



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Impact of QnrB19, a pentapeptide repeat protein mimicking double stranded DNA, on the quinolone resistance in Salmonella Typhimurium. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Ruttana, PACHANON
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14276号
Issue Date	2020-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79721
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Pachanon_Ruttana_review.pdf, 審査の要旨



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：Pachanon Ruttana

審査委員	主査	教授	鈴木	定彦
	副査	教授	東	秀明
	副査	教授	中島	千絵
	副査	特任准教授	磯田	典和

学位論文題名

Impact of QnrB19, a pentapeptide repeat protein mimicking double stranded DNA, on the quinolone resistance
in *Salmonella* Typhimurium
(二重鎖 DNA を模倣するペンタペプチド繰返し蛋白 QnrB19 の
ネズミチフス菌キノロン耐性化への影響)

非チフス性サルモネラ属菌は家畜、家禽等の腸管に保持されており、主に食品経由でヒトに感染する。年間の感染者数は約 1 億人、死亡者数は 15 万人以上と推定されており、公衆衛生において大きな課題と考えられている。非チフス性サルモネラ属菌の中では特に、*Salmonella* Typhimurium（ネズミチフス菌）及び *S. Enteritidis* が世界各国で頻繁に報告されている。アンピシリン及びクロラムフェニコールが治療薬として使用されてきたが、耐性菌株が多く出現していることから、キノロンが代替薬として重要視されている。しかしながら、キノロン耐性サルモネラ菌が近年世界的増加傾向にあり、その対策が喫緊の課題となっている。

キノロンは、細菌の必須酵素 DNA ジャイレースを阻害することで殺菌的作用を示す。DNA ジャイレースは、DNA 複製と RNA 転写に関与する酵素で、GyrA および GyrB の 2 種のサブユニット 2 組から構成されている。キノロンは GyrA、GyrB 及び DNA に結合することで DNA ジャイレースの活性を阻害する。そのため、DNA ジャイレース上のキノロン結合部位周辺にアミノ酸置換が生じることで細菌はキノロン耐性となる。一方、プラスミド DNA 上にコードされる蛋白質によって引き起こされるキノロン耐性（プラスミド媒介性キノロン耐性 Plasmid Mediated Quinolone Resistance; PMQR）も近年その広がりを見せており、注目されている。PMQR の中で最も高頻度に見出されているのはキノロン耐性蛋白質（Qnr）と呼ばれる二重鎖 DNA を模倣するペンタペプチド繰返し蛋白質であるが、これを介したキノロン耐性化機序が全て解明されているとは言いがたい。キノロン耐性菌の制御には、Qnr に起因するキノロン耐性獲得機序の詳細を明らかにするとともに、Qnr 保有菌株にも有効な薬剤を開発することが重要である。

そこで本学位論文提出者 Pachanon Ruttana 氏は、組換え蛋白質発現・精製技術及び試験管内酵素活性測定技術を駆使して、Qnr によるネズミチフス菌キノロン耐性化への関与の解明と Qnr によって耐性化した菌株にも有効な化合物の探索を試み

た。

第 I 章において Pachanon 氏は、文献検索を通じて、ヒト、家畜、並びに食品由来ネズミチフス菌から最も高頻度に見出される Qnr が、QnrB19 である事を見出した。次いで、大腸菌を宿主とする外来遺伝子発現系とカラムクロマトグラフ法を駆使して QnrB19 とネズミチフス菌 GyrA 及び GyrB を組換え蛋白質として精製し、研究に供する材料を用意した。さらに、オールドキノロンであるナリジクス酸とニューキノロンであるノルフロキサシン及びシプロフロキサシンを対象として、これらの薬剤に対する耐性形質獲得への QnrB19 の関与を、DNA スーパーコイル化試験及び DNA スーパーコイル化阻害試験により検証した。その結果、QnrB19 は、キノロンによって阻害された DNA ジャイレースの活性を回復させる能力を有すること、また、QnrB19 は、ノルフロキサシン及びシプロフロキサシンに対する耐性形質を付与できるが、ナリジクス酸に対する耐性形質を付与できない事を明らかにした。また、キノロンの 6 位、7 位及び 8 位の置換基のいずれか、ないしは複数の組み合わせが QnrB19 による耐性形質付与に関係していることを明らかにした。

第 II 章において Pachanon 氏は、1 位に 6-amino-3,5-difluoropyridin-2-yl, 7 位に 3-alkylaminoazetidin-1-yl の構造を有するニューキノロンの一種である WQ-3810、並びに、その類似化合物である WQ-3334 及び WQ-4065 を対象として、第 I 章と同様の方法で QnrB19 のこれらの化合物に対する耐性形質付与への関与について検証した。Pachanon 氏は、試験管内 DNA スーパーコイル化試験の結果より、WQ-3810 及び WQ-3334 が、ノルフロキサシン及びシプロフロキサシンに比べて 10 から 20 倍高い DNA ジャイレース阻害活性を有することを明らかにした。一方、WQ-4065 の DNA ジャイレース阻害活性は WQ-3810 及び WQ-3334 に比べて 1/10 から 1/20 り、1 位の置換基における 6-amino の構造が WQ-3810 及び WQ-3334 の高い活性に重要であることを明らかにした。また、QnrB19 は、WQ-3810、WQ-3334 及び WQ-4065 の全てに対して同等の耐性化をもたらすことも明らかにした。第一章の結果と併せて考えると、QnrB19 による耐性形質付与に 7 位の置換基が関わっている事が推察された。さらに Pachanon 氏は、QnrB19 存在下のそれぞれの化合物の IC₅₀ (DNA ジャイレース活性を 50%阻害するキノロンの濃度) 測定の結果から、ネズミチフス菌に対する最小阻止濃度を推定し、WQ-3810 及び WQ-3334 が QnrB19 により耐性化したネズミチフス菌にも有効である可能性を示した。

Pachanon 氏は、本学位論文を通じて、ネズミチフス菌から最も高頻度に見出される QnrB19 がオールドキノロンには耐性形質を付与しないがニューキノロンには耐性形質を付与する事を明らかにした。また、この現象には、ニューキノロンの 7 位の置換基の構造が関わっている可能性も示した。さらに、2 種の新規キノロン (WQ-3810 及び WQ-3334) が、QnrB19 により既存のキノロンに耐性化したネズミチフス菌による感染症に対しても有効である可能性も示した。本学位論文により示された情報は、ネズミチフス菌のキノロン耐性化への QnrB19 の関与を明らかにするものであり、また、QnrB19 によりキノロン耐性化したネズミチフス菌感染症の効果的な治療法確立に貢献することも期待された。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Pachanon Ruttana 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。