

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16318

研究課題名（和文）早期検出の実現に向けた細菌が放出する生理活性化合物の解析

研究課題名（英文）Analysis of bioactive compounds released by bacteria for early detection

研究代表者

山崎 聖司（Yamasaki, Seiji）

大阪大学・高等共創研究院・准教授

研究者番号：70757301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によって、細胞サイズとイオン漏出量を反映した特定の形状の電流シグナルが、マイクロポアを用いたブリッジ回路内の電位差により発生することを発見し、機械学習を用いたシグナル形状の分類により3種の細菌種を同定することに成功した。また、抗生物質や生理活性化合物等を菌体外に排出する機能を持つ細菌薬剤排出ポンプに関して、薬剤耐性緑膿菌に存在する共通の変異を複数発見し、迅速な耐性菌判定手法の開発に繋がる成果として、論文を投稿することができた。さらに、機械学習を用いた培養液から発生する臭気の解析・分類により、細菌種を同定することに成功した。現在菌種をふやして、実用化に向けたさらなる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期に菌種の同定および耐性菌の検出ができれば、不要な抗菌薬投与を減らすことができ、細菌感染症による死亡者数を減らせるだけでなく、新たな耐性菌出現の抑制、医療費の削減にも大きく貢献することができる。研究期間全体を通じて、当目的の達成に寄与する新デバイスの開発に向けた技術基盤を構築することができた。

研究成果の概要（英文）：This research found that current signals with specific shapes reflecting cell size and ion leakage were generated by potential differences in a micropore-based bridge circuit and identified three bacterial species by classifying signal shapes using machine learning. In addition, we discovered several common mutations in the bacterial drug efflux pump, which is responsible for the efflux of antibiotics and bioactive compounds from bacteria, present in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. We were able to submit the paper as an achievement that will lead to the development of a rapid method for determining bacterial resistance. Furthermore, by analyzing and classifying the gases generated from the culture medium using machine learning, we succeeded in identifying bacterial species. The number of bacterial species is currently increasing and further analysis is underway for practical use.

研究分野：細菌学

キーワード：耐性菌 感染症 排出ポンプ 細菌 抗生物質 抗菌薬 薬剤耐性 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

治療困難な耐性菌への対応は、世界保健総会（WHA）で各国が国家行動計画策定を求められる等、国を挙げて取り組まなければならない大きな問題となっている。耐性菌を出現させないためには、抗菌薬の適正使用が最も重要であり、速やかに原因菌とその薬剤耐性能に適した薬を用いた治療を行うことが求められているが、既存の一般的な検査法は所要時間が問題となるケースが多い。

そこで、世界中の医療従事者が直面している薬剤耐性菌感染症の克服に向け、分野横断的で組織的な共同研究によって、医療応用に向けたナノデバイス解析技術の開発を進めてきた。

これまでに、ナノデバイス開発に向けた細菌由来放出化合物測定法の構築(図1)が完了し、ヒトの健康指標となり得る便成分インドールの産生菌を、簡便に分析可能な培養液の臭気から見分けることに成功し論文を発表した (*Frontiers in Microbiology* 11, 581571, 2020: 研究代表者論文)。

本研究では、ナノデバイスを用いた即日での菌種同定と耐性菌検出を可能にする、細菌性状の迅速分析技術の基盤を構築する。

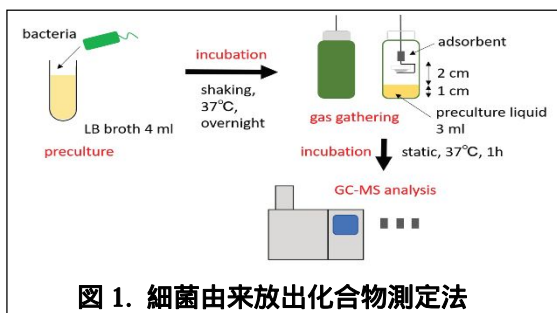


図1. 細菌由来放出化合物測定法

2. 研究の目的

本研究により、他分野でも応用可能な解析・検査技術群の開発・高度化を行うことで、医療応用のための技術的アプローチの多様化に大きく貢献できると確信している。また本研究では、すでに各病院で検査の簡便さやコストの面で評価されている、耐性菌検出用ナノデバイス Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM) を改良する計画であり、細菌関連疾患の検出法の開発に成功した場合、早期に普及させることができる。

細菌の生理活性化合物をバイオマーカーとした診断技術が開発できれば、当化合物が原因の疾患(生活習慣病・がん等)や、食中毒発生時の高リスク群に対する先制介入治療が可能となり、革新的な予防法の開発につながる。全く新たな治療法の創出となるため、医療分野に大きなインパクトを与えることは間違いない。

3. 研究の方法

すでに抗菌薬を用いた実験により、超高感度多種因子同時分析に成功しているため、新たな生理基質同定技術が開発できないという問題はない。実際に当手法によって、細菌の薬剤排出ポンプの基質である抗菌薬を測定した場合、ポンプ発現株では時間が経っても培養上清中の抗菌薬濃度に変化がない一方、欠損株では同濃度が時間依存的に減少する(菌体内に抗菌薬が蓄積することを確認している(図2)(*Nature* 500, 102-6, 2013: 研究代表者論文)。

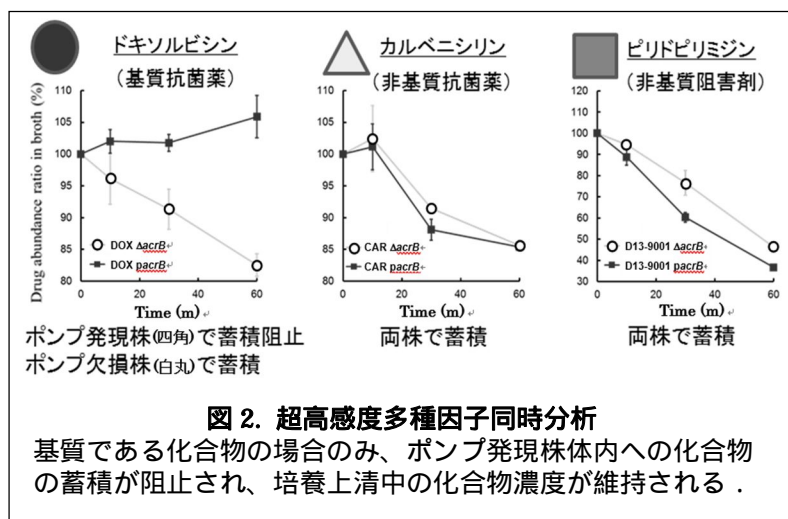


図2. 超高感度多種因子同時分析

基質である化合物の場合のみ、ポンプ発現株体内への化合物の蓄積が阻止され、培養上清中の化合物濃度が維持される。

以上より、当手法によって得られた結果が、薬剤感受性試験を用いた従来の基質同定法の結果と完全に一致することをすでに証明しており、本研究で用いる生理活性化合物の分析にもすぐに応用可能である。

排出ポンプの生理基質があまり見つからない場合は、基質候補化合物を、異種菌株間情報伝達として近年注目されている、他菌種が生産・排出する生理活性化合物にまで範囲を広げ、排出ポンプ生理基質を幅広く探索する。

また、これまでに耐性菌検出用に開発したナノデバイスは、実際に各病院で使用してもらう段階まで来ている。当デバイスは、約 4cm 四方の小さなガラス上に、樹脂と高精度レーザーを用いて臨床サンプルを流す流路を作成し、流路の両端を除いて密封したものである。流路には耐性菌の指標となる各抗菌薬を封入しており、臨床サンプルを流して細菌の形態・菌数変化を USB カメラで観察することで、耐性菌を迅速・簡便に検出できる。

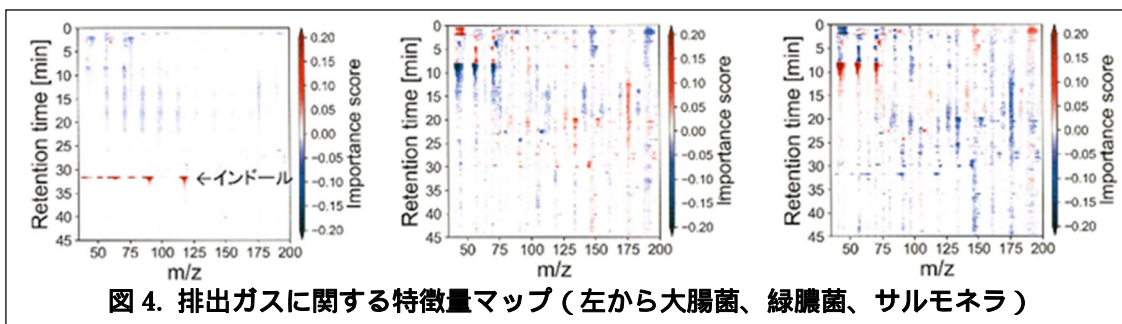
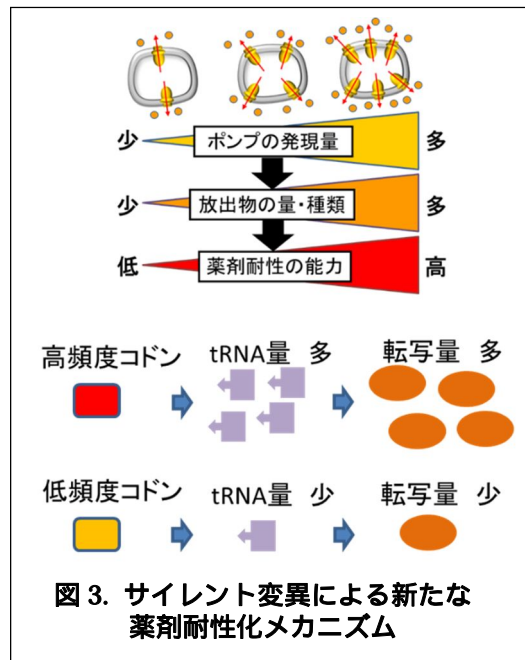
本研究では、抗菌薬の代わりに、疾患関連因子を検出する試薬を封入する等の改良を想定し、各疾患の発症リスク検出用のナノデバイス開発に向けた基盤構築を進める。

4. 研究成果

本研究によって、細胞サイズとイオン漏出量を反映した特定の形状の電流シグナルが、マイクロポアを用いたブリッジ回路内の電位差により発生することを発見し、機械学習を用いたシグナル形状の分類により 3 種の細菌種を同定することに成功した。現在、論文の投稿作業中である。

また、抗生物質や生理活性化合物等を菌体外に排出する機能を持つ細菌薬剤排出ポンプに関して、薬剤耐性緑膿菌に存在する共通の変異を複数発見し、迅速な耐性菌判定手法の開発に繋がる成果として、論文を投稿することができた(図3)。修正対応に必要な遺伝子組み換え菌株も多数構築し、現在はこれらの菌株を活用した各変異の詳細な意義について解析を進めている。別のタンパク質においても、同様の傾向がみられることが明らかになりつつあり、今後も解析を継続する。

さらに、機械学習を用いた培養液から発生する臭気の解析・分類により、インドールの検出量が多い大腸菌に加え、緑膿菌・サルモネラにおいても、菌種同定に活用できる可能性のある臭気成分の差異が存在することが明らかとなった(図4)。臨床分離株、耐性菌株等を使用したさらなる実験を行い、抗菌薬の適正使用につながる迅速検査法の開発に大きく貢献したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Seiji Yamasaki, Martijn Zwama, Naoki Koga, Keisuke Sakurai, Ryosuke Nakashima, Akihito Yamaguchi, Kunihiro Nishino	4. 巻 5
2. 論文標題 Inhibitor binding pits analysis of bacterial multidrug efflux transporters for new drug development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 56-60
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 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 Yamasaki Seiji, Koga Naoki, Zwama Martijn, Sakurai Keisuke, Nakashima Ryosuke, Yamaguchi Akihito, Nishino Kunihiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Spatial Characteristics of the Efflux Pump MexB Determine Inhibitor Binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e0067222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aac.00672-22	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 Yamasaki Seiji, Yoneda Tomohiro, Ikawa Sota, Hayashi-Nishino Mitsuko, Nishino Kunihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Investigating multidrug efflux pumps associated with fatty acid salt resistance in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 954304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.954304	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 Ikawa Sota, Yamasaki Seiji, Morita Yuji, Nishino Kunihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of the drug efflux pump in the intrinsic cefiderocol resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.05.31.494263	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 Fujiwara Masasuke, Yamasaki Seiji, Morita Yuji, Nishino Kunihiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB- or MexXY-OprM in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> using nucleic acid dyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 595-601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.01.003	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 Yoneda Tomohiro, Sakata Hiroki, Yamasaki Seiji, Hayashi-Nishino Mitsuko, Nishino Kunihiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Analysis of multidrug efflux transporters in resistance to fatty acid salts reveals a TolC-independent function of EmrAB in <i>Salmonella enterica</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0266806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0266806	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 Liu Zuoyue, Okada Yuta, Ichinose Yuma, Saitoh Daisuke, Ieda Naoya, Yamasaki Seiji, Nishino Kunihiko, Nakagawa Hidehiko, Fujitsuka Mamoru, Osakada Yasuko	4. 巻 6
2. 論文標題 Vanadyl Naphthalocyanine-Doped Polymer Dots for Near-Infrared Light-Induced Nitric Oxide Release and Bactericidal Effects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1487-1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.2c05566	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 Seiji Yamasaki, Martijn Zwama, Tomohiro Yoneda, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino	4. 巻 169
2. 論文標題 Drug resistance and physiological roles of RND multidrug efflux pumps in <i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> , and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 1322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.001322	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 Nishino Kunihiko, Yamasaki Seiji, Nakashima Ryosuke, Zwama Martijn, Hayashi-Nishino Mitsuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 737288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.737288	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 Fujiwara Masasuke, Yamasaki Seiji, Morita Yuji, Nishino Kunihiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB- or MexXY-OprM in Pseudomonas aeruginosa using nucleic acid dyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 595-601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.01.003	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15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ryo Tanida, Sohei Nakano, Seiji Yamasaki, Atsushi Taguchi, and Kunihiko Nishino
2. 発表標題 Global analysis of genes regulated by Rof in Salmonella enterica serovar Typhimurium
3. 学会等名 The 26th SANKEN International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Takayoshi Suzuki, and Kunihiko Nishino
2. 発表標題 Development of Universal Inhibitors of Drug Efflux Pumps to Overcome Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Infections
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三澤隆史、平野元春、倉島恵愛、山崎聖司、西野邦彦、出水庸介
2. 発表標題 多剤耐性菌感染症治療を目的とした両親媒性ヘリカルペプチドの開発
3. 学会等名 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎聖司
2. 発表標題 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-
3. 学会等名 産研学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎聖司
2. 発表標題 細菌共存学の発展 -病原性に寄与する薬剤排出ポンプの阻害剤開発に向けて-
3. 学会等名 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井川創太、山崎聖司、森田雄二、西野邦彦
2. 発表標題 新規抗菌薬セフィデロコル自然抵抗性における緑膿菌薬剤排出ポンプの役割解明
3. 学会等名 第33回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎聖司
2. 発表標題 新規制御手法の開発による細菌とのより良い共存関係の構築
3. 学会等名 第4回C01 学術交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西野邦彦、山崎聖司、熊ノ郷淳
2. 発表標題 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
3. 学会等名 イノベーションジャパン2021 (JSTフェア)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 氏本勝也、向井琢雄、山崎聖司、西野邦彦
2. 発表標題 イオン移動度分光の腸内環境センシングへの応用
3. 学会等名 イノベーションジャパン2021 (JSTフェア)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野草平、山崎聖司、田口厚志、西野邦彦
2. 発表標題 MacABの発現はRho依存型ターミネーターを介して、Rofによって調整されている
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野草平、山崎聖司、田口厚志、西野邦彦
2. 発表標題 MacABの発現はRho依存型ターミネーターを介して、Rofによって調整されている
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎聖司
2. 発表標題 大阪大学拠点における若手活動の振り返り
3. 学会等名 プレ第6回C012021 会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Martijn Zwama, Ryosuke Nakashima, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino
2. 発表標題 The increasingly pressing role of RND-type efflux pumps in multidrug resistant pathogens
3. 学会等名 10th imec Handai International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎聖司
2. 発表標題 細菌活動のコントロールによる新たな共存関係の構築
3. 学会等名 第3回ファーマラボEXPO（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎聖司
2. 発表標題 細菌とのより良い共存関係の構築
3. 学会等名 第10回大阪大学COIシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関