HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis utilizing recombineering technology [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大内, 勇樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14108号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78460
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_OUCHI_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：大　内　勇　樹

審査委員	主査　教授	鈴　木　定　彦
	副査　教授	東　　秀　明
	副査　准教授	中　島　千　絵
	副査　特任准教授	磯　田　典　和

学位論文題名

Studies on fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* utilizing recombineering technology

（組換え技術を利用した結核菌のフルオロキノロン耐性に関する研究）

結核は結核菌に由来する感染症であり，世界中で年間約 1000 万人の新規罹患者と約 150 万人の死者を出している。多剤併用療法により治療可能ではあるが，複数の薬剤に耐性を獲得した多剤耐性結核の発生が公衆衛生上非常に深刻な問題となっている。フルオロキノロンは，二次選択薬として多剤耐性結核に処方され，中でもレボフロキサシンおよびモキシフロキサシンの利用が勧められている。フルオロキノロンは，DNA トポロジーを調節する DNA ジャイレースの機能を抑制することで，結核菌の増殖を阻害する。しかしながら，DNA ジャイレース A サブユニット上の 88 位，90 位，94 位のアミノ酸置換によって，フルオロキノロンの結合を回避することで，結核菌はフルオロキノロン耐性を獲得することが知られている。本研究では，フルオロキノロン耐性結核の発生及び蔓延を制御するために，遺伝子組換え技術を駆使し，新規フルオロキノロン WQ-3810 のフルオロキノロン耐性結核菌に対する阻害活性と，フルオロキノロン耐性化が結核菌にもたらす影響を評価した。

第 I 章では，新規のキノロン系抗菌薬である WQ-3810 に焦点を当てて解析を進めた。WQ-3810 は，従来のフルオロキノロンに耐性を獲得した大腸菌やアシネトバクター属菌にも殺菌作用を示すことが分かっている。本学位論文では，フルオロキノロン耐性変異を持つ組換え結核菌 DNA ジャイレースに加えて，結核菌 DNA ジャイレースを発現する組換え BCG 菌を用いて，WQ-3810 の酵素活性阻害作用および殺菌作用を調べた。DNA ジャイレースを用いた酵素活性阻害試験の結果，WQ-3810 は，全ての変異型に対してレボフロキサシンよりも強い阻害活性を示すのみでなく，臨床結核菌株の中で最も高いフルオロキノロン耐性を与えるとされる G88C 変異型 DNA ジャイレースに対しても優れた阻害活性を発揮した。加えて，組換え BCG 菌を用いたフルオロキノロン感受性試験の結果，WQ-3810 は，単独ではモキシフロキサシン

よりも弱い殺菌作用しか示さなかったが，細胞壁合成阻害活性を有する一次選択抗結核薬であるエタンブトールとの併用により，G88C 変異型を含む変異型組換え BCG 菌株に対してモキシフロキサシンより強い殺菌作用を有していることを明らかにした。これらの結果から，WQ-3810 と細胞壁合成阻害薬との併用療法は，フルオロキノロン耐性結核菌をも制御できる新しい抗結核治療法として，今後の臨床応用が期待されることを示した。

第 II 章では，フルオロキノロン耐性結核菌における fitness cost に焦点を当てて解析を進めた。結核菌では主に薬剤標的酵素の薬剤結合部の構造を変化させる遺伝子変異により薬剤耐性化が生じている。通常，薬剤の標的酵素は菌の生育に必須であるため，変異を起こすと活性が低下し，菌の生育が妨げられる。耐性化の代償で求められるこのような負荷を fitness cost と言うが，結核菌におけるフルオロキノロン耐性変異が生じさせる fitness cost についての詳細は不明であった。本章では，第 I 章で用いた組換え DNA ジャイレースおよび組換え BCG 菌を用いて，その酵素活性と菌増殖能などの表現型を調べることで，結核菌における fitness cost を評価した。組換え DNA ジャイレースの活性を DNA 超螺旋化試験により評価した結果，A90V 変異型を除いた全ての変異型において，野生型よりも低い活性が確認されたものの，組換え BCG 菌を用いた増殖能評価の結果，全ての変異型組換え菌は野生型と同等の増殖速度を示すことが分かった。しかしながら，G88C 変異型組換え BCG 菌において，菌膜形成能の消失と，その他の抗結核薬やマクロファージの食作用に対する抵抗性の低下が観察された。これらの結果より，DNA ジャイレース上のアミノ酸置換が，DNA トポロジーの不安定化により結核菌の菌体表面の性質を変化させ，環境ストレスへの抵抗性に影響を与えていることを明らかにした。

本学位論文提出者の大内勇樹氏は，本研究の成果から，新規フルオロキノロンが特に細胞壁合成阻害薬との併用により，既存薬と同等以上の抗結核作用を有すること，フルオロキノロン耐性をもたらす変異が抗酸菌において生存に不利益な影響を与えることを明らかにした。また，本研究で作出された組換え DNA ジャイレースや組換え BCG 菌の利用が，結核菌のフルオロキノロン耐性に関する研究に有効であることが実証されたとともに，結核の新しい治療薬や治療法の開発・評価に助力できるアプローチとなる事を示した。よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者大内勇樹氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。