



Title	ゲノム情報に基づく薬剤排出蛋白質遺伝子資源の解析とその発現制御機構に関する研究
Author(s)	西野, 邦彦
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44147
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	にしの野邦彦
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第17760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 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	ゲノム情報に基づく薬剤排出蛋白質遺伝子資源の解析とその発現制御機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 那須 正夫 教授 西原 力 教授 本田 武司

論文内容の要旨

現在、臨床の場において様々な薬剤耐性菌が出現し、耐性菌感染症は医療従事者が直面する重要な問題の一つとなっている。一方で、1995年のインフルエンザ菌を皮切りに、数多くの微生物ゲノムの全塩基配列が報告され、細菌ゲノムの情報を入手できるようになったことにより、細菌の薬剤耐性遺伝子資源の全容に迫ることが可能になった。例えば、細菌の染色体上には薬剤排出蛋白質をコードしていると推定される Open reading frame (以下 ORF と略す) が数多く存在することが明らかとなった。しかし、これら ORF の内、実際に薬剤耐性に寄与していると確認されているものはごく一部に過ぎない。あらかじめ、潜在的な薬剤耐性遺伝子を含めてスクリーニングすることができれば、将来出現するであろう耐性菌を新薬開発の段階で予測しておくことも可能になるのではないか。本論文において、著者は、このような考えにもとづきゲノム情報を利用した薬剤耐性研究に取り組んだ。

(1) *Escherichia coli* の染色体上には薬剤排出蛋白質をコードしていると推定される ORF が 37 個存在する。そこで、これら全ての ORF をクローニングし解析した結果、37 個中 20 個の ORF が *E. coli* に顕著な薬剤耐性を与えることを明らかにした。その中でも 10 個の ORF は機能解析が全く行われていないものであり、複数の新規薬剤排出蛋白質遺伝子を同定することに成功した。ほとんどの薬剤排出蛋白質が胆汁酸の主成分であるデオキシコール酸の耐性に関与していた。これは *E. coli* の生育環境中に多量に存在する物質であり、薬剤排出蛋白質の第一の役割は環境からの生体防御であると考えられる。また、グラム陰性菌において初の報告となる ABC タイプ薬剤排出蛋白質 MacAB を発見した。この蛋白を発現させた *E. coli* は 14・15 員環マクロライド系抗生物質特異的に耐性を示す。MacA はペリプラズム空間に存在する membrane fusion protein (MFP) であり、MacB は ATP 結合ドメインを保持する 4 回膜貫通型の内膜蛋白質である。MacAB がその機能を発揮するのには外膜蛋白質 TolC を必要とするこも明らかにした。その後の解析により、大腸菌において、8 個もの薬剤排出蛋白質がその機能に TolC を必要としていることも明らかにした。

(2) つぎに、何故、これだけ多くの薬剤排出蛋白質遺伝子が *E. coli* 染色体上に存在しているのかという疑問が生じる。それを解くための方法の一つとして、大腸菌がどのようにしてこれら複数の薬剤排出蛋白質を利用しているのかを知ること、すなわち排出蛋白質の発現制御の解析が有用であると考えた。まず、その調節因子として二成分情報伝達系に注目した。二成分情報伝達系は細菌において、主要な環境感知・応答システムとして機能している。これまで、多

剤排出蛋白質による薬剤耐性に二成分情報伝達系が関与しているという報告はなかったが、薬剤排出蛋白質の役割が生体防御にあると考えると、この系によって発現制御される排出蛋白質が存在してもよいのではなかろうか。このような考えに基づき、解析を行った結果、著者は、EvgAS 二成分情報伝達システムが多剤排出蛋白質 YhiUV と単剤排出蛋白質 EmrKY の発現を調節し、*E. coli* を多剤耐性化させることを明らかにした。さらに、アレイを用いた解析の結果、EvgAS システムは *E. coli* の薬剤耐性のみならず酸抵抗性や高浸透圧抵抗性をも調節していることを見い出した。このことから、*E. coli* の薬剤排出蛋白質発現制御と恒常性維持との間には密接な関係があると考えられる。また、もう一つの二成分情報伝達系 BaeSR システムが多剤排出蛋白質 MdtABC の発現調節を行っていることも明らかにした。二成分情報伝達系による薬剤排出蛋白質発現制御は、全く新しい耐性制御メカニズムであり、薬剤排出蛋白質の発現が環境応答による生体防御機構により調節されていることを証明した。

(3) *E. coli* の染色体上には、ゲノム解析の結果、約 30 種類の二成分情報伝達システムが存在していると推定されている。具体的にはセンサーが 30 個、レギュレーターが 32 個である。EvgAS、BaeSR 以外にも薬剤耐性に関与する二成分情報伝達系は存在するのだろうか。さらなる二成分情報伝達系による薬剤耐性制御の理解のために、大腸菌の 32 個の推定レスポンスレギュレーターを全てクローニングし、発現ライブラリを構築、解析を行った。その結果、推定 32 個中 15 個のレギュレーターが大腸菌の薬剤耐性化に関与していることを明らかにした。化合物別にみると薬剤排出蛋白質の場合と同様に、デオキシコール酸耐性に関与しているレギュレーターが最も多く、9 個がこの耐性に関与していることが分かった。また、EvgAS、BaeSR に加えて、CpxAR システムが AcrD 薬剤排出蛋白質を制御することで *E. coli* の薬剤耐性化に関与していることを新たに明らかにした。

(4) さらに、薬剤排出蛋白質の発現を制御している可能性があるものとして大腸菌ヒストン様蛋白質である H·NS 蛋白 (histone-like nucleoid structuring protein) に注目した。H·NS は DNA 結合蛋白で、染色体コンパクト化に関与していると考えられているが、近年、H·NS が保持する転写制御機能が注目され、H·NS は莢膜や線毛といった病原因子だけでなく、酸抵抗性や高浸透圧抵抗性因子の発現を調節（抑制）していることが分かってきた。しかしながら、H·NS の薬剤耐性化への関与は未知であった。そこで、著者は H·NS が大腸菌薬剤感受性に及ぼす影響について調べた。その結果、H·NS は、AcrEF と YhiUV の 2 つの多剤排出蛋白質の発現を調節し、大腸菌の多剤耐性化に関与していることを明らかにした。

本論文は、細菌の染色体上に潜む薬剤耐性薬剤排出蛋白質遺伝子同定にはじまり、それらの発現調節機構まで幅広く解析することで、全く新しい細菌の多剤耐性機構の存在を明らかにしたものである。本論文で確立した方法は、薬剤耐性研究においてポストゲノム解析を可能にしたものであり、*E. coli*のみならず、多くの病原感染細菌の耐性因子を解析する際にも有用であろう。細菌ゲノム上に存在する薬剤耐性資源ならびにその制御ネットワークを把握しておくことが、新たな抗菌薬を開発する際に、有用なデータベースを提供できるものと考えている。本論文において確立した解析が将来の薬剤耐性菌克服に役立つことが期待される。

論文審査の結果の要旨

抗生物質の多用に伴い、多剤耐性細菌の増加が社会的問題になってきている。なかでも、多剤排出タンパクによる多剤耐性は、一つの因子で広範な薬剤に対する耐性をもたらすことから、21 世紀型の多剤耐性として注目されている。最近のゲノム解析により、一つの細菌が多種類の多剤排出タンパクをもともと保持していることが明らかになった。私たちは、これらが細胞レベルの基本的な生体防御機構であるという観点から、異物排出タンパクと呼ぶことを提唱している。

西野君は、大腸菌の 37 種類の推定異物排出タンパク遺伝子をすべて網羅的にクローニングし、強制的に発現させ、実際に薬剤排出タンパクとして機能するかどうか検定した。その結果、実に 20 種類が実際に既存の薬物・毒物を排出することが明らかになった。その中には、グラム陰性細菌ではじめて同定された ABC 型排出タンパクも含まれていた。これらのうち、構成的に発現しているのは 1 ~ 2 種類にすぎない。そこで次に、これら異物排出タンパク遺伝子発現制御機構について研究した。生体防御機構であるという観点から、細菌の環境感知・応答システムである 2 成

分情報伝達系に注目し解析した。その結果、EvgAS、BaeSR システムをはじめとして、いくつかの 2 成分情報伝達系が、異物排出タンパク遺伝子発現を制御することによって多剤耐性化を引き起こすことを発見し、その発現制御機構について詳しく解析した。さらに、大腸菌の 32 種類の 2 成分情報伝達系レスポンスレギュレーターを網羅的にクローニングして、異物排出タンパク遺伝子との関連について解析した。

これらの研究は、抗生物質耐性機構の研究におけるポストゲノム手法の応用として先駆的な研究であり、未来の耐性菌を予測することを可能にした画期的な研究でもある。博士（薬学）の学位に十分値する研究と認められる。