

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「異物排出輸送の構造的基盤解明と阻
害剤の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：山口 明人
(大阪大学産業科学研究所、特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

薬剤耐性菌(AMR)問題は世界的に大きくクローズアップされてきており、AMR に関するグローバルアクションプランが作成されるに至っている。なかでも、多剤耐性腸内細菌(CRE)や多剤耐性緑膿菌(MDRP)などのグラム陰性多剤耐性菌には、臨床的に有効な薬剤がないことは大きな問題である。これらグラム陰性多剤耐性の大きな原因は RND 型と呼ばれる外膜チャネルと共役した多剤排出ポンプの高発現である。多剤排出ポンプ阻害剤が多剤耐性菌問題の解決に有効であることは世界的に注目され、ランダムスクリーニングにより阻害剤が報告されているが臨床的に使えるものはなく、大変難しい創薬標的と言える。

私たちのグループは世界に先駆けて多剤排出タンパクの構造決定に成功し、多剤排出機構の概要を解明した(*Nature* 2002, 2006, 2011)。本プロジェクトはその実績の上に立ち、多剤排出機構の詳細解明のためのさらなる構造解明と、構造を元にした多剤排出ポンプ広域阻害剤の創薬を目指して開始した。

本プロジェクト開始早々の成果として、大腸菌多剤排出ポンプ AcrB ならびに緑膿菌多剤排出ポンプ MexB とこれらの狭域阻害剤 ABI-PP との結合構造決定に成功し、SBDD のための基礎を確立した(*Nature* 2013)。次に、ABI-PP を出発物質として、緑膿菌のもう一つの主要排出ポンプで ABI-PP が阻害できない MexY も阻害する広域阻害剤を SBDD によって創薬することを目指した。100 種類以上の有機合成展開の結果、有力な広域阻害剤 H31 とその関連化合物を得た。H31 は臨床分離多剤耐性緑膿菌株ライブラリに対しても、既知抗菌薬との併用で抗菌力を復活させる大きな効果のあることが確かめられ、臨床薬開発に向けて大手製薬会社との共同研究体制を確立した。

多剤排出ポンプは、外膜チャネル及びアダプタータンパクとの複合体として機能する。しかし、複合体は極めて不安定である。本プロジェクトでは AcrB-AcrA リンカータンパクを作成し、TolC との間で S-S 架橋により結合を安定化させる部位特異変異導入を行って、複合体の結晶構造解析を試みた。その過程で、英国の研究室よりクライオ電顕を用いた AcrAB-TolC 3 者複合体構造が報告された。結果はそれまで考えられていた AcrA:B:TolC 3:3:3 構造ではなく、6:3:3 構造で、AcrB と TolC の中間に AcrA による tube 構造があるというものだった。これは、これまでの多くの研究室から出された分子生物学的知見とは整合性がない。私たちは AcrA-AcrB 1:1 リンカータンパクが活性を持つことを見だし、cryo 電顕による構造に疑義を投じた(*J. Bacteriol.* 2015)。TolC とリンカータンパクの複合体を得るのに大変手間取ったが、ようやく電顕像で 3 者複合体が観察される段階に至り、報告書作成には間に合わなかったが、研究終了までには 3 者複合体結晶を作成して構造決定するべく全力を尽くす。

多剤排出ポンプの基質結合構造決定は大変難しいが、本プロジェクト開始後、大分子量化合物 LMNG との結合構造を決定した。予想に反し、これまで小分子量基質の結合領域と推定していた遠位結合ポケットに結合していた。多剤認識の分子メカニズムの全貌が徐々に解明されつつある。また、多剤認識に寄与するものとして私たちは複数の基質輸送チャネルの存在を指摘していたが、本プロジェクトではじめて、それぞれのチャネルの使い分けに関する証拠を発見した。薬剤の排出はプロトン輸送と共役した能動輸送で、両者の輸送部位は約 50 Å 離れた遠隔共役である。そのコンホメーション共役の途中に、 α ヘリックスとランダムコイルを交互変換することで長さを変え、サブドメインの相対運動を可能にする蝶番の存在とその柔軟性を明らかにした(*Frontiers in Microbiology* 2017)。多剤を認識する上で 2 つのマルチサイト結合ポケットと 3 つのエントランス・パスを持つことが大きく貢献している。しかし、これまで複数のエントランスがどのように使い分けられているかについては全く知見がなかった。私たちは初めて、特定のエントランスを通る薬剤とその透過機構を明らかにした(*Nature Communications* 2018)。

タンパク質動態解析により、AcrB と TolC の水平方向の運動性を解析した。TolC は膜に固定されており、AcrB は水平方向に拡散運動していた。TolC 欠損株では AcrB の運動が速くなることから、両者は結合解離を繰り返していることがわかる。予想と違っていたのは、低分子量の基質および阻害剤を加えても AcrB の運動性に変化がなかった。基質を結合して初めて複合体形成するという機

構ではないと思われる。この結果は、cryo 電顕研究者からの、基質無しで AcrB3 量体に 3 回対称がある状態でも TolC との複合体が存在するという知見とも一致する。基質の結合は複合体形成には無関係で、TolC チャンネルの開閉にだけ関与しているということになる。

本研究により、鍵と鍵穴の関係と言われる酵素—基質関係への大きな挑戦としての多剤排出の分子機構解明に向けて前進した。リンカータンパクを用いた 3 者複合体の結晶構造決定に残り 1 年間全力で取り組む。広域阻害剤については、臨床薬開発に向けた共同研究体制を構築することができ、本プログラム終了後も研究続行できる目処が付いた。3 量体が不安定な MexY の構造決定には、MexBYY キメラを用いて残る 1 年間全力で取り組む。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 多剤排出ポンプとその阻害剤の結合構造決定:大腸菌 AcrB 及び緑膿菌 MexB と狭域阻害剤 ABI-PP との結合構造を決定し *Nature* 誌に報告した(2013)。部位特異変異導入と組み合わせ、ABI-PP がもう一つの緑膿菌主要排出タンパク MexY を阻害できない構造的な原因を明らかにした。これは RND 型多剤排出ポンプ阻害剤結合構造として初めてであり、阻害剤の SBDD による創薬を初めて可能にする成果である。

2. 多剤認識・排出機構の解明:2 つのマルチサイト結合ポケットの使い分けは、これまで分子量によるものと考えられてきたが、大分子量基質(LMNG)が遠位ポケットに結合することを示し、分子量ではなく、分子の形に依存することを解明した。3 つのエントランスの使い分けについては、はじめて特定のエントランスのみを使う化合物群を同定し、その特徴と輸送機構を解明した(*Nature Communications* 2018)。また、遠隔コンホメーション共役の途中に、構造変化の伝達を可能にする柔軟なヒンジ構造を発見し、その運動を可視化した(*Frontiers in Microbiology* 2017)。

3. 3者複合体構造決定に向けた AcrAB リンカータンパク構築と TolC との S-S 架橋による複合体安定化: 結晶解析による 3 者複合体構造決定一歩手前まで近づいた。残る 1 年で、結晶構造解析まで全力を挙げて取り組む。この過程で、AcrA-AcrB 1:1 リンカータンパクに排出活性があることが証明され、cryo 電顕で報告された AcrA:AcrB:TolC 構造が果たして活性構造かどうか疑問を提出した。cryo 電顕には画像を選別する段階で一定の恣意性があり、客観的構造かどうかには結晶構造の知見がやはり必要である。

4. AcrAB-TolC3 者複合体のタンパク質動態解析:FDAP 解析により、TolC はペプチドグリカンに固定され、AcrB はこれと解離会合を繰り返しつつ水平拡散運動していることが明らかになった。定説と異なり、複合体形成に基質結合は無関係で、複合体形成されたときに基質が結合していればその時点で TolC チャンネルが開いて基質が排出されるというメカニズムが明らかになった。cryo 電顕で報告されていることと合わせて考えると、基質の結合は複合体形成にではなく、TolC チャンネルの開閉の引き金になると推定される。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 基質結合構造に基づく SBDD と有機合成展開の結果、有力な広域阻害剤 H31 を得、臨床阻害薬創薬に向けた、製薬会社との共同研究体制の確立:狭域阻害薬 ABI-PP の構造を出発点とし、ABI-PP と MexB との結合構造、MexY のホモロジー構造を元に設計展開し、100 種類以上の合成展開の結果、広域阻害剤 H31 を得た(特願 2015-238703)。これを元に製薬会社と臨床薬開発のための共同研究を行っている。多剤排出ポンプ阻害剤だけでなく、広く抗菌薬全体としてもまだ SBDD により創出された臨床薬は無い、先駆的な研究である。

2. MexY 基質結合部位構造決定に向けての前進:これまでに MexY 単独阻害剤は報告されていない。私たちの SBDD でも、MexY 構造が未決定であることが大きな障害であった。本研究で MexY

構造を決定したが、不活性な単量体であり、TolC ドッキングドメインが崩壊していた。このため、ドッキングドメインのみを MexB で置換した活性なキメラ体を構築し、残る1年で MexY 基質結合領域決定に全力を挙げる。これが決まれば、広域阻害剤 SBDD のための大きな武器となる。

3. 多剤排出タンパクの内在的基質及び生理的役割の解明: 細菌細胞間情報伝達物質エンテロバクチンの排出に関係する RND 型排出ポンプを特定。また、バイオフィルム形成にも多剤排出ポンプが関与することを解明した。これらの知見は、RND 型排出ポンプの活性コントロールによって、菌の病原性を低下させたり、新たな感染治療法を創出したり、腸内細菌叢をコントロールすることにもつながる有用な知見と言える。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「構造・排出輸送研究」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
山口 明人	大阪大学産業科学研究所	特任教授	H24.10～
中島 良介	同上	助教	H24.10～H25.3
同上	同上	特任准教授	H25.4～
櫻井 啓介	同上	特任助教	H24.10～H25.3
同上	同上	特任助教	H25.4～H30.3
西野 邦彦	同上	教授	H24.10～
韓 珍珉	同上	技術員	H24.10～H30.3
北川 公恵	同上	技術員	H24.10～H30.3
Martijn Zwama	同上	D1～3	H27.4～H30.3
林 克彦	同上	M1～D3	H24.10～H29.3
同上	同上	CREST 研究員	H29.4～H29.5
中尾 香	同上	B4	H29.4～
山崎 聖司	同上	D1～3	H24.10～H27.3
山崎 優	同上	M2	H24.10～H25.3
五十嵐 綾	同上	技術員	H27.2～H27.4
松本 崇	株式会社リガク	研究員	H24.10～H30.3

研究項目

- ・異物排出輸送の構造的基盤解明と阻害剤の開発

②「有機合成研究」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
加藤 修雄	大阪大学産業科学研究所	教授	H24.10～H29.3
同上	同上	特任教授	H29.4～
樋口 雄介	同上	助教	H25.10～H29.3
同上	同上	同上	H29.4～
新田 孟	同上	助教	H24.10～H27.3
同上	同上	特任研究員	H27.4～H29.3
同上	同上	特任研究員	H29.10～(予定)
井上 雄太	同上	M1～M2	H24.10～H26.3
同上	同上	D1	H26.4～H27.3
同上	同上	D2～D3 学振特別研究員	H27.4～H29.3
福岡 宇紘	同上	技術補佐員	H25.4～H25.7
古澤 秀明	同上	技術員	H25.4～H27.3
阿字地 佳納子	同上	技術補佐員	H29.4～H29.7

研究項目

- ・異物排出タンパクに対する広域阻害剤の分子設計および化学合成

③「タンパク質動態解析」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
松田 知己	大阪大学産業科学研究所	准教授	H24.10～H30.3
永井 健治	同上	教授	H24.10～H30.3
新井 由之	同上	助教	H24.10～H29.7
吉田 邦人	同上	特任研究員	H25.4～H30.3

研究項目

- ・異物排出タンパク質及び排出薬剤の動態解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

- ・大阪大学創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業
- ・東京大学創薬オープンイノベーションセンター
- ・国内製薬企業との共同研究契約の締結(平成 28 年 5 月 25 日)

- ・国際共同研究
 - 香港大学 生物科学学院(多剤耐性緑膿菌分離株、大腸菌分離株の解析)
 - フランス国立農学研究所(サルモネラ薬剤耐性株の解析)

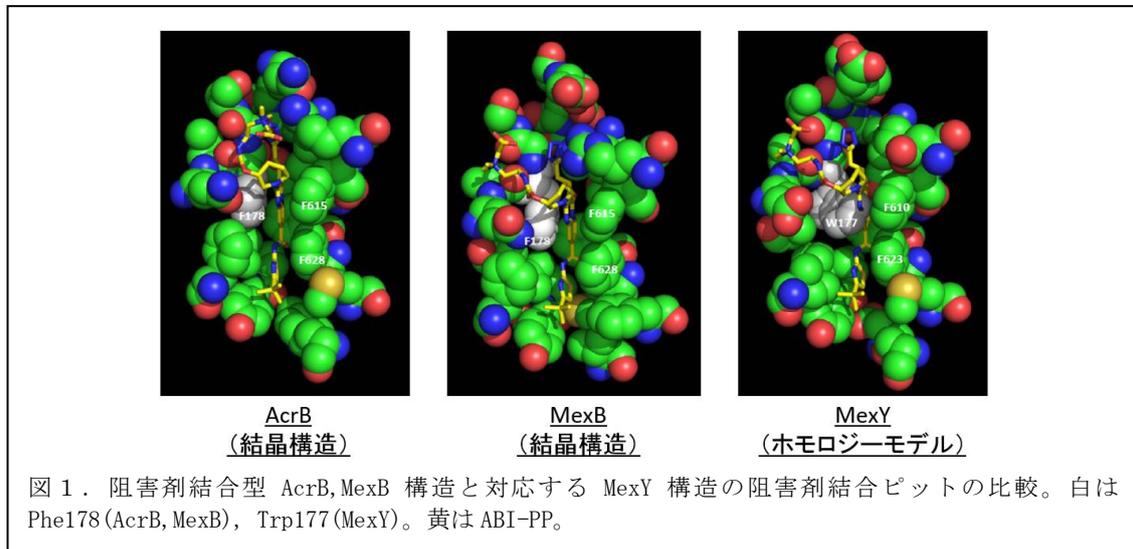
- ・国内共同研究
 - 日本薬科大学 薬学部(多剤耐性アシネトバクターの解析)
 - 愛知学院大学 薬学部(多剤耐性緑膿菌トランスポーターの解析)
 - 東京大学大学院 工学系研究科(トランスポーター排出活性の一分子解析)

§ 3 研究実施内容及び成果

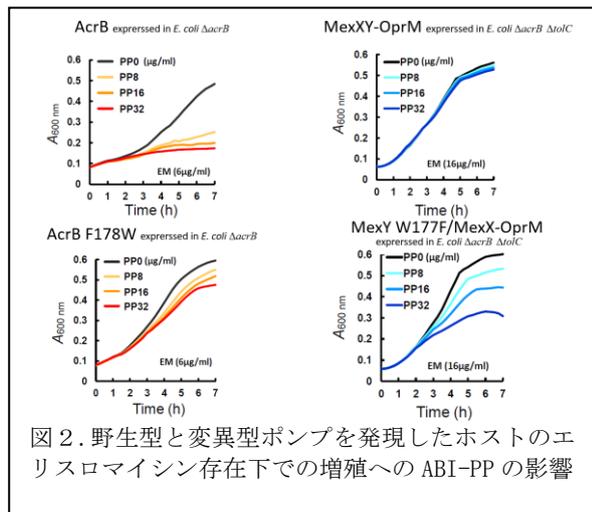
3.1 (1) 異物排出タンパクの構造決定を、臨床的に重要な緑膿菌異物排出タンパクや ATP 共役型異物排出タンパク、内在性基質との結合構造決定などに広げ、部位特異変異導入・新規輸送活性測定法の確立と組み合わせてより詳細な異物輸送機構の全体像を解明するとともに、阻害剤開発の構造的基盤を確立する。(構造・排出輸送研究グループ)

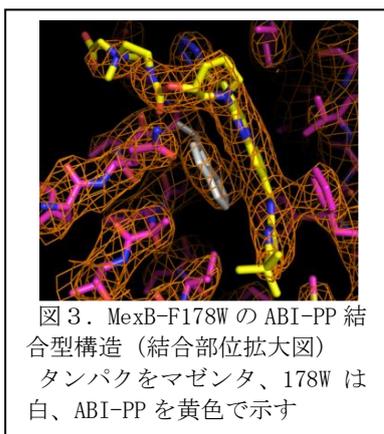
(1)研究実施内容及び成果

3.1.1. 大腸菌 AcrB および緑膿菌主要排出タンパク MexB の阻害剤結合構造の決定(阻害剤結合特異性の構造的基礎の解明):ピリドピリミジン誘導体 ABI-PP は大腸菌等の AcrB、緑膿菌の MexB の優秀な阻害剤であるが、緑膿菌多剤耐性のもう一つの重要な排出タンパク MexY を全く阻害できない。AcrB と MexB の ABI-PP 結合構造を決定したことで、阻害剤結合ピットの存在が明らかになり、MexY のホモロジー構造との比較で阻害剤特異性の構造的根拠が解明された。すなわち、AcrB、MexB のピットに存在する Phe178 が MexY では Trp に置き換わっており、その大きな側鎖に



よる立体障害で ABI-PP が結合できなくなっていると推定された(図1)。AcrB-F178W 置換体では ABI-PP による阻害を受けなくなり、逆に MexY-W177F 変異体では ABI-PP に阻害されるようになったことはこの推定を裏付けるものであった(図2:ABI-PP がポンプを阻害するとエリスロマイシンの効果により増殖が抑えられる。変異により AcrB と MexY に対する阻害剤特異性は入れ替わった)。ところが、MexB-F178W 変異体は依然として ABI-PP に感受性を保っていた。この原因を明らかにするため、本研究ではさらに、MexB-F178W の ABI-PP 結合構造を決定した。ABI-PP はたしかに野生型と同じ結合ピットに結合しており、Trp 側鎖は結合に邪魔にならない位置に納まっていた(図3)。AcrB や MexY の構造において Trp 側鎖に同様の配置を取らせるためには V139(AcrB), I138(MexY) が障害になると推定された。そこで今度は、AcrB-F178WV139A, MexY-I138A 変異体を作り、活性測定したところ、いずれも ABI-PP に阻害される性質を示した(図4)。こ





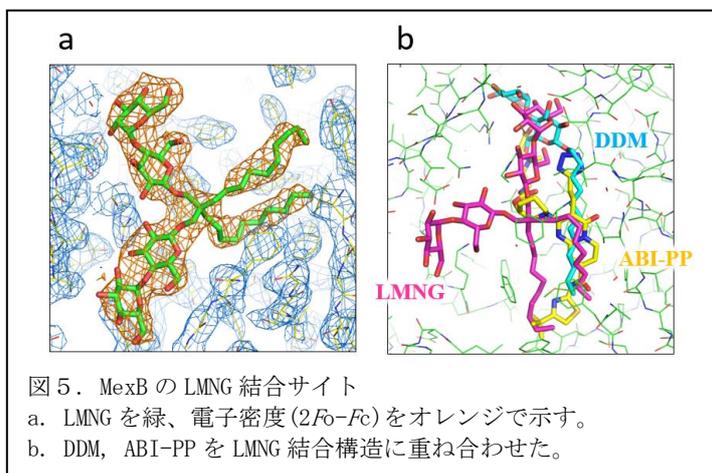
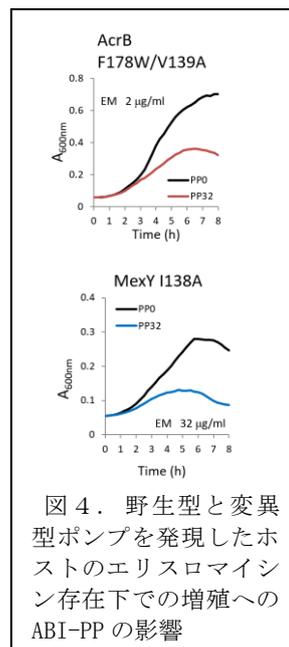
3回対象を持たない)非対称構造に限定すると、我々の報告した AcrB とミノサイクリン、ドキシソルピシン、エリスロマイシン、リファンピシンの結合構造に加えて、2017年に他のグループからピューロマイシン結合構造がやっと一件報告されたのみであった。これらは全て基質であるため、初めての阻害剤結合構造が決定されたことにより、構造に基づく阻害剤の分子設計が初めて可能になった。

3. 1. 2. MexB の大分子量基質結合構造の決定:可溶化精製 MexB は基質結合ポケットに界面活性剤 n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside(DDM, MW 510.62)を結合しており、その結合構造はすでに決定している(Sennhauser G., et al. J. Mol. Biol. 389, 134-145 (2009), Nakashima R., et al. Nature 500, 120-126 (2013))。このため、他の薬剤との結合構造はすでに結合している DDM に妨げられて、強く結合する阻害剤 ABI-PP との結合以外は検証されていない。そこで、DDM に代わって、その約 2 倍の分子量があり、

DDM 結合サイトにははまらないと予想できる界面活性剤 Lauryl Maltose Neopentyl Glycol(LMNG, MW 1005.19)を用いることで、基質非結合型 MexB の構造決定を目指した。当初 3.6 Å 分解能での構造決定に成功した結果は驚くべきもので、予想に反して LMNG 結合型構造が決定された(図5)。LMNG 結合位置は、その大分子量にもかかわらず、DDM や ABI-PP と同じ遠位結合ポケットで、しかし結合様式は DDM とは大きく異なっていた。先の論文(Nakashima R., et al. Nature 480, 565-569 (2011))で大分子量薬物は近位ポケット、小分子量薬物は遠位ポケットに結合が観察されたことを報告したが、LMNG は大分子量でも遠位ポケットに結合していた。

れら変異体の実験は ABI-PP の結合ピットへ結合の可否に関する予測を完全に支持しており、異物排出タンパクの ABI-PP 阻害特異性はその結合ピットの立体障害により決まることが明らかになった。本結果は Nature 誌に掲載された(Nakashima R., et al. Nature 500, 120-126 (2013))。

本成果以前には、精製に用いた界面活性剤(DDM)が基質結合ポケットに収まった MexB の結晶構造が報告されているのみであった。この他の基質結合構造は、生理的に意味のある(三量体中心に結晶学的



大きく異なっていた。先の論文(Nakashima R., et al. Nature 480, 565-569 (2011))で大分子量薬物は近位ポケット、小分子量薬物は遠位ポケットに結合が観察されたことを報告したが、LMNG は大分子量でも遠位ポケットに結合していた。

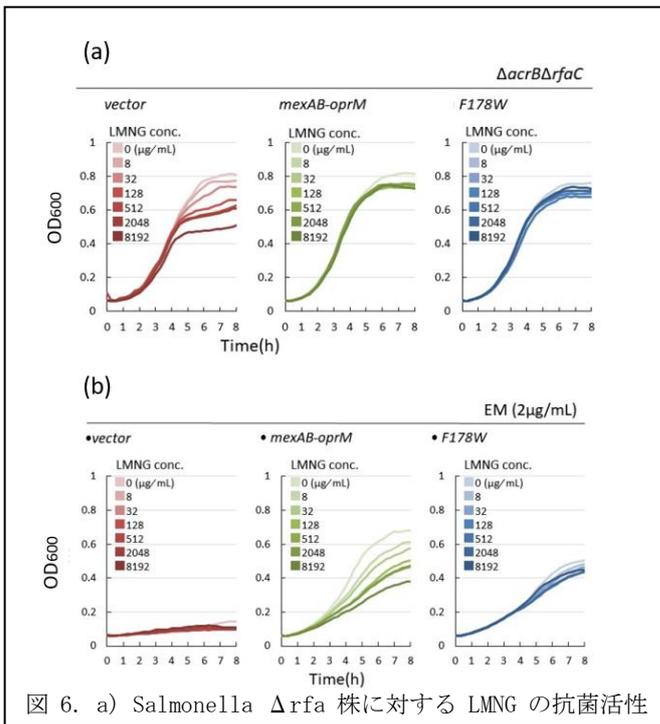


図 6. a) Salmonella Δrfa 株に対する LMNG の抗菌活性

Glycol (C7NG, MW 1028.58)との結合構造決定にも成功し、占有率は LMNG のそれと比較して低い、LMNG とほぼ重なる結合様式が判明した(図 7)。これらの事は、基質結合ポケットの基質選択性は単純に分子量によるものではなくて個々の特異性によることを示している。これまでに MexB+LMNG, MexB-F178W+LMNG, MexB+C7NG の結晶構造をそれぞれ 2.9, 3.15, 3.65 Å 分解能で精密化した(論文投稿中)。今後の阻害剤インシリコスクリーニングにも役立つ情報である。

LMNG は MexAB-OprM システムに排出されることから他の基質の排出を拮抗阻害するが、F178W 変異体においては排出活性を保持しながら拮抗阻害は観測されなくなった(図 6)。そこで MexB-F178W と LMNG の結合構造を決定したところ、野生型では阻害剤結合ピットに挿入されていた LMNG のアルキル鎖が立体障害から挿入されなくなっていた(アルキル鎖はディスオーダーしていて構造はアサインできない)。さらに CYMAL-7 Neopentyl

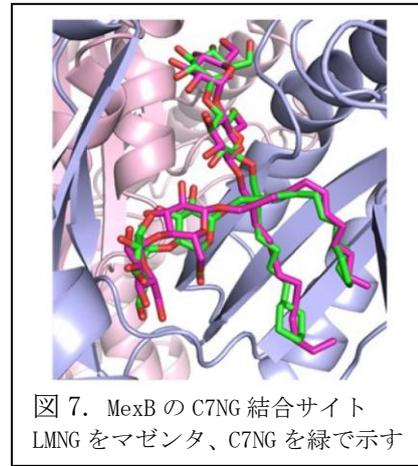


図 7. MexB の C7NG 結合サイト
LMNG をマゼンタ、C7NG を緑で示す

3. 1. 3. 緑膿菌主要異物排出タンパク MexY の構造決定: 広域阻害剤の分子設計には、MexY の詳細で信頼のおける構造情報が必須である。先の項で MexB 特異的阻害剤が MexY を阻害できない理由について述べたが、そこで用いたのは MexY ホモロジーモデルであった。有機合成グループと共同で構造ベースの合成展開につなげるには、やはり高分解能結晶構造が欠かせない。本 CREST 研究開始当初にすでに低品質ながら結晶を得ていた。その後の結晶化条件の最適化で大幅な大型化を達成したが、残念ながら構造解析に適した分解能に到達することはできなかった(図 8)。品質改良に手間取り当初計画に比べて進展は遅れていたが、その後界面活性剤に n-Undecyl- β -D-Maltopyranoside を用いた場合に 4Å 分解能程度の X線回折能を有する結晶の作成が可能なることを発見し、大幅な品質向上を達成した。さらに添加剤として界面活性剤 MEGA-9 を加える条件で結晶析出の再現性向上と結晶の大型化を達成した(図9)。これにより 4.2Å 分解能までの回折強度データの収集にも成功した。分解能が十分でないこともあり分子置換法での解析に手間取ったが 28 年度には構造決定に至った。Se-Met 置換体での結晶化にも並行して取り組んだが、こちらは結晶を得るにいたらなかった。

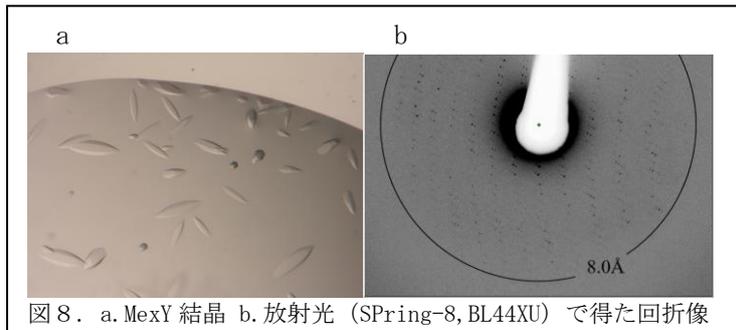


図 8. a. MexY 結晶 b. 放射光 (SPring-8, BL44XU) で得た回折像

決定された分子構造は、ゲルろ過プロファイルや結晶標品の BN-PAGE から予想された三量体ではなく、驚いたことに単量体であった。このため構造機能相関を議論することは困難であるものの、阻害剤設計に寄与する重要な構造情報を獲得できた意義は大きい。機能的回転機構における「排出型」に似た構造をしていたが、隣のプロトマーが供給するヘアピン構造が抜けてしまっているために

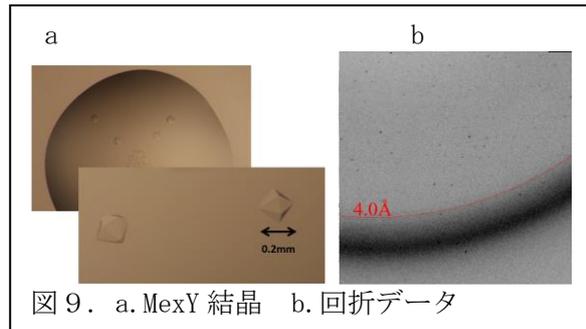


図 9. a. MexY 結晶 b. 回折データ

OprM ドッキングドメインがひしゃげていて、ヘアピン構造自身ディスオーダーしていた (図 10)。三量体を形成していないこと、基質を結合する「待機型」「結合型」ではないことから基質、あるいは阻害剤との結合構造決定に用いるには不利が予想されるのだが、これまでに MexY 結晶構造の報告は無く、現状で利用できる唯一の結晶である。また、ドメインスワップを含む三量体形成は強固だ

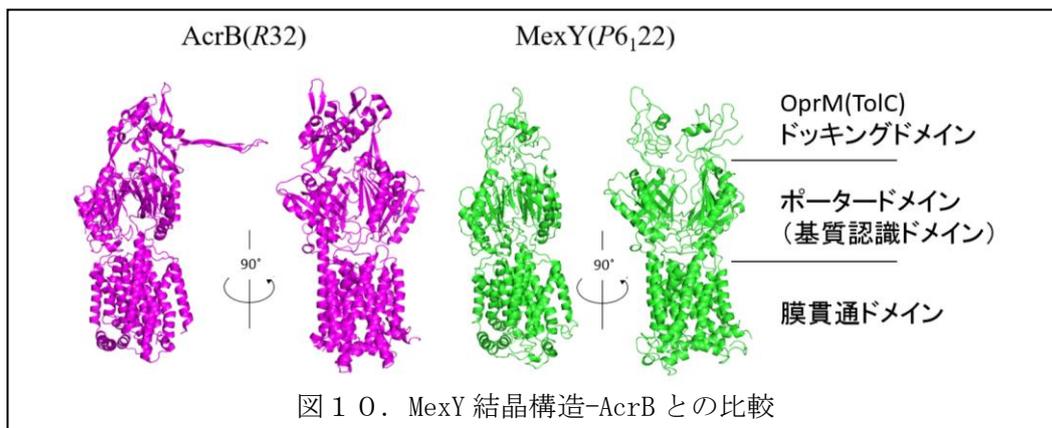


図 10. MexY 結晶構造-AcrB との比較

と見なしていた RND 型ポンプにあって MexY が単量体で結晶を構成した事実からは、スクリーニングでヒットした化合物の阻害様式が三量体形成阻害という可能性も考えられる。そこで、阻害剤結合構造取得の可能性はあるものとして、これら化合物との結合構造決定にも取り組んだ。スクリーニングのヒット化合物、新規合成した阻害剤候補化合物合わせて 12 種の化合物との共結晶化を行い、これまでに 8 種で 3.8-4.7 Å 分解能で構造を解析した。その結果は残念であるが、化合物の電子密度を捉えるには至らなかった。

これまで構造解析された RND 型ポンプには単量体で存在する例は無く、必ず三量体を形成している。唯一ヘアピン構造を欠損させた AcrB 変異体で単量体化の報告があるのみであり、MexY の単量体結晶化は MexY 特有な性質と考えられる。そこで、トライマーの安定性を確保する対策として (欲しいのは三量体の非対称構造)、より強固なトライマーを形成していると考えられる MexB の OprM ドッキングドメインを MexY の対応部位と置換したキメラタンパクを作成して構造決定することとした。キメラタンパクについては次項で記述する。この他にもシステインを変異導入して、三量体を形成する単量体間にジスルフィド結合を形成させることで三量体を安定化する方法にも取り組む。図 11a に示す 4 通りの変異体を構築したところ、R208C/M737C, I252C/T732C 変異体でタンパクの発現とジスルフィド結合形成を確認した。これら 2 つの変異体についても結晶化に取り組む。

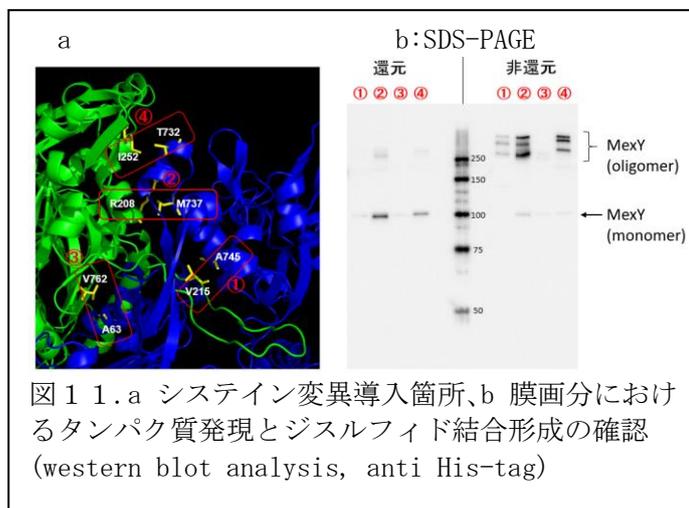


図 11. a システイン変異導入箇所、b 膜画分におけるタンパク質発現とジスルフィド結合形成の確認 (western blot analysis, anti His-tag)

3. 1. 4. 結晶化に向けた MexB-MexY キメラタンパクの作製: MexY の結晶構造では、OprM ドッキングドメインがひしゃげた単量体として構造決定された。この OprM ドッキングドメインは三量体内でドメインスワップする部分であり、MexY のこの部位は MexB よりも不安定であると考えられる。三量体を安定化する方法として、基質を結合するポータードメイン以外を MexB で置換した3種類の MexB-MexY キメラを作製した(図12)。

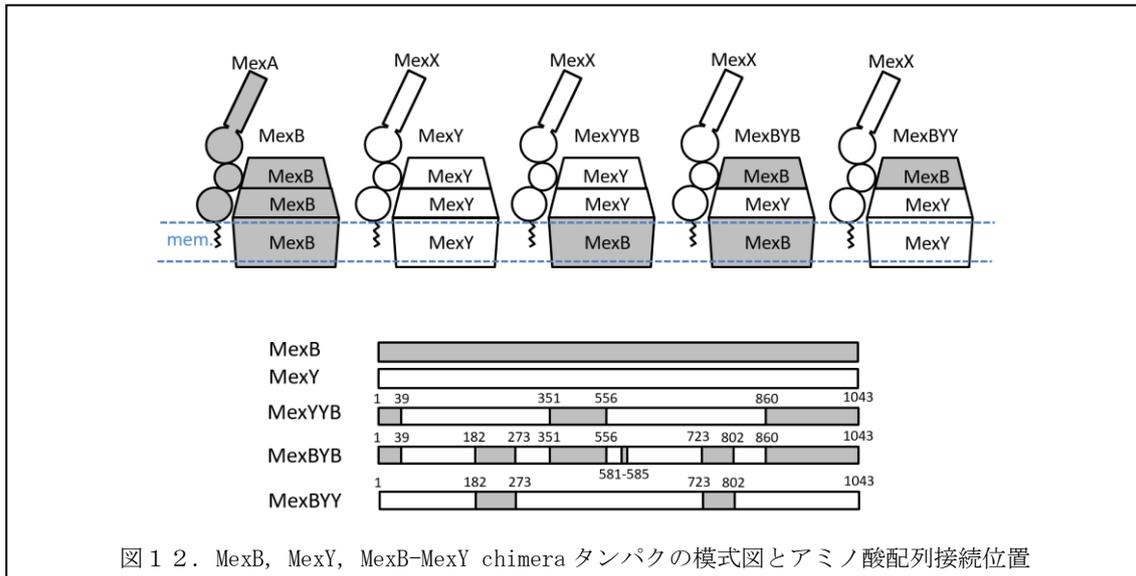


図12. MexB, MexY, MexB-MexY chimera タンパクの模式図とアミノ酸配列接続位置

結晶化に用いるにあたって正常なフォールディングを確認する意味もあり MexB-MexY chimera/MexX(MexA)/OprM を *acrB/tolC* 欠損大腸菌株に同時に発現させてポンプ活性を検証した。野生型よりも弱いながらエリスロマイシンに対する最小発育阻止濃度を有意に上昇させたことから、ポンプ機能を保持していることが確かめられた(図13)。MexBYB, MexBYY 両タンパクは生体膜に正しく発現し、ゲルろ過のプロファイルから三量体を形成していることが確かめられた(670kDa 相当)、単量体に相当するピークは検出されなかった(図1

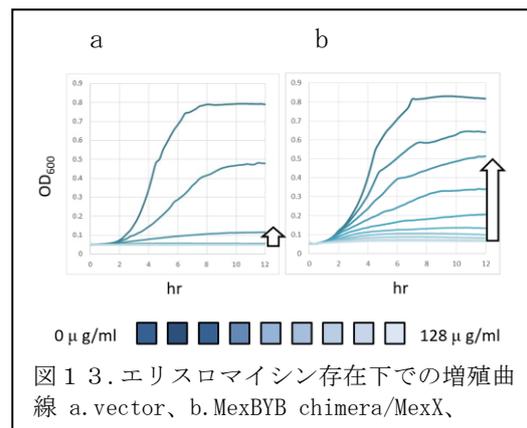


図13. エリスロマイシン存在下での増殖曲線 a. vector, b. MexBYB chimera/MexX,

4b)。野生型 MexB, MexY はいずれも界面活性剤に DDM を用いて精製・結晶化が可能であったが、キメラタンパクではその安定を保てなかったため、界面活性剤のスクリーニングに立ち戻って、LMNG, Fos-choline 14 で良好な精製標品を得た。ただし残念ながらこれまでの結晶化スクリーニングでは結晶は得られていない。先行して構築していた MexBYB キメラでより多くの結晶化トライアルを行ってきたが、残りの研究期間はより素性がよいと期待している(切り替え箇所が少ない)MexBYY キメラに絞って構造決定に邁進する。

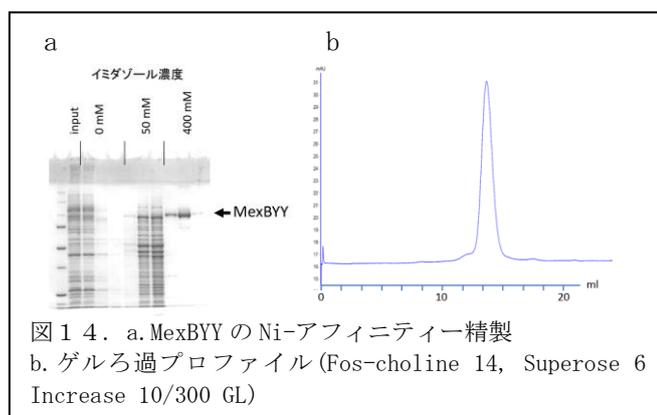


図14. a. MexBYB の Ni-アフィニティー精製
 b. ゲルろ過プロファイル (Fos-choline 14, Superose 6 Increase 10/300 GL)

3. 1. 5. MexB-MexY キメラの排出活性評価: MexB-MexY chimera のポンプ活性は確かめられたが、野生型に比べて弱い。この活性の落ち込みは MexA、MexX のアダプタータンパク質との相性によるところが少なからずあると考えられるので、MexA と MexX のキメラも作製(図15)して MexB-MexY キメラとの同時発現時の機能を確認した。その結果、MexX、もしくは MexAXX でのみ、機能を保持するという興味深い傾向が観測された(図16)。

アダプタータンパクは上から helical hairpin, lipoyl, beta-barrel, MP の4つのドメインで構成される(図17b)。いずれのポンプもポータードメインとアダプタータンパクの beta-barrel, MPドメイン構成が本来ペアのもの(MexA/MexB, MexX/MexY)の場合だけポンプ活性が観測されたのである。ここのところ相次いで報告された cryo-EM を用いた

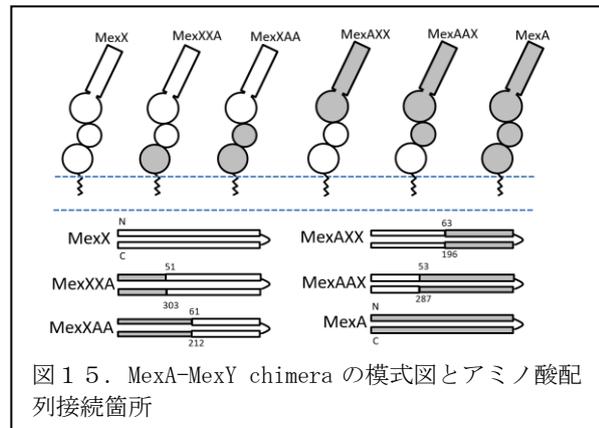


図15. MexA-MexY chimera の模式図とアミノ酸配列接続箇所

AcrAB-TolC 三者複合体構造の解析結果では、共通して AcrB と TolC の間に AcrA の六量体チューブ構造が挟まっている(図17a)。この構造ではポンプのポータードメインとアダプタータンパクの相互作用は限定的で MPドメインの一部しか接触が無く、まして beta-barrelドメインとは接触していない。今回の結果が示唆する AcrB と AcrA 相互作用様式とは整合性がないのだ。また、後の項で述べる AcrB-AcrA 融合タンパクに至っては AcrA が3分子あればポンプシステムとして機能できることを示している。cryo-EM の解析結果が間違っているとは考えていないが、確認されている構造とは異なるモードがあることを強く示唆している。やはり結晶構造解析が必要である。

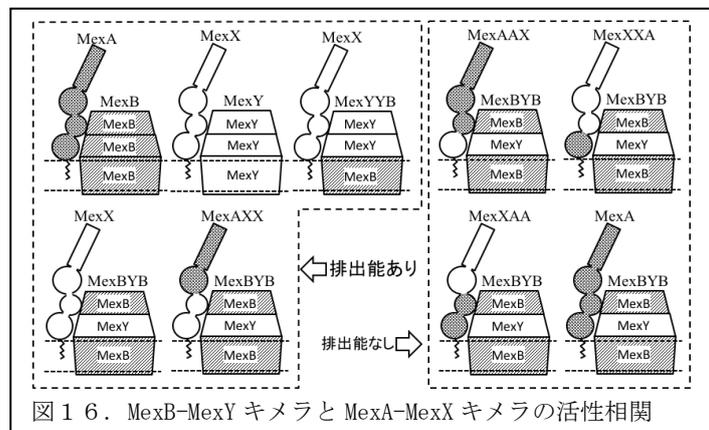


図16. MexB-MexY キメラと MexA-MexX キメラの活性相関

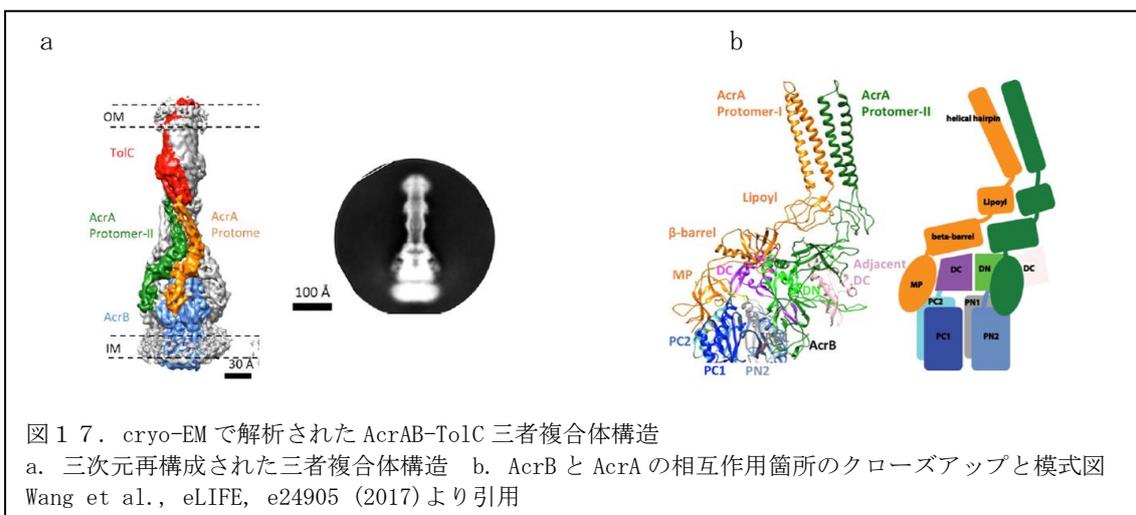


図17. cryo-EM で解析された AcrAB-TolC 三者複合体構造

a. 三次元再構成された三者複合体構造 b. AcrB と AcrA の相互作用箇所のクローズアップと模式図
Wang et al., eLIFE, e24905 (2017)より引用

3. 1. 6. AcrB HL-SG 変異体の結晶構造決定: AcrB はプロトン駆動力で動作し、ペリプラズム空間のポータードメインで基質を認識・結合して機能的回転機構によって外膜チャンネル TolC へと送り出す。プロトン経路として必須な膜貫通部位の D407, D408, K940 のイオンペアと基質結合ポケットは 50Å も隔たっている。いかにして基質輸送とプロトン勾配エネルギーを共役(遠隔コンホメーション共役)しているのか大変興味深い。結晶構造から判明している機能的回転機構の間、最も大きく構造を変化させるのは膜貫通ドメインとペリプラズムドメインの間に位置する膜貫通ヘリックス 8番から伸びるループ領域で、 α ヘリックスが「伸びる-ほどける」ことで基質取り込み口の1つを開閉

表 1, Plate MIC results

	NKE	Strain	Plasmid	MCIPC	BZC	EtBr	CV	NB	Rho6G	MINO	ACR	EM
WT	751	MG1655	-	512	256	>1024	>64	1024	>8192	>2	1024	256
KO	96	MG1655 Δ acrB	-	2	2	16	16	16	8	0.5	16	16
	128	MG1550 Δ acrB Δ tolC	-	0.125	2	4	2	2	4	0.5	8	2
	1810	MG1655 Δ tolC	-	0.125	2	4	2	2	4	0.5	8	2
Δ tolC	1829	MG1655 Δ acrB Δ tolC	pBAD33	0.125	2	4	2	2	4	0.5	8	2
-	1355	MG1655 Δ acrB	pBAD33	2	2	16	16	16	16	0.5	16	16
+	1603	MG1655 Δ acrB	pBAD33acrBHis	256	128	1024	64	1024	8192	>2	1024	128
L868P	2123	MG1655 Δ acrB	pBAD33acrBHis(L868P)His	128	128	1024	64	512	8192	>2	256	128
Q872P	2124	MG1655 Δ acrB	pBAD33acrBHis(Q872P)His	256	128	1024	64	512	8192	>2	512	128
HL-SG	2126	MG1655 Δ acrB	pBAD33acrBHis(HL-SG)His	256	128	1024	64	512	8192	>2	256	128

MCIPC: cloxacillin, BZC: benzalkonium chloride, EtBr: ethidium bromide, CV: crystal violet, NB: novobiocin, Rho6G: rhodamine 6G, MINO: minocycline, ACR: acriflavine and EM: erythromycin

している。また、この動きを介してエネルギーを伝達しているとも考えられた。Hoisting-loop と名付けたこの領域の機能を調べるために、プロリン置換変異体や3残基欠損変異体(AcrB HL-SG)を作成した。これら変異体は失活するという予想に反して野生株に匹敵する活性を保持していた(表 1)。そこで、Hoisting-loop とそれに連なるドメイン構造(TM domain, Hoisting-loop, PC2 domain)を調べるために変異体の結晶構造を決定した(図18)。その結果、各ドメインの構造と空間配置は野生型のそれと完全に一致していた。違いはわずかに膜貫通ヘリックス8番の最後の一巻きがほどけていて短くなったループを補っていること、Hoisting-loop が α ヘリックスを巻けなくなっていることであった。 α ヘリックスが「伸びる」ができなくなっておよチャンネルの開閉を行っていた。機能的回転機構の一端を担うPC2 の構造と動きをいささかも変えることのない確かさと、3残基欠損を補い、尚且つチャンネル開閉も維持する驚くべき柔軟性が判明した(*Front. Microbiol.*, 8(2015), 1-8, 2015)。

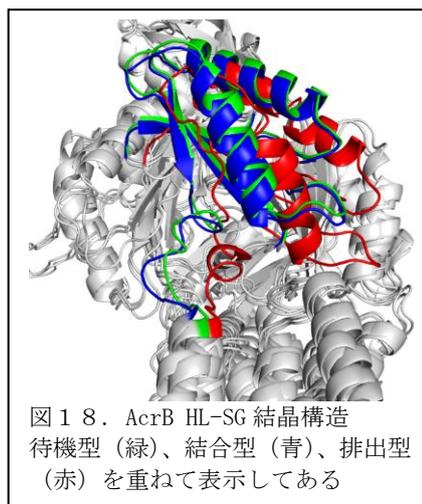


図 18. AcrB HL-SG 結晶構造
待機型(緑)、結合型(青)、排出型
(赤)を重ねて表示してある

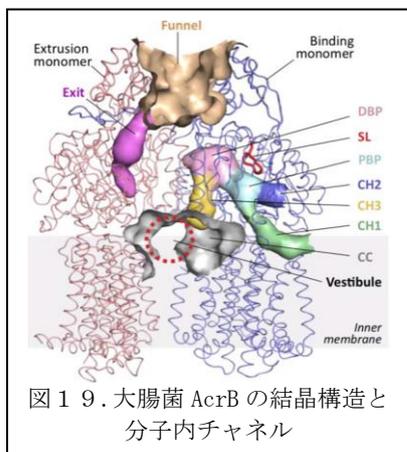


図 19. 大腸菌 AcrB の結晶構造と
分子内チャネル

4. 1. 7. マルチエントランス/マルチパスの使い分け: 細菌異物排出ポンプには 2 つのマルチサイト結合ポケットと 3 つのエントランスがある。3 つのエントランスは細胞質膜表層(CH1)、ペリプラズム(CH2)、ポンプ 3 量体中央空洞(CH3)に開口しており、それぞれ、細胞膜に溶け込んだ異物の排出、ペリプラズムで働く β -ラクタム剤などの排出、細胞内部から Flip-Flop で輸送されてきた異物の排出を担っていると考えられるが、具体的な証拠はなかった。今回初めて、異物によるエントランスの使い分けに関する知見を得た。

3 つのエントランスからのパスはすべて proximal

pocket (PBP) で合流していると考えられてきたが、今回 CAVER を用いてチャンネルの見直しを行ったところ、CH3 は直接 distal pocket (DBP) に接続している可能性を見いだした (図 19)。そこで、CH3 入り口近傍の A33, T37, N298 の 3 つの残基を立体障害性の Trp(W) で置換した triple mutant を作成して (図 20)、ポンプ欠損株に発現させ各種抗菌剤存在下での生育を調べたところ、エチジウム (EtBr) やベルベリン (BER) 存在下では全く生育しないが、エリスロマイシン (EM) などその他の薬剤存在下では生育できることを見いだした。これは、EtBr や BER が主に CH3 を通って排出されていることを示す。次に、ちょっと奥にある A100 も Trp に置換した quadruple 変異体では、驚いたことに EtBr や BER 存在下で顕著に生育が回復した。EM 存在下での生育は逆にやや低下した。EtBr と同じような挙動を示す化合物をスクリーニングしたところ、すべてカチオン性の平面複素環化合物であった。構造上、変異体の Trp37 と Trp100 は並行に配置されることができ、その間に $\pi\pi$ 結合とカチオン・ π 相互作用によって効率的にサンドイッチされることで、効率的に CH3 に補足され易くなるのではないかと推定される。そこで、エントランスによる基質の使い分けが実際にあるのか、EtBr 排出に対する各種薬剤の拮抗阻害効果を調べたところ、拮抗阻害があるのはカチオン性平面複素環化合物のみで、EM などは阻害効果が無いことがわかった。

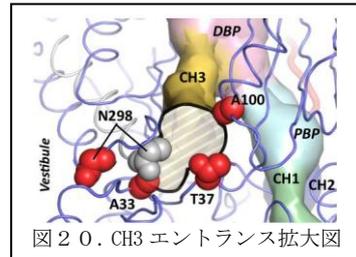


図 20. CH3 エントランス拡大図

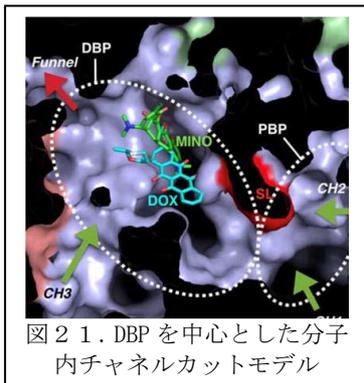


図 21. DBP を中心とした分子内チャンネルカットモデル

DBP と DBP の間にはスイッチンググループ (SL) があり、SL がスイング運動して、基質を PBP から DBP に送り込むと考えられている (図 21)。このスイングを止める変異 SLM では、EM やミノサイクリン (MINO) など多くの薬剤の排出活性はポンプ欠損株レベルまで低下しているが、EtBr などカチオン性複素環化合物の排出活性は顕著に残っていた。さらに、SLM に先ほどの CH3 入口の T37W/A100W ダブル変異を導入すると、EM 排出活性は全く復活しなかったが、EtBr 排出活性は SLM レベルよりさらに上昇し、野生型と匹敵するほどの活性を示した (図 22)。これは、EtBr などカチオン性複素環化合物が PBP や SL を経由せず、CH3 からダイレクトに DBP を通って排出されていることを示すものである。

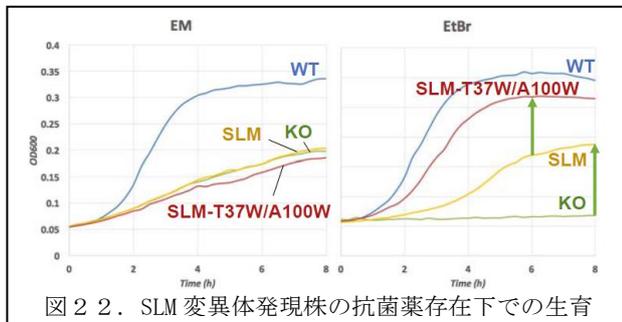


図 22. SLM 変異体発現株の抗菌薬存在下での生育

以上の結果は、基質によって明確なエントランスの使い分けがあることを示す初めての知見である。異物排出ポンプは3つのエントランスを使い分けることにより、物理的性質の異なる異物を排出することに対応していると考えられる (*Nature Communications*, 9(124), 1-9, 2018)

3. 1. 7. ATP 共役型異物排出タンパク MacB の構造決定: TolC 共役 ABC 型排出タンパク MacB の大量発現は研究開始当初には達成し、可溶化に適した界面活性剤の絞込みまで完了した。断片化の問題が原因で結晶化に至らないと考えられたが、これに対して無細胞発現系を用いると断片化を著しく軽減できることを見

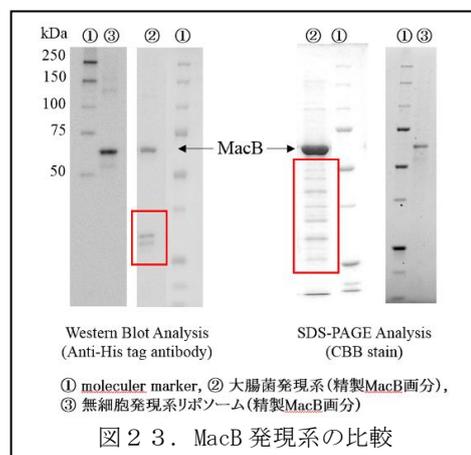


図 23. MacB 発現系の比較

出した(図23)。大腸菌発現系ではタグ精製後も夾雑物が含まれ、このうちの幾つかは末端の His-tag を含む MacB 断片であることがウェスタンブロット解析から判明した。他のバンドも MacB の断片であることが予想される。これに対して無細胞発現系(小麦胚芽系)を用いた場合、精製 MacB 画分は勿論のこと、MacB 発現リポソーム画分にも断片は観測されない。申し分ない発現量は達成されており、発現系の容量をテストスケールから大きくして結晶化に取り組んできたが、これまでのところ結晶は得られていない。我々が結晶作成に手間取っている間に 2017 年にはイギリスのグループから cryo-EM による大腸菌 MacAB-TolC3 者複合体構造(Anthony *et al.*, nature microbiology, 2,17070 (2017))が報告された。結晶構造の必要性はあると確信しているが、本プロジェクトの残りの研究期間は短いので、結晶構造決定は MexBYX キメラ, AcrAB-TolC 三者複合体に注力する。

3.1.8. 内在性基質を含む多様な基質との結合構造の決定に向けた異物排出タンパクの生理的役割についての研究:

3.1.8.1. 生理基質が排出基質かどうかの検証:AcrB, AcrD と MdtABC 多剤排出システムは大腸菌エンテロバクチンの輸送に参与している。薬剤排出システムはもともと薬剤耐性因子として同定された経緯からその名前が付けられているが、

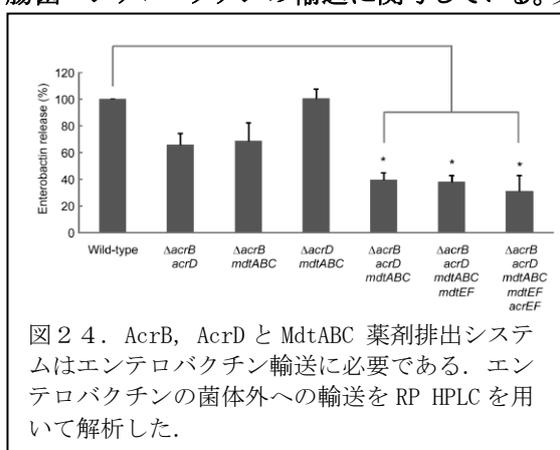


図 24. AcrB, AcrD と MdtABC 薬剤排出システムはエンテロバクチン輸送に必要である。エンテロバクチンの菌体外への輸送を RP HPLC を用いて解析した。

私達の研究から薬剤耐性だけではなく、代謝産物の輸送や細菌病原性発現にも関与していることが明らかになってきた。薬剤排出システムである AcrB, AcrD と MdtABC は、β-ラクタム剤をはじめとする抗菌薬を排出し、細菌を多剤耐性化させる。いずれの排出システムも外膜タンパク質である TolC と共役して薬剤を細胞外へ排出する。一方で、この3つの薬剤排出システムが薬剤の排出以外にどのような生理機能を担っているのかについてはよく分かっていなかった。AcrB は通常の培養条件で恒常的に発現している薬剤排出システムであるが、AcrD と

MdtABC は通常ほとんど発現していない。これまでの実験から、AcrD と MdtABC 薬剤排出システムが、鉄欠乏条件下において誘導され、この発現誘導は、Fur という鉄代謝に関わる調節因子によって制御されていることが分かってきた。また、鉄欠乏条件下において、これら排出ポンプが菌の生育に必要であることが分かった。鉄は病原性細菌にとって必須の微量元素であり、細菌は効率的に鉄を獲得する仕掛けをもっている。細菌はシデロフォアとよばれる Fe^{3+} と特異的に結合する分子(キレーター)を分泌し、シデロフォア- Fe^{3+} 複合体を取り込むことにより鉄を吸収する。そこで、大腸菌が産生するシデロフォアであるエンテロバクチンの菌体からの分泌と、これら AcrB, AcrD と MdtABC 薬剤排出システムの関係について調べた(図24)。解析の結果、AcrB, AcrD および MdtABC は、エンテロバクチンを排出し、菌の鉄獲得に参与していることを発見した(図25)。鉄は細菌病原性発現に必要な因子であることから、薬剤排出システムによるシデロフォア排出が各種細菌の病原性発現にも関与していることが強く示唆される(Horiyama *et al.* *PLoS One*, 9, e108642 (2014))。

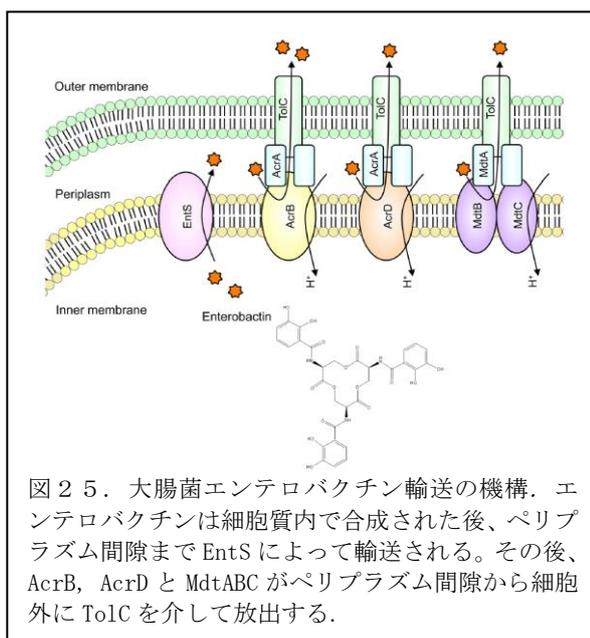


図 25. 大腸菌エンテロバクチン輸送の機構。エンテロバクチンは細胞質内で合成された後、ペリプラズム間隙まで EntS によって輸送される。その後、AcrB, AcrD と MdtABC がペリプラズム間隙から細胞外に TolC を介して放出する。

3. 1. 8. 2. 多剤排出システムはバイオフィーム形成に関与している

一部の菌株は、固体または生体表面に付着した後、細胞外多糖を分泌して強固なバイオフィームを形成する。バイオフィーム内には、複数種の細菌が一種の生態系を形成して共存していることが知られている。成熟したバイオフィーム内では、細菌は休眠状態にあって、急速には分裂しない。古いバイオフィームが破損するとき、病原菌は外部環境に放出され、自由に浮遊している細菌数が増加する。バイオフィームは宿主の免疫機構からの回避に役立ち、抗菌薬の浸透も妨げることで細菌の自然抵抗性を大幅に上昇させる。臨床では、医療用カテーテルに定着したバイオフィーム産生菌による院内感染や、薬物療法が困難な歯周病・齲蝕が大きな問題となっている。私達は、バイオフィーム産生株である TG1 野生株から構築した欠損株を用いて、バイオフィーム形成に関係がある異物排出トランスポーターを探索した。その結果、異物排出トランスポーター AcrAB および MdtABC が、大腸菌のバイオフィームの維持に寄与していることが明らかとなった(図26)。

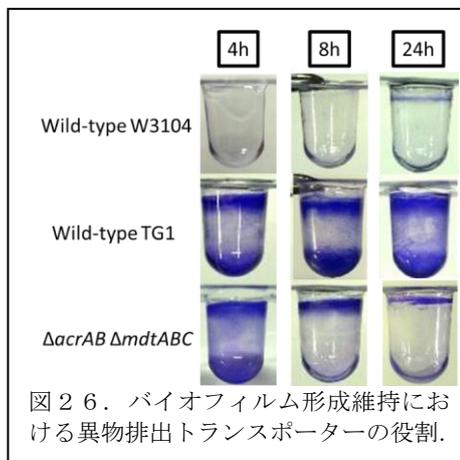


図 26. バイオフィーム形成維持における異物排出トランスポーターの役割.

Δ acrAB Δ mdtABC 株において、バイオフィームの初期の産生過程には問題がないことから、両トランスポーターはバイオフィームを構成する材料ではなく、バイオフィーム維持に関わるシグナル物質を排出していると考えられる(特定するには至っていない)。以上の結果から、異物排出トランスポーターの阻害剤が開発できれば、抗菌薬の排出抑制とともにバイオフィーム形成の抑制効果も期待できるため、非常に有用な治療薬になると期待できる。

3. 1. 8. 3. フェノタイプマイクロアレイ解析を用いた薬剤排出システムの基質探索

病原細菌であるサルモネラには数多くの薬剤排出トランスポーターが存在し、これらトランスポーターの発現上昇が薬剤耐性化の主因となっている。私達は、呼吸活性を指標にフェノタイプマイクロアレイを用いた解析で、サルモネラの野生株と9つの薬剤排出トランスポーター欠損株を検証した。その結果、欠損株が感受性を示す抗菌薬、色素、界面活性剤、抗ヒスタミン剤、植物性アルカロイド、抗うつ剤、抗精神病薬、抗原虫薬等を含む66個の構造の異なる多くの化合物が見出された。サルモネラに存在する9つの薬剤排出トランスポーター個々の役割について調べるために、各トランスポーター遺伝子欠損株と、段階欠損株、そして、トランスポーター発現株を用いて各薬剤の最小発育阻止濃度を測定した。その結果、9つの薬剤排出トランスポーターが示した薬剤感受性化は主に、acrAB 排出遺伝子と tolC 遺伝子の欠損が主たる原因であることが分かった。また、発現株を用いた解析から、AcrAB-TolC 排出システムに加えて、AcrEF や大腸菌 AcrAB、そして緑膿菌の MexAB-OprM、MexXY-OprM がこれら薬剤に対する耐性化に関与していることが明らかになった。これらの結果は、薬剤排出システムが抗菌薬耐性に加えて、抗ヒスタミン剤、植物性アルカロイド、抗うつ剤、抗精神病薬、抗原虫薬に対する抵抗性において重要な役割を果たしていることを示している。

3. 2. 複合体形成解離のダイナミズムとモード切替仮説を立証するため、2 者、3 者複合体構造の決定と、イメージングによる動的観察を行う。

3. 2. 1. 2 者、3 者複合体構造の決定(構造・排出輸送研究グループ)

in vivo で AcrAB-TolC 三者複合体形成は一過性で安定な複合体は形成しない。AcrB と AcrA は共発現系から一方を精製しても他方は共精製されないほど親和性が低い。結晶化に向けてこの親和性の低さを補うアプローチとして AcrB-AcrA 融合タンパク(図27a,b)を設計した。当初問題であった AcrA 部分の欠損については、リンカーの膜貫通部分を AcrA シグナルペプチドから AcrB の膜貫通ヘリックス TM7 への変更により大幅な改善を達成した(図27c)。また、リンカーの細胞質部分を最小化し、より結晶化に適した融合タンパクの取得にも成功した。これら融合タンパクを発現した大腸菌は野生型を発現した場合に匹敵する耐性を獲得していることが分かった(表 2)。これらの

成果は論文として発表した。(Hayashi et al., *J. Bacteriol.* 198, 332-342 (2015)).

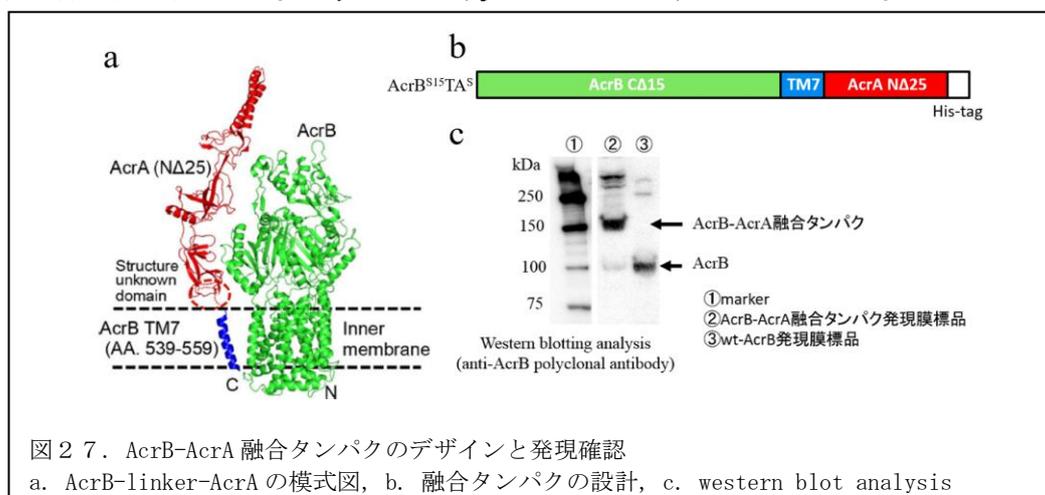


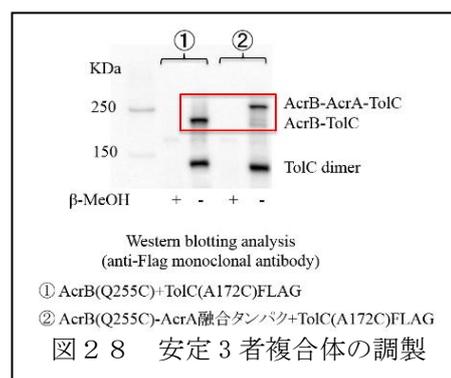
表 2 融合タンパクを発現した大腸菌の最小発育阻止濃度

Host	Expressed protein	MIC(μg/ml) of:										
		MPIPC	MCIPC	EM	MINO	NA	NB	ACR	CV	EB	Rho6G	BZC
BL21 ΔacrB	Vector (pBAD33)	2	2	8	0.13	0.5	4	2	2	4	8	4
BL21 ΔacrB	AcrB ^{His}	256	256	128	0.5	1	256	16	64	256	8,192	8
BL21 ΔacrB	AcrB ^{S15TA^S}	128	256	256	0.5	1	256	16	32	128	1,024	8
BL21 ΔacrAB	Vector (pBAD33)	0.5	0.5	8	0.13	0.5	4	4	4	4	8	4
BL21 ΔacrAB	AcrB ^{His}	0.5	0.5	8	0.13	0.5	4	2	4	8	8	8
BL21 ΔacrAB	AcrB ^{S15TA^S}	64	128	128	0.25	0.5	256	8	16	64	2,048	4

MPIPC: oxacillin, MCIPC: cloxacillin, EM: erythromycin, MINO: minocycline, NA: nalidixic acid, NB: novobiocin, ACR: acriflavine, CV: crystal violet, EB: ethidium bromide, Rho6G: rhodamine6G, BZN: benzalkonium

最終目的である AcrA-AcrB-TolC 三者複合体の構造解析に向けて、細胞外ループに PA タグを付加した外膜チャネル TolC の大量発現、精製法を確立した。レアコドンの修正と精製法の最適化により均質な TolC 標品を安定的に得られるようになった。単独で構造解析された TolC (Koronakis et al. *Nature*, 405 (2000))は、その C 末の 43 アミノ酸残基をプロテアーゼ消化してある。Koronakis らは活性を保持していると報告しているが、C 末は三者複合体形成に重要という報告もあることから、我々は全長 TolC を用いる事とした。

この他、安定三者複合体作成へのアプローチとして AcrB-TolC 結合面へのシステイン導入によるジスルフィド結合形成を利用する。これは三者をクロスリンカーを用いて非特異的に固定する海外グループの方法と異なり、生理的構造を損なう危険性がより少ない方法と考えられる。システイン導入変異体を用いた in vivo 実験において、AcrB-AcrA-TolC 三者複合体の形成を確認した(図 28)。



本研究を開始して以後、海外のグループから CryoEM を用いた AcrAB-TolC 三者複合体構造が相次いで報告された。MexY の項で触れた通り、これらの構造は AcrB:AcrA:TolC 構成比が 3:6:3 である。一方で我々は AcrB と TolC は適切な位置にシステイン残基を導入するとジスルフィド結合を形成すること、構成比 1:1 の AcrB-AcrA 融合タンパクが排出活性を有していることを示した。融合タンパクの排出活性は野生型 AcrAB に比べて低かったが、重要なことは、野生型 AcrA を共発現させる条件下でも、融合タンパクの比活性は変化しなかったことである。これは少なくとも排出には融合タンパクと TolC のみで十分であること、すなわち、排出活性に必要な構成比は AcrB:AcrA

=3:3であることを意味している。AcrA3分子では筒状構造を構成できないので cryo-EM で確認されている構造とは整合性が無い。やはりクロスリンカーを使わないで調整された安定複合体の結晶構造解析が重要である。システインを導入した TolC とリンカータンパクの安定複合体を十分量得るのに大変手間取ったが、残り1年全力で結晶化に取り組む。

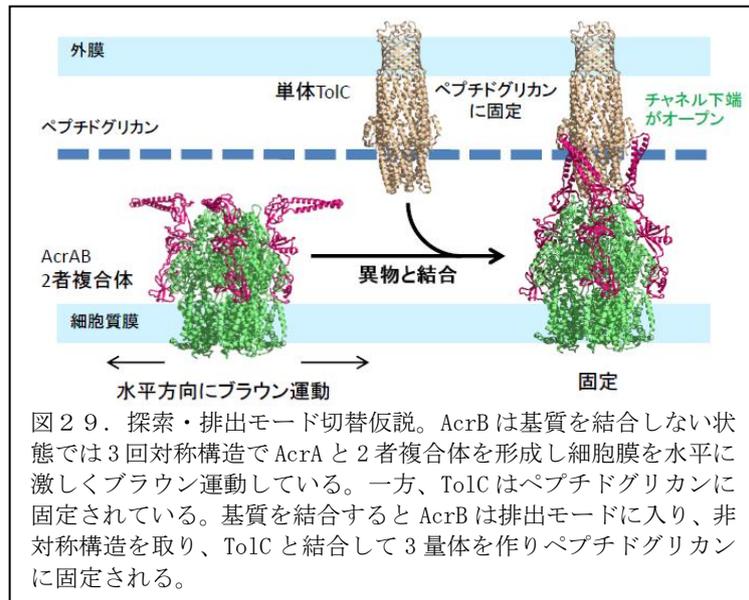
3.2.2. 排出複合体構造解析とダイナミクス解析(タンパク質動態解析グループ)

異物排出タンパクは、普段は AcrA-AcrB 2者複合体として、細胞膜を自由に拡散しており、基質を結合すると初めてペプチドグリカンに固定されている TolC チャンネルと一時的に合体して異物を放出すると推定される。この探索・排出モード切替仮説を検証するため、AcrB および TolC を蛍光標識して、FDAP(光活性化後蛍光減衰)及び FRAP(光退色後蛍光回復)解析を用いて分子動態を測定した。

この仮説が正しいければ、通常は2者複合体で存在し、細胞膜上を激しくブラウン運動しているはずである。TolC 欠損菌においては AcrA-AcrB-TolC 3者複合体は形成されず早い運動が検出され、そこに TolC を発現させると3者複合体としてペプチドグリカンに固定され運動が抑制される結果が得られると期待された(図29)。

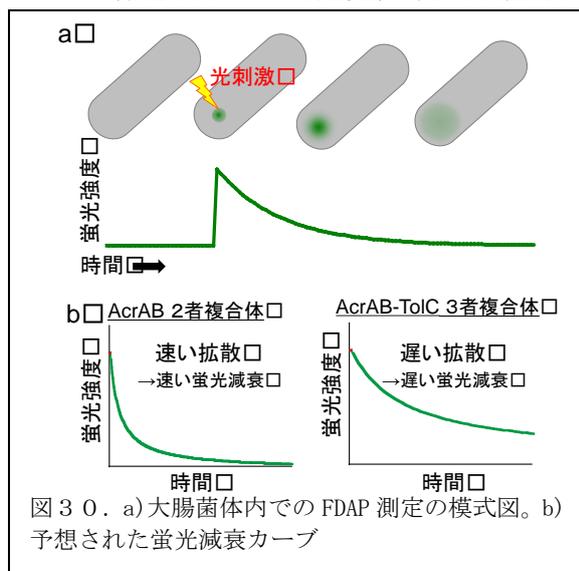
FDAP, FRAP 測定では、菌体内の限定された領域に刺激光を照射して蛍光強度の減衰曲線から拡散係数を求めるが(図30)、ほ乳類培養細胞と異なり光学顕微鏡の回折限界の数倍の幅しか持たない大腸菌体内では光活性化した分子が拡散により希釈されていくのに十分なスペースが無い。そこで、細胞分裂時の隔壁合成を阻害する薬剤等を添加して、菌体を伸張させるを試みた。FDAP 測定のために光活性化蛍光タンパク質 PA-GFP を融合した AcrB を発現誘導させた菌体に対して Piperazine、Ceftazidime、Cephalexin を添加し、菌体の伸長と光刺激による PA-GFP の活性化を評価した。その結果、Ceftazidime を添加した場合に観察に適切な 20 μm 程度に伸長した菌体を得ることができ、光刺激による PA-GFP 蛍光の出現も良好であったことから、以降は Ceftazidime 添加により伸長させた菌体を測定に用いた。

AcrB の動態解析は、AcrB 欠損大腸菌に AcrB と PA-GFP の融合タンパク質を発現させた菌体を用いて行った。光活性化能を向上させる為に、AcrB と PA-GFP との融合蛋白質のリンカー長を伸ばすとともに PA-GFP 部分をフォールディング効率の良い変異体(C3PA-GFP)に入れ替えたコンストラクトを用いることにより、大腸菌内でより安定に光活性化を起こすことが出来るようになった。内在 TolC 発現株と TolC 欠損株について測定結果を比較したところ、TolC 存在下では TolC 欠損株に比べて蛍光減衰が遅くなっており、AcrB の拡散速度が



FDAP, FRAP 測定では、菌体内の限定された領域に刺激光を照射して蛍光強度の減衰曲線から拡散係数を求めるが(図30)、ほ乳類培養細胞と異なり光学顕微鏡の回折限界の数倍の幅しか持たない大腸菌体内では光活性化した分子が拡散により希釈されていくのに十分なスペースが無い。そこで、細胞分裂時の隔壁合成を阻害する薬剤等を添加して、菌体を伸張させるを試みた。FDAP 測定のために光活性化蛍光タンパク質 PA-GFP を融合した AcrB を発現誘導させた菌体に対して Piperazine、Ceftazidime、Cephalexin を添加し、菌体の伸長と光刺激による PA-GFP の活性化を評価した。その結果、Ceftazidime を添加した場合に観察に適切な 20 μm 程度に伸長した菌体を得ることができ、光刺激による PA-GFP 蛍光の出現も良好であったことから、以降は Ceftazidime 添加により伸長させた菌体を測定に用いた。

AcrB の動態解析は、AcrB 欠損大腸菌に AcrB と PA-GFP の融合タンパク質を発現させた菌体を用いて行った。光活性化能を向上させる為に、AcrB と PA-GFP との融合蛋白質のリンカー長を伸ばすとともに PA-GFP 部分をフォールディング効率の良い変異体(C3PA-GFP)に入れ替えたコンストラクトを用いることにより、大腸菌内でより安定に光活性化を起こすことが出来るようになった。内在 TolC 発現株と TolC 欠損株について測定結果を比較したところ、TolC 存在下では TolC 欠損株に比べて蛍光減衰が遅くなっており、AcrB の拡散速度が



FDAP, FRAP 測定では、菌体内の限定された領域に刺激光を照射して蛍光強度の減衰曲線から拡散係数を求めるが(図30)、ほ乳類培養細胞と異なり光学顕微鏡の回折限界の数倍の幅しか持たない大腸菌体内では光活性化した分子が拡散により希釈されていくのに十分なスペースが無い。そこで、細胞分裂時の隔壁合成を阻害する薬剤等を添加して、菌体を伸張させるを試みた。FDAP 測定のために光活性化蛍光タンパク質 PA-GFP を融合した AcrB を発現誘導させた菌体に対して Piperazine、Ceftazidime、Cephalexin を添加し、菌体の伸長と光刺激による PA-GFP の活性化を評価した。その結果、Ceftazidime を添加した場合に観察に適切な 20 μm 程度に伸長した菌体を得ることができ、光刺激による PA-GFP 蛍光の出現も良好であったことから、以降は Ceftazidime 添加により伸長させた菌体を測定に用いた。

低下していることが分かった。同様に、AcrA についても発現株の方が欠損株に比べて蛍光減衰が遅くなっており AcrB の拡散速度の低下が示されたことから、菌体内の定常状態においては AcrAB-TolC 3者複合体が形成されて AcrB の拡散が抑制されていることが示唆された(図31a)。

AcrB との共結晶構造中で遠位ポケットに結合していた分子量の小さい基質として Minocycline と Doxorubicin、近位ポケットに結合していた分子量の大きい基質として Erythromycin と Rifampicin を添加して FDAP 測定を行なった(図31b)。探索・排出モード切替仮説では基質存在下での AcrB 動態の抑制が予想されていたが、遠位ポケット結合基質では、その予想に反して基質を添加していない場合と同様の蛍光減衰を示した(図31c)。それに対して近位ポケット結合基質を添加した場合は、AcrB 拡散の抑制に伴う蛍光減衰速度の低下が見られた(図31d)。これらの結果から、基質を添加していない場合に細胞膜上を自由に拡散する状態と TolC と結合して3者複合体を形成する状態の平衡状態にある AcrB が、小サイズの遠位結合基質添加時はその平衡を変化させず、サイズの大きい近位結合基質を添加した時に平衡がより3者複合体に傾いたことが示唆される。そして、基質のサイズの違いによる AcrB 内基質ポケットでの滞在時間の差がこのような違いを生み出していることが予想される。

AcrB に関しては、既に近位結合基質の結合が阻害される変異体が得られていたため、これらの変異体に関して基質の有無による動態の変化を測定した。近位結合基質 Erythromycin を阻害する変異として、側鎖のかさ高い残基への変異導入により基質の排出を阻害した変異体 AcrB(S79R/T91R)と、結晶構造中で Erythromycin と直接相互作用している残基への変異導入により結合を阻害した変異体 AcrB(S134A/S135A)に対して FDAP 測定を行った。立体障害により非特異的に近位ポケット結合基質の結合を阻害するタイプの変異体 AcrB(S79R/T91R)では、Erythromycin と Riphampicin のいずれの近位ポケット結合基質についても野生型 AcrB にこれらの基質を添加した場合に比べて蛍光減衰が速くなり、平衡がより自由拡散する状態にシフトしていることが示唆された(図32上)。それに対して、Erythromycin 特異的な相互作用を阻害した AcrB(S134A/S135A)では、Erythromycin 添加時については AcrB(S79R/T91R)変異体と同様に蛍光減衰速度が基質を添加していない場合と同程度までに速くなったが、Riphampicin 添加ではそのような顕著な減衰速度の増加は見られなかった(図32下)。AcrB(S134A/S135A)変異は Riphampicin の

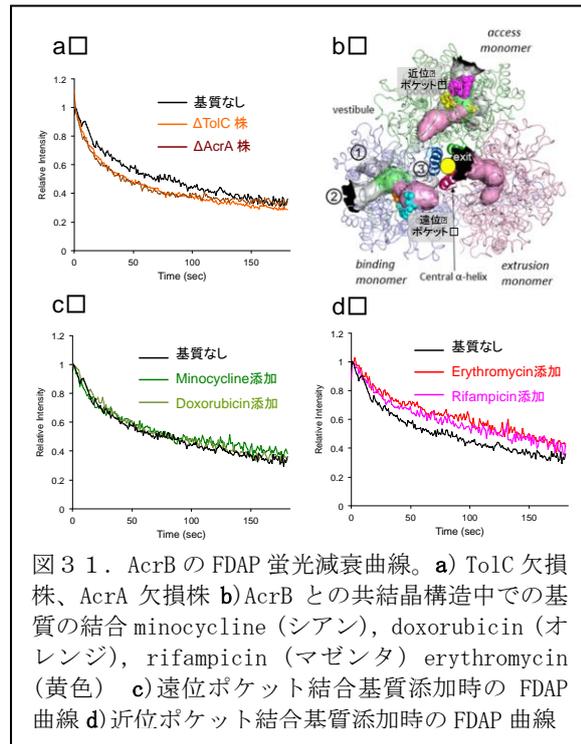


図31. AcrB の FDAP 蛍光減衰曲線。a) TolC 欠損株、AcrA 欠損株 b) AcrB との共結晶構造中での基質の結合 minocycline (シアン), doxorubicin (オレンジ), rifampicin (マゼンタ) erythromycin (黄色) c) 遠位ポケット結合基質添加時の FDAP 曲線 d) 近位ポケット結合基質添加時の FDAP 曲線

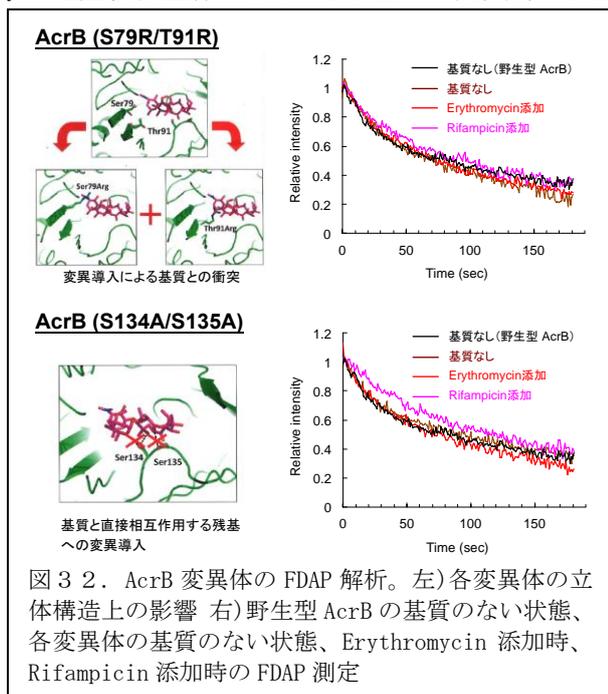


図32. AcrB 変異体の FDAP 解析。左) 各変異体の立体構造上の影響 右) 野生型 AcrB の基質のない状態、各変異体の基質のない状態、Erythromycin 添加時、Rifampicin 添加時の FDAP 測定

近位ポケット内での滞在を阻害するものではないことを考慮すると、基質の近位ポケット内での滞在時間と AcrB の動態には相関があり、滞在時間が長いほど3者複合体の形成が安定化されている可能性が考えられる。

さらに、AcrB 遠位ポケット内で結合した状態での結晶構造が解かれている AcrB の基質排出阻害剤である Pyridopyrimidine 誘導体 ABI-PP を添加した場合の AcrB 動態を FDAP により解析した。阻害剤はポケット内に留まって基質の排出経路を塞ぐことによって排出を阻害すると考えられているため、遠位ポケットへの基質結合が3者複合体形成の促進に何らかの影響を与えているのならば阻害剤添加により減衰速度が低下することが予想される(図33a)。

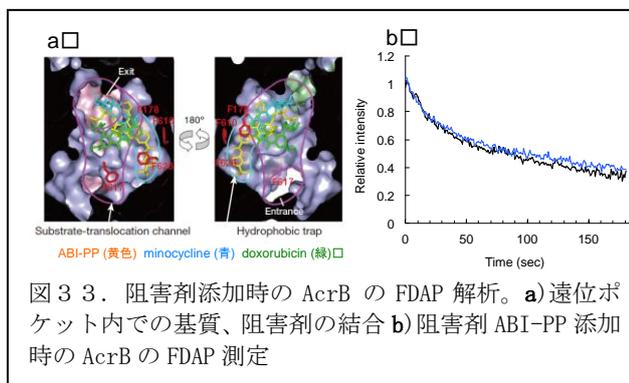


図33. 阻害剤添加時の AcrB の FDAP 解析。a) 遠位ポケット内での基質、阻害剤の結合 b) 阻害剤 ABI-PP 添加時の AcrB の FDAP 測定

が予想される(図33a)。ABI-PP 添加時の FDAP 蛍光減衰曲線が基質を添加しない場合と比較して減衰速度の低下を引き起こさなかったことから、遠位ポケットへの基質結合は3者複合体形成の安定化に寄与していないことが裏付けられた(図33b)。

TolC の動態に関しては、強固な架橋構造を取っているペプチドグリカン層を貫通しているため、細胞外膜上での移動はほとんど起こらないことを仮定しているが、TolC の運動を直接測定したデータはこれまでに報告されていない。当初は、AcrB の動態測定と同様に蛍光タンパク質と融合させた TolC を用いた FDAP、FRAP 解析を行うことを予定していたが、蛍光タンパク質の種類、TolC 内での融合させる位置、タンパク質間のリンカー長を変化させても蛍光を発する融合タンパク質を得ることはできなかった。そこで、TolC の細胞外ループ領域を蛍光標識した抗体で認識させて標識させることを試みた。菌体を抗 PA tag 抗体で認識させて蛍光2次抗体で検出したところ、細胞外ループに PA tag を挿入した TolC を発現させた細胞で特異的に蛍光を観察することができた。3量体の TolC のそれぞれに PA tag と2次抗体を結合させた状態での観測は TolC の動態に大きな影響を与えることが予想されたため、PA tag 抗体を還元して H 鎖間の S-S 結合を切断し、生じた SH 基を蛍光色素で標識したものをを用いた。マレイミド化された光活性化型蛍光色素 CAGE 590 と赤色蛍光色素 Cy3 を用いて標識を試みたが、CAGE 590 については、解析に十分な光活性化が起こらなかったため、Cy3 標識した還元 PA tag 抗体を用いた FRAP 解析を行なっている。既に、これまでに予想と一致するような TolC がほとんど運動しないことを示す結果を得ている。

AcrB の動態については最近1分子追跡による解析が報告されており、拡散係数が本研究での FDAP 蛍光減衰曲線をモデル式にフィッティングさせることによって得られる値と同じオーダーの値であったことより両測定の妥当性が確認された(Yamamoto K. *et al. Sci Rep.* 2016)。本研究では、AcrB-基質複合体の結晶構造を元に基質を分類し、それぞれを添加した場合の3者複合体形成能の違いを AcrB 変異体や基質阻害剤の解析を通して見出したことに先行研究との違いがある。

3. 3. 排出タンパク構造に基づく阻害剤の分子設計・有機合成(有機合成研究グループ)

(i) 研究目的

「構造・排出輸送研究」グループによる AcrB 及び MexB とそれらに対する既知の排出能阻害剤であるピリドピリミジン誘導体 (D13-9001/ABI-PP) の共結晶構造解析から、阻害剤結合ポケットの存在が初めて明らかにされた。本分担研究課題においては、結晶構造解析によって得られた阻害剤結合ポケット周辺の立体構造情報に基づく医薬設計 (SBDD) により、緑膿菌の有する2つの主たる排出ポンプ MexB 及び MexY を同時に阻害する広域阻害剤の創出を研究目的とした。また、化合物ライブラリに対するスクリーニングにより、ABI-PP とは作用機序が異なる新たなシード化合物の探索研究も遂行した。

(ii) 研究実施方法

MexY の結晶構造解析は現在なお鋭意検討中であるが、MexB と ABI-PP との共結晶構造を基にしたホモロジーモデル解析から、MexB 阻害剤である ABI-PP が MexY の排出能を阻害できない

理由も明らかにしている。すなわち、AcrB や MexB の阻害剤ポケット壁にある Phe が MexY では Trp に置き代わっており、そのインドリル側鎖との立体障害のために、阻害剤が結合ポケットに侵入できないことが、ABI-PP が MexY に対して阻害能を示さない理由であると結論された。したがって、SBDD の観点からは、Trp 側鎖との立体障害を回避できることが広域阻害剤の分子構造上の必須要件であると考えられた。そこで、ホモロジーモデルにおいて Trp との立体障害を生じている ABI-PP 分子中央の双環骨格を単環骨格に変更し、その構造展開によって広域阻害剤を創出する戦略を取った。

一方、MexB 及び MexY の阻害剤ポケットに対する Glide (Schrödinger) を用いたドッキングシミュレーションを、東京大学創薬オープンイノベーションセンター及び大阪大学創薬推進研究拠点創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業が提供する化合物データベースに対して実施し、両者に対して高いスコアを与える化合物を見出すバーチャルスクリーニングも実施した。ヒット化合物については、実際に化合物を入手し、阻害能評価を経て広域阻害剤を見出すことを計画した。

なお、医薬への応用展開においては、抗菌薬との併用を念頭に置き、それ自身は抗菌活性を持たない薬剤排出阻害能のみを示す化合物の創出を狙った。

(iii) 研究成果

SBDD による新規 MexB 阻害剤の創出

上述したとおり、ABI-PP 分子中央の双環骨格を単環骨格に置き換えるに際し、ABI-PP 同様 MexB 阻害剤として既知の DA-3849 の構造も参考に、**H-1** をテンプレート分子として設計した。その構造を A~C パートに3分割し、フォーカストライブラリを構築した(図34)。

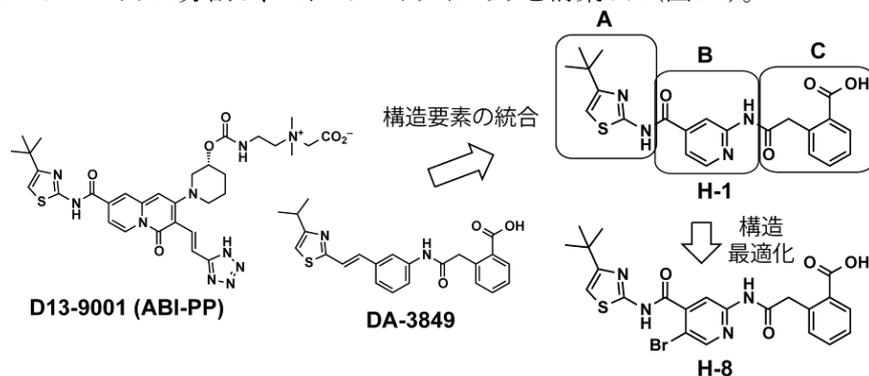


図34. SBDD による阻害剤設計:テンプレート(**H-1**)および最適化された MexB 阻害剤(**H-8**)。

その結果、**A** パートは排出阻害能の強弱に関わり、チアゾール環上置換基が小さいと阻害能が弱くなる。**B** パートはベンゼン誘導体でも許容であるが、ピリジン誘導体の方が若干阻害能が強い。より重要なのは **H-8** に例示されるハロゲン置換によって化合物単独での抗菌活性が消失することで、純粋に排出阻害能だけを示した点である。**C** パートは阻害能の有無に決定的な影響を与え、安息香酸誘導体としては、**H-1** のようにオルト置換体のみで阻害能が発現した。結果として、合成した 30 種の化合物群の中では、**H-8** が MexB に対してもっとも良好な阻害活性を示した。その阻害能は、既知の ABI-PP に匹敵し、したがって、はるかに分子量が小さく簡略化された新規 MexB 阻害剤の創出に成功した。

合成化合物の阻害能は以下の方法によって評価した。まず、化合物単独の抗菌活性は、大腸菌の薬剤排出システムである AcrAB-TolC の *acrB*, *tolC* 遺伝子欠損株 (vector 株) を用いて評価した(図35a)。この Δ *acrB* Δ *tolC* 株に緑膿菌の排出システム遺伝子 *mexB*-*oprM* (*pmexB* 株)、もしくは *mexY*-*oprM* (*pmexY* 株) を形質移入した大腸菌を、それぞれ MexB (図35b) 及び MexY (図35c) に対する阻害能評価に用いた。エリスロマイシン (EM) 併用時の両菌株の増殖をモニターすることで、化合物の排出ポンプ阻害能を知ることができる。いずれの場合も、菌株の増殖は 600 nm における光学的濁度 (OD600) の経時的測定によって評価した。図35には **H-8** に対する評価結果を示した。

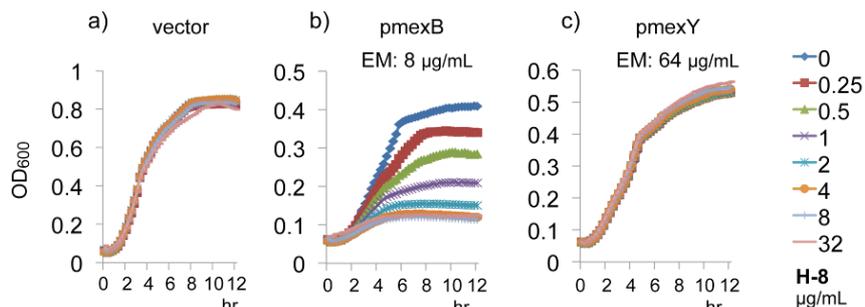


図35. **H-8** の a) 抗菌活性評価、b) MexB に対する阻害活性評価、および c) MexY に対する阻害活性評価。

H-8 は、阻害剤結合ポケットを消失させる MexB 変異体 (V139W) 発現大腸菌に対して活性を失うことから、結合ポケットに作用していることは明らかであったが、結合構造を知るべく、Glide を用いたドッキングシミュレーションを行った。図36に最もスコアの高い結合構造を示した。**H-8** 中央芳香環と MexB/F176 とのスタッキング相互作用に加え、安息香酸カルボキシレートと K151 アンモニウムとの水素結合/静電相互作用の寄与が示唆される。そこで、MexB 点変異体を発現取得し、この結合構造の妥当性を検証した。その際、MexB/K151A 変異体に加え、阻害剤結合ポケット周辺に存在する他の Arg/Lys 残基に変異を加えた K134A および R620A に対する活性評価も行った。その結果、**H-8** は、K134A, R620A 変異体には排出阻害活性を保持したが、予測したように、K151A 変異体に対して完全に阻害活性を失うことが明らかになった。図36の結合モデルの妥当性を示すとともに、安息香酸カルボキシレートと K151 アンモニウム間の相互作用の重要性を示している。

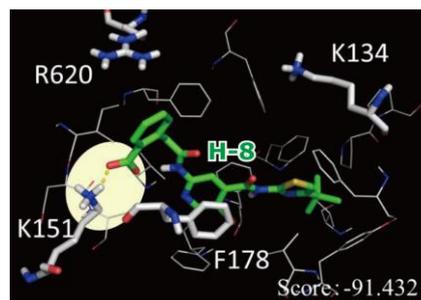


図36 **H-8** の MexB への結合構造モデル、Score は Emodel (kcal/mol) 値 (Glide)。

SBDD による広域阻害剤 **H-31** の創出

上述した点変異 MexB に対する **H-8** の結合様式の解析結果は、芳香環同士のスタッキング効果だけでは阻害能を発揮するには不十分で、水素結合/静電相互作用の寄与も必須であることを示唆している。

その観点からすると、MexB と MexY (ホモロジーモデル) の阻害剤結合ポケットには大きな相違がある。図37に、阻害剤結合ポケット周辺の静電ポテンシャルを表示した。

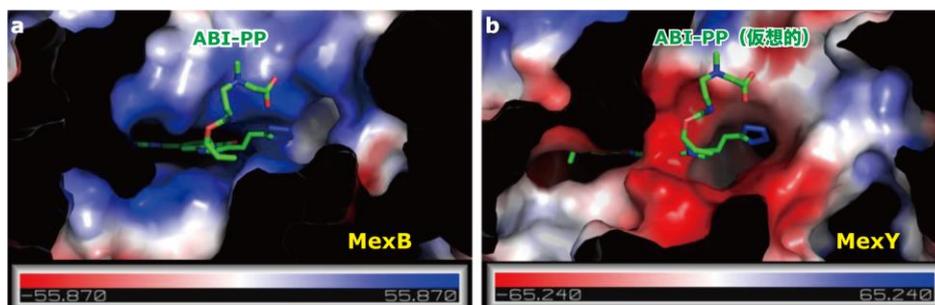


図37. a) MexB および b) MexY の ABI-PP 結合サイト周辺の静電ポテンシャル。

MexB の結合ポケットが正電荷 (K134, K151, R620) を帯びているのに対して、MexY のそれは負電荷を帯びている (E133, D175, E273, D615)。したがって、後者の結合ポケット内で水素結合/静電相互作用を狙うには、図34の C パートに塩基性官能基が必要であると推察した。そこで、A/B パートを図34に示す構造 (TBA-AA) に固定し、容易に構造展開を図れるアミノ酸残基を C パートとする化合物群を合成し、阻害能を評価した。その結果、主鎖二級アミンに加え、側鎖末端にも塩基性官能基を有するアミノ酸残基 (Lys, Arg, Orn) を導入した化合物群が、EM 併用下に pmexB および pmexY 株の増殖を顕著に阻害することを見出した。図38に代表例として、D-Lys 残基を持つ **H-31** の結果を示す。弱い抗菌活性を有するものの、EM 併用下に MexB および MexY 発現株の両方に強い増殖抑制効果を示すことは明らかであり、本分担研究の目的である広域阻害剤である可能性が示唆された。

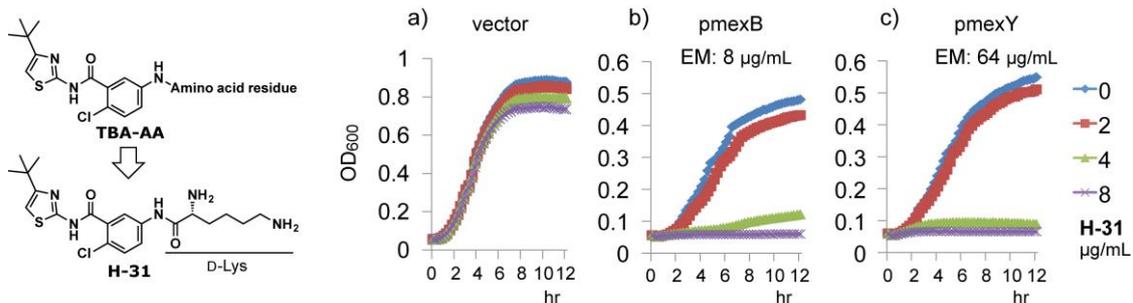


図38. **H-31** の a) 抗菌活性評価、b) MexB に対する阻害活性評価、および c) MexY に対する阻害活性評価。

臨床分離多剤耐性緑膿菌に対する **H-31** と既知抗菌薬との併用効果

実際に、臨床分離された多剤耐性緑膿菌 (MDRP) 55 株に対して、**H-31** と臨床現場で用いられる 5 種類の抗菌薬 (CPFV: シプロフロキサシン、IPM: イメペネム、AMK: アミカシン、CAZ: セフトジジム、AZT: アズトレオナム) との併用効果を調べた。ABI-PP および広域排出阻害剤として知られる PAβN を対象化合物として比較したが、**H-31** は抗菌薬との併用により、いずれの既知阻害剤よりも強い増殖阻害効果を示した。特に AZT および CPFV との併用効果は顕著であり、抗菌薬の MIC 値を大きく低減させた (図39)。すなわち、**H-31** は抗菌薬との併用薬として MDRP 治療薬になり得ることが示された (JST から特許出願: 特願 2015-238703)。

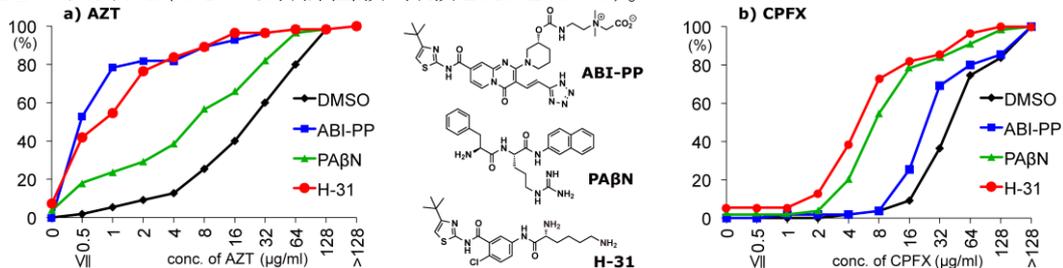


図39. 臨床分離多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬 (a) AZT、b) CPFV と排出阻害剤の併用効果。阻害剤濃度は 32 µg/mL。縦軸は各抗菌薬濃度が MIC 以下である菌株数の総株数 (55 株) に対する割合。

この成果によって、国内製薬企業との共同研究契約を締結することができ、今後の創薬展開に向けた体制を確立した。

H-31 の作用機序解析

H-31 は、MexB と ABI-PP との共結晶構造を基に SBDD によって創出した化合物であり、想定した阻害剤ポケットに結合していると考えるのが妥当である。しかし、**H-8** の MexB に対する阻害能の濃度依存性 (図35b) と **H-31** のそれ (図38b,c) には明らかな相違がある。すなわち、**H-31** の阻害有効濃度には明瞭な閾値が存在している。そこで、薬剤排出系以外への効果の有無を明らかにすべく、排出系を持たない vector 株に対する EM との併用効果を検証した。Vector 株が増殖し得る低濃度 (1~4 µg/mL) の EM 存在下に、**H-8** および **H-31** を添加したところ、前者が何らの影響を与えないのに対して、後者の添加は著しく vector 株の増殖を阻害した。この結果は、先に明らかにしたように、**H-8** が阻害剤ポケットに結合し、純粋な MexB 排出能阻害剤として機能していることを示すと同時に、**H-31** が EM の外膜透過性を向上させる効果を有することを示している。斯様な透過性の向上は、**H-31** の外膜障害性によってもたらされると考えられる。そこで、やはり外膜障害性を持つことが知られている PAβN とともに、pmexB 株に対する nitrocefin を用いた外膜障害性評価を行った。図40には、外膜障害性 (棒グラフ) とともに、EM 8 µg/mL 併用時の pmexB 株対

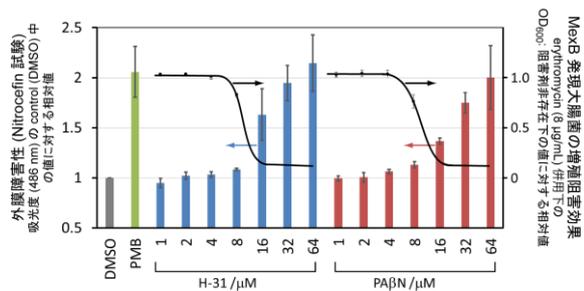


図40. **H-31** と PAβN の外膜障害性と MexB 発現大腸菌に対する増殖阻害に対する有効濃度の相関 (PMB: polymyxin B、外膜障害の positive control)。

する増殖抑制効果(曲線)を示した。両者の外膜障害性と増殖阻害効果は酷似しており、いずれにも閾値が存在するとともに、その値もおよそ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と同程度であった。すなわち、前述した抗菌薬の外膜透過性向上効果と増殖抑制効果に強い相関があることを示している。

一方で、内膜局在性蛍光物質である NileRed を用いたリアルタイム排出測定の結果から、**H-31** や PA β N が NileRed の MexB および MexY による排出を阻害していることも確認できた。ただ、**H-8** の結合部位を特定した際と同様の点変異体を用いた EM 併用時の増殖阻害活性を検証したところ、SBDD の基にした阻害剤結合ポケットには作用していないことが判明した。すなわち、**H-31** は塩基性官能基との水素結合/静電相互作用を期待した残基に対する変異体 (MexB/D274A, MexY/E273A, MexY/D615R) のみならず、**H-8** の活性を消失させた MexB/V139W に対しても完全に活性を保持した。

以上から、**H-31** は外膜障害性を併せ持つ排出阻害剤であると結論されるが、SBDD によって、これら 2 つの活性を分離する可能性を追究して行くには、**H-31** が緑膿菌の多剤排出システム MexAB-OprM あるいは MexXY-OprM のどこにどのように関わっているかについて、構造情報を含めた詳細を解明する必要がある。

バーチャルスクリーニングによる排出阻害剤の探索: MexY 選択的阻害剤

東京大学創薬オープンイノベーションセンターの提供するデータベース(約 21 万化合物)を用いて、MexB (結晶構造) および MexY (ホモロジーモデル) の阻害剤ポケット構造を基にバーチャルスクリーニングを実施し、それぞれに対する score 上位の 600 化合物(重複を除く 995 化合物)を選定した。この 995 化合物について化合物の提供を受け、実際に、vector 株を用いた抗菌活性評価と EM 併用下の pmexB 株および pmexY 株に対する増殖抑制効果を評価した。その結果、MexY に対する阻害活性を持つ 28 化合物を見出した。その中でも 4 化合物は MexB にも阻害活性を持つ広域阻害能を持つことが示唆された。ただし、そのうちの 2 種は PA β N と酷似した構造であり外膜障害能を併せ持つと予測した。残る 2 種のヒット化合物の 1 つである 6-oxa-2-azaspiro[3.4]octane 骨格を母核とする **639 B-8 (K-1 とコード)** とその不斉炭素を窒素原子に置換した 2,6-diazaspiro[3.4]octane 骨格化合物 **J-1** をプレート化合物として、その周辺にフォーカストライブラリを構築した。これらは、EM 存在下に MexY 発現株選択的に増殖抑制効果を示したが、スクリーニング段階で示唆された MexB に対する阻害能は、あったとしても極めて弱く広域阻害能を明確に示す化合物は見出せていない。これまでに 90 種の化合物を得ているが、その中で、**J-46**(図43)の

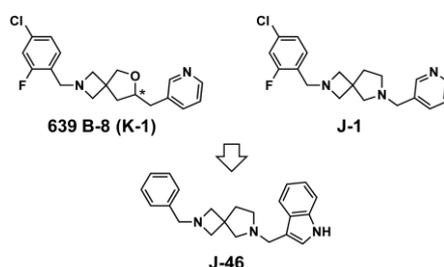


図43. J-/K-series 化合物.

活性が最も高く、EM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 併用時に pmexY 株の増殖を $\text{EC}_{50} = 18 \mu\text{M}$ で抑制した。シード化合物 **K-1** ($\text{EC}_{50} \geq 128 \mu\text{M}$) からかなり活性を向上させることに成功したと言える。J-series 化合物は、単独ではほとんど抗菌活性を持たず、nitrocefin 試験から外膜障害性を持たないことも確認した。さらに、pmexY 株に対する排出阻害によって ethidium bromide の菌内への取込みを促進させることも明らかにした。すなわち、J-series 化合物は、これまで報告例のない MexY 選択的阻害剤としての価値がある。今後、MexY との共結晶構造が得られれば、MexB の阻害剤結合構造との比較が可能となり、SBDD による広域阻害剤への展開を図れるものと期待される。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌16件(未発表1件))

1. Hajime Shinoda, Yuanqing Ma, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Tomoki Matsuda and Takeharu Nagai, "Acid-tolerant monomeric GFP from *Olindias Formosa*", *Cell Chem Biol*, 25 (3), 330-338, 2018
2. Martijn Zwama, Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi, "Multiple Entrances of the Efflux Transporter AcrB Contribute to Multidrug Recognition", *Nature Communications*, 9(124), 1-9, 2018
3. Martijn Zwama, Katsuhiko Hayashi, Keisuke Sakurai, Ryosuke Nakashima, Kimie Kitagawa, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi, "Hoisting-loop in bacterial multidrug exporter AcrB is a highly flexible hinge that enables the large motion of the subdomains", *Frontiers in Microbiology*, 8(2095), 1-8, 2017
4. Keisuke Sakurai, Seiji Yamasaki, Kaori Nakao, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi and Ryosuke Nakashima, "Crystal structures of multidrug efflux pump MexB bound with high molecular mass compounds" Scientific Reports(under revision)
5. Yuji Morita, Ken-ichi Nakashima, Kunihiko Nishino, Kenta Kotani, Junko Tomida, Makoto Inoue, and Yoshiaki Kawamura, "Berberine Is a Novel Type Efflux Inhibitor Which Attenuates the MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*", *Front. Microbiol.*, 7, 1223, 2016
6. Seiji Yamasaki, Takuma Fujioka, Katsuhiko Hayashi, Suguru Yamasaki, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino, "Phenotype microarray analysis of the drug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *J. Infect. Chemother.*, 22(11), 780-784, 2016
7. Yoshimi Matsumoto, Shouichi Sakakihara, Andrey Grushnikov, Kazuma Kikuchi, Hiroyuki Noji, Akihito Yamaguchi, Ryota Iino, Yasushi Yagi, and Kunihiko Nishino, "A Microfluidic Channel Method for Rapid Drug-Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa*", *PLoS One*, 11(2), e0148797, 2016
8. Katsuhiko Hayashi, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Kimie Kitagawa, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino, and Akihito Yamaguchi, "AcrB-AcrA Fusion Proteins That Act as Multidrug Efflux Transporters", *J. Bacteriol.*, 198(2), 332-342, 2015
9. Katsuhiko Hayashi, Aiko Fukushima, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino, "Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*", *Front. Microbiol.*, 5, 180, 2014
10. Naoki Kobayashi, Norihisa Tamura, Hendrik W. van Veen, Akihito Yamaguchi and Satoshi Murakami, "β-Lactam Selectivity of Multidrug Transporters AcrB and AcrD Resides in the Proximal Binding Pocket", *J. Biol. Chem.*, 289(15), 10680-10690, 2014

11. Seiji Yamasaki, Li-Yuan Wang, Takahiro Hirata, Mitsuko Hayashi-Nishino, and Kunihiko Nishino, "Multidrug efflux pumps contribute to *Escherichia coli* biofilm maintenance", *Int. J. Antimicrob. Agents*, **45**, 439-441, **2014**
12. Seiji Yamasaki, Saya Nagasawa, Aiko Fukushima, Mitsuko Hayashi-Nishino and Kunihiko Nishino, "Cooperation of the multidrug efflux pump and lipopolysaccharides in the intrinsic antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**(5), 1066-1070, **2013**
13. Suguru Yamasaki, Eiji Nikaido, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Daisuke Fujiwara, Ikuo Fujii and Kunihiko Nishino, "The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs", *Nature Communications*, **4**, 2078, **2013**
14. Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Seiji Yamasaki, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi, "Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters", *Nature*, **500**(7460), 120-126, **2013**
15. Ryota Iino, Yoshimi Matsumoto, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi and Hiroyuki Noji, "Design of a large-scale femtoliter droplet array for single-cell analysis of drug-tolerant and drug resistant bacteria", *Front. Microbiol.*, **4**, 300, **2013**
16. Ryota Iino, Kohei Hayama, Hiromi Amezawa, Shouichi Sakakihara, Soo Hyeon Kim, Yoshimi Matsumono, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi and Hiroyuki Noji, "A single-cell drug efflux assay in bacteria by using a directly accessible femtoliter droplet array", *Lab. Chip.*, **12**(20), 3923-3929, **2012**

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Kunihiko Nishino, (2018), Regulation of the expression of bacterial multidrug exporters by two-component signal transduction systems, *Methods Mol. Biol.*, **1700**, 239-251
2. Ryota Iino, Syoichi Sakakihara, Yoshimi Matsumoto, and Kunihiko Nishino, (2018), Large scale femtoliter droplet array for single cell efflux assay of bacteria, *Methods Mol. Biol.*, **1700**, 331-341
3. Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Akihito Yamaguchi, (2018) Crystallographic Analysis of Drug and Inhibitor-Binding Structure of RND-type Multidrug Exporter AcrB in Physiologically-Relevant Asymmetric Crystals, *Methods Mol. Biol.*, **1700**, 25-36, **2018**
4. Etienne Giraud, Sylvie Baucheron, Isabelle Monchaux, Benoît Doublet, Kunihiko Nishino, and Axel Cloeckert. (2017) Role of individual bile salts and of the ramRA multidrug efflux regulatory locus in the bile-mediated repression of *Salmonella Typhimurium* cell invasion, (submitted)
5. 山崎聖司、林克彦、櫻井啓介、中島良介、山口明人、西野邦彦. (2017) グラム陰性

菌の薬剤排出トランスポーター, 細胞, 49(11), (533)7-(537)11. 2017 年 9 月号
(2017 年 8 月 20 日刊行)

6. 森田雄二、西野邦彦、「若手が拓く微生物薬学:多剤耐性菌と闘う」, 薬学雑誌, 137(4), 371-372, 2017
7. 西野邦彦、「薬剤耐性における薬剤排出ポンプの役割」, 化学療法の領域, 33(5), (1029)79-(1039)89. 2017 年 5 月号(第 33 巻 第 5 号)(2017 年 4 月 25 日発行)
8. 山崎聖司, 中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦、「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」, 薬学雑誌, 137(4), 377-382, 2017
9. 松田知己、「蛍光タンパク質—知っておきたい性質—」, 生物工学会誌, 94(9), 555-558, 2016
10. Ryota Iino, Shouichi Sakakihara, Yoshimi Matsumoto, Kunihiko Nishino, “Single-Cell Detection and Collection of Persister Bacteria in a Directly Accessible Femtoliter Droplet Array”, *Methods Mol. Biol.*, **1333**, 101-109, **2016**
11. 松田知己、永井健治、「超解像イメージングに利用する光スイッチング蛍光タンパク質の種類と特性」, 初めてでもできる! 超解像イメージング(岡田康志 編、羊土社), 第 3 章1, 138-145, 2016
12. Masakazu Agetsuma, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, “Methods for monitoring signaling molecules in cellular compartments”, *Cell Calcium*, **64**, 12-19, 2016
13. Kunihiko Nishino, “Antimicrobial drug efflux pumps in Salmonella”, Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications(Edited by Xian-Zhi Li, Christopher A. Elkins and Helen I. Zgurskaya (Springer)), Chapter 10, 261-279, 2016
14. Akihito Yamaguchi, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, "Structural basis of RND-type multidrug exporters", *Front. Microbiol.*, **6**, 327, **2015**
15. 松田知己、永井健治、「蛍光スイッチングイメージング、光スイッチング蛍光タンパク質を利用したバイオイメージング技術」, 光アライアンス, 26(11), 1-5, 2015
16. 永井健治、松田知己、「蛍光および化学発光タンパク質の様々な応用」, 生物物理, 55(6), 305-310, 2015
17. 永井健治、松田知己、「蛍光タンパク質の利用」, 新・生細胞蛍光イメージング, 第 13 章, 114-126, 2015
18. 原口徳子、永井健治、松田知己、「スペクトルイメージングによる FRET の検出」, 新・生細胞蛍光イメージング, 実習 7-1, 299-302, 2015
19. 松田知己、永井健治、「光退色/光活性化を利用したイメージング (FRAP, FDAP)」発光の事典, 基礎からイメージングまで, 7.3.6, 661-668, 2015

20. 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, 31, 433-439, 2015
21. Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, “Quantitative measurement of intracellular protein dynamics using photobleaching or photoactivation of fluorescent proteins”, *Microscopy*, **63** 403-408, 2014
22. Takeharu Nagai, Kazuki Horikawa, Kenta Saito, Tomoki Matsuda, “Genetically encoded Ca²⁺ indicators; expanded affinity range, color hue and compatibility with optogenetics”, *Front. Mol. Neurosci.*, **7**, 90, 2014
23. 松田知己, 永井健治, “光スイッチング機能プローブで挑む細胞の個性”, 生体の科学, 65, 101-106, 2014
24. 山口明人, 中島良介, 櫻井啓介, “多剤耐性菌感染症の原因となる多剤排出タンパク質の阻害剤結合構造を決定”, 実験医学, 31(14), 2272-2276, 2013
25. Kunihiro Nishino, “Multidrug efflux pumps and development of therapeutic strategies to control infectious diseases”, *Chembiomolecular Science*, **Part3**, 269-279, 2013

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議18件、国際会議 5件)

(主要な国際会議への招待講演の前に*を付記してください)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日
 1. 山崎聖司, 林克彦, 井上雄太, 樋口雄介, 櫻井啓介, 中島良介, 加藤修雄, 山口明人, 西野邦彦, 耐性菌多剤排出トランスポーターの生化学的解析と新規阻害剤開発, 第90回日本細菌学会総会, 仙台国際センター, 2017/3/19-21
 2. 中島良介, 櫻井啓介, 山口明人, RND型多剤排出トランスポーターの構造的基盤, 第90回日本細菌学会総会, 仙台国際センター, 2017/3/19-21
 3. 山口明人, 中島良介, 櫻井啓介, 異物排出輸送の作動原理, 第89回日本生化学会、シンポジウム「膜タンパク質分子作動原理解明の新機軸」、2016/09/26
 4. 松田知己, 蛍光タンパク質プローブによる生理機能のイメージングと操作, 近畿大学先端技術総合研究所高圧力蛋白質研究センターセミナー, 近畿大学先端技術総合研究所, 2016/8/2
 5. 西野邦彦, 病気と健康と細菌, 産研テクノサロン, 大阪, 2016/5/13
 6. Kunihiro Nishino, Function and regulation of bacterial multidrug efflux pumps, Symposium on Combatting Antimicrobial Resistance, University of Hong Kong, 2016/4/13
 7. 西野邦彦, 細菌の機能を制御する新手法の開発, 産研ざつくばらんトーク, 大阪, 2016/4/28
 8. 山崎聖司, 多剤耐性菌感染症の克服に向けた細菌薬剤排出ポンプの構造解析と阻

害剤開発, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜, 2016/3/29

9. 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, 東京工業大学, 2016/3/5
10. Seiji Yamasaki, Saki Shigeyama, Aiko Fukushima, Atsushi Kumanogoh, Kunihiko Nishino, Improvement of Gut Flora to Activate Human Power, 1st Osaka University COI International Conference, Osaka, Japan, 2016/12/13
11. 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
12. 山崎聖司, 私たちの身近な細菌～抗生物質が効かない菌って?～, 大阪府立茨木高等学校 卒業生講座, 大阪府立茨木高等学校, 2015/7/11
13. 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, ロイトン札幌, 2015/10/23
14. 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, 大阪薬科大学, 2015/12/5
15. Tomoki Matsuda, Fluorescent and bioluminescent sensors for imaging biological events, Roundtable discussion meeting on Photoreceptors, Frauenthemsee, Germany, Frauenwoerth, Germany, 2015/10/10
16. 松田知己, ライブイメージングのための蛍光タンパク質プローブの地道な開発, 大阪大学タンパク質研究所セミナー 構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 東京大学先端科学技術研究センター, 2016/3/2
17. 井上雄太, SBDD に基づいた多剤排出トランスポーター阻害剤の開発, 日本薬学会第 136 年会・大学院生シンポジウム, パシフィコ横浜, 2016/3/26, 国内
18. 松田知己, 「蛍光タンパク質プローブによる生理機能のイメージングと操作」, 第3回蛍光イメージングミニシンポジウム, 北海道大学 電子科学研究所, 2014 年 9 月 24 日
19. 櫻井啓介, 中島良介, 山崎聖司, 林克彦, 西野邦彦, 山口明人, 「RND 型異物排出タンパクのユニバーサル阻害剤開発」, 第 9 回トランスポーター研究会, 愛知県, 2014 年 6 月 14-15 日
20. 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 林克彦, 西野邦彦, 山口明人, 「多剤排出タンパク AcrB, MexB の阻害剤結合構造」, トランスポーター研究会, 熊本, 2013 年 6 月 15-16 日
21. Akihito Yamaguchi, "Inhibitor-bound structures of a multidrug exporters AcrB and MexB", Gordon Research Conference, "Multi-Drug Efflux Systems", Ventura, CA, USA, March 17-22, 2013

22. 山口明人, 中島良介, "異物排出輸送の構造的基盤", 第 85 回日本生化学大会, 福岡国際会議場, 2012 年 12 月 14-16 日
23. Akihito Yamaguchi, "Structural basis of multidrug efflux transport", G3 Meeting International(Japanese Nano-Macro materials, Devices and System Research Alliance), Tokyo, Japan, Oct.11-12, 2012

② 口頭発表 (国内会議38件、国際会議17件)

1. 山口明人、異物排出の構造的基盤と阻害剤の開発、CREST・さきがけ合同成果報告会、東京、2018/01/19
2. 山口明人、異物排出の構造的基盤:マルチエントランス/マルチパスの使い分け、日本生体エネルギー研究会/第43回討論会、京都、2017/12/19-21
3. Tomoki Matsuda, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino, Takeharu Nagai and Akihito Yamaguchi, Analysis of the dynamics of a multi-drug exporter AcrB in the absence and presence of substrates, The Biophysical Society 61st Annual Meeting, New Orleans, U.S.A. 2017/2/11-15
4. 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 86 回日本感染症学会 西日本地方会学術集会/第 59 回日本感染症学会 中日本地方会学術集会/第 64 回日本化学療法学会西日本支部総会, 沖縄, 2016/11/24-26
5. Seiji Yamasaki, Li-Yuan Wang, Takahiro Hirata, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino, Multidrug efflux pumps contribute to Escherichia coli biofilm maintenance, The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan, 2016/9/6-9
6. 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, 広島, 2016/10/21-22
7. 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, 2016/11/24-26
8. Hayashi K., Nakashima R., Sakurai K., Kitagawa K., Yamasaki S., Nishino K., and Yamaguchi A., Stoichiometry of a Functional AcrA and AcrB Complex, Gordon Research Seminar (Multi-Drug Efflux Systems) 2015, Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca (Barga), Italy, 2015/4/25
9. 山崎聖司, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親広, 星野一樹, 小野寺宜郷, 山口明人, 西野邦彦, 細菌異物排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明, 第 62 回 日本生化学会近畿支部例会, 立命館大学, 2015/5/16
10. 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 新任教授講演会, 大坂大学, 2015/5/21
11. 松本佳巳, 西野邦彦, 簡易迅速感受性測定法「DSTM 法」による ESBL/MBL 検出法, 第 63 回日本化学療法学会総会, 京王プラザホテル新宿, 2015/6/6

12. Suguru Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Sylvie Baucheron, Etienne Giraud, Benoît Doublet, Axel Cloeckaert, and Kunihiko Nishino, Crystal structure of multidrug resistance regulator RamR complexed with bile acids, 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment: ARAE2015, Vinci International Convention Centre, France, 2015/6/29-7/1
13. Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Akihito Yamaguchi, and Kunihiko Nishino, Inhibitor-bound structures and inhibition mechanism of multidrug efflux pumps, 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment: ARAE2015, Vinci International Convention Centre, France, 2015/6/29-7/1
14. 松本佳巳, 榊原昇一, 飯野亮太, 野地博行, 山口明人, Aixin Yan, 西野邦彦, マイクロデバイスと顕微鏡を用いる迅速感受性検査法の緑膿菌に対する有用性, 第 27 回臨床微生物迅速診断研究会総会, 金沢商工会議所, 2015/7/4
15. 山崎聖司, 耐性菌感染症の克服に向けた細菌薬剤排出ポンプの機能解析と阻害剤開発, 育志賞研究発表会, 京都大学, 2015/8/31
16. 山崎聖司, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親広, 星野一樹, 小野寺宜郷, 山口明人, 西野邦彦, 細菌異物排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明, 第 27 回微生物シンポジウム, 就実大学, 2015/9/4
17. 松本佳巳, 西野邦彦, 顕微鏡を用いた簡易迅速感受性測定法への画像解析ソフトウェアの導入, 第 63 回日本化学療法学会西日本支部総会, 奈良春日野国際フォーラム, 2015/10/15
18. 松本佳巳, 菊池和馬, Andrey Grushnikov, 西野邦彦, 八木康史, ソフトウェアを用いた Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM)法による迅速感受性測定画像の解析, 第 42 回薬剤耐性菌研究会, ホテルニューさがみや, 2015/10/29
19. Akihito Yamaguchi, Structural Basis of Bacterial Multidrug Efflux Pumps and Development of Pump Inhibitors, JST CREST-PREST Joint International Symposium “Structural Biological Dynamics from Molecules to Life with 60 Trillion Cells, The University of Tokyo, 2015/11/5
20. 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, 大阪大学, 2015/11/24
21. 山崎聖司, 井上雄太, 樋口雄介, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親広, 星野一樹, 小野寺宜郷, 加藤修雄, 山口明人, 西野邦彦, 多剤耐性菌感染症の克服に向けた細菌薬剤排出ポンプの構造解析と阻害剤開発, 第 68 回日本細菌学会関西支部総会, 京都薬科大学, 2015/11/28
22. 山崎優, 中島良介, 櫻井啓介, Sylvie Baucheron, Etienne Giraud, Benoît 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, 京都

薬科大学, 2015/11/28

23. 藤岡拓真, 山崎聖司, 西野美都子, 西野邦彦, フェノタイプマイクロアレイを用いたサルモネラ排出トランスポーターの解析, 第 68 回日本細菌学会関西支部総会, 京都薬科大学, 2015/11/28
24. 松田知己, 遺伝子コードされたケイジドカルシウムを用いた Ca^{2+} 操作, 第 38 回日本分子生物学会, 神戸ポートアイランド, 2015/12/4
25. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 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AcrB-AcrA 融合蛋白質の発現・解析と排出活性に必要な構成比の決定, 日本生体エネルギー研究会第 41 回討論会, 東京大学医学部1号館講堂, 東京, 2015/12/20
26. Hayashi-Nishino, Mitsuko; Hayashi, Katsuhiko; Fujioka, Takuma; Takeuchi, Yuna; Yamasaki, Seiji; Yan, Aixin; Nishino, Kunihiko, Xenobiotic recognition and efflux control by bacterial cells, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015: Pacificchem 2015, Hawaii, America, 2015/12/16
27. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 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AcrB-AcrA 融合蛋白質の発現・解析と排出活性に必要な構成比の決定, 日本生体エネルギー研究会第 41 回討論会, 東京大学医学部1号館講堂, 東京, 2015/12/20
28. 山口明人, 中島良介, 櫻井啓介, 異物排出ポンプによる異物認識と異物排出の構造的基盤, 日本生体エネルギー研究会第 41 回討論会, 東京大学, 2015/12/21
29. Kunihiko Nishino, Regulation and Function of Multidrug Exporters, Mini-Symposium, on Synthetic Biology, Osaka, Japan, 2016/1/26
30. Yuta Inoue, SBDD approach of the novel inhibitor of bacterial multidrug efflux transporter, Pacificchem2015, Honolulu, USA, 2015/12/17
31. 松本佳巳, 菊池和馬, Andrey Grushnikov, 西野邦彦, 八木康史, ソフトウェアを用いた Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM)法による迅速感受性測定画像の解析, 第 27 回日本臨床微生物学会総会, 仙台国際センター, 2016/1/29-31
32. Kunihiko Nishino, Regulation of bacterial multidrug exporters, JSPS-DAAD Joint Seminar at University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany, 2016/2/23-24
33. Katsuhiko Hayashi, Structural analysis of the complex of the AcrAB-TolC multidrug efflux system, JSPS-DAAD Joint Seminar at University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany, 2016/2/23-24
34. Martijn Zwama, Liposomal studies for efflux assays AcrB, JSPS-DAAD Joint Seminar at University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany, 2016/2/23-24
35. Yuna Takeuchi, Morphological analysis of drug resistant bacteria',

JSPS-DAAD Joint Seminar at University of Veterinary Medicine Hannover,
Hannover, Germany, 2016/2/23-24

36. Takuma Fujioka, Phenotype microarray analysis of the multidrug exporters in *Salmonella enterica*, JSPS-DAAD Joint Seminar at University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany, 2016/2/23-24
37. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 北川公恵, 西野邦彦, 山口明人, 大腸菌 AcrB-AcrA 融合タンパクの解析と AcrAB-TolC 構成比の決定, 第 136 回日本薬学会年会, パシフィコ横浜、神奈川県, 2016/3/27
38. 山口明人, 中島良介, 櫻井啓介, 「異物排出の構造的基盤」, 生体エネルギー研究会 第 40 回討論会, 愛媛大学, 2014 年 12 月 11-13 日
39. 松田 知己, Emmy Tran, 竹本 研, 坂井 直樹, 新井 由之, 野田 勝紀, 内山 進, 永井 健治, 単量体型光増感蛍光タンパク質 SuperNova, 第 37 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜, 2014 年 11 月 27 日
40. 林克彦, 中島良介, 山崎聖司, 櫻井啓介, 西野邦彦, 山口明人, 「多剤排出システム AcrAB-TolC 複合体には何分子の AcrA が必要か? 」, 第 36 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 徳島, 2014 年 11 月 20 日
41. Yamasaki, S. “Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug efflux pumps”, JSPS and DAAD International Joint Symposium, Halle, Germany, 30 July, 2014.
42. Yamasaki, S. “Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug efflux pumps”, ISIR and INRA International Joint Symposium, Nouzilly, France, 28 July, 2014.
43. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 西野邦彦, 山口明人, 「グラム陰性菌多剤排出トランスポーターの阻害剤結合構造」, 第 12 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(PPF2014), 神奈川県, 2014 年 7 月 14 日～15 日
44. Matsuda T, Nagai T, ”Genetically encoded photoactivatable Ca²⁺ indicator for highlighted imaging in arbitrary single cell”, Forcus On Microscopy 2014, Seymour Centre, University of Sydney Sydney, Australia, 15 April 2014
45. 井上雄太, 山崎聖司, 櫻井啓介, 古澤秀明, 樋口雄介, 山口明人, 加藤修雄, “SBDD に基づく新規異物排出タンパク機能阻害剤の合成と構造活性相関”, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 28 日
46. 山崎聖司, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親弘, 星野一樹, 小野寺宜郷, 西野邦彦, 山口明人, 「多剤排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明」, 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 2014 年 3 月 26 日～28 日
47. 山口明人, 「異物排出輸送体阻害の構造的基礎」, 第 39 回日本生体エネルギー研究会, 静岡, 2013 年 12 月 18 日
48. 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 林克彦, 西野邦彦, 山口明人, 「多剤排出タンパクの阻害剤結合構造」, 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 東京, 2013 年 11 月

21-22 日

49. 山崎優、二階堂英司、中島良介、櫻井啓介、藤原大佑、藤井郁雄、西野邦彦、「細菌の異物認識機構と排出制御」、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、東京、2013年11月21-22日
50. 山崎聖司、中島良介、櫻井啓介、林克彦、長田親弘、星野一樹、小野寺宜郷、西野邦彦、山口明人、「異物排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明」、第66回日本細菌学会関西支部総会、大阪、2013年11月16日
51. 櫻井啓介、中島良介、山崎聖司、林克彦、西野邦彦、山口明人、「RND型薬剤排出トランスポーターの阻害活性の構造的基礎」、第51回日本生物物理学会年会、京都、2013年10月28-30日
52. 林克彦、中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、西野邦彦、山口明人、「Crystal structures of the inhibitor-bound multi-drug efflux transporters, AcrB and MexB」、第86回日本生化学会大会、神奈川、2013年9月11-12日
53. 林克彦、中島良介、櫻井啓介、山崎聖司、山長田親弘、小野寺宜郷、西野邦彦、山口明人、「The strategy for developing RND type multi-drug efflux pump inhibitor」、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月27-30日
54. 山崎優、二階堂英司、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦、「サルモネラの薬剤排出ポンプAcrABの転写調節因子RamRのX線結晶構造解析及び機能解析」、第85回日本生化学会大会、福岡、2012年12月14-16日
55. 山崎優、二階堂英司、櫻井啓介、中島良介、山口明人、西野邦彦、「サルモネラ薬剤排出ポンプAcrABの制御機構の解析」、第62回日本薬学会近畿支部総会、兵庫、2012年10月20日

③ ポスター発表 (国内会議44件、国際会議17件)

1. 林克彦、櫻井啓介、中島良介、西野邦彦、山口明人、排出機能を持つ緑膿菌の多剤排出トランスポーターMexB-MexY、MexA-MexX キメラ複合体、2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年12月6-9日
2. 山岸純一、神野実桜、石川麻衣、山崎聖司、西野邦彦、賀来満夫、Acinetobacter baumannii のキノロン薬間の不完全交差耐性機構、日本薬学会第137年会、宮城、2017/3/24-27
3. 山岸純一、石川麻衣、神野実桜、山崎聖司、西野邦彦、賀来満夫、アシネトバクターのキノロン薬間の不完全交差耐性機構、第90回日本細菌学会総会、宮城、2017/3/19-21
4. Suguru Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Sylvie Baucheron, Etienne Giraud, Benoît Doublet, Axel Cloeckaert and Kunihiko Nishino, Crystal Structure of the Multidrug Resistance Regulator RamR Complexed with Bile Acids, International Symposium Salmonella and Salmonellosis, Saint-Malo, France, 2016/6/6-8

5. 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, 2016/6/7-9
6. 山崎 聖司, 王 麗媛, 平田 隆弘, 西野 美都子, 西野 邦彦, バイオフィルム産生・維持における薬剤排出ポンプの役割, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 京都, 2016/6/15-17
7. 山崎聖司, 耐性菌の薬剤排出ポンプに着目した新規治療薬の開発, 育志賞研究発表会, 東京, 2016/8/24
8. Tomoki Matsuda, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino, Takeharu Nagai, Akihito Yamaguchi, ANALYSIS OF THE DYNAMICS OF A MULTI-DRUG EXPORTER ACRB IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF SUBSTRATES, The Biophysical Society 61 th Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, 2017/2/14
9. Hayashi K., Nakashima R., Sakurai K., Kitagawa K., Yamasaki S., Nishino K., and Yamaguchi A., Stoichiometry of a Functional AcrA and AcrB Complex, Gordon Research Seminar (Multi-Drug Efflux Systems) 2015, Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca (Barga), Italy, 2015/4/25-26
10. Hayashi K., Nakashima R., Sakurai K., Kitagawa K., Yamasaki S., Nishino K., and Yamaguchi A., Stoichiometry of a Functional AcrA and AcrB Complex, Gordon Research Conference (Multi-Drug Efflux Systems) 2015, Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca (Barga), Italy, 2015/4/26-2015/5/1
11. 山崎聖司, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親広, 星野一樹, 小野寺宜郷, 山口明人, 西野邦彦, 細菌異物排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明, 第 62 回 日本生化学会近畿支部例会, 立命館大学, 2015/5/16
12. 井上雄太, 緑膿菌多剤排出トランスポーター新規阻害剤の研究, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年会, 東北大学川内キャンパス萩ホール, 2015/6/12
13. 松田知己, Photo-manipulation of intracellular Ca²⁺ by genetically encoded caged Ca²⁺, 第 15 回 日本蛋白質科学会年会, あわぎんホール, 2015/6/26
14. Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, and Akihito Yamaguchi , Peristaltic drug export mechanism of the multidrug exporter AcrB, 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment: ARAE2015, Vinci International Convention Centre, France, 2015/6/29-7/1
15. 山崎聖司, 耐性菌感染症の克服に向けた細菌薬剤排出ポンプの機能解析と阻害剤開発, 育志賞研究発表会, 京都大学, 2015/8/31
16. Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Akihito Yamaguchi, and Kunihiko Nishino, Inhibitor-bound structures and inhibition mechanism of multidrug efflux transporters, The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International

Conference Center, Japan, 2015/9/8-11

17. Y. Matsumoto, A. Grushnikov, K. Kikuchi, A. Yan, K. Nishino, and Y. Yagi, Application of an Image Analysis Software for the New Rapid Susceptibility Testing Method via Microscopy in DSTM (Drug Susceptibility Testing Microfluidic device), 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy: ICAAC 2015, San Diego, America, 2015/9/17-21
18. 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, 大阪大学, 2015/11/12-13
19. 西野美都子, 松本佳巳, 林克彦, 山崎聖司, 櫻井啓介, 中島良介, 西野邦彦, 多剤耐性病原細菌の新規治療戦略, 2015 アライアンス G3 分科会, 大阪大学, 2015/11/12-13
20. 山崎聖司, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親広, 星野一樹, 小野寺宜郷, 西野邦彦, 山口明人, 細菌異物排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明, 2015 アライアンス G3 分科会, 大阪大学, 2015/11/12-13
21. 林 克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 北川公 恵, 山崎聖司, 西野邦彦, 山口明人, 機能するRND型多剤排出トランスポーターの結合量比, 2015 アライアンス G3 分科会, 大阪大学, 2015/11/12-13
22. Martijn Zwama, Ryosuke Nakashima, Katsuhiko Hayashi, Kunihiko Nishino, Akihito Yamaguchi, Liposomal studies for reconstruction and efflux assays of AcrB, 2015 アライアンス G3 分科会, 大阪大学, 2015/11/12-13
23. 藤岡拓真, 山崎聖司, 西野美都子, 西野邦彦, フェノタイプマイクロアレイによる薬剤排出ポンプの解析, 2015 アライアンス G3 分科会, 大阪大学, 2015/11/12-13
24. 藤岡拓真, 山崎聖司, 西野美都子, 西野邦彦, フェノタイプマイクロアレイによる
25. サルモネラの排出トランスポーターのフェノーム解析, 第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 熊本大学, 2015/11/19-20
26. 藤岡拓真, フェノタイプマイクロアレイを用いた薬剤排出ポンプのフェノーム解析, 大阪大学 産業科学研究所 第71回 学術講演会, 大阪大学, 2015/11/24
27. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 北川公恵, 西野邦彦, 山口明人, AcrB-AcrA 融合蛋白質による AcrAB-TolC 機能複合体の構成比の決定, 大阪大学 産業科学研究所 第71回 学術講演会, 大阪大学, 2015/11/24
28. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 北川公恵, 西野邦彦, 山口明人, AcrB-AcrA 融合蛋白質による AcrAB-TolC 機能複合体の構成比の決定, 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学大会 合同大会, 神戸国際展示場、兵庫, 2015/12/2
29. Seiji Yamasaki, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Katsuhiko Hayashi, Chikahiro Nagata, Kazuki Hoshino, Yoshikuni Onodera, Akihito Yamaguchi, and Kunihiko Nishino, Structural Basis for the Inhibition of Multidrug Efflux Pumps, The 19th SANKEN International Symposium 2015, The 14th SANKEN Nanotechnology Symposium, ICHIO Hall, Osaka University,

Japan, 2015/12/7-9

30. Hayashi-Nishino, Mitsuko; Nishino, Kunihiko, Electron/immuno-electron tomography of autophagosomal membranes and bacterial multidrug efflux systems, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015: Pacificchem 2015, Hawaii, America, 2015/12/17
31. 松本佳巳, 山口明人, 西野邦彦, 迅速感受性測定法を用いたメチシリン耐性ブドウ球菌の迅速検出法, 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター, 2016/3/23-24
32. 山崎優, 中島良介, 櫻井啓介, Sylvie Baucheron, Etienne Giraud, Benoît Doublet, Axel Cloeckert, 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, 大阪国際交流センター, 2016/3/24
33. 山崎 聖司, 王 麗媛, 平田 隆弘, 西野 美都子, 西野 邦彦, 大腸菌バイオフィルム形成における薬剤排出ポンプの役割, 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター, 2016/3/24
34. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 北川公恵, 山崎聖司, 西野邦彦, 山口明人, 機能する AcrB-AcrA 融合蛋白質による AcrAB-TolC システムの結合量比決定, 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター, 2016/3/23-24
35. 武内優奈, 西野美都子, 古澤力, 西野邦彦, 多剤耐性菌自動判別技術開発に向けた耐性株の形態学的解析, 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター, 2016/3/23-24
36. 武内 優奈, 西野 美都子, 古澤 力, 西野 邦彦, 多剤耐性菌自動判別技術開発に向けた耐性株の形態学的解析, 第 136 回日本薬学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2016/3/27
37. 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, 岐阜, 2015 年 3 月 26 日~28 日
38. 林克彦, 中島良介, 山崎聖司, 櫻井啓介, 西野邦彦, 山口明人, 「多剤排出システム AcrAB-TolC 複合体には何分子の AcrA が必要か? 」, 第 36 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 徳島, 2014 年 11 月 20 日
39. 山崎聖司, 「細菌薬剤排出ポンプの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明」, 平成 26 年度育志賞研究発表会, 東京, 2014 年 8 月 20 日
40. 松田知己, 堀川一樹, 斉藤健太, 永井健治, 「生体組織内の任意の細胞での機能イメージングを可能にする光活性化型カルシウムイオンセンサーの開発」, 第 14 回蛋白質科学会年会, ワークピア横浜, 2014 年 6 月 26 日
41. 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 蛋白質科学会年会, 大阪,

42. 2014年6月25-27日
43. 井上雄太, 樋口雄介, 加藤修雄, 「多剤耐性菌感染症治療薬を指向した異物排出タンパク阻害剤の研究」, 日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会, 大阪大学, 2014年6月11日~13日
44. 山崎聖司, 中島良介, 櫻井啓介, 林克彦, 長田親弘, 星野一樹, 小野寺宜郷, 西野邦彦, 山口明人, 「多剤排出トランスポーターの阻害剤結合様式と阻害メカニズムの解明」, 第87回日本細菌学会総会, 東京, 2014年3月26日~28日
45. Katsuhiko Hayashi, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi, “Structural Basis of Bacterial Major Multidrug Efflux Transporter Inhibition”, The 17th SANKEN International Symposium / The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, Osaka/Japan, 21-22 Jan. 2014
46. Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Akihito Yamaguchi, “Structures of the Multidrug Exporter AcrB Reveal a Proximal Multisite Drug-binding Pocket”, The 17th SANKEN International Symposium / The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, Osaka/Japan, 21-22 Jan. 2014
47. 山崎聖司, 「原核細胞のトランスポートソーム解析」, 第69回学術講演会, 大阪, 2013年11月15日
48. 林克彦, 「RND型多剤排出トランスポーターAcrB, MexBと阻害剤の複合体結晶構造」, 第69回学術講演会, 大阪, 2013年11月15日
49. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 西野邦彦, 山口明人, 「大腸菌多剤排出トランスポーター複合体AcrABの結合比決定」, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 2013年10月28-30日
50. 林克彦, 中島良介, 櫻井啓介, 山崎聖司, 西野邦彦, 山口明人, 「Crystal structures of the inhibitor-bound multi-drug efflux transporters, AcrB and MexB」, 第86回日本生化学会大会, 神奈川, 2013年9月11-12日
51. Katsuhiko Hayashi, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino and Akihito Yamaguchi, “Inhibitor-bound structures of bacterial major multidrug efflux transporters, AcrB and MexB”, 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, AULA Ghent/Belgium, 30 June - 3 July 2013
52. Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Akihito Yamaguchi, “Peristaltic drug export mechanism of the multidrug exporter AcrB”, 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, AULA Ghent/Belgium, 30 June - 3 July 2013
53. 山崎優, 二階堂英司, 中島良介, 櫻井啓介, 西野邦彦, 山口明人, “細菌多剤耐性化に關与する転写制御因子RamRと多剤との共結晶構造解析”, 日本薬学会第133

年会、横浜、2013年3月27-30日

54. 松本佳巳、山口明人、西野邦彦、”マイクロデバイスを用いた簡易迅速感受性測定法”、第86回日本細菌学会総会、千葉、2013年3月18-20日
55. 西野 邦彦、”サルモネラ多剤排出ポンプ AcrAB の発現制御機構”、第86回日本細菌学会総会、千葉、2013年3月18-20日
56. K. Hayashi, R. Nakashima , K. Sakurai , S. Yamasaki , C. Nagata , K. Hoshino , Y. Onodera, K. Nishino and A. Yamaguchi, "The crystal structures of Bacterial multidrug efflux pumps with a specific inhibitor in the common inhibitory narrow pit", Gordon Research Conference, "Multi-Drug Efflux Systems", Ventura, CA, USA, March 17-22, 2013
57. K. Hayashi, R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, K. Nishino, A. Yamaguchi, "The crystal structures of Bacterial multidrug efflux pumps with a specific inhibitor in the common inhibitory narrow pit.", The 16th SANKEN International Symposium 2013/The 11th SANKEN Nanotechnology Symposium 2013, Osaka, Japan, Jan. 22-23, 2013
58. S. Yamasaki, K. Nishino, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi, "Structures of AcrB Multidrug Efflux Pump Reveal the Peristaltic Drug Export Mechanism", The 16th SANKEN International Symposium 2013/The 11th SANKEN Nanotechnology Symposium 2013, Osaka, Japan, Jan. 22-23, 2013
59. S. Yamasaki, E. Nikaido, R. Nakashima, K. Sakurai, A. Yamaguchi, K. Nishino, "The crystal structure of multidrug resistance regulator RamR reveal the mechanism of multiple drugs recognition", The 16th SANKEN International Symposium 2013/The 11th SANKEN Nanotechnology Symposium 2013, Osaka, Japan, Jan. 22-23, 2013
60. 山崎優、二階堂英司、中島良介、櫻井啓介、山口明人、西野邦彦、”サルモネラの薬剤排出ポンプ AcrAB の転写調節因子 RamR の X 線結晶構造解析及び機能解析”、第85回日本生化学大会、福岡 2012年12月14-16日
61. 山崎優、二階堂英司、城阪郁江、櫻井啓介、中島良介、山口明人、西野邦彦、”多剤耐性制御因子 RamR による抗菌薬認識機構の解明”、大阪大学産業科学研究所第68回学術講演会、大阪、2012年11月22日

(4)知財出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称: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
出願人:国立大学法人大阪大学
出願日:2016年2月18日
出願番号:特願 2015-028653
2. 発明の名称:多剤排出ポンプ阻害剤

発明者:山口明人、加藤修雄、井上雄太、山崎聖司、樋口雄介、櫻井啓介、中島良介、西野邦彦
出願人:国立研究開発法人科学技術振興機構
出願日:2015年12月7日
出願番号:特願 2015-238703

②海外出願 (0件)

③その他の知的財産権

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 第11回日本化学療法学会西日本支部長賞(基礎)、山崎聖司、平成29年1月1日
2. 大阪大学薬友会賞スタートアップ賞(大阪大学大学院薬学研究科/大阪大学薬友会合同事業)、藤岡拓真、2016年3月7日
3. 最優秀アブストラクト賞(第27回微生物シンポジウム)、山崎聖司、2015年9月4日
4. 第4回 大阪大学総長奨励賞(研究部門)、松田知己、2015年7月14日
5. 第4回 大阪大学総長奨励賞(研究部門)、中島良介、2015年7月14日
6. 第4回 大阪大学総長奨励賞(研究部門)、西野邦彦、2015年7月14日
7. Poster Award(6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE 2015)), Seiji Yamasaki, France, 2015/6/30
8. 若手奨励賞(第12回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム)、林克彦、2014年7月14日~15日
9. 優秀発表賞(第87回日本細菌学会総会)、山崎聖司、2014年3月28日
10. 平成25年度薬友会賞(大阪大学薬友会・大学院薬学研究科合同事業)、林克彦、2014年3月13日
11. *平成25年度育志賞(日本学術振興会)、山崎聖司、2014年2月24日
12. 優秀者表彰(公益財団法人小野奨学会)、山崎優、2013年5月29日
13. 鈴木絃一メモリアル賞(第85回日本生化学会大会)、山崎優、2012年12月16日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 時事通信、「抗生物質排出の阻害構造解明＝多剤耐性菌、創薬に期待―大阪大」、2013年7月1日
2. 日本経済新聞朝刊、「抗生物質効かない緑膿菌、薬が効果失う仕組み解明 阪大など」、2013年7月1日
3. 日刊工業新聞電子版、「阪大、薬物耐性原因物質と阻害剤の結合構造を解明」、2013年7月1日
4. 毎日新聞朝刊、「耐性化防ぐ方法究明 多剤耐性緑膿菌タンパク質構造解析―阪大教授ら発表」、2013年7月1日

③その他

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

②社会還元的な展開活動

- ・ 2017年、第3世代大学 大人の塾 SiN の講師を担当 一般聴衆向けに感染症や生活習慣病など各種疾患に使われる薬についての基礎知識を啓蒙する講義を行う。毎年度 10 コマで計 20 回
- ・ 2017年7月26日、大阪大学協定校(オランダ・グローニンゲン大学)の短期訪問プログラムによる大阪大学来訪時に研究室・研究内容を紹介
- ・ 2017年7月12日、8月1-3日 西大和学園高等学校 SSH スーパーサイエンスラボステイを受け入れ、講義及び実験を指導
- ・ 2016年5月13日 産研テクノサロン(大阪梅田富国生命ビル)にて研究内容を説明
- ・ 2016年4月28日 第1回産研ざっくばらんトーク(大阪梅田富国生命ビル)にて研究内容を説明
- ・ 2016年1月18日 タイ使節団(RAMKHAMHAENG UNIVERSITY)大阪大学来訪時に研究内容を説明
- ・ 2015年11月9日 オランダ使節団(アムステルダム大学、オランダオリンピック委員会、研究所、企業から24名、オランダ大使館から1名)大阪大学来訪時に研究内容を説明
- ・ 2015年9月4日 群馬県立前橋東高校 出身高校訪問講義にて在校生に研究内容を紹介
- ・ 2015年7月11日 大阪府立茨木高等学校 卒業生講座にて在校生に研究内容を紹介
- ・ 2015年6月15日 武庫川女子大学附属中学校高等学校見学説明会(高校1年 SS クラス 55名)にて研究内容を説明
- ・ 2014年5月2日-3日 大阪大学いちょう祭産業科学研究所一般公開にて研究内容を説明
- ・ 2013年6月15日 西大和学園高等学校 SSH スーパーサイエンス講義にて研究内容を説明
- ・ 2013年5月2日-3日 大阪大学いちょう祭産業科学研究所一般公開にて研究内容を説明
- ・ 2013年12月17日 大阪大学産業科学研究所定例記者会見にて研究内容を説明
- ・ 2012年11月27日 スウェーデン若手研究リーダー SSF FFL(18名)大阪大学来訪時に研究内容を説明

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2017/5/19-9/1(全10講座)	大人の塾 SiN	大阪市北区、富国生命ビル 4F テラプロジェクト	毎回 10 名～40 名	シリーズ名「健康薬学」成人を対象とし、感染症や生活習慣病など各種疾患に使われる薬についての基礎知識を啓蒙する。
2017/3/7	チーム内ミーティング(非公開)	大阪大学	10 人	
2016/12/6	チーム内ミーティング(非公開)	大阪大学	10 人	
2016/11/9	チーム内ミーティング(非公開)	大阪大学	10 人	
2016/10/21-2/24(全10講座)	大人の塾 SiN	大阪市北区、富国生命ビル 4F テラプロジェクト	毎回 10 名～40 名	シリーズ名「健康薬学」成人を対象とし、感染症や生活習慣病など各種疾患に使われる薬についての基礎知識を啓蒙する。
2016/5/23	チーム内ミーティング(非公開)	大阪大学	10 人	
2015/10/8	Special Seminar	大阪大学	15 人	東京大学・渡邊力也博士による講演
2015/9/4	群馬県立前橋東高校出身高校訪問講義	群馬県立前橋東高校	300 人	
2015/8/27	DSANJ 疾患別商談会(非公開)	大阪産業創造館	7 社	
2015/7/11	大阪府立茨木高等学校卒業生講座	大阪府立茨木高等学校	58 人	
2015/7/9	Special Seminar	大阪大学	15 人	学術交流 Belfast City Hospital, John Moore 教授による講演
2015/6/23	薬学研究科大学院生特別講義	大阪大学	35 人	海外研究者による特別講義 香港大学 Aixin Yan 先生による特別講義
2015/5/14	Special Seminar	大阪大学	20 人	学術交流 香港大学 Aixin Yan 先生による講演
2015/3/30	セミナー	産業科学研究所 F386 セミナー室	20 人	学術交流 田辺幹雄博士(Martin Luther Univ.)による講演
2015/3/11	チーム内ミーティング(非公開)	産業科学研究所・管理棟 2 階・中会議室	10 人	研究進捗報告のためのミーティング

2015/1/23	JST/CREST 構造生命・大阪大学サイトビジット (非公開)	産業科学研究所・管理棟 2 階・中会議室	12 人	
2015/1/6	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2014/12/3	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2014/11/5	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2014/10/13	セミナー	産業科学研究所 F386 セミナー室	20 人	学術交流 二階堂 溥 教授 (UC Berkeley) による講演
2014/9/30	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2014/8/7	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2014/7/2	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2014/4/24	チーム内ミーティング (非公開)	産業科学研究所 F141 号室	15 人	
2013/12/13	チーム内ミーティング (非公開)	大阪大学	10 人	
2013/8/30	チーム内ミーティング (非公開)	大阪大学	10 人	
2013/5/13	セミナー	産業科学研究所 F386 セミナー室	15 人	学術交流 二階堂 溥 教授 (UC Berkeley) による講演
2013/5/3	産業科学研究所一般公開サイエンスカフェ	産業科学研究所講堂	40 人	
2013/2/20	チーム内ミーティング (非公開)	大阪大学	10 人	研究進捗報告のためのミーティング
2013 年から 2015 年まで 毎年度 14 講座	大人の塾 SiN	大阪市北区、富国生命ビル 4F テラプロジェクト	毎回 10 名 ~40 名	シリーズ名「健康薬学」成人を対象とし、感染症や生活習慣病など各種疾患に使われる薬についての基礎知識を啓蒙する。
2012/12/25	講演会	産業科学研究所第一研究棟 3 F セミナー室	20 人	学術交流 田辺 幹雄 先生 (マルティン・ルター大学、Junior research group leader)

				による講演
2012/11/2	チーム内ミーティング (非公開)	大阪大学	10 人	研究進捗報告のためのミーティング

§ 6 最後に

本プロジェクトは、AcrB の構造が最初に解かれて以来 10 年以上にわたり、多剤排出タンパク阻害剤開発に携わる研究者の念願であった、阻害剤との生理的に意味のある結合構造が、プロジェクト開始早々に初めて決定できたという、いけいけムードの中で開始された。2000 年代に米国ベンチャーグループとの共同研究で依頼された阻害剤候補化合物の結合構造がどうしても解けなかったという苦い経験の中からようやくつかんだ構造であり、しかもこの構造でもって阻害剤特異性の構造基盤まで明らかになったということで、これで広域阻害剤を構造に基づいて設計創薬できると確信した。医薬品の有機合成に深い経験のあるグループが同じ研究所の隣の研究室にあるという僥倖にも恵まれ、緊密な共同研究を展開した。構造解析に基づく医薬設計 (SBDD) とバーチャルスクリーニングにより、緑膿菌の有する2つの主たる排出ポンプ MexB 及び MexY を同時に阻害するユニバーサル阻害剤の創出研究を展開し、既知の MexB 阻害剤・ABI-PP (D13-9001) よりはるかに分子量が小さく、かつ、同等の阻害活性を持つ **H-8** や MexB および MexY 発現大腸菌の増殖を抑制するとともに、多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対して既存抗菌薬の効果を顕著に増強する **H-31** を創出するなど、計画を上回る成果を挙げて来たとして自己評価している。興味を持ってくれる製薬会社が見つかり、医薬品創成に向けた共同研究を開始することができた。ところが、その直後、**H-31** の細胞毒性とその原因となる多剤排出ポンプの排出阻害以外の細菌外膜障害作用が見つかり、広域阻害活性と外膜障害作用をもたらす官能基に密接な連関があることから、**H-31** 関連化合物からの構造展開をあきらめざるを得ない状況に追い込まれたことは、痛恨の事態であった。基礎研究の成果から医薬品の創成に展開するハードルを実感した。幸い、相手の製薬会社は、構造に元づく多剤排出ポンプ阻害剤創成という研究自体の意義と私たちの研究グループの比較優位性を理解してくれており、**H-31** の挫折にめげず、**H-8** の時点まで戻って SBDD を再開すること、さらに、緑膿菌排出タンパクを大腸菌で発現させて阻害剤をスクリーニングする私たちの構築したスクリーニング系を用いて新たな候補化合物を見つけ SBDD につなげるという研究を続行している。この手法で、これまで報告の全くなかった MexY 特異的阻害剤が見つかり、MexB 阻害との違いを究明して広域阻害剤設計に生かすため MexY 構造の決定をキメラタンパクを用いて懸命に行っている。必ず、臨床に有効な広域阻害剤創成に結びつける。

本プロジェクトのもう一つの高いハードルのある研究目標は RND 型多剤排出複合体結晶構造の決定であった。可溶化した多剤排出タンパクそのままでは3者複合体は全く検出されないほど複合体としての安定性は低い。それでも、結晶の中では複合体になる可能性を求めて最初は結晶化に挑んだが、結果は AcrB 単体の結晶のみが得られた。その経過の中で、英国のグループからクライオ電顕による3者複合体構造が報告されることとなった。結晶解析ではなかったのに、完全に先を越されたとは思っていないが、私たちの予想を上回る解像度であったことは確か。しかし、その構造は従来の蛋白工学的知見とは相容れない部分もあり、その後、リンカータンパクやキメラタンパクを用いて行った私たちの結果とも異なる部分がある。RND 型排出タンパクは *in vivo* でも速やかに解離会合を繰り返しており、大きく構造変化している。クライオ電顕にとらえられた構造は、最終的な活性構造ではない可能性も大きいと考えられる。回り道をして時間がかかったが、プロジェクトの最終段階に至ってようやく、3者複合体としての結晶化を行える段階にこぎつけた。残る僅かな期間にできる限りの努力を傾けたい。

広域阻害剤開発と3者複合体結晶構造決定という2大難関を未だ完遂するに至っていないのは誠に遺憾であるが、広域阻害剤については企業との共同研究が軌道に乗り、今後の目処が付い

た。3 者複合体結晶構造は後一步のところに来ているので、期間内にごんぱりたい。それ以外には、さらなる基質結合構造の決定、部位特異変異導入を組み合わせた多剤認識・エネルギー共役の詳細解明、多剤排出ポンプの生理的役割の解明、3 者複合体の動態解析など、当初の目的をほぼ達成し、予期していなかった発展も得られた。