The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	サルモネラの薬剤排出ポンプMacABの阻害剤に関する基礎的研究
Author(s)	山岸, 亜美
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76499
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　山岸　亜美　　）	
論文題名	サルモネラの薬剤排出ポンプMacABの阻害剤に関する基礎的研究

論文内容の要旨

人類と感染症の関わりの歴史は古く、現在まで世界中で様々な感染症が流行し、多くの命が犠牲となった。感染症の治療に抗菌薬が頻用されるようになると、医療機関ではそれらの抗菌薬に耐性を獲得した薬剤耐性菌が出現するようになった。現在、薬剤耐性菌感染症が世界的に大きな問題となっており、特に複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌に対しては、未だ有効な治療法が存在しない。そのような状況において、複数の抗菌薬を能動的に菌体外に排出する薬剤排出ポンプが、多剤耐性を克服することのできる創薬のターゲットとして注目されている。

サルモネラ属菌は、国内における食中毒の主な原因菌であり、近年多剤耐性化が問題となっている。ゲノム解析の結果、サルモネラにおいて10個の薬剤排出ポンプが同定されている。細菌の薬剤感受性を高めることを目的とし、大阪大学化合物ライブラリーを用いて各薬剤排出ポンプの阻害候補化合物の探索を行った。その結果、MacAB過剰発現株とAcrD過剰発現株については各一種類、MdsABC過剰発現株とMdfA過剰発現株については各二種類の化合物を、阻害候補化合物として見出した。今後、既存抗菌薬との併用効果について、臨床分離株を用いて検証したい。また、薬剤排出ポンプと阻害候補化合物との結合構造の解析に取り組むことで、排出機能に関わる作用部位や作用機序の解明に繋がることが期待される。既存の抗菌薬の再利用、そして臨床応用可能な新規阻害剤の開発に繋がることを期待している。

本研究ではさらに、MacAB過剰発現株の阻害候補化合物（以降OU33858とする）に着目し研究を進めた。というのも、当研究室において、サルモネラ野生株のマウスへの感染実験から、薬剤排出ポンプMacABがマウスの致死性に関与していることが明らかになっていたからである。野生株のサルモネラを接種したマウスは９日後に全て死亡するのに対し、MacAB欠損株では、致死能が著しく低下する。MacABは当初、エリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質を特異的に認識し排出するABC型薬剤排出ポンプとして同定され、当研究室においてMacABと命名した。MacABは病原性のマスターレギュレーターであるPhoPQによって厳密に制御されていることが知られており、病原性因子の輸送に関与している可能性が考えられる。MacABの機能を阻害することができれば、薬剤耐性とマウスに対する致死性の両方を減弱することが可能である。しかしながら、臨床的に有効な薬剤排出ポンプ阻害剤は得られておらず、細菌のABC型薬剤排出ポンプ阻害剤も見つかっていない。そこで、サルモネラの薬剤排出ポンプMacABの阻害剤の開発を目的とし、OU33858の機能解析に取り組んだ。解析の結果、OU33858はマクロライド系抗菌薬との併用により、MacAB過剰発現株の薬剤感受性を増大させることが明らかとなった。OU33858はMacAB以外の薬剤排出ポンプの機能は阻害せず、単独抗菌活性も持たないことから、MacAB特異的な阻害剤であることが示された。

研究室の過去の実験結果より、サルモネラのマクロファージへの感染時にMacABの転写量のみ大きく増加することから、ファゴソーム内での酸化ストレスが、MacABの発現に関与することが示唆されていた。また、H_2O_2曝露により*macAB*の発現が誘導され、H_2O_2存在下でのサルモネラの生存に*macAB*が重要であることが報告されている。これらのことから、MacABがマクロライド系抗菌薬以外に酸化ストレスを軽減させる物質を排出しているのではないかと予想されていた。そこで、MacABの生理的機能の解明を目的とし、サルモネラ野生型から調整した上清(conditioned medium)及びOU33858を用いて、MacABと酸化ストレスの関与について検証した。その結果、conditioned medium内では、H_2O_2存在下でもMacAB欠損株は問題なく増殖することを確認した。この結果は、conditioned mediumに酸化ストレスを軽減させる物質が存在すること、つまりMacABが酸化ストレスを軽減させる物質を排出していることを示唆する。さらに、OU33858を添加すると、conditioned medium内でH_2O_2の有無に関わらず増殖できたMacAB欠損株が、増殖できなくなる。このことは、conditioned mediumに含まれる酸化ストレスを軽減させる物質が減少したことを示唆する。つまり、OU33858の影響で、MacABから酸化ストレスを軽減させる物質の排出が阻害されたと考えている。このことから、OU33858がMacABの阻害剤

であることが裏付けられた。MacABが排出する物質の詳細については、現在解析を進めている。過去に、大腸菌MacABからprotoporphyrinⅨが排出されているという報告がある。protoporphyrinⅨはヘムの前駆体で、鉄イオンが挿入されるとヘムとなる。そこで私達は、サルモネラMacABからもprotoporphyrinⅨが排出され、酸化ストレスへの抵抗性を高めているのではないかと予想している。MacABの阻害剤の開発は、サルモネラの病原性の減弱にも繋がると考えている。MacABが排出する物質の同定、並びに阻害剤の開発を進めることで、サルモネラ感染症の克服に繋がることが期待される。

本研究では、見出した4種類の薬剤排出ポンプ阻害剤のうち、MacABの阻害剤に着目し、機能解析を行った。本化合物は、薬剤排出ポンプの機能の解明に役立つと考えている。さらに、MacABはマクロライド系抗菌薬耐性と病原性の両方に関与しているため、MacAB阻害剤の開発は、薬剤耐性と病原性の両方の減弱を目指した新規治療方法の発見に貢献できると考えている。今後、病原性発現における薬剤排出ポンプの生理機能及びその発現制御が明らかとなり、サルモネラの病原性に関する研究のさらなる発展に繋がることを期待している。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　山岸　亜美　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	西野　邦彦
	副 査	教授	辻川　和丈
	副 査	教授	髙木　達也

論文審査の結果の要旨

人類と感染症の関わりの歴史は古く、現在まで世界中で様々な感染症が流行し、多くの命が犠牲となった。感染症の治療に抗菌薬が頻用されるようになると、医療機関ではそれらの抗菌薬に耐性を獲得した薬剤耐性菌が出現するようになった。現在、薬剤耐性菌感染症が世界的に大きな問題となっており、特に複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌に対しては、未だ有効な治療法が存在しない。そのような状況において、複数の抗菌薬を能動的に菌体外に排出する薬剤排出ポンプが、多剤耐性を克服することのできる創薬のターゲットとして注目されている。

サルモネラ属菌は、国内における食中毒の主な原因菌であり、近年多剤耐性化が問題となっている。ゲノム解析の結果、サルモネラにおいて10個の薬剤排出ポンプが同定されている。細菌の薬剤感受性を高めることを目的とし、本研究では、大阪大学化合物ライブラリーを用いて各薬剤排出ポンプの阻害候補化合物の探索を行った。その結果、MacAB過剰発現株とAcrD過剰発現株については各一種類、MdsABC過剰発現株とMdfA過剰発現株については各二種類の化合物を、阻害候補化合物として見出した。これらの阻害候補化合物中で、MacAB過剰発現株の阻害候補化合物（以降OU33858とする）に着目しさらに研究を進めた。サルモネラ野生株のマウスへの感染実験から、薬剤排出ポンプMacABがマウスの致死性に関与していることが明らかになっていたからである。野生株のサルモネラを接種したマウスは９日後に死滅するのに対し、MacAB欠損株では、その致死能が著しく低下する。MacABは当初、エリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質を特異的に認識し排出するABC型薬剤排出ポンプとして同定された経緯からMacABと命名されている。MacABは病原性のマスターレギュレーターであるPhoPQによって厳密に制御されていることが知られており、病原性因子の輸送に関与している可能性が考えられる。MacABの機能を阻害することができれば、薬剤耐性とマウスに対する致死性の両方を減弱することが可能である。しかしながら、臨床的に有効な薬剤排出ポンプ阻害剤は得られておらず、細菌のABC型薬剤排出ポンプ阻害剤も見つかっていない。そこで、本論文中は、サルモネラの薬剤排出ポンプMacABの阻害剤の開発を目的とし、OU33858の機能解析に取り組んでいる。解析の結果、OU33858はマクロライド系抗菌薬との併用により、MacAB過剰発現株の薬剤感受性を増大させることが明らかとなり、本化合物はMacAB以外の薬剤排出ポンプの機能は阻害せず、単独抗菌活性も持たないことから、MacAB特異的な阻害剤であることが示された。

これまでに、サルモネラのマクロファージへの感染時にMacABの転写量が大きく増加することから、ファゴソーム内での酸化ストレスが、MacABの発現に関与することが示唆されていた。また、H_2O_2曝露により*macAB*の発現が誘導され、H_2O_2存在下でのサルモネラの生存に*macAB*が重要であることが報告されている。これらのことから、MacABがマクロライド系抗菌薬以外に酸化ストレスを軽減させる物質を排出しているのではないかと予想されていた。そこで、MacABの生理的機能の解明を目的とし、サルモネラ野生型から調整した上清(conditioned medium)及びOU33858を用いて、MacABと酸化ストレスの関与について検証している。その結果、conditioned medium内では、H_2O_2存在下でもMacAB欠損株は問題なく増殖することを確認した。この結果は、conditioned mediumに酸化ストレスを軽減させる物質が存在すること、つまりMacABが酸化ストレスを軽減させる物質を排出していることを示唆する。さらに、OU33858を添加すると、conditioned medium内でH_2O_2の有無に関わらず増殖できたMacAB欠損株が、増殖できなくなる。このことは、conditioned mediumに含まれる酸化ストレスを軽減させる物質が減少したことを示唆する。つまり、OU33858の影響で、MacABから酸化ストレスを軽減させる物質の排出が阻害されたと考えている。このことから、OU33858がMacABの阻害剤であることが裏付けられた。MacABが排出する物質の詳細については、現在解析を進めている。過去に、大腸菌

MacABからprotoporphyrinⅨが排出されているという報告がある。protoporphyrinⅨはヘムの前駆体で、鉄イオンが挿入されるとヘムとなる。そこで私達は、サルモネラMacABからもprotoporphyrinⅨが排出され、酸化ストレスへの抵抗性を高めているのではないかと予想している。MacABの阻害剤の開発は、サルモネラの病原性の減弱にも繋がると考えている。MacABが排出する物質の同定、並びに阻害剤の開発を進めることで、サルモネラ感染症の克服に繋がることが期待される。

山岸亜美氏は、見出した4種類の薬剤排出ポンプ阻害剤のうち、MacABの阻害剤に着目し、機能解析を行った。本化合物は、薬剤排出ポンプの機能の解明に役立つと考えている。さらに、MacABはマクロライド系抗菌薬耐性と病原性の両方に関与しているため、MacAB阻害剤の開発は、薬剤耐性と病原性の両方の減弱を目指した新規治療方法の発見に貢献できると考えられ、その価値は高く評価される。

以上の理由から、審査員の合議により、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。