

氏名	美間 健彦
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2915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	緑膿菌の未解析 RND 型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 山本 重雄 助教授 三好 伸一

#### 学位論文内容の要旨

緑膿菌の多剤耐性に最も深く関与しているのは、RND型多剤排出ポンプである。私は、緑膿菌のすべてのRND型多剤排出ポンプの性質を詳細に解析し、緑膿菌の多剤耐性におけるRND型多剤排出ポンプの役割の全体像を明らかにしたいと考えている。

本研究では、緑膿菌の未解析RND型多剤排出ポンプ遺伝子をすべてクローニングし、クローニングした遺伝子を抗菌薬高感受性の緑膿菌株に導入し、それらの遺伝子がコードする排出ポンプの性質を明らかにした。*mexMN*遺伝子を持つ株はchloramphenicol類に対する耐性度が上昇し、*mexPQ-opmE*遺伝子を持つ株はmacrolideやfluoroquinolone、tetracyclineなどに対する耐性度が上昇した。そして、*mexOSU-opmB*遺伝子を持つ株はaztreonam、novobiocin、tetracycline類などに対する耐性度が上昇し、*mexVW*遺伝子を持つ株はnorfloxacin、tetracycline、erythromycinなどに対する耐性度が上昇した。それらの結果から、緑膿菌の染色体DNA上にコードされているRND型多剤排出ポンプはすべて緑膿菌の多剤耐性に関与している、または関与しうることが明らかになった。

次に、緑膿菌のRND型多剤排出ポンプMexCD-OprJの野生株における誘導性について明らかにした。RT-PCR解析の結果、野生株においてMexCD-OprJはbenzalkonium chlorideなどによって発現が誘導された。しかし、MexCD-OprJの誘導物質を作用させることによる、野生株の抗菌薬感受性に変化は見られなかった。また、誘導物質によって誘導された*mexC*遺伝子の発現量は、MexCD-OprJ過剰発現株のものよりも少ないことが分かった。

本研究により得られた知見が、多剤排出阻害剤開発のための有益な情報となることを確信している。

## 論文審査結果の要旨

緑膿菌は院内感染や日和見感染の主たる原因菌の一つであり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）に次いで第3の耐性菌と言われている。この菌はもともと多くの抗菌薬が効きにくい（自然耐性を持っている）ため、この菌による感染症患者の治療は難しいものとなっている。この菌の抗菌薬自然耐性には多剤排出ポンプ（特にRND型と呼ばれる多剤排出ポンプ）が深く関与していることがわかっている。この菌のいくつかの多剤排出ポンプはすでに解析されているが、ゲノム情報から考えるとまだ解析されていないものがいくつか存在する。この論文において、著者は未解析のRND型多剤排出ポンプを全て解析することを目指した。そして、未解析であった4つのRND型多剤排出ポンプの遺伝子をPCR法でクローニングし、抗菌薬高感受性の緑膿菌宿主細胞で発現させ、多剤排出ポンプとしての性質を調べた。新たに、クローニングされたものは、MexMN, MexPQ, MexVW, および MexOSU と名付けられた。それぞれの多剤排出ポンプがどの抗菌薬を基質とするか（基質特異性）、緑膿菌の既知の排出ポンプとの類似点、相違点はどうか、などを解析し、これら多剤排出ポンプの構造（一次構造）の特徴、多剤排出ポンプとしての性質などを明らかにした。本研究により、緑膿菌のRND型多剤排出ポンプの全体像が明らかになったことになり、緑膿菌の多剤耐性の原因の主要な部分が明らかになった。

このようにこの論文は学術上大変興味深いものであり、またこの菌による耐性を克服するという面での応用につながるものが期待されるものである。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。