

審査の結果の要旨

氏名 原田 壮平

本研究は広域セファロスポリン耐性を呈する *Proteus mirabilis* 臨床分離株 TUM4660 が Integrating conjugative element (ICE) を保有していたことを示し、同定された新規 ICE である ICEPmiJpn1 の性質を明らかにしたものであり、下記の結果を得ている。

1. 微量液体希釈法による抗菌薬感受性試験により *P. mirabilis* TUM4660 がセフトキシム、セフトジジム、セフォキシチンに対する感受性が低下していることを確認し、さらに 3-aminophenylboronic acid の添加によりセフトジジムに対する感受性が改善することから AmpC ベータラクタマーゼの産生を推測した。*Citrobacter freundii* の染色体性 *ampC* 由来の獲得性 *ampC* の全長を増幅するように設計されたプライマーペアを用いた PCR とその増幅産物の塩基配列決定により TUM4660 が *bla_{CMY-2}* を保有していることを示した。
2. TUM4660 を供与菌、リファンピシン耐性の *Escherichia coli* ML4903 を受容菌とした接合伝達実験により、接合完了体 *E. coli* TUM4670 を得て、TUM4660 の *bla_{CMY-2}* が可動性遺伝因子上に存在していることを示した。TUM4660、ML4903、TUM4670 の全ゲノム DNA を制限酵素 I-CeuI で切断した断片を用いたサザンハイブリダイゼーションにより、TUM4660 の *bla_{CMY-2}* を含む遺伝因子は染色体上に存在し、接合伝達により受容菌の染色体へと組み込まれることを示した。
3. TUM4660 および TUM4670 の全ゲノム DNA を鋳型とし、SXT/R391-related ICE の染色体への組込みがある時にのみ増幅が得られるように設計されたプライマーペアを用いた PCR により TUM4660、TUM4670 の染色体上に SXT/R391-related ICE が存在していることを示した。また、SXT/R391-related ICE の *int* 特異的 DNA プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによりこの ICE が *bla_{CMY-2}* と関連していることを示し、これを ICEPmiJpn1 と命名した。
4. ICEPmiJpn1 を染色体上に組み込んだ *E. coli* TUM4670、*E. coli* TUM4672 を供与菌とした接合伝達実験により *E. coli* を供与菌とした場合には *P. mirabilis* TUM4660 を供与菌とした場合と比してより高い伝達頻度がみられることを確認した。また、*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Citrobacter koseri* を受容菌とした接合伝達実験によりこれらの菌種にも ICEPmiJpn1 の伝達が可能なことを示した。
5. Real-time quantitative PCR により *E. coli* の細胞内での ICEPmiJpn1 の染色体からの切り出しの頻度は *P. mirabilis* の細胞内と比較して高いことを確認した。
6. SXT/R391-related ICE の間で保存されている塩基配列を基に設計されたプライマーを用

いた PCR およびその増幅産物の塩基配列決定により ICE*PmiJpn1* の可変部位の塩基配列を決定した。ICE*PmiJpn1* の遺伝子構造は全体としては R391 のそれと高い相同性を有していた一方で、

- (1) 両端に *IS10* を有し内部に *bla*_{CMY-2} を有する混成トランスポゾンの挿入を認めること
 - (2) 4 箇所の Hotspot の塩基配列のうち 1 箇所は SXT^{MO10} と相同性が高く、他の 1 箇所はこれまでに報告された SXT/R391-related ICE には認められない独自の配列であること
- といった R391 との差異も認められた。

以上、本論文は *P. mirabilis* 臨床分離株が保有していた *bla*_{CMY-2} を含む ICE である ICE*PmiJpn1* を同定し、その特徴を明らかにした。宿主菌に広域セファロスポリン耐性を付与する ICE の報告はこれまでになく、本研究は腸内細菌科の耐性遺伝子伝播の機序の理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。