

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Promoting Development of Innovative Drugs against
Emerging and Reemerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 細菌多剤排出ポンプ阻害剤開発に関する研究
(英語) Research on the Development of Inhibitors of Bacterial Multidrug
Efflux Pumps

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学産業科学研究所 教授 西野邦彦

所属 役職 氏名：(英語) Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University,
Professor, Kunihiko Nishino

実施期間：平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

多剤排出ポンプは複数の抗菌薬を菌体外に排出することにより、細菌を多剤耐性化させる。これまでに、ポストゲノム解析の結果、細菌に存在する数多くの多剤排出ポンプが同定されてきた。多剤排出系を標的とする薬剤は、多剤耐性を克服することのできる、全く新しい可能性を秘める創薬のターゲットとしても注目される。そこで、本計画では、これまでに同定されたサルモネラ、大腸菌、緑膿菌の排出ポンプの阻害候補化合物について、化合物ライブラリを用いたランダムスクリーニングを行う。さらには、サルモネラ、大腸菌、緑膿菌の各排出ポンプに対する阻害剤を得て、既存抗菌薬と阻害剤を併用した時の臨床分離株に対する効果を明らかにする。多剤排出ポンプを阻害することにより、抗菌薬との併用で、多剤耐性能を軽減して治療する既存の抗菌薬を有効利用する感染症治療につなげることを研究の目的としている。

今年度は、サルモネラに存在する 10 個の排出ポンプ (AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, MdsABC, MdfA, EmrAB, SmvA, MdtK, MacAB) の内、マウスに対する致死性に関係していることが分かっている薬剤排出ポンプ遺伝子 *macAB* をクローニングし、発現株を構築した。発現株に対する各種抗菌薬の最小発育阻止濃度を測定し、MacAB を発現させることで最も耐性が上昇したエリスロマイシンを、阻害剤をスクリーニングする時の相乗効果を検証する抗菌薬として選定した。大阪大学の化合物ライブラリと MacAB 発現株を用いて、本排出ポンプの阻害候補化合物を 2 種選定した。この内、1 種は MacAB 阻害効果に加えて、単独での抗菌活性を保持していた。もう 1 種の阻害候補化合物は、単独では抗菌活性を示さず、エリスロマイシンと併用することで、本抗菌薬に対する MacAB 発現株の感受性を高める効果が確認された。本候補化合物について、さらに、MacAB に対

する阻害効果について調べるため、エリスロマイシンに加えて、クラリスロマイシン、オレアンドマイシン、アジスロマイシンとの相乗効果について検証した結果、候補化合物は、これら 14 員環と 15 員環マクロライドの組み合わせで相乗効果を示すことが分かった。

また、大腸菌の薬剤排出ポンプ阻害剤スクリーニングのために、AcrAB, MdtABC, AcrD, AcrEF, MdtEF の発現株を構築し、発現株に対する各種薬の最小発育阻止濃度を測定した。いずれの発現株も、発現時にオキサシリンに耐性（各、>256 倍、8 倍、32 倍、128 倍、32 倍）を示すことから、阻害候補化合物との相乗作用について検証する第一選択薬として、オキサシリンを選定した。

さらに、多剤耐性緑膿菌において高発現している薬剤排出ポンプ MexAB と MexXY の発現株を構築し、両排出ポンプが認識する抗菌薬との相乗効果を確かめる形で、大阪大学化合物ライブラリを用いた阻害候補化合物のスクリーニングを行った。MexAB と MexXY 各々に対して阻害効果を保持している化合物を選定し、また、両ポンプを同時に阻害する候補化合物の探索を行った。また、阻害候補化合物の中から、単独で抗菌活性を有するもの、抗菌活性が無いものを判別し、各候補化合物の膜傷害性の有無や、細菌の薬剤排出活性に与える影響について調べた。

Multidrug efflux pumps contribute to bacterial multidrug resistance by exporting multiple antimicrobial agents from inside to outside of the cells. As a result of post genomic analysis, it was revealed that bacteria possess a number of multidrug efflux pumps. Multidrug efflux systems are an attractive target of new drugs that enable to overcome the problem of bacterial multidrug resistance. In this project, random screening using compound libraries was performed to select candidates of inhibitors of efflux pumps in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Furthermore, we clarify the effect of inhibitors on drug susceptibilities of clinical isolates by using the combination of antibacterial drugs and inhibitors. The purpose of the study is the treatment of infectious diseases with multidrug resistant bacteria.

In this fiscal year, among ten identified pumps (AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, MdsABC, MdfA, EmrAB, SmvA, MdtK, MacAB) in *Salmonella*, we constructed the MacAB-expressing strain because it was previously found that MacAB is related with *Salmonella* virulence. The minimum inhibitory concentration of various antimicrobial agents against this strain was measured and the strain exhibited the highest resistance to erythromycin. Thus, we selected erythromycin to verify the synergistic effect at the screening of inhibitors of MacAB. Two candidates were selected among Osaka University chemical library. Of these, one compound showed the antibacterial activity by itself, in addition to the MacAB inhibitory effect. Another compound did not show antibacterial activity, and when it was used in combination with erythromycin, the synergetic effect against the MacAB-expressing strain was confirmed. As a result of verifying the synergistic effect with clarithromycin, oleandomycin, and azithromycin, the candidate compound showed synergistic effect with a 14- and 15-membered ring macrolide.

For the screening of *E. coli* drug efflux pump inhibitors, strains expressing AcrAB, MdtABC, AcrD, AcrEF and MdtEF were constructed and the minimum inhibitory concentrations of various drugs against the strains were measured. The strains shows resistance to oxacillin by expressing these pumps (> 256 fold, 8 fold, 32 fold, 128 fold, 32 fold-increase, respectively), it is considered that oxacillin is a first choice drug to verify the synergistic action with the inhibitor candidates.

In addition, we constructed expression strains of drug excretion pumps MexAB and MexXY, which are

highly expressed in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. And we investigated the synergistic effect with antibiotics recognized by both efflux pumps by using Osaka University compound library for the screening. We select compounds that retain inhibitory effects on MexAB and MexXY, respectively, and also searched candidate compounds that inhibit both pumps simultaneously. In addition, among the candidate compounds, we selected the compounds having antibacterial activity by themselves, and the compounds having no antibacterial activity. We also tested the influence of each compound on the membrane damage and the effect on the bacterial drug efflux activity.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌3件、国際誌5件）

1. Yamasaki, S., T. Fujioka, K. Hayashi, S. Yamasaki, M. Hayashi-Nishino, and K. Nishino. (2016) Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Infect. Chemother.* 22(11), 780-784.
2. Nishino, K. (2016) Antimicrobial drug efflux pumps in *Salmonella*. In *Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications*, Chapter 10. Edited by Xian-Zhi Li, Christopher A. Elkins and Helen I. Zgurskaya (Springer) 261-279.
3. Morita, Y., K. Nakashima, K. Nishino, J. Tomida, M. Inoue, and Y. Kawamura. (2016) Berberine is a novel type efflux inhibitor which attenuates the MexXY-mediated aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 7, 1223.
4. 西野邦彦. (2017) 薬剤耐性における薬剤排出ポンプの役割 (Role of drug efflux pumps in bacterial drug resistance). 化学療法の領域 (*Antibiotics & Chemotherapy*) 33(5), in press. 2017年5月号（第33巻 第5号）（2017年4月25日発行）
5. 森田雄二、西野邦彦. (2017) 若手が拓く微生物薬学：多剤耐性菌と闘う (Frontier of pharmaceutical microbiology: To combat-resistant bacterial pathogens). 薬学雑誌 (*Yakugaku Zasshi*), 137, 371-372.
6. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦. (2017) 耐性菌感染症の克服に向けた薬剤排出ポンプの構造解析と新規治療薬開発 (Structural analysis and new drug development against multidrug efflux pumps). 薬学雑誌 (*Yakugaku Zasshi*), 137, 377-382.
7. Nishino, K. (2017) Regulation of the expression of bacterial multidrug exporters by two-component signal transduction systems. *Methods Mol. Biol.* in press.
8. Iino, R., S. Sakakihara, Y. Matsumoto, and K. Nishino. (2017) Large scale femtoliter droplet array for single cell efflux assay of bacteria. *Methods Mol. Biol.* in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Kunihiko Nishino. Function and regulation of bacterial multidrug efflux pumps. Symposium on Combatting Antimicrobial Resistance. University of Hong Kong, April 13, 2016. 口頭、国外.
2. Suguru Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Sylvie Baucheron, Etienne Giraud, Benoît Doublet, Axel Cloeckert and Kunihiko Nishino. Crystal Structure of the Multidrug Resistance Regulator

- RamR Complexed with Bile Acids. International Symposium Salmonella and Salmonellosis. 2016/6/6-8. Saint-Malo, France. ポスター、国外.
3. Mitsuko Hayashi-Nishino, Yoshimi Matsumoto and Kunihiko Nishino. Development of Novel Therapeutic Strategies to Tackle Multidrug-Resistant Pathogens. International Symposium Salmonella and Salmonellosis. 2016/6/6-8. Saint-Malo, France. ポスター、国外.
 4. Kunihiko Nishino. Regulation and Function of Bacterial Multidrug Efflux Systems. Seminar at INRA, Tours, France. 2016/6/10. 口頭、国外.
 5. Kunihiko Nishino. Regulation and Function of Bacterial Multidrug Efflux Systems. Seminar at Tohoku University, Sendai, Japan. 2016/7/19. 口頭、国内.
 6. Yuna Takeuchi, Mitsuko Hayashi-Nishino, Chikara Furusawa, Kunihiko Nishino. Morphological Analysis of Enoxacin-resistant Escherichia coli. The 20th SANKEN International Symposium. Osaka, Japan. 2016/12/13. 口頭、国内.
 7. Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Katsuhiko Hayashi, Yuta Inoue, Yusuke Higuchi, Nobuo Kato, Akihito Yamaguchi, Kunihiko Nishino. Structural analysis and new inhibitor development against multidrug efflux pumps. 第 16 回日本蛋白質科学会年会. 福岡国際会議場. 2016/6/7-9. ポスター、国内.
 8. 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. 神戸国際会議場. 2016/6/9-11. 口頭、国内.
 9. 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. 安芸グランドホテル. 2016/10/21-22. 口頭、国内.
 10. 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 64 回日本化学療法学会西日本支部総会. 沖縄コンベンションセンター. 2016/11/24-26. 口頭、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 西野邦彦. 細菌の機能を制御する新手法の開発. 産研ざっくばらんトーク. 梅田富国生命ビル. 2016/4/28, 国内.
2. 西野邦彦. 病気と健康と細菌. 産研テクノサロン. 梅田富国生命ビル. 2016/5/13, 国内.
3. 西野邦彦. 日経メディカル 10月号 (日経 BP 社) 特集 薬剤耐性クライシス, 国内.
4. 西野邦彦. 論文がきっかけで拓けた、研究者への道 incu・be [インキュビー] 2016. 冬号 vol. 35, 国内.
5. 松本佳巳、西野邦彦. おはよう関西 「緑のう菌の耐性 短時間で判定の検査器具を開発」, NHK 関西, 国内. (他、日刊工業新聞、Jiji.com、毎日新聞等) (産研定例記者会見)

(4) 特許出願

出願なし