

## 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 22 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

現在、臨床現場において様々な多剤耐性菌が出現し、耐性菌感染症は医療従事者が直面する重要な問題である。薬剤排出ポンプは生体異物や複数の抗菌薬を細胞外へ排出することにより細菌に多剤耐性をもたらす。これまで、ゲノム情報を利用した薬剤耐性研究に取り組み、多数の細菌に潜在する薬剤排出ポンプを同定してきた。一方、薬剤排出ポンプの大部分は通常の条件下では発現していないことも分かってきた。これら細菌に潜在する排出ポンプが一旦、何らかの要因で発現すると細菌は強力な多剤耐性を示す可能性が考えられることから、どのような条件で、どのような制御ネットワークで薬剤排出ポンプ発現が調節するのかを解明することは重要な課題である。本年度は、多剤耐性菌細菌による感染症克服を目的として、多剤耐性化における薬剤排出ポンプと制御ネットワークの役割について解析を行い、多剤耐性菌感染症を克服する新規創薬ターゲットの確立につなげる。

### 2. 研究の実施状況

食中毒原因菌であり、近年、多剤耐性化が問題となっているサルモネラにおける薬剤排出ポンプを中心に解析を進めた。種々の抗菌薬に対するサルモネラ薬剤排出ポンプ遺伝子欠損株の感受性についてフェノタイプマイクロアレイならびに現在開発中の抗菌薬を用いて調べた。その結果、サルモネラ薬剤排出ポンプ遺伝子欠損株は開発中の新規抗菌薬も含めて、多くの構造的に関連性のない化合物に対して感受性化していることを見出した。

チゲサイクリンは、グリシルサイクリン誘導体に分類される新規広域スペクトラムの抗生物質であり、テトラサイクリン耐性の原因となるテトラサイクリン排出ポンプおよびリボソーム保護による耐性化を克服しているが、本研究により、サルモネラ AcrAB および AcrEF 薬剤排出システムがチゲサイクリンおよびテトラサイクリン系抗菌薬への耐性化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、AcrAB 制御因子である RamA の過剰発現および RamR の不活化は、AcrAB 依存的にチゲサイクリンへの耐性を上昇させた。サルモネラにおけるチゲサイクリンへの耐性には、外因性のテトラサイクリン耐性決定因子である *tet* 遺伝子は関与せず、内因性の排出ポンプである AcrAB および AcrEF が主要な役割を果たしていると考えられる。

また、マイクロアレイを用いた解析の結果、腸内細菌が産生するインドールや、宿主が産生する胆汁酸によって、薬剤排出ポンプが誘導されるという新機構を明らかにした。その誘導は制御因子 RamR を介しており、基質結合型 RamR 蛋白質の結晶構造も解くことに成功した。さらには、これまで多剤耐性化への関与が知られていなかった small RNA である DsrA が、大腸菌の MdtEF 薬剤排出ポンプを制御することにより、細菌多剤耐性化に関与しているという新規多剤耐性機構を発見した。今回発見したこれら多剤耐性制御に関与する因子は、耐性菌感染症を克服する新規創薬ターゲットとしても期待される。

細菌ゲノム上にコードされる薬剤排出システムの情報に基づいて、将来出現しうる薬剤耐性を予測可能であることを証明するとともに、環境シグナルによって細菌の多剤耐性化が引き起こされるという新機構を発見した。これらの知見は細菌の薬剤耐性化克服に非常に有益であると考えられる。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

雑誌論文 計6件	<p>(掲載済み一査読有り) 計2件(平成23年2月～3月に掲載された論文)</p> <p>1) <u>Kunihiko Nishino</u>, Seiji Yamasaki, Mitsuko Hayashi-Nishino, Akihito Yamaguchi. Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in <i>Escherichia coli</i>. <b>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</b>, 2011, 66, 291-296. (Online ISSN: 1460-2091, Print ISSN: 0305-7453)</p> <p>2) Eiji Nikaido, Ikue Shirotsuka, Akihito Yamaguchi, <u>Kunihiko Nishino</u>. Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium in response to indole and paraquat. <b>Microbiology</b>, 2011, 157, 648-655. (Online ISSN: 1465-2080, Print ISSN: 1350-0872)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計4件(受理済みで、平成23年度に出版予定のもの)</p> <p>1) Yoshimi Matsumoto, Kohei Hayama, Shouichi Sakakihara, <u>Kunihiko Nishino</u>, Hiroyuki Noji, Ryota Iino, Akihito Yamaguchi. Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. <b>PLoS One</b>, 2011, 6, e18547. (ISSN: 1932-6203)</p> <p>2) Seiji Yamasaki, Saya Nagasawa, Mitsuko Hayashi-Nishino, Akihito Yamaguchi, <u>Kunihiko Nishino</u>. AcrA dependency of the AcrD efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. <b>Journal of Antibiotics</b>, 2011, doi:10.1038/ja.2011.28 (in press). (ISSN: 0021-8820)</p> <p>3) 西野邦彦. 薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化・病原性発現制御. <b>化学療法の領域</b>, 2011, in press. (ISSN: 0913-2384)</p> <p>4) 西野邦彦. 抗菌薬排出トランスポーター. <b>検査と技術</b>, 2011, in press. (ISSN: 0301-2611)</p>
会議発表 計3件	<p>専門家向け 計2件</p> <p>1) 西野邦彦. 多剤排出ポンプによる細菌機能制御、静岡、2011年3月29日、日本薬学会第131年会</p> <p>2) 山崎聖司、長澤沙弥、西野美都子、山口明人、西野邦彦. サルモネラ菌薬剤排出ポンプ AcrD の機能における AcrA の役割、静岡、2011年3月30日、日本薬学会第131年会</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1) <u>Kunihiko Nishino</u>, Seiji Yamasaki, Mitsuko Hayashi-Nishino, Akihito Yamaguchi. Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens, Washington DC, USA, 2011年2月20日 (Family Science Days), The American Association for the Advancement of Science 2011 Annual Meeting</p>
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p><a href="http://web.me.com/kunihikonishino/Site/Welcome.html">http://web.me.com/kunihikonishino/Site/Welcome.html</a></p> <p>大阪大学: <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>大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室: <a href="http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html">http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</a></p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>日本薬学会第131年会での発表内容は、講演ハイライトとして取り上げられ、報道機関用に冊子が配布された。私達の取り組んでいる研究内容を国民に向け公開することができた(報道機関用・第131年会講演ハイライト pg. 56「耐性菌はやりくり上手? ~小さなゲノムをフル活用! ~」)。</p> <p>また、国際的な一般向けの講演として、米国ワシントンDCにおいて開催された American Association for the Advancement of Science (AAAS) Annual Meeting の Family Science Days に、最先端・次世代研究開発支援プログラムでの研究内容について発表を行った。会場には科学者のみならず、家族での来場もあり、約100名の来場者に研究内容を紹介することができた。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	特になし。

4. その他特記事項

Microbiology に掲載された論文の研究成果が、大変重要な発見であるとして、英国の微生物学会(SGM)が発行する Microbiology Today にハイライト論文として取り上げられることとなった(平成23年度掲載予定)。

実施状況報告書(平成22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す

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
直接経費	109,000,000	0	36,400,000	72,600,000
間接経費	32,700,000	0	10,920,000	21,780,000
合計	141,700,000	0	47,320,000	94,380,000

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
直接経費	0	36,400,000	0	36,400,000	100,000	36,300,000
間接経費	0	10,920,000	0	10,920,000	0	10,920,000
合計	0	47,320,000	0	47,320,000	100,000	47,220,000

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	100,000	ディスプレイホルダー、プラスチックピペット
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	0	
直接経費計	100,000	
間接経費計	0	
合計	100,000	

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
				0		
				0		
				0		