

氏名（本籍） 藤 村 茂
学位の種類 博士（医学）
学位記番号 医 第 3015 号
学位授与年月日 平成 10 年 3 月 4 日
学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当
最終学歴 昭和 63 年 3 月 19 日
東北薬科大学薬学部衛生薬学科卒業
学位論文題目 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* に
おける Arbekacin 不活化の新しい機序に関する
検討

（主 査）

論文審査委員 教授 貫 和 敏 博 教授 佐々木 毅
教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

本研究の目的は、MRSA 感染症に適応を有する初めてのアミノグリコシド系抗生物質である Arbekacin (ABK) に対して、従来から MRSA が示していた耐性機構の他に新しい機構を確認し、その機構の化学分析学的（化学構造解析）、分子生物学的な解明（修飾酵素解析）を行うことである。

今回使用した ABK 耐性 MRSA は、東北地方において分離された株であり、その最小発育阻止濃度 (MIC) は、 $6.25\sim 25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の中等度耐性を示した。また、コアグララーゼ型は、すべて II 型であった。この菌株を使用して ABK 耐性機構について検討を行った。

化学分析学的な検討として ABK 耐性 MRSA 培養液に添加した ABK を単離して、その中の ABK 修飾体の化学構造解析を行った。その方法は、NMR（核磁気共鳴）による化学構造修飾部位の同定、MS（質量分析）による ABK 修飾体の総分子量と組成式の同定、FT-IR（フーリエ変換赤外分光法）による修飾基の同定以上 3 法を用いたものである。NMR 解析では、ABK 修飾体にアセチル基の存在を示すプロトンシグナル (2.21ppm) とカーボンシグナル (175ppm , 22.7ppm) が確認され、その全帰属から磁場変化を同定したところアセチル化の部位は、4''' 位のアミノ基部分であること、及びその修飾体は N-アセチル体であることが確認された。MS では、そのアセチル体の分子イオンピークである分子量 594 が確認され、その組成式も ABK の N-アセチル体と一致した。FT-IR においてもアセチル基のカルボニルと考えられる 1650cm^{-1} が確認された。今回使用した東北地方分離の耐性株においては、従来から報告されている ABK のリン酸化とアセチル化の同時修飾は確認されなかった。すなわち ABK の 4''' 位のモノアセチル化による新しい修飾（不活化）が確認された。

分子生物学的検討として、アミノグリコシド系抗生物質の不活化は修飾酵素によるとされているので、4''' 位をアセチル化する酵素（今回、AAC4''' と命名）について解明した。その方法として、修飾酵素による不活化率の測定、修飾酵素の分子量同定と PCR で AAC4''' 遺伝子における既知の ABK 修飾酵素 (bifunctional enzyme) 遺伝子の有無の確認を行った。また AAC4''' の N-末端 30 残基のアミノ酸配列の決定し bifunctional enzyme と相同性を確認した。

不活化率の検討では、アセチル化の反応系のみ ABK が不活化され、その不活化率は 20~60% であった。また菌体内酵素活性画分 (AAC4''') の分子量は、28kDa であった。SDS 電気泳動からも ABK 耐性株にのみ 28kDa のバンドが確認された。PCR による検討では、今回使用した菌株に、bifunctional enzyme 遺伝子と相同性が確認された。AAC4''' のアミノ酸配列は、bifunctional enzyme とほとんど一致した。

以上の成績から、今回新たに確認された ABK の耐性機構は、ABK の 4'' 位のモノアセチル化修飾であり、その修飾酵素 AAC4'' は、何らかの影響によって既知の ABK 修飾酵素 (bifunctional enzyme) の変異体、あるいは分解産物であると示唆された。

また、今回使用した菌株の臨床背景としては、本来の使用目的以外 (創部 MRSA 除菌等) の ABK 長期投与例が確認されている。ABK に限らず他の抗 MRSA 剤においても耐性獲得例が多数報告されており、感染症に対する適切な抗生物質使用の重要性を意味するものと思われた。

審査結果の要旨

Arbekacin (ABK) は臨床的に最も重要な耐性菌の一つである MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) 感染症に適応を有する初めてのアミノグリコシド系抗生物質である。しかし 1994 年に ABK 耐性 MRSA が報告され、その耐性機構は修飾酵素 (APH2''-AAC6') による ABK の不活化であることが判明した。これに対して、本学位申請者は、既報告の修飾酵素によらない ABK 耐性 MRSA を解析し、新しい修飾機構が存在することを確認した。

使用菌株は東北地方において臨床分離された ABK 耐性 MRSA 5 株で、その最小発育阻止濃度は、6.25~25 $\mu\text{g/ml}$ で中等度耐性を示した。

1) 化学構造解析: ABK 耐性 MRSA 培養液に添加した ABK を単離して、その中の ABK 修飾体の化学構造解析を行った。核磁気共鳴 (NMR) による化学構造修飾部位の解析では、アセチル基の存在を示す H-signal (2.21ppm) と C-signal (175ppm, 22.7ppm) が確認され、アセチル化の部分は 4'' 位のアミノ基部分であり、その修飾体は N-アセチル体であることを確認した。質量分析 (MS) による ABK 修飾体の総分子量と組成式の解析では、アセチル体の分子イオンピークが確認されその組成式も ABK の N-アセチル体と一致した。さらに、赤外分光法 (FT-IR) による修飾基の同定においてもアセチル基の存在が確認された。

2) 修飾酵素解析: 本研究で見出された 4'' 位をアセチル化する酵素 (以下 AAC4''') を以下の方法で解析した。(A) 修飾酵素による不活化率の測定, (B) 修飾酵素の分子量同定, (C) PCR 法による AAC4''' 遺伝子と APH2''-AAC6' 遺伝子の相同性の確認, (D) AAC4''' の N-末端 30 残基のアミノ酸配列の決定と APH2''-AAC6' と相同性の確認。

不活化率の検討では、アセチル化の反応系のみで ABK が 20~60% 不活化された。AAC4''' の分子量は 28kDa であり、PCR による検討では APH2''-AAC6' 遺伝子との相同性が確認された。さらに AAC4''' のアミノ酸配列は、APH2''-AAC6' とほとんど一致した。以上から、今回新たに確認された ABK の耐性機構は、ABK の 4'' 位のモノアセチル化修飾であり、その修飾酵素 AAC4''' は既知 ABK 修飾酵素の変異体、あるいは活性変化である可能性が示された。

本研究の意義は、MRSA の ABK に対する新しい修飾機構を解明したことにある。既存の不活化酵素に安定な ABK に対して、本研究の不活化酵素の標的が AHB 基に存在していることは合理的である。VCM 耐性 MRSA の報告がなされはじめた今日、本研究 ABK 耐性の機序とその克服は重要である。かかる点より本論文は学位に値すると評価される。