

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23年度)

本様式の内容は一般に公表されません

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、薬剤排出ポンプは細菌多剤耐性に関係する因子として主に解析が進められてきたが、人類が抗菌薬を開発する前から細菌ゲノムには薬剤排出ポンプがコードされていると考えられており、これらが本来排出している生理的基質については不明な点が多い。そこで、本年度は、細菌薬剤排出ポンプによる代謝産物等の生理的排出基質を同定する目的で、薬剤排出ポンプのディファレンシャルメタボローム解析を行った。また、平成24年度から計画していた薬剤排出活性測定の新デバイス開発についても本年度から研究を開始した。

2. 研究の実施状況

薬剤排出ポンプのディファレンシャルメタボローム解析

細菌薬剤排出ポンプが本来輸送している生理的基質を同定する目的で、薬剤排出ポンプのディファレンシャルメタボローム解析を行った。薬剤排出ポンプ遺伝子発現株と欠損株を培地中で生育させ、培養上清と細菌内に含まれる成分について、HPLCによって分離した後、低分子化合物や蛋白質等の構成の違いについて検証した。サルモネラのMacABポンプと、大腸菌MdtEFポンプについて以下の知見が得られた。

サルモネラMacAB薬剤排出ポンプは、これまでマクロライド系抗菌薬の排出に関与していることを報告してきたが、マウス感染実験の結果から病原性に関与していることが分かり、その発現量がマクロファージ内で増大することを明らかにしている。発現株と欠損株について、培養上清ならびに菌体内の蛋白質を二次元電気泳動により解析を行い、LC-MS/MSにより蛋白質を同定し、MacAB生理機能の解析を行った。その結果、MacABポンプはリボースの代謝に関与していることが明らかになった。ADP-リボースはサルモネラをはじめとする多くの細菌において病原性発現に関与していることが知られており、このことがMacABによるサルモネラ病原性発現に深く関係していることが示唆される。

腸内等の病原細菌感染部位は、酸素濃度が低く嫌氣的であることが多いが、本環境における薬剤排出ポンプの制御と生理的役割については、これまで知られていなかった。そこで、嫌氣的環境下における大腸菌薬剤排出ポンプ生理機能の解析を進めた。嫌氣的条件においてMdtEFポンプが誘導され、これに伴い細菌が多剤耐性化するのに加えて、細菌細胞内からインドールレッド等の毒物を細胞外に排出することにより自身を保護しているという新たな薬剤排出蛋白質の生理機能を明らかにした。本研究により、細菌が生存している生理環境下における多剤排出蛋白質発現誘導とその生理機構が明らかになった。また、生化学的解析から大腸菌薬剤排出ポンプAcrBの多剤認識機構についても明らかにすることができた。

多剤排出活性測定デバイスの開発(平成24年度計画について本年度から開始)

多剤耐性菌の迅速検出のため、微細デバイスを応用した検査キット開発に取り組んだ。これまでの細菌多剤排出活性測定法は、いずれも時間がかかるものであったが、マイクロ流路を用いることで、15分程の短時間に高感度で細菌の抗菌薬排出活性を測定することに成功した。本方法は、将来、臨床分離株の抗菌薬排出活性を迅速に測定することのできる検査キットや、排出蛋白阻害剤のスクリーニングデバイスとしての応用が高く期待される。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計11件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計8件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Y. Matsumoto, K. Kaihatsu, K. Nishino, M. Ogawa, N. Kato, Yamaguchi A. (2012) Antibacterial and antifungal activities of new acylated derivatives of epigallocatechin gallate. <i>Front. Microbiol.</i> 3: 53. 2. R. Iino, K. Nishino, H. Noji, A. Yamaguchi, Y. Matsumoto. (2012) A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors. <i>Front. Microbiol.</i> 3: 40. 3. Y. Shan, Q. Pan, J. Liu, F. Huang, H. Sun, K. Nishino, A. Yan. (2012) Covalently linking the <i>Escherichia coli</i> global anaerobic regulator FNR in tandem allows it to function as an oxygen stable dimer. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 419: 43–48. 4. K. Nishino. (2012) Physiological role of bacterial multidrug efflux pumps. <i>Yakugaku Zasshi</i> (in Japanese) 132: 45–50. 5. R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Nishino, A. Yamaguchi. (2011) Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. <i>Nature</i> 480: 565–569. 6. Y. Zhang, M. Xiao, T. Horiyama, Y. Zhang, X. Li, K. Nishino, A. Yan. (2011) The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic. <i>J. Biol. Chem.</i> 286: 26576–26584. 7. S. Yamasaki, S. Nagasawa, M. Nishino, A. Yamaguchi, K. Nishino. (2011) AcrA dependency of the AcrD efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. <i>J. Antibiot.</i> (Nature Publishing Group) 64: 433–437. 8. Y. Matsumoto, K. Hayama, S. Sakakihara, K. Nishino, H. Noji, R. Iino, A. Yamaguchi. (2011) Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. <i>PLoS One</i> 6: e15847. <p>(掲載済み一査読無し) 計3件</p> <ol style="list-style-type: none"> 9. 西野邦彦. (2011) 細菌の薬剤排出タンパクと生存戦略. <i>感染・炎症・免疫</i> 41: 335–338. 10. 西野邦彦. (2011) 抗菌薬排出トランスポーター. <i>検査と技術</i> 39: 677–684. 11. 西野邦彦. (2011) 薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化・病原性発現制御. <i>化学療法の領域</i> 27: 1495–1503. <p>(未掲載一査読有り) 計0件</p>
<p>会議発表 計35件</p>	<p>専門家向け 計32件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yamasaki, S., E. Nikaido, K. Sakurai, R. Nakashima, A. Yamaguchi, K. Nishino. Mechanism of multidrug recognition by the RamR regulatory protein required for the induction of the AcrAB multidrug efflux pump. 15th SANKEN International & 10th Nanotechnology Symposium (Osaka, Japan・2012年1月12日) 2. Hayashi-Nishino, M., A. Yamaguchi, K. Nishino. Immuno-electron tomography for elucidation of localization of the multidrug efflux pumps in <i>Salmonella</i>. 7th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium (Osaka, Japan・2011年11月11日) 3. Nakashima, R., K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Nishino, A. Yamaguchi. Peristaltic mechanism of multidrug efflux transporter AcrB revealed by the crystal structure of AcrB with high-molecular-weight drugs. 7th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium (Osaka, Japan・2011年11月10日) 4. Yamasaki, S., E. Nikaido, K. Sakurai, R. Nakashima, A. Yamaguchi, K. Nishino. The regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in <i>Salmonella typhimurium</i>. JSPS-INRA collaborative project meeting (Nouzilly, France・2011年10月14日)(自ら企画した国際会議) 5. Hayashi-Nishino, M., R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi, K. Nishino. Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens. France-Japan Workshop (Bio-inspired approaches: Micro- & Nano- Architectures, Materials & Imaging) (Bordeaux, France・2011年10月11日～12日) 6. Yamaguchi, A., R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Nishino. Peristaltic mechanism of multidrug efflux transport. France-Japan Workshop (Bio-inspired approaches: Micro- & Nano- Architectures, Materials & Imaging) (Bordeaux, France・2011年10月11日～12日) 7. Matsumoto, Y., K. Nishino, A. Yamaguchi. Antibiotic augmenting activities of Phe-Arg-β-Naphtylamide based on its membrane permeabilizing effects. American Society for Microbiology 51st ICAAC Meeting (Chicago, IL, U. S. A.・2011年9月18日) 8. Yamasaki, S., S. Nagasawa, M. Hayashi-Nishino, A. Yamaguchi, K. Nishino. AcrA dependency of the AcrD efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. IUMS 2011 Congress (Sapporo, Japan・2011年9月9日) 9. Matsumoto, Y., K. Nishino, A. Yamaguchi. Effect of efflux pump inhibition versus outer membrane permeabilization to antimicrobial activities of ciprofloxacin and erythromycin against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. IUMS 2011 Congress (Sapporo, Japan・2011年9月9日) 10. Yamasaki, S., E. Nikaido, K. Sakurai, R. Nakashima, A. Yamaguchi, and K. Nishino. The regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in <i>Salmonella</i>. JSPS-INRA collaborative project meeting (Nouzilly, France・2011年6月25日)(自ら企画した国際会議)

11. Nikaido, E., I. Shirotsuka, A. Yamaguchi, K. Nishino. Regulation of AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat. 4th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE) (Tours, France・2011年6月27日～29日)
 12. Yamasaki, S., S. Yamasaki, S. Nagasawa, M. Hayashi-Nishino, A. Yamaguchi, and K. Nishino. Role of AcrA on the function of the AcrD multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 4th ARAE (Tours, France・2011年6月27日～29日)
 13. Yamasaki, S., S. Yamasaki, A. Ono, K. Hayashi, A. Fukushima, Y. Matsumoto, M. Hayashi-Nishino, K. Sakurai, R. Nakashima, A. Yamaguchi, and K. Nishino. Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens. 4th ARAE (Tours, France・2011年6月27日～29日)
 14. Nishino, K. The roles of drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance and virulence. Seminar at Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University (Ghent, Belgium・2011年10月7日)
 15. Nishino, K. Drug resistance and virulence roles of bacterial multidrug efflux pumps. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo・2011年9月9日)
 16. 西野邦彦. 細菌多剤耐性化・病原性発現におけるトランスポーターの役割. 第6回トランスポーター研究会年会(仙台・2011年6月11日)
 17. Nishino, K. Multidrug efflux pumps and development of therapeutic strategies to control infectious diseases. The Uehara Memorial Foundation Symposium 2011(東京・2011年6月8日)
 18. Nishino, K., E. Nikaido, I. Shirotsuka, S. Yamasaki, K. Sakurai, R. Nakashima, and A. Yamaguchi. Regulation of the AcrAB xenobiotic transport system in response to environmental signals. 第85回日本細菌学会総会(長崎・2012年3月27日～29日)
 19. Matsumoto, Y., K. Nishino, A. Yamaguchi. Outer membrane permeabilizing effects of Phe-Arg-β-Naphtylamide on *Pseudomonas aeruginosa*. 第85回日本細菌学会総会(長崎・2012年3月27日～29日)
 20. Hayashi-Nishino, M., A. Yamaguchi, K. Nishino. Immuno-electron tomography for elucidation of localization of the multidrug efflux pump in *Salmonella*. 第85回日本細菌学会総会(長崎・2012年3月27日～29日)
 21. Yamasaki, S., R. Nakashima, K. Sakurai, K. Nishino, A. Yamaguchi. Structures of the multidrug exporter AcB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. 第85回日本細菌学会総会(長崎・2012年3月27日～29日)
 22. 松本佳巳、葉山浩平、榊原昇一、飯野亮太、野地博行、西野邦彦、山口明人. マイクロデバイスを用いた簡易迅速多剤耐性緑膿菌検出法. 第40回薬剤耐性菌研究会(群馬・2011年12月1日～2日)
 23. 葉山浩平、松本佳巳、西野邦彦、山口明人. マイクロデバイスを用いた迅速多剤耐性緑膿菌(MDRP)検出法. 第59回日本化学療法学会西日本支部総会第54回日本感染症学会中日本地方学術集会・合同学会(奈良・2011年11月25日)
 24. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、西野邦彦、山口明人. 細菌異物排出トランスポーターの機能解析. 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(岡山・2011年11月24日)
 25. 大野愛子、尾島学、西野美都子、山口明人、西野邦彦. サルモネラ薬物排出トランスポーターの生理機能解析. 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(岡山・2011年11月24日)
 26. 中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、西野邦彦、山口明人. 異物排出タンパク AcrB に存在する基質結合マルチサイトの解明. 平成23年度日本結晶学会年会及び総会(札幌・2011年11月24日～25日)
 27. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、西野邦彦、山口明人. 新たな共結晶構造から明らかになった異物排出タンパク AcrB の多剤認識機構. 第64回日本細菌学会関西支部総会(大阪・2011年11月19日)
 28. 葉山浩平、松本佳巳、西野邦彦、山口明人. マイクロデバイスを用いた迅速多剤耐性緑膿菌(MDRP)検出法. 第60回日本感染症学会東日本地方学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会(山形・2011年10月27日)
 29. 山崎優、二階堂英司、城阪郁江、櫻井啓介、中島良介、山口明人、西野邦彦. サルモネラ異物排出トランスポーターAcrB 発現制御ネットワーク解析. 第84回日本生化学会大会(京都・2011年9月24日)
 30. 山崎聖司、西野林美都子、山口明人、西野邦彦. Small RNA による細菌多剤耐性化メカニズムの解明. 第84回日本生化学会大会(京都・2011年9月24日)
 31. Tanaka, A., S. Kageyama, K. Nishino, T. Noda, and T. Yoshimori. Analysis of autophagy against *Salmonella* using *Salmonella* mutants. 第63回日本細胞生物学会(札幌・2011年6月27日～29日)
 32. 松本佳巳、西野邦彦、山口明人. 排出ポンプ阻害薬と外膜透過性亢進薬の有用性. 第59回日本化学療法学会総会(札幌・2011年6月23日～25日)
- 一般向け 計3件
33. 山崎優、二階堂英司、城阪郁江、櫻井啓介、中島良介、山口明人、西野邦彦. サルモネラ異物排出トランスポーターAcrB 発現制御ネットワーク解析. 大阪大学産業科学研究所第67回学術講演会(大阪・2011年11月22日)
 34. 西野邦彦. オープンラボ-細菌の多剤耐性機構. 大阪大学第52回まちかね祭(大阪・2011年11月4日)
 35. 西野邦彦. マルチコンポーネント型薬剤排出蛋白質の機能解明. 新学術領域研究「過渡的複合体」公開

様式19 別紙1

	シンポジウム(東京・2011年7月20日)
図書 計2件	<ol style="list-style-type: none"> 1. はじめの一步のイラスト感染症・微生物学、羊土社、本田武司編 / 西野邦彦、亀井克彦、熊ノ郷淳、児玉年央、清水少一、勝二郁夫、高松漂太、本田武志、牧本清子、丸山治彦、三浦聡之、森康子 著、「感染症の治療—抗微生物薬」担当、ISBN 978-4-7581-2023-4、2011年7月20日発行、189ページ 2. 薬学用語辞典、東京化学同人、日本薬学会編 / 西野邦彦、青木伸、青木隆、赤澤祐子、秋澤宏行、東純一、厚味徹一、阿部芳廣、天ヶ瀬紀久子、荒川秀俊、荒川義弘、他 210 名著、「微生物学分野」担当、ISBN9784807906772、2012年3月23日発行、552ページ
産業財産権 出願・取得状況 計1件	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計1件 (国内) 出願番号: 特願 2011-200036 発明者: 松本佳巳、葉山浩平、榊原昇一、西野邦彦、山口明人、野地博行、飯野亮太 発明の名称: 細菌の抗菌薬感受性の分析に使用するマイクロデバイスおよびそれを使用する分析方法 出願人: 国立大学法人大阪大学 出願日: 2011年9月13日</p>
Webページ (URL)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next 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 http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html 3. 大阪大学産業科学研究所・感染制御学研究分野 http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/Welcome.html 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 http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/NEXT_Program.html 5. 最先端・次世代研究開発支援プログラム研究成果発信 Twitter https://twitter.com/#!/nishinolab
国民との科学・技術対話の実施状況	<ol style="list-style-type: none"> 1. 大阪大学産業科学研究所第67回学術講演会において、来所者に研究内容説明を行った(参加者 約50名)。(2011年11月22日) また、その様子をウェブサイトで公開した。 http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/info/20111122_report_ni.html 2. 大阪大学第52回まちかね祭の期間に、オープンラボを実施。研究内容について、来所者に説明を行う(参加者 約10名)。(2011年11月4日) また、その様子をウェブサイトで公開した。 http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/info/20111104report_n.html 3. 最先端・次世代開発支援プログラムの研究内容を大阪大学ウェブサイトにて公開。(2011年6月11日) 概要: http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/jisedai2010/kunihiko_nishino.html 詳細: http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/NEXT_Program.html 4. 国民との科学・技術対話の新たな試みとして、最先端・次世代研究開発支援プログラムによる研究成果について Twitter による発信を開始。(2011年8月8日～現在) https://twitter.com/#!/nishinolab
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	日経バイオテク ONLINE、2011年12月7日、「異物排出たんぱく質 AcrB の機能的回転ベリスタポンプ機構を解明 Nature 誌に発表」、 https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20111207/158288/
その他	<ol style="list-style-type: none"> 1. 受賞 1件、西野邦彦、大阪大学功績賞(研究部門)、2011年8月1日 2. 国際共同研究 5件、フランス・国立農学研究所、香港大学、ベルギー・ゲント大学、ドイツ・ハノーファー獣医大学、米国・オハイオ大学 3. 国際雑誌論文 編集次長、K. Nishino, <i>Frontiers in Microbiology (Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy)</i>・Associate Editor, 2010年10月～現在 4. 国際雑誌論文依頼審査 13件 (2011年4月1日～2012年3月31日) 5. 米国微生物学会プログラム諮問委員, K. Nishino, 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance・Program Advisory Committee, 2010年11月28日～現在 6. 第85回 日本細菌学会総会 コンビーナ、西野邦彦、シンポジウム「細菌センサーと環境応答」

4. その他特記事項

その他、研究内容に関連した受賞

1. 山崎聖司(大阪大学大学院薬学研究科修士課程) 第85回日本細菌学会総会優秀ポスター賞(2011年3月29日)
発表内容: Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. S. Yamasaki, R. Nakashima, K. Sakurai, K. Nishino, A. Yamaguchi.
2. 山崎聖司(大阪大学大学院薬学研究科修士課程) 第64回日本細菌学会関西支部総会最優秀発表賞(2011年11月19日)
発表内容: 新たな結晶構造解析から明らかになった多剤排出タンパク AcrB の多剤認識機構. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、西野邦彦、山口明人.

実施状況報告書(平成23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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	109,000,000	36,400,000	0	72,600,000	0
間接経費	32,700,000	10,920,000	0	21,780,000	0
合計	141,700,000	47,320,000	0	94,380,000	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	36,300,000	0	0	36,300,000	34,981,601	1,318,399	0
間接経費	10,920,000	0	0	10,920,000	3,257,805	7,662,195	0
合計	47,220,000	0	0	47,220,000	38,239,406	8,980,594	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	28,182,141	リアルタイムPCR装置、実験試薬等
旅費	1,204,987	研究成果発表(札幌コンベンションセンター)等
謝金・人件費等	4,826,056	研究開発補助業務人材人件費等
その他	768,417	英文校正等
直接経費計	34,981,601	
間接経費計	3,257,805	
合計	38,239,406	

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
StepOnePlusリアルタイムPCRシステム	米国ライフテクノロジーズ社	1	4,999,900	4,999,900	2011/4/25	大阪大学
MxiQ2リアルタイムPCR解析システム	米国バイオラッドラボラトリーズ社製	1	2,814,000	2,814,000	2011/7/28	大阪大学
ウルトラマイクロームシステム	オーストリア国ライカマイクロシステムGmbH社	1	16,170,000	16,170,000	2011/12/16	大阪大学