

氏名	李 洋
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2917号
学位授与の日付	平成17年 3月25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 MexVW の生化学的及び遺伝学的解析
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 森山 芳則 助教授 中尾 浩史

学位論文内容の要旨

近年、多剤耐性緑膿菌による院内感染が多発し、臨床現場で深刻な問題になっている。緑膿菌の主要な多剤耐性機構として、構造や標的部位の全く異なる抗菌薬の多剤排出ポンプによる細胞外への排出が知られている。我々は緑膿菌の多剤排出ポンプの全体像を解明することを目標にしている。

本研究では、緑膿菌の多剤耐性変異株を分離し、その耐性に関わった遺伝子 *mexVW* をクローニングした。*MexVW* は RND ファミリーに属する新規多剤排出ポンプであり、cefpirome、キノロン系抗菌薬、erythromycin、tetracycline、chloramphenicol 及び色素系抗菌薬である ethidium bromide、acriflavine などの多剤耐性に関与していることがわかった。また、*mexVW* の高発現株はプロトン駆動力に依存して ethidium を排出することもわかった。*mexVW* は野生株においてわずかながら発現しており、変異により発現が上昇し多剤耐性を示すようになることがわかった。本研究において、*mexVW* の発現を上昇させる変異パターンが 3 つあり、その変異部位は全て promoter 領域にあることが明らかになった。解析したものの中には Pribnow box の G→A 変異を持つ変異株が多くあり、調べた株の 7 割を占めていた。その他に promoter の -35 領域付近にある T が C に変わった変異や、promoter の -35 領域を含んだ 25 塩基の欠失を持つ変異株もあった。これらの変異株において、*mexV* の発現量が親株 YM44 の 4 倍から 6 倍に上昇していた。

mexVW オペロンの下流側に外膜成分をコードする遺伝子は存在しないため、*MexVW* が利用できる外膜成分について検討した。YM44 株 (*oprM*, *opmD*)、YM64 株 (Δ *oprM*, *opmD*)、PMX52 株 (Δ *oprM*, Δ *opmD*) を用い、*mexVW* の plasmid (pTAJ2) の transformant や *mexVW* の遺伝子破壊株を作製した。解析した結果、*MexVW* は既知の *MexXY*, *MexJK* と同じように *OprM* と相補的に機能し多剤耐性を示すことを明らかにした。また、*OprM* 以外に *MexVW* が利用する外膜成分の存在も示唆された。その外膜成分に *OpmD* が関与していること、及び *OpmD* 以外に *MexVW* が利用できる外膜成分が存在していることも予想された。

論文審査結果の要旨

感染症の治療には抗菌薬がよく使われるが、抗菌薬が使われれば使われるほど耐性菌が出現する。緑膿菌は院内感染、日和見感染の主要な原因菌の一つであるが、各種抗菌薬にかなりの自然耐性を示す。また、各種抗菌薬に高度耐性を示す緑膿菌も臨床現場で出現している。この菌の抗菌薬自然耐性や高度耐性には多剤排出ポンプが最も深く関与していることがわかっている。この菌のゲノム情報から、この菌には10個の多剤排出ポンプが存在すると予想されている。それらの中で未解析のものが4つあった。著者は、すでに解析されている多剤排出ポンプを4つ欠損させた緑膿菌変異株から、臨床的に使用される複数の抗菌薬に対して耐性となった変異株を多数分離し、耐性の責任遺伝子をクローニングした。その遺伝子のシーケンス解析の結果、それはRND型の多剤排出ポンプをコードする遺伝子であることがわかった。それを *mexVW* と名付けた。そして *mexVW* が得られた多剤耐性変異株における多剤耐性の原因遺伝子であることをいくつかの面から確認している。さらに、*MexVW* が実際に多剤排出ポンプであることを確認し、基質特異性を明らかにした。得られた耐性変異株の変異部位を解析し、*mexVW* オペロンのプロモーター領域に変異があることを明らかにした。12株の変異株について解析し、3つのタイプの変異があることを明らかにしている。また、そのようなプロモーター領域の変異により、実際に *mexVW* の発現が上昇していることを確認している。

この論文で得られた成果は学術上大変興味深いものであり、審査委員会はこの論文が博士(薬学)の学位に値するものと判断した。