

氏 名 (本 籍)	むら かし ひろ ゆき 村 上 弘 之 (茨 城 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3229 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	医学研究科
学 位 論 文 題 目	<i>Staphylococcus aureus</i> の薬剤応答機構の解析
主 査	筑波大学教授 薬学博士 幸 田 幸 直
副 査	筑波大学講師 医学博士 今 川 重 彦
副 査	筑波大学講師 医学博士 大 前 比呂思
副 査	筑波大学講師 医学博士 竹 内 薫

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

Staphylococcus aureus は通性嫌気性のグラム陽性球菌であり、通常はヒトの哺乳動物の皮膚・鼻孔・口腔・咽頭等に常在していると同時に、様々な病原因子を産生して多彩な疾患を起こす病原細菌でもある。*S. aureus* 感染症の治療は抗菌薬の開発によって克服されたに見えたが、MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) や, VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) のような薬剤耐性菌の出現により、*S. aureus* 感染症は未だに制圧されていない。*S. aureus* は環境適応能が高く、抗菌薬ストレスに対して適応しながら新しい形質や薬剤耐性を獲得すると考えられる。本研究では、抗菌薬ストレスに対して *S. aureus* はどのような応答機構を発現するか、その分子生物学的機構を解明することを目的とした。

(対象と方法)

S. aureus に抗菌薬ストレスを加え、ディファレンシャル・ディスプレイ法によって薬剤応答遺伝子の探索を行った。クローニングした薬剤応答遺伝子の同定を行い、アミノ酸配列から遺伝子産物の生理的機能を推定した。作用点の異なる細胞壁合成阻害剤や界面活性剤による薬剤応答蛋白質の誘導発現、その蛋白質の局在性をウェスタン・ブロット法によって決定した。また、薬剤応答蛋白質の機能解析のため融合蛋白質発現系を構築し、大量発現させて分離精製し、酵素活性を測定した。さらに、薬剤応答遺伝子破壊株と過剰発現株を作製し、細胞壁合成阻害剤や他のストレスに対する応答性等について検討した。

(結果)

ディファレンシャル・ディスプレイ法により、オキサシリン存在下で発現が増強する二つの遺伝子があり、一つは細胞壁合成に関与するペニシリン結合蛋白質 *pbp2* (Penicillin Binding Protein 2: *pbp2*) で、他の一つは機能未知の新規遺伝子 *drp35* (Drug Responsible Protein 35: *drp35*) であった。*Drp35* は、細胞壁合成阻害剤によって mRNA の発現が誘導された。

薬剤応答蛋白質 *Drp35* は、細胞壁合成阻害剤だけでなく界面活性剤にも誘導された。また、この蛋白質は細胞質内に局在し、多くの *Staphylococcus* 属菌種に保存されていた。相同性検索の結果、*Drp35* は *Oryctolagus cuniculus*

の芳香族エステラーゼ (EC3.1.1.2) と25%の相同性を認めたので、GST-Drp35融合蛋白質を精製し、*p*-ニトロフェニール酢酸を基質として酵素活性を測定したところ、芳香族エステラーゼ活性を示した。この酵素活性は、芳香族エステラーゼのインヒターである

ヒドロキシ水銀安息香酸塩によって抑制された。Drp35は細胞質内に局在する芳香族エステラーゼ活性を有する蛋白質であることが判明した。

薬剤感受性試験では、*drp35*遺伝子破壊株は親株と比べて、細胞膜に作用するバシトラシンに対しては最小発育阻止濃度が低下し、抗菌薬に感受性化した。しかし、他の細胞壁合成阻害剤に対しては、感受性差が認められなかった。

(考察)

細胞壁合成阻害剤と消毒剤に使用する界面活性剤により発現が誘導される新規遺伝子 *drp35* を特定し、その発現蛋白質 Drp35 は芳香族エステラーゼ活性をもつことを見出した。*drp35* 遺伝子破壊株はバシトラシンに対する感受性はやや上昇するが、他の細胞壁合成阻害剤に対しては感受性に変化が見られないこと、また過剰発現株においても各細胞壁合成阻害剤に対する最小発育阻止濃度には変化が生じないことから、Drp35 が直接細胞壁合成に関与するとは考え難い。むしろ細胞壁あるいは細胞膜に何らかの構造的障害が生じたときに、細胞内に局在している Drp35 は細胞膜のウンデカプレノールリピドサイクルあるいは細胞膜脂質の合成ないしは修復のためのエステラーゼとして機能していると考えられる。*S. aureus* は、各種の物理的・化学的な環境からのストレスに対応する遺伝子をオペロンないしシストロンとして備えている。*drp35* は細胞膜障害で発現誘導される単独の遺伝子 (モノシストロン) であり、今後さらに詳細な機能の解明が必要である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

Staphylococcus aureus 感染症の治療は、抗菌薬の開発によって克服されたに見えたが、MRSA や VRSA のような薬剤耐性菌の出現により未だに制圧されていない。*S. aureus* は環境適応能が高く、抗菌薬ストレス下において適応しながら新しい形質や薬剤耐性を獲得すると考えられている。

本研究は、抗菌薬ストレスに応答する新規遺伝子を同定した。そしてバシトラシンに対する *drp35* 変異性の感受性化と、細胞壁合成阻害剤だけでなく界面活性剤に対しても Drp35 は誘導発現されることから、Drp35 は抗菌薬ストレス下、細胞質内から細胞膜中のリピドサイクルに関与し、細胞壁や細胞膜の生合成に関与する遺伝子や薬剤遺伝子と協調して細胞壁合成阻害剤の耐性化に寄与していると推測している。また、Drp35 は抗菌薬ストレスだけでなく、細胞の増殖移行期と共に誘導されること、*drp35* 変異株の増殖速度が親株と比べて遅いことから、*S. aureus* の増殖や生存に関与していることを示唆した。このように、*S. aureus* のストレス応答機構、特に抗菌薬ストレスに対してどのような応答機構が発現するかを分子生物学的に解明したことは、たいへんに意義のある研究成果であり、今後の発展が期待できるものとして評価できる。

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。