

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713004

研究課題名(和文) トランスポーター制御による細菌恒常性維持機構の解明と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Mechanism of bacterial homeostasis mediated by transporters and development of new 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) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸がRamR/Aの制御系を介して、多剤排出システムacrABとtolC遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。多剤排出トランスポーターが、バイオフィルムの形成維持において重要な役割を担っていることを明らかにした。細菌体内で合成された鉄キレーターであるエンテロバクチンを、多剤排出トランスポーターが輸送している事実を突き止めた。メチルグリオキサールの多剤耐性緑膿菌に示す抗菌性や、消毒剤のトリクロ酸耐性における多剤排出トランスポーターの役割について明らかにした。細菌が保持するトランスポーター制御因子による胆汁酸認識機構を構造レベルで明らかにするとともに、トランスポーターの新たな基質を決定した。

研究成果の概要(英文)：We found that the bile-mediated activation of the acrAB and tolC multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of ramA in Salmonella. It was revealed that multidrug efflux pumps contribute to E. coli biofilm maintenance. It was discovered that AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export. We also investigated the effect of methylglyoxal on multidrug-resistant P. aeruginosa, and roles of Salmonella multidrug efflux pumps in decreased susceptibility to triclosan. The structures of the regulator bound with bile acids were also solved, and we performed the phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in Salmonella enterica serovar Typhimurium.

研究分野：生体分子制御科学研究分野

キーワード：トランスポーター 薬剤耐性 サルモネラ 大腸菌 緑膿菌 遺伝子発現制御 バイオフィルム 構造生物

## 1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌は院内感染等でたびたび死者を出し、新聞報道等で問題になっているが、有効な治療薬は存在しない。多剤耐性には複数の耐性機構が関与しているが、その中でも多剤排出トランスポーターは単独で多剤耐性化の原因となるため問題となっている。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かとこの考えに基づき、ゲノム情報を利用した薬剤耐性研究に取り組み、複数の細菌に数多くの多剤排出トランスポーターが存在することを実験的に証明してきた (*Science* 307: 864, 2005; *Mol. Microbiol.* 59:126, 2006)。また、細菌の多剤排出トランスポーターによる抗菌薬認識機構を明らかにするとともに (*Nature* 480 :565, 2011; *Nature* 500:102, 2013)、その発現制御ネットワークの解析を進めてきた (図1)。

一方で、マウスとサルモネラ多剤排出トランスポーター遺伝子欠損株を用いた実験から、トランスポーターは多剤耐性だけでなくマウスに対する致死性に関与していることが分かってきた (*Mol. Microbiol.* 59:126, 2006)。また、これら多剤排出トランスポーターは、通常発現しておらず、細菌間情報伝達物質であるインドールや宿主環境に存在する胆汁酸等により発現誘導が起こることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 283:24245, 2008; *Gut Pathog.* 4:5, 2012)。多剤排出トランスポーターが抗菌薬ではなく、宿主に存在する環境物質により誘導されることから考えても、これらトランスポーターは多剤耐性のためだけに存在するのではなく、本来は細菌恒常性維持等の生理機能に関与していることが強く示唆される。

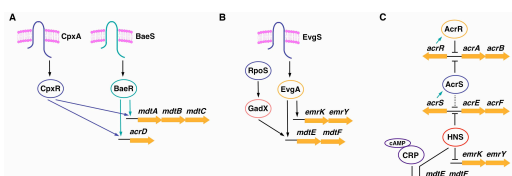


図1. これまでに同定した多剤排出トランスポーター制御ネットワーク. 宿主環境に存在するインドールや胆汁酸などが、これら発現制御ネットワークを介して、トランスポーター発現を誘導することが分かってきた。

サルモネラが感染時に定着する腸内には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どのような形で多剤排出トランスポーターの発現を制御して、多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。これまでに、胆汁酸がサルモネラの RamR/RamA という制御ネットワークを介して多剤排出トランスポーター AcrAB の発現を誘導することを明らかにしており、また、最上流に位置する環境感知センサー・レギュレーターである RamR の構造も明らかにした (*Nature Commun.* 4: 2078, 2013)。

## 2. 研究の目的

多剤排出トランスポーターは、細菌において多剤耐性化の原因になることが知られている。これら多剤排出トランスポーター遺伝子は、人類が抗菌薬を使用する前から存在しており、地球上の様々な環境に細菌が適応するために必要な最も基本的な生存戦略因子であると考えられる。しかしながら、多剤排出トランスポーターが細菌にとって生理的のどのような役割を担っているのかは、ほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では宿主環境適応や細菌宿主間相互作用における多剤排出トランスポーターの役割を明らかにする。さらに、トランスポーター阻害剤を用いた細菌恒常性維持機構の破綻により、多剤耐性と病原性の両方を軽減することのできる新たな治療戦略を確立する。

## 3. 研究の方法

AcrABは多剤耐性化に関与しているトランスポーターとされているが、遺伝子欠損株は胆汁酸存在下では生存できず、生理的には腸内で細菌が生育するために必要な環境適応因子であると考えられる。これまでに胆汁酸が細菌の遺伝子発現におよぼす研究は複数のグループから数多くの論文で報告されていたが、何が胆汁酸を感知しているのかは不明であった。これまでに、胆汁酸による AcrAB 誘導には RamR/RamA 制御ネットワークが関係していることが明らかになっている。RamRには基質を認識すると思われるポケットが存在していたが、どのような環境物質が認識されるのかは不明であった。そこで、本計画では、多剤排出トランスポーター制御を行っている RamR による胆汁酸感知機構について解析を行う。また、本計画では RamR と胆汁酸の共結晶構造解析に取り組み、細菌の環境感知センサーによる宿主環境物質の認識分子機構について明らかにする。

細菌が病原性ならびに抗菌薬耐性を発揮するには、決められた場所で適時に必要な因子を発現させることが必要である。そこで、本計画では、宿主環境中におけるトランスポーターの遺伝子発現の変化や生理的役割について解析する。トランスポーター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。病原細菌は、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。本計画では、このような宿主の保有している免疫機構からの回避において、細菌の多剤排出トランスポーターがどのような役割を担っているのかを明らかにする目的で、マクロファージのサイトカイン (TNF- $\alpha$ ) 産生におよぼす影響を調べる。予備的実験の結果、トランスポーター欠損株は野生株に比べTNF- $\alpha$ 産生誘導能が高いことが分かっているが、今後、各 Toll-like receptor欠損マウスからマクロファージを採取して、どのTLRがトランスポーターによるマクロファージ産生抑制に関与していることを明らかにする。

#### 4. 研究成果

宿主環境におけるトランスポーターの役割に注目して解析を進めた結果、胆汁酸が RamR/A の制御ネットワークを介して、多剤排出システムをコードしている *acrAB* と *tolC* 遺伝子の発現を誘導し、サルモネラの耐性化を上昇させることを明らかにした (*J Antimicrob Chemother* 誌にて発表)。また、大腸菌の多剤排出トランスポーターが、薬剤耐性だけでなく、バイオフィルムの形成維持において重要な役割を担っていることを明らかにした (*Int J Antimicrob Agents* 誌にて発表)。また、鉄欠乏時に細菌体内で合成された鉄キレーターであるエンテロバクチンを、外環境から鉄を獲得するために多剤排出トランスポーターが輸送している事実を突き止めた (*PLoS One* 誌にて発表)。また、薬剤耐性の観点から、メチルグリオキサールの多剤耐性緑膿菌に示す抗菌性 (*Front Microbiol* 誌にて発表) や、消毒剤のトリクロ酸耐性におけるサルモネラ多剤排出トランスポーターの役割について明らかにすることができた (*Int J Antimicrob Agents* 誌にて発表)。

また、宿主相互作用における多剤排出トランスポーターの生理的役割を明らかにするため、免疫との関連について調べた。マクロファージからのサイトカイン産生誘導能は、サルモネラ野生株よりもトランスポーター遺伝子欠損株の方が高いことが判明した。また、トランスポーター阻害剤を用いて調べた結果、トランスポーターの機能を阻害すると、マクロファージからのサイトカイン産生量が高くなることが分かり、この産生誘導能の差がどこに起因するのかを調べるために、Myd88 や Toll-like receptor ノックアウトマウスから採取したマクロファージを用いて解析を行った。Myd88 ノックアウトマウスから採取されたマクロファージでは、サルモネラ野生株とトランスポーター遺伝子欠損株

の間でサイトカイン産生誘導能の差が無くなったが、各 Toll-like receptor ノックアウトマウスではその差が無くならなかったことから、産生誘導の差は、複数の Toll-like receptor によって生み出されている可能性が考えられた。そこで、Toll-like receptor の多重欠損株を用いて解析したところ、2つの Toll-like receptor が、サルモネラ野生株とトランスポーター遺伝子欠損株の間で生じる差を認識していることが分かった (論文投稿準備中)。この他にも、細菌が保持するトランスポーター制御因子による胆汁酸認識機構を構造レベルで明らかにし (論文投稿済・審査中)、フェノタイプマイクロアレイを用いて、トランスポーターの新たな基質を決定する (*J Infect Chemother* 誌掲載予定) 等の成果があった。また、細菌の排出トランスポーターの阻害候補化合物を得ることに成功した。これらの研究成果は、新たな耐性菌感染症の治療戦略につながるものが高く期待できる。

#### 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 11 件)

- ① Hayashi K, Fukushima A, Hayashi-Nishino M, Nishino K. Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2014 Apr 17;5:180. doi: 10.3389/fmicb.2014.00180.
- ② Rensch U, Nishino K, Klein G, Kehrenberg C. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Aug;44(2):179-80. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.04.015.
- ③ Horiyama T, Nishino K. AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014 Sep 26;9(9):e108642. doi: 10.1371/journal.pone.0108642.
- ④ Baucheron S, Nishino K, Monchaux I, Canepa S, Maurel MC, Coste F, Roussel A, Cloeckert A, Giraud E. Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Sep;69(9):2400-6. doi: 10.1093/jac/dku140.
- ⑤ 山崎聖司、西野邦彦. 薬剤排出トランスポーターの分子生物学. 化学療法の領域. 2015; 31:433-9.

- ⑥ Yamasaki S, Wang LY, Hirata T, Hayashi-Nishino M, Nishino K. Multidrug efflux pumps contribute to *Escherichia coli* biofilm maintenance. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Apr;45(4):439-41. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.
- ⑦ Lin J, Nishino K, Roberts MC, Tolmasky M, Aminov RI, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2015 Feb 5;6:34. doi: 10.3389/fmicb.2015.00034.
- ⑧ Iino R, Sakakihara S, Matsumoto Y, Nishino K. Single-cell detection and collection of persister bacteria in a directly accessible femtoliter droplet array. *Methods Mol Biol*. 2016;1333:101-9. doi: 10.1007/978-1-4939-2854-5\_9.
- ⑨ Hayashi K, Nakashima R, Sakurai K, Kitagawa K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. AcrB-AcrA fusion proteins that act as multidrug efflux transporters. *J Bacteriol*. 2015 Nov 2;198(2):332-42. doi: 10.1128/JB.00587-15.
- ⑩ Matsumoto Y, Sakakihara S, Grushnikov A, Kikuchi K, Noji H, Yamaguchi A, Iino R, Yagi Y, Nishino K. A microfluidic channel method for rapid drug-susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2016 Feb 12;11(2):e0148797. doi: 10.1371/journal.pone.0148797.
- ⑪ Yamasaki S, Fujioka T, Hayashi K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, Nishino K. Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Infect Chemother*. 2016 May 20. pii: S1341-321X(16)30041-1. doi: 10.1016/j.jiac.2016.03.015. [Epub ahead of print]
- (雑誌論文⑤を除いて、全て査読有)

[学会発表] (計31件)

- ① K. Nishino. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug efflux pumps. ISIR and INRA International Joint Symposium. 2014年07月28日. Nouzilly, France
- ② Y. Matsumoto, S. Sakakihara, R. Iino, A. Yan, K. Nishino. Rapid Detection of ESBL Producing Strains by the New Rapid Susceptibility Testing Method via Microscopy Using a Novel Microfluidic Device. ICAAC2014. 2014年09月05日～2014年09月09日. Washington DC, USA.
- ③ K. Nishino. Regulation and Physiological Function of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演). 2014年09月26日. Sapporo, Japan.

- ④ Y. Matsumoto, S. Sakakihara, R. Iino, A. Yan, A. Yamaguchi, K. Nishino. Rapid Detection of ESBL in Enterobacteriaceae -Application of the New Rapid Drug-Susceptibility Testing Method via Microscopy Using a Novel Microfluidic Device-. The 18th SANKEN International Symposium / The 3rd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project. 2014年12月10日～2014年12月11日. Osaka, Japan.
- ⑤ 西野邦彦. 細菌の膜輸送体. いちよう祭 大阪大学産業科学研究所一般公開. 2014年05月02日～2014年05月03日. 大阪
- ⑥ S. Yamasaki, E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, D. Fujiwara, I. Fujii and K. Nishino. 膜輸送体制御因子による抗菌性物質認識機構の解明. 附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創成戦略プロジェクト平成25年度成果報告会. 2014年05月30日. 大阪.
- ⑦ 松本佳巳、西野邦彦 (非会員共同研究者: 榊原昇一、飯野亮太、野地博行、山口明人、Aixin Yan). 顕微鏡を用いた簡易迅速MIC測定法による緑膿菌の評価. 第62回日本化学療法学会総会. 2014年06月18日～2014年06月20日. 福岡.
- ⑧ 住本千明、酒寄夏希、西野邦彦、山田作夫、賀来満夫、山岸純一. *Acinetobacter baumannii*のレボフロキサシン高度耐性獲得機構. 第62回日本化学療法学会総会. 2014年06月18日～2014年06月20日. 福岡.
- ⑨ 山岸純一、徳永亮、川井真好、西野邦彦、山田作夫、賀来満夫. 無核細胞検出系を用いた生薬由来DNAジャイレース阻害化合物の探索. 第62回日本化学療法学会総会. 2014年06月18日～2014年06月20日. 福岡
- ⑩ 林克彦、中島良介、山崎聖司、櫻井啓介、北川公恵、西野邦彦、山口明人. 大腸菌多剤排出トランスポーター AcrAB の機能複合体の構成比. 第14回日本蛋白質科学会年会. 2014年06月25日～2014年06月27日. 横浜.
- ⑪ 松本佳巳、西野邦彦 (非会員共同研究者: 榊原昇一、飯野亮太、Aixin Yan). 顕微鏡を用いた簡易迅速感受性測定法によるESBL産生菌の検出法. 第62回日本化学療法学会西日本支部総会. 2014年10月31日～2014年11月01日. 岡山.
- ⑫ 松本佳巳、榊原昇一、飯野亮太、野地博行、Aixin Yan、山口明人、西野邦彦. マイクロデバイスと顕微鏡を用いた簡易迅速感受性測定法を用いたESBL測定法. 第43回薬剤耐性菌研究会. 2014年10月31日～2014年11月01日. 加賀.

⑬ 山崎聖司、林克彦、福島愛子、西野美都子、松本佳巳、西野邦彦。膜輸送体のシステムバイオロジー。附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創成戦略プロジェクト医療材料・デバイス・システムグループG3分科会。2014年11月21日～2014年11月22日。福岡。

⑭ 西野邦彦、Aixin Yan、林克彦、山崎聖司、福島愛子、松本佳巳、西野美都子、Danny KC Fung, Ma Yongzheng, Sun Jingjing, Gao Xiang, Kai Yong, Deng Ziqing。トランスポーター制御による細菌恒常性維持機構の解明と新規治療戦略の開発。大阪大学国際共同研究促進プログラム報告会。2014年12月09日。大阪。

⑮ 西野邦彦。トランスポーターの薬剤認識機構と制御。第5回「産と学をつなぐ SENRI の会 (招待講演)」。2015年01月22日。大阪。

⑯ 松本佳巳 (非会員共同研究者: 榊原昇一、西野邦彦、飯野亮太、野地博行、山口明人)。新しいマイクロデバイスと顕微鏡を用いた迅速ESBL検出法。臨床微生物学会。2015年01月31日～2015年02月01日。東京。

⑰ 西野邦彦。グラム陰性菌の異物認識と排出機構。第49回緑膿菌感染症研究会 (招待講演)。2015年02月06日。東京。

⑱ 山崎聖司、西野美都子、西野邦彦。サルモネラ薬剤自然抵抗性における薬剤排出ポンプとLPSの関係。第88回日本細菌学会総会。2015年03月26日～2015年03月28日。岐阜。

⑲ 松本佳巳、山口明人、西野邦彦。新しいマイクロデバイスと顕微鏡を用いる迅速感受性測定法による腸内細菌科のESBL産生株の検出。第88回日本細菌学会総会。2015年03月26日～2015年03月28日。岐阜。

⑳ 西野邦彦。細菌の抗菌薬排出機構と阻害剤の開発。第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (招待講演)。2015年10月23日。ロイトン札幌。

㉑ 西野邦彦。細菌の多剤排出機構と新規治療戦略。大阪薬科大学 公開シンポジウム (招待講演)。2015年12月05日。大阪薬科大学。

㉒ 西野邦彦。細菌異物排出トランスポーターの機能を探る。第10回日本ゲノム微生物学会年会 (招待講演)。2016年03月05日。東京工業大学。

㉓ 西野邦彦。排出系膜輸送体の機能と制御—生命活動維持における捨てることの重要性—。2015年度 産業科学研究所 講演会。2015年05月21日。大阪大学、大阪。

㉔ Suguru Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Sylvie Baucheron, Etienne Giraud, Benoit Doublet, Axel Cloeckaert, and Kunihiko

Nishino. Crystal structure of multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids. ARAE2015 (国際学会)。2015年06月29日～2015年07月01日。Vinci

International Convention Centre, France.

㉕ 西野邦彦。複雑系生命の統合理解を目指して。大阪大学 産業科学研究所 第71回学術講演会。2015年11月24日。大阪大学、大阪。

㉖ 山崎優、中島良介、櫻井啓介、Sylvie Baucheron、Etienne Giraud、Benoit Doublet、Axel Cloeckaert、西野邦彦。胆汁酸によるサルモネラ異物排出システムAcrAB-TolCの発現制御機構の解明。第68回日本細菌学会関西支部総会。2015年11月28日。京都薬科大学。

㉗ Hayashi-Nishino, Mitsuko; Hayashi, Katsuhiko; Fujioka, Takuma; Takeuchi, Yuna; Yamasaki, Seiji; Yan, Aixin; Nishino, Kunihiko. Xenobiotic recognition and efflux control by bacterial cells. Pacificchem 2015 (国際学会)。2015年12月16日。Hawaii, USA.

㉘ Kunihiko Nishino. Regulation and Function of Multidrug Exporters. Mini-Symposium, on Synthetic Biology. 2016年01月26日。Osaka University, Osaka, Japan

㉙ Kunihiko Nishino. Regulation of bacterial multidrug exporters. JSPS-DAAD Joint Seminar at University of Veterinary Medicine Hannover. 2016年02月23日～2016年02月24日。Hannover, Germany.

㉚ 山崎聖司、松本佳巳、林克彦、櫻井啓介、中島良介、西野美都子、西野邦彦。細菌の排出系膜輸送体。2015アライアンスG3分科会。2015年11月12日～2015年11月13日。大阪大学。

㉛ 山崎優、中島良介、櫻井啓介、Sylvie Baucheron、Etienne Giraud、Benoit Doublet、Axel Cloeckaert、西野邦彦。サルモネラ多剤排出システムAcrAB-TolCの発現制御因子による胆汁酸認識機構。第89回日本細菌学会総会。2016年03月23日～2016年03月24日。大阪国際交流センター。

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 細菌の有害性低減物質のスクリーニング方法

発明者: 西野邦彦、山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、藤岡拓真

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号：028653

出願年月日：2016年2月18日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

・大阪大学産業科学研究所第3研究部門（生体・分子科学系）生体分子制御科学研究分野（西野研）

[http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi\\_06/](http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/organization/thi/thi_06/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野 邦彦 (NISHINO KUNIHICO)  
大阪大学・産業科学研究所・教授  
研究者番号：30432438

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし