

平成13年度分担研究報告書

アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便検出法に関する研究

分担研究者 堀田国元 国立感染症研究所生物活性物質部
研究協力者 土崎尚史、斎藤文子、石野敬子、石川淳 国立感染症研究所生物活性物質部

MRSAにおいて知られている*mecA*遺伝子と5種のアミノグリコシド修飾酵素(AME)遺伝子 [*aad(4', 4'')*, *aad(9)*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')*および*aad(6)*] の迅速簡便な同時検出法の確立を目指して研究を行い、以下の成果を得た。

1. 上記6種の遺伝子のPCR増幅断片を一度に識別できるプライマー設定を行ない、それらのプライマーすべてを添加した条件で各MRSA菌株のAME遺伝子プロファイルを一度に明らかにできるMultiplex Colony Direct PCR系を確立した。
2. その結果、多数菌株の遺伝子プロファイルの迅速簡便な解析が可能となり、MRSA230株（50株は80年代、180株は90年代後半）のAME遺伝子に加えて、AG(アミノグリコシド)耐性とコアグラーゼ遺伝子多型(*AluI*-RFLP)を調べた結果、以下の関係が明らかになった。
 - 1) *aad(4', 4'')*は頻度が高く（80年代52%、90年代92%）、4'-OHをもつAG (KM, AMK, ISP) およびDKB (4''-OH) に対する耐性と相関した。
 - 2) *aac(6)/aph(2'')*も頻度が高く（80年代70%、90年代46%）、GMおよびSISO耐性との間にほぼ完全な相関性（NTL耐性ともかなり相関）が認められた。
 - 3) ABK耐性は例外的で、90年代の菌株でも上記2種を保持する菌株（80年代30%、90年代42%）の一部に限られ（中等度以下の耐性で、10%未満）、未知の因子の関与が考えられた。
 - 4) *aph(3')*は頻度が低く（80年代8%、90年代1%）、顕著な低下傾向が認められた。また、特異的にSM耐性を付与する*aad(6)*と共存することが認められた。
 - 5) *aad(9)*は、高頻度（80年代74%；90年代96%）に検出され、SPCMに特異的に耐性を与えた。
 - 6) 1菌株当たり最多様のプロファイルは、*aad(4', 4'')*を除く4種のAME遺伝子であった。
 - 7) コアグラーゼ遺伝子多型に関して、80年代菌株ではL21, L31およびM22の3型がメジャー（36, 34, 22%）であったが、90年代菌株ではL21型が支配的（93%）で明瞭な変化があった。
 - 8) 80年代のABK耐性菌株はすべてM22型のもので、90年代菌株ではM22すべてとL21型のごく一部に認められた。今後、L21型菌株のABK耐性化に注意すべきと思われる。
 - 9) SCC*mec*に関連するAME遺伝子である*aad(4', 4'')*と*aad(9)*についてみると、L21型菌株は両方、L31型は*aad(9)*のみ、M22型は*aad(4', 4'')*のみという特徴が認められた。

A. 目的

平成12年度研究で確立したコロニーダイレクトPCR法¹⁾により、MRSAで知られている5種（すべて）のアミノグリコシド修飾酵素(AME)遺伝子を*mecA*遺伝子とともに一度に検出できる系を確立する。

その系を用いて、80年代と90年代後半に臨床分離されたMRSA約230株のAME遺伝子プロファイルとAG耐性を調べ、AG耐性のレファレンス因子を特定する。

また、コアグラーゼ遺伝子に関しても、多型解析を行ない、AME遺伝子プロファイルとの相関性を調べる。

B. 研究方法

1) AME遺伝子のMultiplex Colony Direct PCR
aad(4', 4''), *aad(9)*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-III* および*aad(6)* の5種のAME遺伝子、*mecA*およびコアグラーゼ遺伝子を標的（図1）として、表1のプライマー設定し、表2の反応液組成を用いた。この反応液20 μ lに滅菌爪楊枝の先端を用いて極微量の細胞をコロニーより添加し、95 $^{\circ}$ C, 3分 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 30秒 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C, 30秒 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 1分) \times 30回 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 3分の条件でPCRを行った。

2) コアグララーゼ遺伝子多型の*AluI*-RFLPによる解析

コアグララーゼ遺伝子 (*coa*) については、平成12年度研究を基に、N末端付近の繰り返し領域を標的としてコロニーダイレクトPCRにより増幅後*AluI*切断し、その電気泳動パターンによって多型解析(RFLP)を行った。

3) AG耐性

AG耐性は、最高濃度を100 μ g/mlとして希釈寒天平板法により調べた。Kanamycin系4種(KM, DKB, AMK, ABK)とGentamicin系4種(GM, SISO, NTL, ISP)について常時調べ、必要に応じてSMやSPCMについても調べた。

C. 結果

1. Multiplex colony direct PCRによる標的遺伝子の検出

図2は、予め遺伝子プロフィールがわかっている菌株を用いて6種の標的遺伝子(*mecA*とAME遺伝子5種)のプライマーすべてを添加したときのcolony direct PCRによる標的断片の増幅結果を示している。試験した菌株において増幅した遺伝子プロフィールは、既知の情報と一致した。

一方、図3は上記の条件で6種の標的遺伝子すべてが増幅するかどうかを見ることを兼ねて、陽性対照(P)として図2の②と⑧のレーンの2菌株の細胞を同じPCR反応液に添加してPCRを行ったときの結果を示している。図の①と⑥のレーンが6種の増幅バンドが得られる予定のレーンであったが、⑥レーンでは6種の標的遺伝子断片がクリアに増幅したのに対して、①レーンでは4種の増幅バンドしか認められなかった。

陽性対照の標的遺伝子増幅が不安定であった要因を調べた結果、*aad(6)*のプライマーを添加すると原因不明であるが不安定化することが認められた(データ示さず)。但し、現実的に5種のAME遺伝子すべてをもつ菌株はないので、6種すべてのプライマー添加条件で上記遺伝子プロフィールの調査は可能と判断された。

2. 1980年代および1990年代後半の臨床分離MRSA菌株

におけるAME遺伝子とAG耐性あるいはコアグララーゼ遺伝子との間の相関関係(表3および表4)

臨床分離された1980年代の50菌株と1990年代後半の180菌株について、AME遺伝子プロフィールに加えてAG耐性とコアグララーゼ遺伝子多型を調べた結果、以下のことが明らかになった。

1) *aad(4', 4'')*とAG耐性

*aad(4', 4'')*を保持する菌株の頻度は高く(80年代52%、90年代92%)、この遺伝子を単独でもつ菌株のAG耐性プロフィールから、この遺伝子は4'-OHをもつAG(KM, AMK, ISP)およびDKB(4''-OH)に対する耐性と相関した。

2) *aac(6)/aph(2'')*とAG耐性

*aac(6)/aph(2'')*の検出頻度も高く(80年代70%、90年代46%)、この遺伝子を保持している菌株は、ほぼ例外なくGMおよびSISOに耐性であった。NTL耐性ともかなり相関が認められた。

その他、*aad(4', 4'')*が耐性を付与するAGに対して耐性を付与することが明らかになったが、ISPに関しては比較的頻度が低く低レベルの耐性しか示さないことが認められた。

例外的であったのはABK耐性で、90年代の菌株でも上記2種の遺伝子を保持する菌株(80年代30%、90年代42%)のごく一部に限られ(中等度以下で、10%未満)、耐性化の進行は認められなかった。上記2種の遺伝子を持つ菌株はABK以外のAGに対して耐性を示した。

3) *aph(3')*とAG耐性

*aph(3')*を持つ菌株は頻度が低く、80年代8%、90年代1%と顕著な低下傾向が認められた。また、特異的にSM耐性を付与する*aad(6)*と共存することが認められた。

4) *aad(9)*とAG耐性

*aad(9)*は、高頻度(80年代74%；90年代96%)に検出され、SPCMに特異的に耐性を与えた。

5) 1菌株あたり最も多くのAME遺伝子が認められたのは、*aad(4', 4'')*を除く4種のAME遺伝子プロフィールであった。

6) コアグララーゼ遺伝子多型とAG耐性

コアグララーゼ遺伝子多型(*AluI*-RFLP)に関して、80年代菌株ではL21, L31およびM22とコードした3つの型がメジャー(順に36%, 34%, 22%)であったが、90年代菌株ではL21型が支配的(93%)で、それ以外はすべてマイナー化しており、年代間で明瞭な変化が認められた。

コアグララーゼ遺伝子多型とAG耐性との相関性を調べたところ、80年代のABK耐性菌株はすべてM22型のもので、90年代菌株ではM22すべてとL21型のごく一部に認められた。それ以外の*AluI*-RFLP型のMRSA菌株でABK耐性は認められなかった。今後、L21型菌株のABK耐性化に注意すべきと思われる。

7) コアグララーゼ遺伝子多型とSCC*mec*関連AME遺伝子の関係

コアグララーゼ遺伝子多型とSCC*mec*関連AME遺伝子である*aad(4', 4'')*および*aad(9)*との関連性について調べたところ、L21型菌株は両方、L31型は*aad(9)*のみ、M22型は*aad(4', 4'')*のみという特徴が認められた。

D. 考察

1. Multiplex Colony PCR

MRSAの*mecA*遺伝子とすべてのAME遺伝子プロフィールを一度に検査できるcolony direct PCRを確立することができた。AME遺伝子以外にも、コアグララーゼ遺伝

子多型解析や毒素遺伝子プロファイルのなどの解析のためにMultiplex colony direct PCRを活用することができる。従って、今年度の研究で確立した系は、多数の菌株の多様な標的遺伝子プロファイルを短時間のうちに解析する上で有用かつ有効な方法と判断される。

今後の課題としては、精度を考慮する必要があると思われる。解析した230株には、これまでMRSAにおいて報告されているすべてのAME遺伝子を保持するものが見つからなかったため、特に問題はなかった。しかしながら、すべてのAME遺伝子をもつことを想定して2つの菌株のコロニーから細胞を1つの反応液に添加してPCRを行ったところ、6種の標的遺伝子がすべて検出できたケースとできなかったケースが認められた(図3)。その後、種々検討した結果、原因は不明であるがaad(6)のプライマーを除くと比較的安定した結果が得られることが認められた。しかしながら、同じ反応液に細胞の添加を2度行うので、細胞の添加量の増大が原因である可能性も考えられた。

このような精度上解決すべきことは残っているが、陽性対照に問題がでたときには容易にやり直しができることもColony Direct PCRの利点の一つである。

2. AG耐性のレファレンス因子の特定について

230株の解析の結果、AME遺伝子の存在とAG耐性の間に以下の密接な相関が認められ、レファレンス因子として特定できると判断された。すなわち、aad(4', 4'')を単独で保持する菌株は、4'-OHをもつAG(KM, AMKおよびISP)と4''-OHをもつDKBの4種のAGに耐性を示す。また、aac(6'')/aph(2'')は単独でGMとSISOに耐性を付与する。従って、これら2種の遺伝子は、AG耐性のレファレンス因子として特定できる。

問題はABK耐性のレファレンス因子である。ABKはその構造上、MRSAにおいて知られているAME遺伝子の中ではGMと同じくaac(6'')/aph(2'')によってのみ修飾を受けることがわかっているが、この遺伝子を単独でもっている菌株中にはABK耐性は認められなかった。ABK耐性が認められたのは、aac(6'')/aph(2'')とaad(4', 4'')の両遺伝子をもつ菌株の中の限られたものだけであった。その中で、コアグララーゼ遺伝子型がM22のMRSA菌株の殆どがABK耐性である(表3)が、L21型の菌株は90年代の菌株の中の一部がABK耐性を示したに過ぎない。このことから、ABK耐性となるには、aac(6'')/aph(2'')は必要因子であるが、それだけでは不十分で、未知の因子が関与していることが示唆された。したがって、ABK耐性に必要十分な因子を特定することが今後の課題として残されている。

一方、aph(3')に関しては、それを持つ菌株の頻度は少ないが、aad(6)と共存することが認められた。このことは、MRSAのゲノム解析情報からも裏付けられる。

aph(3')とaad(6)を持つ菌株は特異的にSM耐性を示すが、これはaad(6)によるリン酸化によるものであるため、aad(6)はSM耐性のレファレンス因子と判定できる。さらに、aad(6)と共存するaph(3')もSM耐性の指標因子として扱っても良いのではないと思われる。

なお、aac(6'')/aph(2'')がなくてもGM耐性を示す菌株があり、耐性因子の解明は今後に残された課題である。

3. MRSAにおけるAG耐性化の傾向について

80年代と90年代後半に臨床分離されたMRSAのAME遺伝子プロファイルとAG耐性およびコアグララーゼRFLP型を重ね合わせるにより、AG耐性(特にABK耐性)の傾向が浮き彫りになった。ABK耐性はaac(6'')/aph(2'')とaad(4', 4'')の両遺伝子をもつ菌株の一部にしか認められないが、両遺伝子をもつ菌株の率は増加傾向にあるにもかかわらず、ABK耐性菌の率はむしろ減少傾向が見られた(表4)。そこで、ABK耐性とコアグララーゼ遺伝子のRFLP型との関係を見ると、ABK耐性菌は80年代の菌株ではM22型の菌株に集中していたが、90年代の菌株ではマイナー化してしまったM22型の菌株と唯一のメジャー型のL21型菌株のごく一部に限られたいることがわかった。このことは、日本中の医療施設においてこの10年間にM22型とL31型の菌株をマイナー化し、L21を支配的にするメカニズムが存在することを強く示唆していると考えられるが、結果論的にはABK耐性化を抑制する大きな要因として働いているものと考えられる。しかし、L21型菌株に絞ると増加傾向にあるということができ、今後その推移を注目していくことが必要であろう。

E. 結論

1. MRSAのAGE遺伝子プロファイルを一度に識別増幅できるMultiplex colony direct PCRを確立した。
2. この方法は他の遺伝子の検出にも適用でき、数多くのMRSA菌株の遺伝子プロファイルを迅速簡便に明らかにできる有用性が高い方法である。
3. 230株のMRSAのAME遺伝子プロファイルとAG耐性の関係解析により、aad(4', 4'')はKM, DKB, AMKおよびISP耐性、aac(6'')/aph(2'')はGMとSISO耐性のレファレンス因子と特定した。ABK耐性には、aac(6'')/aph(2'')が必要因子ではあるが必要十分因子ではなく、未知の因子の関与が示唆された。
4. また、ABK耐性と特定のコアグララーゼ遺伝子多型(特にM22型)との密接な相関性が認められた。
5. aph(3')とaad(6)は出現率は低いながらも常に共存し、SM耐性のレファレンス因子と判断された。
6. コアグララーゼ多型に関して、80年代の菌株ではL21、L31、M22の3種がメジャーであったが、90年代はL21によって支配されるという変化が認められた。

参考文献

- 1) Tsuchizaki N, Ishikawa J and Hotta K.: Jpn. J. Antibiot. 53(6): 422-429 (2000).
- 2) 堀田国元: 本プロジェクト平成13年度分担研究報告書
- 3) Kuroda, M. et al.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 357: 1225-1240(2001).

F. 健康危険情報: なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Tsuchizaki, M. Hamada and K. Hotta: Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity on *Streptomyces* of kan gene encoding a specific aminoglycoside-3-N-acetyltransferase. Actinomycetologica 15: 23-29, 2001.

2. 学会発表

- 1) 堀田国元、土崎尚史、荒川宜親: MRSAの薬剤耐性遺伝子プロファイルとコアグラーゼ遺伝子多型のコロニーPCRによる解析. 第49回日本化学療法学会総会、2001年5月、横浜.
- 2) 石野敬子、堀田国元: MRSAのABK耐性化はなぜ進行しないか: 耐性因子aac(6')/aph(2'')のMSSAへのクローン化による検討. 第49回日本化学療法学会総会、2001年5月、横浜.
- 3) 土崎尚史、石川淳、浜田雅、堀田国元: 放線菌におけるアミノグリコシド耐性遺伝子の分布特性. 2001年度日本放線菌学会大会、2001年6月、大阪.
- 4) K. Hotta, N. Tsuchizaki & J. Ishikawa: Rapid checking by colony PCR of the distribution of specific antibiotic resistance genes in actinomycetes. 12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 2001年8月、バンクーバー (カナダ).

謝辞: 菌株の提供下さった池康嘉(群馬大学医学部)、荒川宜親(国立感染症研究所)、和田昭仁(国立感染症研究所)ならびに浜田雅(微生物化学研究所)の4先生に感謝いたします。

表1. 標的遺伝子とPCRプライマー

標的遺伝子	遺伝子産物	プライマー	PCR産物
<i>mecA</i>	PBP2'	Forward: 5'-TGTCGGTAACCTGAATCAGC-3' Reverse: 5'-TGCTATCCACCCCAAACAG-3'	519 bp
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	AAC(6')/APH(2'')	Forward: 5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG-3' Reverse: 5'-CATTTGTGGCATTATCATCATC-3'	407
<i>aph(3')-III</i>	APH(3')-III	Forward: 5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' Reverse: 5'-TCATACTCTTCCGAGCAAAGG-3'	269
<i>aad(6)</i>	AAD(6)	Forward: 5'-CTTTAGCAGAACAGGATGAAC-3' Reverse: 5'-AGGCATAATGAAGCCTTTCC-3'	750
<i>aad(4',4'')</i>	AAD(4',4'')	Forward: 5'-CTGCTAAATCGGTAGAAGC-3' Reverse: 5'-CAGACCAATCAACATGGCACC-3'	174
<i>aad(9)</i>	AAD(9)	Forward: 5'-CAAGAAAAGTTCTCGTTCGG-3' Reverse: 5'-TCCTTCCCACATTATCATCAC-3'	1000
<i>coa</i>	Coagulase	Forward: 5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3' Reverse: 5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3'	多様

表2. PCR条件

構成成分	終濃度	耐性遺伝子 増幅液	coa遺伝子 増幅液
10x PCR Buffer	1 x	+	+
dNTPs	各0.2mM	+	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM	+	+
DNA polymerase (KOD-Plus)	0.4U	+	+
Primers			
mecA F & R	各0.2 μM	+	-
aac(6'')/aph(6'') F & R	各0.5 μM	+	-
aph(3'')-III F & R	各0.2 μM	+	-
aad(6) F & R	各0.2 μM	+	-
aad(4',4'') F & R	各0.2 μM	+	-
aad(9) F & R	各0.2 μM	+	-
coa F & R	各0.2 μM	-	+
反応液量		20 μl	20 μl
反応条件: 95°C, 3分 → (95°C, 30秒 → 50°C, 30秒 → 72°C, 1分) × 30			

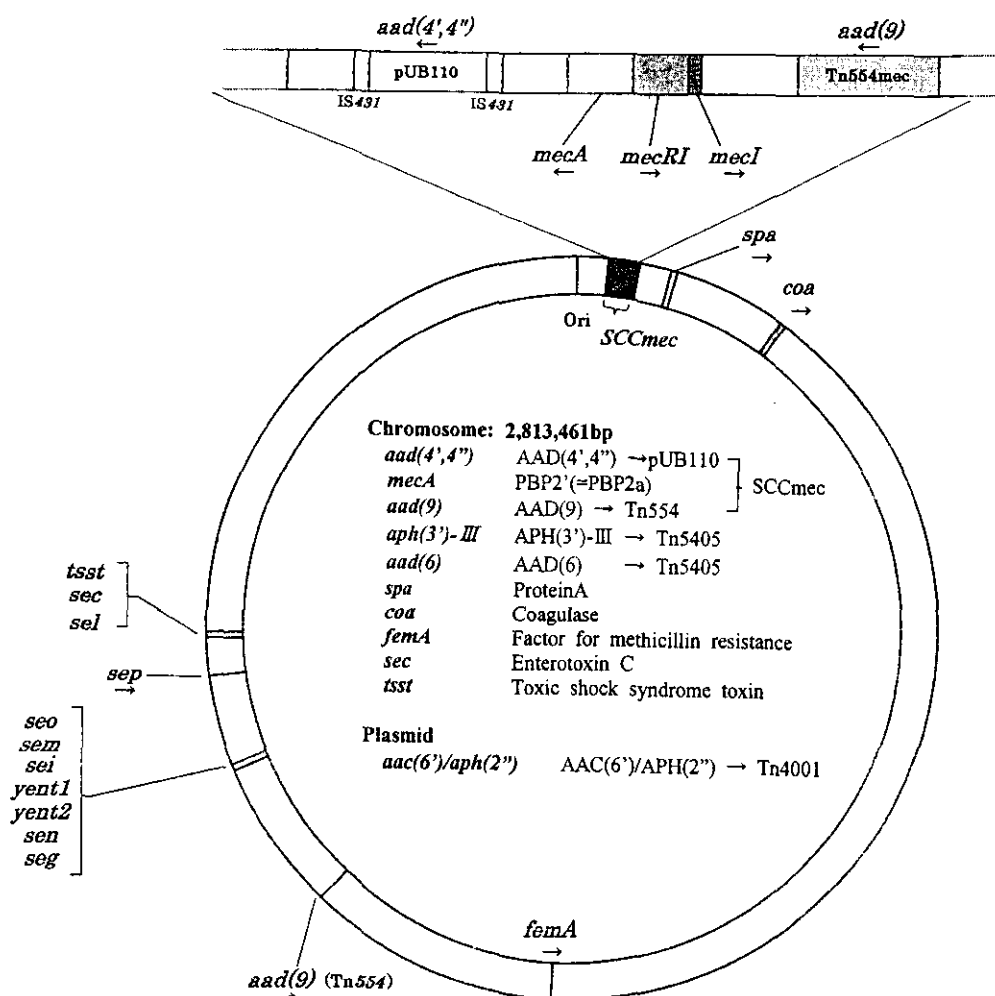
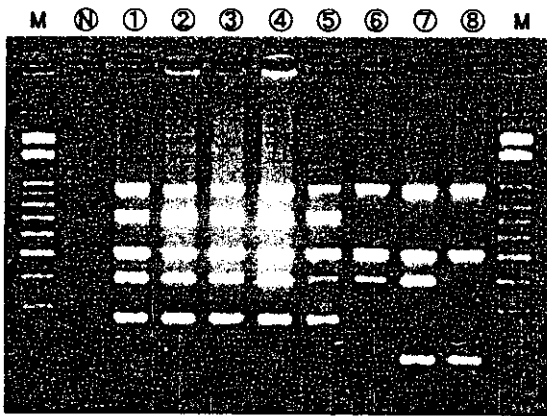


図1. MRSAにおける検出標的遺伝子の位置



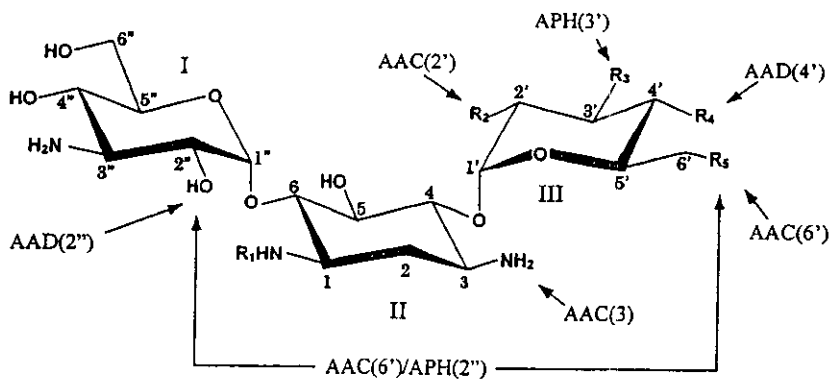
▲ *aad(9)*
 ▲ *aad(6)*
 ▲ *mecA*
 ▲ *aac(6'')/aph(2'')*
 ▲ *aph(3')-III*
 ▲ *aad(4',4'')*



▲ *aad(9)*
 ▲ *aad(6)*
 ▲ *mecA*
 ▲ *aac(6'')/aph(2'')*
 ▲ *aph(3')-III*
 ▲ *aad(4',4'')*

図2. 6種のプライマーを用いたColony Direct PCR

図3. Colony Direct PCRによる6種遺伝子の検出



Kanamycin- and Gentamicin- group AGs

MRSA における 既知 AG 修飾酵素	ABK		GM		ISP	
	修飾	耐性	修飾	耐性	修飾	耐性
APH(3')	なし	なし	なし	なし	あり	中度
AAD(4',4'')	なし	なし	なし	なし	あり	中度
AAC(6'')/APH(2'')	あり	低~中度	あり	高度	あり	中度
AAD(9)	なし	なし	なし	なし	なし	なし
AAD(6)	なし	なし	なし	なし	なし	なし
1-N-AHB	あり		なし		あり	
3'-OH と 4'-OH	なし		なし		あり	

図5. 既知アミノグリコシド修飾酵素の作用部位

表3. MRSA(*mecA*+)菌株におけるAG修飾酵素遺伝子プロフィール・コアグラーゼRFLP型・AG耐性

菌株	SCGmec		Tn5405		plasmid	<i>coa</i>			AG-耐性($\geq 6 \mu\text{g/ml}$)							
	<i>aad4'</i> / <i>aad9</i>	pUB110/Tn554	<i>aph3'</i>	<i>aad6</i>	<i>aac6'</i> / <i>aph2''</i>	Alu-RFLP			KM系				GM系			
					Tn4001	L21	L31	M22	KM	DK	AMK	ABK	GM	SISO	ISP	NTL
1980年代	+/+	19:	0	0	7	19	0	0	19	18	19	0	7	7	19	7
50株	-/+	19:	3	3	19	0	17	0	19	18	16	0	19	16	6	15
	+/-	9:	0	0	9	0	0	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	-/-	3:	0	0	3	0	0	2	3	3	3	1	3	3	2	3
		50	3	3	38	19	17	11	50	48	47	10	38	35	36	34
1990年代	+/+	160	0	0	70	157	2	0	157	151	157	9	70	70	154	56
180株	-/+	13:	2	2	7	7	3	0	7	7	5	1	7	6	1	1
	+/-	5:	0	0	3	2	0	3	5	5	3	3	3	3	3	3
	-/-	2:	0	0	2	0	0	2	2	2	2	0	2	2	0	2
		180:	2	2	82	166	5	5	171	165	167	13	82	81	158	62

表4. MRSAのAME遺伝子プロフィール、コアグラーゼ遺伝子RFLP型およびAG耐性

パラメーター	80年代 (50株)	90年代 (180株)	備考
AME遺伝子プロフィール			
1) <i>aad(4',4'')</i> のみ	22%	53%	KM, DKB, AMK及びISP
2) <i>aad(4',4'')</i> + <i>aac(6')/aph(2'')</i>	30%	42%	ABK(一部耐性)除くすべてに耐性
3) <i>aac(6')/aph(2'')</i> のみ	40%	4%	ABK・ISP(一部耐性)除くすべて
4) <i>aac(2')/aph(2'')</i> + <i>aph(3')</i>	8%	1%	同上およびSM
5) <i>aad(9)</i>	74%	96%	SPCMに特異的に耐性
コアグラーゼ遺伝子RFLP型(SCGmec関連AME)			
1) L21 (<i>aad4'/4''</i> + <i>aad9</i>)	38%	93%	90年代菌株の一部にABK耐性
2) L31 (<i>aad9</i> のみ)	34%	3%	ABK耐性なし
3) M22 (<i>aad4'/4''</i> のみ)	22%	3%	80年代も90年代にもABK耐性
4) その他	8%	2%	ABK耐性なし
AG耐性($\geq 6 \mu\text{g/ml}$)			
1) KM(Kanamycin)	100%	97%	殆どが $\geq 100 \mu\text{g/ml}$
2) DKB(Dibekacin)	96%	94%	二機能酵素ないと低耐性($6 \mu\text{g/ml}$)
3) AMK(Amikacin)	94%	93%	耐性レベル: 低~高に分散
4) ABK(Arbekacin)	20%	7%	殆ど ≤ 12.5
5) GM(Gentamicin)	76%	45%	感性(≤ 3)と耐性(≥ 50)の二峰性
6) SISO(Sisomicin)	70%	61%	GMと同じ傾向、二機能酵素と高相関
7) NTL(Netilmicin)	68%	55%	GM・SISOより耐性レベル低い
8) ISP(Isepamicin)	72%	90%	<i>aad4'/4''</i> と高相関、殆ど $\leq 50 \mu\text{g/ml}$

臨床分離緑膿菌由来多剤排出システムの基質認識バリエーションと 基質認識機構の解析

分担研究者: 後藤 直正; 研究協力者: 佐藤 剛章、諏訪雅宣、村田 健、西野 武志
京都薬科大学・微生物学教室

グラム陰性菌に広く分布するマルチコンポーネント型多剤排出システムの基質認識はその構成成分である RND タンパク質によって担われている。この基質認識(選別)の機構を調べるために、臨床分離株から MexB および MexD 遺伝子をクローン化し、基質認識変異体の検索を行ったところ、MexD で目的とするクローンを得た。このクローンの塩基配列の決定およびアミノ酸変異の同定、さらにはキメラタンパク質の作成および部位特異的変異導入により基質認識に寄与するアミノ酸残基の同定を行った。その結果、MexD タンパク質の二次構造から予測されるペリプラスムループの機能および機能ドメインを推測させる結果を得た。

A. 研究目的

日和見感染症の原因菌の 1 つである *Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)は、種々の抗菌薬や消毒薬に対し高度な自然耐性を示す。その原因の 1 つに、基質認識の本体である RND (resistance· nodulation· cell division)、外膜タンパク質 OEP (outer-membrane efflux protein) および 2 つをリンクする MFP (membrane fusion protein)の 3つのコンポーネントで構成されたマルチコンポーネント型多剤排出システムによる細胞外への抗菌薬の排出が挙げられる。ゲノム解析の結果から、本菌の染色体は少なくともこれと同様の 10 種のホモログシステムをコードしていると推定されている。その中の 1 つである MexC·MexD·OprJ システムは、第 4 世代 cephem 薬、quinolone 薬、chloramphenicol や macrolide 薬などを排出し、広域交差耐性を与えるが、その排出基質の認識機構は未だ不明である。私どもの研究室では、臨床分離株を材料

に、MexD の基質認識変異体の検索を行い、実験室株由来の MexD の排出基質ではない carbenicillin を排出するようになった基質認識変異体をすでにクローン化している。今回著者は、この変異 MexD を解析し、基質認識に関与する機能性アミノ酸残基の同定を行った。

B. 研究材料と方法

PAO1 株の PCR により臨床分離緑膿菌計 43 株から *mexB* および *mexD* 遺伝子を増幅し、*E. coli* *P. aeruginosa* shuttle vector の *lacI^q-P_{tac}* 下流に挿入した。こうして作成した *mexB* 発現プラスミドを用いて KG4509 (MexA⁺ OprM⁺; *mexR*::*omagaSm* Δ *mexB* Δ (*nfxB-mexCD-oprJ*) *mexXY*) の形質転換を、また *mexD* 発現プラスミドを用いて KG4501 [MexC⁺ OprJ⁺; *mexR*::*omagaSm* Δ (*mexAB-oprM*) Δ *mexD*] を形質転換した。その後、抗 His-tag 抗体を用いた Western immunoblot により *mexB* および *mexD* の発現が確認できた株の

抗菌薬感受性を調べた。また、部位特異的変異導入法やPCR および DNA 塩基配列決定法など

の組換え DNA 技術により基質特異性に寄与するアミノ酸残基を同定した。

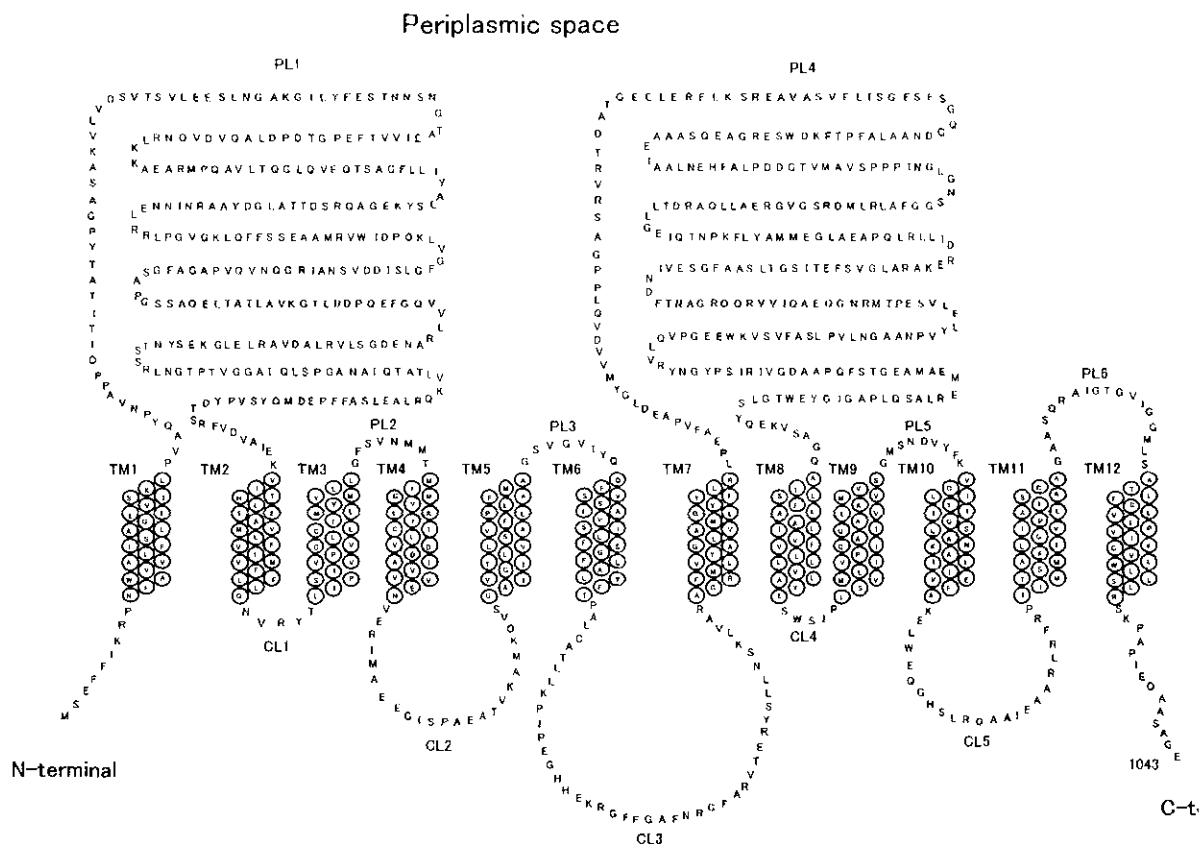


図. MexD の推定 2 次構造モデルと基質特異性に影響するアミノ酸残基

MexD の基質特異性に影響を及ぼす、281 位と 613 位のアミノ酸残基(□; 臨床分離株由来 MexD 変異体から同定)および 292 位と 328 位のアミノ酸変異残基(◇; カルベニシリン耐性 MexD 変異体から同定)の存在位置を、MexD の推定 2 次構造モデル上に示した。これら 4 カ所の変異は RND に特徴的な 2 つの大きなペリプラスムループ PL1, PL4 上に存在していた。右上の表には、各部位のアミノ酸変異とそれを起こす塩基変異を記載した。

PL, periplasmic loop; CL, cytoplasmic loop; TM, transmembrane region.

C. 結果および考察

mexB または *mexD* の発現によってノルフロキサシン、スパフロキサシン、セフピロム、ペニシリン、モノバクタム、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、エリスロマイシンのいずれかに対する耐性化が見られた株はともに 25 株あった。これらの株のうち、基質特異性の変化した株を *mexD* の場合には 5 クローン取得することが出来たが、*mexB* の場合には全く得ることは出来なかった。これらの結果から MexB の基質特異性

は MexD に比べて安定であることが分かった。

こうして得られた *mexD* 変異体のうち、カルベニシリンおよびアズトレオナムにまで基質域が拡張した MexD 変異体をコードする *mexD* 遺伝子の塩基配列を調べ、そのアミノ酸配列を実験室株 PAO1 由来のそれと比較した。その結果、Thr⁸⁷Ser, Ser²⁸¹Leu, Val⁵³⁵Ala, Val⁵⁶⁴Ala, Phe⁶¹³Ser および Ser⁸⁴⁵Ala の 6 カ所で変異が起こっていることがわかった。これらの変異のうち、基質域拡張化の原因となる変異を同定するため、変

異を持つ *mexD* 遺伝子と PAO1 由来の *mexD* 遺伝子との間でキメラ遺伝子を作製し、1 個または複数個の変異の組み合わせを持つ変異 MexD 発現プラスミドを作製したところ、図に示された Ser²⁸¹Leu または Phe⁶¹³Ser の変異が carbenicillin 耐性に寄与することが分かった。また、これらの変異は norfloxacin 感受性や ethidium bromide の細胞内蓄積量には影響を及ぼさなかった。次に、部位特異的変異導入法により、281 位のアミノ酸残基を 11 種のアミノ酸に置換したところ、元の Ser 残基から Phe, Tyr や Lys 残基といった側鎖分子の大きなアミノ酸への置換は、carbenicillin への拡張だけではなく、faropenem や chloramphenicol に対しても 4~8 倍の耐性度の上昇をもたらすことが分かった。しかし erythromycin に対しては、逆に側鎖分子の増大につれ 1/8~1/2 倍に耐性度が減少した。これらの変異体の発現量と耐性度上昇に相関がなかったこと、さらに norfloxacin 感受性や ethidium bromide 蓄積にも影響が見られなかったことから、これらの排出活性の変化は、ポンプの発現量の増減によるものではなく、MexD の質的な変化に由来することが分かった。また、Phe⁶¹³Ser の変異と Ser²⁸¹ の疎水性アミノ酸 (Leu, Ile, Phe) への変異が重なると、測定に用いた抗菌薬のうち特異的に carumonam に対する耐性度が 8 倍に上昇した。一方、Ser²⁸¹Lys への変異が重なると、測定した全ての抗菌薬に対する耐性度の消失をもたらした。これらの結果は、281 位と 613 位が立体的に近接し、それぞれのアミノ酸残基の相互作用によって基質認識に寄与する構造が形成されていることを推測させた。さらに PAO1 由来の MexD 発現株プラスミド保有株から carbenicillin 耐性株を選択したところ、norfloxacin に対する感受性に変化は見られな

かったが、carbenicillin に加え faropenem や chloramphenicol に対する耐性度の上昇が観察された。この原因となったプラスミド上の *mexD* 遺伝子の塩基配列は、図に示すように Ala²⁹²Val および Pro³²⁸Leu の変異を示した。

MexD は約 1043 個のアミノ酸から構成された 12 回膜貫通型の内膜タンパク質で、N-末端から 1 番目および 4 番目にそれぞれが約 300 個のアミノ酸からなる大きなペリプラスムループ (PL1 および PL4) を持つ RND 型排出タンパク質特有の構造をしている。今回同定した基質特異性に関与する 4 種類のアミノ酸変異は、全てこのループ内に位置していた。このことは、PL1 および PL4 が排出基質の選別に機能していること、さらにこれらの変異の 3 種が 281 位、292 位、328 位と、PL1 内の近接した位置にあることから、PL1 内に基質認識ドメインが存在することが示唆された。

D. 結論

1) 野生株でも発現し、緑膿菌の抗菌薬自然耐性の一因である MexAB-OprM の基質特異性が調べた限りで安定であることは阻害薬の創製のみならず排出システムの発現の防止策を考案するうえでも重要な情報であると考えられる。

2) MexD タンパク質で推測されるアミノ酸数が約 300 からなるペリプラスムループが基質認識と選別に機能していること、さらにそれらに機能するドメインの存在が示唆された。これらの情報は排出システム阻害薬の創製に有益な情報を提供するものであると考えられる。

今後さらに、これらのループ構造とさらなる機能ドメインを解析することで多剤耐性化の原因となる排出ポンプの基質認識機構や、排出の分子メカニズムが解明につながるものと考えられる。

研究発表(印刷物のみに限った)

1. 後藤直正. 2001. 特集 耐性菌感染症—基礎・臨床の進歩と展望. 膜透過および排出機構に伴う多剤耐性菌. *日本臨床*, **59**:712-718.
2. 後藤直正. 2001. トピックス 薬剤耐性とエフラックスポンプ. *臨床検査*, **45**:779-782.
3. 後藤直正. 2001. Seminar & カラー 耐性菌シリーズ⑥ MDR. *感染症*, **31**:32, 35-44.
4. Hyunjoo Pai, Jong-Won Kim, Jungmin Kim, Ji Hyang Lee, Kang Won Choe, and Naomasa Gotoh. 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:480-484.
5. Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya, Naomasa Gotoh, and Takeshi Nishino. 2001. Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfxB* mutant to β -lactams due to reduced expression of AmpC β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1284-1286.
6. Kiyomi Okamoto, Naomasa Gotoh, and Takeshi Nishino. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: Penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1964-1971.

MexR を介した緑膿菌 MexAB-OprM 排出ポンプの発現調節分子機構

研究分担者： 中江 太治

研究協力者： 斉藤 孝二郎、江田 志磨、間世田 英明、

研究要旨

遺伝子抑制因子 MexR による MexAB-OprM 排出ポンプの発現調節分子機構を明らかとする目的で、MexR と *mexR-mexA* 中間領域 DNA(*mexOP*)との相互作用、および様々な長さの *mexOP* が組み込まれた *mexA-lacZ* 融合レポーター遺伝子の転写量を調べた。精製した MexR は *mexOP* 上の特に *mexR* 側への特異的結合を示した。*mexOP* 配列上の *mexR* 側のわずかな領域を削除したような *mexOP-lacZ* 融合遺伝子はほとんど酵素活性を示さなかったことから、プロモーター因子は *mexR* 遺伝子と MexR 結合部位との間に位置しているものと示唆された。これらの結果より、*mexR* 遺伝子発現の自己抑制機構、すなわち緑膿菌野生株における低レベルの MexAB-OprM 発現および *nalB* 型変異株における MexAB-OprM 発現の増加を説明するに至った。

A. 研究目的

免疫力の低下した患者への緑膿菌感染は、病院内において深刻な問題となりつつある。この細菌による感染の問題点は、この菌が構造的にも機能的にも異なる様々な抗生物質に対して幅広く耐性を示すことが挙げられる。このような多剤耐性は主に外膜の低透過性および MexAB-OprM 排出ポンプとの連携が要因となっている。*mexAB-oprM* オペロンは3つのポンプ構成タンパクをコードしており、それらは：内膜内在性タンパク MexB、内膜へ結合しているペリプラズムリポ（脂質）タンパク MexA、そして外膜へ結合しているリポタンパク OprM である。

nalB 型の変異株は、*mexR* 上に変異が生じた変異株であり、高いレベルの MexAB-OprM が構成的に生産され、野生株が耐性を示すと同一種類の薬剤に対してさらに高い耐性を示す。*mexAB-oprM* オペロンの上流に位置するこの *mexR* 遺伝子には、*mexAB-oprM* オペロンの負の転写調節因子がコードされ、発現される。ゆえに多くの研究者たちは *mexR* 遺伝子が *mexAB-oprM* および *mexR* 自身の両遺伝子の転写を調節しているものと考えてきた。さらに、*mexAB-oprM* オペロンの発現を説明する上で、*mexR* 以外の調節遺伝子の関与が示唆されている。

147のアミノ酸残基から構成される MexR は、詳細に研究されている大腸菌 MarR と高い類似性を示すことから、近年 MarR 属の転写調節因子として分類されるようになった。MarR 属に分類されるほかのタンパク質のほとんどが、オペレーター領域に結合することによって遺伝子転写を抑制していることから、MexR もまた *mexAB-oprM* オペロンに対して同様な特徴を示すものと考えられる。しかしながら、MexR が結合する領域あるいは *mexAB-oprM* オペロンのプロモーター因子のいずれもこれまで同定されていない。ポンプタンパクの産生と薬剤耐性をさらに理解するためにも、*mexAB-oprM* オペロンの転写抑制が重要で

ンタンパクの産生と薬剤耐性をさらに理解するためにも、*mexAB-oprM* オペロンの転写抑制が重要であることから、我々は MexR と *mexR-mexA* 中間配列 DNA である *mexOP* (*mexAB-oprM-operator-promoter* 領域より名称決定)との相互作用を解析した。その結果、MexR 結合部位および *mexAB-oprM* のプロモーター因子を同定した。

B. 研究方法

2.1. 菌株、プラスミドおよび培養条件

本研究に用いた菌株は、大腸菌は DH5 α および BL21(DE3)pLysS、緑膿菌は *lacZ* Δ M15 遺伝子を保有する PAO1S-Lac であった。OCR-Lac4 および OCR-Lac6 は 1 μ g/ml のオフロキサシン(ofloxacin)およびセフスロジン(cefsulodin)を添加した L-寒天板上において PAO1S-Lac 株から選択した。菌株は以下に示す濃度の薬剤を添加した Luria-Bertani(LB)培養液において培養した：大腸菌培養には、100 μ g/ml アンピシリン(ampicillin)、35 μ g/ml クロラムフェニコール(chloramphenicol)、15 μ g/ml ゲンタマイシン(gentamicin)、緑膿菌培養には 200 μ g/ml ゲンタマイシン。

2.2. His-MexR の精製

DNA 組み換え操作はこれまでに発表されている基本方法に従って行った。ヒスチジン 10 残基を付加したような MexR 発現ベクターの構築には、はじめに *mexR* 遺伝子をプライマー対：PR1-Xho(5'-cgctcgagATGAACTACCCCGTGAATCC)、PR2-Xho(5'-ccctcgagCCAGTAAGCGGATACCTG) を用いて PCR 法(ポリメラーゼ連鎖反応法)によって増幅した。この PCR 産物を制限酵素 XhoI で処理をした後、pET19 ベクター (Novagen 社製、米国)へ組み込んだ。His-MexR 組み換えタンパクを得るために、構築したベクターを保有する BL(21)DE3pLysS を 30ml の LB 培養液中、37°Cにおいて、OD600 値が約 0.5 となるまで培養し、1mM のイソプロピル β -D-チオガラクトピラノサイド(isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)を加えた。さらに 3 時間培養した後、His-Bind-Resin カラムクロマトグラフィー (Novagen 社製、米国)を取扱説明書に従って使用し、His-MexR を精製した。

2.3. *in vitro* (試験管内) DNA 結合解析

mexOP 全長領域を含む 290bp の DNA 断片は、プライマー対：BamHI-タグ付き *mexA1*、HindIII-タグ付き *mexA2* (図 1 参照)

を用いて増幅し、MEGALABEL T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製、日本)を用いてその 5'末端を [γ ³²-P]ATP 標識することにより作製した。*mexOP*(107-274)領域を含む 175bp の DNA 断片はこの DNA 断

片を制限酵素 *NcoI* で消化・分離することにより作製した。この他に *mexOP*(1-107)領域を含む 255bp の DNA 断片を、プライマー対：*Bam*HI-タグ付き *mexA1*、M13(-40)forward (Amersham Pharmacia Biotech 社製、英国) および鑄型 DNA pME4510-OP(1-107) (後述) を用いて PCR 法によって増幅し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 標識することにより作製した。ゲルシフト解析(gel retardation assay)はこれまでに発表されている方法に従って行った。イメージ・アナライザー FLA-2000 (富士フィルム社製、日本) を用いて、バンドを画像化した。

2.4. β -ガラクトシダーゼ酵素活性の測定

mexA 転写レポーター遺伝子の構築の目的で、染色体遺伝子上における *mexR* および *mexA* 翻訳開始コード間の領域を、*Bam*HI-タグ付き *mexA1*、*Hind*III-タグ付き *mexA2* (図 1 参照)

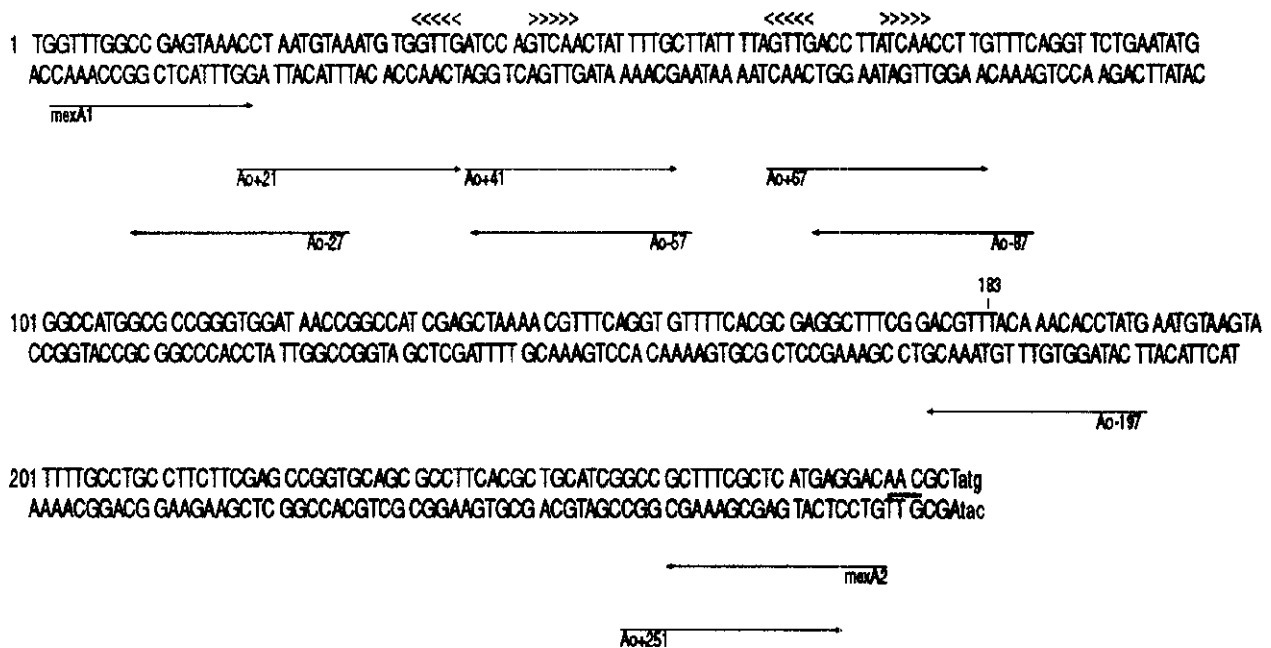


図 1. *mexR-mexA* 中間領域 DNA(*mexOP*)の塩基配列。左側に示している番号は、*mexR* の開始コードの隣の塩基から数えた塩基数。*mexA* 開始コードは下線を引いて示している (右側)。<<<<<>>>>>記号は繰り返し配列を表している。使用したプライマーは矢印で示している。OCR-Lac6 における塩基突然点変異は太字で示した 183 番目の塩基である。

を用いて増幅した。この DNA 産物を制限酵素 *Bam*HI および *Hind*III で消化した後、プロモーターを欠いた *lacZ* 遺伝子(promoter-less *lacZ*)が組み込まれている pME4510 へ挿入することによって、pME4510-*mexOP* を作製した。プラスミド pME4510-OP(C183T)は、OCR-Lac6 染色体から前述した方法に従って構築した。pME4510-OP(1-107)は、pME4510-*mexOP* を *NcoI* および *Hind*III で消化し 167bp の断片を欠失させた後、自己結合 (self-ligation) 処理を行うことによって構築した。*mexOP* の 3'末端もしくは 5'末端から削除し

己結合 (self-ligation) 処理を行うことによって構築した。mexOP の 3'末端もしくは 5'末端から削除していった系列は、pME4510-mexOP をもとに PCR 法によって目的の長さの DNA 断片を PCR 増幅した。pME4510-OP(1-27)、pME4510-OP(1-57)、pME4510-OP(1-87)および pME4510-OP(1-197)の構築に、HindIII-

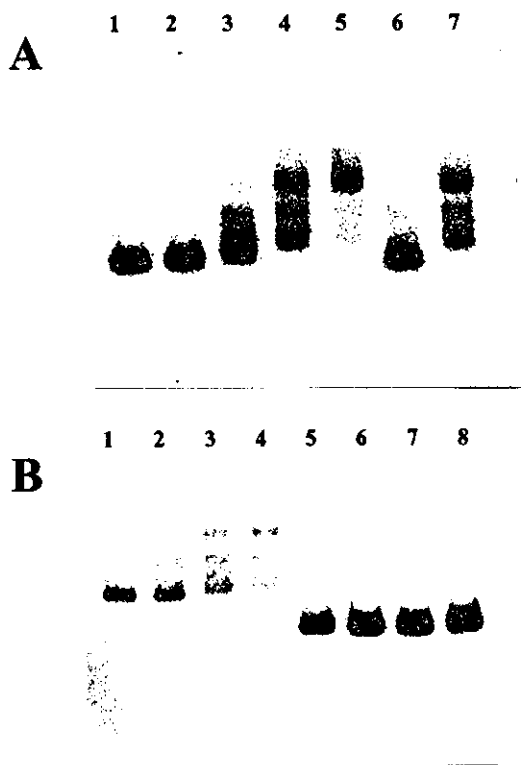


図2. mexOP のゲルシフト解析。20 μ l の反応液になるように、1nM の DNA 断片と精製した His-MexR を混合し、25 $^{\circ}$ Cにおいて 20 分保温した。次にこの反応液 4 μ l をポリアクリルアミドゲル(0.25 TBE)へ供し、4mA、4 $^{\circ}$ Cにおいて電気泳動をおこなった。(A)mexOP 全長を含む 290bp の DNA 断片へ、次に示す His-MexR を

Ao-107) に対して Ao+251 を用いた。pME4510(Δ 21)、pME4510(Δ 41)および pME4510(Δ 67)の構築に、BamHI-タグ付きプライマー (それぞれ Ao+21, Ao+41, Ao+67) に対して Ao-12(5'-ggaagcttTCGGCCAAACCAGGATCCC-3') (図1参照) を用いた。これらのベクターを PAO1S-Lac あるいは OCR-Lac4 へ形質転換し、Miller 法に従って β -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。

2.5. その他の技術

菌に対する抗生物質の最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)はこれまでに発表されている方法に従い、決定した。タンパク定量は BioRad Protein Assay Kit I (Bio Rad Laboratories 社製、米国) を用いて決定した。精製した融合タンパクは SDS-PAGE で確認し確認した。

C. 研究結果

3.1. mexOP DNA 断片に対する MexR の相互作用

MexR にヒスチジンタグを付加することによって、本来の遺伝子調節活性が失われていないかを確認するために、野生株および mexR 欠損変異株で His-MexR をそれぞれ発現させ、それらの抗生物質感受性を測定

した。アズトレオナム(Aztreonam)の MIC は野生株において 3.13 μ g/ml、mexR 欠損変異株において 25 μ g/ml であり、これまでに得られた結果と一致していた。IPTG 存在下において His-MexR を発現させるとアズトレオナムの MIC は mexAB-oprM 遺伝子を欠失した変異株が示す値(0.2 μ g/ml)程度まで低下したことから、His-MexR は緑膿菌生体内(in vivo)において mexAB-oprM の転写を強固に抑制していることが示唆された。

次に、mexA-mexR 中間領域 DNA(mexOP)に対する精製 His-MexR の結合能力をゲルシフト解析法により確認した (図2 参照)。様々な濃度の His-MexR を mexOP 全長 DNA へ混合したところ、濃度依存的な

DNA断片の移動度の変化を確認した(図2A)。1nMのDNA断片に対して100nMのHis-MexRが結合状態を保っていた(図2A、レーン1-5)。これに100nMの放射性標識をしていないDNAを添加したところ、タンパク-DNA相互作用が完全に阻害された(図2A、レーン6)。また、10μg/mlのサケ精子DNAを添加しても、DNA断片の移動度の変化に影響を全く与えなかった(図2A、レーン7)。以上の結果から、His-MexRが*mexOP*DNA断片へ結合することが明確に証明された。タンパクの濃度を10から100nMへ増加するに従い、それぞれ移動度の異なるDNAバンドが複数現れたことから(図2A、レーン3および4)、His-MexRが*mexOP*DNA断片へ結合している。あるいはHis-MexRが*mexOP*上の複数の部位に結合している、あるいはHis-MexRが

*mexOP*上の複数の部位に結合しているものと考えられた。この結果は、大腸菌MarR-marO相互作用におけるMarRと類似した性質を現していた。

MexRの結合部位を決定するために、異なる長さの*mexOP*遺伝子断片を用いてゲルシフト解析を行った。*mexOP*の107番目から274番目の塩基配列を含む175bpのDNA断片はHis-MexRとの結合が見られなかった(図2B、レーン1-4)。一方で、1番目から107番目の塩基配列を含む225bpのDNA断片は濃度依存的なDNA断片の移動度の変化が見られた。225bp

のDNA断片を用いた際、全長*mexOP*DNA断片を用いた際のゲルの画像様式と完全に一致していたことから、MexRは*mexOP*の1番目から107番目の塩基配列へ結合するものと示唆された。

3.2. MexR結合部位の同定

MexR結合部位をさらに詳細に同定するために、様々な長さの*mexOP*を組み込んだ*mexA-lacZ*転写レポーターが示す酵素活性をPAO1S-Lacにおいて測定した(図3参照)。全長*mexOP*DNA断片が組み込まれたpME4510プラスミドからは3.2Uのβ-ガラクトシダーゼ酵素活性しか示されなかったのに対して、*mexOP*の1番目から57番目の塩基配列が組み込まれプラスミドからは31.8Uの酵素活性が示された。この結果から*mexOP*の57bpの領域を含むプラスミドへMexRが弱いながらも結合していることが分かった。107bpの領域が組み込まれたプラスミドからは、全長*mexOP*が組み込まれたプラスミドとほぼ等しい値の

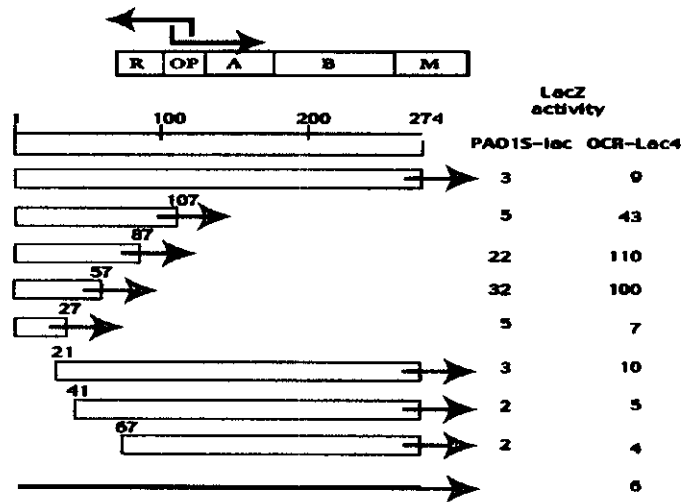


図3. MexR結合部位および*mexAB-oprM*プロモーター因子の位置。5'および3'を削除した*mexOP*DNA断片をpME4510へ組み込んだ。それぞれの菌株から3株分離し、解析に用いた。*mexOP-lacZ*融合ベクターを緑膿菌PAO1S-Lac(野生株)およびOCR-Lac4(*mexR*欠損変異株)へ導入し、β-ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。図中の長さは便宜上示したものである。プロモーターを欠いた*lacZ*遺伝子は矢印で示した。

p の領域が組み込まれたプラスミドからは、全長 *mexOP* が組み込まれたプラスミドとほぼ等しい値の酵素活性が示された。一方で 87bp の領域が組み込まれたプラスミドは pME-OP(1-107)と pME-OP(1-57)との中間の酵素活性値 21.6U が示されたことから、この DNA 領域へは 1 番目から 57 番目の DNA 領域よりもより強く MexR が結合し、逆に全長領域の DNA よりも弱く結合していると考えられた。従って、MexR 結合部位が位置する領域はさらに限定でき、*mexOP* 上のおよそ 27 番目から 107 番目の塩基配列上に結合部位が位置していた。

3.3. もう一つの遺伝子抑制因子の結合部位の予測

我々はこれまでに、*nalB* 型の変異株が産生する MexR は機能を失った結果、MexAB-OprM ポンプの発現が抑制されないということを発表してきた。この結果を分子レベルで確認する目的で、染色体上 *mexR* に(A388C)の変異が生じたことによってその機能を失っ

た菌株 OCR-Lac4 におけるレポーター-酵素活性を測定した。*mexOP* の 1 番目から 87 番目の塩基配列が組み込まれたレポーターの酵素活性値は OCR-Lac4 において 109.8U であり、同じレポ

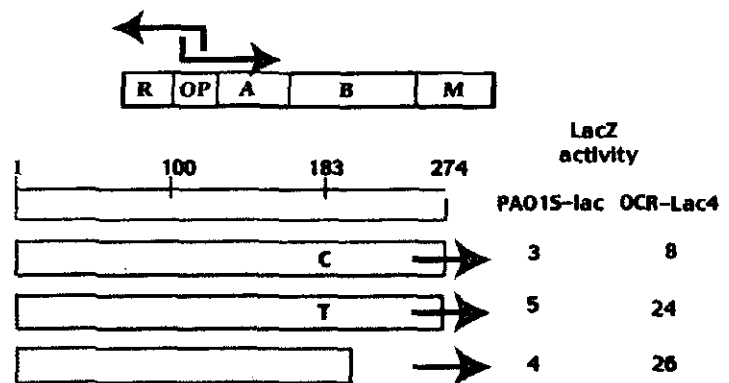


図 4. もう一つの抑制因子結合部位の同定。*mexOP*、*mexOP*(183T)もしくは *mexOP*(1-197)を組み込んだ *mexA* 転写レポーター遺伝子を PAO1S-Lac (野生株) および OCR-Lac4 (*mexR* 欠損変異株) へ導入し、β-ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。図中の長さは便宜上示したものである。プロモーターを欠いた *lacZ* 遺伝子は矢印で示した

た菌株 OCR-Lac4 におけるレポーター-酵素活性を測定した。野生株 PAO1S-Lac における活性値に対して 3 倍から 8 倍高い値を示した。遺伝子抑制因子が不活性化されている *mexR* 欠損変異株において、構築した全てのレポーターは同一の酵素活性値を示すものと仮定していたため、これは我々の予想を越えた結果であった。この結果に対する解釈としては、*mexAB-oprM* オペロンが *mexR* とそれ以外のもう一つの抑制因子によって二重に遺伝子調節が行われているものと考えられる。

このもう一つの抑制因子が結合する部位を明らかにするために、自然発生的なオフロキサシン-セフトロジン耐性変異株である OCR-Lac6 を分離し、その変異株における染色体上 *mexOP* 遺伝子の 183 番目の塩基対には C (シトシン) から T (チミン) の塩基突然点変異が生じていた。この変異株は野生株に比べて高く、*mexR* 欠損変異株に比べて低い薬剤耐性を示した (この結果は示していない)。予想する遺伝子抑制因子の

結合部位を特定するために、C183T の点変異を生じた、あるいは生じていない *mexA-lacZ* レポーターを構築し（図 4 参照）、野生株および *mexR* 欠損変異株においてそれぞれレポーターの酵素活性値を測定した。この結果は図 4 に示しており、それは：(i) *mexR* 欠損株における β -ガラクトシダーゼ酵素活性値は野生株に比べて 2.8 倍高く、これまでの結果と一致していた。

(ii) C183T の変異が生じることによって、野生株に比べて 1.9 倍高いレポーター活性値を示した。(iii) *mexR* および *mexOP* の二カ所に変異が生じることによって、野生株に比べて 8.9 倍高いレポーター活性値を示した。この結果は、各菌株における抗生物質に対する MIC 値と一致したものであった（この結果は示していない）。この結果を検証するために、197 番目から 274 番目までの 77bp の塩基配列を削除したようなレポーターを構築し、野生株および *mexR* 欠損変異株における酵素活性値をそれぞれ測定した。このレポーター活性値、C183T 変異株から構築したレポーター活性値は、それぞれの菌株においていずれも同様な値を示していた。これらの結果より、もう一つの遺伝子抑制因子の結合部位は *mexOP* 上の 183bp 付近に存在しているものと考えられた。

3.4. 予想されるプロモーター因子の同定

先に述べたように、pME-OP(1-57)からは β -ガラクトシダーゼ酵素活性が示されなかった。*mexOP* DNA 断片の領域を pME-OP(1-27)のようにさらに短くするとレポーター活性値が減少し、*mexOP* 全長領域が組み込まれたレポーター活性とほぼ等しい値を示した（図 3 参照）。この結果から、この短い DNA 断片上には RNA ポリメラーゼが結合できる領域が存在しないものと解釈した。この仮説を確かめるために、5'末端側から削除されている様々な長さの *mexOP* を組み込んだ *mexOP-lacZ* 転写レポーターを構築し、*mexR* 欠損変異株である OCR-Lac4 において酵素活性値を測定した（図 3 参照）。この菌株における pME-OP(Δ 41)および pME-OP(Δ 67)が示す β -ガラクトシダーゼ酵素活性は、プラスミド pME4510 だけを保持している菌株が示す酵素活性値に近い値であった。一方で、pME-OP(Δ 21)が示すレポーター活性値は、*mexOP* 全長が組み込まれたレポーターが示す酵素活性値にほぼ等しい値であったことから、*mexAB-oprM* に対するプロモーター因子はこの領域上に位置していると思われる（図 3 参照）。

4. 考察

我々はこの論文において、染色体上の *mexR* と *mexA* 中間領域 DNA に MexR 結合部位、および *mexAB-oprM* オペロンのプロモーター因子が存在していることを報告した。図 2 においては、MexR の *mexOP* への特異的な結合を証明する直接的な結果が示されている。*mexA* 転写レポーターの測定によって、MexR 結合部位が *mexOP* の 27 番目から 107 番目の間の DNA 領域に存在していることをつきとめた（図 3 参照）。この結果は、*mexOP* 上に二つの繰り返し配列が位置していることと一致したものである（図 1 参照）。様々な長さの *mexOP* が組み込まれた *mexA* 転写レポーターの測定から、1 番目から 41 番目の間の DNA 領域を削除したようなレポーターは活性をほとんど示さなかったことから、この領域にプロモーター因子が

したようなレポーターは活性をほとんど示さなかったことから、この領域にプロモーター因子が含まれているものと示唆された。こうした結果から、プロモーター因子と MexR 結合部位とは一部重なり合っていると考えられた。

MexR 結合部位は *mexR* 遺伝子の翻訳開始コドン付近に位置することから、MexR がこの領域へ結合することによって *mexR* の転写自身も抑制していることになり、これは以前に推測したものと一致したものである。

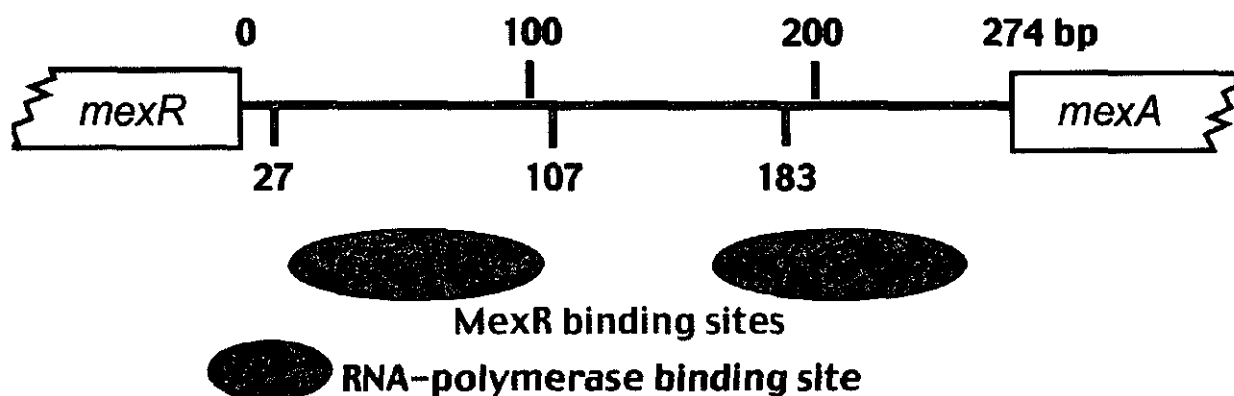


図5. MexR による *mexAB-oprM* オペロン制御の総括
 詳細は本文を参照

このような *mexR* の転写が自己抑制されることにより MexR が低発現され、その結果 *mexAB-oprM* オペロンの抑制が弱まり、野生株において *mexAB-oprM* オペロンが低レベルで発現されているものと説明することができる。実際に、プラスミドに組み込み過剰に MexR を発現すると、*mexAB-oprM* を欠損したような菌が示すような薬剤低感受性を示すようになる。(図5)

これら以外の興味を引くような結果としては、MexR 結合部位を欠いたようなレポーター遺伝子からは、野生株に比べて *mexR* 欠損株において高い活性値を示したことである。この結果より、もう一つの転写抑制因子の結合部位の存在が示唆され、それは *mexA* の翻訳開始コドンから約 100bp の場所に位置しているものと思われる。現時点ではこの部位に推定 NalC 遺伝子抑制因子が結合するのかは定かでない。

F. 研究業績 (英文の論文のみ)

Saito, K., Eda, S., Maseda, H., Nakae, T. 2001. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Letts. 195, 23-28

Guan, L., Nakae, T., 2001. Identification of essential charged residues in Transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183, 1734-1739.

Herskovits, A. A., Seluanov, A., Rajsbaum, R., tenHagen-Jongman, C. M., Henrichs, T., Bochkareva, E.S., Philips, G.J., Probst, F. J., Nakae, T., Ehrmann, M., Luirink, J., and Bibi, E. 2001. Evidence for coupling of membrane targeting and function of the signal recognition particle (SRP) receptor FtsY. *EMBO reports* 2, 1040-1046