

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	嶋田 徳光
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Complete nucleotide sequence of pKOI-34, an IncL/M plasmid carrying <i>bla</i> _{IMP-34} in <i>Klebsiella oxytoca</i> isolated in Japan (近畿地区で検出された <i>bla</i> _{IMP-34} を保有するプラスミド pKOI-34 の解析)			
論文審査担当者			
主 査	坂口 剛正	印	
審査委員	志馬 伸朗		
審査委員	横崎 典哉		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】 現在、世界中の医療施設でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）による感染が発生しており重大な問題となっている。広島県ではイミペネムには感受性を示したが、メロペネムには耐性を示すステルスタイプの腸内細菌科細菌が確認され、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)遺伝子 <i>bla</i>_{IMP-6} が関与していることが判明した。我々は近畿地区で分離されたステルスタイプを示す腸内細菌科細菌より新規 MBL である IMP-34 を見出し、それをコードする遺伝子 <i>bla</i>_{IMP-34} がプラスミド上に存在することを明らかにした。そこで <i>bla</i>_{IMP-34} 保有プラスミド pKOI-34 の塩基配列決定および解析を目的とした。</p> <p>【対象と方法】 2004年から2010年に近畿地区で分離された <i>bla</i>_{IMP-34} を保有する <i>K. oxytoca</i> 2株（MS5279・MS5280）、<i>K. pneumoniae</i> 3株（MS5284・MS5285・MS5286）を使用した。各菌株から大腸菌 BL-21 株に接合伝達して得られた transconjugant 株からプラスミドを精製した。配列決定には MS5279 株由来のプラスミド pKOI-34 を使用し、次世代シーケンサーで得られたドラフト配列に対して PCR-based gap close 法で contig を連結して環状プラスミドの全配列を得た。得られた遺伝子配列より Open Reading Frame (ORF) 解析後に、Blastp Program を用いた解析を行った。他の4株のプラスミドは pKOI-34 の遺伝子配列から22種類のプライマーセットを作成し PCR scanning 法にて比較解析した。</p> <p>【結果】 pKOI-34 は 87,343bp (GC content 53%, 104 ORFs) のプラスミドであった。複製に関する蛋白 RepA のアミノ酸配列より IncL/M プラスミドに属することが判明した。耐性遺伝子や Mobile element を持たないプラスミド pEL60 (60,145bp) が IncL/M プラスミドの祖先と考えられているが、pKOI-34 は pEL60 に類似した基本</p>			

骨格に 2 個の Mobile element (8.8kb, 19.5kb) を有した構造であった。前者はトランスポゼース *tnpA*, *tnpR* と砒素耐性遺伝子群を含む遺伝子群であり、19.5kb Mobile element はトランスポゾン *Tn21* に類似した構造に加え、その両端に挿入配列 *IS4321R* を含んでいた。トランスポゾン *Tn21* はトランスポゼース *Tn21 tnp* と水銀耐性遺伝子群 *mer* より構成され、様々な薬剤耐性遺伝子の伝達に関連する可動性遺伝子群として知られている。この *Tn21* に類似した構造に様々な薬剤耐性遺伝子を出し入れするインテグロン構造 (*In808*) が組みこまれ、インテグロンカセットに *bla_{IMP-34}* が存在していた。

他の 4 株 (MS5280, MS5284, MS5285, MS5286) に対して PCR scanning を行った結果では 22 個のプライマーセットのうち 4 株と No3,4 のセットで増幅が得られず、配列解析の結果 8.8kb の Mobile element が欠落していた。Multi Locus Sequence Typing (MLST) 法による解析では MS5279・MS5280 は ST1771 に、MS5284・MS5285・MS5286 は ST334 に属していた。

広域スペクトラムの β ラクタム耐性を持つ多剤耐性 *IncL/M* プラスミドが世界中で報告されており、これらは同様の基本骨格を持っている。pKOI-34 は日本で初めて報告されて多剤耐性を有する *IncL/M* プラスミドであった。これまで報告された薬剤耐性 *IncL/M* プラスミドへの耐性遺伝子群の挿入部位を比較すると 2 ヶ所の hot spot があるが、pKOI-34 の挿入部位はこれまでの報告とは異なる部位であった。

【まとめ】薬剤耐性遺伝子 *bla_{IMP34}* を保有するプラスミド pKOI-34 の全塩基配列を決定し、それを解析した。pEL60 を基本骨格とした *IncL/M* プラスミドが様々な β -ラクタム耐性遺伝子を獲得して腸内細菌科細菌に拡がっている。本研究では新規 MBL 遺伝子 *bla_{IMP-34}* が接合能を持つ pEL60 骨格に挿入され可動性薬剤耐性遺伝子として存在することを明らかにした。

以上の結果から本論文は、*bla_{IMP-34}* を保有するプラスミド pKOI-34 は接合伝達能を有するうえに、トランスポゾンやインテグロン構造を取り込みながら薬剤耐性遺伝子の拡散に関与していることを明らかとした。

よって審査委員会委員全員は、本論文が嶋田徳光に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。