

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 561 号		学位申請者	渡邊 温子
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (医学・ <b>歯学</b> ・学術)
	副査	佐藤 友昭	副査	中村 典史
	副査	松口 徹也	副査	前田 綾

An alternative nisin A resistance mechanism affects virulence in *Staphylococcus aureus*

## (ナイシン A 作用により分離したナイシン A 高度耐性 MRSA のビルレンスに及ぼす影響)

現在、世界的に薬剤耐性菌の蔓延が問題となっており、*Staphylococcus aureus* (以下 Sa) は、医療現場で問題視される耐性菌の 1 つであることから、Sa の薬剤耐性化メカニズムの解明を行うことは重要な課題である。今回、学位申請者は乳酸菌由来の抗菌性ペプチドであるナイシン A に着目した。ナイシン A はグラム陽性菌に高い殺菌効果を発揮することが知られている。現在、日本では食品の保存料や歯磨剤の抗菌成分として使用されている。食品の保存料に含まれるナイシン A が高濃度であることから、ナイシン A の使用による耐性化株の出現が懸念される。そこで、学位申請者は、ナイシン A をメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) である MW2 株に作用させ、ナイシン A 高度耐性化株を 2 株 (SAN2 と SAN469 と命名) 分離した。分離株のナイシン A 耐性化機構を解明するため、SAN2 株のナイシン A 高度耐性化に関与する候補遺伝子を DNA マイクロアレイ解析にて探索した。同定した候補遺伝子について、SAN2 株の遺伝子不活性化株および不活性化した遺伝子の相補株を作製し、ナイシン A 高度耐性化との関連を検証した。さらに同定した遺伝子領域の塩基配列を決定し、変異部位の同定を行った。同定した遺伝子が発現調節性因子であったため、組み換えタンパクを作製し、DNA 結合解析をゲルシフトアッセイ法により行った。また、分離株のビルレンスに与える影響を検証するため、溶血活性、ヒト抗菌性ペプチドの 1 つであるヒト  $\beta$ -defensin-3 (以下 hBD3) に対する感受性およびマウスに対する致死活性の検証を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) SAN2 株は親株に比べ ABC トランスポーターである *pmtABCD* が恒常的に高発現であった。
- 2) SAN2 株の *pmtABCD* 不活性化株では、ナイシン A の感受性は増大した。
- 3) *pmtABCD* の上流にある発現調節性因子 (サプレッサー) である *pmtR* に変異を認めた。
- 4) SAN2 株由来組換え変異型 *PmtR* タンパクは *pmt operon* の promoter 領域 DNA との結合能が消失した。
- 5) MW2 株以外の MRSA 2 株 (COL 株、TY34 株) を用いて同様にナイシン A 高度耐性株を分離し検証した結果、*pmtR* の変異に伴う *pmtABCD* の高発現を認めた。
- 6) *PmtABCD* の過剰発現により、溶血活性の増大および抗菌性ペプチド感受性の低下を認めた。
- 7) SAN2 株は MW2 株と比較してマウスに対する致死活性が有意に大きかった。

これらの結果から、高濃度ナイシン A を作用することで耐性株は出現すること、その耐性化機構として *PmtABCD* の過剰発現によることを明らかにした。また、この耐性化は病原性にも影響を及ぼすことが示され、今後ナイシン A を使用する際にはその濃度や頻度に注意が必要であると考えられる。

本研究は、Sa の高濃度ナイシン A に対する耐性化メカニズムおよびビルレンスへの影響を検討したものであり、Sa の薬剤耐性化機構の解明に大きく寄与するものである。

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。