

論文内容の要旨

申請者氏名 安藤（北尾） 公英

本研究では、多剤耐性緑膿菌臨床分離株の中でアミノグリコシド系抗生剤に対する耐性機序が不明な株から、新規のアミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaf を同定し、その機能解析を行った。また、外來性薬剤耐性因子を標的とする分子ベースの耐性菌検出法の開発にも取り組んだ。

まず、薬剤耐性因子のスクリーニングの過程で、インテグロンと呼ばれる外來性遺伝子獲得エレメントの内部に TTG を開始コドンとする 552 塩基長の ORF を同定した。配列解析から、183 アミノ酸から成るアミノグリコシド 6'-N-アセチル基転移酵素(AAC(6'))の新規アイソフォームをコードすると予測されたことから、この ORF を *aac(6')-Iaf* と命名した。次に、制限酵素 I-CeuI を用いたゲノムタイピングと抗 AAC(6')-Iaf 抗体を用いたウェスタン解析から、*aac(6')-Iaf* は抗生剤の有無に関わらず緑膿菌染色体上に組み込まれていること、また、AAC(6')-Iaf を構成的に発現していることが分かった。*aac(6')-Iaf* を導入した大腸菌は、広範囲のアミノグリコシド剤耐性を示し、耐性パターンは親株と関係があった。さらに、組換え AAC(6')-Iaf 蛋白質を用いた *in vitro* の生化学的解析から、AAC(6')-Iaf は 2 量体を形成しアミノグリコシド剤 6' 位のアミノ基を特異的にアセチル化することが分かった。以上の結果から、AAC(6')-Iaf は多剤耐性緑膿菌においてアミノグリコシドアセチル基転移酵素として機能し、アミノグリコシド剤耐性に寄与していることが明らかになった。

AAC(6')は、これまでに 27 種類のアインザイムが報告されている。AAC(6')-Iaf が属するサブファミリーにおいては、AAC(6')-Ii の結晶構造が明らかとなっており、アセチル CoA との結合に関して詳細に解析が行われてきた。しかし、アミノグリコシド剤と AAC(6')-Ii の相互作用メカニズムについてはほとんど分かっていない。そこで、AAC(6')-Ii の構造と AAC(6')-Iaf 予測構造のアライメントから、アミノグリコシド結合に関与すると予想された AAC(6')-Iaf の基質ポケットのアミノ酸残基を Ala に置換した変異体を作成し、生化学的解析を行った。その結果、AAC(6')-Iaf における Glu78 と Pro81 は、アミノグリコシドをアセチル化修飾する際に修飾部位の位置選択性に寄与していることが明らかとなった。

耐性菌検出システムの開発では、薬剤耐性因子のスクリーニングで最も高頻度に検出された AAC(6')-Iae に対するモノクローナル抗体を調製し、イムノクロマト法を構築した。その結果、緑膿菌のコロニーあるいは培養液から 15 分以内に AAC(6')-Iae 産生の有無を検出することに成功した。検出限界は、1 試験あたり 1.0×10^5 cfu で、陽性株は全て高度なアミノグリコシド剤耐性を示した。また、臨床分離株を用いた感度試験では擬陽性および擬陰性を示さないことから、本検出法は PCR 法に代わる有効な外來性薬剤耐性因子の検出手段であることが示唆された。近年、緑膿菌だけでなく他の日和見感染菌も多様な外來性薬剤耐性因子を産生し耐性化している。イムノクロマト法は、目的標的蛋白質に対する抗体を複数適用できることから、今後、多剤耐性菌の検出に広く応用できる可能性が高い。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 安藤（北尾） 公英

本論文は、日本における臨床分離株である多剤耐性緑膿菌の中で、アミノグリコシド系抗生剤に対する耐性機序が不明な株から、新たにアミノグリコシド耐性因子 AAC(6')のアイソザイムを同定し、その機能解析を行ない、明解な結論を得ている。さらに外來生薬剤耐性因子を標的とする簡便かつ迅速な耐性菌検出法の開発を行った。

- 1) 外來生遺伝子獲得エレメントに注目し、耐性機序の不明な分離株より、同エレメントの分離を行ったところ、TTG を開始コドンとする 183 アミノ酸からなる新規のアミノグリコシド耐性因子 AAC(6')のアイソザイムを同定した。
- 2) 同エレメントより、プロモーターを含む形でクローン化し、抗体を作製。Pulse Field Gel Electrophoresis 及び制限酵素 *I-CeuI* によるゲノムタイピング及び抗体による Western 解析を行い、薬剤耐性遺伝子がゲノムにコードされている事を確認。
- 3) クローン化された同遺伝子を大腸菌に導入することで、薬剤耐性因子をコードしていることを確認。
- 4) 塩基配列決定を行い、タンパク質 3D 構造がすでに解かれている類似タンパクを用いたホモロジーホモロジーモデリングを行い、薬剤耐性分子機構の仮説をたて、アミノ酸置換変異を導入することで、同酵素の活性に重要なアミノ酸を同定。
- 5) 精製酵素タンパク質を用い、その生化学的な性質の解析を行い、2 量体で、アセチル CoA を基質として、広範囲のアミノグリコシド剤 6'部位のアミノ基を特異的にアセチル化することを解明した。
- 6) 本酵素ではないが、臨床上最も高頻度に検出される類似の酵素に対するモノクローナル抗体を作製し、免疫クロマト法による簡便かつ迅速な検出法の開発とキット化を行った。

以上、本論文は日本における深刻な院内感染を引起す多剤耐性緑膿菌の持つ、新規アミノグリコシドアセチル基転移酵素の同定及びその生化学的解析を行い、分子レベルでその機構を明らかにしたもので、学術上及び臨床上大きな貢献と考えられる。よって審査員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値のあるものと認めた。