

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2007～2011

課題番号：19679002

研究課題名 (和文) オーフアン輸送体による多剤耐性機構の解明と新規治療薬開発

研究課題名 (英文) Roles of orphan transporters in multidrug-resistant bacteria and development of therapeutic strategies to control infectious diseases

研究代表者

西野 邦彦 (NISHINO KUNIHICO)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：30432438

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学、薬剤耐性、感染症、輸送体、細菌

1. 研究計画の概要

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、細菌ゲノムには輸送体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。これまでに、大腸菌に存在する基質が不明のオーファン輸送体について解析を行った結果、数多くのオーファン輸送体が細菌多剤耐性化に関与していることを明らかにした。また、細菌の情報伝達システムが輸送体発現を調節し、多剤耐性化をコントロールしていることを見出した。さらに、研究を進める中で、オーファン輸送体が細菌病原性にも関与していることが分かってきた。

本研究では、細菌オーファン輸送体の生理機能と制御ネットワークを解析し、細菌の多剤耐性化・病原性発現や毒性との関連について解明する。阻害剤の効果について検証し、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新しい治療薬開発のため情報基盤を構築する。

2. 研究の進捗状況

(1)オーファン輸送体のフェノーム解析

近年、サルモネラによる食中毒事例が増えており、その多くが多剤耐性を示す。多剤耐性化に関与していると考えられるオーファン輸送体遺伝子全てについて発現株と欠損株を構築した。フェノタイプマイクロアレイを用いて約 2000 種類の異なる環境下における細菌の生育を観察したところ、オーファン輸送体は抗菌薬・色素・界面活性剤といった様々な化合物に対しての耐性化に関与していることが分かった。サルモネラには少なくとも 9 個の薬剤耐性化に関与しているオーフ

アン輸送体が存在していることを明らかにした。さらに、これらオーファン輸送体は薬剤耐性化だけではなく、銅や亜鉛といった金属に対する耐性化に関与していることを明らかにした。

(2)オーファン輸送体のトランスクリプトーム解析

感染の場において、実際に細菌がどのような形でオーファン輸送体を利用して、薬剤耐性化と病原性をコントロールしているのかわかることは重要な課題である。本研究で、インドールや胆汁酸といった腸内に存在する化合物が、RamRA を介して、AcrAB 輸送体の発現を誘導していることを明らかにした。インドールは RamR による RamA の発現抑制を解除することで、胆汁酸は RamA に直接結合して活性化させることにより、輸送体の発現を誘導する新機構を明らかにした。これら制御因子の結晶構造解析も進め、分解能 2.5Å のデータを得た。さらに、RNA シャペロンや small RNA が輸送体を制御する新規薬剤耐性機構を発見した。

(3)宿主環境中でのオーファン輸送体の生理機能の解明

オーファン輸送体が宿主環境中においてどのような生理機能を担っているのかは未知の部分が多い。宿主の保有している殺菌機構に対して、細菌のオーファン輸送体がどのような役割を担っているのかを調べた結果、オーファン輸送体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、輸送体遺伝子を発現させることで抑えられる。よって、細菌のオーファン輸送体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。ノックアウトマウスの解析から、Toll-like receptor がオーファン輸送体によるマクロファージ産生抑制に関与していることが分かってきた。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、細菌オーファン輸送体が深く関与していることも見出した。

(4)オーファン輸送体阻害剤による細菌生育人工的制御法開発と新規治療法確立の試み

オーファン輸送体は、薬剤耐性化に加えて、細菌の病原性発現にも関与していることが明らかになった。オーファン輸送体を阻害することにより、細菌の病原性および薬剤耐性化が軽減される可能性がある。サルモネラと緑膿菌臨床分離株を用いて調べた結果、輸送体阻害剤には、細菌の多剤耐性化を軽減させる効果があることが分かった。これまで効かないとされていた抗菌薬も阻害剤を併用することにより、感染症を治療することが可能になると思われる。すなわち、既存薬を有効に利用することが可能になる。さらに、輸送体阻害剤は単独で、サルモネラの細胞侵入性低下を引き起こし、また、カイコへの致死性を減弱させるといった、細菌病原性を軽減させる効果もあることが分かった。

オーファン輸送体は、細菌の多剤耐性化と病原性発現という2つの重要な現象に関係していることから、感染症を克服するための新薬ターゲットとして期待される。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。
(理由)

病原細菌のオーファン輸送体には宿主環境に適応するための生理機能があり、病原性を理解する上での新たな観点が生まれた。また、金属耐性や抗菌ペプチド耐性における輸送体の役割を明らかにするなど順調に研究成果を得た。さらには、長年謎であった、環境応答におけるオーファン輸送体制御因子を同定し、その制御因子の結晶化に成功するなど計画以上の進展があった。今後オーファン輸送体の機能と制御、阻害剤効果の詳細を明らかにすることで、予定以上の成果が見込まれる。

4. 今後の研究の推進方策

病原性に関与する輸送体基質の同定、制御因子の構造解析、輸送体活性測定の新規デバイス開発に取り組む。オーファン輸送体機能をさらに明らかにすることで、感染現象を理解する上での新たな観点が生まれるものと考えている。輸送体阻害剤が細菌耐性化と病原性に与える影響についても、今後も継続して評価を行い、新しい感染症治療法開発に役立てる。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計22件)

① Nishino K., Yamasaki S., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A. (2010) Effect of NlpE overproduction on multidrug resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** in press. 査読有

② Yamada J., Yamasaki S., Hirakawa H., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A., Nishino K. (2010) Impact of RNA chaperone Hfq on multidrug resistance in *Escherichia coli*. **J. Antimicrob. Chemother.** 65, 853-858. 査読有

③ Nishino K., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A. (2009) H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing *acrEF* multidrug efflux genes. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53, 3541-3543. 査読有

④ Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A. (2009) Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1794, 834-843. 査読有

⑤ Nikaido E., Yamaguchi A., Nishino K. (2008) AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. **J. Biol. Chem.** 283, 24245-24253. 査読有

⑥ Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A. (2007) Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica*. **J. Bacteriol.** 189,9066-9075. 査読有, 他16件
[学会発表] (計88件、内招待講演20件)

① Nishino K. Physiological functions of multi-drug efflux systems in *S. enterica*. The Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems (Texas, USA・2009年3月22日~27日) 他87件

[その他]

ホームページ

<http://web.me.com/kunihikonishino/Site/Welcome.html>

受賞 (計8件)

① 花王研究奨励賞 (2009年6月)

② 上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞 (2008年6月)

③ 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (2008年4月)

④ 日本化学療法学会 西日本支部 支部長賞 (2008年1月) 他4件