

氏名	李 恩 雨
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 学
学位授与番号	博甲第2515号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular Genetic Analysis and Biochemical Characterization of Multidrug Efflux Pumps in <i>Enterococcus faecalis</i> (腸球菌における多剤排出ポンプの分子遺伝学的及び生化学的解析)
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 山本 重雄 教授 森山 芳則

#### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

近年多くの多剤耐性菌の出現が報告されているが、特に多剤排出ポンプの亢進や獲得による多剤耐性化は、非常に大きな問題となっている。私は多剤排出ポンプの耐性機構の解明を目指している。本研究では、院内感染の主要な原因菌の一つであり幅広い範囲の抗菌剤に自然耐性を持っている腸球菌から、多剤排出ポンプ遺伝子をクローニングし、構造解析と生化学的解析を行った。

腸球菌感染の主要な原因菌である *Enterococcus faecalis* の染色体には 34 個の薬剤排出ポンプが存在することがゲノムの sequence 解析によって推定されている。しかし、腸球菌の多剤排出ポンプに関する報告はほとんどない。そこで、私はショットガン法により *E. faecalis* の染色体 DNA から多剤排出ポンプ遺伝子クローニングを行った。クローニングされた遺伝子 (*emeA* と命名) の塩基配列を決定した結果、393 アミノ酸残基からなる推定 12 膜貫通構造を有すること、及び MFS family に属することがわかった。*EmeA* は枯草菌の多剤排出ポンプ *Blt* や *Bmr*、黄色ブドウ球菌の *NorA* と高い類似性を示した。また、*EmeA* は quinolone 剤や EtBr, Hoechst 33342 等の各種抗菌剤の耐性に関与していることが分かった。さらに、EtBr, acriflavine, Hoechst 33342, DAPI などの抗菌剤の細胞内蓄積量の変化又は細胞外への排出を測定することにより、*EmeA* による抗菌剤の排出活性を確認した。

次に、上記の *EmeA* とは異なる新たな多剤排出ポンプ遺伝子のクローニングを行った。その結果、acriflavine を含む培地で多剤耐性を示すコロニーが得られた。この多剤排出ポンプ遺伝子は、572 アミノ酸残基と 589 アミノ酸残基からなる 2 つの open reading frames (*efrA* と *efrB* と命名) からなっていた。*EfrA* と *EfrB* はいずれも、6 回膜貫通ドメインと長い親水性ドメインを有するものであり、アミノ酸配列から ATP binding cassette (ABC) family に属することが分かった。*EfrAB* はヒトの *MDR1* 等の色々な ABC type 多剤耐性ポンプと類似性を示した。*efrA* と *efrB* をそれぞれ発現させ活性を調べた結果、*EfrA* 又は *EfrB* 単独では活性がなく、多剤耐性を示す為には *EfrA* と *EfrB* の両方が必要であることが分かった。*efrAB* を導入した大腸菌 KAM32 株は acriflavine 以外にも quinolone 剤、抗癌剤、色素系薬剤等の様々な薬剤に耐性を示した。また、acriflavine を用いた薬剤の細胞外への排出活性を調べた結果、*EfrAB* はエネルギー依存的に acriflavine を細胞外へ排出する活性を持つことがわかった。この排出活性は多剤排出ポンプの阻害剤で知られている verapamil や sodium-*o*-vanadate 等の薬剤によって顕著に阻害された。*EfrAB* は腸球菌で見出された最初の ABC 型多剤排出ポンプである。

## 論文審査結果の要旨

腸球菌感染症の主要な原因菌の1つである *Enterococcus faecalis* は、いろいろな抗菌剤に対して自然耐性を示す。また、獲得耐性も示す。多剤耐性に最も深く関与するのが多剤排出ポンプである。*E. faecalis* の染色体には 34 個の薬剤排出ポンプ遺伝子が存在することがゲノム解析から推定されている。しかし、*E. faecalis* の多剤排出ポンプに関する報告はほとんどない。本論文では、*E. faecalis* から多剤排出ポンプの遺伝子を2つクローニングし、構造を解析すると共にそれらの生化学的解析を行っている。その内の1つである EfrAB は、互いに似ている2つの成分からなる多剤排出ポンプであり、ヒトの多剤排出ポンプである MDR1 などとある程度似ていることがわかった。抗菌活性を持つ acriflavine や quinolone 剤、抗癌剤、色素系薬剤等の様々な薬剤に耐性を示すことが明らかにされている。また、acriflavine を用いた薬剤の細胞外への排出活性を調べた結果、EfrAB はエネルギー依存的に acriflavine を細胞外へ排出する活性を持つことが明らかにされている。この排出活性は多剤排出ポンプの阻害剤で知られている verapamil や sodium-*o*-vanadate 等の薬剤によって阻害された。EfrAB は腸球菌で見出された最初の ABC 型多剤排出ポンプということになる。もう1つの多剤排出ポンプ EmeA は、MFS family に属するものであること、EmeA は quinolone 剤や EtBr, Hoechst 33342 等の各種抗菌剤の耐性に関与していることなどが明らかにされた。さらに、EtBr, acriflavine, Hoechst 33342, DAPI などが EmeA により細胞外に排出されることが明らかにされている。以上のように、本論文は *E. faecalis* の多剤耐性に関わる2つの多剤排出ポンプを解析したものであり、学術上大変興味深く、博士(薬学)の学位に値するものと判断する。