

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 303 号	学位申請者	山根 隆史
審査委員	主査	西 順一郎	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 橋口 照人、
	副査	有馬 直道	副査 武田 泰生

**Genome-wide transcriptome analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli***

(尿路由来大腸菌のフルオロキノロン耐性遺伝子についての解析)

大腸菌が起炎菌となる尿路感染症は、泌尿器科領域において急性膀胱炎、腎盂腎炎をはじめ頻繁に経験される。しかし、現在、第一選択薬であるフルオロキノロン薬に耐性を示す大腸菌の分離率が上昇し、問題となっている。大腸菌のキノロン耐性機序としては、標的酵素である DNA ジャイレース、トポイソメラーゼIVの変異、薬剤取り込みの低下、薬剤の排出亢進、プラスミド上の *qnr* 遺伝子の伝播などが知られているが、臨床分離株を用いて行った研究は少ない。今回、学位申請者らは複数の尿路由来大腸菌の臨床株を用いて、キノロン耐性に関する新規遺伝子の探索を行った。尿路感染症患者より分離された大腸菌より、薬剤感受性試験にて、キノロン薬に感性を示す 52 株と、耐性を示す 50 株を用い、そのうちの感性の 4 株、耐性の 5 株より RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ法で、大腸菌すべての遺伝子発現解析を行い、キノロン耐性株で発現が亢進する遺伝子、発現が抑制される遺伝子を同定した。候補遺伝子に関しては、102 株全てを用い、リアルタイム RT-PCR 法でマイクロアレイ法の結果を検証した。また候補遺伝子の強制発現株を作成し、最小発育阻止濃度 (MIC) の変化を測定した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) cDNA マイクロアレイ法では、キノロン感性株に比べて耐性株で 2.5 倍以上に有意に発現が亢進している遺伝子は 40 個あった。
- 2) キノロン耐性で発現が亢進している遺伝子を機能別に分類すると転写に関するものが最も多く 18%を占め、次に代謝、輸送に関するものの割合が 12%であった。
- 3) マイクロアレイの結果で上位にあった *psp* 群の遺伝子の中で最も発現が亢進している *pspC* と DNA の修復、複製、転写に関わるとされる *dam* を候補遺伝子にあげた。
- 4) リアルタイム RT-PCR の結果、両遺伝子ともキノロン耐性群で有意に発現が亢進し、マイクロアレイの結果を支持するものであった。
- 5) *dam* と *pspC* を導入した株のキノロン薬に対する最小発育阻止濃度を wild type と比較した結果、明らかな MIC の上昇がみられ耐性の獲得が示された。

*psp* 遺伝子群は細胞内膜に存在し、毒素や細胞膜へのストレスなどで発現が亢進すると言われているが、キノロン薬など抗菌薬への曝露でも、発現が亢進すると考えられた。*dam* は遺伝子複製、ミスマッチ修復や転写を誘導するファクターのメチル化機構に関わっているとされており、抗菌薬曝露後の遺伝子障害の修復に関与していると考えられた。本研究はマイクロアレイを用いた新しい方法で、臨床の分離株を用いて耐性に関与する遺伝子を示した点で意義がある。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。