

氏 名 西岡 俊博

授与した学位 博士

専攻分野の名称 薬学

学位記授与番号 博甲第 3853 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 25 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第 5 条第 2 項該当)

学位論文の題目 グラム陽性菌の多剤排出ポンプの解析  
腸球菌と枯草菌について

論文審査委員 教授 土屋 友房 教授 森山 芳則 准教授 表 弘志

#### 学位論文内容の要旨

本研究ではまず、抗菌薬高感受性大腸菌株を宿主として腸球菌 *Enterococcus faecium* の多剤排出ポンプの遺伝子クローニングと解析を行った。*E. faecium* の臨床分離株より多剤耐性に関与する遺伝子の機能的なクローニングを行った。その結果、多剤耐性を示す候補株が得られた。その耐性を与える責任遺伝子は多剤排出ポンプに類似性を示す、未解析のタンパク質をコードする遺伝子であった。そこで、この遺伝子を *efmA* と命名し、解析を行った。*efmA* を導入すると大腸菌、枯草菌に対して多剤耐性を与えた。また、*EfmA* は排出ポンプをして機能することを明らかにした。また、*efmA* は *E. faecium* において発現していた。これより、*EfmA* は *E. faecium* の抗菌薬耐性に関与していることが示唆された。

その過程で、多剤排出ポンプの解析の宿主としてグラム陰性菌の大腸菌を用いた場合とグラム陽性菌の枯草菌を用いた場合とでその活性の見え方が異なっていることがわかってきた。これは、グラム陰性菌とグラム陽性菌とで膜構造が異なることなどによると考えられた。これより、グラム陽性菌の多剤排出ポンプはグラム陽性菌の宿主を用いて解析を行う方が望ましいと考えられた。そこで、グラム陽性菌の枯草菌を宿主とした多剤排出ポンプの解析系の構築に取り組んだ。

多剤排出ポンプの解析の宿主として用いる枯草菌株は多くの抗菌物質に対して感受性の高い株であることが望ましい。多くの細菌で主要な多剤排出ポンプ遺伝子を破壊することで多くの抗菌物質に対して感受性を示すようになることがわかっている。そこで、genome project の完了している枯草菌 168 株より多剤排出ポンプ遺伝子を破壊した株を構築した。構築した破壊株は親株と比べて抗菌物質に対してより高い感受性を示し、多剤排出ポンプの解析の宿主としてより適した株であることがわかった。

一方で、構築した枯草菌多剤排出ポンプ遺伝子破壊株において、*norfloxacin* のエネルギー依存的な排出が見られた。そこで、この株より *norfloxacin* 耐性変異株を分離し、*norfloxacin* の排出活性が上昇した株を得た。この株では *noefloxacin* に加え、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) などに耐性を示した。発現解析より、ABC family の多剤排出ポンプと推定される、*yheI* の発現上昇が確認された。*yheI* は *yheH* と heterodimer あるいは heterooligomer を形成して機能すると推定される。遺伝子破壊と相補実験より、耐性変異株は *yheIH* の発現上昇により耐性を示すことが明らかになった。*yheIH* の promoter 領域の塩基配列を解析したが、この領域に変異は確認されなかった。これより、*yheIH* の調節因子に変異が入ることで *yheIH* の発現が上昇したと考えられた。

本研究で腸球菌 *E. faecium*、枯草菌の多剤排出ポンプの解析を行った。加えて、構築した枯草菌多剤排出ポンプ遺伝子破壊株はグラム陽性菌の多剤排出ポンプの解析に有用なシュル種となると考えている。

## 論文審査結果の要旨

多くの抗菌薬が効かない多剤耐性菌による感染症が臨床現場で大きな問題になっている。先進諸国では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) などの多剤耐性菌による院内感染が重大な問題になっている。多剤耐性には多剤排出ポンプが大きな役割を果たしていることが、大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性菌で明らかにされている。一方、MRSA や VRE などのグラム陰性菌については、多剤排出ポンプの解析はあまり進んでいない。この論文の著者は、グラム陽性菌の例として、VRE の一つである *Enterococcus faecium* と、遺伝子組換え実験の宿主として認定されている枯草菌について、多剤排出ポンプの解析を行った。*E. faecium* については、ショットガン法によるクローニングの結果、一つの候補遺伝子がクローニングできた。これを *efmA* と名づけ、解析を行った。そして、EfmA の基質特異性を調べ、かつ排出活性を調べるなど、性質の解析を行っている。一方、グラム陰性菌の多剤排出ポンプの解析用宿主として、枯草菌に注目し、抗菌薬感受性株の構築を行っている。枯草菌で報告されている 7 つの多剤排出ポンプの遺伝子破壊を行い、高感受性株を構築している。そしてその株からキノロン耐性株を分離し、そのキノロン耐性の責任遺伝子をクローニングし解析している。

この論文の内容には新規性があり、当該分野の発展に貢献するものであると考えられる。実験は適切に行われており、信頼性がある。実験結果の表現も適切であり、議論の進め方、結論も妥当である。また、文献の引用も適切である。

以上を総合的に考え、この論文は博士 (薬学) の学位にふさわしいものと判断した。