

特別寄稿

緑膿菌に懸想—奇跡的な軌跡を反芻する—

後藤直正*

京都薬科大学 名誉教授

本学教育職員として約40年の研究生活の雑感をまとめた。グラム陰性の日和見感染症の起因菌である緑膿菌の外膜タンパク質 OprF および OprD の機能の解明, 広範囲の抗菌薬を細胞外に能動的に排出する RND 型異物排出システムの同定および機能の解明, 異物排出システムの細菌の生存のための機能の解明とともに, ゲノムプロジェクトの一環として担当したセラチア菌の解析から見えてきた非病原性細菌から病原性細菌への進化についての成果についてまとめた。また学長を終え, 大学教育職員としてあるべき姿について個人的な意見を記した。

キーワード: 緑膿菌, ポーリンタンパク質, 多剤排出システム, セラチア菌, ゲノム解析

受付日: 2022年5月13日, 受理日: 2022年6月6日

1. はじめに

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* に魅入られ40年が過ぎた。Moraxella catarrhalis, Bacteroides fragilis, Enterobacter faecalis などの細菌をも研究対象としなければならなかったときもあるが, それらに魅力を感じることもなく, 早々に幕を引いた。しかし終盤になって着手したセラチア菌 *Serratia marcescens* に関しては夢を描き, それなりの力を込めた。それは緑膿菌では着手できなかったゲノム研究だからであった。

なぜ緑膿菌か。現在では日和見感染症起因菌の代表格ではあるが, 筆者が本学微生物学教室に卒論生として配属された1970年代半ば, 黄色ブドウ球菌や, 大腸菌を始めとした腸内細菌

科の研究が主流であり, 緑膿菌研究というのはマイナーであった。

では緑膿菌が将来臨床で大きな問題となることを予想したのか? そのようなことを想像したのではない。他人と同じことはしたくない, “Pseudomonas” という属名にかっこよさを感じ, さらに当時出版された成書『緑膿菌とその感染症』¹⁾の白い表紙に惹かれた, そんな稚拙なことが契機だったような気がする。

非科学的な衝動から緑膿菌研究を始めたが, 『Genetics and Biochemistry of Pseudomonas aeruginosa』²⁾を読み終え, 実験を重ねるうちに, 「緑膿菌は大腸菌にはない, 多彩な資化能力や環境への適応性, そして種々の消毒薬・抗菌薬に高い抵抗性を有している。これを研究材料にすれば, 細菌という生命の普遍性と特異性が見いだせるのではないか。それは真核細胞にも通じる知見にはならないか」と夢想するように

*連絡先:
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5

なった。長らく論文や講演では「緑膿菌感染症を克服するために—To overcome severe infectious diseases caused by *P. aeruginosa*—」と言うようなことを少なからず書いたし、言ってもきた。それらは嘘ではないが一種の隠れ蓑であり、真の目的は緑膿菌を起点に真核生物にまで通じる生命現象を見出すという夢を追うことだった。

本稿は、今の時代では趣味的と排される研究に寛容な時代の軌跡を反芻したものである。一研究者の“ぶつぶつ”としてお読み頂ければ幸いである。

2. 抗菌作用研究の挫折

大学院修士課程の研究テーマは、電子顕微鏡を用いた細菌の形態的变化観察から抗菌薬の作用を調べることであった。抗菌薬、とくにβ-ラクタム薬による細菌の形態変化は劇的なもので、フィラメント化、球状化やブレップ形成などを引き起こすことから形態変化研究に魅了された。特に武田薬品工業で開発中の単環系β-ラクタム、Nocardicin A がもたらす特異な形態変化³⁾から新規な細胞分裂機構を見出せるのではないかと考えていた。しかし、Spratt による衝撃的な論文⁴⁾に出会い、私の考えの愚かさ気づかされた。細菌細胞内に透過した抗菌薬が作用点に結合し、細菌細胞壁の主成分であるペプチドグリカン合成が阻害された結果、形態が変化する。この変化のメカニズムはひとつではなく、ペニシリン結合タンパク質 penicillin-binding proteins と名付けられた合成酵素群によって担われていることが明らかにされた。この発見は細菌細胞の形態形成の機構を明らかにしただけではなく、細菌感染症治療におけるβ-ラクタム薬の選択の因子としても重要な発見である。この論文に大きな感銘を覚える一方、私がやっている形態変化研究の価値を疑うもの

ともなった。つまり、形態変化は複雑な反応の結果であって、いくら積み重ねても原因には辿り着かないことに気付かされた。今後、どうすべきかと悶々と考え込む日々を過ごすことになった。

このように割り切れぬものを抱きながらも本学助手（微生物学教室・谷野輝雄教授）に採用された。与えられた研究テーマは、形態学的研究を含む「新規抗菌薬の細菌学的評価」で、開発中の抗菌薬の細菌学的有効性を“第三者”として検証し、さらに特徴づけをするという、企業から依頼された受託研究である。画期的なフルオロキノロンの第1号であるノルフロキサシン（杏林製薬）を始め、幾つかの抗菌薬を担当した。しかしすでに製薬企業の研究所で行われた研究データの再現性を調べるのが面白い研究であるとは思えず、気も乗らぬ日々を過ごした。そのようなテーマであっても無駄でなかったこともある。ひとつは実験動物を使った感染実験を経験したことであり、ふたつ目はノルフロキサシンの創製や上市に貢献され、のちに杏林製薬の社長を務められた平井敬二博士と出会ったことである。平井博士は開発当初よりキノロン薬耐性機構の先駆けの研究を開始しておられ、その研究について議論できたことが後述する異物排出システムの研究に繋がった。

3. 緑膿菌の遺伝学研究の端緒

新規抗菌薬の受託研究に不満を抱きながら、Spratt の研究⁴⁾の衝撃から立ち直るべく、研究の軌道修正を考え続けていたときに、細菌の運動器官であり、多種のタンパク質による部品がさらに秩序正しく会合するという複雑な鞭毛の形成過程を遺伝学的研究の成果がまとめられた『分子構築の遺伝学』⁵⁾に出会った。複雑な器官形成でさえ、遺伝学的に説明することができ

ることを知り、遺伝学を学ぶべきだと思った。遺伝学的手法を研修する場はないかと模索した。紆余曲折を経て、当時の微生物学教室の谷野輝雄教授のご支援のもと、緑膿菌の遺伝研究の第一人者である信州大学医学部細菌学教室の松本穎樹講師に学ぶために信州大学・医学部に内地留学することが許可された。

信州大学では細菌間遺伝子伝達現象、とくに接合や形質導入を使って表現型の原因となる遺伝子座を特定することについて研鑽した。現在の方々は、遺伝実験系と言えば分子生物学的技術のことに思われるが、当時は、数種類の制限酵素やリガーゼの販売が宝酒造（現タカラバイオ）から始まったところであり、遺伝子操作も含めた分子生物学的技術を使えるようになったのは緑膿菌外膜タンパク質 OprD の研究を始めた頃だった。

当時の緑膿菌の遺伝研究は、Holloway, B. W. (Australia) を中心に、Haas, D.E. (Switzerland) と松本先生の3人の研究者によって先導されていた。当時の松本先生は染色体性 Amp^{Cβ}-ラクタマーゼ産生の制御機構を主にやっておられ、また Holloway 博士との共同研究で緑膿菌の染色体が1個の環状であること⁶⁾を証明されたところであった。松本先生は何から何まで独りでやっておられたので非常に多忙な日を過ごされていたが、私の指導に手を抜かれることはなかった。単に実験手技を教わるだけでなく、知りたいことをどうやって自分でつかんで

いくのか、研究者としての姿勢まで厳しくお教え頂いた。当時の信州大学・医学部・細菌学教室は、寺脇良郎教授を主任として、神尾好是助教授（のち東北大学・農学部・教授）、伊藤義文助手（のち農林水産省・食品総合研究所部長、東北大学・農学部・教授）と松本穎樹講師（のち助教授）の4名で構成され、それぞれの先生が独立して進めておられた研究についての熱い議論と共同が常の研究室であった。松本先生による薫陶、そして神尾助教授を中心とした議論に参加できたことが、私の研究者としての原点である。なかでも、私よりも1歳年上の伊藤義文助手と毎日夕食をともにし、その後、研究室に帰るとい生活の中で先輩として多くのことを教えられた。教授として赴任後、数年で不慮の死を遂げられたことを思い出すと今でも感傷的になる。偉大な先輩だった。

4. 緑膿菌の外膜タンパク質 (OprE, OprD) 研究 —研究者としての自立—

私にとって本格的な研究の開始とも言える研究の発端とその展開についての経緯（図1）を記したい。京都薬科大学に戻ってから信州大学で学んだ技術をもとに PBPs (Penicillin-binding Proteins) を含めた緑膿菌の分裂・増殖に機能する遺伝子座の同定研究を始めた。そして分裂時期を決定する遺伝子座 *srs* を同定した⁷⁾。さ



図1 緑膿菌の外膜タンパク質 OprF の機能に関する論争と OprD の発見

らに研究を進めたかった反面、先にも記したように抗菌薬の評価研究が主流であった微生物学教室で、その上助手3名のうちの一番年下の私が主流研究もせず、勝手な研究をしていることに気が引ける気もあったが、抗菌薬開発の標的が大腸菌などの腸内細菌科から緑膿菌に移りつつあり、緑膿菌研究をやっているのが一人いてもいいかという気運も感じられた。

グラム陰性菌細胞の最外層には、他には生物界ではミトコンドリアや葉緑体にしか存在しない“外膜 outer membrane”があり、その外膜に組み込まれたポーリン⁸⁾タンパク質が栄養物などの低分子溶質の透過孔を形成している。この透過孔は単純に水分子が詰まったものではなく、孔の大きさや内側に露出したアミノ酸残基の電荷によって分子ふるい機能を發揮している。また栄養物だけではなく、親水性低分子抗菌薬であるβ-ラクタム系薬もこの孔を介して細胞内に透過する。しかしその分子の大きさや電荷によって透過速度が異なり、抗菌力に影響する因子でもある。

Nikaido, H (University of California, Berkely, USA) と Hancock, R.E.W. (University of British Columbia, Canada) らのグループは、緑膿菌の外膜は大腸菌のそれよりも大きな溶質分子の透過を許すこと⁹⁾、また外膜タンパク質 OprF (35 kDa) がその透過のためのポーリンであり、その欠損によってβ-ラクタム系薬耐性が引き起こされること¹⁰⁾を報告した。これらの知見が緑膿菌のβ-ラクタム系薬感受性が大腸菌よりもはるかに低いという事実と矛盾するとは気づかず、緑膿菌の OprF 欠損変異株を作成すれば、微生物学教室で行っている新規抗菌薬の特徴づけに少しでも貢献できるのではないかと考えた。当然のことながら、当時、ゲノムデータは無く、遺伝子クローニングさえ容易ではない時代で、変異剤によって変異株バンクを作成し、そこからスクリーニングするほかなかった。こ

の非効率的で、多大な労力を要する実験の遂行のために、可能な限り操作を省力化することを企図した。大腸菌などの主要な外膜タンパク質はペプチドグリカンに強固に結合しているという報告を拠り所に、緑膿菌細胞を SDS 溶液中で溶解し、不溶性のペプチドグリカンを集め、次に塩濃度の高い SDS 中で加熱したところ、効率よく OprF 画分を得ることができた¹¹⁾。本法を応用して、緑膿菌のゲノムサイズから予想される遺伝子数に応じた 6,000 の変異株のスクリーニングを目標に、連日多数のサンプルを調製し、SDS-PAGE 解析した。面白い、懐かしいエピソードがある。一緒にやっていた卒論生が家でお母さんに「最近、寿司屋さんでバイトしているの?」と聞かれたと話してくれた。SDS-PAGE 後の染色に酢酸を使用していたので服にまで酢の匂いが移っていたのである。寿司屋に勝つほどの酢酸臭漂う実験室に幸運が訪れ、2,000 株を越えたところで目指す変異株を 1 株分離できた。結局、計 3 株を手中に納め、勇躍、性状を調べたが、抗菌薬感受性の変化は見られなかった。私たちの分離した株に間違いがあるのかと思い、比較のために株の分与をお願いする手紙を Hancock 博士に出した。数週間してあった返答に「フリーザーの故障で保存していた変異株を失った」と。私たちの株の性状を再度確かめたが、抗菌薬感受性の変化だけが先の論文とは異なり、他は同じであった。そこで私たちが分離した株の性状を学会で発表し、批判を受けることにした。Nikaido 研究室から戻られた先生から「あなたのように業績もない人が偉大な業績をあげられている先生の研究を疑うような発表をすることは何事か」と詰問された。事実を報告しているだけで、偉大な先生云々には答えることはできなかったが、ポーリンの発見者であった中江先生(東海大学・医学部・教授)から「そもそも Nikaido と Hancock のデータは過去の事実と合わない。それから考えても

OprF がポーリンかどうか再考すべきだ」という助け舟が出された。議論は続いたが、時間超過で打ち切られた。演壇を降りたところで、中江先生から「再構成膜で透過率を測定したいので変異株を分与してほしい。結果はすべてお話しする」という提案があった。中江先生自ら分与した株を使った実験をされ、その結果を持って来学された。「少数のβ-ラクタム系薬で測定したが、OprFの有無でβ-ラクタム系薬の透過率は変化しなかった。多数のものでさらに測定する必要がある」と報告された。再構成膜を使った実験を自分の手でやってみたいとの思いで、中江先生に「実験を私にさせてほしい」とお願いしたところ、快諾が得られ、また当時の教室主任であった西野教授(のちに本学第8代学長)の了解を得ることができた。こうして研究生として研修医寮に住み、東海大学・医学部(神奈川県伊勢原市)で再構成リポソームを用いて多数の抗菌薬や糖の透過についての実験を行うことになった。その結果、第一に、緑膿菌の外膜中に存在するポーリン孔のサイズは大腸菌よりもはるかに小さいこと¹²⁾、第二にOprFの有無によってβ-ラクタム系薬の外膜透過は影響されないこと、さらにOprFは緑膿菌細胞の維持に働いている^{13,14)}ことを示すことができた。第二の結果についての論文を投稿に際して、一人のレビュワーから信じられないという痛烈な批判とリジェクトの返答があったが、それらに対する返答をエディターは正当に判断し、そして受理された。しかし、その後、どのようなテーマであっても米国微生物学会 American Society for Microbiology (ASM) の学会誌への投稿は、全て即座にリジェクトされた。匿名であるはずのコメント用紙に REWH のイニシャルが印字されていた。このような状態が約5年続いたが、その間英国の雑誌に救われた。

中江研究室での実験中に同じβ-ラクタム系薬でありながら、カルバペネム系のイミペネム

の透過速度が他とは異なることに気づいた。本学に戻ってのちに分離したイミペネム耐性の自然変異株の外膜では機能が不明であったOprD(45 kDa)が欠損し、イミペネムの透過率が特異的に減少していたことから、OprDがイミペネム透過のためのポーリンとして機能していることを報告した。この論文もASMの雑誌に投稿したが、返答が来なかった。何度か請求はしたものの受付後約6ヶ月目に実験方法を変えて行った論文がNikaido研究室から出された。慌てて、取り下げの旨をASMの事務局に送り、事情を記した手紙とともに英国の微生物学会誌に送ったところ、速やかに受理された¹⁵⁾。論文が無為に帰するところを救ってもらえた。

上述のように理不尽な対応が長く続いたが、後述する排出システム研究に移ってからは、学会であった時、両先生からにこやかな応対があるようになり、幾つかの共同研究も行なった。しかしOprFが抗菌薬耐性に機能するかどうかについては決着を見ていない。心残りの一つである。

信州大学での研修では研究者としてあるべき姿勢を教えられ、自分の無知を知ったことで頭を殴られるような思いをした。そのお蔭で外膜タンパク質の研究を行うことができるようになった。東海大学での日々、研究者としてやって行けるという自信が芽生えた。

5. *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* 研究 —ちょっと異文化海外生活を—

緑膿菌のポーリン研究も一段落し、文化や制度の異なる海外の研究室に行ってみたく思うようになった。しかし当時の微生物学教室の先輩助手はどなたも海外に出ようなどとは考えておられなかった。一番歳下の助手が2回も国内に出て、さらにまた海外までと言えるのかと遂

巡したが、臆しては後悔する、許可されなかったら辞めるまでと西野教授にお伺いしたところ、快い返答があった。しかし行く先の目処はない泥縄的で、ポストクで雇ってほしいという手紙、履歴書、業績録、そして論文別刷を同封した重い郵便物を送ったところ、緑膿菌のエフェクター ExoS の発見者である Donald E. Woods (University of Calgary, Canada) から受け入れるとの返答を得た。経験のないエフェクター研究も面白いかという気分で行ったのだが、「Canadian Cystic Fibrosis 財団の Visiting Scientist として、Mahidol University (Thai Land) との共同研究で *Pseudomonas pseudomallei* の外膜蛋白質の解析と治療目的のモノクロナル抗体を作成」という提案があった。*P. pseudomallei* とは聞いたこともなかった。それも当然のことで、医学では全く扱われていない細菌であった。しかし、「*Pseudomonas*」という属名が付いていることと *Pseudomonas* 属の外膜なら大した労力もいらないと踏み、ゆっくりと外国文化を楽しむかといういい加減な考えで受諾した。文献調査を進めていくうちに、ヒト感染は東南アジアで多く、特にベトナム戦争時には糖尿病などの基礎疾患を有するヘリコプタークルーで、治療が困難で致死的な感染症が頻発したことを知った。これといった基礎疾患も持たぬ身、身の保証はないけどやってみようということで、培養した細胞を破壊し、ショ糖密度勾配遠心法で外膜を分離することから始めた。実験を進めるうちに、性状が緑膿菌とはかなり違うことに気づき、また緑膿菌の膜分画法ではうまく行かないこともあって、同じ仲間だろうかと疑うようになった。数ヶ月間の試行錯誤を経て、内膜と外膜の分離ができ、外膜タンパク質プロフィールも示せた頃、*P. pseudomallei* などを含む *Pseudomonas* group II の細菌が新しく樹立された「*Burkholderia* 属」に変更された。この分類学の変更については頷けることではあったが、

一方で属名が変わることでやる気も減衰した。しかしカナダでの研究記念に論文 1 報は書くという目標を立てていたこともあり、また経験のないモノクロナル抗体作成にも興味があって本テーマを継続した。カナダにいる間に論文を投稿することはできなかったが、2ヶ月残して実験すべき項目をほぼ終えた。日本では *P. pseudomallei* を研究材料とすることは法令違反であったし、更なる夢を描けるような対象とも思わなかった。そこで、帰国後のテーマを見つけるために、論文作成の合間に図書館で文献を漁る日々を過ごした。

カナダでの研究生活は研究成果よりも、制度や文化の違いを肌身に感じた経験と菌株や意見の交換ができる海外の研究者と知り合えたことの方が大きかった。

6. 緑膿菌 RND 型異物排出システムによる抗菌薬多剤耐性研究—胸が躍った競争の日々—

文献調査でもこれからの研究テーマが閃くことはなかった。カナダから帰学し、しばらくは持ち帰った外膜等の材料を使っての追加実験をし、論文原稿は国際電話料金を使ってファックスでやりとりした。

P. pseudomallei の論文¹⁶⁾を出した頃、参加した緑膿菌感染症研究会で、世界初のフルオロキノロン系薬であるノルフロキサシンを開発された平井敬二博士（後に社長）のキノロン系薬の耐性機構の先駆けの研究について聞いた。分離された3種類の緑膿菌耐性変異株¹⁷⁾では、それぞれに特徴的な外膜タンパク質（のちに OprM, OprJ, OprN）の新生が起こっているということであった。これらのタンパク質がキノロン耐性の原因として働いているのか否か、またそうならメカニズムはという議論があった。当時の外膜タンパク質が原因となる抗菌薬耐性



8 緑膿菌の薬剤耐性機構：新キノロン剤

杏林製薬・中央研究所 平井敬二氏

～初のフルオロキノロン(ノルフロキサシン)の創生と耐性気候の先駆け

緑膿菌のノルフロキサシン耐性変異株を分離

- 多剤交差耐性化
- 新奇な外膜タンパク質の産生

学会で議論沸騰

- 外膜タンパク質と多剤耐性化 -
- 無関係 ⇔ なにか関係があるはず

【私が考えたこととやったこと】

- 議論しても始まらへん、外膜タンパク質欠損株を分離したらえんや
- 抗OprM抗体の作成とOprMの分離/Tn変異株バンクの作成とスクリーニング

図2 緑膿菌のキノロン系抗菌薬に対する新奇な耐性機構の発見と展開
杏林製薬・中央研究所の平井敬二博士によって行われた先駆的な耐性機構研究の詳細のまとめた成書『緑膿菌—基礎と臨床—』の表紙と内容の要約とそれに対して私が考えたこととやったこと

はポーリンの欠損により外膜透過が減少するというものであり、新生タンパク質がどう働くのかは全くの未知であった。ポーリン研究をやっていたことから沸騰する議論の最中に意見を求められた。答えの用意はなかったが、「推測や空論で時間を費やすよりも、新生タンパク質のノックアウトが答えになる」と考えていた(図2)。

学会から帰り、欠損株の作成に着手した。まずOprM検出用の抗血清を作成した。それを使ってトランスポゾン(Tn)変異株の外膜画分をウェスタンブロット(WB)法により調べるのが順当な方法で、OprFのとくと同じで膨大な労力と時間を要する力仕事になる。しかし外膜画分の分離法やWB法はラフな方法で望まない変異株を減少させ、正確な検出法が使えるまでに減少させれば省力化できると考えた。

数千株のスクリーニング後に欠損株を分離し、その抗菌薬感受性を調べたときの衝撃は今でも忘れられない。“緑膿菌が緑膿菌ではなくなった”のである。先にも記したように緑膿菌の最も注目される特徴は種々の抗菌薬に自然耐性(多剤自然耐性)を示すことである。OprM

の欠損によって、その耐性が消失したことは、OprMがキノロン系薬を含む種々の抗菌薬に対する耐性に機能する外膜タンパク質であることを示していた。

メカニズム解明のためのOprM遺伝子のクローニングは、精製したOprMの部分アミノ酸配列の決定、その配列をもとに合成したDNAプライマーを用いたPCR法で緑膿菌染色体DNAクローンバンクをスクリーニングした。こうしてOprM遺伝子を含む約30kbの断片を得た。この断片のサブクローニング進行中に、Poole, K. (Queen's University, Canada)らによって緑膿菌の鉄イオン取り込み機構の研究の過程で発見した異物排出システムについての論文²⁰⁾が出された。それは本菌の染色体上には鉄代謝や抗菌薬多剤耐性に働く遺伝子オペロン *mexR-mexAB-oprK* がコードされ、それらは内膜から外膜を貫き、プロトン駆動力とするRND型異物排出システムを形成しているというものであった(図3)。私たちの研究が遅れをとっていることを認識したが、私たちが標的にしているOprMがそのオペロン上にコードされているのか疑問が残った。そこでDr. Pooleに私たち

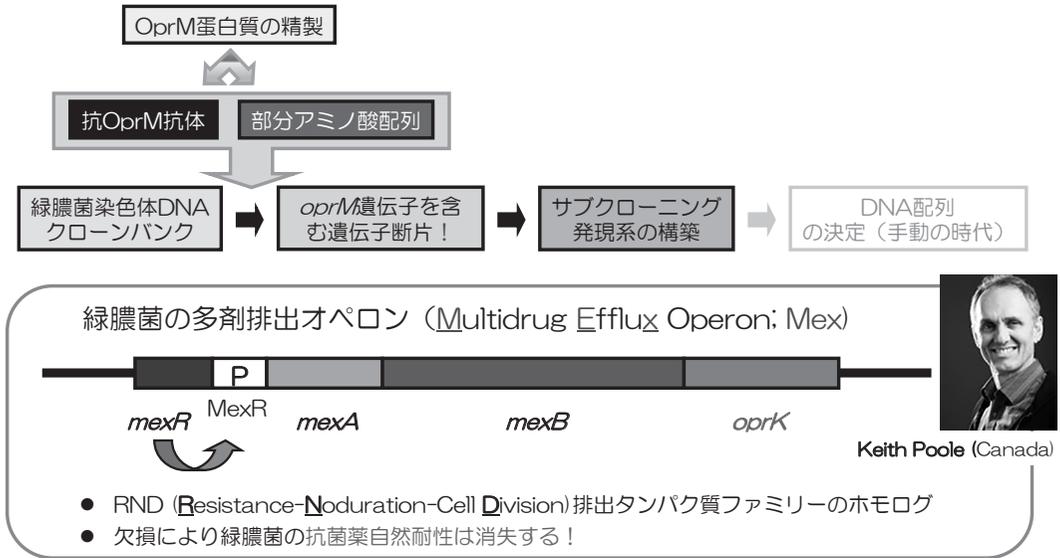


図3 OprMをコードする遺伝子のクローニングと Dr. Keith Poole との出会い
OprMをコードする遺伝子のクローニング計画のサブクローニング段階で Dr. Keith Poole の論文が出された。

の研究結果を伝え、同じタンパク質かどうか共同で調べたいという提案をした。快諾が得られ、OprM²¹⁾を含む排出システムに研究が進化した。その後、Dr. Poole との共同研究は次の目標である OprJ をコードする遺伝子の解析に移り、新たな遺伝子オペロン *nfxB-mexCD-oprJ*²²⁾ の同定と解析に至った。同時にスイスの Kohler, T. との共同研究で、第3のオペロン *mexT-mexEF-oprM*²³⁾ を同定した。

その後、MexDを対象にした膜貫通実験から内膜タンパク質は12回膜貫通型²⁴⁾ (図4)であることと同定した排出システムのそれぞれの基質特異性(図5)²⁵⁾を明らかにした。12回膜貫通型の論文では、当時のモジュラー型アップルPCの10インチもない、小さなモニターを見ながら、1,000を超えるアミノ酸の記号を一つ一つ入力し、モデル図を1週間かけて作成した。その図がFEBS Lett.の表紙に採用された。その後、テトラサイクリン排出タンパク質 TetA の機能解析を長らく研究テーマにされていた山口明人博士(大阪大学産業科学研究所)

も大腸菌のRND型排出システム AcrAB-TolC 研究に参入され、見事に内膜タンパク質 AcrB の結晶解析に成功された。私たちがすでに予測したように内膜タンパク質は膜12回貫通型で、ペリプラズム間隙に大きなループ構造が二つあることを示された。

排出システム研究のお陰で創薬の難しさを経験することもできた。日本で最も臨床使用量の多い、キノロン系薬レボフロキサシンへの緑膿菌の耐性化の進行を抑制するために第一製薬(現第一三共)は米国 Microcide 社と組んで排出システム阻害薬の創成を企画した。著者は中江先生とともに変異株の提供とアドバイザー役を務めた。排出システムの阻害薬のヒット率は極めて低く、抗菌薬探索の1/1,000程度ということであったが、創薬研究所の努力でいくつかの候補化合物を見つけ、最適化も果たされた。しかし、もう一つ乗り越えることができない大きな課題があった。排出システム欠損株の研究から分かっていたのだが、欠損は緑膿菌の生育に影響を与えない。そこで阻害薬は単独では薬

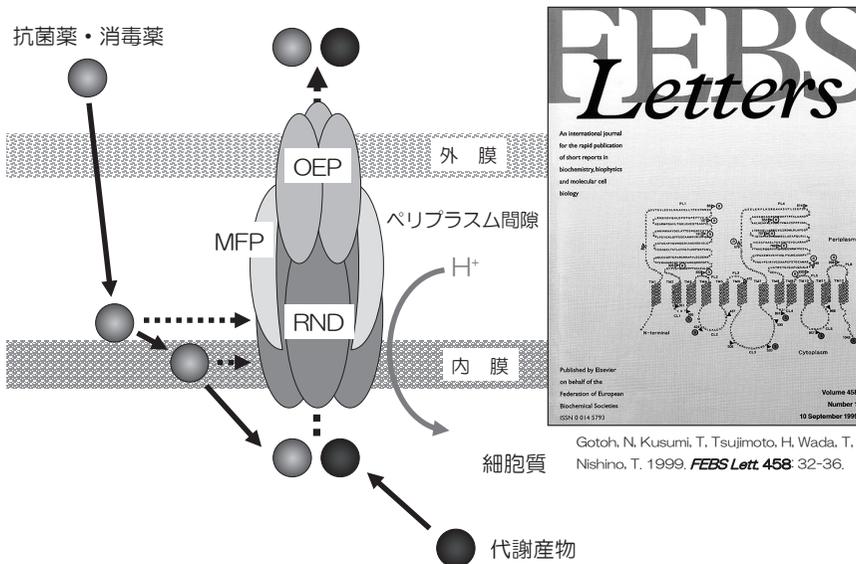


図4 RND型異物排出システムと内膜コンポーネント MexD の二次構造モデル

mexA-mexB-oprM のそれぞれの遺伝子の DNA 配列のホモロジー解析から、排出システム MexA-MexB-OprM は、ペリプラスムコンポーネント (MFP)、内膜コンポーネント (RND) MexB と外膜タンパク質 (OEP) OprM とが会合し、プロトン勾配を利用して細胞内に透過した抗菌薬や消毒薬、さらには代謝産物を細胞外に排出していると推測された (左図)。

第2の排出システム MexC-MexD-OprJ も同じ構造を形成しているものと推測される。内膜コンポーネントの2次構造を推測する目的で、*mexD* 遺伝子断片を作成し、その3'-末端にβ-ラクタマーゼ遺伝子またはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を結合させ、その発現から作成した断片にコードされたタンパク質断片のC-末端が細胞質内またはペリプラスムのいずれに露出しているか調べた。この実験の結果、内膜コンポーネントは膜12回貫通構造をとっていることが示唆された (右図)。このモデル図は FEBS Lett. の表紙絵に採用された。

	フルオロキノロン	セフェム	4thセフェム	ペニシリン	モノバクタム	カルバペネム	アミノ配糖体
MexAB -OprM							
MexCD -OprJ							
MexXY /OprM							
MexEF -OprN							
MexJK /OprM	トリクロサン耐性に働く						

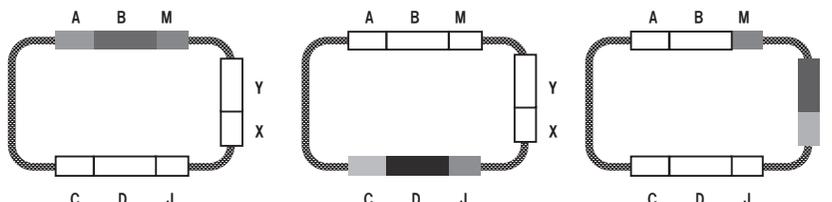


図5 染色体にコードされた排出システムの単独発現系で現れる抗菌薬耐性プロフィール

緑膿菌の染色体上にコードされた排出システムの基質特異性を調べるために、MexA-MexB-OprM、MexC-MexD-OprJ および MexX-MexY/OprM が単独で発現するように欠失株を作成し、抗菌薬耐性化を測定した。MexE-MexF-OprN および MexJ-MexK/OprJ については他の研究グループのデータを引用した。

ならず、主薬との配合が求められる。数年におよぶ探索と構造変換に力が注がれたもののレボフロキサシンと血中濃度推移が一致する阻害化合物を作り出すことができなかった。この阻害薬創成研究に参画することで、薬となるには活性もさることながら越えるべき高い壁が幾つもあることを実感した。薬学部という場に長いながらもようやくの経験だった。

7. RND 型異物排出システムの多面的役割—「抗菌薬耐性は一面」という面白さ—

私たちが研究してきた多剤排出システムが細

菌に多剤耐性能を付与することから、緑膿菌のみならず多種のグラム陰性菌での研究が盛んになった。排出システム研究を始めた頃から、排出システムの真の役割が抗菌薬に対する耐性とは思えなかった。2000年に解読された緑膿菌 PAO1 株の完全ゲノム配列²⁶⁾から私たちが単離した排出システムも含めて、ホモログが少なくとも 12 種類コードされていること(図 6)、一部のシステムだけが発現していることが明らかにされた。なぜこれほど多数の排出システムが存在するのかと興味が湧いた。何らかの原因によって一つの機能が失われたときの代替として存在するという意見の研究者もいた。あながち間違っているとは思えないが、代替物を 12 種

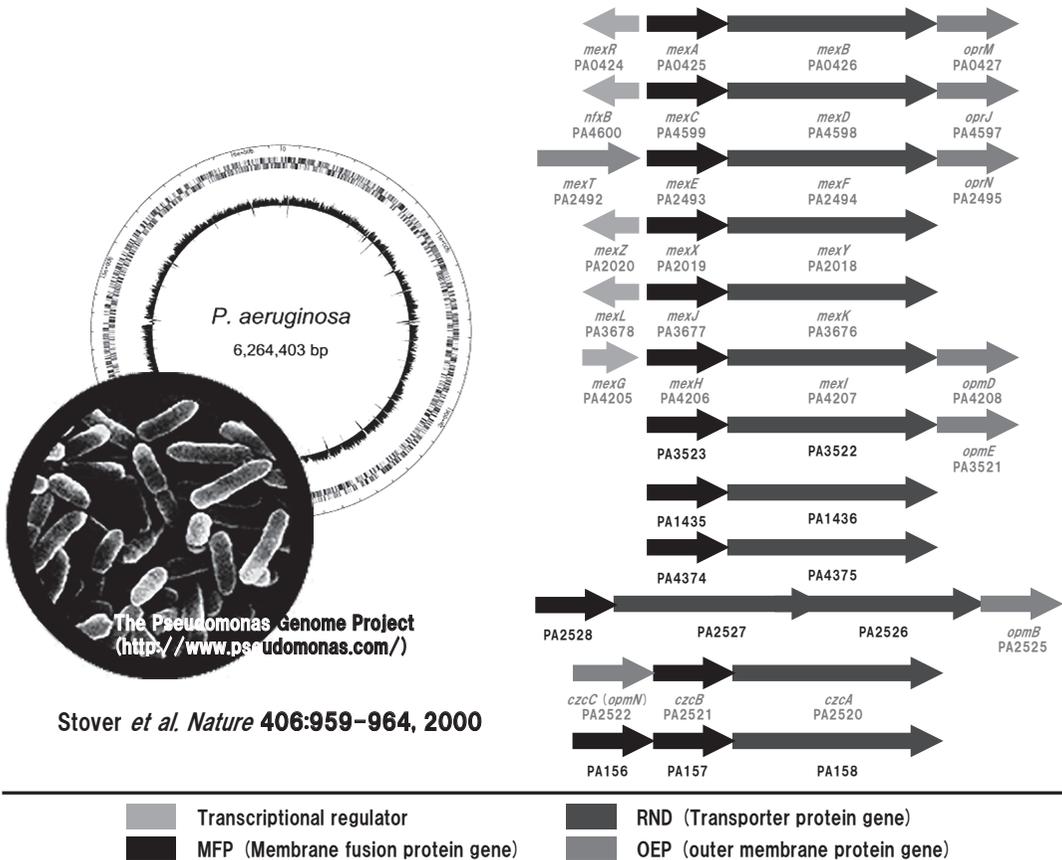


図 6 緑膿菌 PAO1 株のゲノム配列の解析によってコードされていることが推測された RND 型排出のホモログ遺伝子オペロン

も保存しておく必要があるとは信じられなかった。それぞれに特定の環境で発現し、異なる機能を発揮するのではと思えてならなかった。

Dr. van Veen ら²⁷⁾は腸球菌に存在する ABC 型排出システムをヒト細胞中で発現させたところヒト細胞の排出システム p-gp と同じ機能を発揮したことを示した。また Dr. Davies ら²⁸⁾は、ヒト細胞の小胞体膜に存在し、コレステロールの膜輸送に働く Niemann-Pick C1 タンパク質がアミノ酸配列での相同性は低いものの私たちの MexD の 2 次構造モデル²⁴⁾と同じ構造を持って機能していることを示した。これらの論文に感動を覚えた。進化の系統が異なる真核生物と原核生物で相似の構造と機能を持っている排出システムが保存され続けてきたことは、それらの遺伝子が生命の出発点の近くでコードされ、生命維持に重要な役割を果たしてきたことを示唆している。抗菌薬が使われるようになってまだ 200 年も経たないことから考えると抗菌薬耐性という機能は本質を見ていない知見ではないだろうか。

細胞は細胞膜に囲まれた単位であるが、単独で生命活動が完結しているのではない。真核生物ではこのような細胞が集まって組織が作られ、制御された活動を行なっている。細菌のように単細胞で活動していると考えられてきた原核生物でさえ、互いの存在を認識し、ときには集団行動を起こすことが知られている（クォーラムセンシング quorum sensing 現象）。こう考えると細胞は私たちが居住している国の活動と類似していると想像された。国間の活動を大きく分ければ、外交、防衛、交易に分けることができる。細菌細胞も外界への物質輸送（排出）や情報伝達や外界からの物質取り込みや外的刺激や防衛があって生命活動が成り立っていることに気づいた。そこで、防衛、外交、進出という面で緑膿菌の排出システムの役割を調べることで排出システムの生命維持への役割を

見出すことができるのではないかと考えた。

「防衛」という面では、私たちの研究も含めて多くの研究成果から、排出システムが抗菌薬という生命活動阻害物質からの退避、つまり抗菌薬耐性（図 7）に働いていることは疑うべくもない。「外交」面では、上記のクォーラムセンシング現象に着目した。本現象は、それぞれの細菌が特有のアシル基の長さが異なる N-アシルホモセリン誘導体を生合成し、細胞外に排出する。それが別の細胞内に透過するとき、その頻度によって同属の細菌が近くに存在するの否かを感知し、集団行動を起こす現象である。多種の細菌が割拠する環境には多種の N-アシルホモセリン誘導体が遊離している。特定の化合物にだけ反応し、それ以外のは不反応でなければ細胞活動は混乱する。つまり「雑音」には耳を貸さないように排除することが必要である（図 8）。排出システムにおける選別機能を調べたところ、近縁菌種の N-アシルホモセリン誘導体の排出効率が高くなかったが、雑音にあたるだろうと考えられる N-アシルホモセリン誘導体は効率よく排出した。こうして異種細菌とのコミュニケーション²⁹⁾、つまり「外交」に機能していることを確かめることができた。次に調べるべきことは「進出」であるが、病原性を標的にすることが考えられた。うまい具合に、University of British Columbia (Canada) に留学していた長崎大学医学部の平方博士から腸管を介した緑膿菌のヒト体内への侵入、つまり内因性感染における排出システムの役割を調べる共同研究の提案があった。私たちが作成したノックアウト株シリーズを使って、MDCK 細胞モノレイヤの透過性や免疫系を破壊させたマウスでの経口感染での致死性が調べられ、マウス腸管上皮組織の透過に排出システムが必要であることが明らかになった（図 9）³⁰⁾。

こうして、細菌細胞は国家および国家間の活動と同じではないかという空想が間違っていない

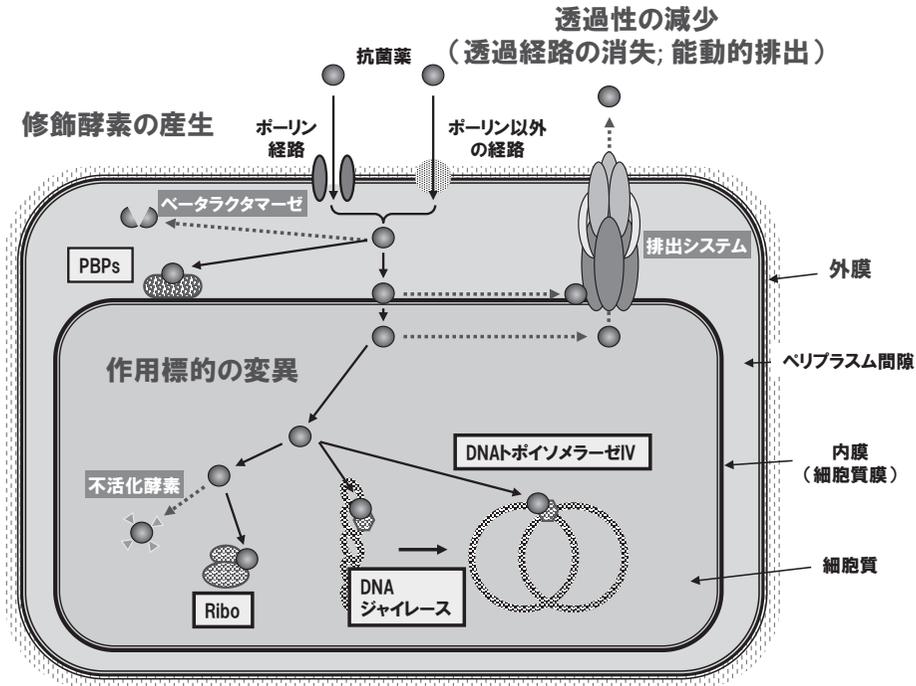


図7 グラム陰性菌における抗菌薬・消毒薬の作用点と耐性機構
 抗菌薬は、ペニシリン結合蛋白質 (PBPs)、DNA ジャイレースおよび DNA トポイソメラーゼIV またはリボソームに結合することによって抗菌活性を発揮するが、外膜透過経路の消失、 β -ラクタマーゼによる加水分解、さらには標的の変異によって活性が減少することが知られてきた。排出システムの研究によって、これらの耐性機構に新しい能動的排出が加えられた。

ないことを示すことができた。これに至ることができたのは多彩な環境に適応でき、能力の高い、今様の言葉で言えば、ゲノムサイズの大きい緑膿菌を研究材料にしたからにほかならない。

8. セラチア菌のゲノム研究—ゲノム研究だからという寄り道—

嚢胞性線維症 cystic fibrosis は我が国でも全身性の指定難病ではあるが、黄色人種では稀にしか起こらない。しかし欧米の白人社会では大きな問題である。この問題点の一つは若年発症者における致死的な緑膿菌感染症である。このために緑膿菌を研究対象とする欧米の研究者は日

本よりもはるかに多く、緑膿菌を研究対象とすることは極めて厳しい競争の渦に巻き込まれる。緑膿菌、そして排出システムという競争の激しい二つが重なった熾烈なレース下では他のテーマに手を染める余裕はなかった。そのようなときに、信州大学での研修生時代に医学部の学生であり、その後、信州大学医学部細菌学教室の助手、助教授を務めた、旧知の親しい間柄の林哲也博士（当時宮崎大学・医学部、現在九州大学・医学部）がいつもとは違う様子で現れた。彼は我が国の細菌ゲノム研究の草創期に腸管出血性大腸菌 O157 のゲノム研究を成功させ、日本の微生物ゲノム研究のリーダーを務めていた。その彼が口にしたことは「腸内細菌科のゲノム研究を確立するためにセラチア菌のゲノムプロジェクトチームを立ち上げるのでリーダー

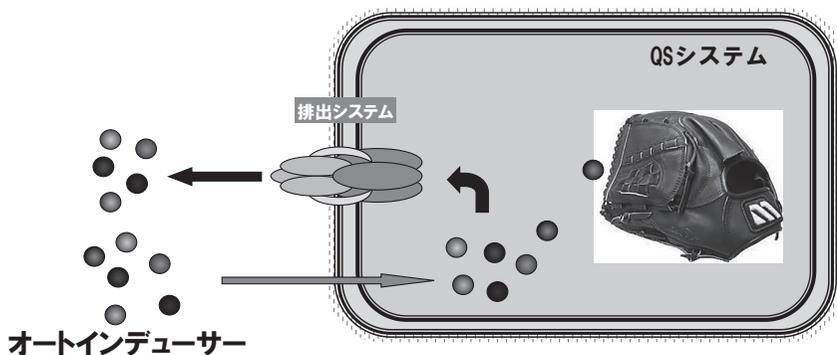
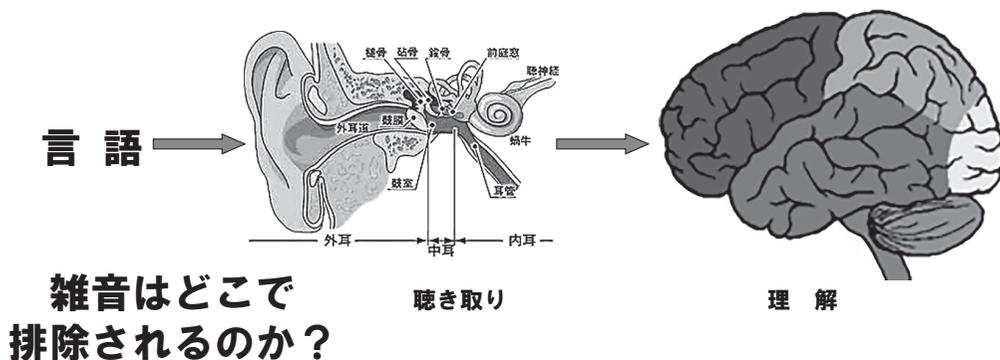


図8 排出システムによるオートインデューサーの選別を予測したモデル図
ヒトは聞くべき音とそうでない音を耳および脳で選別していることを参考に立てた細菌における排出システムによるオートインデューサー選別仮説を示している。

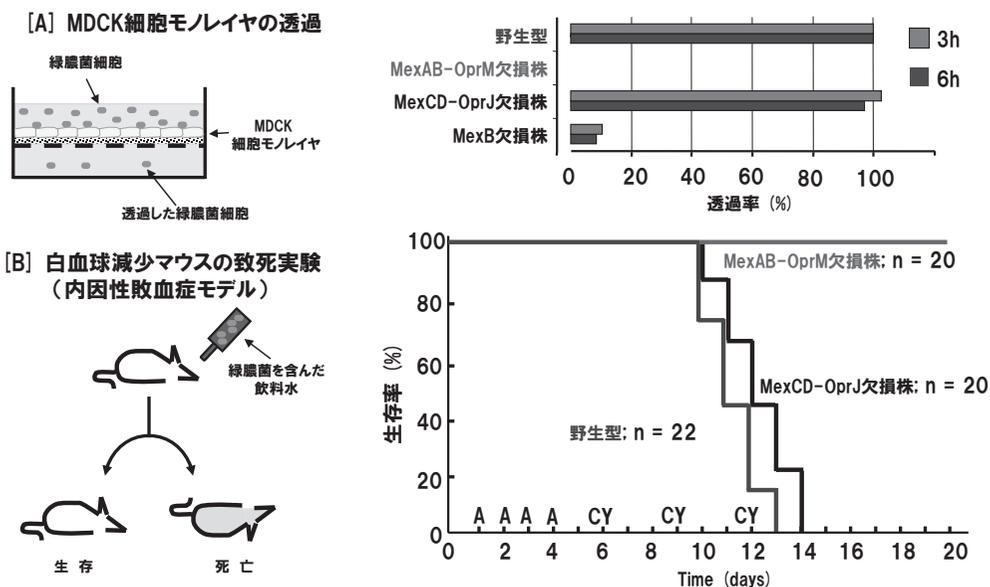


図9 緑膿菌による内因感染における排出システムの寄与
MexA-MexB-OprM 排出システムの欠損は、緑膿菌の MDCK 細胞モノレイヤ透過能 [A] や白血球減少マウス (内因性敗血症モデル) における致死活性 [B] を消失させた。

を務めていただけませんか」ということであった。長いやりとりがあったが、「そんな余裕はないし、ましてセラチアなど興味もない」と終始応えた。その後、彼は同じ目的で遠い宮崎から二度もやってきた。三度目に来たとき、彼は「緑膿菌や排出システムだけにこだわることはないでしょう。かつて細菌の真の姿を理解するためにはゲノム研究をやる必要があると言ったじゃないですか」と言った。確かに言った。緑膿菌ゲノム解析が報告されたとき、このままでは米国に太刀打ちできなくなる。それを避けようと研究仲間にも全ゲノム遺伝子のノックアウトバンクの作成を呼びかけたが、頓挫したことがある。ゲノム研究に対する考えは変わっていなかった。痛いところを突かれ、また「三顧の礼」の教えが後押しをして、セラチア菌のゲノム研究と二足草鞋を履くことを承諾した。

まずは対象株の選定から始め、多剤耐性株で重篤な感染症を引き起こした臨床分離株 SM39 を選択した。ゲノムプロジェクトの班会議は聞

いたこともない用語が飛び交い、議論が白熱する余り、持ち時間も終了時間も気にする風もない場であった。しかし、何とか用語を使えるようになり、議論に参加できるようになった頃、ようやく解析班から全ゲノム配列が提出され、当時微生物学教室の助手であった小川倫洋博士の二人で予測プログラムが推定した約 5,000 個の open reading frame (ORF) の検証と機能の推定作業 (アノテーション) 作業を行った (図 10)。その結果、抗菌薬多剤耐性化の経緯とメカニズムは見えてきたが、同定した遺伝子群からセラチア菌の特徴を読み取ることに難渋し、論文化の目処が立たなかった。同じように Sanger 研究所 (英国) でもセラチア菌のゲノム解析を行なったが、私たちと同じように論文化が遅滞していると言う情報を得た。Sanger 研究所では昆虫に対する病原性がすでに報告されている DB11 株の解析が行われていた。分離源が異なることからゲノムを比較することで何かが見えてくるのではないかと考え、Sanger 研究所

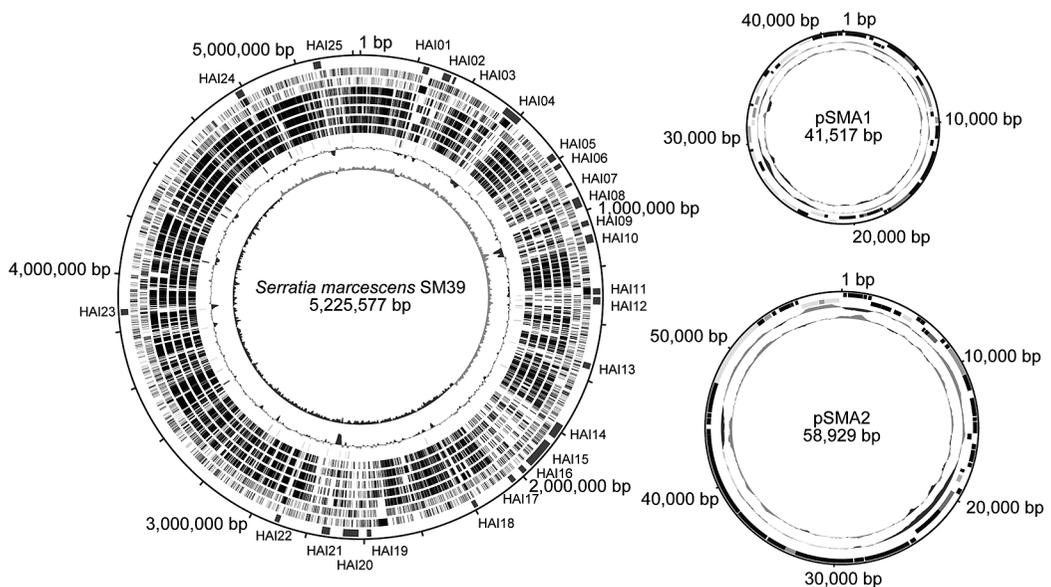


図 10 セラチア菌 SM39 のゲノム構造モデル
SM39 株のゲノムは 1 個の環状染色体と抗菌薬耐性遺伝子群をコードするプラスミド pSMA1 と機能未知の遺伝子群で構成されたプラスミド pSMA2 によって構成されている。

に提案したところ快諾があった。期待通り、ゲノム配列の比較によって、SM39 株に見られるヒト病原性に関与する遺伝子群が DB11 にはないことが判明し、抗菌薬多剤耐性化の経緯も含めて論文化することができた (図 11)^{31,32)}。

当時、日本や米国でのセラチア菌による院内でのアウトブレイク事故が起こっていた。セラチア菌は腸内細菌科ではあるが通常の土壌や海水中にも生息している。アウトブレイクは人為的ミスによる環境中の土壌などによる製剤や点滴液の汚染が原因であると考えられていた。しかし SM39 株と DB11 株のゲノム配列の比較から環境株と臨床分離株とでは進化の系統が異なるのではないかと想像した。それを確かめるために、当時の卒論生や院生たちと医療機関が近くにない大学近辺の土壌 (図 12) から環境株を多数分離した。臨床分離株は懇意な研究者の所属する医療施設 (東邦大学大森病院, 産業医科大学病院, 鳥取大学病院など) から分与を

受けた。それらの株の幾つかの House-keeping 遺伝子配列の解読を林哲也博士のグループに依頼した。得られた DNA 配列を使って Multilocus sequencing typing (MLST) 解析を行なったところ、環境分離株と臨床分離株とでは系統が違うという傾向が読み取れた (図 13)。精度を上げるために全ての株の全ゲノム配列を決定したかったが、多数の株のゲノム配列を決定するには手も足も出ないほどの研究費が必要であった。傾向だけで論文化することに躊躇し、また環境株の分離源が局所的過ぎるという問題点もあった。共同研究者である林博士も同じ考えで、本研究をパイロット的な研究と捉え、ゲノム配列の費用が下がるまで、日本とは違う環境からの分離をしながら待とうということになった。九州大学に異動した林博士も研究室の整備等を終え、研究も軌道に乗った 2012 年頃、彼から全ゲノム配列の決定をしようという提案を受けた。林博士は海外への出張中に私たちが考案し

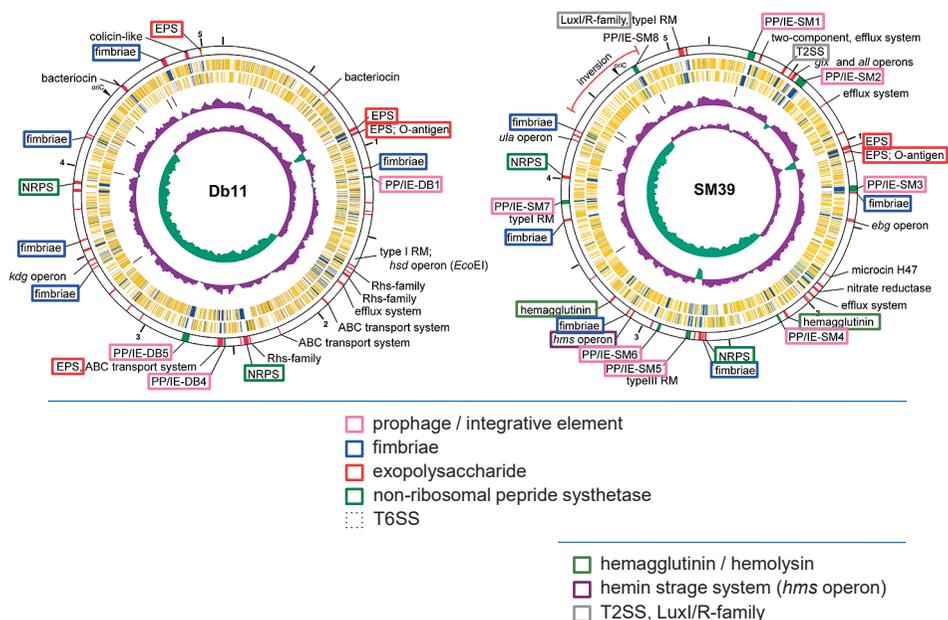


図 11 セラチア菌 DB11 と SM39 のゲノムの比較モデル
両株のゲノムの比較によって、SM39 にコードされ、DB11 にはない遺伝子群として、ヘマグルチニンやヘモリジンなどのヒト赤血球溶解酵素遺伝子群が見出された。

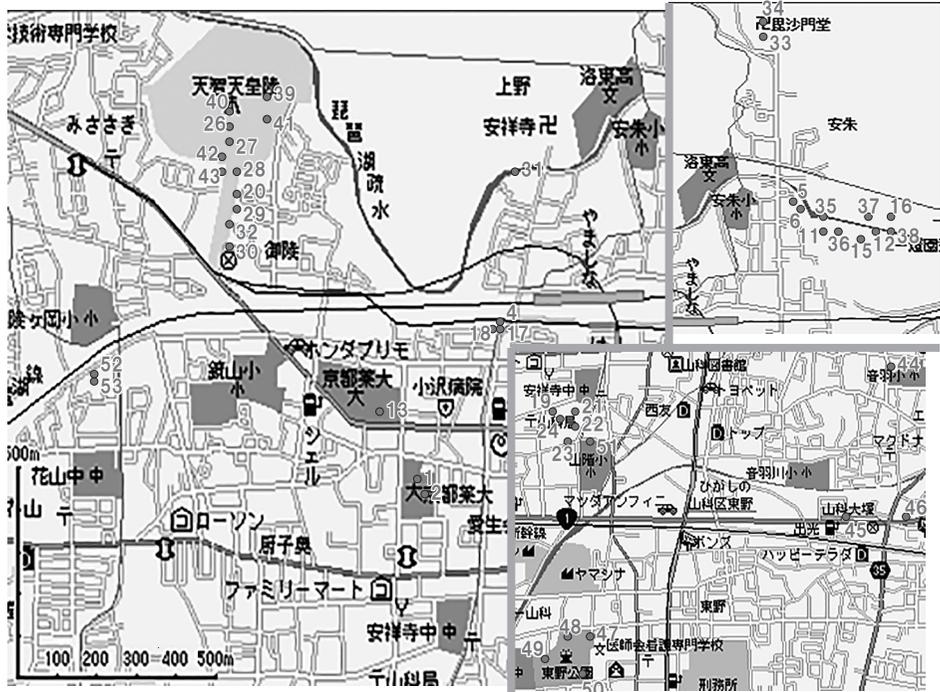


図 12 セラチア菌が分離できた土壌の採取地点
 本学近辺で医療施設から離れた場所の土壌を採取し、それらから計 49 株が分離できた。

た簡易分離法を使って海外の土壌から多数の環境株を分離してくれていた。こうして全ゲノム配列の解読が始まり、数年かけて得られた配列データにゲノムバンクに登録されたデータも加えて、ゲノム配列の比較 (図 14) を行なったところ、環境株と病原性株とでは系統が異なること、さらに病原株へと進化しつつある集団が存在することを明らかにすることができ (図 15)、2022 年、私の本学での最後の年に論文文化³³⁾することができた。これが人生最後の科学論文だろうと嬉しく思っている。

“緑膿菌に懸想”しながらセラチア菌研究に手を染めたのは、林博士の説得もさることながら、細菌の全体像をこの目で見たいという長年の希求を果たすためでもあった。ゲノムから細菌の全体像を見ることで臨床にも貢献できる知見が得られることを身をもって知らされた。我が国のゲノムプロジェクトの一環として長い間

研究費や労力など多大な支援を受けることができたことは幸いなことであった。

私のように凝り固まったものが言うのは憚られるが、個々の研究テーマを固守するのも悪くないが、そのテーマがその生物種にとってどのような“位置”にあるのか、ゲノム全体を俯瞰することなしに現代の生物学は成り立たないことを伝えたい。

ただ、緑膿菌でもセラチア菌と同じように菌種内での系統の違いが見られればもっと嬉しかった。実はそれについても着手したのだが、思ったように行かなかったことは残念で、心残りである。“柳の下にいつも泥鰌がいるとは限らない”，そんなものかもしれない。その連続で 40 余年やってきたのではとも思う。

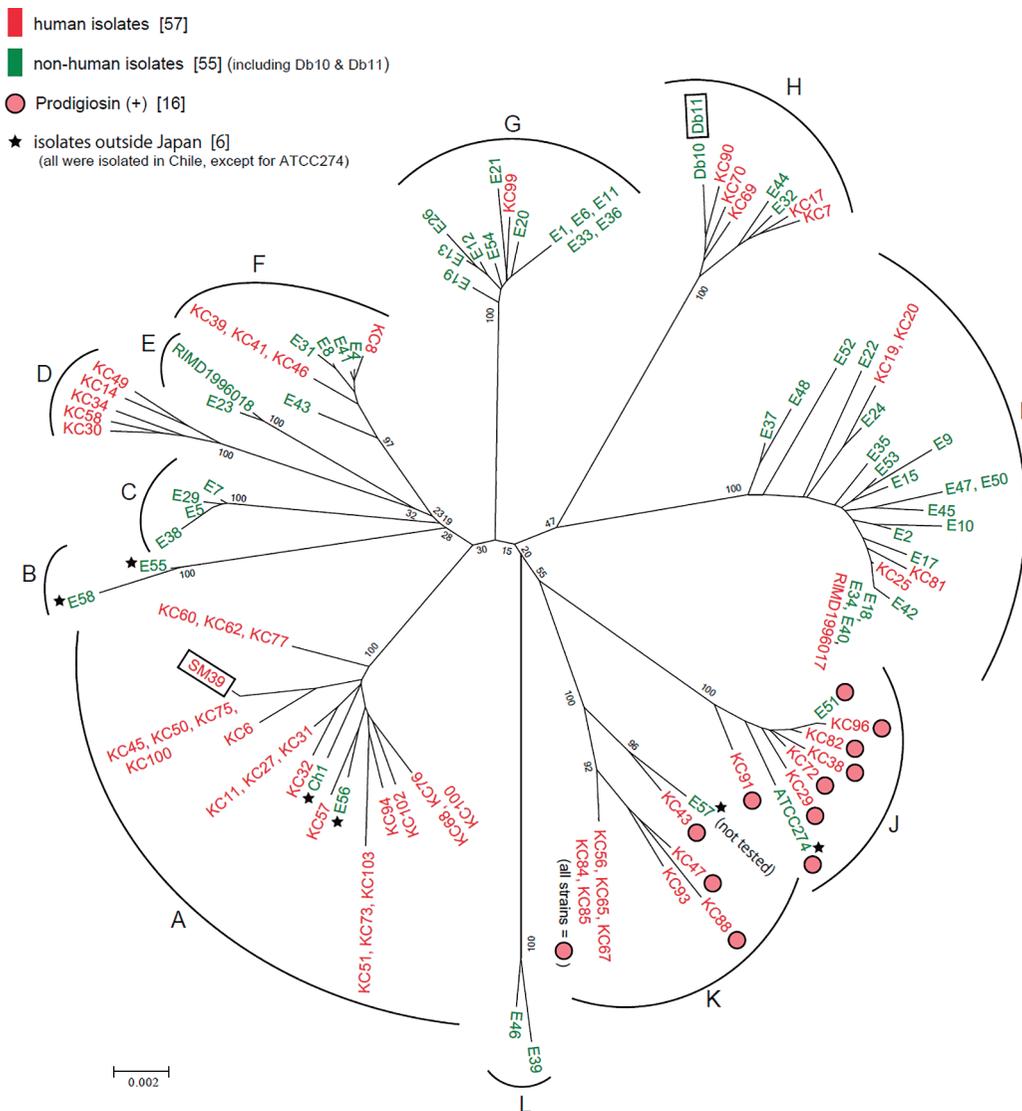


図 13 Multilocus sequence typing (MLST) によるセラチア菌の環境分離株と臨床分離株の系統解析

9. 終わりに

緑膿菌を材料に夢見た 40 年を反省することなく、反芻した。社会貢献や社会実装ということに貢献しなかったと言うことに反省の念は沸かないが、多数の研究諸氏やポスドク、院生、卒論生に支えられながら、スキージャンプでいうところの K 点を越えることができなかった

ことは、私の不出来であり、反省している。一方、研究面ではどのように科学の進歩に貢献するかということは常々考えてきた。趣味的な研究と言われればそれまでだが、それが臨床での抗菌薬選択に必要な知見を得ることにつながったことで許されるかと考えている。

ヒトとチンパンジーのゲノムの違いはたった 1.5% 程度である。そうするとヒト間ではほとんど差がない、前の人も、後ろの人も、皆持つ

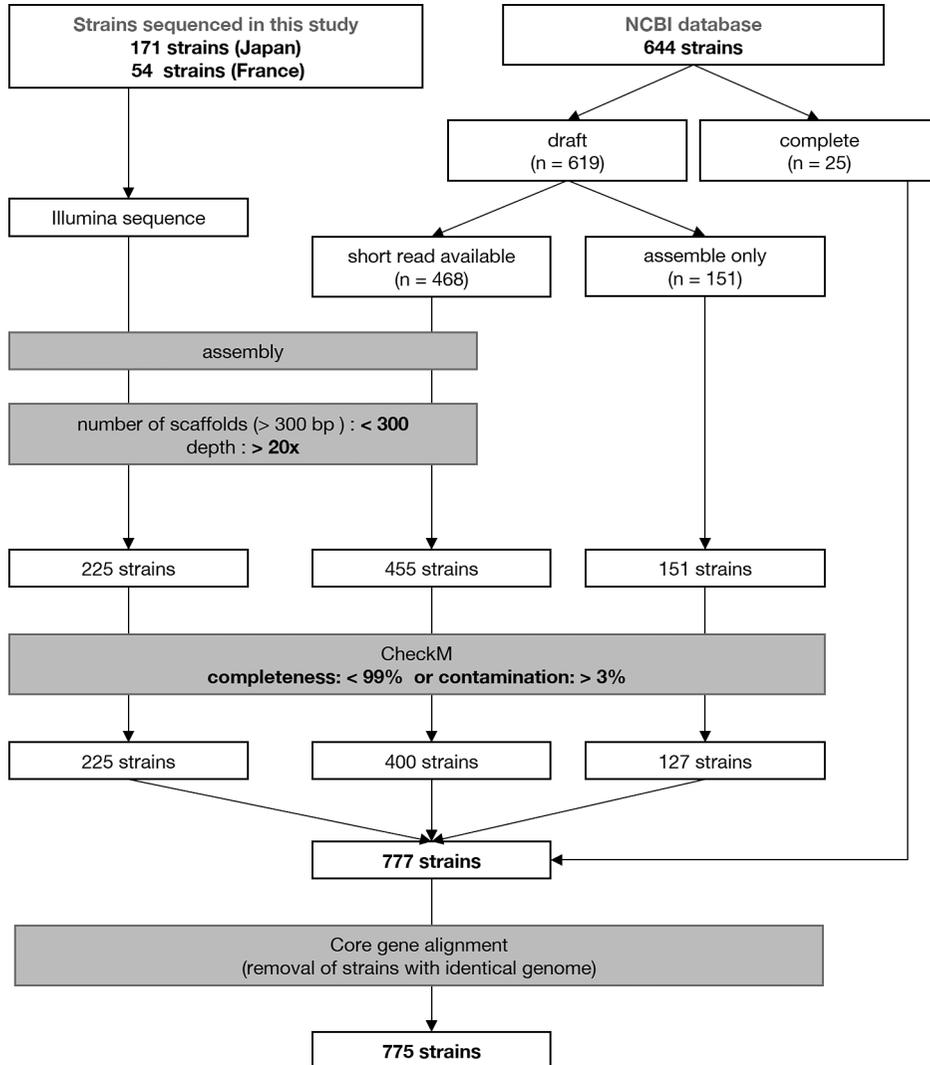


図 14 系統解析に利用したセラチア菌の全ゲノム DNA 配列の由来のスキーム
日本およびフランスで分離された環境分離株および臨床分離株 225 株から決定したゲノム配列と NCBI データベースに登録された 527 株分の配列、計 775 株分の配列を系統解析に利用した。

ている遺伝子はほぼ同じである。ただ持っている遺伝子をどう使いこなすか（どのように発現させるか）である。ピオラ（図 16）は通常は背丈の低い花であるが、背丈の高い矢車草の間で育ったときには、陽の光を求めて矢車草よりも高く背を伸ばすことができる。不遇な環境下だからこその姿だろう。もう一つ、一昨年の本校地正門付近のツツジからも学んだことがある。ツツジは同じ木に白い花と赤い花が咲いた

り、部分的に赤い斑が入ったりすることはよくある。赤い筋が入った白い花（図 17）は、きっと花の成長の初期、細胞内でのトランスポゾン transposon（可動遺伝子 mobile genetic elements）の転移により赤を支配する遺伝子の発現が起こり、それが花の細胞が分裂・増殖するとともに受け継がれ、赤い筋が形成されたのだろう。つまり稀にしか起きないトランスポゾンの転移という引き金が大きき跡を残すことになった。私

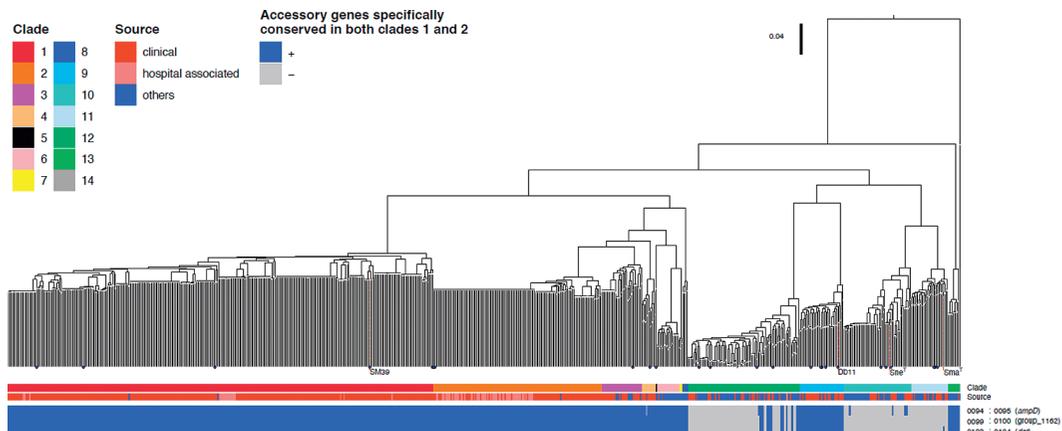


図 15 全ゲノム DNA 配列解析によるセラチア菌の系統樹



図 16 ビオラの背丈の変化

通常で生育したビオラの背丈 [A] は 5 cm 程度であるが、矢車草の群生環境では背丈は 30 cm ぐらいに伸びている。



図 17 ツツジの花

同一の木から白色の花と赤色の花 [A] が咲くこともあれば、赤い筋が入った白色の花 [B] が見られることもある。

たちの社会の中でも、たった一言、一動が戻れない結果に繋がることと同じではないだろうか。詳細は省略するが、戦前の「統帥権干犯」という正論らしき発言が我が国を戦争に至らしめることに繋がった史実がある。大学においても“正論”という曖昧なものをしっかりと評価して進むべきだと考える。正論は状況に応じて悪論にもなることを忘れないでいただきたい。

科学の世界で研究の方向性が間違っていなければ必ず進歩に貢献できるものである。しかし、それには“発想”という独自性が要求される。流行だから、研究費が稼げるから、論文になるから、研究室の伝統研究だから、そんなことを動機にすべきではないし、ハイインパクトの雑誌に論文が掲載されること、また大きなグラントを獲得することは研究の成果であり、それらを目指すことは本末転倒であることを忘れないでほしい。何を指すのかが明確で、科学的に間違っていなければ、いまは理解されなくともきっといつかは成果が得られるものではないだろうか。こういうのを老婆心ということはよく分かっている。半世紀にも渡って育てられた

“芥子の一粒”だから京都薬科大学のことは終始気にかかる。皆様の奮闘を期待している。

最後の最後に、科学の世界で楽しめた人生に文句はない。生まれ変わることができるとしたら、もうちょっと勉強に励んで、もう一度、また緑膿菌のような気がするが、科学の世界で過ごしたいと考えている。

【謝辞】

本稿に記載しました研究の遂行でお世話になった方々を図 18 に記させて頂きました。心より感謝申し上げます。

また、自由気ままな言動にご寛容戴きました西野武志先生に深謝申し上げます。さらに無茶な進軍ラッパに耐え、本研究の遂行に心血を注いで下さいました微生物学教室並びに微生物・感染制御学分野の歴代の教員、ポスドク、大学院生、卒論生の皆様に御礼申し上げます。

【引用文献（キーとなる文献だけをリストした）】

- 1) 本間 遜, 小酒井望, 瀧上正編集. 緑膿菌とその感染症. 1975. 文光堂, 東京.
- 2) P.H. Clarke and M.H. Richmond (edit.). Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa*. 1975, John Willy & Sons. New York.

細菌遺伝学（研究の原点）

松本 穎樹、故寺脇 良郎
(信州大学・医学部)

遺伝子ノックアウト系の構築

津田 雅孝
(東北大学大学院・生命科学)

病原性との関連

平潟 洋一
(長崎大学・医学部)

**膜タンパク質Porinの
生化学的研究**

中江 太治
(東海大学・医学部)

抗菌薬耐性機構としての意義

増田 修久
(三共・第二生物研究所)

分子構造

山口 明人
(大阪大学・産業化学研究所)

**MEXのクローニング
と性状の解析**

Keith Poole
(Queen's Univ., Canada)
Thilo Köhler
(Geneva Univ., Switzerland)

阻害薬の創製

星野 一樹
(第一製薬・創薬研究所)
Olga Lomovskaya
(Microcide Pharm., USA)

セラチアゲノム・プロジェクト

林 哲也
(九州大学・医学部)
菅井基之
(国立感染症研究所)

臨床分離株での研究

Bengt Wretling, Shah Jaral
(Kalorinska Univ. Hosp., Sweden)

適応的発現

Patrick Plesiat
(Hopital Jean Minijoz., France)

敬称略

図 18 本項で記した研究の遂行にご支援いただいた方々

- 3) Naomasa Gotoh, Takeshi Nishino, Teruo Tanino. Morphological alterations of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* by nocardicin A. *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, 23, 299–301.
- 4) Brian G. Spratt. Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1975**, 72, 2999–3003.
- 5) 飯野徹雄. 分子構築の遺伝学. **1980**, 培風館, 東京.
- 6) P.L. Royle, H. Matsumoto, B.W. Holloway. Genetic Circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO Chromosome. *J. Bacteriol.* **1981**, 145, 145–155.
- 7) Naomasa Gotoh, Chie Hanehara, Teruo Tanino. Isolation and characteristics of a short rod-shaped mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, 24, 345–349.
- 8) Taiji Nakae. Outer membrane of *Salmonella*. isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 2176–2178.
- 9) Fuminobu Yoshimura, Hiroshi Nikaido. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophylic solutes. *J. Bacteriol.* **1982**, 152, 636–642.
- 10) Roland Benz, Angela Schmid, Robert E.W. Hancock. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.* **1985**, 722–727.
- 11) Naomasa Gotoh, Hirokazu Wakebe, Takeshi Nishino, Teruo Tanino. Rapid extraction method for detection of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Meth.* **1987**, 6, 265–271.
- 12) Eisaku Yoshihara, Naomasa Gotoh, Taiji Nakae. In vitro demonstration by the rate assay of the presence of small pore in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 156, 470–476.
- 13) Naomasa Gotoh, Hiraku Okazu Wakebe, Eisaku Yoshihara, Taiji Nakae, Takeshi Nishino. Role of protein F in maintaining the structure integrity of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 983–990.
- 14) Naomasa Gotoh, Hirokazu Wakebe, Takeshi Nishino. Ultrastructural aspects of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane devoid of protein F. *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, 59, 51–54.
- 15) Naomasa Gotoh, Takeshi Nishino. Decreases of the susceptibility to low molecular weight β -lactam antibiotics in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: role of outer membrane protein D2 in their diffusion. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**, 25, 191–198.
- 16) Naomasa Gotoh, Nicholas J. White, Wipada Chaowagul, Donald E. Woods. Isolation and characterization of the outer membrane proteins of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. *Microbiology (UK).* **1994**, 140, 797–805.
- 17) 平井敬二. 緑膿菌の薬剤耐性機構:新キノロン剤. 緑膿菌—その基礎と臨床—. **1993**, 緑膿菌感染症研究会.
- 18) Naomasa Gotoh, Nobuko Itoh, Hideto Tsujimoto, Jun-ichi Yamagishi, Yoshihiro Oyamada, Takeshi Nishino. Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: Evidence of involvement in multiple antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, 122, 267–274.
- 19) Naomasa Gotoh, Nobuko Itoh, Hiroshi Yamada, Takeshi Nishino. Evidence confirming the location of OprM in the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, 122, 309–312.
- 20) Keith Poole, Kathleen Krebs, Catherin McNally, Shadinesha Neshat. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 7363–7372.
- 21) Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, Keith Poole, Takeshi Nishino. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2567–2569.
- 22) Keith Poole, Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, Qixun Zhao, Akihisa Wada, Tetsuo Yamazaki, Shadi Neshat, Jun-ichi Yamagishi, Xian-Zhi Li, Takeshi Nishino. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *rfxB* type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **1996**, 21, 13–724.
- 23) Thilo Köhler, Menno Kok, Mehri Michéa-Hamzeshpour, Patrick Plesiat, Naomasa Gotoh, Takeshi Nishino, Lasta K. Curty, Jean-Claude Pechère. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 2288–2290.
- 24) Naomasa Gotoh, Oshiyuki Kusumi, Hideto Tsujimoto, Takaomi Wada, Takeshi Nishino. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **1999**, 458, 32–36.
- 25) Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya,

- Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, Takeshi Nishino. Substrate Specificity of the MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 3322–3327.
- 26) C.K. Stover *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **2000**, 406, 959–964.
- 27) van Veen, HW *et al.* A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* **1998**, 391, 291–295.
- 28) J.P. Davies, *et al.* Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* **2000**, 290, 2295–2298.
- 29) Shu Minagawa, Hiroaki Inami, Tomoyuki Kato, Shinji Sawada, Tatsuya Yasuki, Shin-ichi Miyairi, Mamoru Horikawa, Jun Okuda, Naomasa Gotoh. RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* **2012**, 12, 70.
- 30) Yoichi Hirakata, Ramakrishnan Srikumar, Keith Poole, Naomasa Gotoh, Takashi Suematsu, Shigeru Kohno, Shimeru Kamihira, Robert E.W. Hancock, David P. Speert. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **2002**, 196, 109–118.
- 31) Atsushi Iguchi, Yutaka Nagaya, Elizabeth Pradel, Tadasuke Ooka, Yoshitoshi Ogura, Keisuke Katsura, Ken Kurokawa, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Julian Parkhill, Mohamed Sebahia, Sarah J. Coulthurst, Naomasa Gotoh, Nicholas R. Thomson, Jonathan J. Ewbank, Tetsuya Hayashi. Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug resistant nosocomial pathogen. *Genome Biol. Evol.*, **2014**, 6, 2096–2110.
- 32) Shinsuke Toba, Yusuke Minato, Yuma Kondo, Kanami Hoshikawa, Shu Minagawa, Shiho Komaki, Takanori Kumagai, Yasuyuki Matoba, Daichi Morita, Wakano Ogawa, Naomasa Gotoh, TomofTsuchiya, Teruo Kuroda. Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from *Serratia marcescens*, Db10. *Sci Rep.* **2019**, 4854.
- 33) Toshiyuki Ono, Itsuki Taniguchi, Keiji Nakamura, Debora S. Nagano, Ruriko Nishida, Yasuhiro Gotoh, Yoshitoshi Ogura, Mitsuhiko P. Sato, Atsushi Iguchi, Kazunori Murase, Dai Yoshimura, Takehiko Itoh, Ayaka Shima, Damien Dubois, Eric Oswald, Akira Shiose, Naomasa Gotoh, Tetsuya Hayashi. Global population structure of the *Serratia marcescens* complex and identification of hospital-adapted lineages in the complex. *Microb. Genomics.* **2022**, 8, 000793.