

氏名	港 雄介
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 3598 号
学位授与の日付	平成 20 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 1 項該当)
学位論文の題目	<i>Serratia marcescens</i> の多剤耐性系の遺伝学的及び生化学的解析
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 岡本 敬の介 準教授 表 弘志

学位論文内容の要旨

Serratia marcescens は院内感染の起因菌の一つである。この菌は各種抗菌薬や消毒薬に対して高い自然耐性を示すため、その感染症の治療はなかなか難しく、問題視されている菌の一つである。

本論文は、大腸菌を宿主に多剤耐性に関与する遺伝子として *S. marcescens* からクローニングしてきた 3 つの遺伝子の解析に関するものである。

まず、SMR 型多剤排出ポンプに分類される *SsmE* の遺伝子の解析を行った。この遺伝子は、大腸菌に導入すると norfloxacin、acriflavine、ethidium bromide 等の幅広い抗菌薬に対して耐性を与えることがわかった。

次に、MATE 型多剤排出ポンプに分類される *SneM* の遺伝子の解析を行った。この遺伝子は、大腸菌に導入すると norfloxacin、kanamycin、triclosan、Hoechst33342 等の幅広い抗菌物質に対して耐性を与えることがわかった。また *sneM* を導入した大腸菌 MKT4/p SNC56 においてエネルギー依存的な Hoechst33342 の排出が見られた。この排出ポンプは、多くの細菌の MATE 型多剤排出ポンプが共役カチオンとして利用する Na^+ を利用しなかった。

更に、LysR 型の転写調節因子に分類される *SdeT* の遺伝子の解析を行った。この遺伝子を導入した大腸菌 KAM32 株では、大腸菌の多剤排出ポンプである *AcrEF* が基質とする抗菌物質の MIC に上昇が見られ、ethidium のエネルギー依存的な排出が見られた。また、この MIC の上昇は *acrEF* を欠損した大腸菌に導入した際には見られなくなった。RT-PCR 法による解析の結果、この遺伝子を導入した大腸菌では *acrEF* の発現が上昇していたため、この遺伝子は多剤排出ポンプの転写調節因子として機能し、大腸菌を多剤耐性化する機能がある事が明らかになった。

最後に、私たちが今まで解析した遺伝子の中で、*S. marcescens* の多剤耐性に最も関与する可能性が高いと考えられた、RND 型多剤排出ポンプ *SdeXY* の遺伝子破壊株の作製を行った。その結果、*sdeXY* を破壊した株では、erythromycin、novobiocin、norfloxacin などを含む各種抗菌薬や、benzalkonium や chlorhexidine などの消毒薬の MIC が大きく低下した。この事から、*sdeXY* は、*S. marcescens* の多剤耐性を担う最も主要な遺伝子である事が明らかになった。

本論文によって得られた知見を更に発展させる事で、多剤耐性化が顕著である *S. marcescens* を含めたグラム陰性細菌感染症に対抗する手がかりを得られると確信している。

論文審査結果の要旨

多剤耐性菌による院内感染が医療現場で大きな問題となっている。*Serratia marcescens* は主要な院内感染原因菌の一つであり、もともと多くの抗菌薬に自然耐性を示す。そのため、*S. marcescens* による感染が起こると治療が難渋化する。また院内での集団感染も起こりやすい。この論文の著者は、*S. marcescens* の多剤耐性に最も深く関与していると考えられた多剤排出ポンプについて、遺伝子面および生化学面からの解析を行った。そして、SsmE と名付けた多剤排出ポンプについて、norfloxacin, acriflavineなどを基質とすること、実際にエネルギー依存的な基質の排出が起こる事、*S. marcescens* 細胞において実際に *ssmE* 遺伝子が発現しており、これが多剤耐性に関与していると思われることなどを明らかにした。また、これと類似した3つの多剤排出ポンプについても遺伝子クローニングと性質の解析を行っている。さらに SneM と名付けた多剤排出ポンプについても遺伝子クローニングと性質の解析を行っている。これも norfloxacin, kanamycin, triclosan などの抗菌薬を基質とする事、エネルギー依存的に基質を排出することなどを明らかにしている。また、多剤排出ポンプ遺伝子の発現制御に係る転写制御因子で SdeT と名付けたものについても遺伝子クローニングと性質の解析を行っている。このように、*S. marcescens* の多剤耐性系について広範な解析を行い、多くの新たな知見を得ている。この論文の内容には新規性があり、当該分野の発展への貢献が期待される。実験方法は妥当であり、実験結果には信頼性がある。実験結果の図表も適切に表現されており、実験結果の説明、議論も妥当である。関連の論文も適切に引用されている。以上のことから、審査委員会はこの論文が博士（薬学）の学位に値するものであると判断した。