

薬剤耐性菌等に関する研究班

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究

分担研究者 倉田 毅 富山県衛生研究所

研究要旨

感染症法で保健所を通じて届け出ることが定められている薬剤耐性菌は、大規模な医療施設等での集団発生のリスクをかかえているだけでなく、公衆衛生上においても蔓延防止対策が必要となっている。しかし、地域保健衛生領域で専門的な研究機関である地方衛生研究所等（以下、地衛研）で、そのための検査や調査研究は実施されていないのが現状である。そこで薬剤耐性菌の検査について、その検査・解析機能についての役割を把握するために地衛研76施設を対象にアンケート調査を行なった。その結果、検査の重要性は認識しつつも、地衛研としてこれらの検査に強く関わる時、院内感染や感染源の調査といった事例が予想されることから、遺伝子学的解析について、マニュアルの整備と結果の解釈に関する研究会や支援が必要であることが判明した。

協力研究者：

綿引正則、磯部順子（富山県衛生研究所）、八柳潤（秋田県保健環境センター）、白木 豊（岐阜県保健環境センター）

が予想されている薬剤耐性菌の検査・解析機能について地衛研の役割を明確にすることを目的として耐性菌検査に関する現状を把握するため、地衛研全国協議会に加盟している76施設を対象に郵送による、耐性菌検査についてのアンケート調査を実施した。

A. 研究目的

薬剤耐性を示すバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）及び多剤耐性を含む緑膿菌（MDRP）の5つの耐性菌による感染症患者が発生した場合、感染症法では保健所を通じて届け出ることと定められている。近年、これらの耐性菌は、大規模な医療施設等で集団発生するリスクを常にかかえているだけでなく、公衆衛生上の観点から、蔓延防止対策が必要となっている。そのなかでこれまで地域保健衛生領域で専門的な検査および調査研究を行なっている研究機関である地衛研では積極的には、検査や調査研究は実施されていないのが現状である。従って、拡大

B. 研究方法

アンケート対象：地衛研全国協議会加入機関76機関

方法：郵送によるアンケート用紙の配布及び郵送による回収を平成18年9月～10月にかけて行い、内容を集計した。

アンケート内容（資料1、2及び3）

C. 研究結果

I. 薬剤耐性菌の検査体制について

1. 地衛研の細菌検査の担当者数について

図1に示した。

2. これまで医療機関などからの薬剤耐性菌の検査依頼の実績について

実績ありと回答した機関の実績として、*Acinetobacter*(1)、BLNAR(1)、*gyr mutant*(1)、*Klebsiella*(3)、MBL(1)、MDRP(9)、MRSA(15)、PBP変異菌(1)、PRSP(3)、*Serratia*(2)、VIM(1)、VRE(26)、VRSA(1)、BLP(1)、ベータラクタマーゼ産生菌(1) [()内は、回答件数を表す]の検査であった。VRE、MRSAの検査依頼が多いことが判る。また、検査内容については、PFGE(20)、PCR(33)、分離・同定(9)、MIC、感受性試験その他(18)であった。また、実績なしと回答して、その理由として記載があった理由としては、経験なし(1)、未整備(2)、相談者あるいは制度上の問題(2)であるとした。

3. 薬剤耐性の検査・解析について

この質問は、薬剤耐性菌の検査や解析について医療機関から依頼があった場合、随時対応することが出来るかどうかを質問したものである。その結果は、図3の通りであり、()には回答機関数を表示した。

この中で実施可能であると回答した機関が、実施可能な耐性菌の種類はなにか聞いたところ、表1のような結果を得た。

実施可能な菌種については、VREが25機関で可能と答えており、続いてMRSA、VRSA、MDRPの順で多かった。

また、実施不可能であり、現時点で耐性菌検査の体制整備の予定をもっていないと回答した25機関の、その理由として、[()ないは機関数]依頼なし(9)、必要性なし(4)、将来的な必要性認識はしているが(3)、人員不足(5)、予算不足(2)、手数料設定なし(1)であった。

4. 地衛研での薬剤耐性の検査体制を整備強化する必要があるか

検査体制強化の必要性については、67機関から回答があり、54機関(81%)が必要である、13機関(19%)が必要ないと回答した(図4)。その理由としては、表2にその件数とともに示した。

5. 地衛研で必要な薬剤耐性菌の検査体制整備について

標記の件について最も必要であると思われる事を該当する項目から選択する方式で質問した。その集計結果は、表3に示した。

その他を選んだ機関から得た具体的な項目は、法的根拠が必要、依頼検査の頻度、予算的措置、マニュアルの整備、標準菌株の整備・精度管理及び検査技術の維持を掲げている。

II. 現在実施可能な薬剤耐性菌の検査・解析について(各論的な設問)

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、ペニシリン耐性肺炎双球菌(PRSP)及び薬剤耐性緑膿菌(=多剤耐性緑膿菌、MDRP)の5菌種について質問した。

表中の()内の数字は、回答が得られた機関数を示す。

1. バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)について

結果は、表4に示した。

2. バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)について

結果は、表5に示した。

3. メシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) について

結果は、表 6 に示した。

4. ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) について

結果は、表 7 に示した。

5. 薬剤耐性緑膿菌 (=多剤耐性緑膿菌、MDRP) について

結果は、表 8 に示した。

6. 上記以外の薬剤耐性菌について検査・解析の実施可能性について

可能と回答した 19 機関にさらに耐性菌の種類及び検査内容について質問したところ、以下のような回答を得た。但し、()内の数字は、回答した機関数を示す。

耐性菌の種類としては、*Salmonella* (8)、ESBL 産生菌 (5)、*E. coli* (5)、*Shigella* (5)、AmpC bacteria (3)、*S. pyogenes* (1)、*Haemophilus* (1)、*Campylobacter* (1)、*Vibrio* (1)、MDR-TB (1)、BLNAR (1)、*Klebsiella* (1)、*Acinetobacter* (1)、*Serratia* (1)、Vitek (1) であった。また、実施検査の内容は、遺伝子検査 (PCR, sequencing) (5)、ディスク拡散法 (5)、遺伝子検査 (PFGE) (3)、ESBL 型別 (1) であった。

7. これまでに実施した試験検査結果が法的な証拠等として利用された経験について (耐性菌の検査以外も含む)

結果は、図 6 に示した。

8. 地衛研における耐性菌検査の充実強化について関心の有無

結果は、図 7 に示した。

考察

アンケート回収率は 93.4% (71/76) で、地衛研の現状の把握が出来たと考える。そして、それぞれの質問に対する回答から、耐性菌の検査体制が明らかになった。以下、その内容を要約する。

- ① 各機関の細菌検査の担当者は、0~11 人と地衛研により大きく異なる結果となった。しかし、これについては、その多くは細菌全般の検査に携わる人員数を回答してきたと思われるが、いくつかの機関では、薬剤耐性菌の検査に限定した人員数を回答していることが、差を大きくしている原因となった。
- ② 耐性菌の依頼内容は、遺伝子関連の項目が多かったことから、医療機関や地域保健等の観点から、地衛研に求められている耐性菌検査のひとつの方向性を示唆するものと考えられる。

地衛研としてこれらの検査に強く関わるとき、院内感染や感染源の調査といった事例が予想されることから、遺伝子学的解析について、マニュアルの整備と結果の解釈に関する研究会が必要になるであろう。

(資料1) アンケート送付挨拶状

各都道府県／政令指定都市
地方衛生研究所等所長殿

前略、

感染症法では、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)〈全数〉、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)〈全数〉、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)〈定点〉、ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)〈定点〉、薬剤耐性緑膿菌〈定点〉の5つの耐性菌による感染症患者が発生した場合、保健所を通じて届け出る事が求められています。

これらの様々な薬剤耐性菌の確認試験などが、各自治体の地方衛生研究所等に依頼される事も多くなってきておりますので、各々の地方衛生研究所等における薬剤耐性菌の試験・検査体制の現状等を厚生労働科学研究の一環として調査する事になりました。

つきましては、別添の調査用紙を貴下担当職員にお渡し頂き、質問事項に御回答頂き、お手数ですが同封の封筒にて、10月16日までに御返送願えますようお願い致します。

草々

平成18年9月**日

分担研究課題
「地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究」

富山県衛生研究所 所長
倉田 毅

平成18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)
「薬剤耐性菌等に関する研究(H18-新興-11)」班
主任研究者 荒川宜親

(資料2) アンケート送付依頼状

地方衛生研究所等
細菌、病原体等検査・解析
御担当責任者様

感染症法では、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)〈全数〉、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)〈全数〉、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)〈定点〉、ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)〈定点〉、薬剤耐性緑膿菌〈定点〉の5つの耐性菌による感染症患者が発生した場合、保健所を通じて届け出る事が求められています。

しかし、様々な理由から、それらの耐性菌の確

認試験などは、各自治体の地方衛生研究所等で実施できず、国立感染症研究所に直接、解析依頼が来る事も多いのが現状となっています。

最近、国内各地の医療機関においてVREや多剤耐性緑膿菌(MDRP:感染症法では「薬剤耐性緑膿菌」)による大規模なアウトブレイク事例も発生しており、公衆衛生上もそれらの蔓延を防止する実効ある対策が必要となっています。

そこで、各自治体の地方衛生研究所等におけるVRE、VRSA、MDRPなどの検査・解析機能をさらに整備・強化する事が重要になりつつあると認識し、厚生労働科学研究費により現状調査を実施する事になりました。

本調査の集計結果は参加協力施設にお返しするとともに、今後、実施を計画している技術研修会などの企画に反映させて頂きたいと考えております。

つきましては、別添の調査用紙に御記入の上、御返送頂けますようお願い致します。

分担研究課題

「地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究」

富山県衛生研究所 所長
倉田 毅

平成18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)
「薬剤耐性菌等に関する研究(H18-新興-11)」班
国立感染症研究所 細菌第二部
主任研究者 荒川宜親

研究協力者
富山県衛生研究所
綿引正則
磯部順子

秋田県健康環境センター
八柳 潤

岐阜県保健環境研究所
白木 豊

国立感染症研究所 細菌第二部
鈴木里和

(資料3) アンケート内容

注:このアンケートにおける「薬剤耐性菌」とは、感染症法の感染症発生動向調査対象疾患の病原体であるバンコマイシン耐性腸球菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、ペニシリン耐性肺炎球菌、薬剤耐性緑膿菌およびその他の院内感染対策上問題となる

薬剤耐性菌 (ESBL 産生菌、アシネトバクター属、セラチア属等) のことを示します。

I. 薬剤耐性菌の検査体制について

1. 現在の細菌検査担当者数： 人
2. これまでに医療機関などから薬剤耐性菌の検査などを依頼されたことがありますか。

(該当する項目に○をつけ、設問にご回答ください)

a. 依頼されたことがあり、検査を実施した。
耐性菌や遺伝子の種類、複数記入可
検査・解析内容

b. 依頼されたが、実施しなかった
実施しなかった理由

c. 依頼された事はない

3. 薬剤耐性菌の検査や解析について医療機関等から依頼があった場合、随時対応することは可能ですか。(該当する項目に○をつけ、設問にご回答ください)

a. 可能
対応可能な耐性菌の種類、複数記入可

b. 現時点では体制が整備されていないが、将来的には可能

検査体制の整備を考えている耐性菌の種類

c. 現時点では体制整備の予定はない
理由

4. 地方衛生研究所での薬剤耐性菌の検査体制を整備強化する必要があると思いますか。

(該当する項目に○をつけ、理由をお答えください)

ある なし

理由

設問4. で「ある」と回答された方におききます。

5. 地方衛生研究所での薬剤耐性菌の検査体制整備に最も必要と思われる事は何ですか。

該当する項目1つに○をつけてください。

a. 人員増加

b. 検査に必要な機材の整備

c. 検査・解析方法の講習会

d. その他 具体的に：

II. 現在実施可能な薬剤耐性菌の検査・解析について

(該当する項目に○をつけ、設問に回答してください。)

1. バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) について

1. 菌種の同定

a. 可能

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

2. 薬剤感受性試験 (最小発育阻止濃度測定)

a. 可能

測定方法に○をつけてください

ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希

釈法・E-テスト

その他 ()

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

3. 薬剤耐性遺伝子 (van 遺伝子等) の検出

a. 可能

検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

4. パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別解析

a. 可能でありその結果の解釈についても自信あり。

b. 可能であるがその結果の解釈については自信なし。

c. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

2. バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) について

1. 菌種の同定

a. 可能

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

2. 薬剤感受性試験 (最小発育阻止濃度測定)

a. 可能

測定方法に○をつけてください

ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希

釈法・E-テスト

その他 ()

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

3. 薬剤耐性遺伝子 (van 遺伝子等) の検出

a. 可能

検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

4. パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別解析

a. 可能でありその結果の解釈についても自信あり。

b. 可能であるがその結果の解釈については自信なし。

c. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

3. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) について

1. 菌種の同定

a. 可能

b. 不可能

「不可能」と回答した場合、その理由

2. 薬剤感受性試験 (最小発育阻止濃度測定)

a. 可能

測定方法に○をつけてください

ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希

釈法・E-テスト

- その他 ()
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
3. 薬剤耐性遺伝子(mec 遺伝子)の検出
- a. 可能
検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
4. 遺伝子型別(パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析など)
- a. PFGE 解析が可能でありその結果の解釈についても自信あり。
- b. PFGE 解析が可能であるがその結果の解釈について自信なし。
- c. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
- d. PFGE 解析以外の遺伝子型別試験法を実施試験法および参考になっている文献、資料、マニュアル
4. ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) について
1. 菌種の同定
- a. 可能
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
2. 薬剤感受性試験 (最小発育阻止濃度測定)
- a. 可能
測定方法に○をつけてください
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト
その他 ()
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
5. 薬剤耐性緑膿菌 (=多剤耐性緑膿菌、MDRP) について
1. 菌種の同定
- a. 可能
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
2. 薬剤感受性試験 (最小発育阻止濃度測定)
- a. 可能
測定方法に○をつけてください
ディスク拡散法・微量液体希釈法・寒天希釈法・E-テスト
その他 ()
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
3. 薬剤耐性遺伝子の検出
- a. 可能
検査対象としている薬剤耐性遺伝子
検査方法の参考になっている文献、資料、マニュアル
- b. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
4. 遺伝子型別(パルスフィールドゲル電気泳動法: PFGE による解析など)
- a. PFGE 解析が可能でありその結果の解釈に

- についても自信あり。
- b. PFGE 解析が可能であるがその結果の解釈について自信なし。
- c. 不可能
「不可能」と回答した場合、その理由
- d. PFGE 解析以外の遺伝子型別試験法を実施試験法および参考になっている文献、資料、マニュアル
6. 上記以外の薬剤耐性菌について検査・解析が実施可能ですか。
(該当する項目に○をつけてください。)
- a. 可能
耐性菌の種類、実施検査内容など具体的回答してください。
- b. 不可能
7. これまでに衛生研究所等で実施した試験検査結果が法的な証拠等として用いられた事がありますか? (耐性菌の検査以外も含む)
(該当する項目に○をつけてください)
- a. あり b. なし c. 不明
8. 地方衛生研究所等における耐性菌検査の充実強化について関心がありますか?
(該当する項目に○をつけてください)
- a. あり b. なし

回答者の、お名前、御所属等を御記入下さい。

お名前 職名
御所属
連絡先電話番号:
FAX:
E-mail address

ご協力ありがとうございました

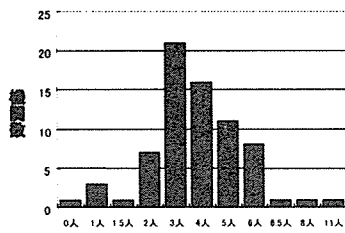


図1. 機関別細菌検査担当者数

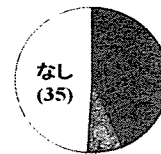


図2. 外部機関からの薬剤耐性菌検査依頼の実績

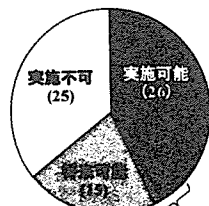


図3. 外部機関からの薬剤耐性菌検査依頼時の実施可能性



図4. 検査体制強化の必要性

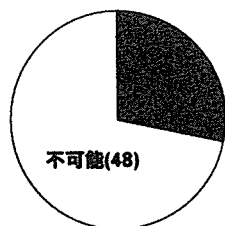


図5. その他薬剤耐性菌の検査・解析の実施可能性

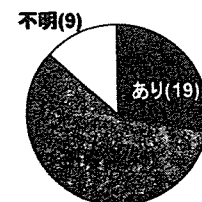


図6. 試験検査結果の法的利用の経験について

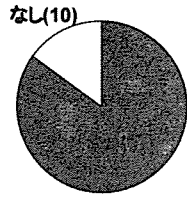


図7. 地方衛生研究所等における耐性菌検査の充実強化の関心について

表1. 検査実施可能な耐性菌

対応可能な耐性菌の種類	件数
VRE	25
MRSA	19
MRSA	13
MDRP	12
PHSP	8
ESBL産生菌	4
メタロβラクタマーゼ産生菌	2

表2 機能強化の必要性ありと回答した理由

理由	件数
衛生研究所でしかできない	21
蔓延防止に支援、貢献が可能	20
発生頻度の増加	9
感染症法に記載されている	2

機能強化は必要なしと回答した理由

理由	件数
現状維持で問題なし	8
医療機関の問題である	2
検査依頼がない	2

表3. 薬剤耐性菌の検査体制整備に必要と思われる事項

選択項目	件数
検査・解析方法の講習会	25
人員増加	18
検査に必要な器材の整備	11
その他	9

表4. バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の検査・解析について

検査項目	可能(54)	不可能(14)
菌種の同定	可能(14) 不可能(7) 観察なし(8) 依頼なし(3)	不可能(7) 観察なし(8) 依頼なし(3)
薬剤感受性試験	可能(52) 不可能(15)	不可能(15) 不可能(13)
薬剤耐性遺伝子 (van遺伝子)の検出	可能(39) 不可能(28)	不可能(28) 不可能(16)、準備しているが不明(12)
パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別解析	結果自任あり(12) 結果に自任なし(34) 実施不可能(10)	結果自任あり(12) 結果に自任なし(34) 実施不可能(10)、観察なし(8)、マニュアル不足(3)

表5. バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)の検査・解析について

検査項目	可能(21)	不可能(15)
菌種の同定	可能(15) 不可能(6) 依頼なし(9)	不可能(15) 不可能(6) 依頼なし(9)
薬剤感受性試験	可能(18) 不可能(3)	不可能(3) 不可能(3)
薬剤耐性遺伝子 (van遺伝子)の検出	可能(17) 不可能(4)	不可能(4) 不可能(16)、準備しているが不明(9)
パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別解析	結果自任あり(12) 結果に自任なし(9) 実施不可能(1)	結果自任あり(12) 結果に自任なし(9) 観察なし(6)、マニュアル不足(3)

表6. メシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の検査・解析について

検査項目	可能 (56)	不可能 (14)
菌種の同定	本数値 (7) 依頼なし (6) 依頼なし (3)	
薬剤感受性試験	ディスタク試験法 (40) E-test (9) MIC法 (8) 薬液希釈法 (3) VITEK (2) スタリ・ユニシズ (1)	
薬剤感受性試験	本数値 (13)	不可能 (18)
薬剤感受性試験	参考試験として、感染時・院内の 方法を参照 (25)、その他の文献を 参照 (11)	不可能 (33)
薬剤感受性試験	本数値 (17)、参照しているが不完 全 (1)	
薬剤感受性試験	結果自信あり (17) 結果に自信なし (30)	
薬剤感受性試験	実施不可能 (18)	不可能 (18)
薬剤感受性試験	別法を要集 (1)	

表7. メシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の検査・解析について

検査項目	可能 (42)	不可能 (22)
菌種の同定	本数値 (7) 依頼なし (6) 依頼なし (3)	
薬剤感受性試験	ディスタク試験法 (23) E-test (8) 薬液希釈法 (7) VITEK (2)	本数値 (13)、依頼なし (3)

表8. 薬剤耐性緑膿菌 (=多剤耐性緑膿菌、MDRP)の検査・解析について

検査項目	可能 (54)	不可能 (14)
菌種の同定	本数値 (8) 依頼なし (3) 依頼なし (1) 依頼なし (1)	
薬剤感受性試験	ディスタク試験法 (41) 薬液希釈法 (6) VITEK (1) SMAディスタク (2)	
薬剤感受性試験	本数値 (13)	不可能 (20)
薬剤感受性試験	検査時感染伝子、タコトコラク クローニング (9)、PCR (4)、 PCR (2)、VITEK (2)、 PCR (2)、VITEK (2)、 PCR (2)、PCR (2)、 PCR (2)、PCR (2)、 PCR (2)、PCR (2)、 PCR (2)、PCR (2)	
薬剤感受性試験	本数値 (38)、依頼なし (8)、依頼な し (4)	
薬剤感受性試験	結果自信あり (7) 結果に自信なし (36)	
薬剤感受性試験	実施不可能 (23)	不可能 (23)
薬剤感受性試験	別法を要集 (1)	

薬剤耐性菌等に関する研究班

新型の薬剤耐性菌の耐性機構・立体構造の物理化学的解析とその耐性功能ならびに
立体構造に基づいた検出剤の分子設計に関する研究

分担研究者 黒崎博雅 熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野

研究要旨

アミノグリコシド(AG)系抗菌薬は、臨床における敗血症などの重篤な感染症治療に不可欠な治療薬であり、特に日和見感染症として問題となる緑膿菌に有効で、 β -ラクタム剤と併用して汎用されている。しかし 2004 年に AG に対して高度耐性を示す緑膿菌やセラチア菌などの臨床株から、AG の作用点である 30S サブユニットの 16S rRNA をメチル化する酵素 RmtB が単離された。RmtB は補因子として S-adenosyl-L-methionine(AdoMet) と結合し、AdoMet のメチオニン部分に相当するメチル基を 16S rRNA の 1405 位にあるグアニンの N7 位に転移させるメチル基転移酵素(m7G MTase)であると提案されている。

本研究は、RmtB とメチル基転移反応の補因子として用いられる AdoMet および AdoMet の反応生成物である AdoHcy との X 線結晶構造解析を行いそれらの立体構造を決定し、RmtB によるメチル基転移反応機構を分子レベルで解明することを目的とした。

RmtB ならびに RmtB-AdoMet と AdoHcy 複合体の X 線結晶構造解析結果から、RmtB は 2 つのドメイン、即ち、基質認識ドメイン(small domain)と触媒ドメイン(large domain)からなり、触媒ドメインは Rossmann fold をとっていることが分かった。さらに AdoMet は触媒ドメインに 1 個結合しており、その転移メチル基は溶媒側を向いていることが分かった。さらに、これまで知られているメチル基転位酵素との比較から RmtB は少なくとも 8 個の構造モチーフを有していることが分かった。この中で Motif I~III および V は補因子の結合に関与しており、一方、Motif IV、VI、VIII は基質 RNA との結合に重要な働きを担っていると考えられる。

研究協力者：

山口佳宏（熊本大学環境安全センター）

湯本陽香（熊本大学大学院薬学教育部）

系抗菌薬に対して様々な方法で耐性を獲得してきた。

2004 年に、国立感染症研究所細菌第二部の荒川部長らは *P. aeruginosa* やセラチア菌(*Serratia marcescens*)などの臨床株から、AG の作用点である 30S サブユニットの 16S rRNA をメチル化し AG 耐性を示す新型の 16S rRNA メチル化酵素 RmtB の単離に成功した(1)。この RmtB はメチル化に S-Adenosyl-L-methionine(AdoMet)を補因子とし

A. 研究目的

アミノグリコシド(AG)系抗菌薬にはゲンタマイシン、アミカシン、アルベカシン等があり、臨床における敗血症などの重篤な感染症治療に対する不可欠な治療薬である。しかし、細菌は AG

て要求する AdoMet 依存性 methyltransferase (MTase)であり、そのメチル基転位機構は Fig.1 のように推定されている。

本研究では RmtB とその AdoMet ならびに AdoHcy 複合体の三次元立体構造を X線結晶構造解析により決定し、RmtB 酵素のメチル基転移反応機構を分子レベルで解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. RmtB の培養・精製

rmtB 遺伝子を含むプラスミドベクター pET22b(+)/rmtB を *E. coli* BL21(DE3)star に transform し、既に報告されている方法(1)に従って培養、精製した。

2. SeMet-RmtB の培養・精製

RmtB 酵素中の 4 つのメチオニンをセレノメチオニンに置換した SeMet-RmtB の培養・精製は SR 培地を用いて RmtB と同様の方法で行なった。

3. SeMet-RmtB の結晶化

Additive Screen™(HAMPTON RESEARCH)を用いてスクリーニングを行った。条件は全部で 96 種類あり、蒸気拡散法(Hanging drop)を用い、4°C で結晶化を行った。タンパク質溶液は-80°C に凍結保存しておいた精製酵素を 37°C の恒温槽で急速溶解させて用いた。結晶化条件として、タンパク質溶液 5 mg/mL、リザーバー溶液は 0.1 M Bis Tris-HCl buffer(24% PEG MME 2000)(pH 7.0)を用いた。Additive Screen™によるスクリーニングで結晶が析出した条件を用い、添加剤の種類と濃度を検討した。結晶化は、スクリーニングと同様に蒸気拡散法で行った。その際、タンパク質溶液、リザーバー溶液、プレート、カバーガラス、チップ等はあらかじめ 4°C で冷やしておいたものを使用した。

4. SeMet-RmtB の MAD (Multiwavelength Anomalous Diffraction)法のための X線測定

SPring-8 のビームライン BL41XU において測定を行った。SeMet-RmtB の結晶に X線を照射して測

定した蛍光スペクトルから RmtB に導入した Se 原子における peak(0.9793 Å)、edge(0.9790 Å)、remote(0.9900 Å)の 3 つの波長を決定し測定した。測定は、測定温度 100 K、カメラ長 250 mm、検出器 ADSC Quantum-315、1 枚あたりの露光時間は 1 秒、振動角 0.5°、全振動角 135° (270 枚)の条件で行った。プログラム HKL2000(2)を用い、収集したデータの指数付け、反射強度の積算、および反射強度のスケーリングを行った。

5. RmtB-AdoMet 複合体

初めに結晶を含む母液を AdoMet を 5 mM となるように溶かしたクライオプロテクタント緩衝液 [0.1 M Bis-Tris-HCl(pH 7.0)、40% PEG MME2000] で置換した。まず、5 μL のドロップから母液を 1 μL 取りクライオプロテクタント緩衝液 1 μL を加え 5 分間静置した。同様の操作を後二回繰り返した後、クライオループで結晶をすくい上げ、100 K で急冷し、液体窒素中に保管した。回折データの収集は高輝度光科学研究センター(SPring-8)のビームライン BL38B1 において行った。測定は、照射 X線波長 1.0 Å、測定温度 100 K、カメラ長 200 mm、検出器 Jupiter210 Rigaku CCD、1 枚あたりの露光時間は 20 秒、振動角 1°、全振動角 300° (300 枚)の条件で行った。プログラム HKL2000(2)を用い、indexing、integrating、scaling を行った。

6. RmtB-AdoHcy 複合体

初めに結晶を含む母液を AdoMet を 5 mM となるように溶かしたクライオプロテクタント緩衝液 [0.1 M Bis-Tris-HCl(pH 7.0)、40% PEG MME2000] で置換した。まず、5 μL のドロップから母液を 1 μL 取りクライオプロテクタント緩衝液 1 μL を加え 5 分間静置した。同様の操作を後二回繰り返した後、クライオループで結晶をすくい上げ、100 K で急冷し、液体窒素中に保管した。回折データの収集は SPring-8 のビームライン BL38B1 において行った。測定は、測定温度 100 K、カメラ長 170 mm、検出器 Jupiter210 Rigaku CCD、1 枚あたりの露

光時間は 20 秒、振動角 1° 、全振動角 300° (300 枚)の条件で行った。プログラム HKL2000(2)を用い、indexing、integrating、scaling を行った。

C. 研究結果

1. SeMet-RmtB の構造解析

RmtB とアミノ酸配列の相同性の高いタンパク質の構造解析が行われていなかったため、RmtB のメチオニンをセレノメチオニンに置換した SeMet-RmtB を調製し、RmtB の構造を分解能 2.4 \AA で、MAD 法により決定した。精密化データを Table 1 に示す。 R_{working} および R_{free} はそれぞれ 23.4%、25.7%であった。

SeMet-RmtB の全体構造は Fig. 2 で示した。RmtB の三次元構造は 12 個の α -helix と 7 個の β -strand を持っており、2 つのドメインからなる。N-terminal 側の small domain (Met1~Ile52) は 3 つの α -helix ($\alpha 1 \sim \alpha 3$) から構成されており、C-terminal 側の large domain (Pro59~Lys251) は、9 個の α -helix ($\alpha 4 \sim \alpha 12$) と 7 個の β -strand ($\beta 1 \sim \beta 7$) で構成されていた。多くの AdoMet 依存性 MTase は触媒ドメインと基質認識ドメインの 2 つのドメインで構成されている (3)。Large domain は α -helix と β -strand の繰返し構造からなる Rossman fold をとっていた。これは多くの AdoMet 依存性 MTase の触媒ドメインで見られ、こちらに AdoMet 結合部位、基質が結合する活性部位があるとされている。Large domain で見られる β -strand の配向は、 $\beta 6 \uparrow \beta 7 \downarrow \beta 5 \uparrow \beta 4 \uparrow \beta 1 \uparrow \beta 2 \uparrow \beta 3 \uparrow$ (矢印は β -strand の向き) となっており、 $\beta 7$ -strand だけが他の β -strand とは逆方向を向いていた。また、 $\beta 5$ -strand と $\alpha 12$ -helix をつなぐ loop の Gly210~Gly214 は disorder しており電子密度が確認できなかった。Small domain は 3 個の α -helix で構成されている。Lys や Arg といった正の電荷を帯びた残基が 52 残基中 10 残基と比較的多く存在し (Lys14、Lys15、Arg17、Arg25、Arg26、Arg34、Lys36、Lys39、Arg46、Arg48)、これらの残基は

タンパク質表面に存在することから、こちらが基質認識ドメインと考えられる。Small domain と large domain は Ala18 の O と Gln134 の N、Cys20 の N と Ile132 の O、Thr23 の O^1 と Asp157 の O^{62} 、Arg26 の NH1、NH2 とそれぞれ Asp157 の O^{62} 、Glu182 の O^{62} 、Arg48 の NH_2 と Glu182 の O^{62} 間で水素結合をしていた (Fig. 3)。2 つのドメインはこれらの相互作用を介して結合しているため、Small domain と large domain を結ぶ loop (Cys53~Thr58) は大きな可動性を持ち、実際にこの領域内のアミノ酸残基は温度因子が高くなっていることが分かった。

2. RmtB-AdoMet 複合体の構造解析

AdoMet 複合体の構造は分解能 2.3 \AA で、分子置換法によって決定し、 R_{working} と R_{free} はそれぞれ 22.2%、24.0%であった。

AdoMet 複合体の全体構造は AdoMet が結合していない SeMet-RmtB とほぼ同じで、small domain と Rossman fold をとる large domain からなり、small domain と large domain 間の相互作用も SeMet-RmtB の場合と同様に確認できた。Small domain と large domain をつなぐ loop の Ala55、Tyr56、そして $\beta 5$ -strand とそれに続く $\alpha 12$ -helix を結ぶ loop の Leu208~Gly214 は disorder しており電子密度が確認できなかった。

補因子である AdoMet は、アデノシル基の 5' 側に α -アミノ酸のメチオニンが結合した化合物である。構造解析の結果より large domain の $\alpha 6$ -helix、 $\beta 1$ -strand、 $\beta 2$ -strand、 $\alpha 10$ -helix に取り囲まれ、タンパク質表面が大きく窪んだ領域に 1 個結合しており、転移メチル基は溶媒側を向いていた (Fig. 4)。RmtB-AdoMet 間の相互作用を Fig. 5-A に示す。アデニンの 6 位の N と Asp157 のカルボキシル酸素原子、そして 1 位の N と Val158 の N がそれぞれ水素結合を形成していた。また、アデニン環は Ile132、Leu175、Leu179 の側鎖と疎水性相互作用をしていた。リボースの二つのヒドロキシル基は Asp131 のカルボキシル酸

素原子と水素結合していた。アデノシン骨格で見られたこれらの相互作用は、後からも述べるが AdoHcy 複合体においても同様に見られた。正の電荷を帯びた AdoMet の S⁺は Ser 83 の O⁻と相互作用しており、Ala111 の O と Cys112 の O、二つの水分子 Wat 9 と Wat11 がそれぞれアミノ酸部位の N と相互作用していた。同じくアミノ酸部位のカルボキシル酸素原子と Arg87 の側鎖の二つの NH 基が相互作用していた。アミノ酸部分と Arg87、Ala111 で見られた相互作用も AdoHcy 複合体において同様に見られた (Fig. 5-B)。

3. RmtB-AdoHcy 複合体の構造解析

RmtB-AdoHcy 複合体の構造は分解能 2.0 Å で、分子置換法により決定した。精密化データを Table 2 に示した。R_{working} および R_{free} はそれぞれ 18.3%、24.1%であった。

RmtB-AdoHcy 複合体の全体構造は RmtB、AdoMet 複合体と比べ大きなコンホメーション変化は見られず、ドメイン間での相互作用も RmtB、AdoMet 複合体と同様に確認された。Small domain と large domain とを結ぶ Gly54~Tyr56 と、β5-strand とそれに続く α12-helix を結ぶ loop 中の Gly210~Gly214 は disorder しており電子密度が確認できなかった。

AdoHcy は AdoMet のメチル基が脱離した反応生成物であるが、AdoMet と同じ large domain の α6-helix、β1-strand、β2-strand、α10-helix に取り囲まれた領域に 1 分子結合していた。アデノシン骨格で見られる周辺残基との相互作用は AdoMet 複合体で見られたのと同様に、アデニンの 6 位の N と Asp157 のカルボキシル酸素原子、そして 1 位の N と Val158 の N がそれぞれ水素結合を形成しており、Ile132、Leu175、Leu179 の側鎖とアデニン環の疎水性相互作用も確認された。リボースの二つのヒドロキシル基は Asp131 のカルボキシル酸素原子と水素結合していた。AdoMet 複合体で S⁺と相互作用していた Ser83 の O⁻は、占有率 50%で alternate しており、一方は AdoHcy の O、

OXT と水素結合していた。アミノ酸骨格部位での相互作用は AdoMet 複合体で見られた Arg87、Ala111 との相互作用に加え、Phe173 の O と N の相互作用も見られた (Fig. 5-B)。

D. 考察

16S rRNA のグアニンの 7 位の N をメチル化する m7G MTases ファミリーに属するものは、RmtB をはじめとして発見されて間もないものが多く、構造解析も行われていない。また、これらの酵素のほとんどが AG 系の抗菌薬に対して耐性を与えることが分かっており、その有用性の維持のために m7G MTase の詳細な分子機構を明らかにすることは重要である。

本研究では、RmtB とその補因子である AdoMet、反応生成物である AdoHcy との複合体の構造解析を行うことでその RmtB 酵素のメチル基転位機構の解明を目的とした。

1. RmtB の全体構造

RmtB は 251 個のアミノ酸残基からなり、その三次元構造は主に N-terminal 側の small domain と C-terminal 側の large domain の 2 つからなっていた (Fig. 2)。一般的に、AdoMet を補因子として用いるメチル基転移酵素は触媒ドメインと基質認識ドメインからなるとされている。触媒ドメインは AdoMet 結合部位と基質が結合する活性部位からなり、α-helix と β-strand が交互につながった Rossman fold とよばれる共通の構造を持っているが、基質認識ドメインの構造は酵素によって様々であり、この多様性が基質となる分子の多様性を与えているとされている。RmtB の large domain は 7 個の β-strand (β1~β7) と 9 個の α-helix (α4~α12) からなり、Rossman fold をとっていた。β-strand は最も一般的に見られる 6-7-5-4-1-2-3 の順序で並び、β7-strand だけが他の β-strand に対して逆平行に向いていた (Fig. 6)。また、複合体構造においては AdoMet、AdoHcy 分子の電子密度が確認できたことから AdoMet、

AdoHcy が large domain に結合することも分かった (Fig. 4)。よって、こちらが触媒ドメインであることが改めて分かった。一方で、small domain は3個の α -helix ($\alpha 1 \sim \alpha 3$) で構成されていた。Arg や Lys といった正の電荷を帯びたアミノ酸残基を52残基中10個と比較的多く含み、これらの残基がタンパク質表面全体に存在した。そのため、負の電荷を帯びた RNA の塩基と相互作用しやすいことから、こちらが基質認識ドメインと考えられる。同じ rRNA のメチル化酵素である ErmC' (4) でも基質認識ドメインと考えられる領域は3~4個の α -helix で構成されており、基質 RNA の塩基と相互作用する可能性のある残基がタンパク質表面に存在していた。

2. モチーフ構造について

触媒ドメインには AdoMet や基質結合に関わるモチーフが提唱されている(5)。Motif I は AdoMet のメチオニン骨格と、Motif II は AdoMet のリボースと、Motif III は AdoMet のアデニン環と水素結合し、Motif IV、VI~VIII は基質塩基部分との結合に関与しているといわれている。構造に基づいた m7G AG 耐性メチル基転移酵素 (m7G Agr MTase) の配列比較より保存された8個の構造モチーフの存在が明らかになった (Fig. 6)。23S rRNA のアデニンをメチル化する酵素である ErmC' と比較し、考察してみた。

Motif I は $\beta 1$ -strand-loop- $\alpha 8$ -helix を形成しており、ここに含まれる Ala111 の主鎖の O、Cys112 の主鎖の O と AdoMet の主鎖の N は水素結合していた (Fig. 5)。ErmC' では $\beta 1$ -strand-loop- $\alpha 2$ -helix の領域に相当し AdoMet のメチオニン骨格やリボース骨格の結合ポケットの一部を形成していた(4)。Motif II は $\beta 2$ -strand とそれに続くループ領域に相当し、Asp131 の O¹²、O¹⁴ がリボースの O2、O3 とそれぞれ水素結合しており、それに続く Ile132 の側鎖は AdoMet のアデニン環と疎水性相互作用していた。ErmC' では Glu59 が Asp131 にあたり、O¹¹、O¹² が

それぞれリボースの O3、O2 と水素結合しており、RmtB と同様に、次の Ile60 は AdoMet のアデニン環と疎水性相互作用をしていた。Asp131 は全ての m7G Agr MTase で保存されており、その後続く疎水性残基も Ile または Leu が保存されていることから、これらのアミノ酸残基は AdoMet の結合に関与していると考えられる。Motif III は $\beta 3$ -strand と $\beta 4$ -strand をつなぐ loop 領域であり、AdoMet のアデニン環との相互作用が Asp157 の O¹¹ と O¹² と N6、Val158 の主鎖の N と N1 で見られた。ErmC' においては Asp84 が N6 と相互作用していた。m7G Agr MTase において Asp157 は比較的良好に保存されていることから AdoMet のアデニン環との相互作用に関与していると考えられる。

以上のように、Motif I~III は従来の AdoMet 依存性 MTase と同様に AdoMet の結合に関与していることが分かった。

Motif IV は触媒において重要な残基を含むとされており、RmtB では $\beta 4$ -strand 領域に相当する。この領域内の Lys174 は AdoMet の転移メチル基と立体的に近い位置に存在した。そのため、Lys174 の主鎖の O がメチル化を受ける1405位のグアニンの7位の N と水素結合することで N が負に分極し、AdoMet のメチル基を受け取りやすくしていると考えられる。Lys174 は他の m7G Agr MTase でも保存されていることから RmtB と同様にメチル基転移反応に重要な触媒残基であると考えられる。ErmC' では 101-NIPY-104 という配列が重要であるとされている。Asn101 が RmtB の Lys174 と同様の役割を持つとされ、Tyr104 の側鎖が疎水相互作用を介した標的塩基の結合親和性の増加に関与していると考えられている(4)。後に続く Motif V は、疎水性残基を多く含んでおり、Leu175、Leu179 の側鎖は AdoMet のアデニン環と疎水性相互作用しており、Ile132 (Motif II) とともにアデニン環を安定化させていると考えられる。他の m7G Agr MTase、ErmC' でも Motif V は疎水性残基を多く含んでいることから、Motif V のアミノ酸残基は

疎水性相互作用を介した AdoMet の安定化に重要と考えられた。Motif VI は β 5-strand とそれに続く loop 領域を形成していた。このモチーフの C 末端側(Gly210~Gly214)は disorder していた。触媒ドメインから突き出ており、正の電荷を帯びた残基(Arg211、Lys213)を含むことから基質 RNA と水素結合すると考えられる。一方で、ErmC' における Motif VI の C 末端側は疎水性残基であり、標的塩基の位置付けに関わっているとされている。他の m7G Agr MTase でも Motif VI の領域は RmtB と同様に正の電荷を帯びた残基がよく保存されていることから、ErmC' とは異なり、静電的相互作用を解した RNA との結合に関与していると考えられた。この違いが ErmC' と RmtB を含む m7G Agr MTase との基質特異性の違いにつながると考えられる。Motif VII は β 6-strand の C 末端側にあり、RmtB を含めた m7G Agr MTase 間では保存されていなかった。これは ErmC' を含む Erm family や DNA MTase でも同様に、MTase の適切なフォールディングに関係していると考えられていることから(6)、RmtB でも同様の役割があると考えられる。Motif VIII は β 7-strand 付近で Glu242 が m7G Agr MTase でよく保存されていた。Glu242 は Motif IV の Lys174 の近くに存在することから活性部位にも近く、標的グアニン、またはその周辺のリン酸やリボースと水素結合している可能性がある。ErmC' では Phe163 が標的塩基の安定化に関わっているとされており、Erm family でもよく保存されていた。

以上のことから、m7G Agr MTase は共通の AdoMet 結合様式を持つと考えられる。

3. AdoMet、AdoHcy 結合について

メチル基供与体として働く AdoMet、その反応性生物である AdoHcy はそれぞれアデノシンとメチオニン、ホモシステインからなる化合物である。構造解析により、どちらも large domain の α 6-helix、 β 1-strand、 β 2-strand、 α 10-helix に取り囲まれた領域に結合しており、AdoMet の転移

メチル基は溶媒側を向いていた(Fig. 4)。これらのアデノシン骨格で見られる周辺残基との相互作用に変化はなかったが、アミノ酸骨格では違いが見られた(Fig. 5)。AdoMet 複合体において Ser83 の O^γは AdoMet の S^δと水素結合していたが、AdoHcy 複合体では Ser83 の側鎖が alternate することで(Fig. 5-B)、一方は S^δと、もう一方は AdoHcy の O、OXT と水素結合していた。Ser83 は主鎖の O が Lys174 の N^εと、N が His81 の N^{o1} と水素結合しており、これはそれぞれの複合体で共通して見られた(Fig. 5-B)。よって AdoMet 複合体において Ser83 の側鎖が alternate していなかったのは、S^δが正の電荷を帯びているため Ser83 の O^γをより強く引き付けていたためと考えられた。また、AdoMet 複合体では Cys112 の主鎖の O が AdoMet のアミノ骨格の N と水素結合していたが、AdoHcy では Phe173 の主鎖の O が AdoHcy のアミノ骨格の N と水素結合していた(Fig. 5-B)。AdoMet と AdoHcy は RmtB の同じ領域に結合していたが、2つを重ね合わせてみたところ、アデノシン骨格はうまく重なるがアミノ骨格ではコンホメーション変化が生じていることが分かった。これは、AdoMet からメチル基が外れることで S^δの電荷がなくなり、Ser83 の O^γが AdoHcy の O、OXT と水素結合できるようになったことで生じたものと考えられた。実際にメチル基転移反応が生じる場合は AdoMet を選択的に取り入れるとされている。RmtB においては AdoMet の S^δが正の電荷を帯びているために AdoHcy よりも強く結合でき、選択的に RmtB に取り込まれると考えられた。ErmC' (4)を含むメチル基転移酵素では、AdoMet の方が AdoHcy に比べて酵素への親和性が高いことが速度論を用いた研究で証明されていることから、RmtB でも同様と考えられた。また AdoMet は生体組織全体に AdoHcy よりも高い濃度で存在しているため、AdoHcy よりも酵素に取り込まれる割合が高いのも原因の一つと考えられる。

E. 総括

RmtB の構造解析は AG 耐性につながる m7G 16S rRNA MTase ファミリーで初めてであり、メチル基転移機構や基質認識機構解明における第一歩である。今回の解析結果より RmtB の触媒ドメインも他の AdoMet 依存性 MTase と同様に Rossmann fold をとっており、こちらに AdoMet が結合することが分かった。また、モチーフ構造の存在から Agr MTase ファミリー間では共通の AdoMet 結合様式をもつことも予想された。触媒ドメイン中の β 5-strand から α 10-helix を結ぶ loop (Thre205~Glu215) 付近が基質 RNA との結合に関与していると考えられたことから、今後これらの残基の変異体によるメチル基転移活性や基質結合能の測定、RmtB-AdoMet-RNA 複合体の構造解析を行うことで、より詳しいメチル基転移機構が明らかになるだろう。それにより AG 耐性機構を詳細に理解し、Agr MTase 阻害剤や新規 AG 系薬剤の創薬につながることを期待できる。また、グアニンの 7 位のメチル化は遺伝子発現の制御に関わる mRNA のスプライシングにおける 5' -capping 反応の一部と同様の反応であることからガンや遺伝性疾患を引き起こすとされる mRNA のスプライシングの制御の理解にもつながることが期待される。

F. 参考論文

1. Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, K., Wachino, J., Shibata, N., Yagi, T., Shibayama, K., Kato, H., and Arakawa, Y. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 491-496
2. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods in Enzymology* **276**, 307-326
3. Cheng, X., and Roberts, R. J. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 3784-3795
4. Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K. D., Kavanaugh, T. J., and Abad-Zapatero, C. (1999) *J. Mol. Biol.* **289**, 277-291
5. Malone, T., Blumenthal, R. M., and Cheng, X.

(1995) *J. Mol. Biol.* **253**, 618-632

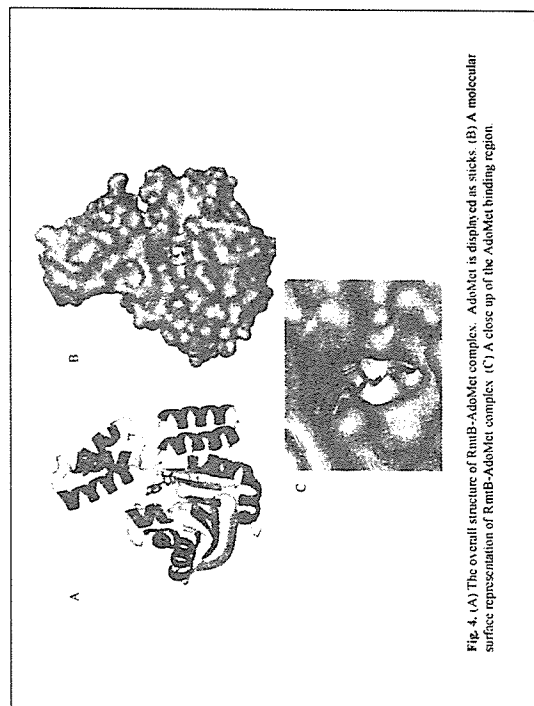
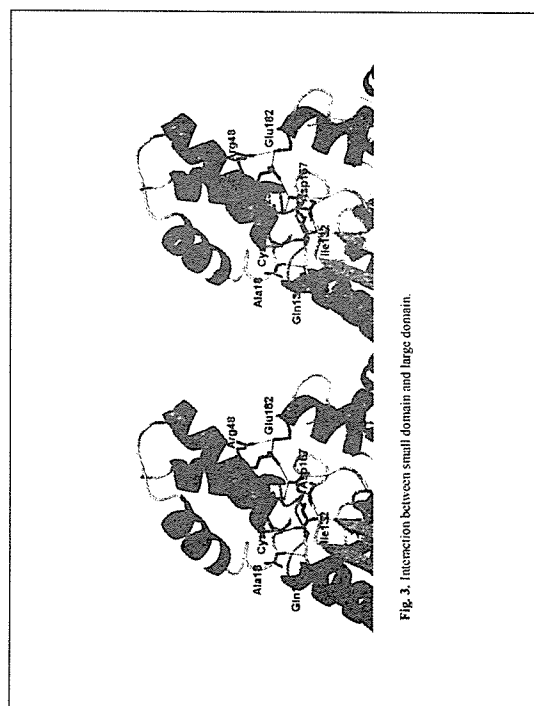
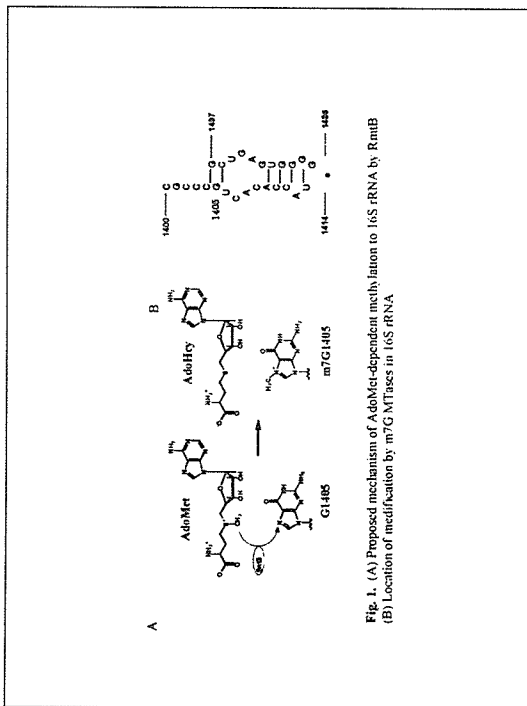
6. Cheng, X. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 293-318

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録、その他
なし



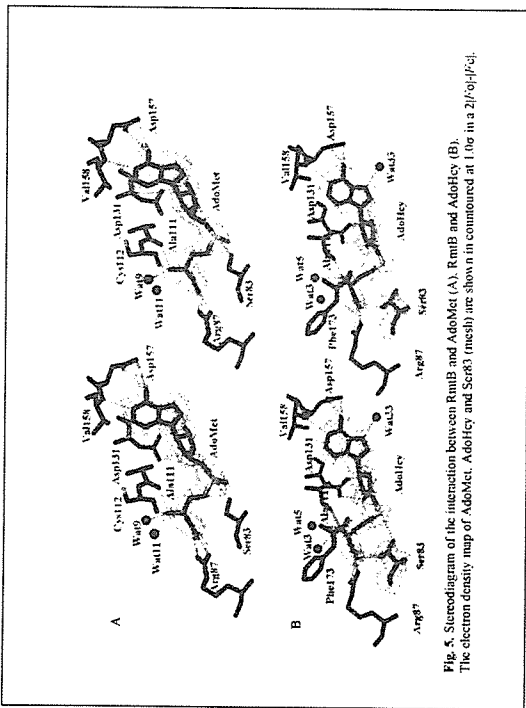


Table 1. X-ray data collection statistics and refinement of RmbB - AdoMet.

Space group	P1	P2	P3
Unit cell parameters	54.52	54.55	54.59
a (Å)	93.15	93.38	93.41
b (Å)	94.05	94.08	94.13
Data set wavelength (Å)	0.9791 (Å)	0.9794 (Å)	0.9790 (Å)
Resolution (Å)	50-2.1 (2.38-2.30)*	50-2.1 (2.38-2.30)	50-2.1 (2.38-2.30)
Completeness (%)	95.0 (8.5)	97.0 (86.5)	97.0 (86.2)
R_{int} (%)	5.1 (86.3)	5.1 (92.5)	5.1 (82.3)
No. of observed reflections	5960	5994	5960
No. of unique reflections	1075	1074	1077
I Sigma	208 (2.67)	217 (2.64)	214 (2.50)
Refinement			
R_{int} (%)	2.4		
R_{free} (%)	25.7		
Rms deviation from ideal			
Bonds (Å)	0.007		
Angles (deg)	1.7		
Atom radii used for model	66		
Number of water atoms	210-214		
R_{int} , R_{free} , I , σ , where I and σ are the observed and calculated structure factors respectively.			
*The R_{int} was determined from S^2 of the data.			
The number in parentheses represent statistics in the highest resolution shell.			
R_{int}^{high} = $\sum_{hkl} R_{int}(hkl) $; R_{int}^{low} = $\sum_{hkl} R_{int}(hkl) $.			

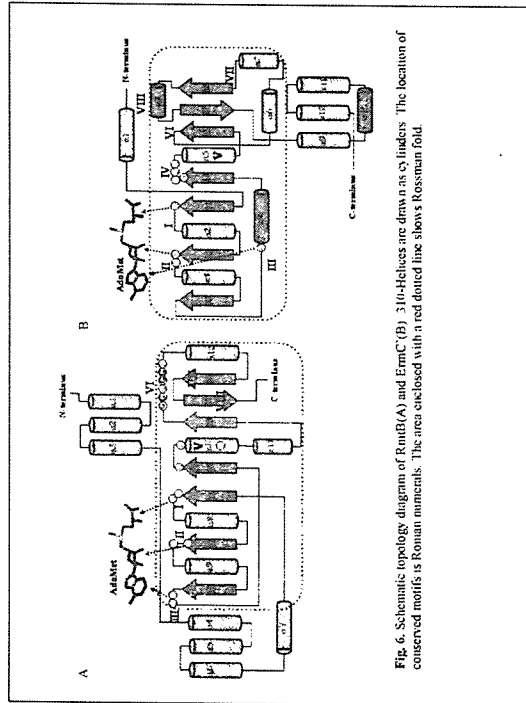


Table 2. Topological statistics and refinement of RmbB - AdoMet and RmbB - AdoMet.

Space group	P1	P2	P3
Unit cell parameters			
a (Å)	56.51	56.54	56.54
b (Å)	94.28	94.28	94.31
c (Å)	96.45	96.45	96.41
Data processing			
Resolution (Å)	50.0-2.07 (2.07-2.14)*	50.0-2.07 (2.07-2.07)*	50.0-2.07 (2.07-2.07)*
Completeness (%)	93.1 (92.2)		
R_{int} (%)	0.08 (0.25)		
No. of observed reflections	17662		
No. of unique reflections	14907		
I Sigma	549 (6.85)		
Refinement			
Resolution (Å)	2.30-4.88		
R_{int} (%)	2.22		
R_{free} (%)	24		
Rms deviation from ideal			
Bonds (Å)	0.008		
Angles (deg)	1.7		
The number in parentheses represent statistics in the highest resolution shell.			
*The number in parentheses represent statistics in the highest resolution shell.			
R_{int}^{high} = $\sum_{hkl} R_{int}(hkl) $; R_{int}^{low} = $\sum_{hkl} R_{int}(hkl) $.			

薬剤耐性菌等に関する研究班
多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP)
の出現メカニズムに関する研究

分担研究者 後藤直正 京都薬科大学薬学部 微生物学教室

研究要旨

多剤耐性緑膿菌 (MDRP) の発生メカニズムを明らかにするために、MDRP を含む緑膿菌 227 株のハウスキーピング遺伝子群 (*aroE*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *gyrA*)、複製時の校正に機能する DNA ポリメラーゼ III ε サブユニット遺伝子 (*dnaQ*)、変異修復遺伝子群 (*mutL*, *mutS*, *uvrD*, *mutT*, *mutY*, *recA*) の計 12 遺伝子の塩基配列を決定し、その情報をもとに Multilocus sequence typing (MLST) による分子系統解析を行った。その結果、緑膿菌には少なくとも 4 つの MDRP クラスタが存在することが明らかとなった。また、このクラスタは修復系遺伝子群のクラスタと一致したことから、MDRP を輩出する系統が存在すること、その系統では変異修復系遺伝子の共通変異が存在することを明らかにした。本年度の研究によって MDRP の発生メカニズムを明らかにするための情報基盤を確立することができた。

研究協力者：

小川倫洋、野口薫（京都薬科大学薬学部 微生物学教室）；石井良和、山口恵三（東邦大学医学部 微生物・感染症学講座）、山下 敦士、服部 正平（北里大学 生命科学研究所ゲノム情報学）

A. 研究目的

近年、カルバペネム、キノロンやアミノグリコシドなどの抗緑膿菌性抗菌薬に同時耐性を示す多剤耐性緑膿菌 (multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) による薬剤耐性緑膿菌感染症（感染症法第 5 類定点把握疾患）の増加とアウトブレイクが臨床で問題となっている。本耐性菌の問題点は抗緑膿菌活性の高い抗菌薬のほとんどに耐性を示すことから、抗菌薬治療が極めて困難なこととにある。このような MDRP の出現を抑制するためには、出現メカニズムを明らかにすることが必要である。

MDRP の抗菌薬耐性メカニズムは株ごとに異なっているが、カルバペネム耐性は外膜孔形成タンパク質 OprD の欠損と β-ラクタマーゼの産生、キノロン耐性は DNA ジャイレースと DNA トポイソメラーゼの変異によるキノロン親和性の低下および RND 型排出システムの発現亢進、そしてア

ミノグリコシド耐性は修飾酵素の産生によることが多くの臨床分離 MDRP で見られる性状である。これらの耐性メカニズムのうち、OprD の欠損、DNA ジャイレースと DNA トポイソメラーゼの変異や排出システムの発現亢進は緑膿菌染色体にコードされた遺伝子の変異によるものであり、染色体変異が重積することによって緑膿菌の多剤耐性化が起こっていることを示している。抗菌薬ごとに異なっているが、ひとつの抗菌薬に対する耐性菌は 10^{-7} - 10^{-9} の低頻度でしか出現しない。したがって、抗菌薬耐性メカニズムが 3 種類が重なる頻度は 10^{-21} - 10^{-27} と天文学的な頻度で、通常では起こりえないことである。

慢性感染症からミスマッチ修復に機能する MutS などの遺伝子の変異によって突然変異率が上昇した多剤耐性株が分離される (Oliver, A. et al. Science 288: 1251-1253, 2000; Oliver, A. et al. Mol. Microbiol. 43:1641-1650, 2002; María, D. et al. Antimicrob Agents Chemother 49:3382-3386, 2005)。これは、変異修復機構の欠損により高頻度に変異が蓄積されること、このような遺伝的欠損は分裂後の細胞に受け継がれ、系統を形成する可能性を示唆している。

本研究の目的は、MDRP を輩出する系統を Multilocus sequence typing (MLST) によって明

らかにし、MDRP の出現予測ならびに出現防止策の考案のための情報基盤を構築することである。

B. 研究方法

1. MIC (最小発育阻止濃度)測定: 抗緑膿菌性抗菌薬として、セフェム (セフトジジム)、カルバペネム (イミペネム、メロペネム)、アミノグリコシド (アルベカシン、アミカシン、トブラマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン)、キノロン (シプロフロキサシン、レボフロキサシン)、その他の抗菌薬としてテトラサイクリンとリファンピシンに対する感受性(MIC)を CLSI 法に準じて測定した。

2. 使用菌株: 日本各地の医療施設から分与された臨床分離緑膿菌 226 株 (MDRP 91 株, non-MDRP 135 株) と実験室株 PAO1 の計 227 株

3. 標的遺伝子と増幅: ハウスキーピング遺伝子群 (*aroE*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *gyrA*)、複製時の校正に機能する DNA ポリメラーゼ III ε サブユニット遺伝子 (*dnaQ*)、変異修復遺伝子群 (*mutL*, *mutS*, *uvrD*, *mutT*, *mutY*, *recA*) の計 12 遺伝子からの 2,724 本の部分断片を各株のゲノム DNA を鋳型に PCR により増幅した。

4. MLST 分子系統解析 (*in silico* 情報解析): 遺伝子断片の DNA 塩基配列を決定した。得られた配列を Consed で修正し、CLUSTAL W を使ったアラインメントによって選定した信頼領域 (510-831 bp; Table 1) 中の塩基の変異位置を DnaSP (version 4.10.3) によって検出した。これらの情報をもとに、MEGA (version 3.1) を使用して最小進化法に基づいた MLST 系統樹の作成を行った。

C. 研究結果

解析に用いた遺伝子のなかで、*gyrA* 遺伝子の同義置換と非同義置換 (dN/dS) 値が 0.269 と他の遺伝子の値よりも突出して高いことが分かった (Table 1)。これは解析に用いた株の多くがキノロン選択圧、つまりキノロンに暴露された可能性を示し、*gyrA* の変異によってキノロン耐性化が起こる既知の結果から妥当性が裏付けられた。そこで、ハウスキーピング遺伝子群から *gyrA* を除いて以後の解析を行った。

ハウスキーピング遺伝子群 (*aroE*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*) の系統解析から緑膿菌臨床分離株には、少

なくとも 6 つのクラスターが存在することが分かった (Fig. 1)。各株の抗菌薬感受性を系統樹と対比させたところ、少なくとも 4 つの MDRP クラスターが存在することが明らかになった。

変異修復系遺伝子群 (*mutL*, *mutS*, *uvrD*, *mutT*, *mutY*, *recA*) の系統解析でも幾つかのクラスターの存在が認められた (Fig. 1)。これらのクラスターとハウスキーピング遺伝子群の解析で示された MDRP クラスターとが一致した。

D. 考察

MDRP の 4 つのクラスターと変異修復系遺伝子群クラスターとが一致したことから、MDRP の発生が特定の変異を有する修復系遺伝子に起因することが示唆された。

E. 結論

MLST 分子系統解析によって、MDRP の系統データベースを構築することができた。また、変異修復系の遺伝的欠損を持つ系統が存在するという作業仮説を検証することができた。これらの成果を基盤にこのクラスターをさらに確かなものにするために、①系統解析の続行、②各株での耐性機構の同定、③Pulse field gel electrophoresis (PFGE) 解析によるクラスターの細分化、④抗菌薬耐性株の出現率 (変異率) の測定および⑤責任修復系遺伝子の特定を次年度に継続して行う予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. (総説) Naomasa Gotoh: The RND-type multicomponent efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: functional link between antibiotic resistance and pathogenicity. Pathophysiological and Biochemical Analyses of "Life-Style Related or Intractable Diseases"- Target Validation for Drug Therapy- 2006. (ed.) Takeshi Nishino and Koji Takeuchi, pp. 125-135, Research Signpost (India).

2. (原著論文) Kondo, A., Hirakata, Y., Gotoh, N., Fukushima, K., Yanagihara, K., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Nishide, K., Node, M., Yamada, Y., Kohno, S., Kamihira, S. 2006. Quorum sensing