

課題番号	LS080
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化・病原性発現制御機構の解明と新規治療法開発
研究機関・部局・職名	大阪大学・産業科学研究所・准教授
氏名	西野邦彦

1. 当該年度の研究目的

病原細菌には数十個もの薬物・毒物を排出する薬剤排出ポンプが存在しているが、その大部分は通常の条件下では発現していない。菌の生育段階や、環境感知応答システム等の多彩な制御性の働きによって排出ポンプの発現が誘導されてくることが分かってきた。さらには、サルモネラが実際に宿主の中で毒性を発揮するためにも薬剤排出ポンプの存在が必須であることも見出した。細菌の薬剤排出ポンプによって細菌多剤耐性化と病原性発現が制御されていることから、薬剤排出ポンプは新たな感染症治療のターゲットとして期待される。そこで、本年度は、新たな治療戦略を開発する目的で、薬剤排出ポンプ阻害剤が、細菌の多剤耐性化と病原性発現におよぼす影響について解析を行った。

2. 研究の実施状況

約 300 万の化合物データベースからスクリーニングして得られた複数の薬剤排出ポンプ阻害候補化合物が、大腸菌とサルモネラの薬剤感受性におよぼす影響について調べた。その結果、これらの化合物は、いずれも細菌の抗菌薬抵抗性を軽減させることが分かった。また、細菌の細胞侵入性の解析から、薬剤排出ポンプ阻害剤は、抗菌薬と併用しなくても、単独で、細菌の病原性を軽減させることが明らかとなった。これら阻害剤について、HeLa 細胞を用いた毒性試験を実施し、毒性の低い化合物の選定を行った。

阻害剤と薬剤排出ポンプの共結晶構造も明らかになり、複数の薬剤排出ポンプ変異体を用いて、阻害剤効果の解析をした結果、阻害剤の結合サイトを同定することに成功した。この情報は、さらに効果の高い阻害剤を開発にすることにも役立つ。

さらには、サルモネラの細胞内に、複数の抗菌薬を感知することのできる制御因子があることを明らかにした。制御因子 RamR は、細菌にとって毒性を有する複数の化合物を感知して薬剤排出ポンプの発現を誘導し、毒物を細胞外に排出するという新たな制御機構を発見した。この制御ネットワークは、今後の耐性菌出現を抑制するための新たな治療法開発につながると考えられる。

研究成果は、多剤耐性菌感染症克服のために重要なものであり、本成果に基づき、さらに効果の高い阻害剤開発を継続することで、細菌の多剤耐性化を克服しながら、病原性を軽減させることのできる全く新しい治療薬開発に役立つものと期待できる。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 9 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 6 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Blair, J. M. A., A. Cloeckaert, K. Nishino, and L. J. V. Piddock. (2013) Alternative explanation for indole-induced antibiotic tolerance in <i>Salmonella</i>. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>. 110, E4569 (letter).</li> <li>2. Iino, R., Y. Matsumoto, K. Nishino, A. Yamaguchi, and H. Noji. (2013) Design of a large-scale femtoliter droplet array for single-cell analysis of drug-tolerant and drug resistant bacteria. <i>Front. Microbiol.</i> 4, 300.</li> <li>3. Yamaguchi, M., Y. Terao, Y. Mori-Yamaguchi, H. Domon, Y. Sakaue, T. Yagi, K. Nishino, A. Yamaguchi, V. Nizet, and S. Kawabata. (2013) <i>Streptococcus pneumoniae</i> invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. <i>PLoS One</i> 8, e77282.</li> <li>4. Nakashima, R., K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Hayashi, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, K. Nishino, and A. Yamaguchi. (2013) Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. <i>Nature</i> 500, 102-106. (DOI 10.1038/nature12300)</li> <li>5. Yamasaki, S., E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, D. Fujiwara, I. Fujii, and K. Nishino. (2013) The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. <i>Nature Commun.</i> 4, 2078. (DOI: 10.1038/ncomms3078)</li> <li>6. Yamasaki, S., S. Nagasawa, A. Fukushima, M. Hayashi-Nishino, and K. Nishino. (2013) Cooperation of the multidrug efflux pump and lipopolysaccharides in the intrinsic antibiotic resistance of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. <i>J. Antimicrob. Chemother.</i> 68, 1066-1070.</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rensch, U., K. Nishino, G. Klein, and C. Kehrenberg. (2014) <i>Salmonella</i> Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. <i>Int. J. Antimicrob. Agents</i>, in press.</li> <li>2. Baucheron, S., K. Nishino, I. Monchaux, S. Canepa, M. C. Maurel, F. Coste, A. Roussel, A. Cloeckaert, and E. Giraud. (2014) Bile-mediated activation of the <i>acrAB</i> and <i>tolC</i> multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of <i>ramA</i> in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. <i>J. Antimicrob. Chemother.</i>, in press. (doi: 10.1093/jac/dku140)</li> <li>3. Hayashi, K., A. Fukushima, M. Hayashi-Nishino, and K. Nishino. (2014) Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. <i>Front. Microbiol.</i>, in press. (doi: 10.3389/fmicb.2014.00180)</li> </ol>
<p>会議発表 計 39 件</p>	<p>専門家向け 計 36 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nishino, K. Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. Symposium <i>Salmonella and Salmonellosis I3S 2013</i> (Saint Malo, France・2013 年 5 月 27 日～29 日)</li> <li>2. Matsumoto, Y., S. Sakakihara, R. Iino, K. Nishino. Simple and rapid determination of antibiotic susceptibility using microfluidic device and a microscope. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection (Yokohama・Japan・2013 年 6 月 5 日～8 日)</li> <li>3. Yamasaki, S., S. Baucheron, E. Giraud, E. Nikaido, S. Yamasaki, K. Hayashi, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Cloeckaert, K. Nishino. Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. 5<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (Ghent, Belgium・2013 年 6 月 30 日～7 月 3 日)</li> <li>4. Baucheron, S., K. Nishino, S. Canepa, M.C. Maurel, F. Coste, I. Monchaux, A. Cloeckaert, E. Giraud. Bile-mediated activation of the <i>acrAB</i> and <i>tolC</i> efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of <i>ramA</i> in <i>Salmonella typhimurium</i>. 5<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (Ghent, Belgium・2013 年 6 月 30 日～7 月 3 日)</li> <li>5. Yamasaki, S., K. Nishino, R. Nakashima, K. Sakurai, and A. Yamaguchi. Peristaltic drug export mechanism of the multidrug exporter AcrB. 5<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (Ghent, Belgium・2013 年 6 月 30 日～7 月 3 日)</li> <li>6. Hayashi, K., R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Nishino, and A. Yamaguchi. Inhibitor-bound structures of bacterial major multidrug efflux transporters, AcrB and MexB. 5<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (Ghent, Belgium・2013 年 6 月 30 日～7 月 3 日)</li> <li>7. Nishino, K. Function and regulation of bacterial multidrug efflux pumps. Joint Meeting of ISIR and BioTechnology Institute at University of Minnesota (St. Paul, USA・2013 年 8 月 22 日)</li> <li>8. Nishino, K. Function and regulation of bacterial drug efflux systems. Special Seminar at Center for Pharmaceutical Biotechnology, University of Illinois at Chicago (Chicago, USA・2013 年 8 月 23 日)</li> <li>9. Matsumoto, Y., S. Sakakihara, R. Iino, K. Nishino. The new rapid method to determine antibiotic susceptibility via microscopy using a novel microfluidic device. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013 (Denver, USA・2013 年 9 月 10 日～13 日)</li> <li>10. Nishino, K. The crystal structure of multidrug resistance regulator RamR with multiple drugs. Technologies</li> </ol>

	<p>for Medical Diagnostic and Therapy Symposium 2nd Committee Meeting for G3(Taipei, Taiwan・2013年10月21日～22日)</p> <p>11. Yamasaki, S., E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, D. Fujiwara, I. Fujii, K. Nishino. The crystal structure of multidrug resistance regulator RamR with multiple drugs. The 14th RIES-Hokudai International Symposium Mou (Hokkaido, Japan・2013年12月11日～12日)</p> <p>12. Yamasaki, S., E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, D. Fujiwara, I. Fujii, K. Nishino. The crystal structure of multidrug resistance regulator RamR with multiple drugs. The 17th SANKEN International Symposium / The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project (Osaka, Japan・2014年1月21日～22日)</p> <p>13. Yamasaki, S., K. Nishino, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi. Structures of the Multidrug Exporter AcrB Reveal a Proximal Multisite Drug-binding Pocket. The 17th SANKEN International Symposium / The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project (Osaka, Japan・2014年1月21日～22日)</p> <p>14. Hayashi, K., R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Nishino, A. Yamaguchi. Structural Basis of Bacterial Major Multidrug Efflux Transporter Inhibition. The 17th SANKEN International Symposium / The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project (Osaka, Japan・2014年1月21日～22日)</p> <p>15. 松本佳巳、西野邦彦、榊原昇一、飯野亮太. 有効な抗菌薬を迅速に選ぶための簡易感受性測定法. 新技術説明会(東京・2013年7月19日)</p> <p>16. 西野邦彦. サルモネラ多剤排出トランスポーターAcrAB 制御因子 RamR と基質の相互作用. 第 86 回日本生化学会大会(横浜・2013年9月13日)</p> <p>17. 林克彦、中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、西野邦彦、山口明人. RND 型多剤排出トランスポーターAcrB、MexB と阻害剤の複合体結晶構造. 第 86 回日本生化学会大会(神奈川・2013年9月11日～13日)</p> <p>18. 松本佳巳、榊原昇一、飯野亮太、野地博行、西野邦彦、山口明人. マイクロデバイスと顕微鏡を用いた簡易迅速感受性測定法. 薬剤耐性菌研究会(静岡・2013年10月17日)</p> <p>19. 西野邦彦. サルモネラの異物認識による排出制御機構. 第 42 回薬剤耐性菌研究会(静岡・2013年10月18日)</p> <p>20. 櫻井啓介、中島良介、山崎聖司、林克彦、西野邦彦、山口明人. RND 型薬剤排出トランスポーターの阻害活性の構造的基礎. 第 51 回日本生物物理学会年会(京都・2013年10月28日～30日)</p> <p>21. 林克彦、中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、西野邦彦、山口明人. 大腸菌多剤排出トランスポーター複合体 AcrAB の結合比決定. 第 51 回日本生物物理学会年会(京都・2013年10月28日～30日)</p> <p>22. 松本佳巳、西野邦彦. 顕微鏡判定を用いた感受性測定法の迅速化. 第 60 回日本化学療法学会東日本支部総会(東京・2013年10月31日)</p> <p>23. 松本佳巳、西野邦彦. 専用のマイクロ流路チップ(DSTM)と顕微鏡を用いた簡易迅速 MIC 測定法. 第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会(大阪・2013年11月7日)</p> <p>24. 西野邦彦. 多剤耐性制御因子の構造解析. 第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会(大阪・2013年11月8日)</p> <p>25. 西野邦彦. サルモネラの異物認識による排出制御機構. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会(大阪・2013年11月16日)</p> <p>26. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、林克彦、長田親弘、星野一樹、小野寺宜郷、西野邦彦、山口明人. 異物排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会(大阪・2013年11月16日)</p> <p>27. 西野邦彦. 細菌の異物認識機構と排出制御. 第 36 回日本分子生物学会年会(神戸・2013年12月4日)</p> <p>28. 西野邦彦. 細菌の異物排出と制御. 愛知学院大学薬学部・医療生命薬学研究所第 2 回サイエンスフォーラム(名古屋・2014年3月17日)</p> <p>29. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、林克彦、長田親弘、星野一樹、小野寺宜郷、西野邦彦、山口明人. 多剤排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明. 第 87 回日本細菌学会総会(東京・2014年3月26日～28日)</p> <p>30. 西野邦彦. サルモネラ薬剤排出制御因子 RamR による異物認識機構. 第 87 回日本細菌学会総会(東京・2014年3月26日～28日)</p> <p>31. 松本佳巳、山口明人、西野邦彦. The new rapid method to determine antibiotic susceptibility via microscopy with a novel microfluidic tip. 第 87 回日本細菌学会総会(東京・2014年3月28日)</p> <p>32. 山岸純一、川井真好、西野邦彦、賀来満夫. 無核細胞検出系を用いた生薬由来 DNA ジャイレース阻害剤のスクリーニング. 第 87 回日本細菌学会総会(東京・2014年3月26日～28日)</p> <p>33. 酒寄夏希、西野邦彦、賀来満夫、山岸純一. <i>Acinetobacter baumannii</i> のキノロン耐性機構. 第 87 回日本細菌学会総会(東京・2014年3月26日～28日)</p> <p>34. 徳永亮、川井真好、西野邦彦、賀来満夫、山岸純一. 無核細胞検出系を用いた生薬由来 DNA ジャイレース阻害剤の探索. 日本薬学会第 134 年会(熊本・2014年3月28日)</p> <p>35. 照沼修、西野邦彦、賀来満夫、山岸純一. アシネトバクターのキノロン耐性メカニズム. 日本薬学会第 134 年会(熊本・2014年3月28日)</p>
--	--

様式19 別紙1

	<p>36. <u>西野邦彦</u>, Aixin Yan. 細菌による異物認識と排出制御. 日本薬学会第134年会(熊本・2014年3月30日)</p> <p>一般向け 計3件</p> <p>1. <u>西野邦彦</u>. 細菌の多剤耐性メカニズム. 大阪大学いちょう祭産業科学研究所一般公開(大阪・2013年5月2日～3日)</p> <p>2. <u>西野邦彦</u>. スーパーサイエンス講義「薬はなぜ効かなくなるのか? -多剤耐性菌のお話-」スーパーサイエンスハイスクール西大和学園中学校・高等学校(奈良・2013年6月15日)</p> <p>3. <u>西野邦彦</u>. 薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化・病原性発現制御機構の解明と新規治療法開発. 最先端研究開発支援プログラム FIRST シンポジウム「科学技術が拓く 2030年」へのシナリオ(東京・2014年2月28日)</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>1. 大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム <a href="http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next">http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</a></p> <p>2. 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム <a href="http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html">http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</a></p> <p>3. 大阪大学産業科学研究所・感染制御学研究分野 <a href="http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/Welcome.html">http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/Welcome.html</a></p> <p>4. 大阪大学産業科学研究所・感染制御学研究分野内・最先端・次世代研究開発支援プログラム研究紹介 <a href="http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/NEXT_Program.html">http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/NEXT_Program.html</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1. 大阪大学いちょう祭産業科学研究所一般公開において、来所者に研究室案内と研究内容説明を行った。(2013年5月2日～5月3日)(対象:小学生以下・中高生・大人、参加者72名)</p> <p>2. スーパーサイエンスハイスクール西大和学園中学校・高等学校において、スーパーサイエンス講義「薬はなぜ効かなくなるのか? -多剤耐性菌のお話-」を行った。(2013年6月15日)(対象:中高生・大人、参加者105名)</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計1件</p>	<p>1. RND型多剤排出たんぱく質の阻害剤結合構造を決定. 日経バイオテクオンライン.(2013年7月1日) <a href="https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20130701/169302/?ST=academic">https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20130701/169302/?ST=academic</a></p>
<p>その他</p>	<p>1. 情報伝達システムによる細菌膜輸送体制御機構を解明—細菌の病原性と抗薬制御へ戦略的治療光—. 大阪大学産業科学研究所第6回定例記者会見(2013年12月17日)</p> <p>2. 多剤排出タンパク質の発現にブレーキを掛ける機構を解明! —細菌の抗菌薬抵抗性制御への戦略的治療へ光—. 阪大広報課プレスリリース(2013年6月25日) <a href="http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/06/20130626_1">http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/06/20130626_1</a></p>

4. その他特記事項

研究内容に関連した受賞

1. 西野邦彦 大阪大学 総長顕彰(研究部門) (2013年8月2日)
2. 山崎聖司(大阪大学大学院薬学研究科博士課程)第87回日本細菌学会総会 優秀発表賞.(2014年3月28日)  
発表内容:山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、林克彦、長田親弘、星野一樹、小野寺宜郷、西野邦彦、山口明人. 多剤排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明.
3. 林克彦(大阪大学大学院薬学研究科修士課程)薬友会賞若手奨励賞. 大阪大学薬友会・大学院薬学研究科 (2014年3月1日)
4. 山崎聖司(大阪大学大学院薬学研究科博士課程)日本学術振興会 育志賞. 日本学術振興会 (2014年2月24日)

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	109,000,000	72,700,000	36,300,000	0	0
間接経費	32,700,000	21,810,000	10,890,000	0	0
合計	141,700,000	94,510,000	47,190,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	510,317	36,300,000	0	36,810,317	36,810,317	0	0
間接経費	7,133,049	10,890,000	0	18,023,049	18,023,049	0	0
合計	7,643,366	47,190,000	0	54,833,366	54,833,366	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,998,678	卓上型超遠心機・実験試薬等
旅費	2,282,728	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	7,712,495	特任研究員人件費・研究開発補助業務人材費等
その他	2,816,416	英文校正・論文投稿費等
直接経費計	36,810,317	
間接経費計	18,023,049	
合計	54,833,366	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
Liquidator96ch手動 卓上型ヒパッティングシ ステム	米国レイニン社製 LIQ-96-200	1	1,653,750	1,653,750	H25/ 6/11	大阪大学
ProFlexPCR System 3x32well 4484073	ライフテクノロジー社製	1	1,275,750	1,275,750	H25/ 7/24	大阪大学
ACQUITY UPLC H-Class System- Japan	米国ウォーターズ社 製	1	4,987,500	4,987,500	H25/ 11/13	大阪大学
卓上型超遠心機	米国ベックマン・コール ター社製 Optima MAX-TL	1	3,927,000	3,927,000	H26/ 1/27	大阪大学