

Nguyen Dong Tu 論文内容の要旨

主 論 文

Two different mechanisms of ampicillin resistance operating in strains of *Vibrio cholerae* O1 independent of resistance genes

(コレラ菌で作動する2つの新規アンピシリン耐性機構)

Nguyen Dong Tu, Ngo Tuan Cuong, Tran Huy Hoang, Nguyen Thi Phuong Lan,
Nguyen Binh Minh, Kouichi Morita, Masahiko Ehara

FEMS Microbiology Letters

(298 巻 1 号 37 頁-43 頁 2009 年掲載)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：森田 公一 教授)

【緒言】

コレラ菌感染による下痢症は熱帯地域で流行を繰り返しており、治療に用いる抗菌薬への耐性獲得機構の解明は疾病対策上重要な研究項目となっている。

ダルスガードらは1979年から1996年にベトナムで分離されたコレラ菌の耐性遺伝子を調査し、1990年以前の株では薬剤耐性因子Rプラスミドが確認され、1990年以降の株は耐性遺伝子 *aadA2* を有するクラス I インテグロンを保持し、1996年になるとほとんどの株が多剤耐性遺伝子をもつ SXT element を獲得していることを報告した。一方、グラム陰性桿菌の中には既知の薬剤耐性遺伝子とは関係なく、線毛産生相 (fimbriate phase) や外膜多糖マトリックス、皺のよったコロニーなどの特徴をもつラフ型菌で薬剤耐性が増すことが知られている。本研究ではベトナムで分離したコレラ菌のラフ型株、線毛産生相株を解析しアンピシリンに対する新規耐性機構を解析した。

【対象と方法】

バングラデシュ分離の線毛産生相株 (Bgd17) 1株、ベトナム分離ラフ型菌6株、ラオス分離ラフ型菌1株を alkaline tryptone 液体培地 (ATbroth) で培養し、それぞれ菌膜を作らせその一部を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地に接種し一夜培養後、100 μ g/ml のアンピシリンを含む TCBS 寒天培地に塗布し

さらに一夜培養しアンピシリン耐性株を得た。得られた耐性変異株は-80℃に保存した。耐性変異株のアンピシリンに対する MIC (Minimal Inhibitory Concentration)の決定を行い、プロテオーム解析は SDS-PAGE, Western Blot, 標的タンパク質の N 末端アミノ酸解析等により行った。タンパク質の精製はイオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィにを用いた。抗体の作製は抗原を SDS-PAGE 後、ゲルから切り出し抽出して抗原とし、家兔に免疫した。Twitching motility の観察は寒天培養で tooth-pick 法により実施した。

【結果】

ラフ型コレラ菌の rugose phenotype は 37℃で 3 日培養するとスムーズ型への復帰がみられたが、線毛産生相の株には見られなかった。変異株の MIC は 65 μ g/ml 以上でその親株の MIC は 4 μ g/ml であった。プロテオームの解析結果、ラフ型が耐性変異すると外膜タンパクの OmpU (outer membrane protein U) 産生がアンピシリンと dose dependent manner に減少した。一方、線毛産生相の株では耐性変異すると、抗酸性ストレス蛋白 cpxP を多量に産生したが OmpU には変化が見られなかった。またこの cpxP は inner membrane protein (YceI-like) と outer membrane protein (OmpU) とからなる複合体を形成していた。cpxP 産生株では線毛産生相の株に特有な Twitching motility が消失していた。

【結論と考察】

ラフ型菌の耐性変異株では親株と比較して、細胞内外の物質輸送に関与する外膜蛋白 (porin) の 1 つである OmpU の産生を減少させていたことから、アンピシリンの細胞内への輸送を減少させ耐性を獲得する機序が示唆された。

一方、線毛産生相の菌株 Bgd17 は cpxP を発現し、さらに細胞内膜と外膜に存在する YceI-like、OmpU と cpxP が複合体を形成して酸性ストレスに対抗し耐性を獲得する機序が示唆された。この cpxP 蛋白は、El Tor コレラ菌のゲノム解析によりその存在は知られていたが、実際に発現した cpxP 蛋白をコレラ菌で検出したのは本研究が初めてである。

線毛産生相の菌株はアンピシリンの刺激により cpxP を産生し菌の Twitching motility が消失した。これはアンピシリンが IV 型線毛の発現/機能を抑制した事を示している。即ち、アンピシリンにはコレラ菌の小腸上部での菌播種、microcolony の形成を阻止する作用があると考えられる。さらに、IV 型線毛はコレラ毒素の発現を増強すると考えられている線維状フェージの受容体であることから、アンピシリンは in vivo では小腸上部に定着したコレラ菌が繊維状フェージを取り込むのを阻止して病原性を減弱させる可能性も示唆された。