

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15518

研究課題名（和文）LC-MS/MSとナノデバイスを用いた疾患関連因子に基づく感染症診断制御法の確立

研究課題名（英文）Establishment of infection diagnostic and control methods based on disease-related factors using LC-MS / MS and nanodevices

研究代表者

山崎 聖司 (Yamasaki, Seiji)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：70757301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によって、当初から開発を目指していた細菌薬剤排出ポンプの生理基質同定技術として、新たに、様々な蛍光基質を用いた簡便・迅速な手法を複数確立することができた。

当手法を活用した細菌薬剤排出ポンプに関する研究により、カチオン性の平面芳香族小分子の排出に特化している第3の薬剤排出ルートを解明することができた。

また、自ら開発した細菌薬剤排出ポンプ阻害剤スクリーニング手法（特願2016-028653）を用いることで、細菌の病原性発現に関する薬剤排出ポンプ阻害剤候補を実際に複数見出すことに成功した。詳細な解析の結果、感染症治療上有用であることが判明したため、現在特許申請の準備中である。

研究成果の概要（英文）：As a result of this research, as techniques for identifying the physiological substrate of bacterial drug efflux pump, I established simple and rapid methods using various fluorescent substrates.

Through research on bacterial drug efflux pumps utilizing this technique, I elucidated the third route excreting cationic planar aromatic small molecules.

In addition, I found out drug efflux pump inhibitor candidates involved in bacterial pathogenicity by using inhibitor screening method (Japanese Patent Application No. 2016-028653). These are useful for treatment of infectious diseases.

研究分野：細菌学

キーワード：感染症 排出ポンプ 細菌 抗生物質 トランスポーター 多剤耐性菌 薬剤耐性 抗菌薬

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な薬剤に対して耐性を示す多剤耐性菌、食中毒等で深刻な症状を引き起こす病原性菌が次々と出現し、臨床現場において大きな問題となっている。依然、感染症によって年間約 1500 万人が命を落としており、細菌感染症の克服は今なお医療分野における喫緊の課題である。

多剤耐性化の原因として、抗菌薬を含む様々な化合物を菌体内から菌体外へ排出する細菌薬剤排出ポンプが特に注目されている。これまでの自らの研究により、排出ポンプの排出機構が世界で初めて解明され [Nature 480, 565-9, 2011]、自ら世界初となる抗菌薬排出阻害剤の開発を進める段階にまで来ている [Nature 500, 102-6, 2013]。

しかしながら、高病原性菌による食中毒等の場合、しばしばメディアで報道されるように、抗菌薬等による治療が間に合わず死亡するケースがみられる。また、新たに腸内細菌と精神疾患・生活習慣病・がん等との関連も明らかになりつつあり、特に米国で研究が進んでいる。ここに至って、菌体外に排出される様々な病気を引き起こす原因となっている、細菌の生理活性化合物を同定・解析し、早期に診断する方法が必要となってきた。

これまでの自らの研究から、排出ポンプの基質認識性はとても幅広く、実際にある種の生理活性化合物を排出することで、薬剤耐性だけでなく病原性・定着性にも深く関与することが分かりつつある [Int J Antimicrob Agents 45, 439-41, 2015]。そこで本研究では、重要な生理活性化合物の同定・各疾患との関係解明・早期検出法の確立までの一連の研究開発を行うことで、成果の早期実装による細菌関連疾患の克服を目指す。

## 2. 研究の目的

世界各国の医療従事者が直面している細菌が関与する各疾患の克服に向け、細菌が持つ薬剤排出ポンプとその生理基質に着目した基礎研究と、研究成果を活かした新たな検出診断法の開発を行う。

具体的には、実際に自らの研究から、排出ポンプが薬剤耐性だけでなく病原性・定着性にも深く関与し、細菌と精神疾患・生活習慣病・がん等との関連も明らかになりつつあるため、菌体外に排出される様々な病気を引き起こす細菌の重要な生理活性化合物を同定し、各疾患との関係について明らかにする。

さらに、得られた情報を活用して、発症リスク早期検出診断法の確立に向けた研究も行う。

## 3. 研究の方法

抗菌作用のない生理活性化合物に関しては、従来の薬剤感受性試験を用いた基質同定法は利用できないため、新たな基質同定技術の創出が必要不可欠である。具体的には、細菌培養液に基質候補化合物である生理活性化合物を添加し、各培養時間で培養上清を回収する。この上清中に含まれる候補化合物濃度を、LC-MS/MS を用いた超高感度多種因子同時分析技術等によって測定し、排出ポンプ発現株と欠損株で比較することで、排出ポンプの基質かどうかを効率的に調べる。

同定した排出ポンプの生理基質が、実際に各病気を引き起こす疾患関連因子として宿主に対して働いているのかも調べる。具体的には、細菌が持つ排出ポンプを一つずつ高発現させるための各プラスミド(大腸菌・サルモネラにおいては、すでに全て構築済み)を用いて、同定した生理基質を高排出する遺伝子組み換え菌株を探索し、当基質を排出する排出ポンプを同定する。基質排出量の測定には、LC-MS/MS による超高感度分析技術等を用いる。構築した基質高排出遺伝子組み換え菌株を実験動物に感染させ、生存率・行動・体重等がどのように変化するかを観察し、各疾患への関与を調べることも検討する。

現在、得られた研究成果に基づく早期の社会実装が求められている。具体的には、これまでに開発したナノデバイスに改良を加え、同定した疾患関連因子をバイオマーカーとした、発症リスク早期検出診断法を開発する。検出試薬としては、疾患関連因子存在下で変色・発色するものを想定しており、もはや USB カメラや顕微鏡も必要としない、目視で判別できる簡便な検出法の開発を考えている。

## 4. 研究成果

本研究によって、当初から開発を目指していた細菌薬剤排出ポンプの生理基質同定技術として、新たに、様々な蛍光基質を用いた簡便・迅速な手法を複数確立することができた。

当手法を活用した細菌薬剤排出ポンプに関する研究により、カチオン性の平面芳香族小分子の排出に特化している第 3 の薬剤排出ルートを解明することができた。

また、自ら開発した細菌薬剤排出ポンプ阻害剤スクリーニング手法(特願 2016-028653)を用いることで、細菌の病原性発現に関与する薬剤排出ポンプ阻害剤候補を実際に複数見出すことに成功した。詳細な解析の結果、感染症治療上有用であることが判明したため、現在特許申請の準備中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Martijn Zwama, Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Kunihiro Nishino, and Akihito Yamaguchi.

Multiple entry pathways within the efflux transporter AcrB contribute to multidrug recognition.

*Nature Communications* 9, 124 (2018)

査読有り

DOI: 10.1038/s41467-017-02493-1

Seiji Yamasaki, Katsuhiko Hayashi, Keisuke Sakurai, Ryosuke Nakashima, Akihito Yamaguchi, and Kunihiro Nishino. Drug Efflux Transporters of Gram Negative Bacteria.

*The Cell (New Science)* 49, 7-11 (2017)

査読有り

[http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/04cell/cell2017\\_10.html](http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/04cell/cell2017_10.html)

Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Akihito Yamaguchi, and Kunihiro Nishino.

Structural Analysis and New Drug Development against Multidrug Efflux Pumps.

*Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 137, 377-387 (2017)

査読有り

DOI: 10.1248/yakushi.16-00235-2

[学会発表](計29件)

津之浦穂野香、中村澪沙、石巻理奈、山崎聖司、西野邦彦、山岸純一

アシネトバクターのキノロン化合物間の不完全交差耐性機構

薬学会第138年会

2018年

### 山崎聖司

「細菌共存学」の開拓 - ヒトと病原細菌・腸内細菌との新たな関係の構築 -

量子ビーム科学研究施設研究会 人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミックアライアンス 「物質・物性評価横串サブグループ」研究会

2017年

中尾香、櫻井啓介、山崎聖司、西野邦彦、山口明人、中島良介

緑膿菌多剤排出ポンプ MexB の基質認識に関する新たな知見

第70回日本細菌学会関西支部総会

2017年

山崎聖司、井上久美、山村凌大  
腸内フローラ判定トイレと改善サプリの開発

第3回COI2021会議

2017年

山崎聖司、井上久美、山村凌大  
腸内フローラ判定トイレと改善サプリの開発

第2回COI若手連携研究会

2017年

### 山崎聖司

「細菌共存学」の開拓 - ヒトと病原細菌・腸内細菌との新たな関係の構築 -

人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミック・アライアンス エレクトロニクス 物質・デバイス(G1) グループ分科会

2017年

### 山崎聖司

創薬ターゲットとしての細菌異物排出ポンプ

第65回日本化学療法学会西日本支部総会(招待講演)

2017年

山村凌大、山崎聖司  
健康増進に寄与する腸内細菌遺伝子・産生物質の同定および応用製品開発

COI2021 第2回ワークショップ

2017年

山崎聖司、井上久美  
トイレの溜まり水測定を目指したセンサーの開発および 水中に溶け出す糞便成分と健康状態との関係解明

COI2021 第2回ワークショップ

2017年

山崎聖司、井上久美  
糞便成分センサーを利用した健康検知トイレの開発

JST フェア 2017 (招待講演)

2017年

### 山崎聖司

「細菌共存学」の開拓 - ヒトと病原細菌・腸内細菌との新たな関係の構築 -

第五回アライアンス若手研究交流会(招待講演)

2017年

### 山崎聖司

C01 トイレ  
第一回 C01 若手研究者アイデアソン合宿  
2017 年

### 山崎聖司

健康検知トイレの開発  
C012021 第 1 回ワークショップ (招待講演)  
2017 年

### 西野邦彦、山崎聖司

腸内フローラの改善による 人間力活性化メカニズムの解明  
第 8 回 医療機器 開発・製造展 MEDIX (メディックス)  
2017 年

### 重山紗紀、山崎聖司、西野邦彦

腸内フローラ改善による人間力活性化  
第 8 回 医療機器 開発・製造展 MEDIX (メディックス)  
2017 年

山岸純一、神野実桜、石川麻衣、山崎聖司、西野邦彦、賀来満夫  
Acinetobacter baumannii のキノロン薬間の不完全交差耐性機構  
日本薬学会第 137 年会  
2017 年

山岸純一、石川麻衣、神野実桜、山崎聖司、西野邦彦、賀来満夫  
アシネトバクターのキノロン薬間の不完全交差耐性機構  
第 90 回日本細菌学会総会  
2017 年

山崎聖司、林克彦、井上雄太、樋口雄介、櫻井啓介、中島良介、加藤修雄、山口明人、西野邦彦  
耐性菌多剤排出トランスポーターの生化学的解析と新規阻害剤開発  
第 90 回日本細菌学会総会 (招待講演)  
2017 年

### 山崎聖司

腸内フローラに着目した健康検知トイレの開発  
第 2 回 C012021 会議 (招待講演)  
2017 年

Tomoki Matsuda, Seiji Yamasaki, Kunihiro Nishino, Takeharu Nagai and Akihito Yamaguchi  
Analysis of the dynamics of a multi-drug exporter AcrB in the absence and presence of substrates  
The Biophysical Society 61st Annual Meeting (国際学会)  
2017 年

② Seiji Yamasaki, Saki Shigeyama, Aiko Fukushima, Atsushi Kumanogoh, and Kunihiro Nishino  
Improvement of the Gut Flora to Activate Human Power  
1st C01 International Conference (国際学会)  
2016 年

### ② 山崎聖司

腸内フローラを利用したヒト活性化手段の開発  
第 5 回 ネイチャー・インダストリー・アワード  
2016 年

### ③ 山崎聖司、西野邦彦

創薬ターゲットとしての細菌異物排出ポンプ  
第 86 回日本感染症学会 西日本地方会学術集会  
第 59 回日本感染症学会 中日本地方会学術集会  
第 64 回日本化学療法学会 西日本支部総会  
2016 年

### ④ 山崎聖司

腸内フローラ改善によるヒト活性化手段の開発  
大阪大学科学イノベーションフェア 2016 (招待講演)  
2016 年

⑤ 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、林克彦、井上雄太、樋口雄介、加藤修雄、山口明人、西野邦彦  
耐性菌異物排出ポンプの構造解析と新規阻害剤開発  
第 45 回薬剤耐性菌研究会  
2016 年

⑥ Seiji Yamasaki, Li-Yuan Wang, Takahiro Hirata, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiro Nishino  
Multidrug efflux pumps contribute to Escherichia coli biofilm maintenance  
The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)  
2016 年

⑦ Seiji Yamasaki, Li-Yuan Wang, Takahiro Hirata, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiro Nishino  
Role of multidrug efflux pumps in the production and maintenance of biofilms  
第 68 回日本細胞生物学会大会  
2016 年

⑳ 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、林克彦、井上雄太、樋口雄介、加藤修雄、山口明人、西野邦彦  
耐性菌異物排出ポンプに着目した 新規治療薬の開発  
第 64 回日本化学療法学会総会（招待講演）  
2016 年

㉑ Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Katsuhiko Hayashi, Yuta Inoue, Yusuke Higuchi, Nobuo Kato, Akihito Yamaguchi, Kunihiro Nishino  
Structural analysis and new inhibitor development against multidrug efflux pumps  
第 16 回日本蛋白質科学会年会  
2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mid/Site/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 聖司 (YAMASAKI, Seiji)  
大阪大学・産業科学研究所・助教  
研究者番号：70757301

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )