

黄色ブドウ球菌の細胞外毒素分泌トランスポーターの同定

垣内 力

東京大学大学院 薬学系研究科 微生物薬品化学

研究の目的

薬剤排出ポンプは MRSA だけでなく多剤耐性緑膿菌や多剤耐性アシネトバクターなど様々な細菌種の薬剤耐性菌においても発現量が増加している。薬剤排出ポンプの働きを解明することは、MRSA のみならず、様々な病原性細菌の薬剤耐性菌に対する臨床対策を構築する上で重要である。

黄色ブドウ球菌の *AbcA* は、様々な細菌の排出システムに典型的に見られる、6つの膜貫通ドメインと ATP 加水分解ドメインがひとつのポリペプチド (575 アミノ酸) 中に存在する type III ABC transporter である。*abcA* の多量発現は様々な抗生物質と化学物質に対する耐性の増加を導く事が明らかになっている。また、*AbcA* の発現は抗生物質耐性に働く転写因子である *NorG* 以外に、病原性因子群のレギュレーターである *agr*, *Rot*, *SarA*, *SarZ*, *MgrA* によって発現制御を受けている。*AbcA* の発現は、抗生物質処理以外に、静止期や飢餓条件によっても誘導される。これらの知見から *AbcA* が化学物質の排出以外の機能を有すると推定されるが、*AbcA* が輸送する内在性分子や黄色ブドウ球菌の病原性における機能はこれまで明らかになっていない。

黄色ブドウ球菌は PSM と呼ばれる毒素を分泌する事が知られている。黄色ブドウ球菌において、PSM をコードする遺伝子の欠損は黄色ブドウ球菌のマウスに対する殺傷活性を低下させる。また、PSM は黄色ブドウ球菌の軟寒天培地表面における菌集団の広がり制御する^{2,3}。さらに近年、高病原性として問題となっている市中型 MRSA においては、PSM の発現量が増加していることから、PSM は市中型 MRSA の高病原性を説明する因子だと考えられている。PSM の分泌機構を明らかにすることは、黄色ブドウ球菌の感染の分子メカニズムを明らかにする上で重要である。

PSM は両親媒性の α ヘリックス構造を持つ小分子ペプチド (20-26 アミノ酸) であり、その等電点は 10.1-10.5 である。PSM と似た性質を示すペプチドとして、様々な細菌が分泌する抗菌ペプチドが存在する。本研究では、PSM のトランスポーターが、抗菌ペプチドのトランスポーターに類似の構造を持つと考え、トランスポーターの同定を試みた。

方法と結果

AbcA は PSM の分泌に必要である

AurT は一部の黄色ブドウ球菌が分泌する抗菌ペプチド *Aureocin* (等電点 9.9-10.0) のトランスポーターである。PSM α のトランスポーターが *AurT* と類似したアミノ酸配列を有するという仮説を立てた。黄色ブドウ球菌の N315 株のゲノムから protein BLAST により、*AurT* と配列上相同性のあるタンパク質をコードする 18 個の遺伝子を見出した。見出された各遺伝子について黄色ブドウ球菌の遺伝子破壊株を Newman 株において作出し、各株の培養液上清中の PSM 量を HPLC により定量したところ、*abcA* (SA0599) 遺伝子破壊株において培養液上清中の PSM の量が低下していた。*AbcA* は *AurT* と全体のアミノ酸配列が 58% 一致しており、ABC トランスポーターの活性に重要な ATP 結合モチーフ A, モチーフ B, signature C だけでなく、膜貫通ドメインの数とそのアミノ酸配列も良く一致していた。*abcA* 破壊株の培養液上清中の PSM 量の低下は *abc* 遺伝子の導

入によって回復した。また、*abcA* 破壊株の細胞内では PSM 量が野生株に比べて増加していた。さらに、*abcA* 破壊株は野生株とほとんど変わらない増殖を示した。以上の結果より、AbcA は PSM の分泌に必要であることが示唆された。

AbcA は ABC トランスポーターである

ABC トランスポーターは ATP 加水分解時のエネルギーを輸送の駆動力としているため、ATP 加水分解活性に重要な部位である ABC トランスポーターに保存されたモチーフである Walker A, Walker B にアミノ酸置換変異を導入するとその活性を失うことが知られている。AbcA の WalkerA, WalkerB にそれぞれアミノ酸置換変異(K374R, D497R)を導入して変異を導いた変異型 *abcA* 遺伝子を作成し、*abcA* 破壊株に導入した。野生型 *abcA* 遺伝子は培養液上清中の PSM 量を野生型のレベルにまで回復させる一方、K374R および D497R 変異 *abcA* 遺伝子はその回復活性が低下していた。このとき、野生型および変異型 AbcA の発現量は同程度であった。以上の結果は、AbcA の ATP 結合モチーフが黄色ブドウ球菌の PSM の分泌に必要であることを示唆する。

AbcA は黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する

AbcA が黄色ブドウ球菌の病原性に重要であるか知るため、野生株と *abcA* 破壊株の病原性をマウス全身感染モデルにおいて検討した。その結果、野生株を注射したマウスが注射後 30 時間で全頭死亡したのに対し、*abcA* 破壊株を注射したマウスは注射後 100 時間経っても半数以上が生存していた。*abcA* 破壊株のマウス殺傷能力の低下は、*abcA* 遺伝子の導入により回復した。以上の結果は、AbcA が黄色ブドウ球菌の哺乳動物に対する病原性において重要な機能を果たしていることを示唆している。

乳酸菌における AbcA の異種発現は PSM に対する耐性を上げる

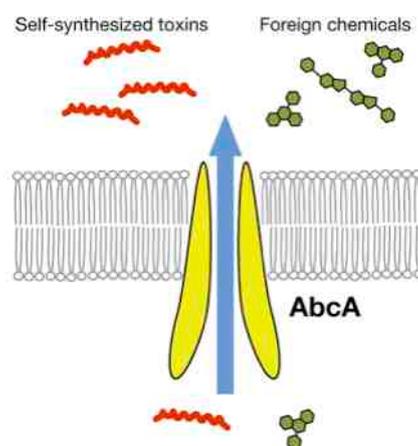
AbcA が直接に PSM を排出するトランスポーターであれば、黄色ブドウ球菌以外の細菌においても PSM の排出に働くと推定される。我々は AbcA を乳酸菌において異種発現させ、PSM に対する耐性が増加するかを検討した。AbcA を発現させた乳酸菌は、発現させていない乳酸菌に比べて、PSM 存在下における生菌数が多かった。この結果は、AbcA が PSM を直接に排出するトランスポーターであることを示唆している。

結論

本研究は、抗生物質に対する耐性に寄与する ABC トランスポーター AbcA が PSM の分泌に必要であることを明らかにした。また、マウス感染実験の結果から、AbcA は黄色ブドウ球菌の病原性発現において必須の働きをすることが明らかになった。さらに、AbcA の乳酸菌における発現は乳酸菌の PSM に対する耐性を上昇させたことから、AbcA は PSM を直接排出するトランスポーターであることが示唆された。本研究は、AbcA がこれまでに知られていた異物排出の機能以外に、菌が生産した毒素を細胞外へ分泌するという機能を持つことを明らかにした³(図 1)。

これまでの研究から、AbcA は疎水性側鎖を有する β ラクタム薬、糖リン脂質のモノマイ

図 1 . AbcA は異物排出と毒素分泌のふたつの機能を持つ



シン, リポペプチド系抗生物質であるダプトマイシン, 染色剤であるエチジウムブロマイドの排出に働くと考えられている。PSM の両親媒性 α ヘリックス構造はこれらの分子の構造とは異なるものの、疎水性の部分構造を有する特徴が一致している。PSM と他の基質の構造を比較することにより、AbcA の基質認識の分子メカニズムが明らかになると期待される。さらに、細胞表面に露出しているトランスポーターは薬がアクセスしやすい標的である。AbcA の阻害は抗生物質への感受性化と病原性の低下というふたつの効果が期待され、黄色ブドウ球菌感染症の新しい創薬標的として有望だと考えられる。

文献

- 1) Kaito C, *et al.* (2011) Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element SCC*mec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS Pathog.* **7**:e1001267.
- 2) Omae Y, Sekimizu K, Kaito C. (2012) Inhibition of colony-spreading activity of *Staphylococcus aureus* by secretion of δ -hemolysin. *J Biol Chem.* **287**:15570-9.
- 3) Yoshikai H, Kizaki H, Saito Y, Omae Y, Sekimizu K, Kaito C. (2016) Multidrug-Resistance Transporter AbcA Secretes *Staphylococcus aureus* Cytolytic Toxins. *J. Infect. Dis.* **213**:295-304.