

氏名(本籍)	よね 米	ざわ 沢	みのる 実	(富山県)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博乙第1,340号			
学位授与年月日	平成9年12月31日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
審査研究科	医学研究科			
学位論文題目	細菌におけるキノロン耐性とDNAジャイレース変異に関する研究			
主査	筑波大学教授	医学博士	林英生	
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直	
副査	筑波大学教授	理学博士	坂内四郎	
副査	筑波大学教授	医学博士	小山哲夫	
副査	筑波大学助教授	医学博士	山根一秀	

## 論文の内容の要旨

### (研究の背景と目的)

キノロン系抗菌剤は化学的に合成されたものであり、1962年にナリジクス酸が臨床応用されてから、主としてグラム陰性菌感染症の治療に使用されていた。それ以来キノロン系の抗菌力を増強すべく化学合成に改良が重ねられ、1984年、キノロンの基本骨格の6位にフッ素(F)を導入したノルフロキサシン(フルオロキノロンあるいはニューキノロン)は、従来のものより抗菌活性が1,000倍以上上昇し、加えてグラム陽性菌にも強い抗菌作用を発揮することが解り、広範囲の抗菌スペクトルを持つため広く臨床使用されるようになった。キノロン系の抗菌作用はDNAジャイレース(トポイソメラーゼⅡ、2分子のGyrAと2分子のGyrBからなる4量体)の活性阻害であるが、臨床使用量の増加とともに臨床分離菌株にキノロン耐性をもつものが多く分離され、深刻な問題を提起してきた。キノロンの耐性機構は主として、*E. coli*、*S. aureus*などの耐性株で解析が進み、*gyrA*遺伝子の変異がその本体であると報告されてきていたが、日和見感染菌として臨床上問題となる*Pseudomonas aeruginosa*ではその耐性出現は大きな問題でありながらも、耐性機構についての解析は進んでいなかった。

そこで本研究では*P. aeruginosa*のキノロン系薬剤の耐性機構を明らかにすべく1989年と1993年に日本国内で臨床的に分離された*P. aeruginosa*のDNAジャイレースの変異について解析した。

### (材料および方法)

試供菌株は1989年および1993年に関東地方の病院で分離された患者由来の*P. aeruginosa*である。

耐性解析のために試供した薬剤は富山化学工業(株)総合研究所において合成されたノルフロキサシン(NFLX)、オフフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、トスフロキサシン(TFLX)である。

薬剤感受性の測定は日本化学療法学会標準法に基づき寒天平板希釈法で行い、菌の発育が認められない最小の薬剤濃度を最小発育阻止濃度(MIC)とした。

遺伝子解析のための染色体DNAはInstagene matrix(Bio-Rad, Hercules, USA)を用いて抽出した。Polymerase Chain Reaction(PCR)は常法に準じて行い、プライマーは、*P. aeruginosa*の標準株PAO1の*gyrA*遺伝子のヌクレオチド番号の36~62に相当する5'GAGCTGGGCAACGACTGGAACAAGCCC3'と191~217の相補鎖に相当する5'GATACCGCTGGAACCGTTGACCAGCAG3'を用いた。部位特異的変異を導入したプラスミドの

構築の宿主として *E. coli* DH 5 (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-relA1*) を用いた。*E. coli* の温度感受性株 KNK453 (*gyrA43 polA thiA uvrA thx*) および *E. coli* の野生型 *gyrA* 遺伝子を保持するプラスミド pAWO 12 を実験に試供した。DNA の塩基配列はジデオキシ法によって決定した。

(結果)

1983年および1993年に分離された *P. aeruginosa* の *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域をクローニングし、DNA 塩基配列を解析した。その結果、1989年に分離された株では変異は認められなかったが、1993年に分離された株では、(1)Thr83Ile, (2)Asp87Asn, (3)Thr83Ile and Asp87Gly, (4)Thr83Ile and Asp87Asn, (5)Thr83Ile and Asp87His の5種類の型の変異が同定された。このうち3種類に2重変異があり、このような例はこれまで報告がなく、要注意な変異である。これらの変異は、これまで報告された *E. coli* における Ser83Leu, Asp87 Gly, Asp87Asn 変異と類似しており、GyrA 変異は *P. aeruginosa* においてもキノロン耐性と深く関わっていることが確認された。また、変異が83および87番アミノ酸に集中していたことは、これらのアミノ酸残基がキノロンとの結合部位の形成に重要な役割をになっていることを示している。

キノロン耐性における GyrA の83番および87番の残基の役割をよく明らかにするため、これらの残基に部位特異的変異を導入し、温度感受性変異株を作製し、*E. coli* を宿主として耐性発現の解析を行った。その結果、83番目のアミノ酸が Ser, Trp, Leu, Phe, Tyr, Ala, Val, Ile の変異型ではキノロン耐性を示したのに対し、Gly, Asn, Lys, Arg, Asp の変異型ではキノロン感受性であった。これらのことは、*E. coli* のキノロン耐性の発現には、GyrA の83番アミノ酸が疎水性であることが重要であることを示している。87番目のアミノ酸は Asp, Ala, Val, Phe, Ser, Asn, Lys の変異型でキノロン耐性を示した。これらのことは、キノロンの感受性には、GyrA の87番アミノ酸が負電荷を持たねばならないことを示している。

(考察)

DNA ジャイレースは DNA のスーパーコイル形成に必須であり、また DNA の複製、遺伝子発現にかかわり、細菌にとっては生命維持のために最も重要な酵素の一つである。キノロン系化合物は DNA ジャイレースに結合し活性を阻害するものであり、細菌感染症治療薬として幅広く使用されている。しかし、他の抗菌剤同様、キノロン耐性菌の出現が臨床問題となっており、その耐性機構の解明が望まれている。キノロン耐性機構のひとつは、DNA ジャイレースの変異によるキノロンへの結合性の低下であるとされている。*E. coli* や *S. aureus* における耐性機構の解析から、キノロン結合部位は GyrA 分子の N 末端から67番目のアラニンから106番目のグルタミンの間にあることが解明されており、DNA ジャイレースのキノロン結合部位は GyrA の Ser 83 の水酸基がキノロンと結合するのではないかという考えが提案されていた。しかし、本研究では、83番目のアミノ酸へ部位特異的変異を導入して解析した結果、この仮説には否定的であり、むしろ、Asp 87 のカルボキシル基がキノロンの塩基性基と相互作用をするのではないかという考えを提示した。ニューキノロンの臨床使用年月は短いにもかかわらず、1993年にすでに2重変異を持ったキノロン高度耐性の *P. aeruginosa* が複数株分離されており、疫学的見地からいってもこれらの菌の拡散が懸念される。今回の DNA ジャイレース変異とキノロン耐性との関係についての研究は、薬剤耐性機構の解明とその対策といった臨床医学的な問題だけでなく、DNA ジャイレースの構造と機能の解明といった基礎医学的な問題の解決への手助けになると考えられる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

人工化学合成法により新しく開発された抗菌剤に対しても病原性細菌は早期に耐性を獲得する。本研究では比較的新しい抗菌剤ニューキノロンに対して緑膿菌が耐性を獲得していることに注目し、その耐性機構を分子遺伝学的に解析している。この研究では緑膿菌のキノロン耐性は DNA ジャイレースの特定部位の変異によることを明らかにし、さらにキノロンの作用点に関しても新しい知見を提示している。このような発見は今後の抗菌剤開

発に有用な情報を提供するものであり、質の高い価値ある論文である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。