

目的菌は、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ菌 (*M.pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌 (*L.pneumophila*)、⑥クラミジア菌 (*C.pneumoniae*) である。PCR のプライマーは、それぞれの菌の 16S rRNA 遺伝子の、菌種に特異的な塩基配列を基に設計した。新たな方法での結果を得るまでの所要時間は、2~2.5 時間に短縮できた。この方法を小児・呼吸器感染症の検査材料を用いて実施し、培養よりも高い精度であることを証明した。

後藤 正文：カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究

メタロ-β-ラクタマーゼ生産菌は、カルバペネムを含むすべての β-ラクタム剤に耐性となるために問題となる。メタロ-β-ラクタマーゼ生産菌を迅速検出するために、メタロ-β-ラクタマーゼに特異物に結合する蛍光色素を用いる方法の開発研究を行った。メタロ-β-ラクタマーゼの活性中心に存在する Zn イオンと特異的に結合するチオール基と蛍光色素を含む DansylCnSH (n = 2-6) を化学合成した。この化合物は、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的に結合し、蛋白質側鎖と相互作用により蛍光が増大することが解った。

後藤 直正：臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析

緑膿菌の多剤排出システムが関与する抗菌薬耐性発現には、キノロン薬耐性には MexAB-OprM と Mex XY-OprM が、アミノ配糖体耐性には Mex XY-OprM 機構が重要な役割をしていることが解った。臨床分離緑膿菌において、これらの排出機構による耐性を検出する方法を開発する目的で、キノロン耐性およびアミノ糖耐性緑膿菌において、排出機構の抗菌薬排出蛋白である *mexB*, *mexY* 遺伝子発現とそれぞれの蛋白を定量した。RT-PCR により mRNA を、ノーザンブロットにより蛋白を定量した結果、相互にほぼ相関関係があった。

堀田 国元：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

MRSA におけるアミノグリコシド (AG) 耐性菌の迅速検出方法の開発を行った。AG 不活化酵素による AG 耐性は、各種の AG 不活化酵素により、それぞれの AG 薬剤に対して耐性となる。各種の AG 不活化酵素遺伝子をコロニーから直接検出する迅速簡便検出法 (Multiple Colony Direct PCR) を開発した。今回この方法の有用性を調べた。臨床分離 MRSA の MIC 検査で、ゲンタマイシン (GM) 耐性およびアルベカシン (ABK) 耐性として分離された菌について、再検査した結果、MIC も感受性で、迅速簡便検出法で

不活化酵素遺伝子も含まれていないものが約 30%含まれていた。また、再検査で MIC 値で耐性菌とされたものはすべて不活化遺伝子も検出できた。

山口 恵三: AmpC 大量産生株における ESBL の検出方法の確立

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) は、元型の β -ラクタマーゼに安定な第 3 世代セフェム系抗菌薬をも分解する。AmpC 型 β -ラクタマーゼは元来、第 3 世代セフェムは分解しないが、多量生産株は第 3 セフェムを分解する。第 3 世代セフェムを分解する菌が、AmpC 型 β -ラクタマーゼの多量生産によるものか、ESBL 生産によるかを鑑別する方法の開発を目的として研究を行った。第 3 世代セフェムのセフェピムに対する感受性 (または耐性) は AmpC 型 β -ラクタマーゼ生産株と ESBL では異なる。この現象を利用し、寒天平板上での 3 次元拡散法を用いて、それぞれの生産株を鑑別する方法を開発するための実験を行った。AmpC 型 β -ラクタマーゼ多量生産菌はセフェピムを分解する効率が悪いことから、阻止円の縮小が認められなかった。一方、ESBL はセフェピムの分解効率がよいことから、阻止円の顕著な縮小を認めた。

山本 友子: サルモネラが多剤耐性菌の

レファレンスと分子疫学

非チフス性サルモネラ菌の多剤耐性機構の研究を行った。非チフス性サルモネラ菌は、食中毒の主要原因菌である。分離頻度の高い菌種は *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) および *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) である。特に多剤耐性 ST の中で definitive type 104 (DT104) が急増し問題となっている。DT104 は染色体性の一群の 5 剤耐性 (Ampicillin (Ap), Streptomycin (Sm), Sulfonamide (Su), Chloramphenicol (Cm), Tetracycline (Tc) 耐性) を持つ。1999 年から 2000 年に千葉県で食中毒患者から分離された ST 37 株の薬剤耐性遺伝子の構造解析を、PCR を用いることにより行った。37 株中 23 株 (62%) に、ST の DT104 株に存在する 5 剤耐性を保持していた。これらの株の耐性領域の遺伝子構造解析、 β -ラクタマーゼ型別解析を行った。

渡辺 治雄: PCR-RFLP 法を利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 変異のスクリーニング法の検討

ニューキノロン低感受性腸チフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出方法の研究。腸チフス菌、パラチフス菌によるチフス症治療には、ニューキノロン系 (レボフロキサシン LUFX、スパフロキサシン

SPFX、トスキサシン TFLX) 抗菌剤が第一選択薬である。ニューキノロン低感受性菌によるチフス症は、ニューキノロンによる治療に抵抗性を示す。ニューキノロン低感受性菌はジャイレース遺伝子の変異によりジャイレース蛋白 (GyrA) の 83 番目または 87 番目のアミノ酸の点突然変異が存在する。これらの遺伝子の変異を PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法によりスクリーニングする方法を開発した。これは、PCR 法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅し *HinfI* で切断しポリアクリルアミド電気泳動で切断パターンを比較する方法である。

D. 考察

グラム陰性菌の不活化酵素 (β -ラクタマーゼ) による β -ラクタム剤多剤耐性は、元型の β -ラクタマーゼ (セリン- β -ラクタマーゼ) の変異と進化により多剤耐性化した基質拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended Spectrum β -lactamase, ESBL) と、 β -ラクタマーゼの活性中心に金属イオンの Zn が存在するメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) がある。基質拡張型 β -ラクタマーゼは広域活性を持つ第 3 世代セフェムは元型の β -ラクタマーゼには安定であるが、ESBL は 3 世代セフェムも分解する。また、メタロ- β -ラクタマーゼは、カルバペネムおよびセフェ

ムを含むすべての β -ラクタム剤を分解する。そのため、これらの β -ラクタマーゼ生産菌は、その感染症治療を困難にするために問題となる。これらの β -ラクタマーゼ生産菌のレファランスと迅速検出方法の開発を目的に研究推進された、これまでの研究で開発したメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験 (MBL 簡便検出方法) を用いて検査した結果、国内分離広域 β -ラクタム剤耐性菌の 587 株中 431 株 (73%) は、MBL 剤耐性菌と判定され、MBL 特異的プライマーを用いて検査した結果も、431 株はすべて MBL 生産菌であることが確認された。このことは、MBL 簡便検出方法が有効であること、また、国内に MBL 生産菌が急速に拡散していることを明らかにしたものである [荒川 宜親]。

MBL 簡便検出方法開発のため、MBL に特異的に結合する物質と蛍光色素との化合物を新たに合成し、MBL に結合した化合物を蛍光色素により検出する方法を開発中である。これは MBL と特異的に化学結合する物質を利用した方法である。この研究は、MBL にのみならず、他の薬剤耐性に特異的な酵素の検出方法の開発にも応用することが可能なことが期待できる [後藤 正文]。MBL 生産菌と ESBL 多量生産菌による、カルバペネム不活化を鑑別する簡便検出方法の研究も実用化

の方向が示された [山口 惠三]。

AmpC 型 β -lactam 剤高度耐性化の遺伝子解析を行い、高度耐性化により AmpC 型 β -lactamase による β -lactam 剤基質拡張機構の解析に役立った [井上 松久]。

非チフスサルモネラ菌 (食中毒菌) の薬剤耐性菌の、薬剤耐性の現状と検出方法の開発のために日本で分離された菌についての基礎的な研究がなされた。この結果、この菌において、世界的に問題となっている *Salmonella typhimurium* DT104 型耐性菌が多く (68%) 分離されることが解った。この結果は、今後継続的な調査研究が必要と考えられる [山本 友子]。

いわゆるチフス菌の薬剤耐性では、その治療の第一選択薬であるキノロン耐性菌の検出方法の開発研究がなされた。この方法は、現在までに分離されているチフス菌のキノロン耐性菌が、ジャイレース遺伝子の特異的な部位の点突然変異であることを利用し、PCR-RFLP 方法により検出する方法である [渡辺 治雄]。薬剤の排出機構による薬剤耐性は、緑膿菌のキノロン耐性やアミノ糖の耐性で問題となる。これまでの排出機構の基礎的な研究に基づき、臨床分離株における排出機構による耐性菌の、検出方法の開発のための研究が行われた。この方法は PCR

を用いた排出蛋白遺伝子と、ノーザンブロットを用いた排出蛋白の検出を行い、その相関を研究したものである。今後、PCR 方法を用いることの有用性等に発展可能と考えられる [後藤 直正]。

呼吸器感染症には、各種の起因菌が関連する。これらの起因菌の中で主要な 6 種類の細菌に特異的な PCR プライマーを設定し、これらの細菌を、PCR 方法を用いて迅速検出する方法の開発研究が行われた。その結果、短時間で検出することが可能となった [生方 公子]。

MRSA の各種アミノグリコシド不活化による耐性をコロニーから PCR 方法を用いて検出する方法を臨床分離菌に応用した研究により、この検出方法の有用性が証明された [堀田 国元]。

アミノ糖系抗生物質のアルベカシン (ABK) は、これまで発見されているアミノ糖不活化酵素では分解されにくい薬剤である。この薬剤の高度耐性緑膿菌とセラチア菌の遺伝学的・生化学的研究を行い、これまでに発見されていない新たなアミノ糖不活化酵素を発見した。この酵素は、ほぼすべてのアミノ類を分解する酵素で、しかもプラスミド上に生産遺伝子が存在するために急速な拡散が危惧される。今後の継続的な調査研究が必要と考えられる。この薬剤耐性遺伝子は、アミノ糖抗生物質生産菌が保持している。

自らの抗生物質に対する耐性機構（遺伝子）から進化したものと考えられ、薬剤耐性の起源と進化という点から、細菌生物学的にも重要な発見である [荒川 宜親]。

バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）において、世界的にも報告例が少ない VanD 型 VRE が日本で新たに発見された [池 康嘉]。過去に日本の 1 病院での VRE 集団発生例起因菌が VCM 耐性遺伝子（VanB 遺伝子）が *E. faecalis* のフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在していることにより、プラスミド性のバンコマイシン耐性が院内感染の急速な拡散の原因となり得ることが示された [池 康嘉]。Vancomycin 耐性 *E. faecium* (VanA VRE) より、世界で初めてバンコマイシン耐性高頻度接合伝達性プラスミドが分離され、このプラスミド VRE において VCM 耐性のみならず、各種の薬剤耐性を拡散させるプラスミドであることが解った [池 康嘉]。

F. 結論

(1) これまでに報告のない、新たな細菌学および厚生労働行政上重要な発見がいくつか成された。

グラム陰性菌の緑膿菌、およびセラチア菌の高度アミノ配糖体耐性菌から、临床上に用いられるほぼすべてのアミノ糖体抗生物を不活化し、耐性を賦与するア

ミノ配糖体不活化酵素とその遺伝子が発見された。これはこれまでに報告されていない、まったく新しい新型のアミノ配糖体耐性遺伝子である。接合伝達性プラスミド上に耐性遺伝子が存在するため、今後グラム陰性菌全体に拡散することも示唆される。そしてこの発見は、細菌学的・生物学的および医療上、また厚生労働行政上も重要な発見である [荒川 宜親]。

バンコマイシン耐性腸球菌は（VRE）は、腸球菌の中で主として *E. faecium* において分離頻度が高い。*E. faecium* 菌においては VRE のバンコマイシン耐性遺伝子の研究報告は多く存在するが、耐性遺伝子を拡散する高頻度接合伝達性プラスミド等は解っていなかった。VanA 型 *E. faecium* より発見された高頻度接合伝達性プラスミドは、新型のまったく新しい薬剤耐性プラスミドである。このプラスミドにより、*E. faecium* の薬剤耐性の拡散因子として、細菌学的にも、厚生労働行政的にも重要と考えられる [池 康嘉]。

(2) これまでの研究で開発された薬剤耐性菌の迅速検出方法を臨床分離菌等に適応し、その有用性の研究報告が成された。メタロ・ β -ラクタマーゼの検出方法 [荒川 宜親]、薬剤排出ポンプとニューキノロン耐性およびアミノ配糖体耐性 [後藤 直正]、黄色ブドウ球菌のアミノ配糖体不活化酵素の検出方法 [堀田 国元]、気道感

染症起因菌の検出方法の研究[生方 公子]等である。

(3) 新たな検出方法の開発の研究。気道感染症起因菌の起因菌の検出方法[生方 公子]、メタロ・ β -ラクタマーゼの検出方法[後藤 正文]、チフス菌のキノロン耐性菌の検出方法[渡辺 治雄]。

(4) 問題となる薬剤耐性菌の基礎的研究。VanD 型 VRE の研究[池 康嘉]。食中毒起因サルモネラの薬剤耐性の研究[山本友子]。

G. 研究成果

1. Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Ishibashi H, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2004 53(3):425-30.
2. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, and Arakawa Y. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004 48(2) 491-6.
3. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003 6;362(9399):1888-93.
4. Nagano N, Shibata N, Saitou Y, Nagano Y, Arakawa Y. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 2003 41(12):5530-6.
5. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 2003 41(12):5407-13.
6. Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, Arakawa Y. A new TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the omega-loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003 47(9):2981-3.
7. Tomita H. and Ike Y. Tissue Specific Adherent *Enterococcus*

- faecalis* Strains that show Highly Efficient Adhesion to Human Bladder Carcinoma T24 Cells also adhere to Extracellular Matrix Proteins. 2004 Infect.Immun. (in press)
8. 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 185(23):7024-8.
 9. Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 2003 Mar 28;220(2):287-93.
 10. Kaieda S, Okitsu N, Yano H, Hosaka Y, Nakano R, Okamoto R, Takahashi H, Inoue M. Induction of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 2003 Oct;52(4):736-7. Epub. 2003 Sep 01.
 11. Nagano N, Sato J, Cordevant C, Nagano Y, Taguchi F, Inoue M. Presumed Endocarditis caused by BRO β -lactamase-producing *Moraxella lacunata* in an infant with Fallot's Tetrad. J. Clin. Microbiol. 2003 41(11):5310-2.
 12. Inoue M, Lee NY, Hong SW, Lee K, Felmingham D. PROTEKT 1999-2000: a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. Int. J. Antimicrob. Agents. 2004 23(1):44-51.
 13. Furuhata M, Iwamura M, Baba S, Inoue M. Combined effect of clarithromycin and imipenem/cilastatin against urinary biofilm infection after pyeloplasty. Int. J. Urol. 2003 10(4):228-30.
 14. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, and Ubukata K. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microbial Drug Resistance, 2003 9: 39-46.
 15. Ubukata K. Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. Journal of Infection and Chemotherapy, 2003 9: 285-291(総説)

16. Ubukata K, Iwata S, and Sunakawa K. In vitro activities of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate macrolide resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2003 9: 221-226.
17. 千葉菜穂子、長谷川恵子、小林玲子、鈴木悦子、岩田 敏、砂川慶介、生方公子、化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班：化膿性髄膜炎例から分離された *Streptococcus pneumoniae* の疫学解析 -1993 年から 2002 年の分離株について-。 *日本化学療法学会雑誌*、2003 51: 551-560.
18. 生方公子、小林玲子、千葉菜穂子、長谷川恵子、紺野昌俊：本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学解析。 -肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ、 *日本化学療法学会雑誌*、2003 51: 60-70.
19. 諸角美由紀、岩田 敏、遠藤廣子、大石智洋、大成 滋、川村尚久、黒木春郎、小林正明、斉藤洪太、酒井律子、砂川慶介、田島 剛、新田雅彦、野々山勝人、小林玲子、千葉菜穂子、生方公子： *Mycoplasma pneumoniae* の迅速検索を目的とした PCR -小児呼吸器感染症検体を用いて-。 *日本化学療法学会雑誌*、2003 51: 289-299.
20. Kuroki H, Morozumi M, Chiba N, Ubukata K. Characterization of children with *Mycoplasma pneumoniae* infection detected with the rapid polymerase chain reaction technique. *Journal of Infection and Chemotherapy*, (in printing)
21. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Iwata S, Murayama SY, Sunakawa K, and Ubukata K. Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (in printing)
22. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Murayama SY, K. Sunakawa: Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* responsible for meningitis in Japan, 1999-2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (in printing)
23. Wanchun JIN, Yoshichika Arakawa, Hisami Yasuzaka, Tomoko Taki, Ryo Hashiguchi, Kana Mitsutani, Asumi Shoga, Yoshihiro Yamaguchi,

- Hiromasa Kurosaki, Naohiro Shibata, Michio Ohta, and Masafumi Goto. Comparative Study of the Inhibition of Metallo-beta-Lactamases (IMP-1 and VIM-2) by Thiol Compounds That Contain a Hydrophobic Group : (日本薬学会誌 Biol. Pharm. Bull.に投稿中)
24. Hiromasa Kurosaki, Hisami Yasuzawa, Yoshihiro Yamaguchi, Wanchun Jin, Yoshichika Arakawa and Masafumi Goto. Detection of a metallo- β -lactamase (IMP-1) by fluorescent probes having dansyl and thiol groups. *Org. Biomol. Chem*, 2003 1:17-20.
25. Hacquet D, Vogne C, Garch FE, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskata O, and Plesiat P. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2003 47:1371-1375.
26. Gotoh N, Murata T, Kimura T, Ozaki T, Kondo A, and Nishino T. Intrinsic Resistance of *Escherichia coli* to mureidomycin A and C due to expression of the multidrug efflux system AcrAB-TolC: comparison with the efflux systems of mureidomycin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* 2003 9:101-103.
27. Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, and Tuchiya T. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003 51:991-994.
28. 後藤直正. 新世紀の感染症学 下 - ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート. 第1部 グローバル時代の感染症学 IV 感染症特論 5. 薬剤耐性菌 8) 薬剤耐性緑膿菌. *日本臨牀* 2003 61: 196-201.
29. 堀田国元, 土崎尚史, 石野敬子, 石川淳 新しい耐性菌モニタリングの展望・迅速簡便なゲノムモニタリングによる耐性菌の動向予測・*獣医畜産新報 JVM* 2003 56(10) 846-9.
30. Nakaya H, Yasuhara A, Yoshimura K, Oshihoi Y, Izumiya H, and Watanabe H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg Infect Diseases.* 2003 9: 255-257.

31. Izumiya H, Nojiri N, Hashiwata Y, Tamura K, Terajima J, and Watanabe H. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, J. Emerg. Infect. Diseases. 2003 9: 1650-1651.
32. Hirose K, Tamura K, Watanabe H. Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism. Microbiol. Immunol. 2003 47, 161-165.
33. Hirose K, Itoh K, Arakawa E, Tamura, K, Watanabe H. DNA based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to

fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). (Review) Research Advances in MICROBIOLOGY, 2003, vol. 3, p108-117. Global Research Network, Kerale, India.

その他研究成果は各班員の報告書の中に記載。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請中

荒川宜親：(発明の名称) グラム陰性桿菌の 16S rRNA メチラーゼの遺伝子

2. 実用新案登録、その他

なし

II. 分担研究報告書（平成15年度）

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成15年度分担研究報告書

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

—アルベカシン高度耐性グラム陰性桿菌の耐性機構の解析—

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

従来報告されているアミノグリコシド（AG）修飾酵素では不活化されにくいといわれていたアルベカシン（ABK）に対して高度の耐性を有する緑膿菌およびセラチアが分離された。ABK耐性に関与する遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、カナマイシンやゲンタマイシンなどのAGを産生する放線菌が、自己の16S rRNAをメチル化して保護するために産生する16S rRNAメチラーゼ遺伝子に類似した遺伝子を保持していることが判明した（*rmtA*, *rmtB*）。また接合実験の結果、緑膿菌から分離された*rmtA*は他の緑膿菌株に伝達されることから、プラスミド上に存在することが示唆された。セラチアから分離された*rmtB*は接合実験で伝達性は確認されないものの、プラスミドを抽出しエレクトロポレーション法で大腸菌に伝達させることが可能であったことからこちらの遺伝子もプラスミド上にあることが判明した。さらにアイソトープ標識したS-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として酵素反応を行い、RmtAおよびRmtBの16S rRNAメチラーゼ活性を測定した。その結果、放射活性の取り込みが認められ、RmtAおよびRmtBは16S rRNAメチラーゼであることが確認された。

本耐性遺伝子の由来を調べるためそれぞれの酵素遺伝子の周辺の遺伝子構造を調べたところ、*rmtA*とその周辺構造は水銀耐性遺伝子を保持するトランスポゾン（Tn5041）内に挿入される形で存在した。また*rmtB*はTn3の下流に位置することがわかっており、いずれの遺伝子も外来性に病原細菌に取り込まれた可能性が強いことが判明した。

そこで、この種の16S rRNAメチラーゼ遺伝子が、院内感染症、術後感染症、日和見感染症の原因となる種々の臨床分離株に拡散する事を防止する実効ある対策を講じる事が急務となっている。

研究協力者：

横山佳子、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、
八木哲也、柴山恵吾、加藤はる（国立感染症研究所 細菌第二部）

A. 研究目的

アルベカシン（ABK）は日本で開発された半合成アミノグリコシド（AG）系抗生物質で、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示すことを特徴としている。日本では、1990年に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染症の治療薬として認可され、現在臨床現場で広く用いられている。ABKは細菌が産生するアセチル化酵素、リン酸化酵素、アデニル化酵素など種々のAG修飾酵素による耐性化機構を回避することを想定して設計されており、耐性菌が出現しがたい抗生物質といわれてきた。現在までに報告されているABK耐性菌の出現についてはMRSAにおいて、ABKの最小発育阻止濃度（MIC）が12.5–25 $\mu\text{g/ml}$ 、即ち中等度耐性MRSAが数%出現しているという報告がある。この耐性化機構は薬剤のアセチル化とリン酸化を同時に行う二機能酵素によるものであり、ABKの6'位のアミノ基と2''位の水酸基が同時に修飾を受けることにより不活化される。

しかし、1997年にABKのMICが1,024 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示す超高度耐性緑膿菌が臨床分離された（AR-2株）。また2001年にはセラチアからも同様に高度耐性を有する株（S-95株）が臨床分離された。AR-2株およ

びS-95株はABK以外の種々のAG系抗生物質にも高度耐性（MIC, >1,024 $\mu\text{g/ml}$ ）を示し、薄層クロマトグラフィーでAGの修飾が確認できなかったことから、二機能酵素によるAGの修飾不活化とは異なる全く新規の耐性機構を獲得している可能性が示唆された。院内感染の原因菌である緑膿菌やセラチアでこのような株が臨床現場に広まっている可能性が考えられ、化学療法の実施において将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。本研究ではAR-2株およびS-95株からABK耐性遺伝子をクローニングし、塩基配列の決定および遺伝子産物の機能およびそれを媒介している遺伝子構造を解析した。

B. 研究方法

1. ABK耐性遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

緑膿菌AR-2株およびセラチアS-95株から全DNAを抽出し、AR-2株はHindIIIでS-95株はBamHIでそれぞれ切断した後、大腸菌用クローニングベクターであるpBCSK+のHindIIIおよびBamHI部位にライゲーションを行った。大腸菌XL-1Blueに形質転換後、得られた大腸菌クローンからプラスミドを回収し、自動DNAシーケンサー（3100 Genetic Analyzer；ABI社）により塩基配列を決定した。ホモロジー検索はFASTA法およびBLAST法を用いた。

2. 接合実験

ABK耐性遺伝子がプラスミド性であるか

どうかを検討するために AR-2 株 (ABK^R, CPFY^S) をプラスミド供与株、緑膿菌 No.105 株 (ABK^S, CPFY^R) をプラスミド受容株として接合を行った。同様に S-95 株 (ABK^R, RFP^S) をプラスミド供与株、大腸菌 CSH2 株 (ABK^S, RFP^R) をプラスミド受容株として接合を行った。

3. MIC 値の測定

各々の抗菌薬の MIC 値の測定は NCCLS 法に準じて行った。

4. 遺伝子産物の 16S rRNA メチラーゼ活性の測定

アイソトープ標識した S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とし、リボソームの 30S サブユニットを基質として酵素反応を行った。緑膿菌 AR-2 株について用いた粗酵素液は ABK 耐性遺伝子を緑膿菌 大腸菌シャトルベクター pT0001 にサブクロニングし、緑膿菌 PA01 に形質転換して得られたクローンより抽出したものを用いた。セラチア S-95 株は His-tag 付きリコンビナントタンパクを合成し実験を行った。

C. 研究結果

緑膿菌 AR-2 株およびセラチア S-95 株由来の ABK 耐性遺伝子の塩基配列を決定した結果、この遺伝子は 756 塩基、251 アミノ酸で構成されており、ホモロジー検索の結果、両者のアミノ酸配列の相同性は 82%であった。現在までに報告されている AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子アミノ酸レベルで相同性を調べたところ

約 30%であった。我々は緑膿菌由来の ABK 耐性遺伝子を *rmtA*、セラチア由来の ABK 耐性遺伝子を *rmtB* と命名した。数種の AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼおよび RmtA, RmtB のアミノ酸配列の比較を Fig. 3 に示す、また、それらもとに作成したデンドログラムを Fig. 1 に示した。

大腸菌クローンにおける種々の AG 系抗生物質の MIC 値を測定した結果、RmtA および RmtB は ABK のみならず類似の基本構造を有するカナマイシン (KM) 系、ゲンタマイシン (GM) 系の抗生物質すべてに高度耐性 (MIC, >1,024 μ g/ml) を付与した (Table 1)。

また接合実験において得られた接合体、AR-2 株および No.105 株の MIC 値を測定したところ、少なくともトブラマイシン (TOB)、アミカシン (AMK)、ABK、イセパマイシン (ISP) についての耐性が伝達されていることが明らかとなった (Table 1)。S-95 株は接合実験では耐性は伝達されなかったが、プラスミドを抽出しエレクトロポレーション法により大腸菌 XL-1Blue を形質転換したところ AG 耐性は伝達された。

RmtA および RmtB の 16S rRNA メチラーゼ活性を測定した結果、RmtA を含む粗酵素抽出液を酵素溶液として用いた場合、30S サブユニットへの放射活性の取り込みが強く認められた (Fig. 2)。RmtB では His tag 付き RmtB を合成し実験を行ったところ同様に放射活性の取り込みが認められた。

rmtA の周辺構造を調べた結果、*rmtA* およびその周辺の 6.2 kbp は水銀耐性遺伝子を

保有するトランスポゾンである Tn5041 内に挿入される形で存在した。また *rmtB* は Tn3 のすぐ下流に位置する事が判明した。

D. 考察

今回クローニングした *rmtA* および *rmtB* の産物は、AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼと約 30% の相同性があり、KM 系および GM 系の抗生物質全てに高度耐性を付与した。またメチル基取り込み実験より、16S rRNA メチラーゼ活性を有することが強く示唆された。またこれらの遺伝子の周辺構造を調べるとこの遺伝子を保有する緑膿菌およびセラチアのゲノムとは全く異なった構造をしており、遺伝子の転位に関係するトランスポゾンと関係が深いことが判明した。これらの結果は、これらの耐性遺伝子が放線菌に代表される AG 産生菌から由来している可能性を示唆するものである。

AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼは AG の標的部位である 30S リボソームにおける 16S rRNA の特定の塩基をメチル化することにより AG の結合を妨げる作用をし、AG 産生放線菌が自己防衛手段として生来獲得している酵素である。また特徴として転写後に rRNA を修飾することが挙げられ、リボソームの立体構造の構成過程で関与する種々の RNA メチラーゼとは性質が異なる酵素であることが報告されている。また接合実験結果から他の緑膿菌株に伝達することが判明した。また、*rmtA* や *rmtB*

遺伝子トランスポゾン様の遺伝子構造に媒介されていることから、これらの結果は、今後、臨床現場においてこれらの耐性遺伝子がグラム陰性桿菌の間に拡散し、各種のアミノグリコシドに超高度かつ多剤耐性を獲得した緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌が増加する危険性を示しており、AG の適正使用の推進とともにその動向の監視が強く臨まれる。

E. 結論

本研究により、全く新しい AG 高度耐性メカニズムを獲得した緑膿菌やセラチアが臨床現場に出現したことが確認された。

院内感染症や術後感染症の原因菌である緑膿菌およびセラチアにおいて、臨床現場で使用頻度が高い AG 系抗生物質全般に対し高度耐性を付与する、新規な耐性機構を獲得した臨床分離菌の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。また、これらの遺伝子がプラスミド上に存在することから、グラム陰性菌間における伝播拡散の危険性が強く懸念される。

F. 健康危険情報

我々の予備調査では 1997 2002 年度に臨床分離された緑膿菌 1,113 株中、少なくとも 9 株が *rmtA* 遺伝子を保有していた。これら 9 株について、パルスフィールド電気泳動により解析を行ったところ、それらは全く異なるバンドパターンを示したことが

ら、*rmtA*がプラスミドを介して異なる緑膿菌株間に接合伝播し、拡散しつつある可能性が強く示唆された。*rmtB*を保有するセラチアは現在のところ1例のみであるがこの遺伝子を保有する大腸菌、肺炎桿菌も臨床現場から分離されている。これらの株は、現在臨床現場で用いられている多種類のAG系抗生物質に耐性を与えるため、临床上極めて危険性が高い。現在実施されている「院内感染対策サーベイランス事業」などの中で、16S rRNAメチラーゼ遺伝子保有緑膿菌の分離状況、他菌種への同遺伝子の伝播状況の把握を検討項目として付け加える必要性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yokoyama, Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, Y. Arakawa. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet 2003; 362: 1888-1993.
2. Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance

to aminoglycoside. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 491-496.

2. 学会発表

1. K. Yamane, Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa: Genetic environment of 16S Ribosomal RNA Methylase (*magrA*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* conferring Resistance to Aminoglycosides. American Society for Microbiology 103rd General Meeting, Washington DC, USA, May, 2003
2. 山根一和、土井洋平、和知野純一、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親：グラム陰性桿菌に高度アミノグリコシド耐性を付与する16S rRNA methylaseの保有状況 第86回日本細菌学会関東支部会、横浜、10月、2003年

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請中

(発明の名称)グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの遺伝子

2. 実用新案登録、その他

なし

Table 1. MICs for parental strain, transformants and transconjugant

Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for									
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i> XL1-blue		<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. aeruginosa</i>			
	AR-2	H9	H9-13	pBC	pTORmtA	pTO001	Transconjugant	No.105 ^a		
4,6-substituted deoxystreptamines										
Kanamycin groups										
Arbekacin	>1,024	>1,024	>1,024	0.5	>1,024	1	>1,024	4		
Amikacin	>1,024	>1,024	>1,024	1	>1,024	8	>1,024	4		
Kanamycin	>1,024	>1,024	>1,024	2	>1,024	128	>1,024	>1,024		
Tobramycin	>1,024	>1,024	512	1	>1,024	1	>1,024	>1,024		256
Gentamicin groups										
Gentamicin	>1,024	>1,024	1,024	0.5	>1,024	256	>1,024	>1,024		>1,024
Sisomicin	>1,024	512	>1,024	0.5	>1,024	256	>1,024	>1,024		>1,024
Isepamicin	>1,024	>1,024	>1,024	0.5	>1,024	4	>1,024	>1,024		8
4,5-substituted deoxystreptamine										
Neomycin	>1,024	4	2	4	512	16	>1,024	>1,024		>1,024
Other aminoglycosides										
Streptomycin	128	4	2	4	32	32	>1,024	>1,024		>1,024
Hygromycin B	1,024	64	2	32	512	512	1,024	1,024		512
Others										
Ceftazidime	2	0.5	0.25	0.25	ND ^b	ND	128	128		32
Imipenem	1	0.25	0.25	0.125	ND	ND	16	16		16
Ciprofloxacin	0.25	0.125	0.125	0.125	ND	ND	64	64		64

^aNo.105: recipient for the conjugation study

^bND, not determined.

Figure 2

ACCATCCCGAGTGTGGCCCTTGGTACTGGCAATTAATCAATATGCTATTCGCCCCCAATCTGGTCTCAGGGCCATGCCCAATGGCCGCGCAGA 90
 H P E L W P S Y C D N S Y A I R P D L V L S E H A H G G Q I
 TCGCCCTGCCAATGCCGCGGCTGCTTGGCCCAATCAAGGCTGTCCTTAAGTATATACCTCCGGCCACTATTCGGCCAGCAATGGCA 180
 R L P W I G G L E A P N Q G F F P K Y T S G H Y A A D N G T
 -35 -10
 CCCAAATGATGTCAGCCCGGGCCCTTCCGAATGCAATCTTCCGCTGGTGTATTCATACGGCCCAATTCGGCCCTTCATCCCTACCGG 270
 Q M I V S R G L G N S I F P V R V F N R P H L P V I T L T G
 GTGGTAGGGTTCAGCCGAGGATATAGGGATCATTTATGCAATGACGCCCAATTCGCCCAACAACCCAGCAACACACAGATACAGCTTT 360
 G * S D M S F 3
 GACGATGCCCTAGCGTCCATCCCTTCCCTCAAAAATAATCTGCTCCCTCTCCCGCGCATACCGTACGGCGGATTTATGATTCAGCAATGGCGG 450
 D A L A S I L S S K K Y R S L C P D T V R R I L D Q E W G 33
 CGGCACAAATCGCCCTAAGCTGGCAGTGGCCAGTCCAGTCCAGCCCGCCCTCCAGCCGCTATGTCACCGCCGATGCTCCCTCAG 540
 R H K S P K L A V E A T R T R L L H G I C G A Y V T P E S L K 63
 GCTCCAGCAGCGGCAATATCGGTTGGCGATGTGCAAAAGGACATGTCCCTGTCACCGCTCTACCAAGCGGCTTGGCCGATTCGCAATCC 630
 A A A A L S V G P V Q K A L S L H A S T K E R L A E L D C 93
 CTCATCCAAATTTAATCTTCCGGGGTCCCGCAATGGTGTGATATCCCTTCCGGCCCTAATACCCCGCTCCCGCTCTTTATACGTGAC 720
 L Y D F I F S G G V P H R V L D I A C G L N P L A L F I R D 123
 ATACATGTGTATCCGCTCCGACATCCATCAGGGTTCGGCCGATGTCACCCCTTCCCAATCAATGCAATGCAATGCAATGCAATG 810
 I T S V W A C D I H Q G L G D V I T F F A H H Q G L D F F F 153
 GCCCTCCAGGATGTCATGTTAGCCCGCCAGTCCAGACGGGGGATTTGGCAGTCTGATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA 900
 A L Q D V M C T P P T E T G D L A L V E K L L P L L E R E Q 183
 GCTGGCCCGCCCAATGGCCCTAAGCAGGCACTAGCTTACCCCTCCGATTCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAGCTTCCAG 990
 A G A A M A L L Q A L A T P R I A V S F P P R S L G G R G K 213
 GGCATGGAGCAACATTTCCCAATGCTTCCAGCCCGCCAGTCCCTGATGATTTGCAATTCAGCAATTCAGCAATTCAGCAATTCAGCA 1080
 G M E A N Y S A W F E G A L P D E F E I E D T K T I G I E L 243
 GTGTACATGATATAAAGCAATPAGTACCTAAGCCAGGCAAAACCTTACCCCTGCTAATAAATAAAGGAGGACCAAAAATAATGCTTTTCGT 1170
 V Y M I K R N K *
 TCCCTCTTTGTATATCGACTACACACCCCTATGATGCTGTTGTTCAGTAGCCGCTTTATAGTTCAGTTCATCCCAAGCCGCCAGGG 1260
 * S Q Q K K L L R K Y T L E I G L A G L
 GTGGTTCAGCAAGTATGCGAGATTCGCCACCCCTAGTATCCCTTCCCGCCCTCAGCCCGCCATCCAGCCGCTTGAACCAATTCGGCAG 1350
 P A T L L I A L I A V A L I A E G G S L G M S L P I S G I A

P. aeruginosa	/RntA	1	-----MFDALASLSSK-----IVFSLQFDVFRDQBWGRKSKLAVEAT	45
S. marcescens	/RntB	1	-----MINDALISLASK-----KYPALQFDVFRRLIIEWGRHSPKQIVAEA	45
K. pneumoniae	/AmA	1	-----MDKNDVWKLSEK-----KYENLSDMKEVWSSRKYKVEY--BNY	43
M. purpurea	/GntA	1	---MIT---SAFE---D-FHQVEGAIKSRVQIVAPATVFRLARAAVAARQDVPQAVKR	52
S. hindustanus	/Nrb	1	MHP-APCPA-DADFLAEVMAAFSSRYQSAFETVFLAANALVARGGLAEAVKR	53
S. karayocicus	/Knt	1	---MSGSASDE---DRLTRVVAVFGJRRRSYTDQAVRRLARPAALAVEGDYVIRAKR	54
S. tenebralis	/KntB	1	---MIT---S/PD---D-FHQVEGAIKSRVQIVAPATVFRLARAAVAARQDVPQAVKR	52
M. rosea	/GntB	1	---MIT---STGD---D-FHQDGLQAIKSRVQIVAPATVFRLARAAVAARQDVPQAVKR	52
* . . . *				
P. aeruginosa	/RntA	46	RT-RLHJGCGA-----YVTRESI-KAAAALSGVGMQKA-L-SJHAS-TKERLAEL	91
S. marcescens	/RntB	46	RT-RLHJGCGA-----YVTRESI-KAAAALSGVGMQKA-L-SJHAS-TKERLAEL	91
K. pneumoniae	/AmA	44	SKKKLHJMGCS-----YYSVPMQKLLK-K-INGGQISEDLIKFSS-TNERVAITL	93
M. purpurea	/GntA	53	TKRQJHBYGAFPPSPRYAALRQDSVADAGDEAVRAALRRAMSHVSTIE RLHL	112
S. hindustanus	/Nrb	59	TKRQJHEVFCAYLPSFP-KYDALLRQDRDADGDEAVRAALRRAMSHVSTIERLRL	117
S. karayocicus	/Knt	55	TKRQJHEVFCAYLPSFP-KYDALLRQDRDADGDEAVRAALRRAMSHVSTIERLRL	113
S. tenebralis	/KntB	53	TKRQJHBYGAFPPSPRYAALRQ DSVDGDDAAVQAAURRAMSHVSTIERLPL	112
M. rosea	/GntB	53	TKRQJHBYGAFPPSPRYAALRQLDSAVRAGDEAVRAALRRAMSHVSTIERVPHL	112
** * * * **				
P. aeruginosa	/RntA	92	DQYDFSGGPHRV-LDIA-CGJNLAJFRQIS-VWA-C-DF-HG-LGMITPFAHI	146
S. marcescens	/RntB	92	DTLYDFSAETRRV-LDIA-CGJNLAJVERQAS-VWGC-DF-HG-LGMITPFAFE	146
K. pneumoniae	/AmA	94	NDYVYFGVNHVSSLDLFG-CGDFLALYQWVWENKTHAYDPAFABLSSEK	152
M. purpurea	/GntA	113	AEFYGERHMPQPNIL-FDLACGJNLAAPWAGLSQDQVYVASDDARLQVDAALTR	171
S. hindustanus	/Nrb	118	EEFYREVFARLDAPTSV-RDLACGJNLAAPWAGLSQDQVYVASDDARLQVDAALTR	176
S. karayocicus	/Knt	114	TBMVAEVRDLTAPATVRLDLAGGMPNLAAPWAGLSQDQVYVASDDARLQVDAALTR	173
S. tenebralis	/KntB	113	AEFYREVFARLDAPTSV-RDLACGJNLAAPWAGLSQDQVYVASDDARLQVDAALTR	171
M. rosea	/GntB	113	DEFYREVFARLDAPTSV-RDLACGJNLAAPWAGLSQDQVYVASDDARLQVDAALTR	171
* * * * *				
P. aeruginosa	/RntA	147	QGLDFTFALQDVMCIPTTETDGLAL-VFKLPLEEGAGAMALQALATFRVAVSFTT	205
S. marcescens	/RntB	147	KDNDFTFALQDVMCIPTTETDGLAL-VFKLPLEEGAGAMALQALATFRVAVSFTT	205
K. pneumoniae	/AmA	153	LKTKTYRFLNKESDVKGYDWF-LKMLPVKGGQVNLDFLQLHRTQNFVSTFI	210
M. purpurea	/GntA	172	LGVAHRTSWOLLERLDE-PTDVTLLKTLPLETOFRGSGVEVDMNSFWITPPT	230
S. hindustanus	/Nrb	177	LGVAHVRVRLMGTG-EVAVDVTLLKTLPLETOFRGSGVEVDMNSFWITPPT	235
S. karayocicus	/Knt	174	LGVAHVRVRLMGTG-EVAVDVTLLKTLPLETOFRGSGVEVDMNSFWITPPT	232
S. tenebralis	/KntB	172	LGVAHRTSWOLLERLDE-PTDVTLLKTLPLETOFRGSGVEVDMNSFWITPPT	230
M. rosea	/GntB	172	LGVAHRTSWOLLERLDE-PAD VTLLKTLPLETOFRGSGVEVDMNSFWITPPT	230
* * * * *				
P. aeruginosa	/RntA	206	RSLGGRCKGMFANSAWFEALPDE-FEEDTKTDELVMF-K-RVK	251
S. marcescens	/RntB	206	RSLGGRCKGMFANSAWFEALPDE-FEEDTKTDELVMF-K-RVK	251
K. pneumoniae	/AmA	211	KSLSKGKGMFENYQWIFESTIK-GMKLDSKQVNEVYF--SDFOK-	257
M. purpurea	/GntA	231	KSLGGRCKGMFONYSQFESQAFESQRFLE-QNELMOK-----	274
S. hindustanus	/Nrb	236	KSLGGRCKGMFANSAWFEALPDE-FEEDTKTDELVMF-K-RVK	281
S. karayocicus	/Knt	233	KTLGRFRGMQTHSAFARRVAFRRVAKOBEF-CDELVYVTKG-----	277
S. tenebralis	/KntB	231	KSLGGRCKGMFONYSQFESQAFESQRFLE-QNELMOK-----	274
M. rosea	/GntB	231	KSLGGRCKGMFONYSQFESQAFESQRFLE-QNELMOK-----	274
* ** * * * *				