

104 細胞外膜標的抗生物質に対する緑膿菌の耐性機構の解明	今井 優
-------------------------------	------

【目的】 近年薬剤耐性菌の出現が社会問題となっており、新しい抗生物質の開発が求められている。これまでに我々は、線虫共生細菌である *Photorhabdus khanii* から、グラム陰性細菌に特異的な活性を示す抗生物質ダロバクチンを発見している。大腸菌 *Escherichia coli* をモデルとした研究から、ダロバクチンが BamA タンパク質（新生外膜タンパク質の折りたたみと挿入に関与）に結合し、同菌を死に至らしめることを明らかにしている。また *bamA* 遺伝子における特定の変異が *E. coli* に対してダロバクチン耐性を付与することも判っている。一方興味深いことに、同じグラム陰性細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* から自然突然変異法により複数のダロバクチン耐性株を分離し、その変異点を解析したところ、全ての株が機能未知遺伝子 PA2784 の 86 塩基上流のチミンが欠失した変異（PA2784-86del 変異）を有することが明らかとなった。また、タンパク質の局在予測ツール PSORTb V.3.0 による解析から、PA2784 タンパク質が細胞質膜に存在すること、そして同タンパク質が *P. aeruginosa* に固有のものであることが判った。これを背景に本研究では、PA2784-86del 変異が *P. aeruginosa* にダロバクチン耐性を付与するメカニズムの解析を目指した。

【方法】 *E. coli* においては *bamA* 遺伝子における変異がダロバクチン耐性を付与することから、*P. aeruginosa* の PA2784 遺伝子破壊株から自然突然変異法によりダロバクチン耐性株の取得を試み、*P. aeruginosa* において PA2784-86del 変異を介さないダロバクチン耐性機構（*bamA* 変異など）が存在するか否かを検討した。また、*P. aeruginosa* PAO1（親株）、PA2784-86del 変異株および PA2784 遺伝子破壊株の外膜透過性やダロバクチン以外の抗生物質に対する耐性を評価することにより、PA2784-86del 変異により外膜の特性や物質の取り込み能が変化しているか否かを調べた。またこれらに加え、PA2784-86del 変異によるダロバクチン耐性メカニズムの全体像を明らかにするため、RNA シーケンス解析を実施し、ダロバクチン存在下で発現が変動する遺伝子を調べた。

【結果】 本研究では *P. aeruginosa* の PA2784 遺伝子破壊株からダロバクチン耐性株を取得することができなかった。このことから *P. aeruginosa* においては *bamA* 変異を介した耐性獲得は生じず、同菌におけるダロバクチン耐性獲得機構は、PA2784 遺伝子および、同一オペロン上に存在すると考えられている PA2785 遺伝子と PA2786 遺伝子が必要不可欠であることが示唆された。また PA2784-86del 変異株の外膜透過性は親株と同様であることも判明し、PA2784-86del 変異株においては、外膜透過性の低下によりダロバクチン耐性を獲得したわけではないことが明らかとなった。これと一致して PA2784-86del 変異株においては、他抗生物質に対する感受性は変化しておらず、ダロバクチンにのみ耐性を示すことも判った。また RNA シーケンス解析から、ダロバクチン存在下の PA2784-86del 変異株においては、物質の輸送に関与するタンパク質や、細胞壁合成酵素 D-アラニル-D-アラニンリガーゼなどの発現量が大きく変動していることを見出した。

P. aeruginosa における BamA 変異を介さないダロバクチン耐性メカニズム

