

学 位 論 文 題 名

Enterococcus の薬剤耐性に関する因子の同定及び
その性質に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

細菌性感染症の治療にはこれまで多種多様な抗生物質が使われてきた。しかしながら、細菌は様々な機構によりこのような薬物に対し耐性を獲得してきた。現在までに知られている耐性機構は次の3つに大別される。それらは薬物の分解及び修飾、薬物標的部位の変異、膜透過性の低下及び能動的排出による薬物の細胞内蓄積量の減少である。

腸内連鎖球菌 *Enterococcus* 属は自然耐性を獲得しており、もともと多くの薬物に耐性を示す。近年、バンコマイシン耐性を示す腸球菌 (VRE) が発見され、事態は深刻化している。筆者らの研究室では *Enterococcus hirae* から 20 μ M ethidium bromide に対する耐性株を単離し、一次性能動排出システムの存在を見出した。また、同属の *Enterococcus faecalis* に ethidium の一次性及び二次性能動排出システムが存在することも見いだした。ethidium は多くの多剤排出輸送担体の基質であることから、*Enterococcus* 属には多剤排出系が存在することが予想される。

【結果及び考察】

1 ショットガンクローニング法による *E. hirae* の ethidium 耐性因子の同定

Enterococcus hirae に存在する薬剤耐性因子を同定すべく、大腸菌を宿主細胞とし、ethidium 耐性株のゲノムライブラリーを用いて 400 μ M ethidium 存在下でショットガンクローニング法を行った。その結果、2つのクローン pSG18 と pSG35 を単離した。両者は同一領域を含み、その部分は 16S rRNA gene の領域であった。ethidium 以外の薬物に対する耐性をサバイバル実験で検討した結果、pSG18 及び pSG35 の導入された大腸菌は ethidium の他、acriflavine にも耐性を示した。単離されたプラスミド中の耐性に必須な領域を調べるため、欠失変異体を作成し、サバイバル実験を行った。16S rRNA gene の上流部分に存在する安定化に関わる配列を欠失させたプラスミド pSGD は ethidium 及び acriflavine に対する耐性能を失っていた。また、16S rRNA gene の 3' 端の欠失体は acriflavine に対する耐性能は保持していたが、ethidium に対しては大きく低下していた。16S rRNA の転写後の安定化に関わる boxA 配列を欠失させると両者に対して耐性能を失うことを考慮すると、クローン中に存在する薬剤耐性因子は 16S rRNA であると推察される。薬剤耐性能が他の細菌の 16S rRNA にも備わっているかを検討するため、枯草菌及び緑膿菌の 16S rRNA gene を用いてサバイバル実験を行った結果、どの細菌の 16S rRNA も

ethidium、acriflavine 耐性を示す傾向にあり、この性質が 16S rRNA に一般的なものであることが分かった。同様に 23S rRNA について検討した結果、23S rRNA gene の導入は ethidium には耐性を与えるが、acriflavine には耐性を示さなかった。欠失変異体の結果とあわせて考慮すると、RNA 分子による耐性機構は ethidium と acriflavine で完全に同一ではないことが分かった。これまで ethidium や acriflavine のような脂溶性カチオンに対する耐性機構は能動的排出による細胞内蓄積量の低下に限られた。ethidium の細胞内蓄積量を比較した結果、16S rRNA gene の導入による蓄積量の低下は見られなかった。このことは、RNA 分子による耐性化が従来の機構とは異なっており、新たな耐性機構の存在を示唆している。

2 E. faecalis ゲノムデータベースを用いた ATP 駆動型薬剤排出担体の同定

E. hirae と同属に含まれる *E. faecalis* の全ゲノム解析が TIGR (The Institute for Genomic Research) で終了している。このデータベースをもとに ATP 駆動型多剤排出ポンプ LmrA に相同な遺伝子を検索した。機能の不明な上位 13 個の遺伝子をクローン化し大腸菌に導入後、10 種の薬物について minimum inhibitory concentration (MIC) を測定した結果、13 個中 1 つの遺伝子、*eltA* を導入した大腸菌だけが acriflavine に対して 2 倍の耐性を示した。acriflavine の細胞内蓄積量を検討した結果、ベクターのみを導入した大腸菌の約 70 % まで低下していた。濃度を変え蓄積量を比較すると、低濃度側では 70 % の蓄積量を維持していたが、高濃度になるにつれてその差は消失した。このことは排出系の飽和を意味し、この遺伝子産物が acriflavine を排出し耐性を与えていると考えられる。*EltA* の walker A 配列中のリジン残基をメチオニンに置換し、ATP を加水分解できない変異体を作成し解析したところ、この変異体はベクターのみと変わらない acriflavine 蓄積量を示した。このことは、この蛋白質が配列から予想されるとおり ATP の加水分解エネルギーを利用して acriflavine を排出していることを示す。

3 E. faecalis ゲノムデータベースを用いたプロトン駆動型薬剤排出担体の同定

ATP 駆動型薬剤排出担体の同定と同様に *E. faecalis* ゲノムデータベースを利用し、プロトン駆動型多剤排出ポンプ NorA と相同な配列を検索した結果、60 % 以上の相同性を示すものは 1 つしか存在しなかった。この遺伝子 *enlA* をクローン化後、大腸菌に導入し MIC を測定した結果、norfloxacin に 4 倍、acriflavine に 2 倍、tetraphenylphosphonium (TPP⁺) に 8 倍の耐性を示し、*EnlA* が多剤排出ポンプであると推察された。TPP⁺ の細胞内蓄積量を TPP⁺ 電極を用いて測定したところ、クローン導入株の蓄積量はベクターのみの約 15 % まで低下していた。同様に norfloxacin の細胞内蓄積量を測定した結果、ベクターのみの約 30 % まで低下していた。また、この低下はプロトノフォアの添加により大きく上昇することから、*EnlA* はこれら薬物の二次性能動排出担体であると考えられる。実際、TPP⁺ 輸送時のプロトンの動きを quinacrine を用いて観察した結果、薬物とプロトンの輸送が共役することがわかり、この蛋白質がプロトンと薬物のアンチポーターであることが明らかとなった。この遺伝子を *E. faecalis* へ導入すると、norfloxacin に 8 倍、acriflavine に 4 倍の耐性を示し、この蛋白質が *E. faecalis* 中で機能する事が示された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	加 茂 直 樹
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	松 本 健 一
副 査	助教授	宮 内 正 二

学 位 論 文 題 名

Enterococcus の薬剤耐性に関する因子の同定及び その性質に関する研究

腸内連鎖球菌である *Enterococcus* 属の細菌は、日和見感染により、敗血症や心内膜炎を引き起こすことが知られているヒト常在菌である。他の腸球菌に比べ自然耐性を獲得しており、もともと多くの薬物に比較的弱い耐性を示す。また、理由は省略するが、ペニシリン系抗生物質やアミノ配糖体抗生物質に対して自然耐性を持っている。また、最近では、アンピシリン、アミノ配糖体及びバンコマイシンに耐性を示す腸球菌が集中治療室から分離され、このような多剤耐性化した細菌による感染症は治療が困難で、臨床上極めて深刻な問題を投げかけている。

このような背景で、申請者は *Enterococcus* 属の薬剤耐性に関わる因子を同定する目的で本研究を行った。学位論文は2つの部分に分けることが出来、第一部では *Enterococcus hirae* のゲノムライブラリーからショットガンクローニングによって単離された因子の解析結果を、第二部では *Enterococcus faecalis* のゲノムデータベースを利用して薬剤排出に関わるトランスポーターの同定結果を報告している。

Enterococcus hirae に、薬剤耐性に関わるトランスポータ（多剤排出輸送体）があるのかどうかを調べるため、エチジウムブロマイドの存在下で生育できる耐性株を分離している。この事実は、*E. hirae* に多剤排出輸送体が存在することを意味している。そこで、申請者は大腸菌を宿主細胞とし、エチジウムブロマイド存在

下でショットガンクローニング法をおこない、薬剤耐性因子を同定しようとした。その結果、2つのクローンをえた。両者は同一の領域を含み、その部分は16S rRNA gene の領域であった。16S rRNA gene 領域を導入した大腸菌は、エチジウムブロマイドの他アクリフラビンにも耐性を示した。興味あることに、枯草菌や緑膿菌の16S rRNA gene を大腸菌に導入しても耐性を示した。23S rRNA gene の導入では、エチジウムブロマイドに対して耐性を示すが、アクリフラビンには耐性を示さなかった。種々の理由から gene は翻訳されてタンパクになっているのではなく、RNA として細胞に存在していると考えられる。実際、導入菌では菌体表面に核酸がより多くあることを示している。すなわち、これらの核酸と相互作用する薬物は、菌体表面に存在する RNA に吸着し、細胞内に薬物を入れない事により耐性を発現していると考えられる。初期の目的とは異なったが、新しい耐性機構を発見したことになる。

ついで、全ゲノム解析が終わっている *E. hirae* と同族の *E. faecalis* のデータを用いて、輸送体の検索を行っている。他の細菌で分かっている ATP 駆動型多剤排出ポンプ LmrA に相同な遺伝子を検索した。機能不明な上位13個の遺伝子をクローン化して大腸菌に導入して、その機能を調べた。そのうちの1つについて、ATP 駆動型排出ポンプ活性を認めている。

プロトン駆動型多剤排出ポンプ NorA と相同な配列を同様に検索し、申請者が *enlA* と命名した遺伝子の産物が多剤排出ポンプであることを MIC (minimum inhibitory concentration) 実験より明らかにしている。また、輸送に伴う pH 変化等の測定から、プロトン駆動型であることを確認している。

このように、本論文は、1) RNA の菌体表面存在による新規耐性機構の発見、2) *E. faecalis* の ATP 駆動型排出ポンプの同定、3) *E. faecalis* のプロトン駆動型多剤排出ポンプの同定 を明らかにしたものであり、薬学博士の称号を授与するに十分値するものと認めた。