

学 位 論 文 題 名

Studies on the mutations causing fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

(結核菌フルオロキノロン耐性獲得機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

結核は全世界で毎年約 1000 万人の新規登録患者と、140 万人の死亡者を出している慢性感染症である。近年、第一次選択薬のうちの 2 剤以上に耐性を示す多剤耐性結核菌が出現し、結核対策の大きな障害となっている。フルオロキノロンは多剤耐性結核に対する有効な治療薬として注目を集めているが、近年になって、この薬剤に耐性を示す結核菌が報告されるようになり、耐性獲得機構の解明が急務となっている。本研究では、フルオロキノロン耐性迅速鑑別法開発および新規キノロン誘導体デザインのための基礎データ取得のために、結核菌におけるフルオロキノロンの唯一の標的である DNA ジャイレース (それぞれ 2 個の A、B サブユニットからなる 4 量体) に焦点を当て、それぞれのサブユニットにおけるアミノ酸置換のフルオロキノロン耐性獲得への影響を明らかにした。その成果は以下の 2 点に要約される。

1. B サブユニット上のアミノ酸置換とフルオロキノロン耐性

バングラデシュのフルオロキノロン耐性臨床分離結核菌よりサブユニット上の 540 番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からバリンに置換する変異を新たに見出した。大腸菌蛋白発現系を用いて同アミノ酸置換を有する組換え DNA ジャイレース発現させ、精製蛋白質を用いてフルオロキノロン耐性について検討した。その結果、上記アミノ酸置換がフルオロキノロン耐性獲得に重要な役割を果たしている事を直接に証明した。また、540 番目のアミノ酸残基グルタミン酸がフルオロキノロンの 7 位の置換基と強い相互作用をしており、バリンへのアミノ酸置換によりこの相互作用が損なわれるためこの現象が生じる事を見いだした。

2. A サブユニット上の菌系統特異的アミノ酸残基のフルオロキノロン耐性獲得への影響

結核菌は東アジアを中心として蔓延している北京型と呼ばれている系統 (北京系統) とそれ以外の系統の 2 つに分類される。これまでに北京系統菌においてのみフルオロキノロン耐性菌から見出される A サブユニット上の 74 番目のアラニンからセリンへのアミノ酸置換が報告されていたが、フルオロキノロン耐性との関連に関する直接的な証明は為されていなかった。本研究では A サブユニット上に存在する系統特異的アミノ酸 (95 番目; 北京系統ではスレオニン、他系統ではセリン) に着目した。組換え DNA ジャイレースを用いて検討した結果、95 番目のアミノ酸残基がセリンであった場合には 74 番目のアミノ酸残基がアラニン、セリン何れであってもフルオロキノロン耐性とならない事を見出し、74 番目のセリン残基のフルオロキノロン耐性への寄与が菌系統特異的アミノ酸残基と相まっている現象である事を明らかとした。

以上の成果 1 は原著論文として国際的な学術雑誌 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* に発表し、高い評価を受けている。また、成果 2 も原著論文として国際的な学術雑誌 *Japanese Journal of Infectious Diseases* より掲載決定の通知を受けている。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	定彦
副査	教授	杉本	千尋
副査	教授	東	秀明
副査	准教授	伊藤	公人

学位論文題名

Studies on the mutations causing fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

(結核菌フルオロキノロン耐性獲得機構に関する研究)

結核は全世界で毎年約 1000 万人の新規登録患者と、140 万人の死亡者を出している慢性感染症である。近年、第一次選択薬のうちの 2 剤以上に耐性を示す多剤耐性結核菌が出現し、結核対策の大きな障害となっている。フルオロキノロンは多剤耐性結核に対する有効な治療薬として注目を集めているが、近年になって、この薬剤に耐性を示す結核菌が報告されるようになり、耐性獲得機構の解明が急務となっている。本論文では、フルオロキノロン耐性迅速鑑別法開発および新規キノロン誘導体デザインのための基礎的知見を得るために、結核菌におけるフルオロキノロンの唯一の標的である DNA ジャイレース（それぞれ 2 個の A、B サブユニットからなる 4 量体）に焦点を当て、それぞれのサブユニットにおけるアミノ酸置換のフルオロキノロン耐性獲得への影響を明らかにした。その成果は以下の 2 点に要約される。

第一に、金玄氏は DNA ジャイレース B サブユニット上のアミノ酸置換とフルオロキノロン耐性の関係を明らかにした。同氏は、バングラデシュのフルオロキノロン耐性臨床分離結核菌より新たに見出した同分子上の 540 番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からバリンに置換する変異に焦点を当て、そのキノロン耐性への関与を明らかにするために、野生型および変異型 B サブユニットをもつ 2 種類の精製組換え DNA ジャイレースのフルオロキノロン感受性を評価し、上記アミノ酸置換がフルオロキノロン耐性獲得に重要な役割を果たしている事を証明した。また、540 番目のアミノ酸残基グルタミン酸がフルオロキノロンの 7 位の置換基と

相互作用をしていることが推測され、バリンへのアミノ酸置換によりこの相互作用が損なわれるため DNA ジャイレースが耐性を獲得する事が示唆された。

第二に、金玄氏は DNA ジャイレース A サブユニット上のアミノ酸置換とフルオロキノロン耐性の関係を明らかにした。同氏は、DNA ジャイレース A サブユニット上の 74 番目のアラニンからセリンへのアミノ酸置換を持ったフルオロキノロン耐性結核菌がこれまでに中国においてのみ見出されている事と中国から分離される結核菌の多くが DNA ジャイレース A サブユニットの 95 番目のアミノ酸としてスレオニンを有するが欧米諸国から分離される結核菌の多くではセリンである事に着目した。金玄氏は、74 番目のアミノ酸残基がアラニンで 95 番目がセリンの A サブユニットと 74 番目がセリンで 95 番目がセリンのそれを持つ 2 つの精製組換え DNA ジャイレースのフルオロキノロン感受性を評価し、95 番目のアミノ酸残基がセリンであった場合には 74 番目のアミノ酸残基がアラニン、セリン何れであってもフルオロキノロン耐性とならない事を見出し、74 番目のセリン残基のフルオロキノロン耐性への寄与は 95 番目のアミノ酸残基と相まっている事を明らかとした。

以上の様に金玄氏の本論文は、組換え DNA ジャイレースを作出してこれを用いる事により結核菌のキノロン耐性獲得機構を分子レベルで明らかにしたものであり、フルオロキノロン耐性迅速鑑別法開発および新規キノロン誘導体デザインのための基礎データを取得できたという点で重要な研究である。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者金玄氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。