

氏名	山田 陽一
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3160号
学位授与の日付	平成18年 3月24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	黄色ブドウ球菌の多剤排出ポンプの遺伝子クローニングと性質
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

①黄色ブドウ球菌の多剤排出ポンプ遺伝子 *mdeA* のクローニングと性質

宿主に大腸菌を用いて、ゲノムの全塩基配列が決定している MRSA N315 株の多剤耐性に関与する遺伝子の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。その耐性の原因は多剤排出ポンプに類似性を示す機能未解析のタンパク質をコードする遺伝子 SA2203 (*mdeA*) であった。基質の排出活性を測定した結果、この MdeA は、多剤排出ポンプであることが示された。さらに、黄色ブドウ球菌において MdeA の機能の解析を行ったところ、黄色ブドウ球菌においても多剤排出ポンプとして機能していることがわかった。さらに、*mdeA* は黄色ブドウ球菌 N315 株において発現していることが示された。

②黄色ブドウ球菌の全多剤排出ポンプ遺伝子のクローニングと性質

黄色ブドウ球菌 N315 株のゲノムプロジェクトのデータベースを利用し、多剤排出ポンプに類似性を示すタンパク質をコードする遺伝子の検索を行い、合計 34 個を見出した。これらの 34 個が抗菌薬耐性に関与するか調べたところ、9 個は単剤耐性に関与し、10 個は多剤耐性に関与した。

多剤耐性に関与した 10 個のうち、SA0323 (*mepA*) と SA1972 (*sdrM*) の 2 個について、さらに解析を行った。その結果、これら 2 個は多剤排出ポンプであることが示された。

34 個の遺伝子と、多剤排出ポンプ遺伝子 *norA*、*mdeA*、*sepA* について黄色ブドウ球菌 N315 株において発現しているかを調べた。9 個の遺伝子と *norA*、*mdeA* は発現量が多いことが考えられ、19 個の遺伝子と *sepA* はある程度は発現していることが示された。残りの 6 個の遺伝子は発現量が少ないか、もしくは発現していないと考えられた。

論文審査結果の要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は院内感染の主たる原因菌である。MRSAは多くの抗菌薬に耐性を示すため、この菌による感染症の治療は大変難しい。細菌の多剤耐性に最も深く関与しているのは多剤排出ポンプである。MRSAの一つである *Staphylococcus aureus* N315 株のゲノムプロジェクトが完成し、DNAのシーケンス情報が公開されている。本論文の著者の解析によると、ゲノムシーケンスから考えて、*S. aureus* N315 には34個の多剤排出ポンプをコードすると考えられる遺伝子が存在するようである。著者は、この菌の多剤排出ポンプの全体像を明らかにすることを目指し、機能クローニングとPCRクローニングを併用し、それら全ての遺伝子クローニングと性質の解析を行った。その結果、それらの内10個の遺伝子産物は機能し、多剤耐性に関与することがわかった。また、それらの内2つについては実際に多剤排出ポンプとして機能することを、基質の排出活性の測定により確認した。*S. aureus* N315細胞内での発現を調べたところ、11個はかなり発現していること、19個はある程度発現していること、残りはほとんど発現していないことがわかった。これらのことから、かなり発現していて、かつ多剤耐性を示したものは、実際に*S. aureus* N315の多剤耐性に関与している可能性が高いと思われた。それらの中で、*S. aureus* N315の示す多剤耐性のパターンなどから考え、SdrM と名付けられた多剤排出ポンプが*S. aureus* N315の多剤耐性に最も大きく寄与している可能性が高いと思われた。

以上のように、この研究により、MRSAの多剤耐性に最も深く関与していると考えられる多剤排出ポンプの全体像がほぼ明らかになった。審査委員会は、この論文に述べられている内容が学術上極めて興味深い成果であり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。