

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24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

これまでに、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することを明らかにした。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を見いだしてきた。このことは、これらの薬剤排出ポンプが実際には何らかの生理的基質の輸送体であることを物語っている。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分かった。細菌の薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化と病原性発現制御機構を明らかにすることが極めて重要な課題になってきた。そこで、本年度は、宿主環境中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、病原性や毒性との関連について解明する。また、微細加工技術を駆使して、細菌多剤排出活性を簡便に迅速に測定することのできるデバイスを開発する。

2. 研究の実施状況

宿主環境中での薬剤排出ポンプの生理機能の解明

病原細菌は、貪食されたマクロファージ、樹状細胞内で生存、増殖することができる宿主の殺菌機構を回避する種々の特徴を有している。宿主細胞はサイトカインの産生によりマクロファージを活性化して細胞内殺菌能を亢進させるなどして、細菌に対する防御を発揮する。このような宿主が保有している殺菌機構に対して、細菌薬剤排出ポンプがどのような役割を担っているのかを調べた。排出ポンプ欠損株は野生株に比べ TNF- α 産生誘導能が高いことが分かった。この産生誘導は、ポンプ遺伝子を発現させることで抑えられ、細菌の薬剤排出ポンプには宿主が持つ殺菌機構から回避するための機能が備わっていることが考えられる。この産生誘導能の差は Myd88 ノックアウトマウスから採取したマクロファージでは見られないことから、排出ポンプによる細菌の変化が Toll-like receptor により認識していることが示唆される。さらには、様々な生物に保存されている感染防御システムである抗菌ペプチドに対する耐性に、細菌薬剤排出ポンプが深く関与していることも見出した。

薬剤排出ポンプ活性測定デバイスの開発

微細デバイスを応用した多剤耐性菌検出方法を開発した。昨年度に確立したマイクロ流路を用いた抗菌薬排出活性測定系をさらに発展させ、院内感染で問題となっている多剤耐性緑膿菌の抗菌薬感受性を3時間で測定することのできるデバイスを開発した。また、マイクロドロプレット型超微小溶液チャンバーを用いることにより、15分で細菌一細胞の抗菌薬排出活性を測定できる方法を開発した。本方法は細菌感染症の早期診断・治療に役立つと考えられる。

本研究成果をもとに、薬剤排出ポンプ阻害剤を開発することにより、細菌の薬剤耐性化と病原性の両方を同時に軽減させることのできる新しい感染症治療法開発に役立つことが期待される。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計4件</p> <ol style="list-style-type: none"> Giraud, E., S. Baucheron, I. Virlogeux-Payant, K. Nishino, and A. Cloeckaert. (2013) Effects of natural mutations in the <i>ramRA</i> locus on invasiveness of epidemic fluoroquinolone-resistant <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isolates. <i>J. Infect. Dis.</i> 207, 794-802. Iino, R., K. Hayama, H. Amezawa, S. Sakakihara, S. H. Kim, Y. Matsumoto, K. Nishino, A. Yamaguchi, and H. Noji. (2012) A single-cell drug efflux assay in bacteria by using a directly accessible femtoliter droplet array. <i>Lab Chip</i> 12, 3923-3929. Hayashi-Nishino, M., A. Fukushima, and K. Nishino. (2012) Impact of Hfq on the intrinsic drug resistance of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. <i>Front. Microbiol.</i> 3, 205. Nikaido, E., E. Giraud, S. Baucheron, S. Yamasaki, A. Wiedemann, K. Okamoto, T. Takagi, A. Yamaguchi, A. Cloeckaert, and K. Nishino. (2012) Effects of indole on drug resistance and virulence of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. <i>Gut Pathog.</i> 4, 5. <p>(掲載済み一査読無し) 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> 西野邦彦. (2013) 薬剤排出トランスポーターの機能と制御 (Regulation and function of drug efflux transporters). <i>化学療法の領域 (Antibiotics & Chemotherapy)</i> 29, 81-89. 2013 年 1 月号 (第 29 巻 第 1 号) (2012 年 12 月 25 日発行) 西野邦彦. (2013) 薬剤排出ポンプの生理機能解明 (Physiological functions of drug efflux pumps). <i>薬学研究の進歩 (Advances in Pharmaceutical Sciences)</i> 29, 27-31. (未掲載) 計0件
<p>会議発表 計30件</p>	<p>専門家向け 計28件</p> <ol style="list-style-type: none"> 林克彦、中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、長田親弘、星野一樹、小野寺宜郷、西野邦彦、山口明人. RND 型多剤排出ポンプ阻害剤開発の基本概念. 第 133 回 日本薬学会総会 (神奈川・2013 年 3 月 27~30 日) 山崎優、二階堂英司、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦. 細菌多剤耐性化に關する転写制御因子 RamR と多剤との共結晶構造解析. 第 133 回 日本薬学会総会 (神奈川・2013 年 3 月 27~30 日) Hayashi, K., R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, K. Nishino, A. Yamaguchi. Structural study on inhibitor specificity of bacterial multidrug efflux pumps. The Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems (Ventura, CA, U.S.A.・2013 年 3 月 17 日~22 日) Nishino, K. Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium. 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉・2013 年 3 月 18~20 日) 松本佳巳、榊原昇一、飯野亮太、野地博行、山口明人、西野邦彦. Easy and rapid detection of bacterial drug-resistance using micro device. 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉・2013 年 3 月 18~20 日) Yamasaki, S., E. Nikaido, K. Sakurai, R. Nakashima, A. Yamaguchi, K. Nishino. Crystal structures of RamR-bile acid complexes from <i>Salmonella enterica</i>. ISIR-INRA project meeting (Nouzilly, France・2013 年 3 月 7 日) Nishino, K. MDR efflux pumps and bacterial virulence. Workshop on MDR Efflux Pumps and <i>Salmonella</i> (Ghent, Belgium・2013 年 3 月 5 日) Nishino, K. Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens. 16th SANKEN International Symposium / 11th SANKEN Nanotechnology Symposium (Osaka, Japan・2013 年 1 月 22 日~23 日) Yamasaki, S., E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi, K. Nishino. The crystal structure of multidrug resistance regulator RamR reveal the mechanism of multiple drugs recognition. 16th SANKEN International Symposium / 11th SANKEN Nanotechnology Symposium (Osaka, Japan・2013 年 1 月 22 日~23 日) Yamasaki, S., K. Nishino, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi. Structures of AcrB Multidrug Efflux Pump Reveal the Peristaltic Drug Export Mechanism. 16th SANKEN International Symposium / 11th SANKEN Nanotechnology Symposium (Osaka, Japan・2013 年 1 月 22 日~23 日) Hayashi, K., R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, K. Nishino, A. Yamaguchi. The Crystal Structures of Bacterial Multidrug Efflux Pumps with a Specific Inhibitor in the Common Inhibitory Narrow Pit. 16th SANKEN International Symposium / 11th SANKEN Nanotechnology Symposium (Osaka, Japan・2013 年 1 月 22 日~23 日) Nishino, K. Regulatory networks of bacterial multidrug resistance. Oxford University Special Workshop on Bio-Nanomaterials Devices (Osaka・2012 年 12 月 21 日) 山崎優、二階堂英司、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦. サルモネラの薬剤排出ポンプ AcrAB

	<p>の転写調節因子 RamR の X 線結晶構造解析及び機能解析. 第 85 回 日本生化学会大会 (福岡・2012 年 12 月 14~16 日)</p> <p>14. Hayashi, K., R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, <u>K. Nishino</u> and A. Yamaguchi. Crystal Structures of Bacterial Multidrug Efflux Pumps with a Specific Inhibitor. 8th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium (Osaka, Japan・2012 年 12 月 10 日~11 日)</p> <p>15. 山崎優、二階堂英司、城阪郁江、櫻井啓介、中島良介、山口明人、<u>西野邦彦</u>. 多剤耐性制御因子 RamR による抗菌薬認識機構の解明. 大阪大学産業科学研究所 第 68 回学術講演会 (大阪・2012 年 11 月 22 日)</p> <p>16. 櫻井啓介、山崎優、中島良介、山口明人、<u>西野邦彦</u>. サルモネラ薬剤排出ポンプ AcrAB 制御因子 RamR と基質の相互作用及び X 線結晶構造解析. 平成 24 年度日本結晶学会年会及び総会 (仙台・2012 年 10 月 26 日)</p> <p>17. 松本佳巳、榊原昇一、飯野亮太、野地博行、<u>西野邦彦</u>、山口明人. マイクロデバイスを用いた簡易迅速感受性測定法. 第 41 回薬剤耐性菌研究会 (下呂・2012 年 10 月 25 日)</p> <p>18. 山崎優、二階堂英司、櫻井啓介、中島良介、山口明人、<u>西野邦彦</u>. サルモネラ薬剤排出ポンプ AcrAB の制御機構の解析—転写調節因子 RamR と基質の相互作用及び X 線結晶構造解析—. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (西宮・2012 年 10 月 20 日)</p> <p>19. <u>Nishino, K.</u>, K. Hayashi, S. Yamasaki, S. Yamasaki, Y. Matsumoto, M. Hayashi-Nishino, A. Yamaguchi. Development of novel therapeutic strategies to tackle multidrug-resistant pathogens. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences (Tokyo, Japan・2012 年 9 月 27 日)</p> <p>20. Yamasaki, S., E. Nikaido, A. Yamaguchi, <u>K. Nishino</u>. Effects of indole on drug resistance and virulence of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences (Tokyo, Japan・2012 年 9 月 27 日)</p> <p>21. Yamasaki, S., <u>K. Nishino</u>, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi. Structures of the multidrug efflux pump AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences (Tokyo, Japan・2012 年 9 月 27 日)</p> <p>22. 林克彦、中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、長田親弘、星野一樹、小野寺宜郷、<u>西野邦彦</u>、山口明人. 結晶構造に基づくグラム陰性菌多剤排出ポンプ阻害剤開発に向けた研究. 第 50 回日本生物物理学会年会 (名古屋・2012 年 9 月 22 日~24 日)</p> <p>23. 山崎優、二階堂英司、城阪郁江、中島良介、櫻井啓介、山口明人、<u>西野邦彦</u>. サルモネラの薬剤排出ポンプ AcrAB の転写調節因子 RamR と基質の相互作用および X 線結晶構造解析. 第 10 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (京都・2012 年 8 月 7 日)</p> <p>24. 山崎優、櫻井啓介、中島良介、山口明人、<u>西野邦彦</u>. サルモネラの薬剤排出ポンプ AcrAB の制御因子 RamR と基質の相互作用及び X 線結晶構造解析. BIA Symposium 2012 (東京・2012 年 7 月 20 日)</p> <p>25. Nikaido, E., E. Giraud, S. Baucheron, S. Yamasaki, A. Wiedemann, K. Okamoto, T. Takagi, A. Yamaguchi, A. Cloeckaert, <u>K. Nishino</u>. Effects of indole on drug resistance and virulence of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment (Aix-en-Provence, France・2012 年 6 月 26 日~29 日)</p> <p>26. Giraud, E., S. Baucheron, I. Virlogeux-Payant, <u>K. Nishino</u>, A. Cloeckaert. Effects of natural mutations in <i>ramRA</i> locus on invasiveness of epidemic fluoroquinolone-resistant <i>Salmonella typhimurium</i> isolates. 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment (Aix-en-Provence, France・2012 年 6 月 26 日~29 日)</p> <p>27. Fung, K., Y. Zhang, <u>K. Nishino</u>, A. Yan. Up-regulation of multidrug efflux pumps during the bacterial stress response to host physiological conditions. 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment (Aix-en-Provence, France・2012 年 6 月 26 日~29 日)</p> <p>28. Yamasaki, S., <u>K. Nishino</u>, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi. Peristaltic drug export mechanism of the AcrB multidrug efflux pump. ASM American Society for Microbiology 112th General Meeting (San Francisco, U. S. A.・2012 年 6 月 16 日~19 日)</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>29. <u>西野邦彦</u>. 感染症克服に向けた検査・薬効評価技術. 平成 24 年度 第 4 回産研テクノサロン バイオサイエンスへの応用展開 (大阪・2013 年 2 月 1 日)</p> <p>30. <u>西野邦彦</u>. 薬はなぜ効かなくなるか —多剤耐性菌感染症の克服に向けて—. 大阪大学産業科学研究所 第 68 回学術講演会 (大阪・2012 年 11 月 22 日)</p>
<p>図書 計1件</p>	<p><u>Nishino, K.</u> (2013) Multidrug efflux pumps and development of therapeutic strategies to control infectious diseases. <i>Chembiomolecular Science</i>, Part3, 269–279. Edited by Masakatsu Shibasaki, Masamitsu Iino and Hiroyuki Osada (Springer), ISBN 978-4-431-54037-3</p>

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	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
国民との科 学・技術対 話の 実施状況	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。(2012年4月30日～5月1日)(対象:小学生以下・中高生・大人、参加者53名) 2. 大阪大学産業科学研究所第68回学術講演会において、来所者に研究内容説明を行った。(2012年11月22日)(対象:大人、参加者28名) 3. 大阪大学中之島サイエンスカフェ もっと見たい! 情報科学と生命科学からのアプローチにおいて、来場者に研究内容説明を行った。その様子は、YAHOO! JAPAN や医療介護 CB ニュースにおいて紹介された。(2013年3月21日)(対象:小学生以下・中高生・大人、参加者:39名)
新聞・一般雑 誌等掲載 計3件	1. 日経産業新聞、2012年7月3日、「多剤耐性菌、15分で検出 院内感染調査へ応用期待」 2. YAHOO! JAPAN ニュース、2012年3月22日「細菌を殺さない」新たな抗菌薬の研究紹介—大阪大主催サイエンスカフェ(http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20130322-00000000-cbn-soci) 3. 医療介護 CB ニュース、2012年3月22日「細菌を殺さない」新たな抗菌薬の研究紹介(http://www.cabrain.net/news/article/newsId/39481.html)
その他	1. 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・イリノイ大学 2. 国際雑誌論文 編集次長、K. Nishino, <i>Frontiers in Microbiology</i> (Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy)・Associate Editor, 2010年10月～現在 3. 国際雑誌論文依頼審査 16件 (2012年4月1日～2013年3月31日) 4. 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

4. その他特記事項

その他、研究内容に関連した受賞

- 山崎優(大阪大学大学院薬学研究科修士課程)第85回日本生化学会大会 鈴木紘一メモリアル賞。(2012年12月16日)
発表内容:山崎優、二階堂英司、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦、サルモネラの薬剤排出ポンプ AcrAB の転写調節因子 RamR の X 線結晶構造解析及び機能解析。
- 山崎優(大阪大学大学院薬学研究科修士課程)第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 若手研究者奨励賞。日本薬学会物理系薬学部会 (2012年8月7日)
発表内容:山崎優、二階堂英司、城阪郁江、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦、サルモネラの薬剤排出ポンプ AcrAB の転写調節因子 RamR と基質の相互作用および X 線結晶構造解析。
- 山崎聖司(大阪大学大学院薬学研究科博士課程) 112th American Society for Microbiology General Meeting ‘Outstanding Student Poster’ and ‘Student Grant Award’. (2012年6月16日)
発表内容:Yamasaki, S., K. Nishino, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi. Peristaltic drug export mechanism of the AcrB multidrug efflux pump.

実施状況報告書(平成24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	36,400,000	36,300,000	36,300,000	0
間接経費	32,700,000	10,920,000	10,890,000	10,890,000	0
合計	141,700,000	47,320,000	47,190,000	47,190,000	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	1,318,399	36,300,000	0	37,618,399	37,108,082	510,317	0
間接経費	7,662,195	10,890,000	0	18,552,195	11,419,146	7,133,049	0
合計	8,980,594	47,190,000	0	56,170,594	48,527,228	7,643,366	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	22,751,649	3DデジタルPCR装置、実験試薬等
旅費	1,864,420	研究成果発表旅費
謝金・人件費等	10,065,624	特任研究員人件費・研究開発補助業務人材人件費
その他	2,426,389	英文校正等
直接経費計	37,108,082	
間接経費計	11,419,146	
合計	48,527,228	

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
ABIPRISM3100- Avantto3130システム アップグレード保守タイ プ	米国ライフテクノロ ジーズ社製 4396844-BA01(コ ンピュータ・モニター付)	1	4,095,000	4,095,000	2012/5/14	大阪大学
マイクロプレートリーダー	スイス国テカン社製 イ ンフユニットM200PRO NanoQuant	1	2,733,885	2,733,885	2012/10/25	大阪大学
マイクロプレートリーダー	スイス国テカン社製 イ ンフユニットM200PRO NanoQuant(Nano QuantPlate含ま	1	2,257,500	2,257,500	2012/12/21	大阪大学
QuantStudio 3D デ ジタルPCRシステム	米国ライフテクノロ ジーズ社製 QS3D- 01LP	1	4,536,000	4,536,000	2013/3/25	大阪大学