

東邦大学審査学位論文(博士)の要旨

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2015年入学	研究分野 分子生物学	氏名 山田 景土
審査委員	<p>(主査) 理学研究科教授 藤崎 真吾</p> <p>(副査) 理学研究科教授 永田 喜三郎</p> <p>(副査) 理学研究科教授 岸本 利彦</p> <p>(副査) 東京医科歯科大学准教授 齋藤 良一</p>	
(論文題目) モラクセラ・カタラーリスのキノロン耐性に関わる分子機構の解明		
<p>(論文審査の要旨及び審査結果の要旨)</p> <p>抗菌薬が汎用されるのに伴い、薬剤耐性菌の出現が病院内にとどまらず一般の生活環境においても認められ、公的機関において抗菌薬使用量の削減目標が制定されるなど対策が取られつつある。<i>Moraxella catarrhalis</i> は、臨床材料からしばしば分離され呼吸器および耳鼻科領域の感染症の起炎菌として知られている。<i>Moraxella catarrhalis</i> は種々の抗菌薬に対して比較的感受性が高く現在のところ抗菌薬による治療に支障はないが、外来診療において広域抗菌薬として処方量が増加しているキノロン系抗菌薬に対して感受性が低下した株の出現が報告されている。</p> <p>本論文は、<i>Moraxella catarrhalis</i> の実験室株よりキノロン系抗菌薬に対する高度耐性株を人工的に取得し、薬剤耐性の判定法を検討するとともに薬剤耐性の分子機構を解析した結果をまとめたものである。</p> <p><i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC49143 株を親株とし、最小生育阻止濃度 (MIC) の 1/2 の濃度の levofloxacin を含む培地で 10 時間培養して得た菌の懸濁液を MIC の levofloxacin を含む培地に塗り広げ 48 時間培養後に生じるコロニーを選択した。得られたコロニーよりシングルコロニーの単離を 10 代繰り返して得た菌株に対する levofloxacin の MIC を微量液体希釈法で測定した。MIC が上昇した株を初代の耐性菌とし、これらのうちの一つを親株として同様の操作を行い、さらに levofloxacin の MIC が上昇した菌株を得た。合計 6 回の選択操作を繰り返し、親株における MIC が 0.032 µg/mL であるのに対し MIC が 16 µg/mL と 500 倍に上昇した菌株を得た。選択の各段階における MIC が上昇した株の出現率は 10^{-8} から 10^{-5} 程度であった。</p> <p>得られた変異株それぞれから染色体 DNA を調製し、キノロン系抗菌薬の標的として知られている DNA gyrase および DNA topoisomerase IV のサブユニットをコードする遺伝子 <i>gyrA</i>, <i>gyrB</i>, <i>parC</i>, <i>parE</i> の塩基配列を解析した。変異株に</p>		

において認められた変異は、GyrAにおける1種類のアミノ酸置換（D84Y）、2種類のアミノ酸重複（T594dup, A722dup）、GyrBにおける2種類のアミノ酸置換（E479K, D439N）、ParCにおける1種類のアミノ酸重複（T568dup）、ParEにおける1種類のアミノ酸置換（Q395R）であった。初回のサイクルでGyrBのアミノ酸置換が出現し、4回目のサイクルでGyrAのアミノ酸置換が出現し、5回目、6回目にその他の変異が出現した。これらの変異を1個ずつ親株に導入し、形質転換株におけるlevofloxacinのMICを測定したところ、GyrAのアミノ酸置換およびアミノ酸重複とGyrBのアミノ酸置換には単独でMICを上昇させる効果が認められ、ParEのアミノ酸置換にはGyrAの変異と組み合わせさせたときにMICを上昇させる効果が認められた。アミノ酸置換変異はいずれも他の細菌のキノロン耐性株においても報告されているQuinolone-resistant determining region (QRDR)と呼ばれる領域に検出されたが、アミノ酸重複変異はこれとは異なる領域に検出された。QRDRが薬剤の結合部位とされているのに対し、アミノ酸重複変異が認められたGyrAのカルボキシ末端領域はDNA結合部位とされており、この知見は新たな耐性化機構を示唆するものである。

得られた変異株の薬剤耐性にエフラックスポンプの亢進が関与している可能性を確かめるため2種類の阻害剤存在下でのMICの測定を行った。いずれの株においても阻害剤によるMICの顕著な変化は認められず、エフラックスポンプの寄与を示唆する知見は得られなかった。

最後に変異株の外膜タンパク質を電気泳動により分析し、親株と比較して発現が減少している電気泳動のバンドに対応するタンパク質を質量分析法により同定した。同定された3種類のタンパク質、すなわち、35 kDa付近に位置するM35、45 kDa付近に位置するM45、およびOmpEホモログに対応する遺伝子 *m35*, *m45*, *ompE* をクローニングした。これらの遺伝子をトランスポゾンの挿入により破壊し、破壊遺伝子による形質転換株を得てlevofloxacinのMICを測定したところ、*m35*の破壊により4倍、*m45*の破壊により2倍の上昇が認められたが *ompE*の破壊による変化は認められなかった。変異株におけるMICの上昇に外膜タンパク質M35、M45の減少による薬剤の菌体への透過の低下が寄与していることが示唆された。

以上のように本論文提出者は、*in vitro*において薬剤感受性が低下した菌の選択を繰り返すことによりlevofloxacinに高度に耐性を示す菌株を得て、耐性化の原因がDNA gyrase、DNA topoisomeraseの複数の変異、および、外膜タンパク質の発現低下であることを示した。加えて、*in vitro*における耐性化菌の出現率が他の菌と比較して特に低いわけではなく、現在医療において処方されている薬剤により今後耐性菌が出現する恐れがあることを示した。さらに、耐性菌をディスク法で判断するときの基準を示す知見を得た。これらの知見は理学的な価値のみならず、医療現場での検査の改善にも資するものであり、審査委員は一致して本論文提出者が博士の学位を受けるのに十分な学力と資格があると認めた。

東邦大学審査学位論文（博士）の要旨

氏名 山田 景士

論文題目

モラクセラ・カタラーリスのキノロン耐性に関わる分子機構の解明

論文要旨

モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) は偏性好気性グラム陰性の双球菌であり、小児上咽頭の常在細菌叢を形成しており、小児や基礎疾患を有する成人に対して、中耳炎や副鼻腔炎、気管支炎などの呼吸器感染症を引き起こす病原体として認識されている。一方で、呼吸器感染症など幅広い感染症に適応を有する抗菌薬としてキノロン系抗菌薬がある。本抗菌薬は細菌の核酸合成系に関する酵素 DNA gyrase および topoisomerase IV に作用し、その酵素活性を阻害することで細菌の核酸合成を阻害し、抗菌活性を示している。また、キノロン耐性機構としては、DNA gyrase の構成単位である GyrA および GyrB、topoisomerase IV の構成単位である ParC および ParE のアミノ酸置換によるキノロン親和性の低下およびエフラックスポンプの過剰発現や外膜タンパク質の発現減弱による菌体内キノロン濃度減少などが他菌種において示されている。これまでの我々の研究では臨床分離株においてキノロン低感受性 (levofloxacin 最少発育阻止濃度: MIC = 1.0 mg/L) を示す株に関して精査した。それらの株ではキノロン作用標的である GyrA タンパク質に 1 アミノ酸の置換を認めており、その変異がキノロン低感受性の要因となることを示した。しかしながら、これまでの研究で *M. catarrhalis* におけるキノロン耐性 (levofloxacin MIC \geq 4 mg/L) 機構を解明した研究は存在しないことから、本研究では *in vitro* でキノロン耐性株を作製・選択し、キノロン耐性に関わる分子機構の解明を試みた。耐性株の選定は levofloxacin を用いた stepwise selection で行い、野生型 (P1) を基に 14 株の variant を作成した (VA1-VF9)。それらの分離株に対して、キノロン作用標的である *gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* 遺伝子のタンパク質翻訳領域の塩基配列を決定し、予測アミノ酸配列上で変異があるか確認した。その結果、GyrA において 3 ヶ所の変異 (D84Y, T594dup および A722dup) を認め、GyrB では 2 ヶ所 (D439N および E479K)、ParC では 1 ヶ所 (T568dup)、ParE で 1 ヶ所 (Q395R) の変異をそれぞれ認めた。また、MIC が上昇した株ほどこれらの変異を多く獲得していた。これらの変異遺伝子断片を用いた形質転換実験では、ParC における T568dup を除く 6 つの変異導入でキノロン MIC の上昇した形質転換体が確認された。また、得られた variant 株のエフラックスポンプの評価として、エフラックスポンプ阻害薬を使用し MIC 測定を行ったが、エフラックスポンプ阻害薬添加群において有意なキノロン MIC の低下は観察されず、今回の検討ではエフラックスポンプの関与は否定的と考えられた。外膜タンパク質の評価として、variant 株の 35-50 kDa 付近の外膜タンパク質 3 種類 (M35, M45, OmpE) を同定し、それぞれをノックアウトし (Δ M35, Δ M45, Δ OmpE) ノックアウト株のキノロン MIC を測定した。耐性株ほど M35 および M45 のタンパク量は減少傾向であり、 Δ M35 および Δ M45 においてキノロン MIC の軽度上昇が確認されたが Δ OmpE ではキノロン MIC の上昇は確認されなかった。以上のことから、*M. catarrhalis* のキノロン通過は複数の外膜タンパク質によって担われている可能性が示唆され、外膜タンパク質の発現減弱がキノロン耐性に関与する可能性も示唆された。