様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｈ０３９８３

研究課題名（和文）トランスポーターによる多剤耐性・病原性発現機構解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Roles of transporters in multidrug resistance and virulence, and development of novel therapeutic strategies to control infectious diseases

研究代表者
西野　邦彦（Nishino, Kunihiko）

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：３０４３２４３８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、細菌ゲノムには多剤排出トランスポーターをコードしている遺伝子が数多く存在することが分かってきた。本研究では、多剤耐性化におけるトランスポーターと制御ネットワークの役割について解析を行うとともに、トランスポーターの基質認識・輸送機構を明らかにする。汁酸の構成成分により、トランスポーターが誘導され、この発現誘導がアクティベーターのRamAに対する抑制性因子RamRに依存していることが分かった。複数の入り口を使用することで、薬剤排出ポンプは、様々な物理化学的特性を持つ複数の薬物の認識と輸送を行っていることが分かった。ABC型薬剤排出トランスポーターMacABに対する阻害候補化合物を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で発見した、多剤排出トランスポーターの制御機構や基質輸送機構は、将来、多剤耐性を克服する新たな薬の開発につながると考えられる。また、発見したMacABトランスポーターを阻害する化合物は、トランスポーターの生理的役割や薬剤耐性における役割を含め、この排出トランスポーターの機能分析に役立つ可能性がある。 さらに、MacABはマクロライド耐性と細菌の毒性の両方に関連しているため、MacAB阻害剤の開発は、抗菌薬と阻害剤の組み合わせ、または阻害剤のみを使用して、薬物耐性と毒性を低減する新しい治療アプローチに貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has been found that there are many genes encoding multidrug efflux transporters in the bacterial genome. In this study, we analyze the role of transporters and their regulatory networks in multidrug resistance, and clarify the substrate recognition and transport mechanism of these transporters. It was found that transporter was induced by the components of the fatty acid, and the induction of this expression was dependent on RamR, a repressor of activator RamA. By using multiple entry pathways, drug efflux pumps have been found to recognize and transport multiple drugs with different physicochemical properties. A compound that inhibit the ABC-type drug efflux transporter MacAB was obtained.

研究分野：細菌学、薬学

キーワード：細菌　感染症　多剤耐性　化学療法　トランスポーター　MacAB　RamR　阻害剤

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

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。近年、細菌ゲノムには多剤排出トランスポーターをコードしている遺伝子が数多く存在することが推定された。これらトランスポーター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。あらかじめ、潜在的多剤耐性遺伝子をスクリーニングすることができれば、将来出現する耐性菌を新薬開発段階で予測しておくことも可能になるのではないだろうか。これまでに以下の研究成果を得ている。

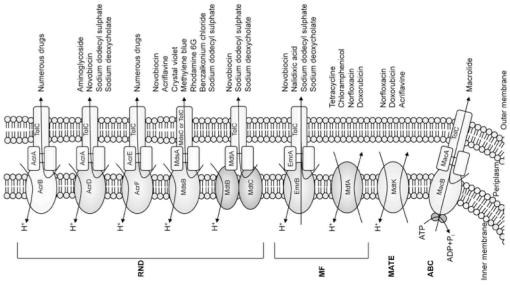

図1．細菌に潜む薬剤排出トランスポーター群.

①大腸菌に存在する 37 個の薬剤排出遺伝子を全てクローニングし解析を行った結果、20 個が薬剤耐性に関与していることを明らかにし、複数の新規薬剤排出遺伝子を同定することに成功した（図1）。

②グラム陰性菌において世界初の ABC 型薬剤排出トランスポーターMacAB を発見した。MacAB を発現させた菌はマクロライド系抗菌剤特異的に耐性を示すことを明らかにした。さらに、細菌病原性発現にも関与していることを見出した。サルモネラ野生株はマウスを約 6-10 日間で死に至らしめるが、*macAB* 遺伝子欠損株はマウス致死能力が顕著に低下していた。

③もし、何らかの要因で排出系の発現が誘導されると、細菌は強力な多剤耐性菌になる可能性がある。よって、薬剤排出ポンプが誘導される要因を探ることが重要である。二成分情報伝達システムが薬剤排出ポンプの発現を調節し、多剤耐性化をコントロールしているという、全く新しい耐性制御メカニズムを発見し、薬剤排出系の発現が環境応答による生体防御機構により調節されていることを証明した。

④さらに、薬剤排出トランスポーターの発現は薬剤だけではなく、環境シグナルによって誘導されることを明らかにした。これまで、宿主環境中において、排出系がどのようなシグナルによって発現誘導されるのかは、ほとんど知られていなかった。細菌が感染時に定着する腸内には、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等の環境シグナルが存在する。感染の場において、実際に細菌がどのような形で薬剤排出ポンプを利用して、薬剤耐性化と病原性をコントロールしているのかを知ることは重要な課題である。

２．研究の目的

病原細菌には数十個もの薬物・毒物を排出するトランスポーター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。さらには、細菌が宿主の中で毒性を発揮するためにも排出系の存在が必須であることも見出した。本研究では、多剤耐性化におけるトランスポーターと制御ネットワークの役割について解析を行うとともに、トランスポーターによる基質認識・輸送の機構を明らかにする。また、薬剤排出トランスポーターの阻害剤の評価を行う。トランスポーターが抗菌薬耐性のみならず病原性発現に関与する点から考えると、排出ポンプは新規薬剤の魅力的なターゲットである。よい阻害剤を見つけることができれば、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法開発に役立つことが期待される。

３．研究の方法

本研究では、細菌多剤耐性化と病原性発現におけるトランスポーターの機能解析を行うことにより、トランスポーターによる細菌機能制御の仕組みを解明する。感染症克服を目指し、トランスポーターの阻害剤の効果についても検証する。

４．研究成果

・トランスポーターの発現制御機構

トランスポーターが細菌の生育環境中でどのように制御されているのかを調べるための実験を行った。その結果、腸内環境に存在する胆汁酸の構成成分により、トランスポーターが誘導され、この発現誘導がトランスポーターの発現上昇に関わるアクティベーターの RamA に対する抑制性因子 RamR に依存していることが分かった。RamR タンパク質を精製して各種胆汁酸構成成分との結合実験を行い、共結晶構造解析に取り組んだ。その結果、いくつかの構成成分と RamR との共結晶構造を解くことに成功した。これまで、多くの細菌において、複数の遺伝子が胆汁酸によって発現状態が変化することが知られていたが、その分子機構については全く分かっていなかった。本研究において、サルモネラに存在する RamR タンパク質が直接、胆汁酸構成成分を認識することを明らかにするだけでなく、共結晶構造まで解明したことは大変重要な発見である。

・トランスポーターの基質認識・輸送機構

AcrB は、大腸菌において恒常的に発現して機能している多剤排出トランスポーターである。これまでの研究から、このトランスポーターには、いくつかの基質の入口の存在が確認されているが、これらの複数の輸送経路の特異性は不明のままである。本研究では、最初にスイッチループと近位ポケットを通過せずに遠位ポケットに直接接続されている AcrB 三量体の中央空洞からの基質チャネル（チャネル 3 と呼ぶ）の証拠を示すことができた。 エチジウムなどの平面芳香族カチオンは、チャネル 1 および 2 よりもチャネル 3 を優先的に通過することが分かった。チャネル 3 を介した排出は、標的変異によって増加し、ミノサイクリンやエリスロマイシンなどの薬物のチャネル 1 および 2 を介した排出と競合しないことが分かった。近位から遠位ポケットへの経路が妨げられているループ変異体は、チャネル 3 を利用する薬物のみを排出できることが分かった。 したがって、複数の入り口を使用することで、薬剤排出ポンプは、様々な物理化学的特性を持つ複数の薬物の認識と輸送を行っていることが考えられる。

・トランスポーターの阻害剤の開発

ABC 型薬剤排出トランスポーターMacAB は、もともとはマクロライド系抗菌薬特異的なポンプとして同定し、このように名付けたが、その後、 MacAB は、マウスに経口感染させた際のサルモネラの毒性にも必要であることが分かった。 本トランスポーターに対する阻害剤を探索することは、細菌の薬剤耐性化と病原性の両方を軽減することのできる新たな治療につながると考えられる。本研究では、サルモネラ MacAB の阻害剤のスクリーニングを実行した。MacAB を発現させた菌株は、非発現株に比べ、マクロライド系抗菌薬に耐性を示すが、マクロライドであるエリスロマイシンに対しての感受性を増加させる化合物のスクリーニングを行った。その結果、OU33858 (5-[(5-chloro-2-hydroxyphenyl) methylene]-3-propyl-2-thioxo-1,3-diazolidin-4-one) (MW:296.77) (図2)が、MacAB に対する阻害候補化合物として選択された。本化合物は、エリスロマイシンに加え、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ロイコマイシン、ジョサマイシンといったマイクロライド系抗菌薬に対する MacAB 発現株の感受性を高める効果があった。MacAB 以外の排出ポンプ、AcrAB (RND)、MdfA (MF)、そして MdtK (MATE)を発現させた菌株に対して、これら排出ポンプの基質への感受性に OU33858 は、影響がなかったことから、この化合物は MacAB 特異的な阻害剤であることが分かった。これまでの研究から、MacAB は *in vitro* でサルモネラの酸化ストレス耐性と関係していることが分かっている。野生型サルモネラから調整した上清は、MacAB を欠失した菌株の H_2O_2 による成長阻害を救済する。本研究において、MacAB 阻害剤が H_2O_2 存在下でのサルモネラ成長阻害を救済する上清の能力を低下させることも発見した。

本研究で見つけた MacAB ポンプを阻害する化合物は、ポンプの生理的役割や薬剤耐性における役割を含め、この排出ポンプの機能分析に役立つ可能性がある。 さらに、MacAB はマクロライド耐性と細菌の毒性の両方に関連しているため、MacAB 阻害剤の開発は、抗菌薬と阻害剤の組み合わせ、または阻害剤のみを使用して、薬物耐性と毒性を低減する新しい治療アプローチに貢献する可能性がある。

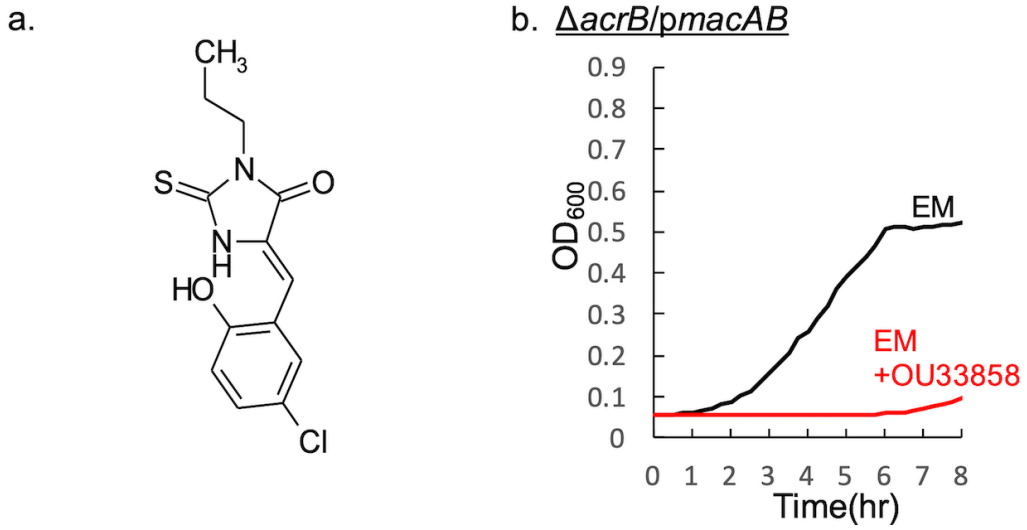

図2. エリスロマイシン(EM)の存在下または非存在下でのサルモネラ増殖に対する OU33858 の阻害効果. (a) OU33858 の化学構造. (b) 2 μg/ml エリスロマイシン存在下で、25 μM OU33858 ありまたはなしの MacAB 発現サルモネラ株の増殖曲線.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計13件（うち査読付論文　9件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　8件）

１．著者名 Yamagishi Ami、Nakano Sohei、Yamasaki Seiji、Nishino Kunihiko	４．巻 64
２．論文標題 An efflux inhibitor of the MacAB pump in Salmonella enterica serovar Typhimurium	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Microbiology and Immunology	６．最初と最後の頁 182～188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kotani Kenta、Matsumura Mio、Morita Yuji、Tomida Junko、Kutsuna Ryo、Nishino Kunihiko、Yasuike Shuji、Kawamura Yoshiaki	４．巻 8
２．論文標題 13-(2-Methylbenzyl) Berberine Is a More Potent Inhibitor of MexXY-Dependent Aminoglycoside Resistance than Berberine	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Antibiotics	６．最初と最後の頁 212～212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics8040212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Xu Zeling、Li Ming、Li Yanran、Cao Huiluo、Miao Lu、Xu Zhaochao、Higuchi Yusuke、Yamasaki Seiji、Nishino Kunihiko、Woo Patrick C.Y.、Xiang Hua、Yan Aixin	４．巻 29
２．論文標題 Native CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing Enables Dissecting and Sensitizing Clinical Multidrug-Resistant P.?aeruginosa	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Cell Reports	６．最初と最後の頁 1707～1717.e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Yamasaki Suguru、Nakashima Ryosuke、Sakurai Keisuke、Baucheron Sylvie、Giraud Etienne、Doublet Benoit、Cloeckaert Axel、Nishino Kunihiko	４．巻 9
２．論文標題 Crystal structure of the multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36025-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Sakurai Keisuke、Yamasaki Seiji、Nakao Kaori、Nishino Kunihiko、Yamaguchi Akihito、Nakashima Ryosuke	4．巻 9
2．論文標題 Crystal structures of multidrug efflux pump MexB bound with high-molecular-mass compounds	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 4539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40232-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 山崎聖司、中島良介、山口明人、西野邦彦	4．巻 34
2．論文標題 耐性菌パンデミックの回避に向けた細菌多剤排出トランスポーターの解析と阻害剤開発	5．発行年 2019年
3．雑誌名 BIO Clinica	6．最初と最後の頁 202～206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Kunihiko Nishino	4．巻 33(5)
2．論文標題 Role of drug efflux pumps in bacterial drug resistance	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Antibiotics & Chemotherapy	6．最初と最後の頁 1029-1039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Yuji Morita, Kunihiko Nishino	4．巻 137(4)
2．論文標題 Frontier of Pharmaceutical Microbiology: To Combat Multidrug-resistant Bacterial Pathogens	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Yakugaku Zasshi	6．最初と最後の頁 371-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.16-00235-F	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Yamasaki S, Nakashima R, Sakurai K, Yamaguchi A, Nishino K	4．巻 137(4)
2．論文標題 Structural Analysis and New Drug Development against Multidrug Efflux Pumps	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Yakugaku Zasshi	6．最初と最後の頁 377-382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.16-00235-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Zwama M, Hayashi K, Sakurai K, Nakashima R, Kitagawa K, Nishino K, Yamaguchi A	4．巻 8
2．論文標題 Hoisting-Loop in Bacterial Multidrug Exporter AcrB Is a Highly Flexible Hinge That Enables the Large Motion of the Subdomains	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Front Microbiol	6．最初と最後の頁 2095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2017.02095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Kunihiko Nishino	4．巻 1700
2．論文標題 Regulation of the Expression of Bacterial Multidrug Exporters by Two-Component Signal Transduction Systems	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Methods Mol Biol	6．最初と最後の頁 239-251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7454-2_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Iino R, Sakakihara S, Matsumoto Y, Nishino K	4．巻 1700
2．論文標題 Large-Scale Femtoliter Droplet Array for Single Cell Efflux Assay of Bacteria	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Methods Mol Biol	6．最初と最後の頁 331-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7454-2_18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Zwama M, Yamasaki S, Nakashima R, Sakurai K, Nishino K, Yamaguchi A	４．巻 9(1)
２．論文標題 Multiple entry pathways within the efflux transporter AcrB contribute to multidrug recognition	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Nat Commun	６．最初と最後の頁 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-02493-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計11件（うち招待講演　11件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 細菌多剤排出トランスポーターの機能と制御 Bacterial Multidrug Efflux Transporters - not just for resistance
３．学会等名 大阪大学微生物病研究所 Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 細菌薬剤排出ポンプの機能と制御
３．学会等名 第30回微生物シンポジウム（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 細菌薬剤排出システムの機能と制御
３．学会等名 第6回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム 第33回生体機能関連化学部会若手フォーラム 第5回バイオテクノロジー部会若手フォーラム（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 Kunihiko Nishino
２．発表標題 Function and Regulation of Bacterial Multidrug Efflux Pumps
３．学会等名 第56回日本生物物理学会年会（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 多剤耐性菌の脅威と新たな治療戦略
３．学会等名 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生命機能物質・デバイスシステムG3分科会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 Kunihiko Nishino
２．発表標題 Regulation of Bacterial Multidrug Efflux System Involved in Multidrug and Bile Resistance
３．学会等名 The 22nd SANKEN International Symposium The 17th SANKEN Nanotechnology International Symposium（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 細菌の多剤耐性化における排出システムの役割
３．学会等名 ライフ＆メディカルイノベーションプロジェクトシンポジウム（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 グラム陰性菌の多剤排出システムと阻害機構
３．学会等名 薬剤耐性（AMR)シンポジウム（招待講演）
４．発表年 2017年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 グラム陰性菌の薬剤排出トランスポーターと多剤耐性における役割
３．学会等名 ConBio2017（招待講演）
４．発表年 2017年

１．発表者名 Kunihiko Nishino
２．発表標題 Regulation and Function of Multidrug Exporters
３．学会等名 Kickoff Meeting (JSPS Symposium) for the ZIAM/GBB and ISIR/IPR collaboration (at University of Groningen)（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2017年

１．発表者名 西野邦彦
２．発表標題 多剤耐性菌の脅威と新たな創薬戦略
３．学会等名 日本薬学会年会（招待講演）
４．発表年 2018年

〔図書〕　計1件

１．著者名 Akihito Yamaguchi, Kunihiko Nishino	４．発行年 2018年
２．出版社 Springer	５．総ページ数 355
３．書名 Bacterial Multidrug Exporters	

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学産業科学研究所
https://www.sanken.osaka-u.ac.jp
生体分子制御科学研究分野（西野研）
https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi_06/

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
連携研究者	中島　良介 (Nakashima Ryosuke) (20379100)	大阪大学・産業科学研究所・特任准教授 (14401)	
連携研究者	西野　美都子 (Nishino Mitsuko) (30510440)	大阪大学・産業科学研究所・助教 (14401)	
連携研究者	山崎　聖司 (Yamasaki Seiji) (70757301)	大阪大学・高等共創研究院・准教授 (14401)	