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

博士学位論文

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

学位申請者

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻 細胞生物学分野

大阪大学産業科学研究所 生体分子制御学研究分野

山岸 亜美

2020年 3月

主論文

Ami Yamagishi, Sohei Nakano, Seiji Yamasaki, Kunihiko Nishino.
An efflux inhibitor of the MacAB pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
Microbiology and Immunology, 2019 Dec 11[Online ahead of print],
DOI: 10.1111/1348-0421.12765

目次

略号・記号

第 1 章　序論

第２章 サルモネラの薬剤排出ポンプの阻害剤の探索
第 1 節　緒言

第２節　実験材料と方法
2-1. 実験に使用した菌株・プラスミド及び培養条件
2-2. 大阪大学化合物ライブラリーを用いたスクリーニング方法

第 3 節　結果

第 4 節　考察

第 3 章 サルモネラの薬剤排出ポンプ MacAB の阻害剤の機能解析
第 1 節　緒言

第２節　実験材料と方法
2-1. 実験に使用した菌株・プラスミド及び培養条件
2-2. 増殖曲線の測定

第 3 節　結果
3-1. 阻害剤のマクロライド系抗菌薬との併用効果
3-2. 阻害剤の MacAB 以外の薬剤排出ポンプへの影響
3-3. 阻害剤の単独抗菌活性についての検証
3-4. 阻害剤の大腸菌 MacAB への影響

第 4 節　考察

第 4 章 サルモネラの薬剤排出ポンプ MacAB の酸化ストレスへの関与、及び阻害剤の影響

第 1 節　緒言

第２節　実験材料と方法

2-1. 実験に使用した菌株及び培養条件

2-2. 増殖曲線の測定

2-3. 生菌数の計測

第 3 節　結果

3-1. H_2O_2 が及ぼす MacAB 欠損株の増殖への影響

3-2. サルモネラ野生株から作成した培地を利用した MacAB の酸化ストレスへの関与、及び阻害剤の影響

第 4 節　考察

第５章　総括

第６章　引用文献

謝辞

略号・記号

試薬

ABI-PP: AcrAB/MexAB specific inhibitor of pryridopyrimidine derivative
AZM: azithromycin
CAM: clarithromycin
DMSO: dimethyl sulfoxide
EM: erythromycin
JM: josamycin
LM: leucomycin
PA β N: phenylalanine-arginene β -naphthylamide
SDS: Sodium dodecyl sulfate

培地

LB: Luria-Betani

その他

ABC: ATP-binding cassette
CFUs: colony-forming units
MATE: multidrug and toxic compound extrusion
MF: major facilitator
RND: resistance–nodulation–division
WT: Wild type

第 1 章
序論

細菌の薬剤耐性

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。1924 年に Alexander Fleming により初の抗物質であるペニシリンが発見され、細菌感染症への治療は発展を遂げた。しかし、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。現在では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、多剤耐性緑膿菌(MDRP)などによる化学療法が難しい感染症が、世界中で数多く報告されている。さらに、2010 年秋には、ペニシリンやセフェムからカルバペネムまですべての β-ラクタムを分解し、アミノグリコシドやキノロンを含む広範囲の抗生物質に耐性をもたらす新種の酵素である NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase)産生株が各国の医療機関から分離され、世界中で社会問題となった。

薬剤耐性化のメカニズム

グラム陰性菌の薬剤耐性機構は 4 種類に分類される。

①作用点の突然変異による薬剤透過性の低下
②修飾酵素や分解酵素による薬剤の不活性化
③細胞膜周辺構造の変化やバイオフィルム形成による薬剤透過性の低下
④薬剤排出ポンプによる能動的排出

などが挙げられる[1]。多くの場合、これらの要因が複雑に絡み合った結果多剤耐性がもたらされるが、特に薬剤排出ポンプは、複数の抗菌薬を能動的に排出し単独で多剤耐性化を引き起こすため、注目されている[2]。

薬剤排出ポンプ

薬剤排出ポンプは全ての細菌のゲノムに元々備わっているものと、プラスミドにコードされているものが存在しており、当研究室では、様々な種類の細菌が数多くの薬剤排出ポンプを有することを明らかにしてきた[3,4]。また、薬剤排出ポンプが薬剤耐性だけでなく、病原性にも関与していることが分かってきており[4]、細菌の薬剤耐性と病原性の両方を抑える重要な創薬ターゲットとして期待されている。これらの薬剤排出ポンプは、その構造及びエネルギー共役機構の違いから、大きく 5 つのファミリーに分類される。①ATP の加水分解をエネルギーとして異物を排出する「ABC (ATP binding cassette)型」、②TolC 等の外膜チャネル及びペリプラズム空間に存在する膜融合タンパク質と三者複合体を形成するプロトン駆動の「RND (resistance nodulation cell-division)型」、③プロトン駆動型で最も主要なフ

ファミリーである「MFS (major facilitator superfamily)型」、④4 回膜貫通構造をもつプロトン駆動の「SMR (small multidrug resistance)型」、⑤MFS 型とは相同性がなく、ナトリウムもしくはプロトンを駆動力とする「MATE (multidrug and toxic compound extrusion)型」の 5 つである[5]。各ファミリーには特徴的なアミノ酸配列が保存されているため、配列から細菌が有する薬剤排出ポンプの数を推定することができる。例えば、モデル生物である大腸菌においては、37 個の薬剤排出ポンプ遺伝子の存在が推定され、当研究室において、これらのうち少なくとも 20 個が大腸菌を薬剤に対して耐性化させることが実験的に証明された[3]。解析が進むにつれ、大腸菌以外の様々な病原細菌のゲノム配列が明らかになってきている。

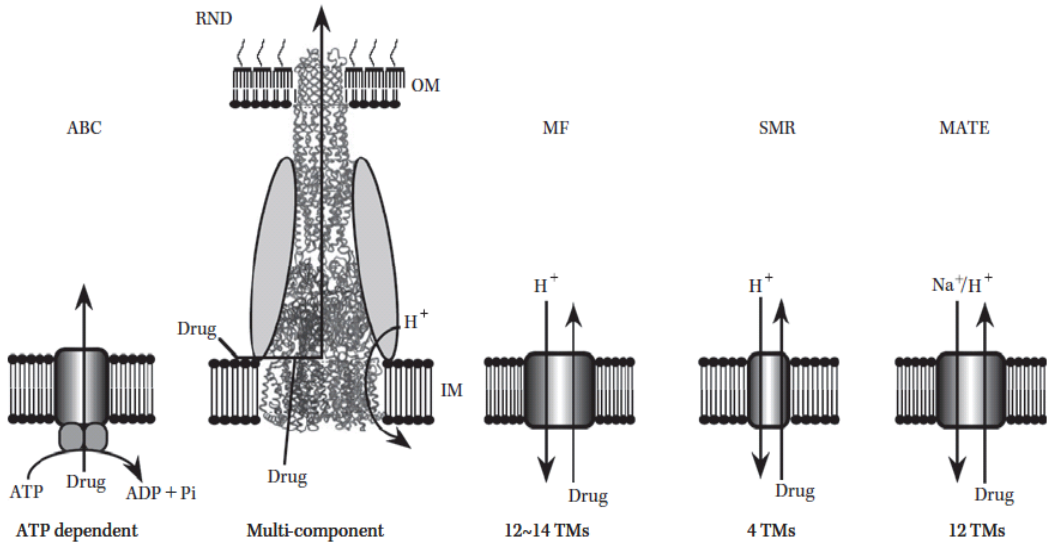


図 1-1. 薬剤排出ポンプの５つのファミリー

サルモネラの薬剤排出ポンプ

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、ヒトにおいて腸炎や敗血症などを引き起こすグラム陰性細菌である。1990 年代に多剤耐性菌が急増し、今なお多剤耐性化が問題となっている[6-10]。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 (AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, MdsABC, MdfA, EmrAB, SmvA, MdtK, MacAB) が同定されている(図 1-2)[4, 11]。AcrAB-TolC システムを除く全ての薬剤排出ポンプの発現量は、通常培養条件下では低く抑えられていることが報告されている[4]。

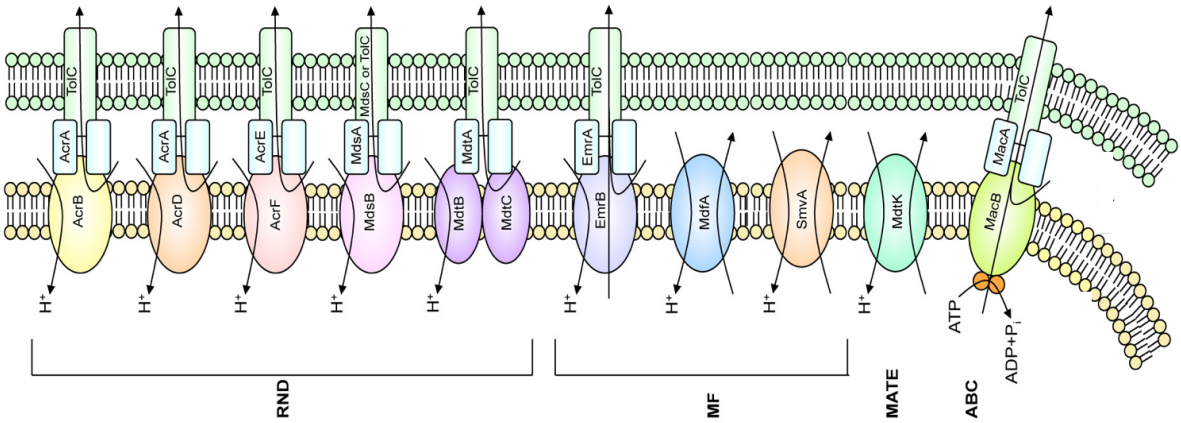


図 **1-2.** サルモネラの薬剤排出ポンプ群

薬剤排出ポンプの生理的機能

薬剤排出ポンプが抗菌薬耐性に関わっているという知見がこれまでに多く蓄積されてきた。一方で、薬剤排出ポンプが生理的機能を担っているという報告もなされている。

大腸菌薬剤排出ポンプ MdfA は、アルカリ耐性に関与している[12]。緑膿菌薬剤排出ポンプ MexAB-OprK は鉄キレート体である pyoverdine を排出し、鉄獲得に寄与していることが報告された[13]。さらに、緑膿菌の MexAB-OprM はクオラムセンシングに関わる 3-オキソ-C12-ホモセリンラクトンの排出に働くことが知られている[14]。また、大腸菌で同定された薬剤排出システムのうち、半数は胆汁酸の構成成分であるデオキシコール酸の耐性に寄与している[3]。このように、薬剤排出ポンプが薬剤だけでなく生理的な基質を排出している可能性が示唆されている。

サルモネラ薬剤排出ポンプ MacAB の生理的機能

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、薬剤排出ポンプがマウスへの致死性に関与していることが示唆された[4]。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、薬剤排出ポンプ全てを欠損させた株ではマウス致死能が完全に消失する(図 1-3)。個々の薬剤排出ポンプを欠損させた株についても同様に感染実験を行った結果、特に MacAB 欠損株では、致死能が著しく低下することが明らかになった。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[15]。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。

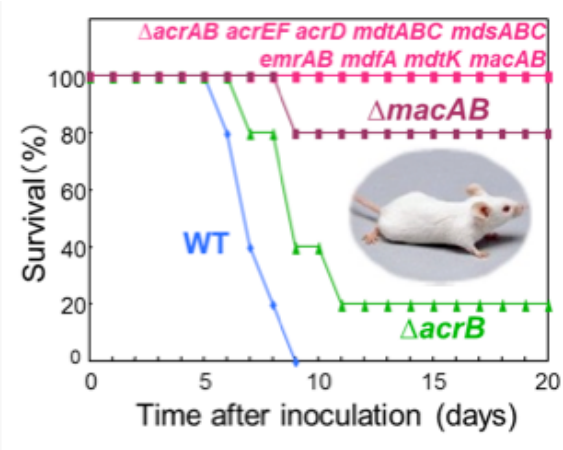


図 1-3. サルモネラ薬剤排出ポンプ欠損による
サルモネラ感染時のマウス生存率への影響 (文献 4 より引用)

さらに、サルモネラが宿主に感染し、病原性を発揮するためには宿主環境内での適応、あるいは宿主免疫機構からの回避が不可欠である。宿主に経口感染したサルモネラは、腸管上皮にあるパイエル板に近接する M 細胞を介してリンパ内に侵入し、マクロファージに感染する。その後、マクロファージ内での殺菌を回避して、増殖し血中へ移行することで敗血症などの症状を引き起こす。サルモネラは細胞寄生性細菌であり、マクロファージ内で生存・増殖することができる。このことから、マクロファージ内でどのようにサルモネラ薬剤排出ポンプの転写発現量が制御され、サルモネラの生存および増殖に関与しているのかを明らかとす

ることは重要であると考えた。当研究室の過去の研究で、マクロファージ感染時のサルモネラ薬剤排出ポンプの転写量が測定されている。感染 8 時間後には、とりわけ *macAB* において転写量の大きな上昇がみられた。サルモネラはファゴソーム内においてラジカルや活性酸素による酸化ストレス[16-18]、低栄養状態、酸性条件、タンパク分解酵素[19, 20]、抗菌ペプチド[21]などのストレスに曝されており、これらのストレスにより *macAB* が誘導される可能性、あるいは、様々なストレスへの抵抗性が *macAB* の生理的機能である可能性が考えられる。

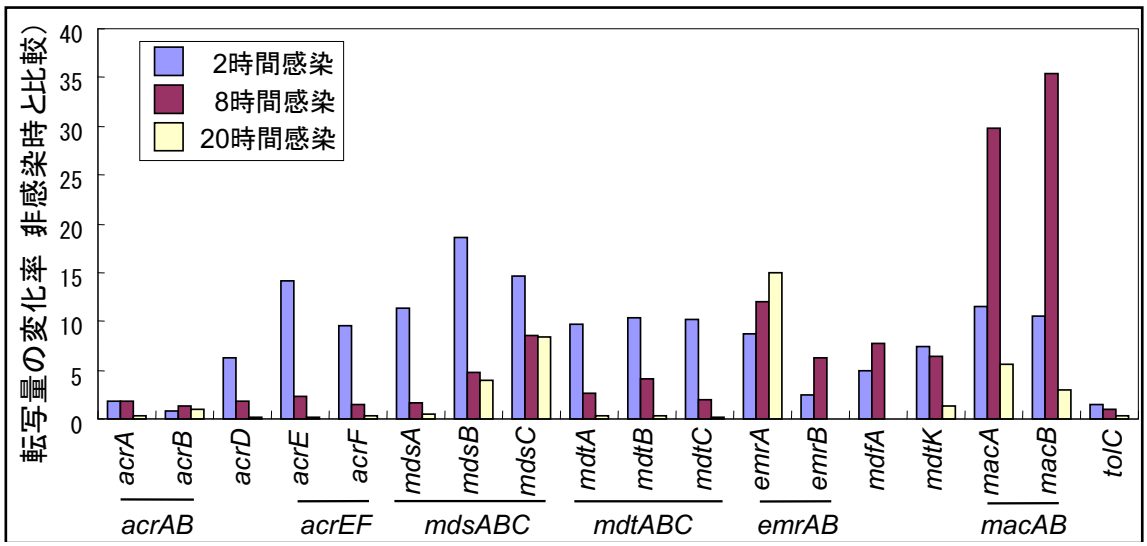


図 1-4.　マクロファージ感染時における各薬剤排出ポンプ転写量の経時的変化
(大野愛子氏の修士論文より引用)

阻害剤開発の現状

これまでに、薬剤排出ポンプの阻害剤開発には多くの努力が傾けられたが、未だに臨床的に有効な阻害剤は得られていない[22, 23]。グラム陰性菌の RND 型ポンプの阻害剤として最初に発見された PAβN[24, 25]は、アメリカで開発が進んでいたが膜障害が大きな問題となった。第一三共製薬が当研究室と共同で開発を進めていたピリドピリミジン誘導体 ABI-PP は、大腸菌の薬剤排出ポンプ AcrB、緑膿菌の薬剤排出ポンプ MexB を阻害できたが、多剤耐性緑膿菌のもう 1 つの原因である薬剤排出ポンプ MexY を阻害できず[26-28]、多剤耐性緑膿菌感染症の治療薬にはならなかった。現状、未だ臨床的に有効な阻害剤は得られておらず、細菌の RND 型以外のポンプ阻害剤も見つかっていない。

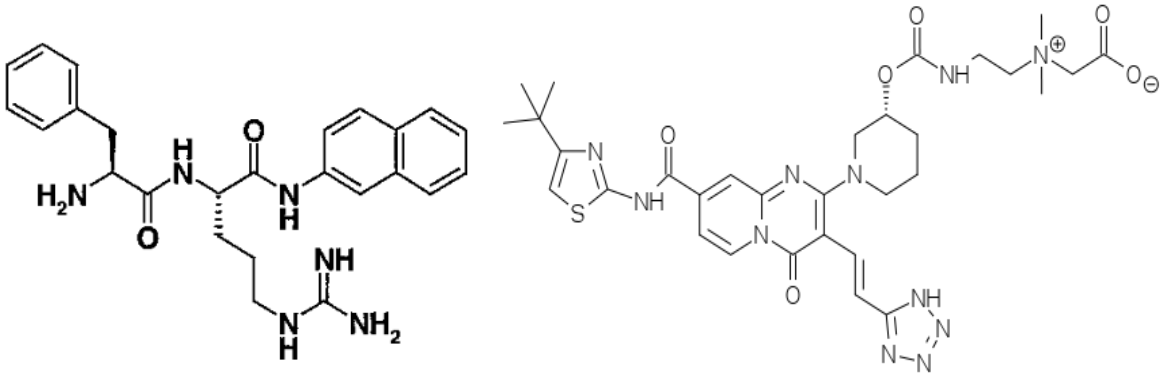


図 1-5. PABN(左)と ABI-PP(右)の構造式

本研究の目的

これまでの解析により、サルモネラ薬剤排出ポンプは、薬剤耐性に加えて病原性にも関与していることが示唆された。しかしながら、サルモネラ薬剤排出ポンプの生理的役割や発現制御機構、病原性への関与について、未だ不明な点が多く残されている。

本研究では、薬剤耐性化の克服、及び病原性の減弱を目的とし、サルモネラ薬剤排出ポンプの阻害剤の探索を行った。薬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がることが期待される。

第２章
サルモネラの薬剤排出ポンプの阻害剤の探索

第 1 節　緒言

耐性菌による感染症は、院内感染を中心に世界各国で大きな問題となっている。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、特に薬剤排出ポンプは、複数の抗菌薬を能動的に排出し単独で多剤耐性化を引き起こすことから、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要な原因菌であり、食中毒や敗血症、腸チフスなど様々な症状を引き起こすグラム陰性菌である。*Salmonella enterica* serovar Typhimurium はネズミにチフス様症状を引き起こすだけでなく、ヒト食中毒の原因にもなる代表的な病原細菌のモデル生物である。近年、他の病原菌と同様サルモネラにおいてもその多剤耐性菌が報告されはじめている。

サルモネラにおいては、10 個の薬剤排出ポンプ (AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, MdsABC, MdfA, EmrAB, SmvA, MdtK, MacAB) が実験的に同定されている。そこで本章では、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。

第２節　実験材料と方法

2-1. 実験に使用した菌株・プラスミド及び培養条件

Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC14028s 株 [29] をサルモネラ野生株として使用した。その他の菌株は、先行研究で作製されたものを使用した。菌株は適切な抗生物質(カナマイシン: 25μg/mL、アンピシリン: 100μg/mL)を含んだ LB プレートもしくは LB 液体培地により、37℃で培養を行った。本章で用いた菌株及びプラスミドは、表 2-1 にまとめた。

Strains or Plasmids	Original name	Characteristics	Reference
Salmonella enterica serovar Typhimurium Strains			
Wild-type	ATCC14028s	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium wild-type	16
Δ*acrB*/vector	NKS 442	Δ*acrB*::Km^R/pUC118	8
Δ*acrB*/p*macAB*	NKS 446	Δ*acrB*::Km^R/pUC*macAB*	8
Δ*acrB*/p*acrD*	NKS 431	Δ*acrB*::Km^R/pUC*acrD*	8
Δ*acrB*/p*mdsABC*	NKS 451	Δ*acrB*::Km^R/pUC*mdsABC*	8
Δ*acrB*/p*mdfA*	NKS 441	Δ*acrB*::Km^R/pUC*mdfA*	8
Plasmids			
pUC118		$rep_{pMBI}Ap^R$	Takara Bio
pUC*macAB*		*macAB* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pUC*acrD*		*acrD* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pUC*mdsABC*		*mdsABC* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pUC*mdfA*		*mdfA* gene cloned into pUC118, Ap^R	8

表 2-1. 実験に使用した菌株及びプラスミド

2-2. 大阪大学化合物ライブラリーを用いたスクリーニング方法

菌株を 37℃の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で OD_{600} が 0.1 となるように希釈した。96 ウェルのポリ塩化ビニル製のプレートに、希釈菌液 185μL と、各排出ポンプの基質である薬剤 10μL と、終濃度が 25μM となるように調整した化合物 5μL(溶媒は DMSO)を加えた。37℃で 15 時間静置培養後、Infinite M200 Pro microtiter plate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)を使用して、細菌の増殖度合いを OD_{600} で測定した。

第 3 節　結果

本研究では、各ポンプが認識する基質の内、過剰発現株と非発現株の間で最も薬剤感受性の差の出る抗菌薬と大阪大学化合物ライブラリー (Drug-like Set, Representative Diversity Set, Pharmacology Diversity set, The Spectrum Collection, Enamine Extra Collection2012, SAR compounds for a project, Osaka University Original Compounds を含む約 6 万化合物) を用いて、相乗的にポンプ発現株の薬剤抵抗性を軽減させることのできる化合物のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、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(図 2)。基質である薬剤は、2μg/ml エリスロマイシン(MacAB 過剰発現株)、8μg/ml クロキサシリン(AcrD 過剰発現株)、32μg/ml ローダミン 6G (MdsABC 過剰発現株)、8μg/ml ドキソルビシン(MdfA 過剰発現株)を使用した。

第 4 節　考察

本研究で行ったスクリーニングにより、サルモネラの薬剤排出ポンプのうち 4 種類の薬剤排出ポンプに対して、阻害候補化合物を見いだすことができた。全ての化合物に対して、単独抗菌活性がないことを確認している。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。薬剤排出ポンプは、菌種が異なっても非常に似た構造をとっていることが知られているため、薬剤排出ポンプの阻害剤に関する研究は、広域の耐性菌感染症薬の開発へと繋がると考えている。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を目指して研究を進めていきたい。

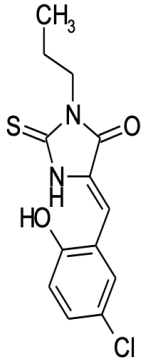
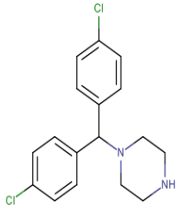
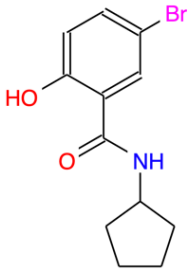
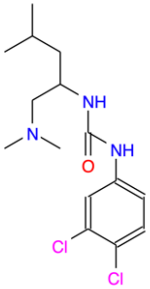
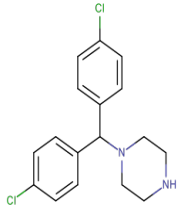
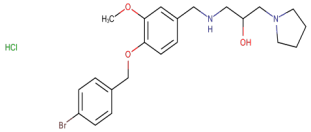
薬剤排出ポンプ		MacAB	AcrD	MdsABC		MdfA	
阻害候補化合物の構造式							
OD_{600}	化合物無し	**0.2805**	**0.2122**	**0.3742**	**0.3742**	**0.2716**	**0.2716**
	化合物有り	**0.0939**	**0.1243**	**0.1419**	**0.0660**	**0.0914**	**0.0987**

図 **2.** スクリーニングによって得られた各薬剤排出ポンプの阻害候補化合物

第３章
サルモネラの薬剤排出ポンプ **MacAB** の
阻害剤の機能解析

第 1 節　緒言

サルモネラにおいては、10 個の薬剤排出ポンプが実験的に同定されている。そのうちの一つである ABC 型薬剤排出ポンプ MacAB は、マウスに対する致死性に大きく関与していることが報告されている。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。

そこで本章では、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、スクリーニングで得られた阻害候補化合物の機能解析に取り組んだ。

第２節　実験材料と方法

2-1. 実験に使用した菌株・プラスミド及び培養条件

Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC14028s 株 [29] をサルモネラ野生株として使用した。その他の菌株は、先行研究で作製されたものを使用した。菌株は適切な抗生物質(カナマイシン: 25μg/mL、アンピシリン: 100μg/mL、クロラムフェニコール: 25μg/mL)を含んだ LB プレートもしくは LB 液体培地により、37℃で培養を行った。本章で用いた菌株及びプラスミドは、表 3-1 にまとめた。

Strains or Plasmids	Original name	Characteristics	Reference
Salmonella enterica serovar Typhimurium Strains			
Wild-type	ATCC14028s	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium wild-type	16
Δ*acrB*/vector	NKS 442	Δ*acrB*::Km^R/pUC118	8
Δ*acrB*/p*macAB*	NKS 446	Δ*acrB*::Km^R/pUC*macAB*	8
Δ*acrB*/p*acrAB*	NKS 426	Δ*acrB*::Km^R/pUC*acrAB*	8
Δ*acrB*/p*mdfA*	NKS 441	Δ*acrB*::Km^R/pUC*mdtA*	8
Δ*acrB*/p*mdtK*	NKS 447	Δ*acrB*::Km^R/pUC*mdtK*	8
Δ*macAB*	NKS 205	Δ*macAB*::Cm^R	8
Escherichia coli Strains			
Δ*acrB*/vector	NKE473	KAM3/pHSG399	
Δ*acrB*/p*macAB*	NKE395	KAM3/pHSG*macAB*	
Plasmids			
pUC118		$rep_{pMBI}Ap^R$	Takara Bio
pHSG399		$rep_{pMBI}Cm^R$	Takara Bio
pUC*macAB*		*macAB* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pUC*acrAB*		*acrAB* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pUC*mdfA*		*mdfA* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pUC*mdtK*		*mdtK* gene cloned into pUC118, Ap^R	8
pHSG*macAB*		*macAB* gene cloned into pHSG399, Cm^R	

表 3-1. 実験に使用した菌株及びプラスミド

2-2. 増殖曲線の測定

菌株を 37℃の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で OD_{600} が 0.1 となるように希釈した。96 ウェルのポリ塩化ビニル製のプレートに、希釈菌液 185μL と、様々な濃度の各薬剤 10μL と、終濃度が 25μM となるように調整した化合物 5μL(溶媒は DMSO)を加えた。細菌の増殖度合いを、Infinite M200 Pro microtiter plate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)を使用して、37℃で振盪しながら 15 分おきに 600nm で測定した。

第 3 節　結果

3-1. 阻害剤のマクロライド系抗菌薬との併用効果

スクリーニングで得られた MacAB 阻害候補化合物を、以降 OU33858 とする。MacAB は通常培養条件下ではほとんど発現していないので、主に発現している薬剤排出ポンプ AcrB を欠損させた、Δ*acrB*/p*macAB* を MacAB 過剰発現株、Δ*acrB*/vector を MacAB 非発現株として使用した。MacAB 過剰発現株の増殖曲線を測定したところ、OU33858 は 2 μg/ml のエリスロマイシンと併用することで増殖を阻害した（図 3-1a）。一方、ベクター株(MacAB 非発現株)においては、OU33858 を単独で作用させても問題なく増殖する(図 3-1b)ことから、OU33858 は単独抗菌活性を持たないと考えている。MacAB 過剰発現株に OU33858 を単独で作用させると、OU33858 非添加時に比べて増殖のスピードは遅くなるが、約 5 時間後から増殖曲線が立ち上がり、その後 OD_{600}=0.7 付近まで増殖が可能である。また、ベクター株に対して sub-MIC の濃度である 1 μg/ml のエリスロマイシンと併用しても、増殖は阻害されなかった（図 3-1c）。このことは、OU33858 はエリスロマイシンの活性化ではなく、MacAB の機能に影響を与えていることを示唆する。

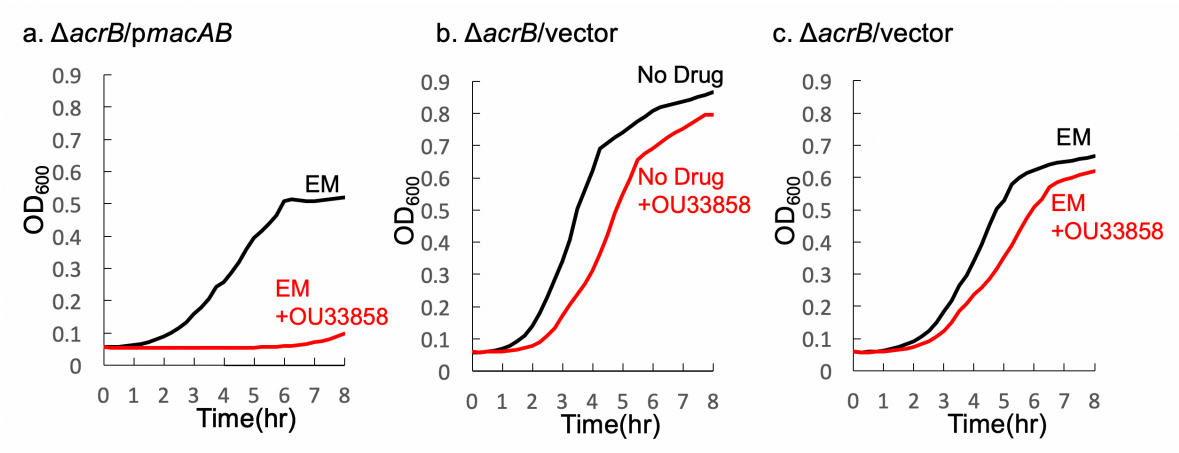


図 3-1. MacAB 過剰発現株及び非発現株に対する OU33858 の効果

a. Δ*acrB*/p*macAB* を 2 μg/ml エリスロマイシンと OU33858 存在下で測定した。

b. Δ*acrB*/vector を OU33858 存在下で測定した。

c. Δ*acrB*/vector を 1 μg/ml エリスロマイシンと OU33858 存在下で測定した。

次に、エリスロマイシン以外の薬剤に対する OU33858 の効果を検証した。MacAB は、マクロライド系抗菌薬を特異的に認識・排出することが報告されている。そこで、他のマクロライド系抗菌薬として、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ロイコマイシン、ジョサマイシンを用いて、それぞれ OU33858 との併用効果を調べた。全ての薬剤に対して、エリスロマイシンと同様に増殖を阻害する結果が得られた(図 3-2)。この結果から、OU33858 は MacAB の機能を阻害し、マクロライド系抗菌薬に対する感受性を高めることが示唆された。

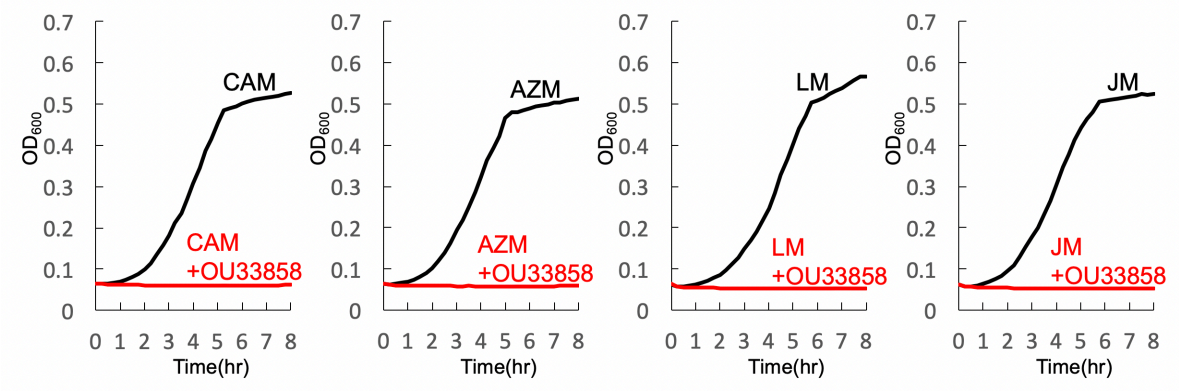


図 3-2. MacAB 過剰発現株に対するマクロライド系抗菌薬と OU33858 の併用効果
Δ*acrB*/p*macAB* をマクロライド系抗菌薬と OU33858 存在下で測定した。マクロライド系抗菌薬は、左から、2μg/ml クラリスロマイシン(CAM)、0.5μg/ml アジスロマイシン(AZM)、1μg/ml ロイコマイシン(LM)、4μg/ml ジョサマイシン(JM)を使用した。

3-2. 阻害剤の MacAB 以外の薬剤排出ポンプへの影響

サルモネラが有する 10 個の排出ポンプは、その構造およびエネルギー共役機構の違いから、RND 型、MF 型、MATE 型、ABC 型の 4 つのファミリーに分類することができる。MacAB は ABC 型の薬剤排出ポンプである。OU33858 が特異的に MacAB を阻害するのか検証するために、ABC 型以外の薬剤排出ポンプに対する効果を調べた。各ファミリーを代表して、AcrAB(RND 型)、MdfA(MF 型)、MdtK(MATE 型)過剰発現株を用いて、OU33858 を薬剤と併用し増殖曲線を測定した。薬剤は各薬剤排出ポンプの基質を使用し、AcrAB 過剰発現株に対してはエリスロマイシン、MdfA、MdtK 過剰発現株に対してはドキソルビシンを使用した。

OU33858 は、これらの薬剤を併用しても、各過剰発現株の増殖を阻害することはできなかった(図 3-3)。このことは、OU33858 は MacAB の機能を特異的に阻害していることを示す。

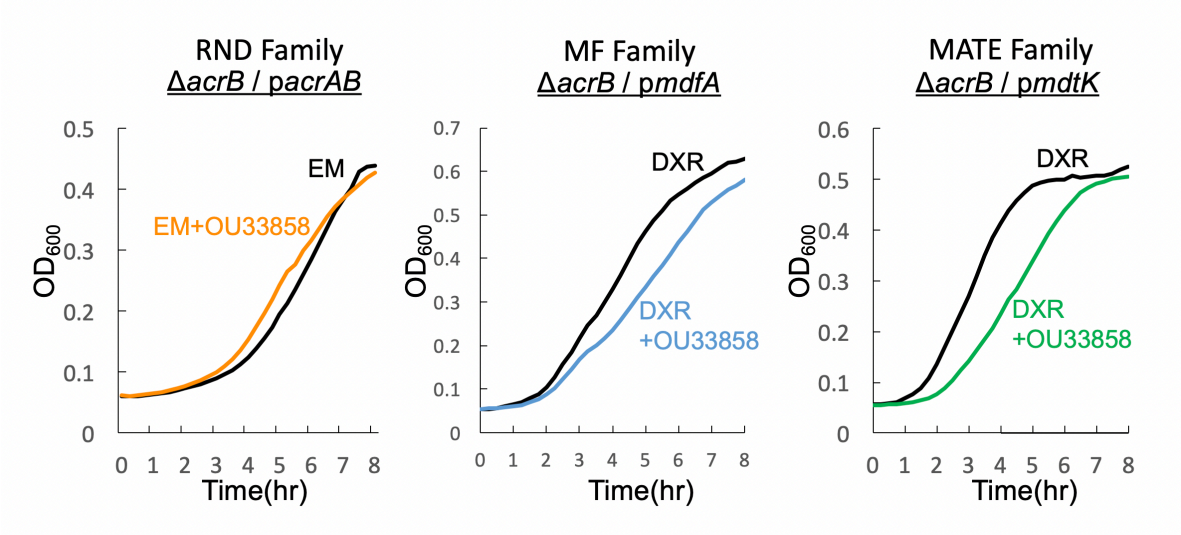


図 3-3. RND 型、MF 型、MATE 型薬剤排出ポンプに対する OU33858 の効果
薬剤は、左から、16μg/ml エリスロマイシン(EM)、2μg/ml ドキソルビシン(DXR)、4μg/ml ドキソルビシン(DXR)を使用した。

3-3. 阻害剤の単独抗菌活性についての検証

OU33858 が MacAB の基質であるマクロライド系抗菌薬と併用することで、薬剤感受性を高めることが明らかとなった。OU33858 自体に抗菌活性があるのか調べるために、OU33858 の濃度をふり、野生型と MacAB 欠損株の増殖曲線を計測した。すると、OU33858 の濃度が上がるにつれて増殖速度は少し遅くなるものの、阻害されることはなかった(図 3-4)。このことから、OU33858 自体には抗菌活性はないと考えている。

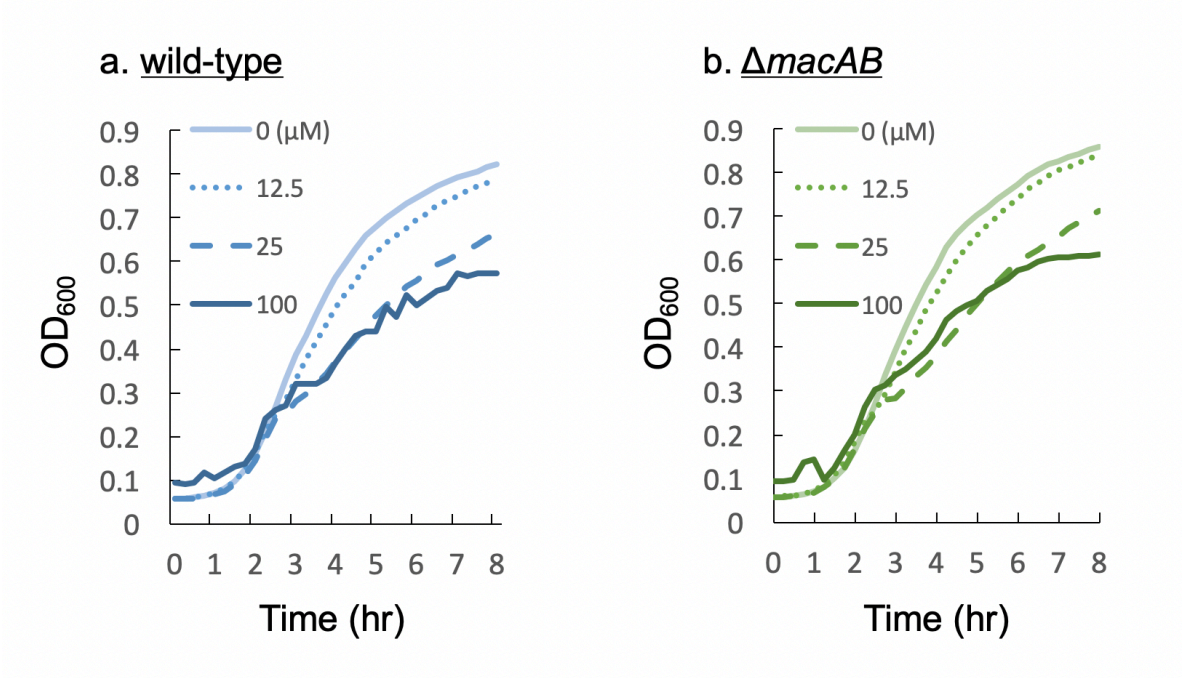


図 3-4. 野生株及び MacAB 欠損株に対する OU33858 の効果

3-4. 阻害剤の大腸菌 MacAB への影響

サルモネラ MacAB は、大腸菌 MacAB と約 83%のアミノ酸の相同性を持つことが報告されている[4]。OU33858 が大腸菌 MacAB の阻害剤としても機能する可能性は十分にあると考えた。そこで、大腸菌 MacAB 過剰発現株(Δ*acrB*/p*macAB*)の増殖曲線を測定したところ、25μM OU33858 では単独抗菌活性を示した。そこで、大腸菌については終濃度が 12.5μM となるように調整した OU33858 を使用した。OU33858 は 4μg/ml のエリスロマイシンと併用することで、大腸菌 MacAB 過剰発現株の増殖を阻害した(図 3-5a)。また、大腸菌のベクター株(Δ*acrB*/vector)については、OU33858 を単独で作用させても増殖は阻害されなかった(図 3-5b)。しかし、ベクター株に OU33858 をエリスロマイシンと併用させると、増殖が阻害されることがわかった(図 3-5c)。このことから、大腸菌においては、OU33858 は MacAB の発現量に関係なく、エリスロマイシンとの併用で増殖を阻害することが示唆された。

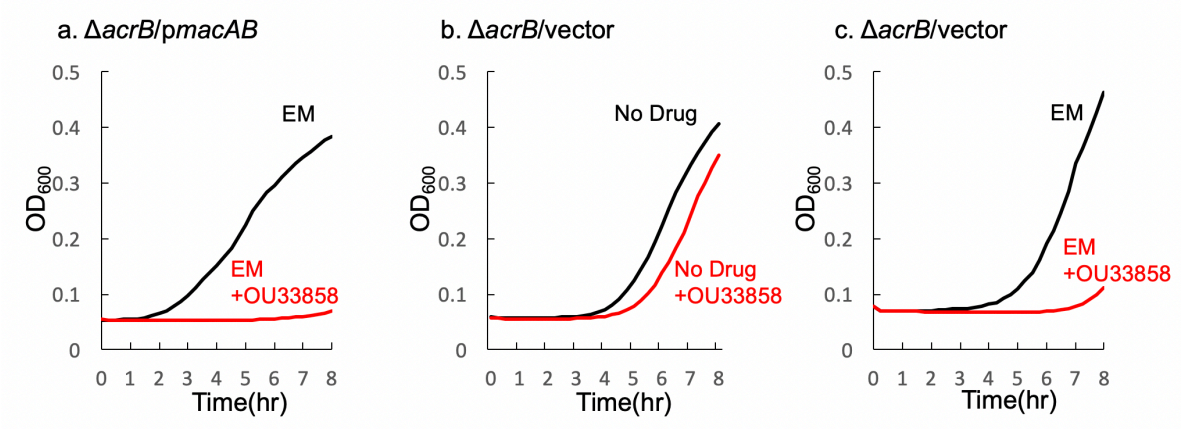


図 3-5. 大腸菌の MacAB 過剰発現株及び非発現株に対する OU33858 の効果

a. Δ*acrB*/p*macAB* を 4 μ g/ml エリスロマイシンと OU33858 存在下で測定した。

b. Δ*acrB*/vector を OU33858 存在下で測定した。

c. Δ*acrB*/vector を 0.5 μ g/ml エリスロマイシンと OU33858 存在下で測定した。

第 4 節　考察

本章では、スクリーニングにより得られた MacAB の阻害候補化合物、OU33858 について詳細を調べた。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。また、他の薬剤排出ポンプ過剰発現株の薬剤感受性には影響を与えなかったことから、MacAB に特異的に作用すると考えている。私の知る限りでは、MacAB の排出ポンプ阻害剤についての初めての報告となる。

また、サルモネラベクター株とは異なり、大腸菌ベクター株ではエリスロマイシンと OU33858 を併用させることで増殖が阻害された。このことから、大腸菌に対しては MacAB に特異的な影響を及ぼしていないと考えている。大腸菌とサルモネラはどちらも外膜を有するが、その構造は少し異なる。この違いにより OU33858 が菌体に及ぼす影響の差が生じている可能性が考えられる。

第４章
サルモネラの薬剤排出ポンプ **MacAB** の
酸化ストレスへの関与、及び阻害剤の影響

第 1 節　緒言

サルモネラ感染症では、活性酸素種(ROS)が過剰に産生されて脂質の過酸化をもたらし、最終的に組織の傷害が起きると考えられる。Bogomolnaya 氏らから、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た [30]。さらに、サルモネラ野生型から調整した上清が、H_2O_2 存在下での MacAB 欠損株の成長をレスキューすることが報告されている [30]。これらの結果より、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。

そこで本章では、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。

第２節　実験材料と方法

2-1. 実験に使用した菌株及び培養条件

Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC14028s 株 [29] をサルモネラ野生株として使用した。その他の菌株は、先行研究で作製されたものを使用した。菌株は適切な抗生物質(クロラムフェニコール: 25μg/mL)を含んだ LB プレートもしくは LB 液体培地により、37℃で培養を行った。本章で用いた菌株及びプラスミドは、表 4-1 にまとめた。

Strains	Original name	Characteristics	Reference
Salmonella enterica serovar Typhimurium Strains			
Wild-type	ATCC14028s	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium wild-type	16
Δ*macAB*	NKS 205	Δ*macAB*::Cm^R	8

表 4-1. 実験に使用した菌株

2-2. 増殖曲線の測定

菌株を 37℃の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で OD_{600} が 0.1 となるように希釈した。96 ウェルのポリ塩化ビニル製のプレートに、希釈菌液 190μL と、様々な濃度の H_2O_2 10μL を加えた。細菌の増殖度合いを、Infinite M200 Pro

microtiter plate reader (TECAN, Zurich, Switzerland)を使用して、37℃で振盪しながら15 分おきに 600nm で測定した。

2-3. 生菌数の計測

生菌数の計測方法は、Bogomolnaya 氏らの方法に従った[30]。菌株を 37℃の LB 液体培地で一晩培養し、同じ液体培地で 1/100 に希釈し、終濃度 2mM の H_2O_2 を加えて 37℃で 3 時間振盪培養した。その後、15 分、4,000 rpm で遠心し上清を回収し、フィルター(0.22 μm, Steriflip, Merck Millipore, MA, USA)を用いて滅菌した。ここで得られた上清を”conditioned medium”と称する。37℃の LB 液体培地で一晩培養した *macAB* 欠損株を conditioned medium で 1/100 希釈したものを２つ用意し、一方には終濃度 2mM の H_2O_2 を加えた。37℃で培養し 4 時間後、それぞれ LB agar にまき、一晩 37℃で静置培養し、翌日生えているコロニー数を数え、生菌数の計測を行った。

第 3 節　結果

3-1. H_2O_2 が及ぼす MacAB 欠損株の増殖への影響

まず初めに、H_2O_2 存在下での増殖に MacAB が必要であるのか確かめるために、H_2O_2 存在下での野生型と MacAB 欠損株の増殖の度合いに差があるのかを検証した。すると、15mM H_2O_2 存在下では、野生型は増殖できるが MacAB 欠損株は増殖できない。また、MacAB 過剰発現株については野生型に比べてさらに H_2O_2 感受性が低くなった(図 4-1a)。この結果から、H_2O_2 存在下での増殖には MacAB の機能が必要である可能性が示唆された。また、OU33858 を併用すると、野生型、MacAB 過剰発現株共に H_2O_2 存在下で増殖できない(図 4-1b, c)。OU33858 により MacAB の機能が阻害されたため、増殖できなくなったと考えられる。

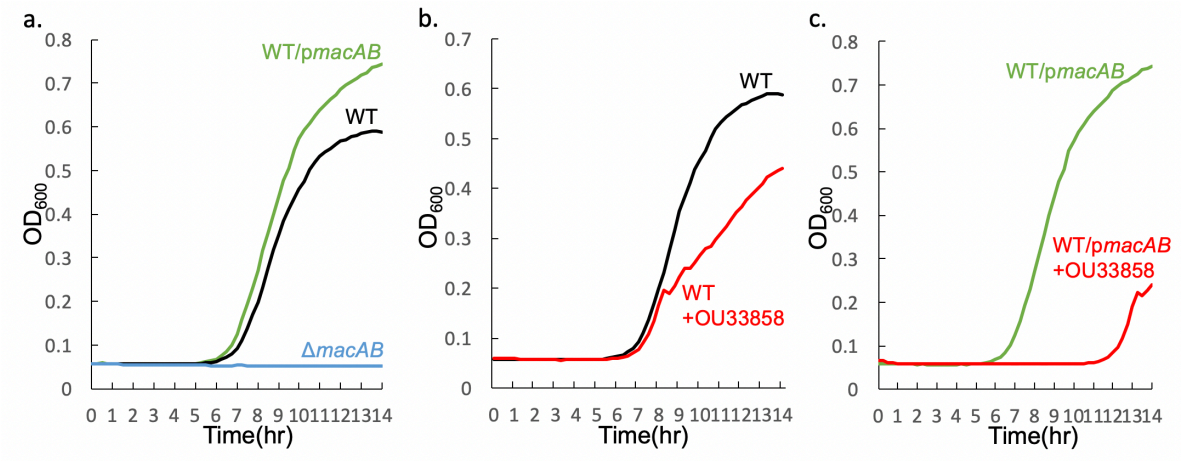


図 4-1. 野生型、MacAB 欠損株に対する H_2O_2 の影響

a. 野生型と MacAB 欠損株、MacAB 過剰発現株を 15mM H_2O_2 存在下で測定した。
b. OU33858 を併用し、野生型を 15mM H_2O_2 存在下で測定した。
c. OU33858 を併用し、MacAB 過剰発現株を 15mM H_2O_2 存在下で測定した。

3-2. サルモネラ野生株から作成した培地を利用した MacAB の酸化ストレスへの関与、及び阻害剤の影響

MacAB の役割は、マクロライド系抗菌薬に対する耐性化に加えて、マウス致死性に関与することが報告されていた[4]。また、マクロファージ感染時に *macAB* の発現量が増大することが、当研究室の過去の研究により明らかとされていた。そ

れに加えて、Bogomolnaya 氏らから、MacAB が酸化ストレスに関与する何らかの物質を排出している可能性があることが報告された[30]。MacAB 欠損株は H_2O_2 存在下ではほとんど増殖できないにも関わらず、サルモネラ野生株から調整した上清中では、H_2O_2 の影響をあまり受けることなく増殖できる。MacAB が酸化ストレスを軽減する何らかの物質を排出するのであれば、OU33858 を作用させると、MacAB からの物質の排出が阻害され、H_2O_2 の影響から MacAB 欠損株を保護する上清の効果が減少するのではないかと考えた。そこで、まず初めに私達はサルモネラ野生株から上清を調整した。この上清を”conditioned medium”と称する。この conditioned medium で MacAB 欠損株を培養し、H_2O_2 の添加時と非添加時での生菌数を計測した。培養 4 時間後のコロニー数を培養開始時のコロニー数で割った値を生菌率として算出した。本実験では、H_2O_2 の有無での生菌率の平均値を比較する際に t 検定を用いた。MacAB 欠損株を LB 液体培地で培養すると、H_2O_2 を添加した場合、非添加時と比較すると生菌率が大きく減少した。ところが、conditioned medium で培養すると、H_2O_2 の添加時と非添加時での生菌率の差があまり見られなかった(図 4-2a)。この結果は、Bogomolnaya 氏らの報告と一致する。

次に、conditioned medium を調整する際に OU33858 を添加した。この conditioned medium で MacAB 欠損株を培養したところ、H_2O_2 を添加した場合、非添加時より生菌率が大きく減少した(図 4-2b)。つまり、conditioned medium で培養することによって H_2O_2 の有無による生菌率の差が減少していたが、OU33858 の添加により無効化されたことが明らかとなった。このことは、OU33858 が MacAB の機能を阻害していることを裏付ける結果となった。

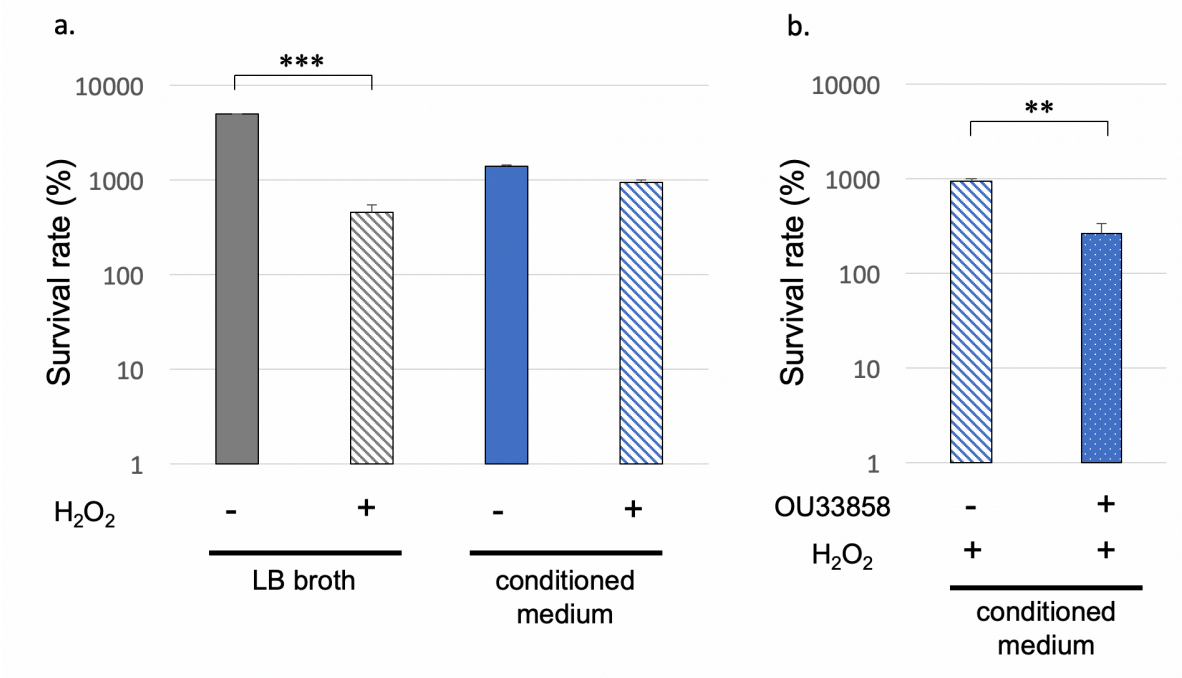


図 4-2. MacAB 欠損株の生菌率

a. LB 液体培地と conditioned medium で培養した MacAB 欠損株の生菌率

b. OU33858 を添加した場合の MacAB 欠損株の生菌率

培養 4 時間後のコロニー数を培養開始時のコロニー数で割った値を生菌率とし、独立した 3 回の実験結果の平均の値を記載した。(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

第 4 節　考察

Bogomolnaya 氏らにより、MacAB が酸化ストレス耐性をあげる何らかの物質を排出していることが報告されていた[30]。そして私達は、サルモネラ野生株から調整した 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とが明らかとなった。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。

本章では、MacAB が酸化ストレスを軽減させる物質を排出している可能性を示した。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[31]。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が排出されているのではないかと予想している。というのも、サルモネラはファゴソーム内において、ラジカルや活性酸素による酸化ストレスに曝されている。ファゴソーム内において MacAB から protoporphyrinⅨを排出し、金属イオンをキレートし酸化ストレス反応の進行を抑えることで、酸化ストレスへの抵抗性を高めているのではないか、という仮説をたてた。この仮説が正しければ、MacAB の機能を阻害することで、サルモネラは酸化ストレス条件下で増殖することができなくなり、ファゴソーム内などでの生存が不可能となる。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。

第５章
総括

1. 大阪大学化合物ライブラリーを用いて、薬剤排出ポンプの阻害剤のスクリーニングを行った。そして、サルモネラの薬剤排出ポンプのうち 4 種類の薬剤排出ポンプの阻害候補化合物を見出した。

2. サルモネラの薬剤排出ポンプ MacAB の阻害候補化合物 OU33858 は、マクロライド系抗菌薬と併用することで MacAB 過剰発現株の増殖を阻害する。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を示した。

3. MacAB の機能が酸化ストレス耐性に関与していることを確認した。また、OU33858 により酸化ストレス耐性が軽減したことから、OU33858 が MacAB の阻害剤であることが裏付けられた。

グラム陰性菌において、MacAB は薬剤排出と病原性の両方に影響を及ぼす[32]。これらのポンプはマクロライド系抗菌薬だけでなく、heat-stable enterotoxin II, outer membrane glycolipids, lipopeptides, protoporphyrin などを排出する[31, 33-35]。MacB はマクロファージ内でのサルモネラと化膿性レンサ球菌の生存にも影響を及ぼす[30, 36]。近年、クライオ電顕で MacAB-TolC の構造が解明され、MacB の結晶構造が明らかにされた[37-39]。その一方で、MacAB に対する多くの疑問が残っている。例えば、MacB がどのような仕組みで基質を認識しているのかについては、未だ明らかにされていない。細菌生理学においても、MacB の役割を理解することは、重要な問題となっている。

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。

第６章
引用文献

1. McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol* 2002; **10**: S8-14.
2. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E et al. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 2002; **419**: 587-93.
3. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5803-12.
4. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2006; **59**: 126-41.
5. Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 834-43.
6. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR et al. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium*. *Lancet*. England, 1996; 1053-4.
7. Threlfall EJ, Ward LR, Skinner JA et al. Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. *Microb Drug Resist* 1997; **3**: 263-6.
8. Multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium--United States, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; **46**: 308-10.
9. Glynn MK, Bopp C, Dewitt W et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1333-8.
10. Ng LK, Mulvey MR, Martin I et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 3018-21.
11. Villagra NA, Hidalgo AA, Santiviago CA et al. SmvA, and not AcrB, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 1273-6.
12. Lewinson O, Padan E, Bibi E. Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 14073-8.
13. Poole K, Krebes K, McNally C et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa:* evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 1993; **175**: 7363-72.
14. Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are

involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 1999; **181**: 1203-10.
15. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5639-44.
16. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 2003; **57**: 395-418.
17. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 2000; **287**: 1655-8.
18. Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella* typhimurium. *Microbiol Rev* 1991; **55**: 561-85.
19. Brumell JH, Tang P, Mills SD et al. Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Salmonella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic* 2001; **2**: 643-53.
20. Wu TF, Hsu CY, Huang HS et al. Proteomic analysis of pycnogenol effects in RAW 264.7 macrophage reveals induction of cathepsin D expression and enhancement of phagocytosis. *J Agric Food Chem* 2007; **55**: 9784-91.
21. Mulero I, Noga EJ, Meseguer J et al. The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. *Dev Comp Immunol* 2008; **32**: 1531-8.
22. Lomovskaya O, Watkins W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; **3**: 225-36.
23. Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 826-33.
24. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 105-16.
25. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med* 2011; **6**.
26. Nakayama K, Ishida Y, Ohtsuka M et al. MexAB-OprM-specific efflux pump

inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; **13**: 4201-4.
27. Yoshida K, Nakayama K, Ohtsuka M et al. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg Med Chem* 2007; **15**: 7087-97.
28. Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S et al. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* 2013; **500**: 102-6.
29. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG et al. Mutants of *Salmonella* typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 5189-93.
30. Bogomolnaya LM, Andrews KD, Talamantes M et al. The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar typhimurium from oxidative stress. *MBio* 2013; **4**: e00630-13.
31. Turlin E, Heuck G, Simoes Brandao MI et al. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli. Microbiologyopen* 2014; **3**: 849-59.
32. Greene NP, Kaplan E, Crow A et al. Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective. *Front Microbiol* 2018; **9**: 950.
33. Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E et al. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* 2008; **190**: 7693-8.
34. Vallet-Gely I, Novikov A, Augusto L et al. Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 910-21.
35. Cho H, Kang H. The PseEF efflux system is a virulence factor of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Microbiol* 2012; **50**: 79-90.
36. Phelps HA, Neely MN. SalY of the *Streptococcus pyogenes* lantibiotic locus is required for full virulence and intracellular survival in macrophages. *Infect Immun* 2007; **75**: 4541-51.
37. Fitzpatrick AWP, Llabres S, Neuberger A et al. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat Microbiol* 2017; **2**: 17070.
38. Okada U, Yamashita E, Neuberger A et al. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. *Nat Commun* 2017; **8**:

1336.
39. Crow A, Greene NP, Kaplan E et al. Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**: 12572-7.

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所・第 3 研究部門・生体分子制御科学研究分野(西野研)において行われたものです。本研究を行う機会を与えてくださり、暖かい御指導をいただきました、西野邦彦教授、西毅准教授、山崎聖司准教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に対する深い御理解と御協力を賜るとともに、様々な面で御力添えを賜りました、山口明人特任教授、中島良介特任准教授に深く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、数多くの質問に真摯にお答えいただくとともに、様々な面でご協力いただきました、西野美都子助教、Martijn Zwama 特任助教、松本佳巳招聘教授、西晶子特任研究員、西村巌特任研究員、林克彦博士に心より感謝申し上げます。

貴重な大阪大学化合物ライブラリーを提供いただきました大阪大学大学院 薬学研究科 細胞生理学分野 辻川和丈教授に心より御礼申し上げます。

さらに、福島愛子特任技術職員、北川公恵技術補佐員には生化学実験を含め研究室生活でのサポートをいただき、研究の遂行にあたって非常に大きなお力添えをいただきました。また、 松岡澄恵事務補佐員、鳥取千春事務補佐員には経費の処理を含め、事務的な面で大変な大きな御力添えを賜りました。心から深く感謝申し上げます。

また、ともに研究に励み、研究以外の面においても色々と支えていただきました、中尾香修士、重山紗紀修士、中野草平様、内田和志様、古閑修輝様、徳光津名魅様、ワイズ健様、井川創太様、池邉美季様、岸勝太様、中村透唯様にこの場を借りて御礼申し上げます。

最後に、いつも暖かく見守り支えていただいた友人、またこのような大変恵まれた環境で学ぶ機会を与え、長きに渡りご協力いただいた家族に心より感謝を申し上げます。

今後のみなさまの人生が充実されますことを心よりお祈り申し上げます。

2020 年 3 月　山岸亜美

本学位論文の審査は、大阪大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査
大阪大学教授（薬学研究科・産業科学研究所）　　薬学博士　西野邦彦教授
副査
大阪大学教授（薬学研究科）　　薬学博士　高木達也教授
大阪大学教授（薬学研究科）　　薬学博士　辻川和丈教授