

学 位 論 文 題 名

Correlation between drug resistance and amino acid substitutions in DNA gyrase of *Mycobacterium leprae*

（らい菌のDNA gyraseにおけるアミノ酸置換と薬剤耐性の関係）

学位論文内容の要旨

ハンセン病は *Mycobacterium leprae* によって引き起こされる慢性感染症であり、ヒト、サル、アルマジロ間を伝播しうる人獣共通感染症である。ハンセン病の治療にはダブソン、リファンピン、クロファジミンからなる多剤併用療法が用いられ、フルオロキノロンは病変が単一のときに使用される。しかしながら、近年では多剤併用療法の主要薬であるダブソン並びにリファンピンの2剤に耐性を持つ多剤耐性菌が出現し問題となっている。多剤耐性ハンセン病の治療に対してはフルオロキノロンが用いられることからフルオロキノロンの重要度は高まっている。一方で、フルオロキノロン耐性 *M. leprae* が現れ始めていることも事実である。フルオロキノロン耐性 *M. leprae* においてはフルオロキノロンの標的蛋白質であるDNA ジャイレースのキノロン耐性決定領域と呼ばれる部位にアミノ酸置換が確認されている。DNAジャイレースはタイプIIトポイソメラーゼに分類され、菌内においてDNAの負のスーパーコイルフォーム形成の役割を担っている。本研究では *M. leprae* におけるフルオロキノロンの唯一の標的である、DNA ジャイレースに着目してA並びにB サブユニットにおけるアミノ酸置換とフルオロキノロン耐性の影響を明らかにしたものである。加えて、*M. leprae* にフルオロキノロン耐性を付与する新たなアミノ酸置換を予測したものであり、得られたデータはハンセン病迅速試験法構築の為の重要な基礎データとして貢献しうるものである。

1. A サブユニット上のアミノ酸置換の耐性獲得への関与

フルオロキノロン耐性 *M. leprae* におけるDNA ジャイレース A サブユニットのアミノ酸置換は89番目と91番目の位置にのみ報告されている。一方で、*M. leprae* と同じく抗酸菌に分類される *Mycobacterium tuberculosis* のフルオロキノロン耐性株に見られるアミノ酸置換はキノロン耐性決定領域内に広く分布しており、94番目 (*M. leprae* では95番目)の位置に最も高頻度に見られるが、フルオロキノロン耐性 *M. leprae* においてこの位置のアミノ酸置換に関する報告はない。本研究では、当該位置にアミノ酸置換を導入した後、フルオロキノロン耐性への影響を評価検討した。実験は大腸菌を用いたリコンビナントの系より発現精製した組換え蛋白質を用いて、フルオロキノロン存在下でのスーパーコイルフォーム形成阻害試験とDNA切断試験を実施した。その結果、95番目のアミノ酸がアスパラギン酸からグリシンまたはアスパラギンへ置換された場合DNAジャイレースが、高度なフルオロキノロン耐性を獲得することを見出した。この結果より95番目にアミノ酸置換を持つフルオロキノロン耐性 *M. leprae* が将来的に出現する可能性が示唆された。

2. B サブユニット上のアミノ酸置換の耐性獲得への関与

M. leprae のDNA ジャイレース B サブユニットにおけるフルオロキノロン耐性に関わるアミノ酸置換の報告はない。しかしながら、他の細菌のDNAジャイレースのX線結晶構造解析により、DNA ジャイレース B サブユニットのキノロン耐性決定領域がフルオロキノロンとの重要な相互作用部位であることが明らかとなっている。また、フルオロキノロン耐性 *M. tuberculosis* のB サブユニット上に耐性に関わるアミノ酸置換が複数確認されている。本研究では、*M. leprae* におけるBサブユニット上のアミノ酸置換のフルオロキノロン耐性への関与を明らかとする為に結核菌で報告のあるアミノ酸置換(461, 499 並びに501 番目)に対応する、464, 502, 504 番目の位置にアミノ酸置換を有する

組換え *M. leprae* DNA ジャイレースを作出し、それらのフルオロキノロンに対する感受性を変異体DNA ジャイレースA サブユニット評価時と同様の試験にて評価した。その結果これらのアミノ酸置換が生じた場合に*M. leprae* がフルオロキノロン耐性を獲得することを明らかとした。また、502番目の位置にアミノ酸置換が生じた場合、*M. leprae* は高度なフルオロキノロン耐性を獲得することも明らかとした。

以上の研究から *M. leprae* は DNA ジャイレース A 並びにB サブユニット上に特定のアミノ酸置換が生じた場合フルオロキノロン耐性を獲得することが明らかとなり、将来的にこれらのアミノ酸置換を伴うフルオロキノロン耐性菌出現の可能性が示唆された。本研究によって得られた基礎的知見は遺伝子変異検出によるハンセン病迅速感受性試験法構築の基礎データとして活用されることに加えフルオロキノロン耐性 *M. leprae* 出現時のより効果的な薬剤選択に貢献しうることが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	定彦
副査	教授	高田	礼人
副査	教授	東	秀明
副査	准教授	迫田	義博

学位論文題名

Correlation between drug resistance and amino acid substitutions in DNA gyrase of *Mycobacterium leprae*

(らい菌のDNA gyraseにおけるアミノ酸置換と薬剤耐性の関係)

らい菌によって引き起こされるハンセン病は、全世界で毎年約 25 万人の新規登録患者を記録している慢性皮膚感染症である。ハンセン病の治療はこれまで、第一次選択薬であるダブソン、リファンピン、クロファジミンの 3 剤併用療法により実施されてきたが、これら 3 剤のうちの 2 剤以上に耐性を示す多剤耐性らい菌が出現し、ハンセン病対策の大きな障害となっている。フルオロキノロン的一种であるオフロキサシンは、多剤耐性ハンセン病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らい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、オフロキサシン耐性ハンセン病迅速鑑別法開発および同治療用フルオロキノロン剤選択のための基礎的知見を得るために、らい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、横山和正氏は、らい菌の近縁菌種である結核菌のフルオロキノロン耐性臨床分離株では高頻度に見られるが、らい菌ではこれまでに報告のない、DNA ジャイレース A サブユニット上の 95 番目のアミノ酸置換に着目して研究を進めた。同氏は、大腸菌を宿主として発現させた当該位置にアミノ酸置換を導入した組換え DNA ジャイレースを対象として、各種フルオロキノロンに対する感受性を *in vitro* で評価・検討した。その結果同氏は、らい菌においても結核菌と同様に 95 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からグリシンまたはアスパラギンへ置換した場合には高度なフルオロキノロン耐性を

獲得することを見出した。更に同氏は、シタフロキサシンは上記何れのアミノ酸置換を有する DNA ジャイレースに対しても低濃度でその活性を抑制する事を見出し、DNA ジャイレース A サブユニット上に上記アミノ酸置換を有し、オフロキサシン耐性となっているらい菌により引き起こされているハンセン病の治療に同薬剤が使用可能であることを明らかにした。

第二に、横山和正氏は、結核菌の DNA ジャイレースの X 線結晶構造解析により明らかになっている DNA ジャイレース B サブユニット上のフルオロキノロンとの相互作用部位に着目して研究を進めた。フルオロキノロンとの相互作用部位に存在するフルオロキノロン耐性臨床分離結核菌には見られるが、らい菌では見られないアミノ酸置換を B サブユニットに導入したらい菌 DNA ジャイレースを作出し、フルオロキノロン耐性への関与について検討した。その結果、464、500、502 番目の位置にそれぞれアスパラギン酸からアスパラギン、アスパラギンからアスパラギン酸、グルタミン酸からバリンへのアミノ酸置換を有する組換え DNA ジャイレースがオフロキサシン耐性となることを明らかにした。更に同氏は、他のフルオロキノロンの DNA ジャイレース阻害活性を評価する事により、シタフロキサシンが上記何れのアミノ酸置換を有する DNA ジャイレースに対しても低濃度で抑制活性を有する事を見出し、DNA ジャイレース B サブユニット上に上記アミノ酸置換を有することによりオフロキサシン耐性となっているらい菌により引き起こされているハンセン病の治療に同薬剤が使用可能であることを明らかにした。

以上の様に横山和正氏の本論文は、組換え DNA ジャイレースを作出し、これを用いる事により、らい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、オフロキサシン耐性ハンセン病迅速鑑別法開発および同治療用キノロン剤選択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横山和正氏の博士論文が、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。