

氏名	関谷 洋志
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3395号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	緑膿菌の多剤排出ポンプ MexHI-OpmD の解析
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 森山 芳則 教授 三好 伸一

学位論文内容の要旨

緑膿菌の既知の多剤排出ポンプ MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM を欠損した抗菌薬高感受性緑膿菌 YM64 株から、抗菌薬耐性を指標に耐性株を分離した。耐性株を抗菌薬の耐性パターンで分類し、キノロン系抗菌薬 norfloxacin、消毒薬 benzalkonium chloride、色素系抗菌薬 acriflavine、ethidium bromide、rhodamine 6G に耐性を示す多剤耐性変異株が得られた。この多剤耐性変異株のひとつを YM644 と命名し、YM644 株の多剤耐性機構についての解析を進めた。YM644 株の染色体 DNA から遺伝子クローニングを行い、YM644 株の多剤耐性の原因遺伝子を含んだ約 8 kbp の DNA 断片をクローニングできた。この DNA 断片には、4 つの遺伝子 PA4205 (*mexG*)、PA4206 (*mexH*)、PA4207 (*mexI*)、PA4208 (*opmD*) が含まれており、*mexHI-opmD* は未解析の RND family に属する多剤排出ポンプをコードする遺伝子群であった。ethidium の排出活性を測定した結果から、*mexHI-opmD* は多剤排出ポンプであることが示唆された。

YM644 株からクローニングした *mexGHI-opmD* を含んだ領域の中には、*mexG* の上流のプロモーター領域に T が欠失した変異があることがわかった。また、同じ耐性パターンを示す他の変異株についても *mexG* の上流のプロモーター領域の欠失した変異がみられた。RT-PCR 法を用いて、*mexGHI-opmD* の発現量を調べた結果、YM644 株は親株 YM64 よりも *mexGHI-opmD* の発現量が 10 倍以上増加していた。変異による *mexGHI-opmD* の発現量の増加により、緑膿菌は多剤耐性を示すことがわかった。また、YM64 株から *mexHI-opmD* を欠損させた PMX52 株の最小生育阻止濃度 (MIC) の測定を行った結果、MexHI-OpmD は親株でも活性は弱い機能がすることがわかった。MexHI-OpmD は緑膿菌の高度耐性に関与する多剤排出ポンプのひとつであると考えられる。また、*mexG* の欠損株、*mexG* の導入株を作製し、機能未知である MexG の機能について調べた。その結果、MexG が単独で抗菌薬耐性に関与する可能性は低いこと、MexG が trans effect で機能する転写調節因子ではないことを示した。さらに、*mexG* の上流のプロモーター領域の T の欠失変異だけではなく、クオラムセンシングの遺伝子制御系が働いている定常期でも、*mexHI-opmD* の発現が上昇することがわかった。また、MexHI-OpmD の酸性環境下、アルカリ性条件下での緑膿菌の生育に対する影響を調べた結果、pH5.0 の酸性培地では MexHI-OpmD 欠損株はほとんど生育しなかった。MexHI-OpmD は抗菌薬耐性に関与するだけでなく、酸性環境下での生育にも有利に機能していると考えられた。

論文審査結果の要旨

緑膿菌は院内感染の主要な原因菌の一つである。緑膿菌は元々多くの抗菌薬に自然耐性を示すため、その感染症の治療薬は限られてくる。さらに、緑膿菌は多剤に対する高度耐性を獲得しやすい。緑膿菌の多剤高度耐性に最も深く関与しているのが多剤排出ポンプである。ゲノム情報から、この菌には34個の多剤排出ポンプ遺伝子が存在すると推定されている。それらのうち、すでに解析されているものは5つであった（本研究開始時）。著者は未解析の多剤排出ポンプの中に、緑膿菌の多剤高度耐性に関与するものがあるのではないかと考え、そのようなポンプを解析するため本研究を進めた。既解析の多剤排出ポンプと重複するのを避けるため、5つの既解析ポンプの遺伝子欠損株を親株として用い、そこから種々の抗菌物質に対する耐性度が上昇した変異株を複数分離した。それらの代表株について耐性度上昇の責任遺伝子をクローニングした。それは重金属耐性に関与する遺伝子として報告された *mexHI-opmD* であることがわかった。多剤排出ポンプとしての MexHI-OpmD の性質を詳しく解析した。また耐性変異株においては *mexHI-opmD* の遺伝子発現が上昇していること、発現上昇の原因はプロモーター領域における1ヌクレオチドの欠失であることを明らかにした。他の耐性変異株についても、プロモーター領域に別の1ヌクレオチドの欠失があることを明らかにしている。さらに *mexHI-opmD* の遺伝子破壊を行い、耐性変異株の各種抗菌物質に対する耐性度が親株と同程度にもどることを確認した。親株とは異なり、この遺伝子破壊株が酸性条件下（pH 5.0）で生育できなくなることから、MexHI-OpmD は緑膿菌の酸性条件下での生育にも必須であることを明らかにした。

以上のように、この論文は緑膿菌の抗菌薬耐性に関わる一つの多剤排出ポンプの性質や発現上昇の機構を明らかにした大変興味深いものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。