表的なプロトン駆動型排出蛋白質の性状（排出基質については抗菌薬、消毒薬、保存剤に限った）をTable 1に示した。しかし、病原細菌の薬剤耐性を考える上で細菌のATP駆動型排出蛋白質には重要なものがないことから、このタイプの排出蛋白質に関しては省略した。

プロトン駆動型の排出蛋白質のほとんどは、染色体性で菌種ごとに高度に保存されている。しかし、菌種を越えて比較した場合、アミノ酸配列の相同性と基質特異性の類似性とは一致しない場合が多い。一方、プラスミド性の排出蛋白質は少ないがQacE (SMR), QacE<sub>1</sub> (SMR) およびQacA (MFS) が知られている。

### 1) SMR<sup>3,10)</sup>

QacE<sup>11)</sup>やQacEAD<sup>12)</sup>は抗菌薬の排出には働かないが、多種の消毒剤を排出することから臨床的に重要な排出蛋白質である。プラスミド性のQacEが*Klebsiella pneumoniae*で発見されたが、その後の研究により、そのホモログであるQacEΔ1をコードするプラスミドが多く、多くのグラム陰性細菌に分布し、それぞれが消毒剤耐性に寄与していることが明らかになった。また、QacEΔ1

Table 1. Proton-dependent antibiotic efflux proteins in pathogenic bacteria

Category <sup>a)</sup>	TP <sup>b)</sup>	PER/OMP <sup>c)</sup>	TM <sup>d)</sup>	Organism	Location <sup>e)</sup>	Resistance to antibiotics, disinfectants, and antiseptics <sup>f)</sup>
SRM	EmrE		4	<i>Escherichia coli</i>	C	CT, TC
	QacE		4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P	BC, CH, CT
	QacEΔ 1		4	Gram-negative bacteria	P	BC, CH, CT
MFS	MdfA		12	<i>E. coli</i>	C	Qs, TC, MAC, BC, CP
	NorA		12	<i>Staphylococcus aureus</i>	C	Qs, BC
	TetA		12	<i>E. coli</i>	C	TC
	CmlA		12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C	CP
	QaxA		14	<i>S. aureus</i>	P	BC, CH, CT
	EmrB	EmrA	14	<i>E. coli</i>	C	Qs
RND	AcrB	AcrA/TolC?	12	<i>E. coli</i>	C	MAC
	ArcF	AcrE/TolC?	12	<i>E. coli</i>	C	AD, VCM
	MexB	MexA/OprM	12	<i>P. aeruginosa</i>	C	Qs, BL, CP, TC, MAC
	MexD	MexC/OprJ	12	<i>P. aeruginosa</i>	C	Qs, BL, CP, TC, MAC
	MexF	MexE/OprN	12	<i>P. aeruginosa</i>	C	Qs, BL, CP, TC, MAC
	MexY	MexX/OprM	12	<i>P. aeruginosa</i>	C	Qs, BL, CP, TC, MAC, AG
	MtrD	MtrC/MtrE	12	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	C	MAC, CP
	AmrB	AmrA/OprA	12	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	C	MAC, AG

Typical efflux proteins of pathogenic bacteria are listed in this table.

<sup>a)</sup>ABC: ATP-binding cassette superfamily, SMR: small multidrug resistance family, MFS: major facilitator superfamily, RND: resistance-nodulation-cell division superfamily.

<sup>b)</sup>TP: transpoter.

<sup>c)</sup>PER: periplasmic component, OMP: outer membrane protein (component). EbrA is thought not to be a periplasmic component, but a component that binds to EbrB on the surface of the *B. subtilis* cytoplasmic membrane.

<sup>d)</sup>TM: transmembrane.

<sup>e)</sup>C: chromosome, P: plasmid

<sup>f)</sup>Qs: quinolones, BL: β-lactams, MAC: macrolides, TC: tetracycline, CP: chloramphenicol, AG: aminoglycosides, AD: actinomycin D, VCM: vancomycin, CT: cetyltrimethylammonium bromide, BC: benzalkonium chloride, CH: chlorhexidine.

遺伝子がインテグロン上にあることから考えても、起源を1つにする遺伝子が、菌種を越えた遺伝子のやりとりによりグラム陰性菌間で拡がったことを示唆している。これは、菌種を越えた場合に、相同性が高くとも基質特異性に類似性は見られない染色体性の排出蛋白質とは異なる点である。SMRファミリー蛋白質の排出機構や構造についてはEmrE<sup>18)</sup>を材料に多くの成果が得られている。

## 2) MFS<sup>3,13)</sup>

単独で排出機能を発揮するものや、他のコンポーネントとの共同作業を必要とするものなどがある。また、細胞質膜を貫通する構造が12回型と14回型とがあり、アミノ酸配列の相同性も低いものまで含まれているのでスーパーファミリーと呼ばれている。医療には使用されない抗菌性化合物を含めて考えると、多剤を排出するのが多くみられるが、抗菌薬など医療現場で使用される薬物に限って見ると、これらの排出蛋白質の基質域は広いとはいえない。

12回膜貫通型の代表格としては*Staphylococcus aureus*のNorA<sup>15)</sup>があげられ、これは主にキノロンの排出に働いている。親水性の高いキノロン(norfloxacin, ciprofloxacinなど)が効率よく排出される<sup>15)</sup>とされてきたが、その後の研究でキノロン分子全体の物理化学的性

質よりも、7-位および8-位の置換基の物理化学的性状(大きさ、疎水度)<sup>16)</sup>が大きな影響を与えることがわかった。その他12回膜貫通型には、chloramphenicol (CP)の排出に働く*Pseudomonas aeruginosa*のCmlAやtetracycline (TC)の排出に働く*Escherichia coli*のTetAが知られているが、CPやTCは臨床での使用量が限られ、薬剤耐性の点からの重要性は現在のところ高くはない。しかし、TetAをモデルとした排出蛋白質の構造および基質認識機構の研究<sup>17)</sup>が進められている。

14回膜貫通型としては*S. aureus*のQacA<sup>18)</sup>や*E. coli*のEmrB<sup>19)</sup>がある。QacAはプラスミド性の排出蛋白質の1つであり、QacEやQacEΔ 1(ともにSMR)と同様に消毒剤の排出に働いている。EmrBは数少ない2成分排出システムのコンポーネント蛋白質(Fig. 1 D)である。グラム陰性菌の*E. coli*細胞中で外膜を越えて基質を排出するためには、さらに未知の外膜コンポーネントがEmrAとEmrBの複合体とリンクしている可能性があるが、機能発揮には少なくともEmrA(ペリプラスムコンポーネント)を必要とすることがわかっている。外膜のないグラム陽性菌である*Bacillus subtilis*でも2成分排出システムEbrA-EbrB<sup>20)</sup>が見いだされている。それぞれのコンポーネントの役割について作動機構の点から興味あるところである。14回膜貫通型には薬

剤耐性の観点から重要なもの多くはないが、EmrA-EmrBがnalidixic acidを基質とすることが報告されているが、残念ながら他のキノロンに対しても働くかどうかについての実験結果はない。

### 3) RND

このファミリー蛋白質はグラム陰性菌に広く分布しているが、その機能の主体が排出にあるとされたのは比較的新しく、それまでそれぞれの機能("resistance", "noduration", "cell division")は異なるが、相同性蛋白質のファミリーとして考えられてきた。

このファミリーの特徴のひとつは、約300のアミノ酸から形成された巨大な2つのループをもち12回膜貫通構造をとることである<sup>21,22</sup>。また、もう一つの特徴は、RND蛋白質だけで排出活性が現れるのではなく、チャンネルを形成していると考えられるOMPとそれらとリンクするような機能をもつと考えられるMFPとの共同作業により働いていることである(Fig. 1F)<sup>23</sup>。これらのコンポーネント遺伝子は染色体上の1つの転写単位(オペロン)上にならんで存在している場合が多い。また、それらの基質域が広い点も特徴としてあげられる。

薬剤耐性の点から*P. aeruginosa*の重要性は高く、そのために本菌の排出システム(MexA-MexB-OprM<sup>23-25</sup>, MexC-MexD-OprJ<sup>26</sup>, MexE-MexF-OprN<sup>27</sup>, MexX-MexY<sup>28,29</sup>)が、機能、基質認識、構造、発現制御の点でもっともよく研究されている(これらのうち、前三者の発見の経緯、抗菌薬耐性への寄与の詳細については拙著<sup>30</sup>を参照されたい)。MexA-MexB-OprMは、*P. aeruginosa*の野生株でもわずかに発現しているが、MexC-MexD-OprJやMexE-MexF-OprNは、野生株ではそれぞれのオペロンの上流に存在する抑制遺伝子により負に制御されているために、発現は抑制されている。制御遺伝子の自然突然変異の結果、それぞれの排出システムが高発現した株が、抗菌薬の投与によって選択される。他方、MexX-MexYの発現がある種の薬物によって誘導されることが、最近、特異抗体を用いた実験によりわかった(Masuda, et al., 投稿中)。また、MexX-MexY排出システムをコードするオペロン上には、外膜蛋白質遺伝子は存在しない。しかし、野生株で発現しているOprMとリンクして機能している。このように、発現制御が異なるために菌株によっては複数の排出システムが同時に働いていることがある。そこで、それぞれの排出システムの基質特異性は単一の排出システムだけが発現した変異株で調べることが必要である。著者のグループではそのために、単独の排出システムのみが発現している変異株シリーズを作成し、その感受性を親株と比較した。その結果、Table 1に示すような抗菌薬(キノロン、 $\beta$ -ラクタム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、マクロライド)を基質とすることがわかった(Masuda, et al., 投稿中)。これらの結

果は、従来のように排出システムが混在した細胞で調べた結果よりもそれぞれの排出システムの基質域が広いことと、本菌のこれらの抗菌薬に対する自然耐性の一因が排出システムにあることを示している。*P. aeruginosa*のゲノムプロジェクト(<http://www.pseudomonas.com>)は、これら4種の排出システム以外にも複数のマルチコンポーネント型排出システムの存在の可能性を示している。それらの解明により基質特異性の正確性が増すものと思われる。

*E. coli*のAcrA(MFP)-AcrB(RND)<sup>31,32</sup>およびAcrE(MFP)-AcrF(RND)<sup>31</sup>も、MexX-MexYの場合のようにOMPがコードされていないが、TolC(OMP)が共通のOMPとして機能<sup>33</sup>しているようである。これらの発現は、マクロライドやactinomycin Dおよびvancomycinに対する耐性を*E. coli*に付与している。また、AcrA-AcrBがコール酸などの胆汁酸塩に対する耐性化<sup>34</sup>にも寄与していることが示されるにいたり、グラム陰性の腸内細菌が胆汁酸塩に対して耐性化を示す原因は外膜の構造にあるとされてきた従来の知見の修正が必要であると考えられる。

その他、*Burkholderia pseudomallei*のAmrA-AmrB-OprA<sup>35</sup>が、マクロライドやアミノ配糖体の排出に働くことが明らかにされた。これは、本菌のマクロライドやアミノ配糖体に対する高度自然耐性の一因を示している。しかし、キノロンに対して働いているかどうかはまだ不明である。今後の研究によって、それは明らかになるものと考えられる。本菌と近縁で、これらの抗菌薬に自然耐性を示す*B. cepacia*にも、同じような排出システムが存在することが推測される。一方、疎水性の高いマクロライド、クロラムフェニコールやキノロンに働く*Neisseria gonorrhoeae*のMtrC-MtrD-MtrE排出システム<sup>36,37</sup>も同定されている。

## II. 抗菌薬耐性機構としての薬剤排出蛋白質の重要性

抗菌薬耐性機構として、作用標的の変化、修飾酵素の産生および膜透過性の減少が古くから知られてきたが、最近の排出機構の研究は新規耐性機構としての重要性を明らかにした。著者のグループは*P. aeruginosa*のキノロンや $\beta$ -ラクタムに対する自然耐性や獲得耐性にどのように排出システムがかかわっているのかを調べた(これらの結果の詳細については拙著<sup>30</sup>を参照されたい)。

キノロンは*P. aeruginosa*の外膜を透過した後、細胞内の作用標的(DNA gyrase/topoisomerase IV)に到達する<sup>39</sup>。また、その間にはキノロンを補足する排出システムが存在する。本菌のDNA gyrase/topoisomerase IVのキノロン親和性が他の細菌、たとえば、*E. coli*のそれらと比べて低いものではないことが明らかにされている(Akasaka, et al., 投稿準備中)。これはキノロンに対する本菌の自然耐性の機構から標的酵素につい

では除外できることを示している。著者らは、外膜透過障害および排出システムの耐性機構を消失させた変異株のシリーズを作成し、そのキノロン感受性を測定した。その結果、外膜透過障害を減少させた株でも、排出システムを除去した株でも同じ程度にまで自然耐性は消失した。これは *P. aeruginosa* のキノロン自然耐性に外膜透過障害と排出システムが同じ程度に寄与していること、すなわち、どちらも耐性機構として重要であることを示す結果であった。また、キノロンの自然耐性機構の研究に用いた変異株から、さらに染色体性の AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼを欠失させ、 $\beta$ -ラクタムに対する感受性を測定したところ、 $\beta$ -ラクタムに対する *P. aeruginosa* の自然耐性には、外膜透過障害、排出システムおよび  $\beta$ -ラクタマーゼが働いていることがわかった<sup>40)</sup>。以上の結果は、排出システムを含めた複数の耐性機構のそれぞれが、キノロンや  $\beta$ -ラクタムに対する *P. aeruginosa* の自然耐性に寄与していることを結論させた。

### III. おわりに

種々の排出蛋白質の抗菌薬、消毒薬、防腐剤に対する耐性への貢献について述べてきた。この排出機構の抗菌薬耐性機構としての重要性が高まったのは、*P. aeruginosa* の Mex システムの同定以降のことである。これは、本菌の高度自然耐性の問題と本菌感染症の治療中に出現する耐性菌の問題の臨床的重要性および Mex 排出システムが現在使用量の多い  $\beta$ -ラクタムやキノロンを排出することに起因する。また、従来の耐性機構が同じ系統の抗菌薬間での狭い交差耐性に限られることに比べて、排出システムの基質域の広さに起因した多剤耐性化は、排出システムを薬剤耐性機構のなかでもクローズアップする要因の1つである。事実、臨床分離株のなかには、排出システムが亢進した多剤耐性株は容易に見いだされる<sup>41,42)</sup>。また、それらの株での排出蛋白質遺伝子のノックアウトは耐性を驚くほど消失させる。これらのことから考えても、新規抗菌薬の開発のための目標として、排出システムに認識されない抗菌薬の開発や排出システムの活性を阻害する薬物の開発も掲げることができよう。

本稿では薬剤耐性の観点から排出蛋白質について稿を進めてきた。そのために、本稿で論述した排出蛋白質は、抗菌薬耐性に寄与する病原細菌由来のものに限った。排出蛋白質の多くは、抗菌薬以外の異物、たとえばクリスタル・バイオレットやアクリフラビンなどの抗菌性色素、トルエンやキシレンのような有機溶媒、Triton X-100 や SDS による界面活性剤および重金属なども基質とする。これらは人工的な化合物ではあるが、細菌の生育環境下にはこれらのホモログが存在し、細菌を含めて生物はそれらの化合物の細胞内侵入から排出蛋白質を使って自己を防衛している。このことは、排出蛋白質が生物の環境適応を調べるためのよい指標であると考えら

れる。また、異種蛋白質の複合体で機能するマルチコンポーネント型排出蛋白質は、蛋白質間の相互作用の点からも興味深い。

以上のように、昨今、臨床現場で重要な問題である多剤耐性菌の出現を防止するためにも、基質域の広い排出蛋白質の研究は重要であると考えられる。さらなる排出蛋白質の研究成果が現代医療の弱点の克服に貢献することと同時に、生命現象の理解に繋がることを願ってやまない。

### 謝辞

本稿は第47回日本化学療法学会西日本支部総会におけるミニ特別講演の内容について座長推薦を受けてまとめたものである。執筆の機会をお与え下さいました学会関係諸先生に深謝いたします。また、本稿文中の著者らの研究は文部省科学研究費補助金と厚生省厚生科学研究費の支援により行われたものである。

### 文 献

- 1) Marger M D, Saier Jr M H: A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Bioscience* 18: 13~20, 1993
- 2) Lewis K: Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends in Bioscience* 19: 119~123, 1994
- 3) Paulsen I T, Brown M, Skurray R A: Proton-dependent multidrug systems. *Microbiol. Rev.* 60: 575~608, 1996
- 4) Ruetz S, Gros P: A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet? *Trends in Pharmacol. Sci.* 15: 260~263, 1994
- 5) Borst P, Schinkel A H: Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends in Genet.* 13: 217~222, 1997
- 6) 植田和光: MDR 1/P糖蛋白質の薬剤輸送の分子機構。蛋白質 核酸 酵素 42: 1263~1271, 1997
- 7) 鈴木洋史, 杉山雄一: 異物排除におけるトランスポーターの役割—cMOAT および MRP を中心として—。蛋白質 核酸 酵素 42: 1273~1283, 1997
- 8) Bolhuis H, van Veen H W, Molenaar D, et al.: Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J.* 15: 4239~4245, 1996
- 9) van Veen H W, Callaghan R., Soceneantu L, et al.: A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* 391: 291~295, 1998
- 10) Paulsen I T, Skurray R A, Tam R, et al.: The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19: 1167~1175, 1996
- 11) Sasatsu M, Shima K, Shibata Y, et al.: Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidium bromide from a transferable plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 17: 10103, 1989

- 12) Paulsen I T, Littlejohn T G, Radstom P, et al.: The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 761~768, 1993
- 13) Yerushalmi H, Lebendiker M, Schuldiner S: EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H<sup>+</sup> and is soluble in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 270: 6856~6863, 1995
- 14) Pao S S, Paulsen I T, Saier Jr M H: Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Rev.* 62: 1~34, 1998
- 15) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, et al.: Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* 172: 6942~6949, 1990
- 16) Takenouchi T, Tabata F, Iwata Y, et al.: Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factors for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1835~1842, 1996
- 17) 山口明人: テトラサイクリン系薬剤の耐性機構。日本臨床 55: 1245~1251, 1997
- 18) Rouch D A, Cram D S, DiBerardino D, et al.: Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* 4: 2051~2062, 1990
- 19) Lomovskaya O, Lewis K: Proc. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8938~8942, 1992
- 20) 上野泰宏, 正岡陽子, 陳 静, 他: 細菌細胞に見出された二成分型多剤排出系の構造と性質。第21回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, p.73~76, 1999
- 21) Guan L, Ehrmann M, Yoneyama H, et al.: Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA, B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 274: 10517~10522, 1999
- 22) Gotoh N, Kusumi T, Tsujimoto H, et al.: Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 458: 32~36, 1999
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) Poole K, 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
- 27) Köhler T, Michèa-Hamzhepour 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
- 28) Mine T, Morita Y, Kataoka A, et al.: Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 415~417, 1999
- 29) Aires J R, Kohler T, Nikaido H, et al.: Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2624~2628, 1999
- 30) 後藤直正: 緑膿菌の多剤耐性化に寄与する薬剤排出システム。日化療会誌 47: 319~328, 1999
- 31) Ma D, Cook D N, Albert M, et al.: Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 6299~6313, 1993
- 32) Ma D, Cook D N, Alberti M, et al.: Genes *acrA* and *acrB* encode a tress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16: 45~55, 1995
- 33) Fralick J A: Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 5803~5805, 1996
- 34) Thanassi D G, Cheng L W, Nikaido H: Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 2512~2518, 1987
- 35) Moore R A, Deshazer D, Reckseidler S, et al.: Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 465~470, 1999
- 36) Hagman K E, Pan W, Spratt B G, et al.: Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* 141: 611~622, 1995
- 37) Shafer W M, Balthazar J T, Hagman K E, et al.: Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to faecal lipids. *Microbiology* 141: 907~911, 1995
- 38) 後藤直正: キノロン耐性一複数の機構の総和。医学のあゆみ 191: 1031~1035, 1999
- 39) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux. *Science* 264: 382~388, 1994
- 40) Masuda N, Gotoh N, Ishi C, et al.: Interplay between Chromosomal  $\beta$ -lactamase and the MexAB-OprM Efflux System in Intrinsic Resistance to  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 400~402, 1999
- 41) Jalal S, Wretling G, Gotoh N, et al.: Rapid identification of mutations in a multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, 107: 1109~1116, 1999
- 42) Jalal S, Ciofu O, Heiby N, et al.: Mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Antimicrob.*

Agents Chemother., in press.

## Bacterial xenobiotic (antibiotic) efflux proteins and antibiotic resistance

Naomasa Gotoh

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

Both bacterial and eukaryotic cells typically contain energy-dependent efflux proteins for self-defense against penetration by toxic compounds (xenobiotics), including antimicrobial and anticancer agents, into the cells. These resistance efflux proteins have been divided into two categories, ATP-dependent and proton-dependent, based on their energy sources. In bacteria, the proton-dependent efflux proteins have been found more frequently rather than ATP-dependent efflux proteins. Comparative amino acid sequence analysis of bacterial proton-dependent efflux proteins has enabled identification of three distinct families and superfamilies: a small multidrug resistance (SMR) family, a major facilitator superfamily (MFS), and a resistance-nodulation-cell division (RND) family. Most efflux proteins typically deal with a narrow range of structurally related substrates; for example, the *Escherichia coli* tetracycline exporter TetA. However, efflux proteins (multidrug efflux proteins) that can clearly handle a wide range of structurally dissimilar compounds have also been identified, and they may contribute to cross resistance between a wide variety of antimicrobial agents. Investigation of the mechanisms of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quinolones and  $\beta$ -lactams has demonstrated interplay between efflux proteins and other resistance factors.