

アミノグリコシド高度耐性 *Proteus mirabilis* より同定された新規 16S rRNA methyltransferase, RmtC の解析

和知野 純一^{1), 2)}、山根 一和¹⁾、鈴木 里和¹⁾、柴田 尚宏¹⁾、
木村 幸司¹⁾、池 康嘉²⁾、荒川 宜親¹⁾

国立感染症研究所細菌二部¹⁾ 群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学²⁾

【目的】我々はアミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA methyltransferase 遺伝子が腸内細菌科やブドウ糖非醗酵群に属するグラム陰性桿菌の一部に存在することを見出した。現在まで *rmtA*, *rmtB*, *armA* の 3 種類の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子が同定されている。本研究に用いた *P. mirabilis* ARS68 株はアミノグリコシドに高度耐性を示すものの、既知の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子は保有していなかった。そこで新規の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子の保有を疑い、その同定及び解析を行った。

【結果】*P. mirabilis* ARS68 株より抽出した plasmid を *E. coli* DH5 α に形質転換したところ、アミノグリコシドに対して耐性を示すようになった。上記の結果よりアミノグリコシド耐性を付与する遺伝子は plasmid 上に存在する可能性が示唆された。アミノグリコシド耐性遺伝子をクローン化し、塩基配列を決定したところ、新規 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtC*)が同定された。His-tag を付加した RmtC 蛋白は *E. coli* DH5 α より抽出した 16S rRNA を速やかにメチル化した。*rmtC* は transposase gene (*tnpA*)を含む IS*Ecp1*-element の下流に存在し、*rmtC* の転移はこの IS*Ecp1*-element に支配されていた。また、*rmtC* の転写開始点は IS*Ecp1*-element 内に存在した。

【考察】*rmtC* は他の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子と同様トランスポゾンによりその転移が担われていた。既に *armA* に関しては東アジア、ヨーロッパの国々で確認されており、*armA* 同様 *rmtC* に関してもその拡散が懸念される。今後はメチル化部位の特定やこれら 16S rRNA methyltransferase 遺伝子の progenitor strain の特定を行う予定である。

マクロライド耐性マイコプラズマの臨床的評価に関する解析

鈴木里和¹ 久保田眞由美¹ 岡崎則男² 見理剛¹ 山崎勉³ 成田光生⁴ 荒川宜親¹
佐々木次雄¹

1 国立感染症研究所 細菌第二部

2 神奈川県衛生研究所・微生物部

3 埼玉医科大学

4 札幌鉄道病院 小児科

目的：2000年以降わが国において、*Mycoplasma pneumoniae*のマクロライド耐性株の分離が報告されるようになった。*M. pneumoniae*感染症の治療にはマクロライド系抗菌薬の使用が一般的であるが、本抗菌薬の臨床的な効果には抗菌活性以外の作用も示唆されていることから耐性がどの程度臨床経過に影響を及ぼすか明らかでない。そこで *M. pneumoniae* 感染症におけるマクロライド耐性株および感性株それぞれのマクロライド系抗菌薬に対する治療効果について有熱期間を指標として比較検討した。

方法：*M. pneumoniae* 感染症患者を① *M. pneumoniae* の分離又は②咽頭スワブを用いたPCR法で陽性かつPA抗体価でシングル血清640倍以上またはペア血清で4倍以上の違いが認められたものと定義した。PCR法により耐性獲得に関わる23S rRNA遺伝子の変異を検索、変異を認めた株が分離された患者を耐性菌感染患者、変異が認められなかった株が分離された患者を感性菌感染患者とし、38℃以上の発熱が見られた期間を比較した。

結果と考察：耐性菌感染患者11例、感性菌感染患者（対照）26例の解析を行った。全有熱期間は症例が9.2日、対照5.5日（ $P<0.05$ ）であった。さらにマクロライド投与までの有熱期間は両群との間で有意差が見られなかった一方で、マクロライド投与後の有熱期間はそれぞれ4.3日、1.4日（ $P<0.05$ ）と耐性菌感染患者で有意に延長していた。耐性菌感染患者では感性菌感染患者に比べ、全有熱期間およびマクロライド投与後の有熱期間が延長していることからマクロライドの治療効果が低いことが示唆された。今後耐性菌が蔓延した場合には、基礎疾患などで重症化が懸念される患者やマクロライド投与後も発熱が遷延する患者にはテトラサイクリン系薬剤等の投与が検討されると考えられた。

謝辞：本研究において臨床情報を提供していただいた茅ヶ崎市立市民病院小児科 鈴木五三男先生のご協力に深く感謝申し上げます。

VanD4 の遺伝子構造とその発現および染色体 D-Ala:D-Ala ligase 遺伝子について

○谷本弘一¹、野村隆浩²、荒川宜親³、池 康嘉^{1, 2}

¹群馬大学大学院医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設、²同・細菌感染制御学、

³国立感染研細菌第二部

【目的】患者より分離された VRE、*Enterococcus raffinosus* GV5 は日本で最初の VanD 型 VRE で、VanD 型 VRE として最初の *E. raffinosus* である。VanD 型耐性遺伝子群の構造と発現調節を明らかにするために、耐性遺伝子群の全塩基配列の決定と northern hybridization を行った。また、既報の VanD 株の *ddl* 遺伝子は突然変異によって不活化されていることが知られているので GV5 の *ddl* 遺伝子の塩基配列も決定した。

【方法】塩基配列の決定は目的の遺伝子を含む PCR 産物を直接シーケンスすることにより行った。染色体 *ddl* 遺伝子の塩基配列決定にはインバース PCR 法を用いた。*E. raffinosus* の野生型 *ddl* 遺伝子の塩基配列決定には標準株 JCM8733 を用いた。

【結果と考察】DNA 塩基配列の結果から GV5 の耐性遺伝子群は VanD4 型であることがわかった。既報の D4 株の遺伝子群と比較するとアミノ酸置換が VanS_D で 2 カ所、VanH_D に 1 カ所、VanD に 1 カ所見つかった。VanY_D には 1 塩基の挿入が見つかった。VanR_D、VanX_D には変化は見られなかった。*vanS_D*、*vanY_D*、*vanD* 遺伝子をプローブとして northern hybridization を行ったところ、バンコマイシンの有無にかかわらず耐性遺伝子群は転写されていた。この結果から、GV5 の耐性遺伝子群の発現は既報の VanD 型 VRE 同様に constitutive であることがわかった。既報の VanD 型 VRE においては 1 株をのぞき 2 成分系のセンサー蛋白である VanS_D に変異があることが知られている。アミノ酸置換や挿入・欠失によるフレームシフトによって VanS_D の脱リン酸化活性のみが損なわれ活性化された VanR_D (調節蛋白) が蓄積することによって常に耐性遺伝子群が発現しているとされている。VanR_D へのリン酸の受け渡しを行う His 残基周辺のアミノ酸置換で脱リン酸化活性のみが損なわれることが知られているが、GV5 ではこの領域にアミノ酸置換が起こっていた。このような株の *ddl* 遺伝子(D-Ala:D-Ala ligase)は変異を持ち活性をなくしていることが知られている。GV5 と *E. raffinosus* 標準株 JCM8733 の *ddl* 遺伝子の塩基配列から GV5 は 2 つのアミノ酸置換を C 末領域に持っていたが挿入・欠失変異はなく、活性を失いかねない明らかな変異はなかった。しかしながら、GV5 における 2 つのアミノ酸置換のうち 1 つが ATP 結合に関与している領域にありこの変異により *ddl* 遺伝子が不活化されているかもしれない。

大腸菌におけるレボフロキサシン耐性化の検討

北里大学大学院 医療系研究科 環境感染学

○ 石川直人、中野竜一、長野則之、前山佳彦、井上松久、岡本了一

【目的】近年、海外におけるフルオロキノロン耐性大腸菌に関する報告が多く、我が国においても 2000 年以降、増加傾向にある。我々は全国 5 施設から収集したレボフロキサシン (LVFX) 耐性大腸菌を調べたところ、(1)血清型に偏りがあり、特に O25:F4a 型が 51%と多く分離されたこと。(2)この血清型の菌株は全て GyrA および ParC それぞれに2箇所ずつ合わせて 4 箇所のアミノ酸変異を生じていたこと。(3)PFGE によりこれら菌株は、単一菌株の拡散ではないことをすでに報告している。フルオロキノロン耐性菌は段階的な変異にともなうアミノ酸変異を生じることより高度耐性を獲得すると考えられている。そこで、O25:F4a 型の LVFX 感受性大腸菌と LVFX を用いて耐性化の過程について検証を行った。

【方法】LVFX 感受性菌 QR22 を LB broth で培養した後、LVFX (MIC、2MIC、4MIC) 含有培地に植え、35°Cにて 72 時間培養を行い、LVFX 耐性変異株を選択した。得られた変異株については感受性試験を行うとともに *gyrA* および *parC* のキノロン耐性決定領域を含む部分を PCR にて増幅し、DNA 塩基配列を決定した。

【結果と考察】①第一段階における変異は GyrA83、84、87 番目のいずれかに生じていた。しかし、ParC における変異は認められなかった。②LVFX の低濃度選択においては GyrA87 番目に、高濃度選択においては GyrA83 番目にアミノ酸変異が生じやすい傾向が認められた。③変異株は感受性菌の薬剤感受性と比較するとナリジクス酸 (NA) で 4-32 倍、シプロフロキサシン (CPF) で 4-16 倍、LVFX では 2-8 倍の上昇が認められた。④GyrA83 番目の変異株を用いて第二段階の検討を行ったところ GyrA および ParC ともにアミノ酸変異の追加が認められなかった。しかし、感受性試験においては NA で 2-8 倍、CPF で 2-8 倍、LVFX では 2-16 倍の上昇が認められた。以上より、LVFX 用いた耐性菌選択の第一段階では、耐性菌は比較的容易に選択されるものの耐性度は低く、GyrA が1箇所変異したものが多く選択された。また、GyrA に認められるアミノ酸変異部位は選択薬剤の濃度に関連していることが示唆された。次いで、第二段階の選択でも耐性菌は比較的容易に選択されるものの、今回の実験条件では GyrA あるいは ParC に追加変異の認められた株は選択されず、GyrA や ParC に追加変異が導入される頻度は予想外に低いものと考えられた。しかし、臨床から最も高頻度に分離される O25:F4a 型の LVFX 耐性菌の多くは GyrA および ParC にそれぞれ2箇所ずつのアミノ酸変異が認められており、これら臨床分離菌における LVFX 耐性化の過程を考えると、単に段階的な変異の蓄積によるものばかりではなく、ほかの耐性獲得メカニズムをも考慮する必要があると考えられた。

ジャイレースおよびトポイソメラーゼIV変異をともなうキノロン耐性伝達の可能性について

北里大学医学部微生物学

岡本了一、石川直人、佐藤優子、中野竜一、前山佳彦、長野則之、井上松久

【背景および目的】わが国でも2000年以降レボフロキサシン(LVFX)耐性大腸菌が増加傾向にある。我々は、これらLVFX耐性菌のジャイレース遺伝子(*gyrA*)およびトポイソメラーゼIV遺伝子(*parC*)を解析し、それぞれに2箇所ずつアミノ酸置換された耐性菌が多く検出されることを学会報告した。これら*gyrA*あるいは*parC*の変異をともなうLVFX耐性は、段階的な変異の蓄積によって高度耐性化すると考えられており、変異した*gyrA*や*parC*が伝達されて耐性化することはほとんど考慮されていない。しかしながら、大腸菌では染色体上の種々の遺伝子が伝達性プラスミドの共存下で伝達されることが既に明らかになっていることから、染色体上に存在する*gyrA/parC*についても例外ではないと考え、*gyrA/parC*の変異をともなうキノロン耐性伝達の可能性について検討した。

【方法】臨床分離LVFX耐性大腸菌QR-34株はキノロン以外の耐性は保有しておらず、*gyrA*および*parC*にそれぞれアミノ酸置換をともなう変異が2箇所ずつ存在する菌株である。本菌に高頻度接合伝達性プラスミドR9-5 [クロラムフェニコール(Cp)耐性]を伝達させた株QR-34 (R9-5)を作成し、供与菌として用いた。受容菌として大腸菌 χ 1038Rif由来のKU6670str株を用いた。KU6670str株はRif、*lac*⁻、*ampD*::IS2、*str*をマーカーとして持っている。接合伝達は液体培養法で行い、選択薬剤としてナリジクス酸(NA)あるいはLVFXを用いた。伝達株については、*gyrA*および*parC*のキノロン耐性決定領域(QRDR)を含む領域をPCR増幅した後、シーケンスを行った。

【結果・考察】1) KU6670strを受容菌とした時のQR-34 (R9-5)からのキノロン耐性伝達頻度は、NAあるいはLVFX選択した場合、それぞれ 1.8×10^{-7} 、 1.7×10^{-9} であった。一方、KU6670str株から同様の薬剤で選択した場合の耐性変異株の出現頻度は、NA/RifあるいはLVFX/Rif選択でそれぞれ 8.1×10^{-9} および $< 1.5 \times 10^{-10}$ であり、明らかにキノロン耐性が伝達されたと考えられた。2) キノロン耐性が伝達されたことを確認するために、選択には用いていないマーカー(*lac*⁻、*ampD*::IS2、*str*)について確認したところ、すべての株でキノロン耐性が伝達されたことが確認できた。3) キノロン耐性伝達株の*gyrA*および*parC*のQRDR領域の塩基配列を調べたところ、NA選択株では*gyrA*が、LVFX選択株では*gyrA*および*parC*がQR-34 (R9-5)から由来していることが確認された。4) さらに、伝達実験で得られた変異*gyrA*の伝達株を受容菌とした時のQR-34 (R9-5)からのキノロン耐性伝達頻度は、LVFX/Rif選択した場合 3.2×10^{-8} であった。5) すべての伝達株でR9-5のマーカーであるCp耐性であることが確認され、さらにこのCp耐性は高頻度に再伝達された。

以上、大腸菌においては伝達性プラスミドの共存下で染色体上の*gyrA*および*parC*の変異をともなうキノロン耐性が伝達されることが実験的に証明された。その頻度は低いもののキノロン耐性大腸菌増加の一因となっている可能性も考えられた。また、キノロン耐性の伝達はHfr形成によるものではなく、伝達性プラスミドによる染色体遺伝子の可動化によるものと考えられた。

臨床分離されたセフェム系薬高度耐性 *Proteus mirabilis* の現状

北里大学大学院 医療系研究科 環境感染学¹、北里大学 医療衛生学部 臨床検査学²

中野竜一¹、岡本了一¹、前山佳彦¹、石川直人¹、阿部美知子²、井上松久¹

【目的】 尿路感染症などの原因菌 *Proteus mirabilis* は元来、 β -lactam 薬に対する感受性が良好なことから臨床上あまり重要視されていなかったが、この数年欧州においてセフェム系薬耐性菌の検出が報告されている。本邦においても耐性菌が検出され始めたので、薬剤感受性の疫学調査ならびにその耐性機構を明らかにした。

【方法】 神奈川県異なる地区の7医療施設より2004年6月から2005年5月に分離された重複を含まない *P. mirabilis* を296株収集した。CLSI法に基づくESBLスクリーニングテスト陽性株について、寒天平板希釈法にてMIC測定を行った。薬剤耐性遺伝子を同定するためにPCRならびにシーケンスを行った。耐性菌の同一性についてはDiene's test およびパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により検討した。さらに、耐性遺伝子拡散への関与が疑われるISやIntについても検討した。

【結果】 ESBLスクリーニングテスト陽性菌114株(38.5%)はCTXに対するMICがいずれも16 μ g/ml以上であったが、阻害剤CVA添加により0.25 μ g/ml \leq 0.06 μ g/mlまで低下した。PCRおよびシーケンスの結果、いずれもCTX-M-2グループ β -lactamaseを保有している事がわかった。PFGEの結果、類似パターンを示すものがいくつかあるものの複数の異なるパターンを示すものがあることがわかった。いずれもISEcp1をコードしており、加えてIS26やIntを保有する株も検出された。

これらセフェム系薬耐性菌のうち59.6%はLVFXに耐性を示していた。耐性菌は*gyrA*や*parC*にアミノ酸変異を伴っていた。

【考察】 神奈川県下の複数施設で同時期、多量発生的にCTX-M-2グループ β -lactamase産生 *P. mirabilis* が分離された。いずれもCTXなどのセフェム系薬に高度耐性を示し、同時にキノロン系薬にも耐性を示すものが多く検出された。これらは院内感染等による単一クローンの拡散ではなく地域内の同菌種の拡散であることから、セフェム系薬耐性 *P. mirabilis* の地域を越えての蔓延が疑われる。セフェム系薬、キノロン系薬ともに耐性を示す菌の出現はその治療がより困難となることからその動向には注意が必要である。

臨床分離株におけるβ-ラクタマーゼ産生菌の実態

北里大学大学院 医療系研究科 環境感染学¹、北里大学 医療衛生学部 臨床検査学²

前山佳彦¹、中野竜一¹、石川直人¹、阿部美知子²、井上松久¹、岡本了一¹

【目的】臨床現場ではβ-ラクタム系薬の繁用に伴いβ-ラクタマーゼ産生による耐性菌の出現が問題となっている。そこで、臨床より分離された腸内細菌科でセフェム系薬耐性菌について実態調査をした。

【方法】2004年6月から2005年5月までに神奈川県下の異なる地区の病院7施設より、CLSIガイドラインに従いESBL産生が疑われるセフェム系薬耐性菌を収集した。対象菌株は*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*K. oxytoca*とした。MIC、P/C ase TESTおよびSMAディスクの結果を基にESBLs、プラスミド性AmpC β-ラクタマーゼ(pAmpC)、Metallo β-ラクタマーゼを推定し、PCRにて同定した。ESBLsのうちCTX-Mについてはそのグループの型別およびそれに伴う挿入配列(IS)やインテグロン(Int)を検出するため、PCR-RFLPおよびPCRを実施した。

【結果】各施設より分離された臨床株を菌種ごとに集計して分離頻度(セフェム系薬耐性菌株数/病院より分離された菌株数)を求めた結果、*E. coli*; 172/3929 (4.4%)、*K. pneumoniae*; 17/1575 (1.1%)、*K. oxytoca*; 30/567 (5.3%)であった。また、PCRにより同定した各β-ラクタマーゼの割合(β-ラクタマーゼ型別による菌株数/セフェム系薬耐性菌株数)は、*E. coli*ではESBLs、染色体性AmpC、pAmpC、Metalloおよびこれら以外が、それぞれ43株(25.0%)、89株(51.7%)、9株(5.2%)、5株(2.9%)、26株(15.1%)であった。同様に*K. pneumoniae*ではESBLs、pAmpC、Metalloおよびこれら以外がそれぞれ7株(41.2%)、3株(17.6%)、4株(23.5%)、3株(17.6%)であり、*K. oxytoca*ではESBLsおよび染色体性OXYがそれぞれ6株(20.0%)、24株(80.0%)であった。

三菌種から検出された全てのESBLsについてタイプを調べたところ、CTX-M、TEM、CTX-M&TEM、SHVおよびTEM&SHVがそれぞれ21、17、15、2、1株検出された。同様にpAmpCではCMY(*Citrobacter*型)およびDHAがそれぞれ2株、7株であり、MetalloではIMPが9株検出された。また、DHA&TEM、DHA&SHVあるいはCMY&TEMといった複数のβ-ラクタマーゼを産生する菌株がそれぞれ1株ずつ検出された。

次いでCTX-M36株についてそのグループ型別を調べたところ、CTX-M-1グループ、CTX-M-2グループおよびCTX-M-9グループがそれぞれ7、5、24株検出された。さらに、これらについてはISならびにIntの保有状況を調べたところ、IS*Ecp1*が32株と最も多く検出され、その多くは同時にIS26やInt1を多様な組み合わせで保有していることが確認された。

【考察】今回の結果ではCTX-M ESBLsが広く分布しており、中でも、CTX-M-9グループが高い割合であることが確認された。また、CTX-M遺伝子に伴ったISならびにIntを調べた結果、IS*Ecp1*、IS26およびInt1の多様な組み合わせが検出されたとともに、これまでに報告のなかったIS26のみに担われている菌株も検出された。このことより、多様な耐性化の過程が示唆された。一方、これまで我が国において検出例の少なかったTEM ESBLsも多数検出されたことから今後このタイプの拡散が懸念される。さらに、第三世代セフェム系やセファマイシン系薬に対して高度耐性化するプラスミド性AmpC β-ラクタマーゼ産生菌やカルバペネム系薬を加水分解するMetallo β-ラクタマーゼ産生菌に加え複数のβ-ラクタマーゼを産生する菌株も分離されたことから、治療に伴う薬剤の選択には十分な考慮が必要であると考えられる。

新興薬剤耐性菌が産生するメタロ-β-ラクタマーゼ(VIM-2)の X 線結晶構造解析

(熊本大院・薬・構造機能物理化学¹、熊本大院・薬・機能分子構造解析学²、国立感染研³)

○松永 和代¹、山口 佳宏¹、金 万春¹、村上慧海¹、佐藤 源太¹、
池水 信二²、山縣 ゆり子²、荒川 宜親³、黒崎 博雅¹

β-ラクタム剤は感染症の治療で繁用されている抗菌剤である。しかし、これらに対する薬剤耐性菌が院内感染の要因ともなっており、主な耐性機構として薬剤不活化酵素であるβ-ラクタマーゼの産生が挙げられる。Zn(II)を活性中心に持つメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) はカルペネムを含むほとんどすべてのβ-ラクタム剤を加水分解し、有効な阻害剤がないことからその酵素を産生する菌の蔓延が危惧されている。

IMP-1、VIM-2 は耐性遺伝子をプラスミド上に持つ MBL でそれぞれ日本とヨーロッパで発見され、水平的な伝播により世界中に拡散しつつある。そこで、IMP-1、VIM-2 の両方に有効な阻害剤の開発を目的として、Zn(II)に結合するチオール基と、酵素との疎水的相互作用を期待するフェニル基を有した 2-mercaptomethyl-5-phenyl-pentanoic acid (PhenylC3SH) の合成を行い、VIM-2 との共結晶の X 線結晶構造解析を行った。

VIM-2 と PhenylC3SH (IC₅₀=1.2 μM) の共結晶は蒸気拡散法で調製し、SPring-8 で X 線回折データを回収し、構造解析を行った。空間群 P2₁2₁2₁ で分解能は 2.3 Å とし、構造解析は多波長異常分散法 (MAD 法) を用いた。VIM-2 は αβ/βα 構造をとっており活性中心 (Fig.1) には 2 つの Zn(II) が存在し、一方の Zn(II) は 3 つの His、他方の Zn(II) は His, Asp, Cys が配位している、他の多くのメタロ-β-ラクタマーゼと同様であった。Zn-Zn 間は 3.8 Å であった。PhenylC3SH はラセミ体で合成されたが結晶構造中では S 体の構造で、チオール基は 2 つの Zn(II) に架橋して配位し、フェニル基は Tyr67 と face-to-face で相互作用していることがわかった。また Phe62 が PhenylC3SH のメチレン鎖と相互作用していることがわかった。カルボキシル基は VIM-2 のどのアミノ酸残基とも相互作用していなかった。

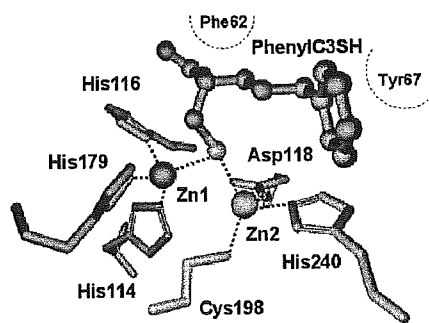


Fig.1 The active site of VIM-2 complexed with PhenylC3SH

Chryseobacterium indologenes 由来の metallo- β -lactamase (IND-1a)の

2.2 Å 分解能での X 線結晶構造解析

(熊本大院・薬・構造機能物理化学¹、国立感染研²、熊本大院・薬・機能分子構造解析学³)

○高潮 信寿¹、山口 佳宏¹、和知野 純一²、柴田 尚宏²、
湯本陽香¹、山縣 ゆり子³、荒川 宜親²、黒崎 博雅¹

β -ラクタム剤は感染症治療において最も汎用されている抗生物質である。しかし近年、薬剤耐性菌の問題があり、その原因の1つとして β -ラクタム環を加水分解する β -lactamaseの産生があげられる。 β -lactamaseはアミノ酸の相同性からClass A~Dに分類されており、Class A, C, Dは活性中心にセリン残基を有するserine- β -lactamasesである。しかし、これらのほとんどは既存の β -lactamase阻害剤が有効であり、カルバペネム剤を加水分解できない。一方、Class Bに属するmetallo- β -lactamases (MBLs)は活性中心にZn(II)イオンを含み、既存の β -lactamase阻害剤が効かず、カルバペネム剤を含むほとんど全ての β -ラクタム剤が加水分解されることから、MBLs阻害剤の開発が急務とされている。そこで、今回我々はMBLsの β -ラクタム剤の加水分解反応と構造に立脚した阻害剤を設計するために胆道感染症、腹腔内感染症などの起因菌である*Chryseobacterium indologenes*由来のMBL (IND-1a)のX線結晶構造解析を行った。

IND-1aの結晶は、Hanging drop法、37°Cにおいて約2週間で調製することができた。X線解析データはSPring-8、BL38B1で収集した。分解能は2.2 Åとし、空間群は $P2_1$ に属していた。IND-1aの構造は他のMBLsと同様に $\alpha\beta/\beta\alpha$ モチーフ構造をとっており、活性中心に2つのZn(II)イオンが観察された(Fig. 1.)。活性中心に存在する1つ目のZn(II)イオンは、His116, His118, His196と2つのZn(II)イオンを架橋し、 β -ラクタム環を求核攻撃する水分子(Wat)が配位し、四面体構造をとっていることがわかった。2つ目のZn(II)イオンは、Asp120, Cys221, His263と水分子(Wat)が配位していることがわかった。また、Zn(II)イオンに配位していないAsp120の酸素原子は水分子(Wat)と水素結合していることがわかった。このことより、Asp120は水分子(Wat)の求核攻撃の方向付けに関与すると考えられる。

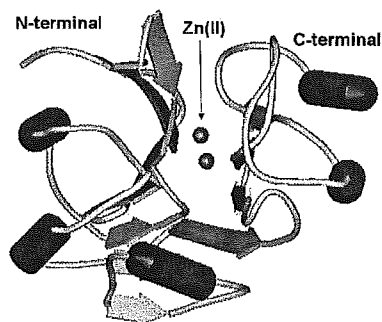


Fig. 1. The overall structure of IND-1a

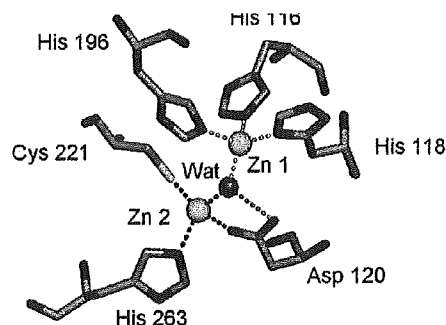


Fig. 2. The active site of IND-1a

臨床分離および環境分離セラチア菌の抗菌薬耐性の比較

¹京都薬科大学・微生物、²宮崎大・フロンティア科学実験総合センター

小松 春伸¹、永屋 豊¹、野口 薫¹、林 良壮¹、小川 倫洋¹、上村 由紀子¹、宮本 知佳¹、松瀬 仁¹、
松山 倫子¹、小椋 義俊²、林 哲也²、○後藤直正¹

[背景と目的] セラチア菌 (*Serratia marcescens*) はヒトや動物のみならず、土壌や水系などの環境に広く生息する腸内細菌科のグラム陰性菌であり、免疫力が低下した患者に、肺炎、敗血症、心内膜炎、尿路感染等多様な病態を引き起こす日和見感染菌のひとつである。わが国では2000年および2002年に本菌の点滴液中への混入によるアウトブレイクが発生している。私どものグループは本菌病原性の解明を目的として、血液感染症から分離された抗菌薬多剤耐性株 SM39 株のゲノム配列を決定し解析した(図1)。本株の染色体上にはベータラクタマーゼ (*ampC*)、アミノ配糖体不活化酵素 (*aac*)、抗菌薬排出システム遺伝子群など抗菌薬耐性に働く多数の遺伝子がコードされていることが分かった。さらに、本菌株は抗菌薬や消毒薬に対する耐性遺伝子 (*bla*_{IMP}, *bla*_{CTMX-8}, *qacE*, *aad*, *aac*) を多数保持する pSMA1 と明確な遺伝子は同定されないが伝達性のプラスミド

pSMA2 が存在することが分かった。以上のような背景のもと、セラチア菌の多剤耐性の本体を理解するために、SM39 株からプラスミドを脱落させた株を作成し、さらに土壌から分離した環境株と臨床分離株の抗菌薬感受性を比較した。

[方法] 1) 使用菌株: 土壌(京都市山科地区およびチリ・アートファンガスタ地区)からのセラチア菌(環境株)の分離: 近辺に病院など医療機関のない地域の土壌を

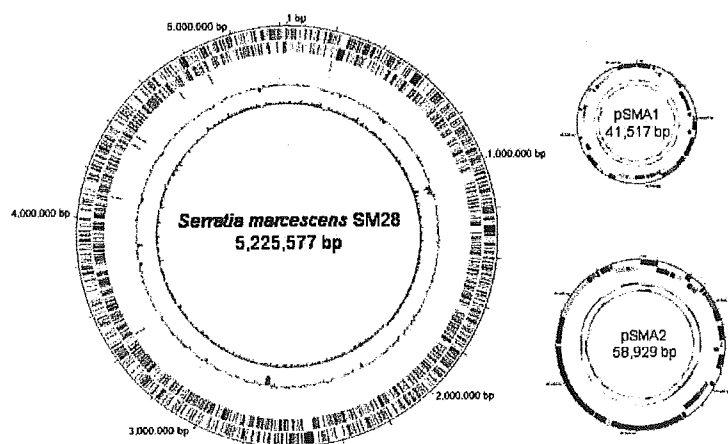


図1 セラチア SM39 株のゲノム構造

採取し、滅菌水に懸濁後、低速遠心によって不溶物を沈殿させた。上清を採取し、高速遠心し、不溶物を濃縮し、Deoxyribonuclease -toluidine blue-cephalothin (DTC) 培地に塗抹した。37°Cで培養後に出現したコロニーを分離培養後、再度、DTC 培地での増殖性を確認した。その後、フェニックスシステムによって菌種の同定を行った。また、臨床分離株は東邦大学・大森病院、鳥取大学病院および産業医科大学病院から分与された。

2) 系統解析: House-keeping 遺伝子である *aroE*, *mdh*, *icd* および *mtlD* 遺伝子の配列を決定し、得られた配列から multilocus sequence typing (MLST) によって系統解析を行った。

3) プラスミドの脱落: 高温 (42°C) での培養や抗菌性色素やキノロン系抗菌薬存在下での培養により、プラスミド

クラス A に属するカルバペネマーゼ、KPC-3、の酵素学的特徴

山口恵三¹⁾、Alba, Jimena¹⁾、Thomson, Kenneth²⁾、Moland, Ellen Smith²⁾ ○石井良和¹⁾

- 1) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
- 2) Creighton University School of Medicine

【背景と目的】カルバペネム系薬はβラクタマーゼに安定な抗菌薬として知られているが、本邦ではこれを分解する、IMP-1などの、クラス B に属するβラクタマーゼを産生する *Pseudomonas aeruginosa* や腸内細菌科に属する菌種が臨床材料から分離され、問題視されている。欧米においてもクラス B に属する酵素産生株が分離されているが、これに加えてクラス A やクラス D に属するカルバペネム分解能を有するβラクタマーゼを産生する菌株も分離されている。その中でも、Tisch Hospital (New York)の集中治療室において発生した KPC-3 産生 *Klebsiella pneumoniae* は1年間に24人の患者に感染を起こしたことなど注目すべき点が多い (Woodford N. et al., 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 4793-4799)。幸いにも本邦ではクラス A あるいはクラス D に属するカルバペネマーゼ産生株は報告されていないが、この種の酵素の特徴を把握し、治療薬を選定しておくことは極めて重要なことであると考えられる。今回は、KPC-3 の酵素学的特徴を把握するために詳細なパラメータを算出することを目的に検討を行った。

【方法】KPC-3 産生 *Escherichia coli* 233 株は Hachensack University 付属病院から分与を受けた。KPC-3 の構造遺伝子は組換えせず、4L の LB 培地で直接 *E. coli* 2332 を培養した。菌体は遠心集菌後、Lysozyme-EDTA 法にて periplasmic 画分を得た。得られた periplasmic 画分は、10mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して透析後、HiPrep 16/10 SP XL カラムを用いて塩化ナトリウムのリニアグラジエントにより KPC-3 を溶出させた。KPC-3 を含むフラクションは、nitrocefin を用いて酵素活性を確認し、活性画分を集めた。集められた活性画分は限外濾過にて濃縮後、10mM MES 緩衝液 (pH 5.5) に対して透析後、Mono S HR 5/5 カラムを用いて塩化ナトリウムのリニアグラジエントにより KPC-3 を溶出させた。溶出画分は SDS 電気泳動法にて純度を確認し、90% 以上の KPC-3 を含むフラクションのみを酵素学的検討に供した。同時に本フラクションを用いて KPC-3 の N-末端アミノ酸配列を決定した。酵素学的パラメータは、精製酵素と基質を一定時間、30°C で反応させ、分解前の吸光度と反応終了時の分解産物の差を基に、Hanes-Woolf プロットを用いて各種パラメータを算出した。Moxalactam と cefoxitin は、reporter substrate として nitrocefin を用いた。それ以外の基質は、直接 KPC-3 し、吸光度変化を観察した。

【結果および考察】KPC-3 の N-末端アミノ酸配列は LTNLVAEPFAKLE であり、コンピュータにより予測されるシグナルペプチドを切断した後の配列と一致した。本酵素が最も高い加水分解効率を示した基質は、nitrocefin と cephalothin であり、 k_{cat}/K_m 値は夫々 $2.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $3.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の値を示した。Cephalothin の k_{cat} および K_m 値は夫々 264 s^{-1} および $261 \mu\text{M}$ と極めて高値を示した。Imipenem と meropenem は KPC-3 に対する好適基質であり、 k_{cat}/K_m 値は夫々 $1.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $1.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。全体的に KPC-3 は KPC-1 および KPC-2 の酵素学的パラメータと類似の値を示した。しかし、詳細にそのパラメータを見てみると、KPC-3 が他の KPC-型酵素と比較して、ceftazidime に対する k_{cat} 値が高いこと、cefoxitin の K_m 値が高いことなどいくつかの相違点を認めた。KPC-3 は KPC-2 と 1 アミノ酸残基 (H272Y) を異にするのみである。KPC-型βラクタマーゼの 272 番目のアミノ酸は、同じクラス A に属する酵素の一つである、CTX-M-44 (Toho-1) の 274 番目のアルギニンに相当するアミノ酸残基であると考えられる。CTX-M-44 のデータを基に、コンピュータモデリングによる KPC-3 の構造を予測した。その結果、本アミノ酸残基は、基質のカルボン酸と相互作用すると考えられる、KPC-型酵素の 209 番目のアルギニンに影響を与える可能性が示唆された。

フルオロキノロン高度耐性 *Proteus mirabilis* の耐性機構

高屋明子、友安俊文、山本友子

(千葉大・院薬・微生物薬品化学)

フルオロキノロンは、臨床において最も繁用されている抗菌薬のひとつであるが、近年多くの菌種が耐性化の傾向にあり、また高度耐性菌の出現が危惧されている。フルオロキノロンは尿路感染症において最も高頻度で使用されていることから、我々は尿路より分離される臨床分離株のフルオロキノロン耐性について検討した。レボフロキサシン (LVFX) に対する MIC を測定した結果、多くの菌種で高度耐性化が認められた。また尿路より比較的高頻度に分離される *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) では、MIC 1024 μ g/mL を示す超高度耐性菌が存在した。*P. mirabilis* のフルオロキノロン耐性化機構については報告例が少なく、また超高度耐性については未だ報告されていないことから、本研究ではこの耐性化機構を明らかにする目的で以下の検討を行った。まず、フルオロキノロン耐性の主要因である DNA gyrase 遺伝子 *gyrA*、*gyrB* および Topoisomerase IV 遺伝子 *parC*、*parE* 変異について解析を行った。その結果、LVFX に対する MIC が 2 μ g/mL 以上を示す全ての耐性菌において、GyrA の変異 (Ser83Ile まれに Glu87Lys) と ParC の変異 (Ser80Arg or Ile) が認められた。一方、MIC が 128-1024 μ g/mL を示す高度耐性菌においては、GyrA、ParC の変異に加えて GyrB の変異 (Ser462Tyr or Phe) が共通に認められたことから、他の近縁菌種とは異なり、*P. mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性においては GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。次に、薬剤ポンプによるフルオロキノロン耐性への寄与について検討するため、菌体内に存在する LVFX の蓄積を調べた。MIC 16-1024 μ g/mL を示した 10 株について比較検討した結果、LVFX の細胞内蓄積は同程度であった。このことから、超高度耐性化における薬剤ポンプの関与は低いと考えられる。以上の結果から、*P. mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性においては、他の近縁菌種で報告のある *gyrA*、*parC* の変異および薬剤ポンプの関与に加えて *gyrB* の変異が重要であることが示された。しかしながら、MIC 256 μ g/mL を示す株でこれら全ての変異を獲得していたことから、MIC 1024 μ g/mL の超高度耐性株では新たなフルオロキノロン耐性化機構を獲得している可能性が考えられる。今後この耐性化機構が明らかにされれば、未知のフルオロキノロンの標的因子の解明や新たな薬剤開発の手がかりとなることが期待される。

β-ラクタム剤に対する耐性度が低下した変異株を生じる肺炎球菌の解析

和田昭仁¹、岡田千香子²、稲川裕子²、米山彰子²

(1, 感染研 細菌第一部; 2, 虎の門病院 臨床感染症部)

肺炎球菌は、呼吸器感染症の主要な起炎菌であるばかりでなく中耳炎、敗血症、髄膜炎の起炎菌としても重要であり、この菌のβ-ラクタム剤に対する耐性度の上昇は治療上の問題となっている。この耐性は主として細胞壁を合成するペニシリン結合蛋白(PBP)の変異によるものであるが、類似した PBP 遺伝子変異を持つ菌が異なる耐性度をしめす場合があり、β-ラクタム剤に対する高度耐性化には PBP 遺伝子以外のどのような変異が必要なのか、詳細は不明のままである。今回、われわれは小児の咽頭から分離されたペニシリン耐性肺炎球菌の解析をおこなったので報告する。

【方法】菌の培養にはヒツジ血液寒天 EX (Nissui)をもちいた。MIC は、CLSI (NCCLS) M7-A6, M100-S15 に準拠し(37°C, 22 h, 大気)、ドライプレート(栄研化学)をもちいて測定した。血清型は Statens Seruminstitut の群別ならびに因子血清をもちいて膨潤法により判定した。競合 PBP アッセイのために、マイクロビーズ法により菌体を破碎して調製した膜画分をもちい、これと、蛍光ラベルペニシリン (Bocillin FL, Molecular Probe) および非ラベル PCG の反応性を測定した。PBP 遺伝子の塩基配列解析のために、PBP1a, PBP2x, PBP2b の遺伝子 *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* の一部を PCR にて増幅し、その配列を決定した。

【結果と考察】分離株を血液寒天で培養したところ、扁平で内部が陥凹したタイプのコロニー (SP111)に混じり、厚みがあり中央部の陥凹がはっきりしないコロニー (SP112)を生じた。各々を血液寒天で継代すると、SP111 からは再び SP112 タイプのコロニーが約 1/100 の割合で形成されたが、SP112 からは SP111 タイプのコロニーが現れることはなかった。SP111 と SP112 はともに血清型 19F であり、複数の制限酵素を用いたパルスフィールドゲル電気泳動によっても、両者のゲノムパターンを区別することはできなかった。SP111 と SP112 では、β-ラクタム剤に対する感受性に 2-4 倍の差が見られた(SP111 [PCG, 8; ABPC, 16]; SP112 [PCG, 2; ABPC, 8])。この原因を調べる目的で、競合 PBP アッセイを行ったが、SP111、SP112 に共通して PBP1a, PBP2x, PBP2b に対する PCG の結合性の低下は見られたものの、SP111 と SP112 間で結合性に差は見られなかった。また、*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* すべてに耐性型の変異が存在したが、SP111 と SP112 間の相違は見られなかった。SP111 と SP112 では莢膜の厚さが異なることが観察されたが、これが感受性の差の原因であるかどうかは不明である。また、ABPC の MIC が PCG よりも高い現象は PBP の変異だけからは説明することができず、今後の解析が必要である。

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

「新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び

迅速・簡便検出法に関する研究(H15-新興-9)」

第2回班会議抄録

日 時 : 平成18年1月14日(土)13:00~17:00

場 所 : 国立感染症研究所(戸山庁舎) 会議室

(東京都新宿区戸山1-23-1)

プログラム

1. プラスミド性セフェム薬耐性菌の検出と耐性発現に関わる挿入配列の解析
分担研究者：井上松久
研究協力者：岡本了一、中野竜一、兼子謙一、前山佳彦、石川直人
北里大学医学部微生物学
2. クラス A に属するカルバペネマーゼ、KPC-3、の酵素学的特徴
分担研究者：山口恵三
研究協力者：Alba, Jimena、○木村聡一郎、石井良和
東邦大学医学部微生物・感染症学講座
3. カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究
部位特異的変異体、速度論的解析およびX線結晶構造解析を用いたメタロ- β -ラクタマーゼの Asp120(81)の役割の検討
分担研究者：黒崎博雅¹
協力研究者：山口佳宏¹、和知野純一²、柴田尚弘²、荒川宜親²
熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野¹、国立感染症研究所細菌第二部²
4. 緑膿菌のマルチコンポーネント型 RND 型排出システムの機能解析
分担研究者：後藤直正
研究協力者：小川倫洋、皆川 周、山口 藍
京都薬科大学・微生物学教室
5. 呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の迅速検索法の確立
分担研究者：生方 公子
北里大学北里生命科学研究所 感染情報学研究室
6. β -ラクタム剤に対する耐性度が低下した変異株を生じる肺炎球菌の解析
研究協力者：和田昭仁
国立感染症研究所・細菌第一部
7. 臨床分離 *Proteus mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性化機構
分担研究者：山本友子
千葉大学大学院薬学研究院
8. アミノグリコシド高度耐性 *Proteus mirabilis* より同定された新規 16S rRNA methyltransferase, RmtC の解析
分担研究者：荒川 宜親¹
研究協力者：和知野 純一^{1,2}、山根 一和¹、鈴木 里和¹、柴田 尚宏¹、
木村 幸司¹、池 康嘉²、
国立感染症研究所細菌第二部¹、群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学²
9. VanD4 の遺伝子構造とその発現および染色体 D-Ala:D-Ala ligase 遺伝子について
分担研究者：池 康嘉^{1,2}
研究協力者：谷本弘一¹、野村隆浩²、荒川宜親³
群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学¹、同・附属薬剤耐性菌実験施設²
国立感染研細菌第二部³

プラスミド性セフェム薬耐性菌の検出と耐性発現に関わる挿入配列の解析

分担研究者：井上松久

研究協力者：岡本了一、中野竜一、兼子謙一、前山佳彦、石川直人

北里大学医学部微生物学

グラム陰性桿菌のセフェム薬高度耐性化のメカニズムとして、プラスミドにコードされた基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBLs)、AmpCβ-ラクタマーゼ(pAmpC)およびメタロβ-ラクタマーゼ(Metallo)がある。これらのβ-ラクタマーゼはわが国においても検出されるようになったが、その実態については明らかになっていないことも多い。そこで、神奈川県下の異なる地区の7施設の協力を得て、過去1年間(2004.6-2005.5)にわたり、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* および *P. mirabilis* を対象にセフェム薬耐性菌の実態調査を行った。加えて、ESBLs や pAmpC 産生遺伝子に伴って検出され、これらβ-ラクタマーゼ産生菌の高度耐性発現に関わっていると考えられている挿入配列の検出を行った。

- 1) 過去1年間に分離された *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* および *P. mirabilis* におけるセフェム薬耐性菌の検出率は、それぞれ 4.4, 1.1, 5.3 および 38.5% であり、*P. mirabilis* におけるセフェム薬耐性化が顕著であった。
- 2) これらセフェム薬耐性菌から検出されたプラスミド性の ESBLs, pAmpC および Metallo の割合は、*E. coli* ではそれぞれ 25, 5.2 および 2.9% であり、51.7% は染色体性 AmpC の多量産生株であった。同様に、*K. pneumoniae* では ESBLs, pAmpC および Metallo の割合がそれぞれ 41.2, 17.6 および 23.5% であった。一方、*K. oxytoca* では ESBLs の割合は 20% であったが、残りの 80% は染色体性 OXY の多量産生株であった。さらに、*P. mirabilis* ではセフェム薬耐性株のすべてが ESBL 産生菌であり、グラム陰性桿菌におけるプラスミド性のセフェム薬耐性化は ESBL 産生によるところが大きいことが判明した。
- 3) これら4菌種における ESBL 産生菌では TEM 型あるいは SHV 型 ESBLs も検出されたものの CTX-M 型 ESBLs の検出率が最も高かった。さらに、CTX-M 型についてグループ型別を行ったところ、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* から検出されたものは CTX-M-1, CTX-M-2 および CTX-M-9 グループのいずれかに型別されたが、CTX-M-9 グループに属するものが最も多かった。一方、*P. mirabilis* から検出された ESBLs はすべて CTX-M-2 であった。
- 4) CTX-M 型 ESBLs について挿入配列の検索を行ったところ、多くの産生菌で CTX-M 産生遺伝子上流に強力なプロモーター配列を伴う IS*Ecp1* が存在していることが明らかとなり、セフェム薬高度耐性化に大きく関与していることが示唆された。さらに、これらの多くが IS26 やインテグロン *Int1* を同時に多様な組合せで伴っていることも明らかとなり、これら転移能を有する挿入配列が染色体上のβ-ラクタマーゼ遺伝子がプラスミド化する過程で重要な役割を担っていると考えられる。

クラス A に属するカルバペネマーゼ、KPC-3、の酵素学的特徴

分担研究者：山口恵三

研究協力者：Alba, Jimena、○木村聡一郎、石井良和

東邦大学医学部微生物・感染症学講座

【背景と目的】カルバペネム系薬はβラクタマーゼに安定な抗菌薬として知られているが、本邦ではこれを分解する IMP-1 などの、クラス B に属するβラクタマーゼを産生する *Pseudomonas aeruginosa* や腸内細菌科に属する菌種が臨床材料から分離され、問題視されている。欧米においてもクラス B に属する酵素産生株が分離されているが、これに加えてクラス A やクラス D に属するカルバペネム分解能を有するβラクタマーゼを産生する菌株も分離されている。その中でも、Tisch Hospital の集中治療室において発生した KPC-3 産生 *Klebsiella pneumoniae* は 1 年間に 24 人の患者に感染を起こしたことなど注目すべき点が多い。幸いにも本邦ではクラス A あるいはクラス D に属するカルバペネマーゼ産生株は報告されていないが、この種の酵素の特徴を把握し、治療薬を選定しておくことは極めて重要なことと考えられる。今回は、KPC-3 の酵素学的特徴を把握するために詳細なパラメータを算出することを目的に検討を行った。

【方法】KPC-3 産生 *Escherichia coli* 233 株は Hachensack University 付属病院から分与を受けた。KPC-3 の構造遺伝子は組換えせず、4L の LB 培地で直接 *E. coli* 2332 を培養した。菌体は遠心集菌後、Lysozyme-EDTA 法で得られた periplasmic 画分から KPC-3 を定法により精製した。酵素学的パラメータは、精製酵素と基質を一定時間、30°C で反応させ、分解前の吸光度と反応終了時の分解産物の差を基に、Hanes-Woolf プロットを用いて各種パラメータを算出した。Moxalactam と cefoxitin は、reporter substrate として nitrocefin を用いた。それ以外の基質は、直接吸光度変化を観察した。

【結果および考察】本酵素が最も高い加水分解効率を示した基質は、nitrocefin と cephalothin であり、 k_{cat}/K_m 値は夫々 $2.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $3.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の値を示した。Cephalothin の k_{cat} および K_m 値は夫々 264 s^{-1} および $261 \mu\text{M}$ と極めて高値を示した。Imipenem と meropenem は KPC-3 に対する好適基質であり、 k_{cat}/K_m 値は夫々 $1.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $1.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。全体的に KPC-3 は KPC-1 および KPC-2 の酵素学的パラメータと類似の値を示した。しかし、詳細にそのパラメータを見てみると、KPC-3 が他の KPC-型酵素と比較して、ceftazidime に対する k_{cat} 値が高いこと、cefoxitin の K_m 値が高いことなどいくつかの相違点を認めた。KPC-3 は KPC-2 と 1 アミノ酸残基 (H272Y) を異にするのみである。本アミノ酸残基は、基質のカルボン酸と相互作用すると考えられる、KPC-型酵素の 209 番目のアルギニンに影響を与える可能性が示唆された。

カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究 部位特異的変異体、速度論的解析およびX線結晶構造解析を用いた メタロ-β-ラクタマーゼの Asp120(81)の役割の検討

分担研究者：黒崎博雅¹

協力研究者：山口佳宏¹、和知野純一²、柴田尚弘²、荒川宜親²

熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野¹、国立感染症研究所細菌第二部²

β-ラクタム剤は感染症の治療で繁用されている。しかしながら、薬剤耐性菌は抗生物質による治療を妨げ社会的にも問題となっている。主な耐性機構としてβ-ラクタマーゼの産生が挙げられる。このβ-ラクタマーゼの中で1990年代以降世界各地で報告されている活性中心にZn(II)イオンを持つメタロ-β-ラクタマーゼはカルバペネムを含むほとんどすべてのβ-ラクタム剤を加水分解し、既存のラクタマーゼ阻害剤が無効であることからこの酵素を産生する薬剤耐性菌の蔓延が危惧されている。

本研究では日本で発見されたメタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1)の加水機構の解明を目的とし、ほとんどすべてのメタロ-β-ラクタマーゼの活性中心に保存されている120(81)*位のAspをAlaとGluに置換した部位特異的変異体(D120(81)A, D120(81)E)を調製し、120(81)位のAspの役割について検討した。

得られた知見を以下に示す。

- 1) 野生型のIMP-1のAsp120(81)はD120(81)AおよびD120(81)E変異体の定常状態における速度論的研究において k_{cat} が減少し K_m が増大したことから触媒活性、基質認識に重要であることがわかった。
- 2) D120(81)E変異体のX線結晶構造解析に成功した(図1右)。その活性中心構造は第一のZn(II)イオンに3つのHisが配位し、第2のZn(II)イオンへはHis, Cys, Gluの1つの酸素原子が配位しており、さらにGluのもう一つの酸素原子が2つのZn(II)イオンを架橋して配位していた。野生型IMP-1のX線結晶構造解析結果(図1左)との比較からAsp120(81)の第二のZn(II)イオンに配位していないカルボキシル基の酸素原子は、2つのZn(II)イオンを架橋しているOH₂またはOHと水素結合することが、触媒活性にとって必須であることがわかった。

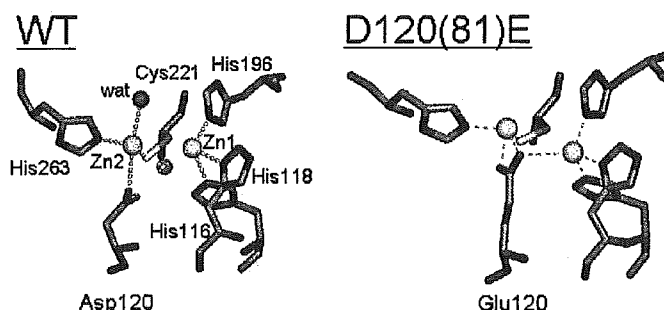


図1. 野生型IMP-1(PDB code:1DDK)およびD120(81)E変異体の活性中心構造の比較

*アミノ酸番号はBBL numberingに従い番号付けした。()の中はmatured酵素におけるアミノ酸番号を示す。

緑膿菌のマルチコンポーネント型 RND 型排出システムの機能解析

京都薬科大学・微生物学教室 後藤直正、小川倫洋、皆川 周、山口 藍

グラム陰性菌の染色体には、抗菌薬や消毒薬などの異物や細胞内代謝産物の排出に働いているマルチコンポーネント型 RND 型排出システムがコードされている。本年度研究では、1) RND 型排出システムの分布および 2) 病原性発現への関与の研究を行った。

- 1) 分布: データベース上のゲノム配列情報をもとに緑膿菌およびセラチア菌の RND 型排出システムのホモログ解析を行ったところ、自然環境で生育する細菌での分布が多いことが分かった。
- 2) 発現: 定量的 RT-PCR および RND コンポーネントに特異的な抗体を用いたウェスタンイムノブロット法により発現を調べたところ、定量的 RT-PCR では、発現量には差は見られるもののすべての Mex システムが実験を行った条件下で発現していることが分かった。
- 3) 抗菌薬感受性: $\Delta mexAB-oprM$ や $\Delta mexXY$ は多くの抗菌薬感受性を上昇させた(多剤耐性の消失)が、他の Mex オペロンの欠失ではそのような多剤耐性の消失は観察されなかった。
- 4) 運動性 (swimming, swarming, twitching): 病原因子として機能する運動性を調べたところ、それぞれの運動性に影響を与える Mex オペロンが同定された。特に、バイオフィーム形成に機能する twitching 活性には 8 種類の Mex オペロンが関与していることが分かった。Type IV pili によって twitching 活性がもたらされることが知られているが、この機能発現には多種の Mex オペロンが関与していることが明らかになった。
- 5) 病原因子産生: $\Delta mexEF-oprN$ 、 $\Delta PA3523-PA3522-PA3521$ 、 $\Delta PA4374-PA4375$ によってアルカリプロテアーゼとエラスターゼの産生が顕著に減少した。また、acyl homoserinelactone 合成酵素である *lasI* および *rhlI* 遺伝子の発現に伴う菌体外の acyl homoserinelactone 産生が消失した。また $\Delta mexXY$ によっては acyl homoserinelactone の受容体である *lasR* と *rhlR* 遺伝子の発現が低下し、アルカリプロテアーゼとエラスターゼの産生が半減した。これらの結果は、Mex システムが Quorum sensing 関連の遺伝子の発現に影響を与えるということを示している。
- 6) MDCK 細胞モノレイヤ透過性: 既報のように $\Delta mexAB-oprM$ は、MDCK 細胞モノレイヤの透過性の減少をもたらした。一方、 $\Delta PA4374-PA4375$ や $\Delta czcABC$ は抗菌薬高感受性化を引き起こさなかったが、MDCK 細胞モノレイヤの透過性を減少させた。
- 7) カイコ致死活性: MDCK 細胞モノレイヤの透過性を減少させた $\Delta PA4374-PA4375$ や $\Delta czcABC$ はカイコ致死活性を減少させることが分かった。

以上のことから、緑膿菌の Mex 排出システムは抗菌薬耐性のみならず、本菌の Quorum sensing 機構や、病原因子の産生にも関与することが示された。これらの結果は、緑膿菌の 12 種類の Mex システムのすべてが抗菌薬耐性に働くのではなく、それぞれが固有の機能を持ち、緑膿菌の病原性の発揮などに機能していること、Mex 排出システムの機能の阻害によって緑膿菌の病原性の制御が行える可能性を示している。Mex システムのホモログはグラム陰性菌に広く分布していることから考えても、グラム陰性の日和見感染症の制御のターゲットとしての Mex システムの阻害の有効性を示すことができた。