

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )	氏名	小林 加直
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Identification and characterization of a novel <i>aac(6')-Iag</i> associated with the <i>bla<sub>IMP-1</sub></i> -integron in a multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (多剤耐性緑膿菌の <i>bla<sub>IMP-1</sub></i> インテグロンに存在する新規アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ AAC(6')-Iag の同定と解析)			
論文審査担当者			
主 査	教授	坂口 剛正	
審査委員	教授	檜山 英三	
審査委員	教授	大毛 宏喜	
〔論文審査の要旨〕			
<p>多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: MDRP) は、院内感染の重要な原因菌の1つである。中でも近年、メタロ-β-ラクタマーゼ産生 MDRP の分離率が増加しつつある。2006年12月から2008年4月にかけて広島大学病院の同一病棟入院患者4名から MDRP が検出された。その4名の患者より分離された緑膿菌9株の染色体DNAを、制限酵素 <i>SpeI</i> で切断後、パルスフィールドゲル電気泳動を行った結果、9株全ての電気泳動パターンが一致した。従って、本事例が単一クローンによる院内感染事例であることが示唆された。この多発感染事例の起因となった株 NK0009 は、<i>bla<sub>IMP-1</sub></i> 陽性であった。広島県内における臨床分離 MDRP の分子疫学研究から、MDRP が保有する <i>bla<sub>IMP-1</sub></i> を含むクラス1インテグロンが6種類 (A~F) あることが報告されている。6種類のインテグロンを検出するプライマーセットを用いてPCR法によるインテグロンマッピングを行った結果、NK0009株は、Aタイプのパターンに類似した新規のクラス1インテグロンを保有していることがわかり、それを <i>In124</i> と名付けた。<i>In124</i> の塩基配列を決定し、耐性遺伝子カセットの中に、新規のアミノグリコシドアセチル化酵素遺伝子を見出し、それを <i>aac(6')-Iag</i> と名付けた。<i>In124</i> には、<i>bla<sub>IMP-1</sub></i>、<i>aac(6')-Iag</i>、各々一部欠失した <math>\Delta bla_{IMP-1}</math> と <math>\Delta aac(6')-Iag</math> をコードする合計4つの遺伝子カセットを保有していた。しかし、<math>\Delta bla_{IMP-1}</math> と <math>\Delta aac(6')-</math></p>			

*Iag* はそれぞれ *bla<sub>IMP-1</sub>* と *aac(6')-Iag* の 5' 末端の 8 塩基が欠失しフレームシフトをおこなっていた。*aac(6')-Iag* は、167 個のアミノ酸をコードし、アミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iz と 42% の相同性を示した。*aac(6')-Iag* 遺伝子を発現させた大腸菌は、アミノグリコシドの中で、ゲンタマイシンを除く全てのアミノグリコシドに耐性を示した。また、これまでの AAC(6')-I の報告と異なり、*aac(6')-Iag* 遺伝子を発現させた大腸菌はアルベカシンに対して耐性を示した。薄層クロマトグラフィー及び質量分析を用いて、組換え体 AAC(6')-Iag による各種アミノグリコシドのアセチル化を確認した。さらに、ESI-MS/MS 解析により、アミノグリコシドの 6' 位のアミノ基がアセチル化される事を、また 6' 位が第 2 級アミンのゲンタマイシン C<sub>1</sub> は基質とならない事を明らかにした。ゲンタマイシンの感受性が低下しなかった理由として、ゲンタマイシンが 3 種類の化合物 (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 及び C<sub>1a</sub>) の混合物であり、そのうちの化合物 C<sub>1</sub> が、アセチル化されずに活性が残ったためではないかと考えられた。接合伝達実験および形質獲得菌を用いた *bla<sub>IMP-1</sub>* と *aac(6')-Iag* の部分配列をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションの結果、*In124* はプラスミド上にあると考えられた。AAC(6')-Iag 酵素の速度論的パラメータを求め評価したところ、酵素の基質に対する代謝能を示す Kcat/Km は高い群、低い群、中間の群の 3 群に分かれ、アルベカシンはシソマイシンとともに高い群であった。アルベカシンが属する高い群とは、効率のよい基質ということを意味し、高い群と低い群では、2 オーダーの差 (約 160 倍) があった。これまでの報告例では、AAC(6')-I 群の酵素により、アルベカシンは他のアミノグリコシドと同様基質となりアセチル化されるが、アセチル化されたアルベカシンでも薬効が存在するため、耐性化しないと考えられている。本研究で新規に見出した AAC(6')-Iag は、アルベカシンに対し高い代謝能を有するため、アルベカシン低感受性の性質を示すと考えられた。

小林らは、これらの結果を第 82 回日本細菌学会総会にて発表した折に、優秀ポスター賞を受賞している。

以上の結果から、本論文は新規アミノグリコシドアセチル化酵素である AAC(6')-Iag を発見し、抗生物質耐性菌の研究として価値の高いものである。また、アルベカシン低感受性の理由が基質特異性にあることを AAC(6')-I 群として初めて示唆する重要な知見を得た。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。