

学位論文の内容の要旨

氏 名

谷山 多美子

論文題目 L-histidine augments the oxidative damage against Gram-negative bacteria by hydrogen peroxide

(論文要旨)

【目的】

多剤耐性*Acinetobacter baumannii*やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌など、グラム陰性桿菌の多剤耐性化が世界的に大きな問題となっている。新たな抗菌物質の開発には多大な経費と時間が必要であるため、既存の抗菌物質の作用を相乗的に増強し、細菌の耐性メカニズムを回避する試みが行われている。近年、比較的人体に安全なH₂O₂を蒸気化して噴霧し、病室消毒する自動化装置が導入され始めている。しかしながら、H₂O₂の反応速度は比較的緩徐であり、広い空間の消毒には数時間を要する。H₂O₂の反応性を高める手法の開発は、本薬剤を使用した環境消毒法の改良に多大な情報を与える。細菌は活性酸素種等によるDNA損傷を修復するRecAシステムを有する。我々は、*recA*遺伝子を欠損する大腸菌を1% L-histidine含有培地で好氣的に培養すると、その増殖が抑制されることを見出した。本研究では、L-histidineがH₂O₂の各種細菌に対する殺菌効果を増強するか否かを調べた。

【方法】

1. 大腸菌の標準株 (MG1655) および*recA*遺伝子欠損株 (JM101およびDH5 α) を1% L-histidineを含有または含有しないLB培地で好気または嫌気培養し、その増殖を比較した。
2. 大腸菌MG1655株を10 mM H₂O₂もしくは10 mM H₂O₂と1% L-histidineに暴露後、*recA*遺伝子の発現をreal-time PCRで比較した。
3. 大腸菌MG1655株を1% L-histidine 存在下もしくは非存在下でH₂O₂ (1, 10, 100 mM) に暴露し、染色体DNAの損傷度をパルスフィールドゲル電気泳動により比較した。
4. 大腸菌MG1655株を10 mM H₂O₂もしくは10 mM H₂O₂と1% L-histidineに暴露後、菌体内での活性酸素種 (ROS) の発生量をOxiSelect 細胞内ROS測定アッセイキットを用いて定量した。
5. 大腸菌MG1655株を1% L-histidine 存在下で100 mM H₂O₂に暴露した際、細胞内で生じるROSを電子スピン共鳴法 (ESR) で同定した。
6. 1% L-histidine 存在下もしくは非存在下でのH₂O₂の各種薬剤耐性菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP)およびextended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL)) に対する殺菌作用を比較した。

【結果】

1. 大腸菌の標準株 (MG1655) は1% L-histidineの添加に関わらず好気培養、嫌気培養ともに増殖した。一方、*recA*欠損大腸菌株は好気条件下における増殖が1% L-histidineの添加により抑制された。しかしながら、この抑制作用は嫌気条件下では認められなかった。
2. 大腸菌の標準株 (MG1655) を1% L-histidine存在下で10 mM H₂O₂に暴露すると、10 mM H₂O₂単独暴露に比較して、*recA*遺伝子の発現量が約7倍増加した。

3. 大腸菌MG1655株を1% L-histidine 存在下でH₂O₂に暴露すると、H₂O₂単独暴露に比較して染色体DNAの細断化がより顕著となった。
4. 大腸菌MG1655株を1% L-histidine 存在下でH₂O₂に暴露すると、H₂O₂単独暴露に比較して菌体内でのROS生成量が有意に増加した。
5. ESR解析の結果、1% L-histidineとH₂O₂処理によってhydroxy radical (OH·) が大腸菌内で発生することが明らかとなった。
6. 1% L-histidineとH₂O₂の併用により、グラム陽性菌 (MRSAおよびVRE) に対する殺菌効果は増強しなかったが、グラム陰性桿菌 (MDRPおよびESBL) に対する殺菌効果が増強された。

【考察】

本研究では、H₂O₂の殺菌効果に対するL-histidineの効果調べ、L-histidineがH₂O₂のグラム陰性桿菌に対する殺菌作用を増強することを明らかにした。この増強効果は菌体内でのFenton様反応によって生ずるhydroxy radical (OH·) の発生量の増加によりもたらされることを示した。L-histidineはグラム陰性桿菌においてH₂O₂もしくは金属イオンの菌体内への取り込みを促進することが示唆された。本研究成果は、グラム陰性桿菌を選択的に殺滅する手法の開発に多大な情報を与えるものとする。

掲 載 誌 名	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE			第 41 卷, 第 5 号
(公表予定) 掲 載 年 月	2018 年 5 月	出版社 (等) 名	Spandidos Publications	
Peer Review	(有)		・	無

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。