

学 位 論 文 題 名

バクテリアの多剤排出に関する研究：
培地組成の排出活性に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

バクテリアの薬剤耐性は抗生物質などの薬物が無効になることから化学療法上の障壁になっている。このバクテリアの中には構造上相関性のない様々な薬物に対する耐性(多剤耐性)を獲得しているものが出現している。最近この多剤耐性は、一つの輸送担体で構造上全く相関性のない多種多様な薬物を排出する輸送担体(多剤排出輸送担体)による薬物の排出によることが明らかになってきた。

従来の研究では抗生物質、抗癌剤、消毒薬などの存在下で生育可能な菌株が単離され、その排出輸送担体が研究されてきた。本研究では2種のバクテリアにおいて多剤排出輸送担体の薬物排出活性は薬物が存在しないにも関わらず、過剰量の糖やアミノ酸存在下で培養することにより増大することが明らかになった。この結果は多剤排出輸送担体の生理的役割を考察する上で重要な鍵になることが考えられた。一方、過剰量の栄養物質存在下で培養することにより薬物排出が抑制される多剤排出輸送担体に関する知見が得られ、この知見は輸送担体の起源を考察する上で重要であると考えられた。

本編は2編構成である。

第1編では古細菌の一種である高度好塩菌 *Haloferax volcanii* (*H. volcanii*) に存在する多剤排出輸送担体の薬物排出活性に及ぼす糖、アミノ酸の影響について検討した。過剰量の glucose 存在下での培養で、*H. volcanii* の野生株は抗腫瘍薬である doxorubicin (DOX) に対して耐性を獲得した。この培養条件下における野生株の薬物排出活性を rhodamine 123 (RH123) を用いて測定したところ、RH123 排出活性は増大しており、過剰量の glucose 存在下での培養で獲得した薬剤耐性は薬物の排出による耐性であることが示された。過剰量の glucose 存在下で獲得したこの RH123 の排出は ATP を駆動力とする能動的な排出であり、DOX をはじめ様々な抗腫瘍薬や Ca^{2+} 拮抗薬で阻害されることが示された。glucose 以外の糖で検討した結果、過剰量の fructose 存在下で培養したときも薬物排出活性の増大が観察された。一方、2-deoxyglucose、3-O-methylglucose、L-glucose といった非代謝性の糖存在下で培養した場合、薬物排出活性は増大しなかった。また、細胞内 ATP 量は培養時に糖が存在するか否かには無関係であった。従って、薬物排出活性の増大は駆動力である ATP の増大によるものではない。これらの結果から、野生株の薬物排出活性は菌体が利用できる糖が存在するときに増大し、その増大に糖の代謝が必須であることが明らかになった。

糖以外の栄養物質であるアミノ酸存在下で培養した野生株の薬物排出活性を測定した。その結果、過剰量のLeu存在下での培養により、糖の場合と同様に薬物排出活性が増大することが示された。様々なアミノ酸について検討したところ、薬物排出活性に対するアミノ酸の影響は一様ではなく、薬物排出活性を示さないアミノ酸も存在した。薬物排出活性を増大させた比較的脂溶性の高いアミノ酸は、その脂溶性が膜に相互作用を及ぼし薬物排出活性が増大したことも考えられた。実際、膜に影響を及ぼすアルコールを含む培地で培養したところ野生株の薬物排出活性は増大した。アミノ酸の脂溶性度に対する薬物排出活性をプロットした結果、各アミノ酸は2群に分類でき、同じ脂溶性度を有するにもかかわらず、薬物排出活性の異なるアミノ酸が存在した。このことは薬物排出活性の増大は脂溶性のみでは説明できないことを示している。水溶性の高い物質である糖はその代謝によって薬物排出活性を増大させることを考慮すると、アミノ酸の代謝が薬物排出活性の増大に深く関与すると考えられた。

第2編では *H. volcanii* 以外のバクテリア、真正細菌である *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) に存在する多剤排出輸送担体の薬物排出活性に対する糖の影響を検討した。*C. glutamicum* には ethidium bromide (EtBr) を代表的な基質とする多剤排出輸送担体と tetraphenylphosphonium ion (TPP) を代表的な基質とする多剤排出輸送担体の2つの多剤排出輸送担体が存在した。

C. glutamicum の野生株を過剰量の glucose 存在下で培養した場合、EtBr を排出する多剤排出輸送担体の薬物排出活性はほとんど増大しなかった。一方、TPP を排出する多剤排出輸送担体の薬物排出活性が増大し、その増大は非代謝性の glucose 誘導体である 2-deoxyglucose 存在下で培養した場合には観察されなかった。これらの結果から TPP 排出活性の増大に glucose の代謝が必須であることが示された。栄養物質の代謝が薬物排出活性を増大させることは *H. volcanii* に特異的なことでなく *C. glutamicum* においても該当することが示された。

EtBr 耐性株を glucose 存在下で培養した場合、EtBr を排出する輸送担体の排出活性は消失することが観察された。バクテリアにおいて phosphotransferase system (PTS) により輸送される糖 (PTS sugar) は PTS により輸送されない糖 (non-PTS sugar) の輸送を抑制する現象が知られており、この現象はカタボライト抑制と呼ばれている。EtBr 排出は PTS sugar である glucose や fructose 存在下での培養により抑制され、non-PTS sugar である galactose を含む培地で培養した場合は抑制されなかった。また、EtBr 排出活性の抑制に対する glucose の濃度依存性はカタボライト抑制の典型である galactose の輸送活性に対するそれとよく一致していた。これらの結果から EtBr を排出する多剤排出輸送担体はカタボライト抑制を受ける可能性が考えられた。人工化合物である薬物を輸送する輸送担体がカタボライト抑制を受けることは生理的には考え難いので *C. glutamicum* の EtBr 排出輸送担体は糖の輸送担体が突然変異を起こした結果、薬物を排出するようになったのではないかと考えられるが、現在のところ詳細は不明である。

以上本研究はバクテリアに存在する多剤排出輸送担体の薬物排出に対する栄養物質の影響を検討し、多剤排出輸送担体は栄養物質により活性化、或いは抑制されることが示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	加茂直樹
副査	教授	鎌滝哲也
副査	助教授	横井毅
副査	講師	宮内正二

学位論文題名

バクテリアの多剤排出に関する研究： 培地組成の排出活性に及ぼす影響

本論文学位論文は古細菌に属する高度好塩菌 *Haloferax volcanii* および 真性細菌である *Corynebacterium glutamicum* の2種の細菌を用いて、菌体の薬物排出活性の培養時の培地組成の影響を調べたものであり、3編から構成されている。第1編は *H. volcanii*、第2編は *C. glutamicum* に関するものであり、第3編は実験法を述べている。

申請者より以前の研究で、*H. volcanii* では多剤耐性を示す耐性株が取られていた。ここで、多剤耐性とは多くの種類の抗ガン剤、毒物や薬物に対して耐性を示すことを意味する。この耐性株の多剤耐性の原因は能動的な薬物排出に寄るものであり、その排出輸送体が構造的に相関性のない多くの薬物を認識し、排出することにより、多剤耐性を示すことが、申請者の研究以前に明らかにされていた。この耐性株は徐々に濃度を上げながら抗ガン剤存在下で継代培養して取られたものである。

第1編第1章において、申請者は多剤耐性を示さない *H. volcanii* 野生株をグルコースまたはフラクトース存在下で培養することのみで、菌体はATP依存性の多剤排出輸送活性を示すようになることを発見した。

一般に高度好塩菌は糖を代謝することは出来ないが、*H. volcanii* は糖を利用出来る。しかし、その生育に糖の存在は必須ではない。グルコースの代わりに非代謝性の糖の添加では、排出輸送活性の発現は見られなかった。

第2章において、培地への糖の添加のみでなく、高濃度のアミノ酸の添加でも、野生株に排出輸送活性が生じることを発見した。種々のアミノ酸存在下で発現した輸送活性を添加したアミノ酸のハイドロパシーインデックスに対してプロットすると、3つのグループに分かれた。その内の1つのグループは荷電をもつ親水性のアミノ酸であり、活性の誘導に殆ど効果がなかった。他の2つのグループについては、1つのグループの中では疎水性の高いもの程高い活性を引き起こしたが、2つのグループにわたって考えると、同じ疎水性でも、引き起こす排出活性は大きく違っていた。

第3章では、これら糖とアミノ酸の結果を総合して考察している。推定にしか過ぎないが、大過剰の栄養物を添加することにより、通常では多くが生成されない「細胞にとって有害な物質」が出来、それを排除するために排出輸送体が誘導されると推論している。有害な物質の同定は将来の問題である。なお、アミノ酸の疎水性も関与すると思われるので、膜に何らかの摂動を与えることでも誘導されると推論している。本結論は細菌での考察にとどまらず、ガン細胞に発現するP-糖タンパクについても適用できると思われる。

第2編は *C. glutamicum* に関する結果を述べている。*H. volcanii* は古細菌と呼ばれている生物のグループに属し、真核生物に近い生化学的性質を持っている。そこで、古細菌のみでなく、その他の細菌にも、栄養物過剰負荷の効果が見られるかどうかを検討するために、*C. glutamicum* を選んでいる。第1章では、高濃度のエチジウムブロマイド存在下で生育出来る耐性株を得取している。この変異株では1つの菌

体に2種類の排出輸送体が発現していることを明らかにしている。

第2章では、第1編で見いだしたグルコースの効果を2つの場合について検討している。まず、野生株を高濃度のグルコース存在下で培養すると、2種類のうちの1種類（タイプ1輸送体と名付けている）の排出輸送活性が活性化する。従って、栄養物過剰負荷による排出輸送体の活性化という現象は、*H. volcanii* のみではない。もう1つの排出輸送体は耐性株でのみ発現しており、野生株には活性がない。そこで、グルコース存在下で耐性株を培養してみると、排出活性は消失した。細菌をグルコース存在下で培養すると、色々な物質の膜透過や代謝に関与する酵素の発現が抑制される現象は、カタボライト抑制として広く知られている。この生理的役割は、グルコースが存在するときはグルコースを優先的に利用することにより、無駄なタンパクを合成しないことにある。薬物排出輸送体がカタボライト抑制を受けることは、従って、合目的でない。そこで、申請者は、エチジウムブロマイドの存在下で変異株を選択したため、何らかの元来存在する輸送体の変異して、多剤排出輸送体になったのではないかと推論している。この推論の当否は輸送体の一次構造の解明によって明らかにされると述べている。

このように、申請者は細菌の多剤排出輸送に関して、興味ある現象を見いだし、推論を立てている。この推論の当否は将来の研究に待たなければならないが、興味ある今後の研究の「扉」を開いたものであり、博士（薬学）の学位を授与するに十分であると認めた。