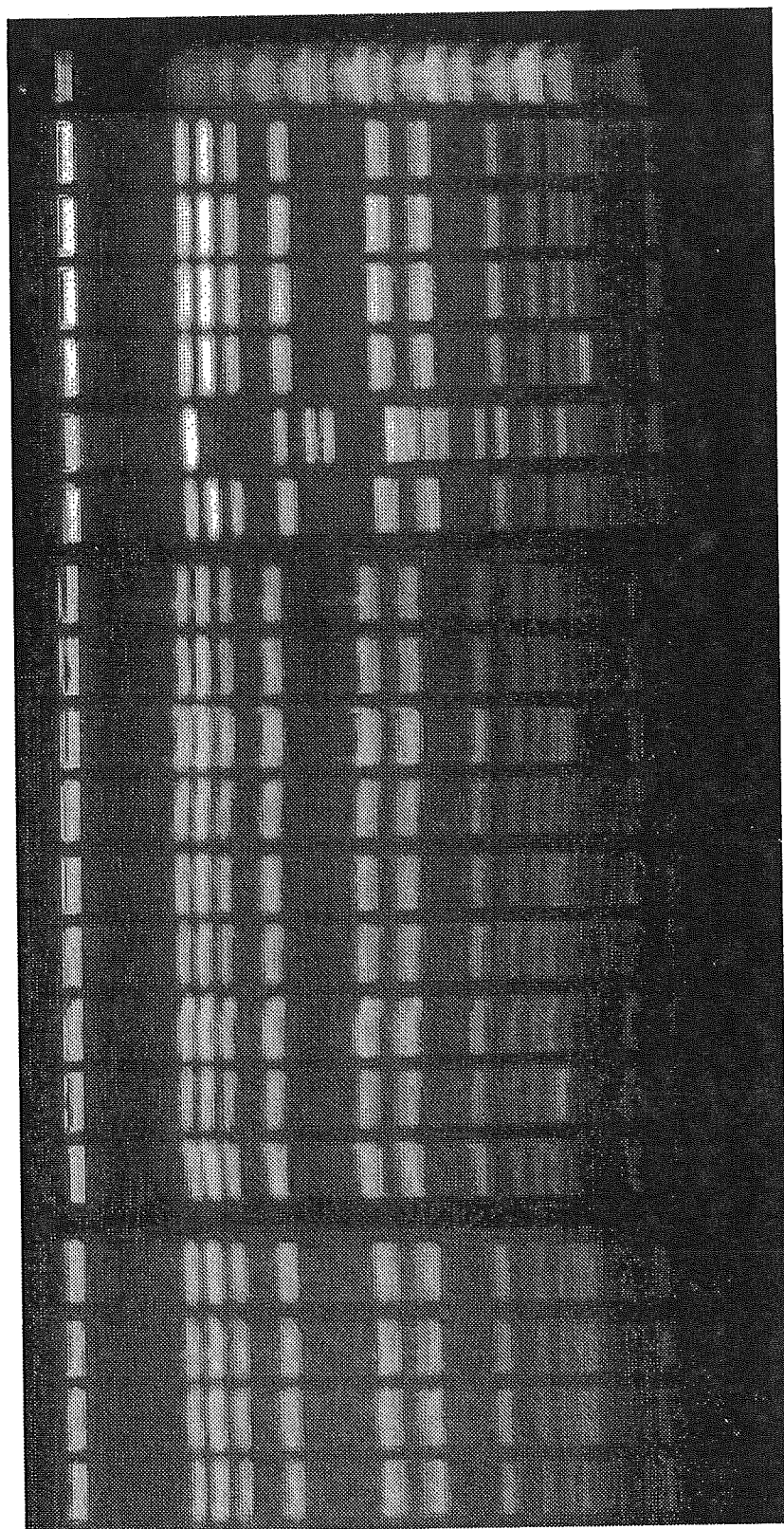


表2. HGH病院分離VanB型 *E. faecalis* 菌のVan耐性の伝達頻度

症例	菌株	遺伝子型	伝達頻度 (供与菌当り)
30	HGH7	vanB	10 <sup>-7</sup>
31	HGH8	vanB	10 <sup>-7</sup>
32	HGH9	vanB	10 <sup>-5</sup>
33	HGH10	vanB	10 <sup>-5</sup>
34	HGH11	vanB	10 <sup>-5</sup>
35	HGH12	vanB	10 <sup>-4</sup>
36	HGH13	vanB	10 <sup>-5</sup>
37	HGH14	vanB	10 <sup>-3</sup>
38	HGH15	vanB	10 <sup>-7</sup>
39	HGH16	vanB	10 <sup>-6</sup>
40	HGH17	vanB	10 <sup>-5</sup>
41	HGH18	vanB	10 <sup>-4</sup>
42	HGH19	vanB	10 <sup>-5</sup>
43	HGH20	vanB	10 <sup>-6</sup>
44	HGH21	vanB*	<10 <sup>-8</sup>
45	HGH22**	vanB	10 <sup>-3</sup>
46	HGH23	vanB	10 <sup>-5</sup>
47	HGH24	vanB	10 <sup>-3</sup>
48	HGH25	vanB	10 <sup>-3</sup>

\*vanB遺伝子が染色体上に存在. \*\*代表株としてプラスミド解析に使用  
 受容菌 *E. faecalis* FA2-2(Rifr, Fusr)、液体培地中での3時間接合

図1. HGH病院から分離されたVanB型VRE株(*E. faecalis*)の  
染色体DNAの制限酵素*Sma*I消化によるPFGE解析



30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

症例番号

図2. *vanB* 遺伝子オペロン内 *vanS<sub>B</sub>-vanY<sub>B</sub>* 領域の塩基配列と各 *VanB* 型

		stop codon of <i>vanS<sub>B</sub></i>	
vanB1	GCGTTTGTGTT CTGGCTGGAT TTACCGCCCA CATCAACACT ATAAATATTT	┐	
vanB2		T G	
vanB3		T G	
vanB1	AAAAC TTAAA TGATTTTGAC CGACAGGTAT AACCTGCCG GTC TTTTGT		T
vanB2			
vanB3			
vanB1	TTTTCGCCGC TACAGGAAA CTACAGATTG ACTACAGGGA AAGTACAGAT		
vanB2	----- T	C G	
vanB3		C G	
vanB1	ACGCTTGCCA TAATAACAAT CGTACCAGCC ACAAATCGTA GTTTATTGAT		
vanB2	G		
vanB3	G	A	
		start codon of <i>vanY<sub>B</sub></i>	
vanB1	AAAGGAGGCA TTCAATCAA TGGAAAAAG CAACTATCAT TCCAATGTGA	↑	
vanB2	G		C G
vanB3			C G

図3. HGH22株から分離したVan耐性高頻度接合伝達性プラスミド pUI22(107 kbp)の*vanB* probe 用いたSouthern hybridization

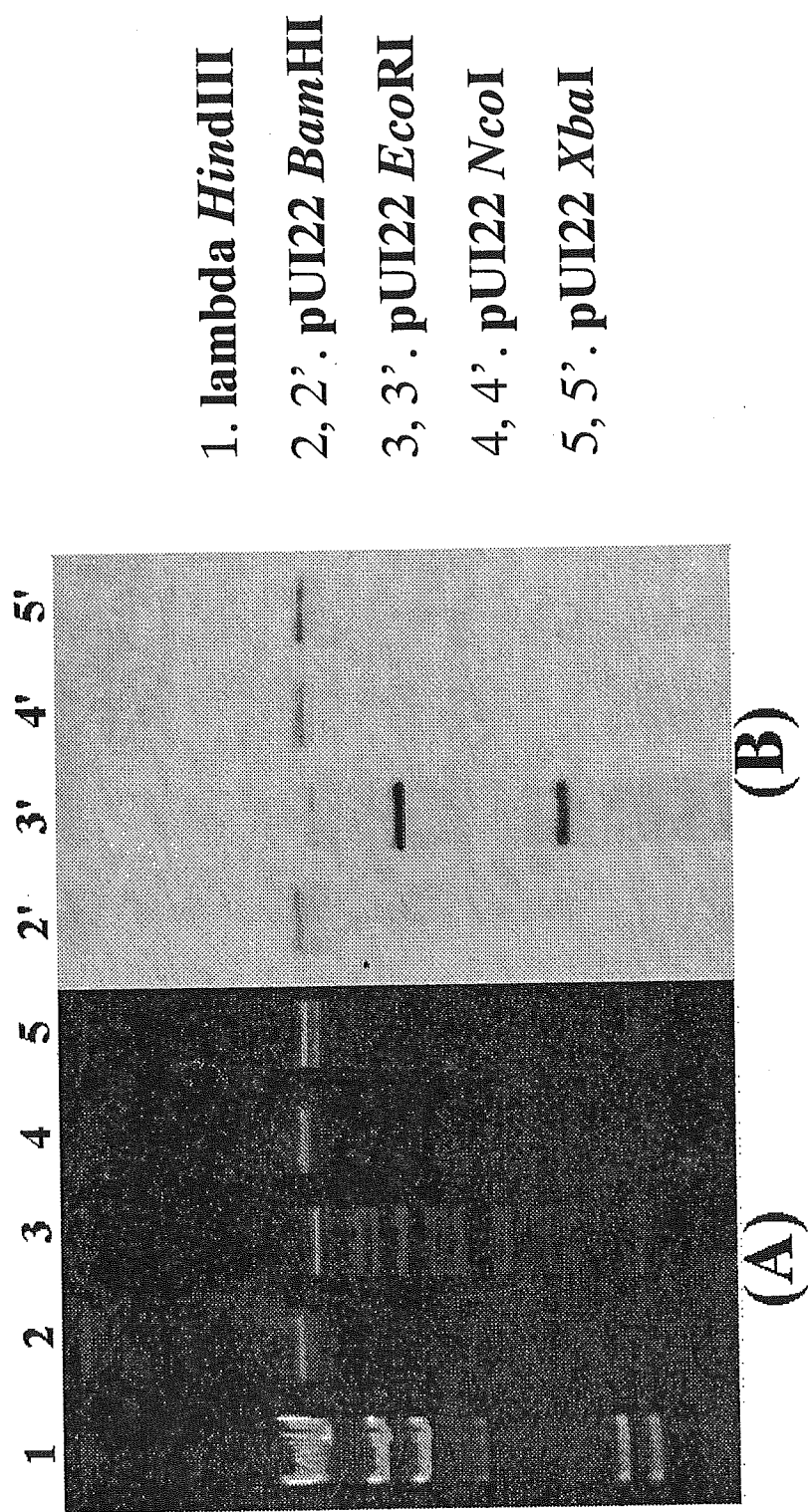


図4. pAD1プラスミドの接合伝達領域をprobeに用いた  
pUI22プラスミド(*Eco*RI消化)のSouthern hybridization

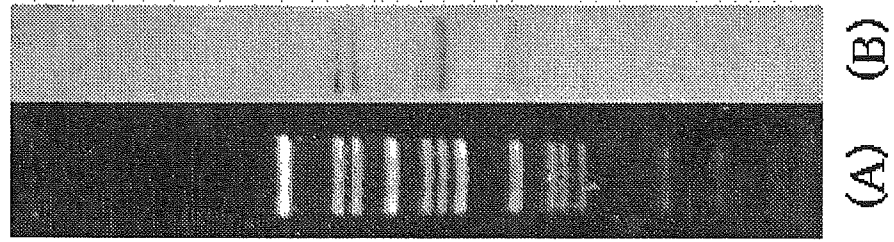


図5. pUI22プラスミドにコードされる遺伝子と機能

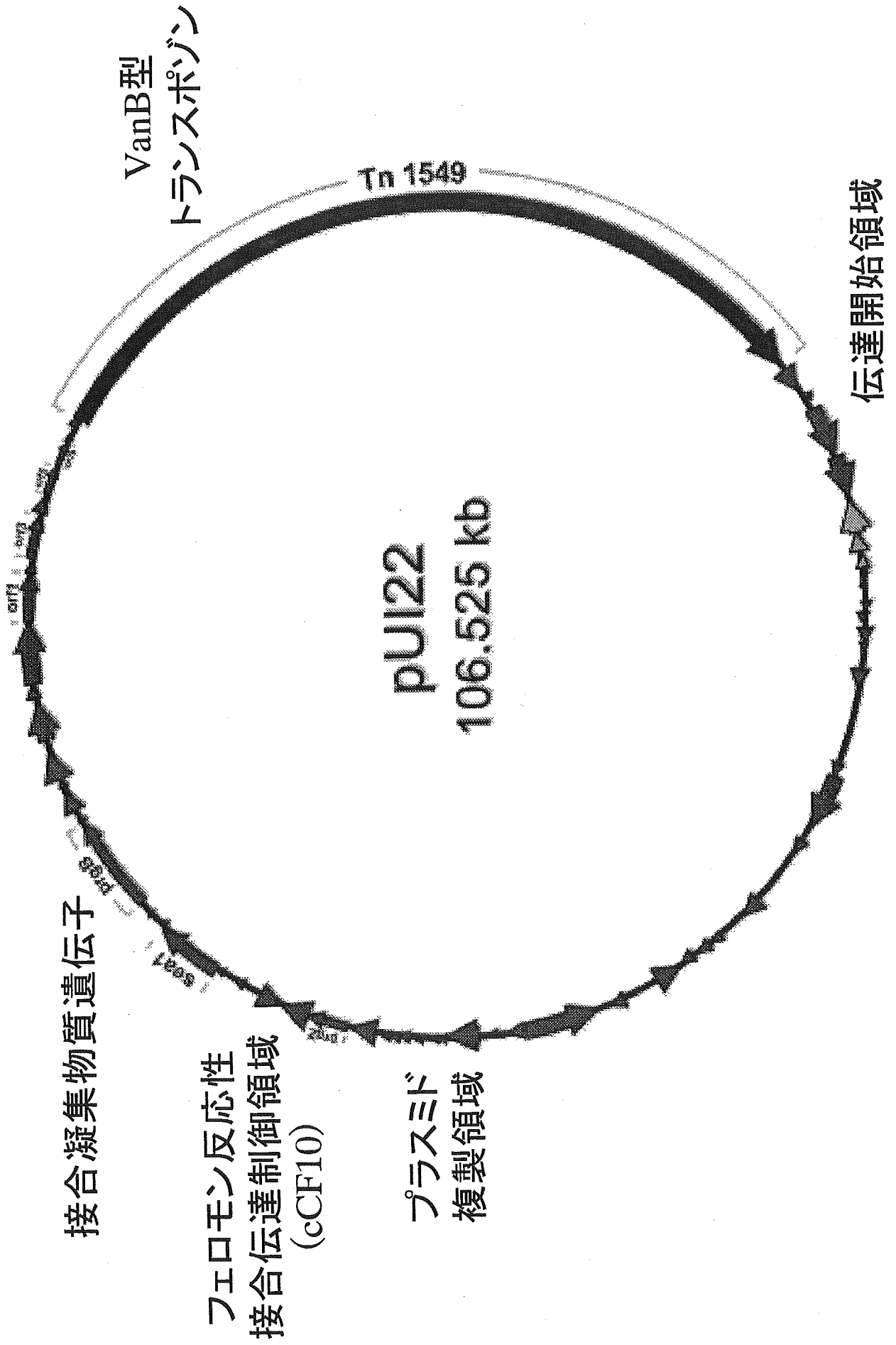


図6. *vanB2*型耐性遺伝子と接合伝達性トランスポゾンTn1549(34kb)の構造

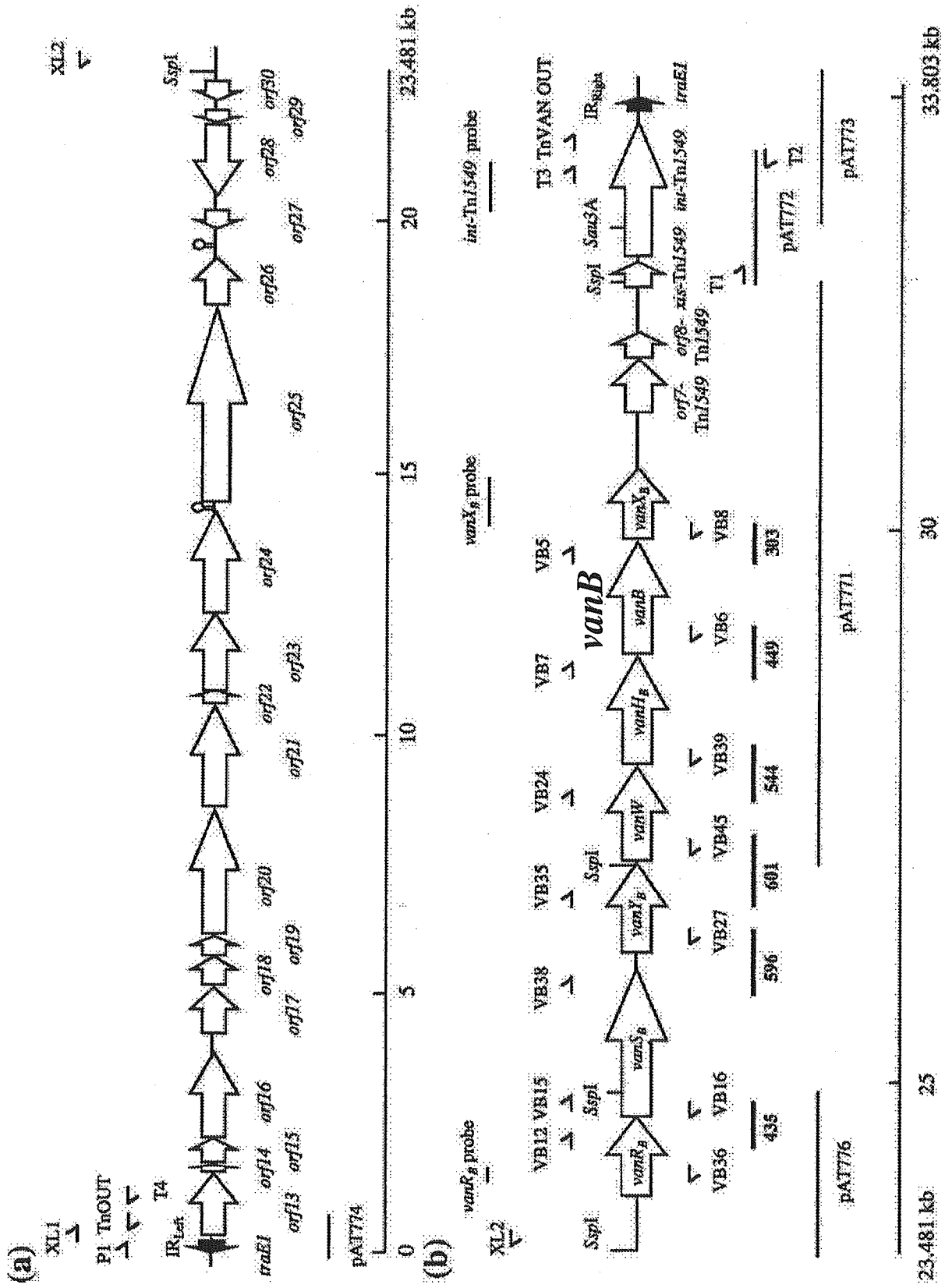
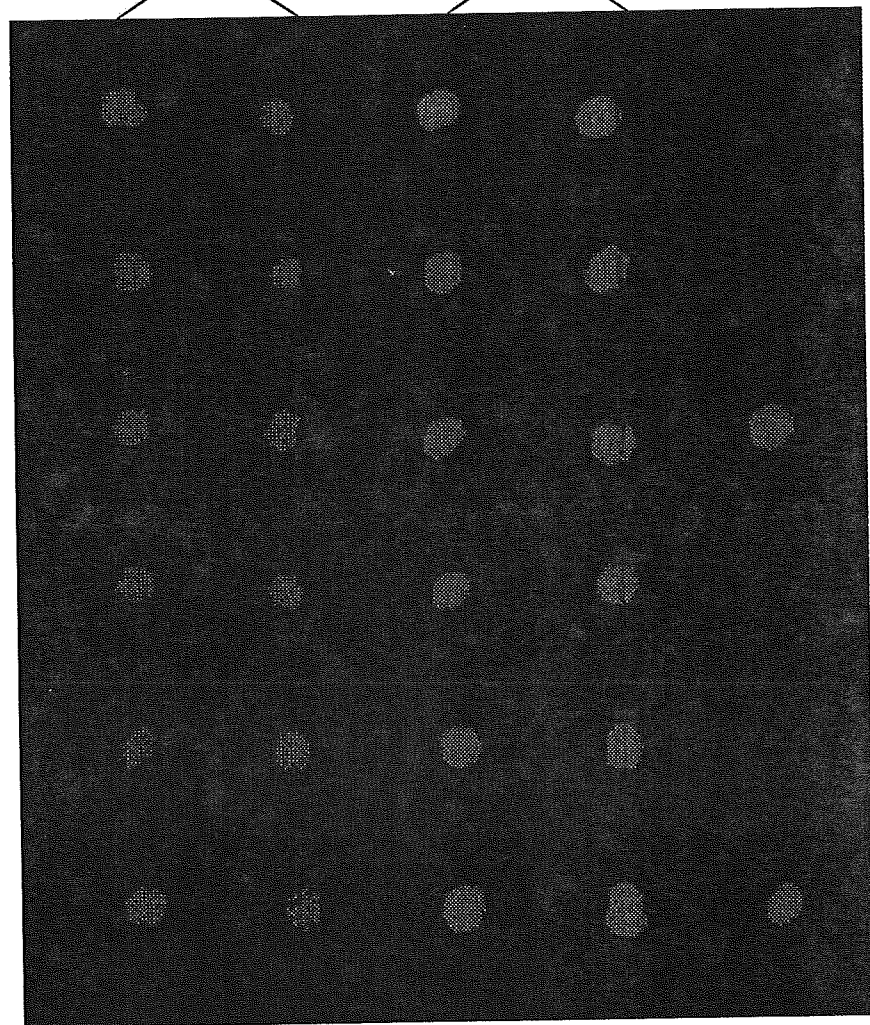


図7. 野生型VRE株とそれぞれから得られた  
エリスロマイシン耐性伝達株の $\beta$ -Hemolysin活性



Wild strains

HGH 8, 9, 10, 12, 14, 15,  
16, 18, 19, 20, 22, 25

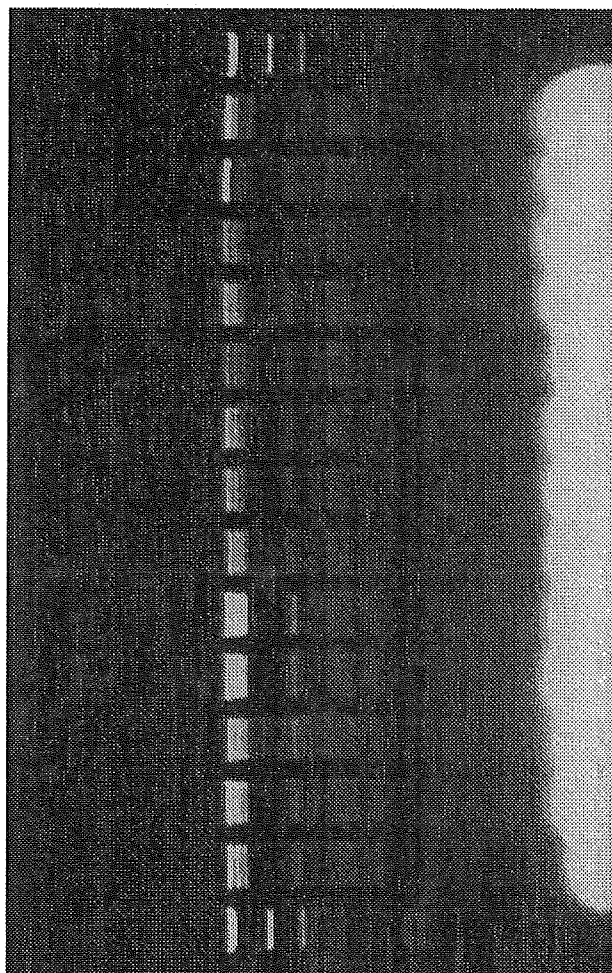
FA2-2/Em<sup>r</sup> transconjugants of

HGH8, 9, 10, 12, 14, 15,  
16, 18, 19, 20, 22, 25

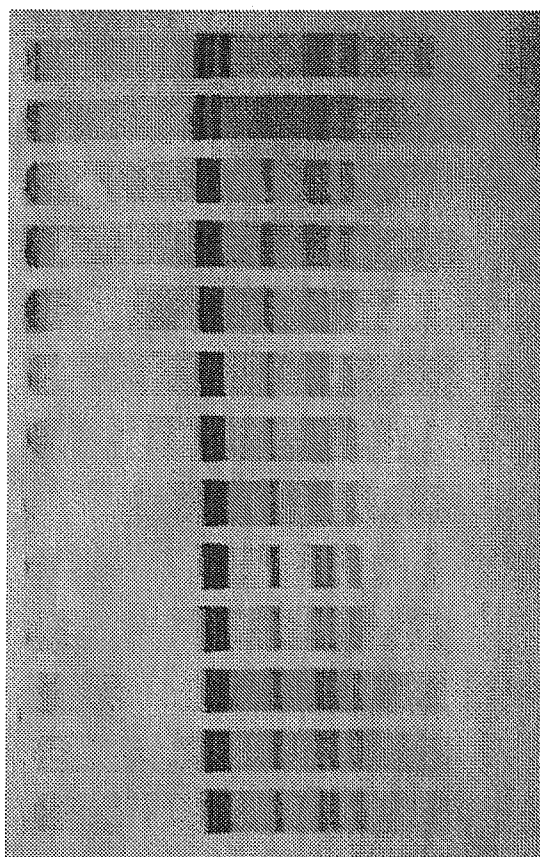
左; FA2-2/pAD1 右; FA2-2



図8. HGH病院のVRE株から分離したEm<sup>r</sup>接合伝達性プラスミド DNA の EcoRI切断パターンとpAD1をprobeに用いたSouthern hybridization



HGH8 9 10 12 14 15 16 18 19 20 22 25 pAD1



HGH8 9 10 12 14 15 16 18 19 20 22 25 pAD1

平成16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 (H15-新興-9)

「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」

プラスミドにコードされた AmpC $\beta$ -ラクタマーゼ産生遺伝子の解析

分担研究者 井上 松久 北里大学医学部微生物・寄生虫学

研究協力者：岡本 了一、中野 竜一、兼子 謙一

プラスミド pKU601 がコードする AmpC $\beta$ -ラクタマーゼ CFE-1 は、その *ampR-ampC* が *C. freundii* GC3 と 99% と非常に高い相同性を示し、かつ *ampC* の上流には *C. freundii* と同様に fumarate operon *frdA*、*B*、*C*、*D* が確認された。CFE-1 は産生調節遺伝子である *ampR* を保有しており、その塩基配列から Asp135 が Ala に変異した *ampR* が CFE-1 多量産生の原因であることが明らかになった。さらに、*ampC* のすぐ下流と *ampC* の上流にある *frdA* にはトランスポゾン IS26 が完全な形で挿入されていることが分かった。二つの IS26 は同一方向を向いていた

が、何れも DNA の転移に関するトランスポザラーゼ *tnpA* を持っていた。したがって、*C. freundii* 染色体上の *ampC* 遺伝子がプラスミド化する過程でこれら IS26 が大きく関与していると推測された。

一方、プラスミド pKU631 がコードする CMY-4 は、*ampC* が *C. freundii* のそれと 95% の相同性を持ち、しかも CFE-1 に認められたような *ampR* が *ampC* の上流には認められず、代わって *ISEcp1* の挿入が確認された。CMY-4 は調節遺伝子 *ampR* を持たないにもかかわらず AmpC を多量産生することから、その原因を究明したところ、挿入された *ISEcp1* 内の強力なプロモーターにより *AmpC* が転写されていることが明らかになった。

大腸菌や肺炎桿菌のセフェム系薬高度耐性化のメカニズムの一つとして、プラスミドにコードされた AmpC β-ラクタマーゼがある。プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ産生菌は、ヨーロッパやアメリカからの報告例が多

かったが、ここ数年わが国においても分離されるようになった。プラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ産生遺伝子は、*C. freundii*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *Aeromonas* 属などの染色体上の *ampC* 遺伝子はその由来とされるが、どのような過程を経て染色体上の遺伝子が

プラスミド化するかについてはわかっていない。わが国では現在のところ *C. freundii* 由来の AmpC $\beta$ -ラクタマーゼが報告されている。そこで、臨床分離の大腸菌から検出されたプラスミド pKU601 にコードされた AmpC $\beta$ -ラクタマーゼ CFE-1 および肺炎桿菌から検出された pKU631 にコードされた CMY-4 産生遺伝子の解析を行い AmpC 多量産生機構の解析とプラスミド化の過程について考察した。

### 1. 大腸菌から検出された CFE-1 産生遺伝子の解析

臨床分離のセフェム系薬耐性 *E. coli* KU6400 は、第四世代セフェム系薬の cefepime (CFPM) およびカルバペネム

系薬の imipenem (IPM) を除くペニシリン系薬およびセファロスポリン系薬に耐性を示す菌株であり、cefotaxime (CTX) に対する MIC が clavulanic acid (CVA) により感受性化することはなかった (Table 1)。したがって、KU6400 株は AmpC $\beta$ -ラクタマーゼを産生していることが予想された。そこで、KU6400 株から超音波破碎により粗酵素液を抽出して cephalothin (CET) を基質として  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を測定したところ、酵素活性は 7.7 u/mgprotein と高い活性を示すとともに、cefoxitin (CFX) 10 $\mu$ g/ml 添加による酵素の誘導産生性を検討したが 7.9 u/mg 蛋白と誘導産生は認

められなかった。さらに、CVA 添加による酵素活性の阻害を検討したが、阻害効果は認められなかった。以上のことから、KU6400 株が産生するβ-ラクタマーゼは、構成的に多量に産生されること並びにその基質特異性から AmpCβ-ラクタマーゼであることが確認された。

KU6400 株のセフェム系薬耐性は、接合伝達により  $10^{-5}$  の頻度で大腸菌 ML4947 株に伝達された。接合伝達されたプラスミド pKU601 は 102-kb でセフェム系薬耐性のみをコードしていた。接合伝達株 ML4947(pKU601)株のβ-ラクタム系薬耐性並びにその酵素活性を検討したところ、供与菌の

KU6400 株と同様の薬剤感受性と酵素産生性を示した (Table 1) ことから、pKU601 はプラスミド性のセファロスポリナーゼタイプのβ-ラクタマーゼ産生遺伝子 *bla<sub>CFE-1</sub>* をコードしていることが明らかとなった。

pKU601 の *bla<sub>CFE-1</sub>* 領域の DNA 塩基配列を決定するため、BamHI/BglII を用いてベクタープラスミド pHSG398 にクローニングした。プラスミド pKU611 は、pKU601 の BamHI/BglII 断片(14-kb)が挿入されており、その全塩基配列を決定したところ、β-ラクタマーゼをコードしていることが明らかとなった。β-ラクタマーゼ産生遺伝子は、1137bp で 378 個のアミノ酸をコ

ードしており、SXXK、YSN および KTG の AmpC $\beta$ -ラクタマーゼに特有のモチーフが確認された。この領域の塩基配列についてデータベースで検索したところ、*C. freundii* GC3 の染色体性 *ampC* 遺伝子と 99.8% の相同性が認められ、*bla*<sub>CFE-1</sub> が *C. freundii* GC3 の染色体由来であることが強く示唆された。また、*ampC* の上流領域についても同様に塩基配列を決定したところ、*C. freundii* GC3 と 99.0% の相同性を持つ AmpR をコードしており、その向きは *ampC* とは反対であることが明らかになった。さらに、*ampR-ampC* の近傍の領域についても塩基配列を確認したところ、*ampC* の下流には *blc*

が、*ampR* の下流には *frdA, B, C, D* の *frd* オペロンが確認され、いずれも *C. freundii* のそれと高い相同性を有していた。また、*blc* と *frdA* の中に IS26 が同じ向きにそれぞれ一つずつ挿入されていることも確認された ( Fig. 1 )  
*bla*<sub>CFE-1</sub> は *ampR* を保有しているにもかかわらず構成的に多量の酵素を生ずることから、その原因についても検討した。*bla*<sub>CFE-1</sub> の AmpR は配列を *C. freundii* GC3 のそれと比較すると 135 番目の Asp が Ala に変化していることが明らかになったため、pKU601 の *ampC* のみを pHSG398 にサブクローニングした pKU612 を構築し、pKU601 および pKU611 と MIC および

β-ラクタマーゼの産生性を比較した ( Table 1, 2 )。その結果、*bla*<sub>CFE-1</sub> の変異した AmpR が CFE-1 の構成的多量産生に大きくかかわっていることが明らかになった。通常、AmpR は *ampC* 転写のリプレッサーとして機能しているが、ムレインモノマー ( anh-Mur Nac-tripeptide ) が結合することにより転写アクチベーターとして機能すると考えられている。しかし、*bla*<sub>CFE-1</sub> の AmpR は 135 番目の Asp が Ala に変化することでムレインモノマーの存在なしで転写アクチベーターと機能していることが判明した。

## 2 . 肺炎桿菌から検出された CMY-4 産生遺伝子の解析

臨床分離の *K. pneumoniae* KU6500 は、ペニシリン系薬やセファロスポリン系薬に耐性を示す菌株であり、β-ラクタム系薬に対する感受性パターンから AmpCβ-ラクタマーゼの産生が強く疑われた( Table 3 )。そこで、*E. coli* DHαに接合伝達を試みたところ、 $10^{-6}$  の頻度でセフェム系薬耐性が伝達され、その耐性は約 60-kp のプラスミド pKU631 にコードされていることが明らかになった。そこで、pKU631 の *bla* 領域の DNA 塩基配列を決定するため、BamHI/BglIII を用いてベクタープラスミド pBCSK(-)にクローニングを試みた。得られたプラスミド pKU641 は、pKU631 の BamHI/BglIII 断片 (5-kb)が

挿入されており、塩基配列を決定したところ、既に報告のある *C. freundii* の染色体性由来と考えられている AmpC $\beta$ -ラクタマーゼ CMY-4 をコードしていることが判明した。*bla*<sub>CMY-4</sub> の近傍の塩基配列も決定したところ、前述の *bla*<sub>CFE-1</sub> と異なり *ampR* に相当する領域が欠損しており、代わって挿入配列 *ISEcp1* の挿入が確認された ( Fig.1 )。CMY-4 産生菌は *ampR* が欠損しているにもかかわらず高い $\beta$ -ラクタマーゼ産生性を示すことから ( Table 3 )、この *ISEcp-1* の挿入が酵素の多量産生に大きくかかわっていると考え、その発現機構を解析した。  
  
*ampC* とその固有のプロモーター領

域を含むプラスミド pMWampC と *ampC* とその固有のプロモーター領域およびさらに上流の *ISEcp1* の一部を含むプラスミド pMWISEcp1 の二つを構築し、それぞれの MIC と酵素活性を測定した ( Table 3 )。その結果、*E. coli* DH  $\alpha$  (pMWISEcp1) は *E. coli* DH  $\alpha$  (pMWampC) に比べて 16 倍高い酵素活性を示したことから、*ISEcp1* の配列の一部に強いプロモーター活性をもつ配列が存在することが強く示唆された ( Table 3 )。

そこで、これらプラスミドのプロモーター活性を比較するために、ルシフェラーゼ遺伝子をもつ pGL3-Basic Vector を用いてプロモーター活性を



比較検討した。*ampC* 固有のプロモーター領域をもつ pGLampC と ISEcp1 の配列の一部でプロモーター活性があると思われる領域をもつ pGLISEcp1 を構築し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、pGLISEcp1 は pGLampC に比べて約 19 倍高いルシフェラーゼ活性を示し、pMWISEcp1 と pMWampC のそれぞれのβ-ラクタマーゼ活性と相関していた (Fig. 2)。このことから、CMY-4 産生菌は ISEcp1 の挿入により強いプロモーター活性を得た結果、AmpC を構成的かつ多量に産生するためにセフトラム系薬に高度耐性を示すと考えられた。

わが国で分離されたプラスミド性 AmpCβ-ラクタマーゼ産生遺伝子はいずれも *C. freundii* の染色体性 *ampC* と相同性が非常に高く、*C. freundii* 由来であると考えられた。これら AmpC 産生菌はいずれも酵素を構成的かつ多量に産生することが特徴であり、その原因として変異型 AmpR の産生やその配列内に強いプロモーター活性をもつ挿入配列 ISEcp1 による挿入が大きく関与していることが今回の解析で明らかになった。また、本研究で解析した *bla*<sub>CFE-1</sub> と *bla*<sub>CMY-4</sub> はいずれもその近傍に IS26 や ISEcp-1 が挿入されており、これら挿入配列の機能によって *C. freundii* の染色体性遺伝子がプ

ラスミド化したものと強く予想され  
と *bla*<sub>CMY-4</sub> 近傍の IS26 や *ISEcp1* が  
る。しかしながら、文献的には *ISEcp-1*  
*ampC* 遺伝子の転移に直接かかわった  
が CTX-M 型β-ラクタマーゼ産生遺伝  
という証明はなく、今後の課題である。  
子の転移に関わっているという報告  
はあるものの、今回検出された *bla*<sub>CFE-1</sub>

Table 1. MICs of selected antibiotics from *E. coli* strains

Strain	MIC (µg/ml) <sup>a</sup>									
	PIP	CPD	CEF	CTX	CTX/CLA <sup>b</sup>	CAZ	CMZ	ATM	FEP	IPM
KU6400	>256	>256	>256	64	64	64	64	8	0.25	0.25
ML4947(pKU601)	>256	>256	>256	256	256	>256	256	64	1	0.5
ML4953(pKU601)	>256	>256	>256	256	256	>256	256	64	1	1
ML4947(pKU611)	64	>256	>256	16	16	8	16	2	0.25	0.25
ML4947(pKU612)	8	32	256	4	2	4	2	0.5	<006	0.25
ML4947	2	0.5	8	<006	<006	0.25	0.5	<006	<006	<006

<sup>a</sup> Antibiotics: PIP, piperacilin; CLA, clavulanic acid; CEF, cephalexin; CPD, cefprozime; CTX, ceftaxime; CAZ, ceftazidime; CMZ, cefmetazole; ATM, aztreonam; FEP, cefepime; IPM, imipenem.

<sup>b</sup> MICs were determined in the presence of clavulanic acid (5 µg/ml).

Table 2.  $\beta$ -Lactamase activities from *E. coli* strains

Strain	Relative $\beta$ -Lactamase Activity (unit/mg protein) <sup>a</sup>	
	non-induced	induced <sup>b</sup>
KU6400	7.7	7.9
ML4947(pKU601)	10.9	11.1
ML4953(pKU601)	14.4	16.3
ML4947(pKU611)	1.4	1.7
ML4947(pKU612)	0.2	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>  $\beta$ -Lactamase activities are the geometric mean determinations for 3 independent cultures. The standard deviations were within 10%.

<sup>b</sup> The inducer used was cefoxitin at 10  $\mu$ g/ml.

<sup>c</sup> ND, not done

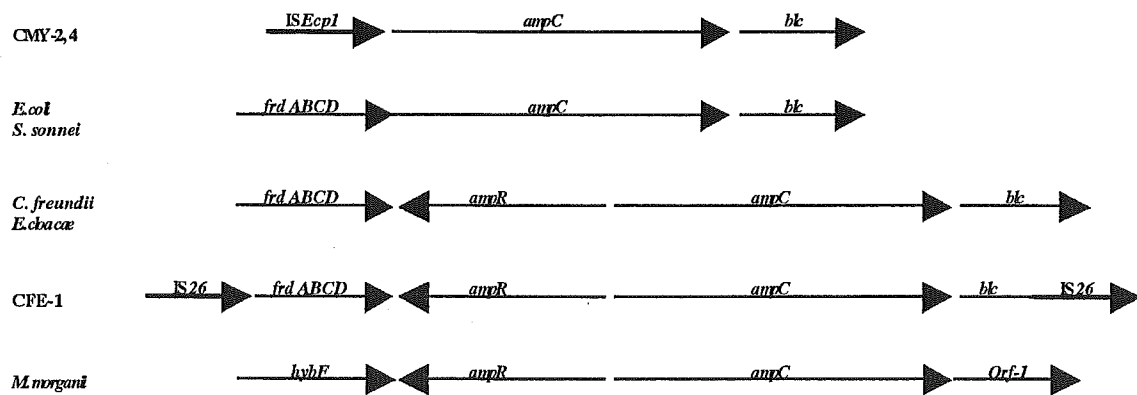


Fig 1. Organization of the sequences surrounding *ampC* in various enterobacterial species. Positions of the *frdABCD*, *bc*, *hylF*, *orf-1*, *IS26*, *ampC*, and *ampR* genes are shown with directions indicated by arrows.

Table 3. MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase activity of clinical isolate *K. pneumoniae* KU6500 and *E. coli* DH5  $\alpha$  harboring plasmids.

Strain	MIC ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup>							Relative $\beta$ -Lactamase Activity (units/mg protein) <sup>b</sup>
	AMP	CPD	CEF	CTX	CAZ	CMZ	ATM	CEF
<i>K. pneumoniae</i> KU6500	>256	256	>256	32	64	32	16	1.10
DH5 $\alpha$ (pKU631)	>256	128	>256	8	16	4	4	0.71
DH5 $\alpha$ (pMWISEcp1)	128	128	>256	8	8	4	4	0.80
DH5 $\alpha$ (pMWampC)	8	4	32	0.5	0.25	0.5	0.125	0.05
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	2	0.5	2	<005	<005	0.5	<005	N.D. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Antibiotics: AMP, ampicillin; CEF, cefepime; CPD, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CMZ, cefmetazole; ATM, aztreonam.

<sup>b</sup>  $\beta$ -Lactamase activities are the geometric mean determinations for 3 independent cultures. The standard deviations were within 10%.

<sup>c</sup> N.D., not done

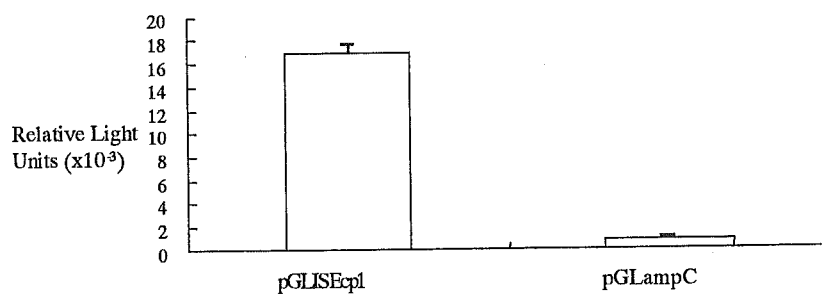


Fig. 2 Luciferase activity in the constructs. The values are presented as relative luciferase activity as measured with luminometer. Data are the geometric means of 3 independent experiments.