

パッチクランプ法による細菌細胞のイオン輸送系の包括的解析

●黒田 照夫

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科ゲノム応用微生物学分野

〈研究の目的と進め方〉

本研究では、我々が開発した大腸菌をはじめとする細菌細胞でのパッチクランプ法（以下、PC法）とゲノム情報を組み合わせて、全てのイオン輸送タンパク質の解析を総合的に行い、膜タンパク質を介したイオン輸送のネットワークを包括的に理解することを目的とする。同法は、大腸菌での解析の利点（遺伝子操作が行いやすい）とPC法の利点（高感度、高時間分解能など）を組み合わせたものであり、現在までに、呼吸鎖末端酸化酵素の解析をおこなった。本研究ではこれを発展させ、イオン輸送能が低いトランスポーターを中心に解析する。その中でも特に臨床重要であることに加えて、イオン輸送ネットワークの全体像を理解する上で非常に重要であると考えられる多剤排出ポンプと、カチオン交換輸送系であるNa⁺/H⁺アンチポーターを重点的に解析する。これらと同時にグラム陰性菌だけではなく、グラム陽性菌にも同法を適用すべく、枯草菌及び黄色ブドウ球菌での適用も目指した。

〈研究開始時の研究計画〉

(1) イオン輸送タンパク質の大量発現

すでにクローニングし解析を進めていた大腸菌のアミノ酸輸送系SstTの大量発現を行う。SstTはアミノ酸の取り込み系であり、巨大プロトプラスト（詳細は後述）そのものを用いてPC法による解析が可能であるため、選択した。

(2) PC法による活性測定

すでに我々は、大腸菌の巨大プロトプラストを用いてPC法による解析法の開発に成功している。しかし二次性能動輸送系は、単位時間当たりのイオン輸送能が低い。そのため、細胞膜に大量発現させて測定する必要がある。上述した大量発現の条件を巨大プロトプラストにも適用し、巨大プロトプラスト膜にも大量に発現させ、PC法による活性測定を行う。またその妥当性を評価するために、再構成系での結果と比較する。

(3) 機能未知膜タンパク質の遺伝子クローニング

細胞において重要なイオン輸送系は、上記アミノ酸輸送系に加えて、多剤排出ポンプやNa⁺/H⁺アンチポーターがある。これら2つはいずれも細菌細胞が外界からのストレス（抗菌薬や不適切なイオン環境）に応答して生存するためには重要なものである。これらの遺伝子を、機能相補（Functional cloning）とゲノム情報を基にした構造類似性（PCR cloning）の観点から網羅的にクローニングする。

〈研究期間の成果〉

(1) イオン輸送タンパク質の大量発現

大腸菌Na⁺/セリン共輸送系SstTの大量発現はtrc promoterの下流に遺伝子を挿入することで比較的容易に行うことができた。また精製してリポソームへの再構成を行い、その活性を生化学的に測定することができた(1)。これによりPC法という新規測定系の妥当性

を示すためのコントロール実験を行うことが可能となった。

一方で多剤排出ポンプについては、活性の強さや基質特異性の広さから、腸炎ビブリオNorM、大腸菌MdfA、黄色ブドウ球菌NorA、non-O1 コレラVcaM (6) を選択し、大量発現を行った。これらについては、下記に記す理由によりtrc promoterをあきらめ、arabinose promoterを用いた大量発現系を構築した。

(2) PC法による活性測定

PC法により活性測定するためには、巨大プロトプラストの膜上に、目的のイオン輸送系を“大量に”発現させる必要がある。そこでSstTの大量発現の条件を参考に、巨大プロトプラスト上での大量発現を試みたが、ほとんど発現しなかった。これは通常細胞ではうまく誘導がかかるが、巨大プロトプラストではその制御がうまくできていない可能性が考えられた。特にtrc promoterは培地の栄養が豊富であると発現誘導しにくいという点も関係しているのだろう。加えて、SstTは重要なイオン輸送系であるがゆえに、大量発現すると細胞にとって致死性となる。巨大プロトプラストは通常細胞と比してはるかに脆弱なため、うまく発現できないことが予想された。

そこで培地の栄養成分などによって影響をほとんど受けず、短時間で効率的な発現誘導を行うことができるarabinose promoterの系に変更した。また対象となるイオン輸送系には、致死性となることがわかっているSstTは選択せず、多剤排出ポンプに絞った。さらにPCRによる増幅を一度行うだけで、arabinoseオペロンのS.D.配列からの距離が最適で、なおかつC末端にHis-tagを連結させることができるようにプラスミドを構築した。その結果、通常細胞では、NorM, NorA, MdfA, VcaMの大量発現を行うことができるようになった。この時点ではたとえ大量発現させても細胞が致死的になることはなかった。

しかし新たな問題が発生した。確かにarabinose promoterを利用すれば、巨大プロトプラストの膜上に目的のイオン輸送系を発現させることはできた。ところが大量発現させた細胞は、PC法を適用できる大きさにまで巨大化しなかった。すなわち大きくなった細胞はあまり目的のイオン輸送系が発現しておらず、逆に大量に発現している細胞は大きくならなかったのである。できる限りよい細胞を選んで活性測定を試みたが、有意な活性は検出できなかった。

以下の2点について現在もお研究を進めている。

a) 巨大プロトプラストの場合にのみ大量に発現する大量発現系の構築

b) 測定系の感度の大幅な上昇

これらの点については‘今後の課題’の項で述べる。一方で、グラム陽性菌である枯草菌、黄色ブドウ球菌においては巨大化条件を確立し、呼吸鎖の活性をPC法により測定できるようになった（論文作成中）。

(3) 機能未知膜タンパク質の遺伝子クローニング

この点に関しては非常に大きな進展が見られた。特に多剤排出ポンプについては、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、腸炎ビブリオ、non-O1 コレラ、セラチア・マルセッセンス、肺炎桿菌などから少なくとも58個の多剤排出ポンプ遺伝子を見出すことに成功した。

黄色ブドウ球菌のゲノム上には推定37個の多剤排出ポンプが存在している。これらのうちNorAはすでにクローニングされ解析されているため、残るものについてFunctional cloningとPCR cloningによりクローニングを行った。その結果計20個のものが多剤排出ポンプとしての機能を持っていることが示された。

セラチア・マルセッセンスと肺炎桿菌についてはまずはFunctional cloningのみを行った。多数の候補プラスミドが得られたが、基質特異性や部分塩基配列からセラチア・マルセッセンスでは9グループ、肺炎桿菌では17グループに分類することができた(3, 14)。またそのうちの1つセラチア・マルセッセンスのSdeXYについては解析結果を報告した(5)。

non-O1 コレラについてはFunctional cloningにより新たに2個が得られた(6, 7)。多剤排出ポンプはアミノ酸配列や共役カチオンの違いにより5つのタイプに分類されているが、この菌では引き続きMATE(Multidrug and toxic compounds extrusion)型の多剤排出ポンプを集中的に解析した。ゲノム上には6個推定されており、すでに解析した2つ以外の4つについてPCR cloningを行い、その性質を調べた(16)。一方、腸炎ビブリオについては新たに得られたものがRND(Resistance modulation cell division)型の多剤排出ポンプであったため、ゲノム上に存在する残り11個についても同時に解析を行った。その結果、少なくとも計9個については多剤排出ポンプとしての機能を有していた。

緑膿菌については本研究開始時においてすでに多くの遺伝子が同定されていた。そこでPCR cloningとともに抗菌薬耐性変異株を分離した後Functional cloningを行った。この方法では、通常では眠っているsilentな遺伝子についてもFunctional cloningが可能となる。その結果、新たに6個のものが同定された。それらのうち、5つについては論文報告すると共に、3つについてはその遺伝子破壊株を緑膿菌で作成した。そして、いくつかのものは緑膿菌の自然耐性(もともと持つ抗菌薬耐性)に大きく関係していることが示された(4, 8, 9, 11, 17)。

そのほか、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、インフルエンザ菌、アシネトバクターなどからも多剤排出ポンプ遺伝子をクローニングした(2, 10, 12, 15)。

さらにNa⁺/H⁺アンチポーターについては緑膿菌から新たなものをクローニングした(18)。多剤排出ポンプ遺伝子が予想以上にクローニングできたため、結果的にはこちらはあまり進展できなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

多剤排出ポンプの遺伝子クローニングについては、これだけ多くの病原性細菌(日和見感染菌を含む)の遺伝子をクローニングした例はない。緑膿菌や大腸菌については他の研究室においても行われている。しかし黄色ブドウ球菌やnon-O1 コレラ、腸炎ビブリオ、肺炎桿菌などについては、臨床上においては極めて重要であるにもかかわらず、このような大規模な解析は行われていなかった。その点においては今後これらの成果が様々な場面において生かされると考えている。

上述した細菌は、臨床分離株の調査によると、徐々にではあるが抗菌薬耐性が上昇してきているという報告もある。現時点では突然変異などが起こらなくても発現している多剤排出ポンプやその他の多剤耐性機構による耐性が見られているに過ぎない。しかし、抗菌薬の発展と共に、細菌側の進化もまた起こる。その際にはこれらの知見が重要になると思われる。

PC法による測定については、同じ分野では発展が期待されている。特にRND型多剤排出ポンプについては、三成分からなる複合体を形成していることもあり、いまだに良い測定系は存在しない状況であると考えている。そのような抗菌薬耐性の研究者だけではなく、広く細菌細胞のイオン輸送系を取り扱う分野においては、大変興味を感じていただいている。世界的に見ても単位時間当たりのイオン輸送能が比較的低いトランスポーターの活性をPC法で測定した例は、細菌細胞では見られていない。本研究でも酵母においては成功しており(13)、そのノウハウは測定系の更なる改善に生かしていこうと考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

最終的に、PC法によって単位時間当たりのイオン輸送能が比較的低いトランスポーターの活性を検出することはまだできていない。その主な理由は以下のとおりである。

- 巨大化させる条件では目的のイオン輸送系を大量発現できない。
- 巨大プロトプラストは通常の細胞と様々な遺伝子の発現が異なっているようである。
- 強引に巨大化しても細胞膜がさらに脆弱になるだけである。

このように1つの利点が別の欠点になっている状態であり、根本的な戦略の練り直しが必要となった。上記の問題点は研究開始当初には予想しなかったことである。

〈今後の課題〉

まずはPC法を適用するために適した大量発現系を構築することが急務である。いくつかのプロモーターについて検討を行ったが、あまり適切なものはない。そこで、全く別のアプローチを考えている。それは、マイクロアレイ解析の結果を基にした最適プロモーターの探索である。研究最終年度末に、通常細胞と巨大プロトプラストからそれぞれRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、非常に多くの遺伝子の発現が変化していることがわかった。それらの中では、巨大プロトプラストで非常に多く発現しているものも見受けられた。この遺伝子のプロモーターは巨大プロトプラストの成長(巨大化)過程において、よく機能しているものであると考えられる。その遺伝子発現のメカニズムは全く知見がないが、少なくともこれらのプロモーターをうまく利用すれば、巨大化させたときにだけ発現できるような発現系を作り出すことが可能であると考えている。いうまでもなく、巨大化に必須な遺伝子であれば染色体上の同遺伝子をノックアウトすることはできないが、いくつか候補を挙げて解析していけば、現状よりもはるかに適した発現系を構築することができると考えている。

一方で、材料側だけでなく、検出側の改善も必要になるであろう。現在のパッチクランプシステムは、1 pAの電流を有意なものとして見極めることは難しい。それはノイズ電流との差がほとんどなくなるからである。現システムでも、市販され動物・植物細胞に汎用されている

システムよりははるかに感度が良く、小さな電流でも精度よく検出できる。現システムでは単位時間当たりのイオン輸送能が高いイオンチャネルや、ある程度高い呼吸鎖やF-type ATPaseの活性を捉えることは十分に可能である。しかしそれではまだ不十分である可能性がある。この不十分さを、対象となるイオン輸送系の数を増加させることができる‘大量発現’でクリアーしようと考えていた。しかし本研究の結果から、大量発現だけでは良くてもせいぜい10倍ぐらいであり、単独では測定が難しいことも予想された。しかし検出側の感度を10倍上げることができれば、結果として現在の検出限界を1/100に下げることができる。機械上（増幅回路図）での改善策は共同研究者と話し合った結果、ある程度形にはなっている。まだ実現には少し時間がかかるが、それまでの間、大量発現系の構築に取り組むべきである。

多剤排出ポンプについては非常に多くの遺伝子がクローニングされた。しかしほとんどのものは宿主である大腸菌で発現させたものの性質を調べているに過ぎない。菌が異なればその膜構造（lipidの組成など）が異なり、その活性に変化が現れる可能性は十分にある。むしろ、腸炎ビブリオなら腸炎ビブリオにおいて解析したほうがより自然な状態での性質を知ることができるであろう。いくつかの細菌は遺伝子破壊の方法が確立できているが、多くの病原性細菌では遺伝子破壊、特に抗菌薬耐性マーカーを残さない方法は確立できていない。今後はこれらのことも踏まえて、クローニングしたもとの細菌での解析を十分に進めるべきであると考え。そして最終的にこれらの菌においてもPC法を適用するべく、手法の改善を進めていくことが必要であるだろう。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. 0303240854
Kim, Y.M., Ogawa, W., Tamai, E., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Purification, reconstitution, and characterization of Na⁺/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli*. *J. Biochem (Tokyo)*. 132(1), 71-76 (2002).
2. 0303240858
Lee, E.W., Chen, J., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of *EmeA*, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol. Pharm. Bull.* 26(2), 266-270 (2003).
3. 0303240901
Chen, J., Lee, E.W., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Multidrug resistance in *Serratia marcescens* and cloning of genes responsible for the resistance. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3), 391-393 (2003).
4. 0401071323
Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T., and Tsuchiya, T. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* 51(4), 991-994 (2003).
5. 0401071340
Chen, J., Kuroda, T., Huda, M.N., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. An RND-type multidrug efflux pump *SdeXY* from *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(2), 176-179 (2003).
6. 0401071355

- Huda, N., Lee, E.W., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, *VcaM*, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(8), 2413-2417 (2003).
7. 0401071359
Huda, M.N., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Gene cloning and characterization of *VcrM*, a Na⁺-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol. Immunol.* 47(6), 419-427 (2003).
8. 0401071404
Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, *mexHI-opmD*, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(9), 2990-2992 (2003).
9. 0401071408
Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, *MexVW-OprM*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(4), 572-575 (2003).
10. 0401071412
Lee, E.W., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. *EfrAB*, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(12), 3733-3738 (2003).
11. 0401071416
He, G.X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, *PmpM*, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 186(1), 262-265 (2004).
12. 0401071431
Xu, X.J., Su, X.Z., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. Molecular cloning and characterization of the *HmrM* multidrug efflux pump from *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiol. Immunol.* 47(12), 937-943 (2003).
13. 0602061515
Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C.L., and Rivetta, A. Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J. Membr. Biol.* 198(3), 177-192 (2004).
14. 0602061519
Ogawa, W., Li, D.W., Yu, P., Begum, A., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. *Biol. Pharm. Bull.* 28(8), 1505-1508 (2005).
15. 0602061522
Su, X.Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. *AbeM*, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(10), 4362-4364 (2005).
16. 0602061525
Begum, A., Rahman, M.M., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. Gene cloning and characterization of four MATE family multidrug efflux

pumps from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol. Immunol.* 49(11), 949-957 (2005).

17. 0602061527

Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49(11), 999-1002 (2005).

18. 0602061700

Kuroda, T., Fujita, N., Utsugi, J., Kuroda, M., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. A major Li⁺ extrusion system NhaB of *Pseudomonas aeruginosa* : comparison with the major Na⁺ extrusion system NhaP. *Microbiol. Immunol.* 48(4), 243-250 (2004).