

## *Legionella pneumophila* の 新規多剤排出ポンプのクローニングと解析

田平 明啓, 石田 里和, 塩田 澄子, 山田 陽一  
就実大学薬学部分子生物学研究室

### Gene cloning and characterization of a novel multidrug efflux pump in *Legionella pneumophila*

Akihiro Tahira, Satowa Ishida, Sumiko Shiota, Yoichi Yamada  
Laboratory of Molecular Biology, School of Pharmacy, Shujitsu University  
(Received 31 October 2016; accepted 6 December 2016)

---

**Abstract:** *Legionella pneumophila* causes respiratory diseases including severe pneumonia, called Legionnaires' disease, and Pontiac fever. *L. pneumophila* have ability to infect alveolar macrophages and grow in them. To approach *L. pneumophila* in macrophages, effective antimicrobial agents are limited. Once *L. pneumophila* develops a resistant to antibiotics, treatment becomes extremely difficult. The analysis of drug resistance mechanisms of *L. pneumophila* is important. One of such mechanisms, the multidrug efflux pump, is common to bacteria and contributing to multidrug resistance. We cloned *lpg1323* from *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* JCM7571. The putative protein of Lpg1323 has 12 trans-membrane segments and belongs to Major Facilitator superfamily. It shows 64% similarity to NorA, a known multidrug efflux pump in *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli* KAM32, a drug hypersensitive strain, cells harboring a plasmid carrying *lpg1323* become resistant to many kinds of antimicrobial agents.

Keywords: drug resistance; *Legionella pneumophila*; efflux pump; major facilitator superfamily

---

#### 緒言

グラム陰性桿菌の *Legionella pneumophila* は、1976 年に在郷軍人病の病原体として見出された<sup>1)</sup>。 *L. pneumophila* は通性細胞内寄生性であり、沼や湖沼などの水中や土壌中において、原生生物や藻類に寄生、共生している。さらに、多量の貯

留水を必要とする空調設備や入浴設備などの人工環境でも生息できる事が知られている。そのような施設において発生した *L. pneumophila* を含むエアロゾルをヒトが吸入した場合に感染を引き起こす。吸入された *L. pneumophila* は肺胞マクロファージによって貪食されるが殺菌機構を逃れ、

肺胞マクロファージ内で増殖が可能である<sup>2)</sup>。感染すると全身性倦怠感, 頭痛, 食欲不振, 筋肉痛, 高熱や肺炎を引き起こし, 有効な抗菌薬が投与されない場合には, 7日以内に死亡することが多い<sup>3)</sup>。そのために, *L. pneumophila* 感染症の治療薬として, マクロファージに浸透しやすい抗菌薬を選択する必要がある。すなわち, macrolide 系の erythromycin, new quinolone 系の ciprofloxacin, rifamycin 系の rifampicin などである。しかし, *L. pneumophila* はこれらの抗菌薬に対して耐性を獲得するという報告がある<sup>3)</sup>。

細菌は様々な機構で抗菌薬に対して耐性を獲得することが知られている。抗菌薬の不活性化, 抗菌薬の作用点の変化, 代替酵素の産生, 抗菌薬の膜透過性の低下, 抗菌薬の菌体外への能動的排出の5つが主に知られている<sup>1)</sup>。これらの中でも抗菌薬の菌体外への能動的排出に分類される多剤排出ポンプは, 1つのポンプで構造上類似性が見られない複数の抗菌薬を排出することができるため, 多剤耐性に関与している。

多剤排出ポンプの解析結果より, 細菌は複数の多剤排出ポンプを持つことが知られている<sup>4)</sup>。さらに, それらが発現することで細菌は多剤耐性化する。しかしながら, *L. pneumophila* の多剤排出ポンプについては全く解析が行われていない。そこで我々は, *L. pneumophila* の多剤排出ポンプをコードすると推測される遺伝子をクローニングし, その解析を行った。

## 方法

**菌株** 理研 BRC から提供された *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* JCM7571 を用いた。制限修飾系と主要な多剤排出ポンプ遺伝子を欠損した *Escherichia coli* KAM32 株を用いた<sup>5)</sup>。

**培養条件** *L. pneumophila* の培養には L-システインを添加した BCYE 培地 (BD) を用いた。*E. coli* の培養には L 培地 (1.0% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 及び L 寒天培地を使用した。必要に応じて終濃度 100

μg/mL となるように ampicillin を添加した。

**ハイドロパシー解析** GENETYX ver.13 のハイドロパシー解析ソフトを使用した。

**DNA 操作** NucleoSpinTissue (MACHERY – NAGEL) を使用し, 染色体 DNA の調製を行った。KOD-Plus-Neo(TOYOBO)を使用して目的遺伝子の増幅を行った。PCR の条件は 94°C で 2 分, 98°C で 10 秒と 68°C で 30 秒と 68°C で 7 分を 35 サイクル, 68°C で 7 分の条件を用いた。PCR に使用した primer は, lpg1323-F: GATGGATCCGC GCTACTGTTAAGAACAC, lpg1323-R: GATGTCG ACTGCAGCCTTATTGCCT である。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて pBluescriptII KS(+) を調製した。BamHI, SalI (TOYOBO) を用いて DNA の切断を行い, ライゲーション反応は Ligation-Convenience Kit (Nippon Gene) を用いた。ユーロフィンジェノミクス (株) DNA シーケンス部門に委託し, 塩基配列を決定した。RbCl<sub>2</sub> 法で調製した *E. coli* のコンピテントセルにプラスミド DNA を導入した。

**最小生育阻止濃度 (MIC) の測定** Clinical and Laboratory Standards Institute の標準法に基づいて測定した<sup>6)</sup>。

## 結果・考察

ゲノムプロジェクトが行われた生物の膜輸送タンパク質の予測を行っている Transporter Data Base (<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html>) を利用し, *L. pneumophila* の推定多剤排出ポンプの検索を行った。多剤排出ポンプは主に 5 つの family に属することが知られているが, その中でも多くの細菌に存在している major facilitator (MF) superfamily に着目した。この family に属する多剤排出ポンプは細胞質膜に存在し, H<sup>+</sup> の電気化学的ポテンシャルをその駆動力とする。また, 構造上, 12 回膜貫通型と 14 回膜貫通型に分類される事が知られている。それぞれの例として, *Staphylococcus aureus* の NorA<sup>7)</sup> や QacA<sup>8)</sup> が挙げられる。NorA は 388 アミノ酸残基

より構成され、キノロン系抗菌薬や色素系抗菌薬などを主な基質としている。一方、QacA は 514 アミノ酸残基より構成され、消毒薬や色素系抗菌薬などのカチオン性の物質を主な基質としている。そこで、*L. pneumophila* の MF superfamily に属する 11 種類の推定多剤排出ポンプと、NorA または QacA との類似性を調べた (表 1)。その結果、Lpg1323, Lpg0177, Lpg2438 は NorA とそれぞれ約 64%, 62%, 57%, Lpg1454 は QacA と約 54% と比較的高い類似性を示した。そのため、他の細菌同様に *L. pneumophila* も MF superfamily に属する複数の多剤排出ポンプを保有していると推測された。それらの中でも、最も高い類似性を

表 1. *L. pneumophila* の推定多剤排出ポンプと NorA, QacA との類似性

推定多剤排出 ポンプ	アミノ酸 残基数	類似性(%)	
		NorA	QacA
Lpg0061	392	28	5
Lpg0177	382	62	37
Lpg0610	435	43	5
Lpg0637	423	32	26
Lpg0652	430	27	4
Lpg1323	386	64	12
Lpg1454	461	16	54
Lpg2061	401	25	28
Lpg2234	455	38	23
Lpg2438	396	57	19
Lpg2841	399	35	20

示した Lpg1323 について解析を進めた。

膜輸送タンパク質の膜貫通領域には疎水性アミノ酸残基が多く含まれ、その逆に膜貫通領域以外には親水性アミノ酸残基が多く含まれる。Lpg1323 は NorA とほぼ同じ 386 アミノ酸残基から構成されているが、NorA と同様にその構造中に膜貫通領域をもつかハイドロパシー解析を行うことで推測を行った (図 1)。その結果、Lpg1323 のアミノ酸配列中には疎水性アミノ酸残基が高頻度に局在する領域が 12 ヶ所見つかった。いずれの領域も膜貫通に必要な長さがあるため、Lpg1323 は 12 回膜貫通領域をもつ膜タンパク質であると推測された。

次に、標準株である *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* JCM7571 の染色体 DNA を鋳型とし、lpg1323-F, lpg1323-R のプライマーを用いて、自身のプロモーターを含むように *lpg1323* の PCR を行った。pBluescriptII KS(+) の *lac* プロモーターと逆向きに *lpg1323* を組み込み、得られたプラスミドを pLKS1323 とした。シーケンスを確認したところ、クローニングした *lpg1323* およびその推定のプロモーター領域において変異はなかった。

pLKS1323 を抗菌薬高感受性 *E. coli* KAM32 株に導入し、種々の抗菌薬に対する MIC の測定を複数回行った (表 2)。抗菌薬高感受性 *E. coli* KAM32 株は主要な多剤排出ポンプを欠損した *E. coli* 株であり、抗菌薬耐性のバックグラウンドが低い。そのため抗菌薬耐性度の解析に適した宿主である。KAM32 / pLKS1323 の MIC は imipenem

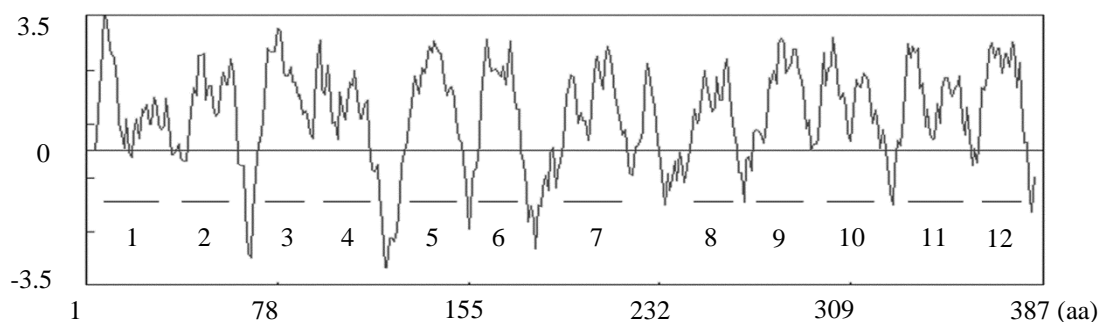


図 1. Lpg1323 のハイドロパシー解析

が 0.5µg/mL, tetracycline が 0.25 µg/mL, erythromycin が 4 µg/mL, norfloxacin が 0.06 µg/mL, acriflavine が 5.6 µg/mL, ethidium bromide が 8 µg/mL, rhodamine 6G が 8 µg/mL と, コントロールの KAM32 / pBluescriptII KS(+) に比べ, いずれも 2 倍, 上昇していた. その中には, 耐性機構が排出ポンプ以外は知られていない acriflavine, ethidium bromide, rhodamine 6G が含まれていた. 以上のことより, Lpg1323 は *L. pneumophila* の多剤排出ポンプであると考えられた. 未だ MF superfamily に属する多剤排出ポンプの候補の結晶構造解析は行われていないが, RND family の多剤排出ポンプの結晶構造解析から, 多剤認識機構が明らかにされつつある<sup>9)</sup>. 多剤排出ポンプは基質認識にある程度の空間を利用している. その空間の中でも基質によって認識に利用する部位が異なるために, 一つの空間で多種類の構造の異なる基質を認識できると考えられている. そのため, ciprofloxacin と norfloxacin のように構造のわずかな違いで Lpg1323 の基質認識空間の特定部位との適合に差がうまれたと考えられた. その結果, MIC において norfloxacin は 2 倍の耐性度の差が見られた一方で, ciprofloxacin は耐性度の差が 2 倍未満, すなわち, 耐性度に差が見られなかったと考えられた. doxycycline と tetracycline においても同様の事が考えられた. 数少ない *L. pneumophila* 感染症治療薬である quinolone 系抗菌薬において多剤排出ポンプの基質のなりやすさがその構造によって異なることは, 治療薬の選択に重要であり, Lpg1323 の解析に意義があると考えられた. また, KAM32 / pLKS1323 では細胞壁の生合成を阻害する imipenem の MIC が 2 倍上昇していた. しかしながら, MF superfamily に属する Lpg1323 は細胞質膜 (内膜) に存在していると考えられ, imipenem を細胞内からペリプラズムに排出しても imipenem 耐性には影響を与えないはずである. そのため, Lpg1323 は *E. coli* の多剤排出ポンプ EmrB のように外膜に存在する outer membrane protein (OMP) と協働し, 細胞内

表 2. 各種抗菌薬に対する MIC

抗菌薬	MIC (µg/mL)	
	KAM32/ pBluescriptII KS(+)	KAM32/ pLKS1323
Imipenem	0.25	0.5
Doxycycline	0.2	0.2
Tetracycline	0.125	0.25
Erythromycin	2	4
Chloramphenicol	0.5	0.5
Ciprofloxacin	0.008	0.008
Norfloxacin	0.03	0.06
Rifampicin	4	4
Acriflavine	2.8	5.6
Ethidium Br	4	8
Rhodamine 6G	4	8
Benzalkonium Cl	2.4	2.4
TPPCI*	8	8

\*TPPCI; tetraphenylphosphonium chloride

の基質を外膜の外に直接, 排出できる可能性が考えられた<sup>10)</sup>. Transporter Data Base によると, *L. pneumophila* には 3 つの OMP が存在することが推測されている.

本研究ではいくつかの抗菌薬の MIC が 2 倍のみ上昇していた. この理由としては, プラスミド上の *lpg1323* は *lac* プロモーターと逆向きに位置しており, このために *lpg1323* のプロモーター活性が低下し, Lpg1323 の発現量が少なくなっている可能性が考えられた. また, 宿主の違いによる可能性も考えられた. *L. pneumophila* と *E. coli* はともにグラム陰性桿菌であるが, その生活様式は大きく異なる. *L. pneumophila* は通性細胞内寄生性であり, 通常の栄養培地での生育は困難である. そのような性質に由来する膜構造の違いなどのために, *L. pneumophila* の多剤排出ポンプは *E. coli* において, 本来の機能を発揮できない可能性が考えられた. *S. aureus* の多剤排出ポンプ MdeA で

は, *E. coli* と *S. aureus* を宿主として解析した場合に, 基質特異性や抗菌薬耐性度への影響が異なることが報告されている<sup>11)</sup>. そして, 本来の宿主である *S. aureus* における解析のほうが多剤排出ポンプの基質が多く見出され, その活性も高かった. そのため, Lpg1323 の本来の機能を解析するためには, *L. pneumophila* を宿主に用いて解析する必要がある. *E. coli* において, Lpg1323 は *L. pneumophila* 感染症の治療薬の erythromycin に対する耐性に関与していた. また, 今回の解析では new quinolone 系の norfloxacin 耐性にも関与していた. そのため, 将来の抗菌薬耐性 *L. pneumophila* の出現に備えるため Lpg1323 のさらなる解析や他にも多く存在している未知の多剤排出ポンプの解析を行うことが重要である.

#### 引用文献

- 1) 塩田澄子, 黒田照夫: 微生物学・感染症学 (第2版), 化学同人, 2016.
- 2) Barker J., et al.: Intraphagocytic Growth Induces an Antibiotic-Resistant Phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39(12) 2684-2688(1995).
- 3) Barry S. F., et al.: *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3) 506-526 (2002).
- 4) Nishino K., Yamaguchi A.: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 183(20) 5803-5812 (2001)
- 5) Chen J., et al.: VmrA, a member of a novel class of Na(+)-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 184(2) 572-576 (2002)
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute: Approved Standard-ninth edition, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. M07-A9. (2012).
- 7) Ubukata K., et al.: Cloning and Expression of the *norA* Gene for Fluoroquinolone Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33(9) 1535-1539 (1989)
- 8) Tennent J. M., et al.: Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 135(1) 1-10 (1989)
- 9) Ryosuke N., et al.: Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* 419 (7378) 587-593 (2002)
- 10) Mikio T., et al.: The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from *Escherichia coli* forms a dimer in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380(2) 338-342 (2009)
- 11) Yamada Y, et al.: Functional gene cloning and characterization of MdeA, a multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(4) 801-804 (2006)