


図1 各種バンコマイシン耐性遺伝子の遺伝子構成

vanDH3  


1 GGATCGGGTACTGGTTCGATACCGTGAGCAATACCATCCGAAATTGTCTGAATTTTGAAAG



61 GAGTCTTGAAAATGTATAAGCTTAAAATTGCAGTCCTGTTGGAGGCTGCTCAGAGGAAC  
M Y K L K I A V L F G G C S E E

121 ATGATGTTTCAGTGAAATCTGCGATGGAGTTGCAGCAAATATAAAACAAGGAAAAATACC  
H D V S V K S A M E V A A N I N K E K Y



181 AGCCGTTTATATTGGAATCACAAAATCCGGCGCATGGAACTATGCGATAAGCCCTGCC  
Q P F Y I G I T K S G A W K L C D K P C

241 GGGACTGGGAGAACTATGCGGGATACCCGGCTGTGATTTCTCCGGACAGAAGGATCCATG  
R D W E N Y A G Y P A V I S P D R R I H

301 GCCTGCTGATACAAAAGGACGGCGGATATGAGAGCCAGCCTGTAGACGTGGTGCTTCCGA  
G L L I Q K D G G Y E S Q P V D V V L P

vanDD1  vanDD2 

361 TGATTCATGGAAAATTTGGCGAGGACGGAACCATACAGGGTCTGCTTGAGCTGTCCGGCA  
M I H G K F G E D G T I Q G L L E L S G

T  
  
V  


421 TTCCTTATGTGGGATGCGACATTCAAAGTTCTGTAATCTGTATGGATAAGTCGCTCGCTT  
I P Y V G C D I Q S S V I C M D K S L A

481 ATATGGTTGTGAAAATGCGGGAATTGAGGTACCTGGGTTTCGAGTTCTACAAAAGGGGG  
Y M V V K N A G I E V P G F R V L Q K G

541 ACAGCCTGGAAGCAGAGACGCTCTCGTATCCGGTCTTTGTAAAGCCTGCCCGTTCCGGCT  
D S L E A E T L S Y P V F V K P A R S G

601 CCTCTTTTGGCGTGAATAAGGTATGCCGGCAGAGGAACTGCAGGCAGCGGTACAGAGG  
S S F G V N K V C R A E E L Q A A V T E


661 CGGTAAGTATGACAGCAAAATATTGGTTGAGGAGGCCGTTCCGGGAGTGAGGTAGGAT  
A G K Y D S K I L V E E A V S G S E V G

721 GTGCCATACTGGGAAACGGAACGATCTCATCACCGGCGAGGTCGATCAGATTGAATTGA  
C A I L G N G N D L I T G E V D Q I E L

781 AACACGGGTTTTTTAAGATCCATCAGGAAGCACAGCCGAAAAGGGTCTGAAAATGCTG  
K H G F F K I H Q E A Q P E K G S E N A


841 TGATTAGAGTCCAGCCGCCCTGCCGGATGAAGTTAGGGAGCAGATTCAGGAAACGGCGA  
V I R V P A A L P D E V R E Q I Q E T A

901 AGAAGATTTACCGGTACTTGGCTGCAGAGGTCGGCCCGCATTGATTTGTTTTTACGGG  
K K I Y R V L G C R G L A R I D L F L R

T  


961 AGGATGGAAGCATTGTCCTGAATGAAGTGAACACCATGCCCGGATTTACTTCCTATAGCC  
E D G S I V L N E V N T M P G F T S Y S

1021 GTTATCCACGCATGATGACAGCAGCAGGGTTTACGCTTCTGAAAATATTGGACCGCTTGA  
R Y P R M M T A A G F T L S E I L D R L

vanDX3  


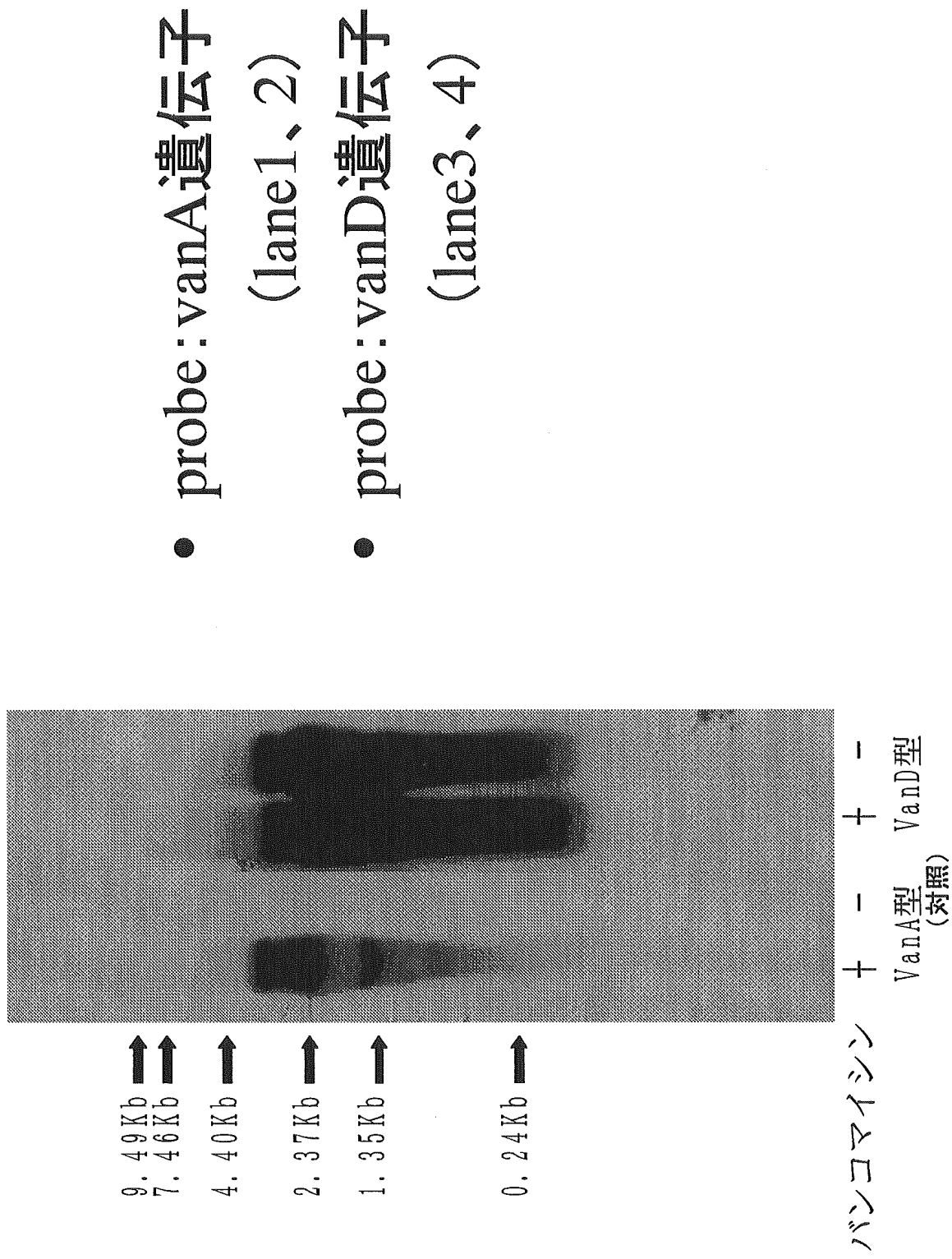
1081 TTGGACTTTCACCTTAGGAGGTAACCATCATGAAAAGAAGCTTTGTCTTTTGGATGAAAT  
I G L S L R R \*

1141 GCTGCCGGGCATCCGGTGGGATGCCAAATATGCCACAT

図2 既報のVanD4遺伝子のDNA塩基配列とアミノ酸配列

- ・VanD4型 *E. raffinosus* のVanD4遺伝子との違いを矢印で示してある。
- ・水平矢印はシーケンスに用いたプライマー。

# 図3 VanD型耐性遺伝子の発現



## 日本初の VRE 院内感染症株から分離されたバンコマイシン耐性プラスミドの解析

主任研究者 池 康嘉<sup>1, 2</sup>

研究協力者 富田 治芳<sup>1</sup>、麻 興華<sup>3</sup>、石綿 司<sup>1</sup>、浦部 優子<sup>1</sup>、藤本修平<sup>1</sup>

群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学<sup>1</sup>、  
群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>、(財)ヒューマンサイエンス振興財団<sup>3</sup>

**要旨[背景・目的]** 1999年7月、日本で初めて VanB 型のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が検出された。本実験では、そのとき検出された菌から *vanB* 遺伝子のコードされたプラスミドを単離し、解析を行うことを目的とした。**[対象と方法]** NKH 病院にて分離された 19 の菌株を対象に抗生剤耐性実験、接合伝達実験を行い、代表菌株より得られたプラスミド (pUI22) を対象に PCR およびサザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。**[結果]** プラスミド pUI22 は 117 kbp であった。また pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされており、そのタイプは *vanB2* であることが判明した。また、フェロモン反応性の接合伝達遺伝子群もコードしており、高頻度で耐性を伝達することが明らかとなった。バンコマイシン以外の薬剤に対する耐性遺伝子はコードしていなかった。**[結語]** 同じプラスミド上に *vanB* 遺伝子とフェロモン反応性遺伝子がコードされているという結果は、この VRE の急速な伝播を示唆している。

キーワード：VRE, VanB, 接合伝達性プラスミド, フェロモン

### はじめに

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、MRSA などとともに世界的に問題となっている院内感染原因菌のひとつである。特に米国では救急治療室、移植・癌・腎疾患病棟などで VRE の水平伝播による院内感染が多発し、その増加は社会的に問題化している。VRE 感染症患者あるいは保菌患者の殆どが免疫機能低下患者であり、感染症治療の経過中に抗菌剤投与による菌交代症の中で出現する。現在、6 種の耐性型を持つ VRE が発見、同定されているが、臨床的あるいは院内感染

対策上問題となるものは、*vanA* と *vanB* の耐性遺伝子を保有する VRE である。VanA 型はバンコマイシン、テイコプラニンの両者に耐性であるのに対し、VanB 型はテイコプラニンに感受性である。VanA 型と VanB 型の腸球菌におけるグリコペプチド系抗生剤耐性は、細胞壁構成タンパク質の末端が *D*-lactate (*D*-Lac) に変化していることによるものである。グリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンやテイコプラニンは、細胞壁の構成成分タンパク質の C 末端残基 *D*-alanyl-*D*-alanine (*D*-Ala-*D*-Ala) に結合し、細胞壁の構築を阻害する。<sup>1</sup> VCM 耐性菌株ではこの C 末端が

D-Ala-D-Lac に変化しており、このため VCM が結合できなくなり耐性となる。VCM 耐性に関連する遺伝子は、*vanRS* と *vanYWHBX* からなる *van* オペロンで構成される。*van* オペロンは多くの場合、接合・転移に関連する染色体やプラスミドの一部だと考えられている。*vanA* オペロンは通常プラスミド上に存在し、Tn1546 により伝達される。<sup>2</sup> 一方、*vanB* オペロンは通常染色体上に存在する。

遺伝子伝達機構は、微生物が抗生剤耐性を伝播する過程において重要な役割を果たす。腸球菌は、独特な方法で同種間や異種間でプラスミドを高頻度に伝達することができる。<sup>3-6</sup> 腸球菌プラスミドには、限られた種にのみ存在するフェロモン反応性のプラスミド<sup>3,4,7</sup> と、*Enterococcus faecalis*<sup>8,9</sup> と *Streptococcus agalactiae*<sup>10,11</sup> から分離された、固体培地において低頻度で伝達し、多種に渡り存在できるプラスミドの 2 種類がある。<sup>8-12</sup> フェロモン反応性のプラスミドを保有しているのは主に *E. faecalis* であり、<sup>13-18</sup> その伝達は、数時間の液体培地中での接合においてドナー 1 に対し  $10^0 \sim 10^{-2}$  の高頻度で起こる。この型のプラスミドは通常 45 kb 以上の大きさであり、受容菌が分泌する性フェロモンに反応して伝達を開始する。<sup>13-18</sup> この接合シグナルにより菌の接合凝集が起こる。このとき性フェロモンは、プラスミド伝達に必要な一連の遺伝子群を発現させる。プラスミドを保有しない受容菌は複数の性フェロモンを分泌し、各々関与するフェロモン反応性プラスミドを持つ供与菌に特異的に影響を与える。受容菌が 1 つのプラスミドを獲得すると、その反応に関与していた 1 つの性フェロモンの分泌は終了するが、それ以外のフェロモン分泌は続く。性フェロモンは、供与菌の自己凝集を誘導する。フェロモン反応性プラスミドにコードされている遺伝因子としては、溶血毒素、バクテリオシン (抗菌活性物質)、抗生剤耐性、紫外線耐性がある。<sup>13,19-27</sup>

近年、日本においても複数の病院から VRE 検出の報告がなされている。1999 年 7 月に、日本

で初めて VanB 型の VRE が検出された。この *vanB* 遺伝子は 110-kb プラスミドにコードされていることがわかったが、そのプラスミド DNA の単離に成功しておらず、性質等は不明である。<sup>28</sup> 今回我々は、そのときに検出された菌を用いて、高頻度にバンコマイシン (VCM) 耐性遺伝子が伝達されることを確認後、そのバンコマイシン耐性プラスミドの単離、解析を行った。

## 対象と方法

### 菌株と培養方法

今回の調査には、H 病院にて分離された *E. faecalis* (VanB type) 19 菌株を用いた。これらは、日本で初めて検出された VanB 型の VRE である。<sup>28</sup> 今回の実験においてこれらの菌株は、Todd-Hewitt broth (THB) または Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 中で培養した。

### 接合伝達実験

バンコマイシン (VCM) 耐性が接合伝達されるか否かについて、検出された 19 株においての実験を行った。受容菌として *E. faecalis*、プラスミドを持たない FA2-2 (リファンピシン、フシジン酸耐性) と JH2SS (ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性) を用い、液体培地中での接合伝達実験を行った。滅菌された試験管に Todd-Hewitt broth (THB) 5ml、受容菌 500.1、供与菌 50.1 を混合し、37°C で 3 時間培養した。その後、混合液 50.1 を vancomycin (6. g/ml) と抗生剤を入れた固体培地 Brain Heart Infusion (BHI) に植え、37°C で 48 時間培養した。発育したコロニーは、同種の培地にて純培養した。同様の手法で、再伝達実験、再々伝達実験も行った。固体培地の抗生剤濃度はそれぞれリファンピシン 25. g/ml、フシジン酸 25. g/ml とストレプトマイシン 250. g/ml、スペクチノマイシン 250. g/ml

とした。

### 抗生剤耐性実験

VCM 以外の抗生剤に対する耐性も伝達されているかを確認するため、4種類の抗生剤について実験を行った。HGH15、22、25 及びこれらから得られた伝達株のそれぞれを、各抗生剤を含む THB 培地で 37°C、48 時間培養した。抗生剤の種類と濃度は、アミカシン 64. g/ml、レボフロキサシン 8. g/ml、カナマイシン 100. g/ml、ゲンタマイシン 100. g/ml とした。

### アガロースゲル電気泳動

分離された VRE の遺伝子解析のため、プラスミド DNA を *EcoRI* で切断し、アガロースゲルで電気泳動した。プラスミド DNA の抽出には、アルカリ少量法を用いた。<sup>29</sup> 電気泳動終了後、アガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下、確認、撮影した。

### pUI22 の制限酵素地図の作成

pUI22 の DNA を *EcoRI* で切断後電気泳動し、各断片の大きさを測定した。また、*Bam*HI、*Nco*I、*Xba*I 制限酵素のうち 1 種類、2 種類、3 種類を使って完全に DNA を切断、電気泳動した後各断片の大きさを測定し、制限酵素地図を作成した。

### PCR

抽出された HGH22 の DNA を用いて PCR を行った。混合液の組成は、DNA サンプル 5.1、各プライマー 0.5.1 (100pM/.1)、dNTP 混合液 4.1、.Taq DNA polymerase 0.25.1、.Taq 添付 10×PCR buffer 5.1、滅菌蒸留水 35.1 とした。

DNA 増幅のための PCR は、DNA thermal cycler (Gene Amp 9700) を用いて、最初のサイクルを 95°C で 2 min、95°C で 1 min、56°C で 1 min、72°C で 2 min を単位とするものを 30 サイクル、最終サイクルを 72°C で 2 min として行った。

DNA シークエンスのための混合液の組成は、サ

ンプル DNA 4.1、各プライマー溶液 (3.3pM/.1) 1.1、half TERM XL 2.1、Big-Dye Terminator RR Mix 2.1、滅菌蒸留水 1.1 とした。PCR には、96°C で 30 sec、50°C で 15 sec、60°C で 4 min を 25 サイクル行う Big Dye 法を用いた。PCR 処理後の DNA は、電気泳動後、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて回収した。

### サザンハイブリダイゼーション

DIG 標識 DNA を用いた dioxigenin-based nonradioisotope system (Boehringer GmbH) を標準のプロトコルにしたがって行った。<sup>30</sup>

## 結 果

### 接合伝達と抗生剤耐性実験

HGH21 を除く全ての菌株は、等しい抗生剤耐性を示した。VCM 耐性は液体培地中において、高頻度で伝達された (表 1)。

表 1. VanB 耐性の接合伝達頻度

菌株	遺伝子型	伝達頻度 (供与菌当り)
HGH7	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH8	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH9	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH10	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH11	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH12	<i>vanB</i>	10 <sup>-4</sup>
HGH13	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH14	<i>vanB</i>	10 <sup>-3</sup>
HGH15	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH16	<i>vanB</i>	10 <sup>-6</sup>
HGH17	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH18	<i>vanB</i>	10 <sup>-4</sup>
HGH19	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH20	<i>vanB</i>	10 <sup>-6</sup>
HGH21	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH22	<i>vanB</i>	10 <sup>-7</sup>
HGH23	<i>vanB</i>	10 <sup>-5</sup>
HGH24	<i>vanB</i>	10 <sup>-3</sup>
HGH25	<i>vanB</i>	10 <sup>-3</sup>

気泳動を行った。pUI22 を *EcoRI* で切断したとこ

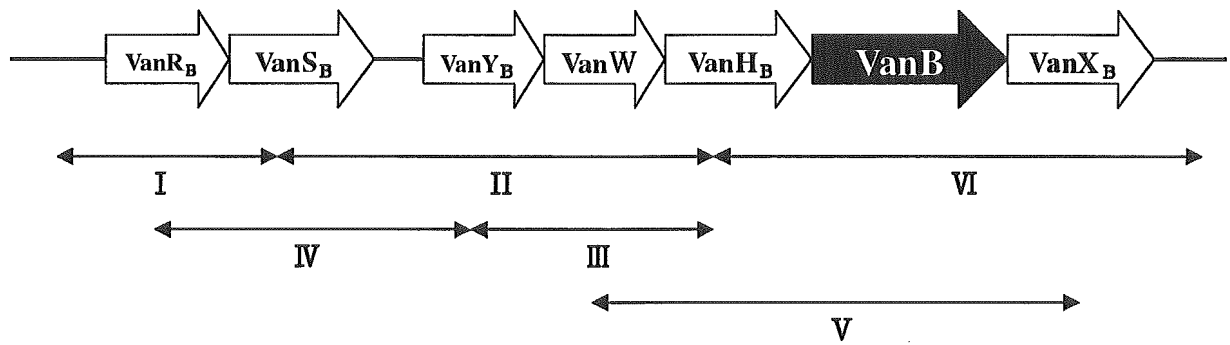


図 2. *vanB* 遺伝子のクラスター

配列は 5' から 3' 方向に示してある。

Combination		Forward primers		Reverse primers
I	<i>vanB-vanN<sub>B</sub>1</i>	TGGGGCAITACAGGGCGTTG	<i>vanB-vanS<sub>B</sub>2</i>	GCTGTGCTTCCATCGCTCTG
II	<i>vanS<sub>B</sub>-vanY<sub>B</sub>1</i>	ATATGCGCTGGAAAACACCTC	<i>vanB-vanH<sub>B</sub>2</i>	TGCGGAAAGCAITTTGCCTCA
III	<i>vanB-vanY<sub>B</sub>3</i>	ATATGTCGGCATCGAAGCTG	<i>vanB-vanH<sub>B</sub>2</i>	TGCGGAAAGCAITTTGCCTCA
IV	<i>vanB-vanR<sub>B</sub>3</i>	TGACGGTGATGGCAGCACAG	<i>vanS<sub>B</sub>-vanY<sub>B</sub>2</i>	CCCCAGAITTGTTCATATGCC
V	<i>vanB-vanW<sub>B</sub>1</i>	ACGGATGCAAGTTGCCTTAG	<i>vanB-vanX<sub>B</sub>2</i>	CCAACGAACACCATGCAACA
VI	<i>vanB-vanH<sub>B</sub>1</i>	GCTGCGAGATACCACAGAAA	<i>vanB-vanN<sub>B</sub>2</i>	AGCAGAITTCCATCAGCGCAG

表 2. 用いたプライマーの組み合わせ

再伝達実験、再々伝達実験においても、ほとんどの菌で耐性の伝達が確認された。接合伝達の実験中、液体培地中でフェロモン誘発性の凝集に似た自己凝集塊が観測され、このことから、供与菌がフェロモン反応性のプラスミドを保有していることが推測された。また VCM 以外の抗生剤についての耐性遺伝子は伝達されていないことが判明した。

### 接合伝達性 VCM 耐性プラスミドの単離

接合伝達に関与するプラスミドの解析を行うために、伝達実験で得られた伝達株からプラスミドを毎回抽出・解析した。各接合伝達株は数個のプラスミドを保有しており、それぞれの電気泳動バンドパターンは似ていた。数回の伝達実験を繰り返した結果、HGH22 から得られた VCM 耐性伝達株が、単一のプラスミドを保有していることがわかった。そのプラスミドを pUI22 とし、対象と方法に記した方法で切断し、アガロースゲル電

ろ 19 の断片が見られ、その大きさを測定したところ、pUI22 の全体の大きさは約 117 kbp ということがわかった。また、pUI22 を 4 種類の制限酵素 (*BamHI*, *EcoRI*, *NcoI*, *XbaI*) で切断し、その結果から、図 1 に示す制限酵素地図を作成した。

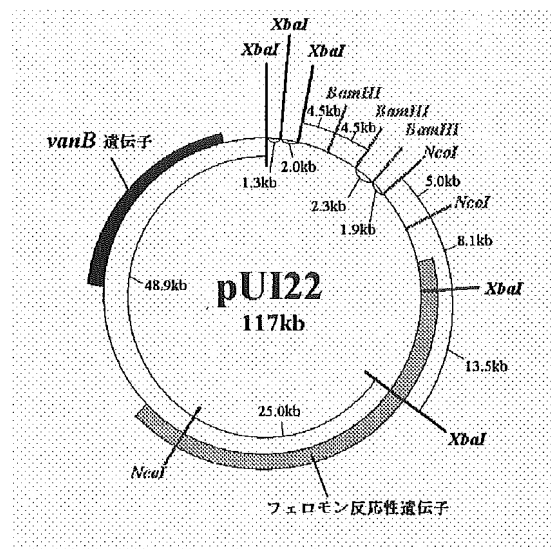


図 1. pUI22 のマップ。DNA の切断に用いた制限酵素は、*BamHI*, *EcoRI*, *NcoI*, *XbaI*。

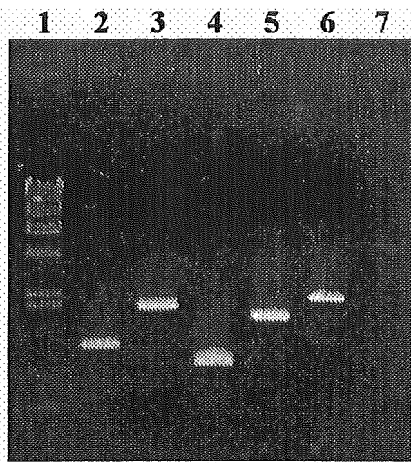


図3. 表2のプライマーを用いたPCRの結果。PCR後の電気泳動の結果を示した。VIの組み合わせでのみ、増幅が行われなかった(lane 7)。Bacteriophage lambdaのDNAをマーカーとして用いた(lane 1)。lane 2、3、4、5、6はそれぞれ順に組み合わせI、II、III、IV、Vである。

### vanB オペロンの解析

プラスミドにコードされている *vanB* オペロンクラスターの構造を調べるために、表2に示されるような6種類のプライマーの組み合わせによって pUI22 に PCR を行った。プライマーの設計に当たっては、これまでにわかっている *vanB* オペロンの塩基配列 (図2) を参考とした。<sup>31</sup> その後、得られた断片それぞれをアガロースゲルで電気泳動したところ図3のような結果が得られた。I~Vの組み合わせではPCRによる遺伝子の増幅がなされたが、VIの組み合わせでは増幅が行われなかった。このことから、図2のIからVまでの領域においてはクラスターの塩基配列が保存されており、*vanXB* の下流で変異または構造変化を起こしていることが推測された。

### vanB 遺伝子の存在確認

pUI22 を *Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I それぞれで切断し電気泳動してみると、図4 (A) の結果が

得られた。*vanB* 遺伝子が得られたプラスミド上にコードされているかどうか、そして存在した場合はその位置を決定するために、このゲルを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。用いた *vanB* 検出用プローブは、pUI22 を V のプライマーの組み合わせで PCR 増幅した DNA 断片である。サザンハイブリダイゼーションの結果は図4 (B) である。いずれのレーンにも発色反応が見られ、pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていることがわかった。(図1)

*vanB* 遺伝子には *VanB1*, *VanB2*, *VanB3* の3つのタイプがあることが知られている。<sup>32</sup> そこで、pUI22 上にコードされている *vanB* 遺伝子がどのタイプであるのか決定するために、この *vanB* 遺伝子に対して DNA sequence を行った。その結果 (data not shown) を、すでに知られている *vanB* のタイプ別の配列 (図5)<sup>32</sup> と比較すると、pUI22 上にコードされている *vanB* 遺伝子のタイプは *vanB2* であることがわかった。

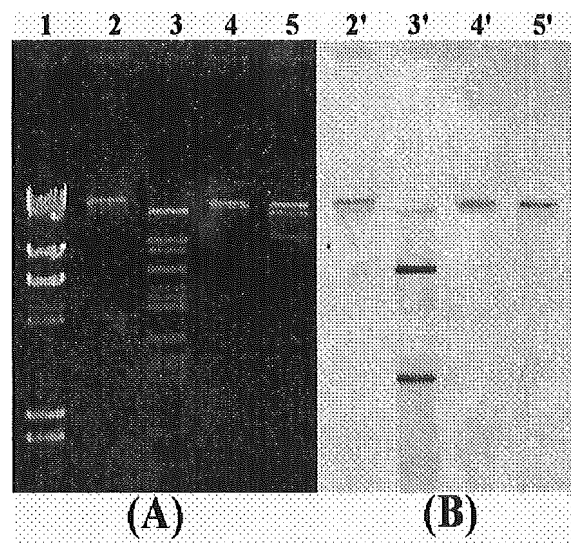


図4. pUI22 の DNA 電気泳動の結果(A)と *vanB* プロブ (*vanB-vanH<sub>B</sub>1* と *vanB-vanN<sub>B</sub>2*) によるサザンハイブリダイゼーションの結果。用いた制限酵素は、*Bam*HI (lane 2, 2'), *Eco*RI (lane 3, 3'), *Nco*I (lane 4, 4'), *Xba*I (lane 5, 5')であった。Bacteriophage lambda の DNA をマ



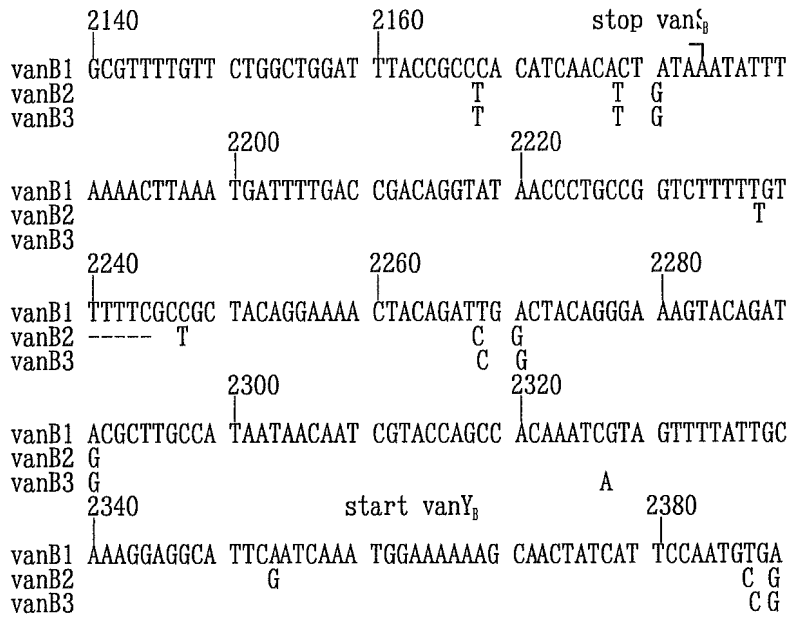


図5. *vanS<sub>B</sub>-vanY<sub>B</sub>*を用いての増幅産物の配列。*vanB1*、*vanB2*、*vanB3*の比較を示した。欠如した塩基はハイフンで示している。

ーカーとして用いた(lane 1)。

#### フェロモン反応性プラスミドの存在確認

菌を液体培地にて培養する過程において、自己凝集が肉眼で確認されたことをふまえて、pUI22上にフェロモン反応性の遺伝子があるかどうかを決定するために、pUI22をEcoRIで切った後、アガロースゲル電気泳動で各断片を分離し(図6(A))、そのゲルを用いてサザンハイブリダイゼー

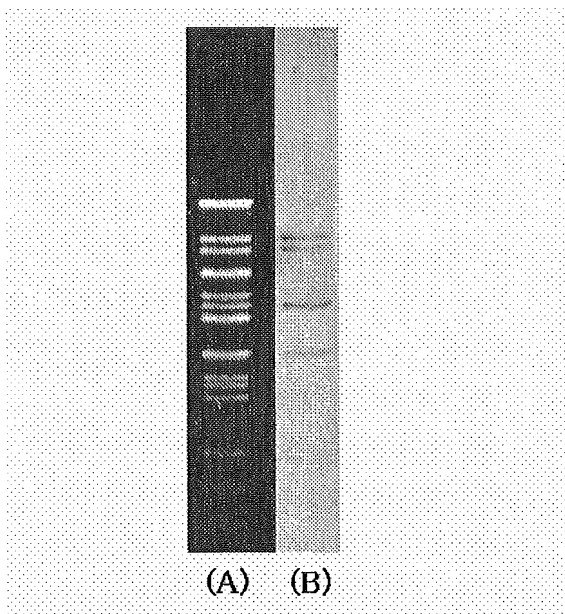


図6. EcoRIを用いて切断されたプラスミド(A)と、pAD1をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼー

ーションにより、フェロモン反応性の遺伝子を検出した結果(B)。

ーションを行った。このときフェロモン反応性遺伝子検出用のプローブとしてpAD1の全プラスミドDNAを用いた。pAD1は、フェロモン反応性のプラスミドとして知られ、その伝達機構も分子レベルで詳しく解析されている。<sup>14,15,33</sup> ハイブリダイゼーションの結果は図6(B)のとおりであり、発色反応が見られた。これにより、pUI22上にはフェロモン反応性の遺伝子群がコードされていることがわかった。また、図4(B)と図6(B)を比較することで、フェロモン反応性の遺伝子と*vanB*遺伝子は違う場所にコードされているということもわかった。(図1)

#### 考 察

抗生剤耐性実験の結果から、pUI22にはVCM以外の抗生剤に対する耐性はコードされていないことが推測された。この*vanB*遺伝子群に対して、複数のプライマーの組み合わせ(表2)によるPCRを行った結果、VIのプライマー*VanB-HB1*、*VanB-NB2*の組み合わせでのみ、その増幅がされ

なかった。VのプライマーVanB-WB1, VanB-XB2の組み合わせでは増幅がなされたということと図2から、 $X_B$ の領域の下流において塩基の変異または構造変化が起きていることが考えられる。

また、サザンハイブリダイゼーションの結果から、pUI22にはフェロモン反応性の遺伝子がコードされているということが明らかとなった。これまでもいくつかのフェロモン反応性のプラスミドは報告されており、その遺伝子群の中にフェロモンによる遺伝子の発現を調節するものを含んでいることがわかっている。こうした遺伝子群は各プラスミドの間で相同性がある。<sup>20,33,34</sup> 今回、菌を培養する過程において、肉眼で判断できるほどの強い自己凝集反応が確認された。このとき、菌は供与菌のみで培養されており、受容菌の分泌する性フェロモンの影響を受けていないはずである。このことは、フェロモン反応を負に調節する遺伝子の領域、*traA* や *traB* などにおいて、なんらかの変異が起こったためと考えられる。<sup>33,36</sup> この凝集は接合伝達に重要なだけでなく、菌の哺乳類細胞への侵入性に関連しており、*E. faecalis* 株における病原因子の一つであることが報告されている。<sup>37</sup>

*vanB* 遺伝子とフェロモン反応性の遺伝子を同時にコードするプラスミドの詳細な構造は、まだ明らかになっていない。このような詳しい解析や実験が、VanB型VREの伝播や院内感染についての理解を深めるために必要である。

## 文 献

1. Reynolds, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994; 8: 943-950
2. Evers, S., P. Courvalin. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS<sub>B</sub>-VanR<sub>B</sub> two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 1302-1309
3. Clewell. D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 1993; 73: 9-12
4. Clewell. D. B. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*, p.349-367. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N.Y., 1993
5. Jett, B. D., M. M. Huyche, M. S. Gilmore. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994; 7: 462-478
6. Schaberg, D. R., M. J. Zervos. Intergenetic and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986; 30: 817-822
7. Dunny, G. M., B. L. Brown, D. B. Clewell. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 3479-3483
8. Clewell, D. B., Y. Yagi, G. M. Dunny, et al. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.*, 1974; 117: 283-289
9. Le Blanc, D. L., L. N. Lee. Physical and genetic analysis of streptococcal plasmid pAM $\beta$ 1 and cloning of its replication region. *J. Bacteriol.*, 1984; 157: 445-453
10. Evans, R. P., F. L. Macrina. Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. *J. Bacteriol.*, 1983; 154: 1347-1355
11. Horodniceanu, T., D. Bouanchaud, G. Bieth, et al. R plasmid in *Streptococcus agalactiae* (group

- B). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1976; 10: 795-801
12. Macrina, F. L., G. L. Archer. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci, p.313-329. *In* D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N. Y., 1993
  13. Clewell, D.B. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.*, 1981; 45: 409-436
  14. Clewell, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 1993; 73: 9-12
  15. Clewell, D. B. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. Plenum Press, New York, 1993; 349-367
  16. Dunny, G.M., B. L. Brown, D. B. Clewell. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 3479-3483
  17. Dunny, G.M., R.A. Craig, R.L. Carron, et al. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid*, 1979; 2: 454-465
  18. Ike, Y. R. C. Craig, B. A. White, et al. Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromone after acquisition of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: 5369-5373
  19. Christie, P.J., G.M. Dunny. Identification of regions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions. *Plasmid*, 1986; 15: 230-241
  20. Fujimoto, S., H. Tomita, E. Wakamatsu, et al. Physical mapping of the conjugative bacteriocin plasmid pPD1 of *Enterococcus faecalis* and identification of the determinant related to the pheromone response. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 5574-5581
  21. Ike, Y., D. B. Clewell. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 8172-8177
  22. Ike, Y., D. B. Clewell, R. A. Segarra, et al. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 155-163
  23. Ike, Y., H. Hashimoto, D. B. Clewell. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1987; 25: 1524-1528
  24. Ozawa, Y., K. Tanimoto, S. Fujimoto, et al. Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 7468-7475
  25. Tanimoto, K., Y. Ozawa, H. Tomita, et al. Cloning and characterization of the *uvr* (ultraviolet resistance) gene on conjugative plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis*. *Dev. Biol. Stand.* 1995; 85: 83-87
  26. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, et al. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 3585-3593
  27. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, et al.

- Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 1997; 179: 7845-7855
28. Kozue Oana, Yoshiyuki Kawakami, Makoto Ohnishi, et al. Molecular and epidemiological study of the first outbreak of vanB type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2001; 54: 17-22
  29. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, et al. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. Inc., New York. 1987
  30. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989
  31. Evers, S., P. Courvalin. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS<sub>B</sub>-VanR<sub>B</sub> two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 1302-1309
  32. Kristin, H., G. Simonsen, O. Olsvik, et al. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant *Enterococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1105-1110
  33. Ike, Y., D. B. Clewell. Genetic analysis of the pAD1 pheromone response *Streptococcus faecalis*, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. *J. Bacteriol.* 1984; 158: 777-783
  34. Galli, D., A. Friesenegger, R. Wirth. Transcriptional control of sex pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 1297-1308
  35. Hirt, H., R. Wirth, A. Muscholl. Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Mol. Gen. Genet.* 1996; 252: 640-647
  36. S. Fujimoto, Don B. Clewell. Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 6430-6435
  37. Carol L. Wells, Elizabeth A. Moore, Julie A. Helmut Hirt, et al. Inducible Expression of *Enterococcus faecalis* Aggregation Substance Surface Protein Facilitates Bacterial Internalization by Cultured Enterocytes. *Infection and Immunity*, Dec. 2000; 7190-7194

20020090

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行物・別冊」をご参照ください。

「研究成果の刊行物・別冊」

Tomita H, Tanimoto K, Hayakawa S, Morinaga K, Ezaki K, Oshima H, Ike Y.

Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*.

J Bacteriol. 2003 Dec;185(23):7024-8.

Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y.

Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan.

Appl Environ Microbiol. 2002 Dec;68(12):6457-61.

Hashimoto Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Murata T, Ike Y.

Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance.

FEMS Microbiol Lett. 2000 Apr 15;185(2):247-54.

Ike Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Nomura T, Fujimoto S, Tomita H.

Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan.

Lancet. 1999 May 29;353(9167):1854.

Fujita N, Yoshimura M, Komori T, Tanimoto K, Ike Y.

First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan.

Antimicrob Agents Chemother. 1998 Aug;42(8):2150.