

図1. 共通法による MBL 遺伝子検査の精度管理の結果  
(A) 結果表、+,陽性; -, 陰性, (B) 電気泳動像 (代表例)

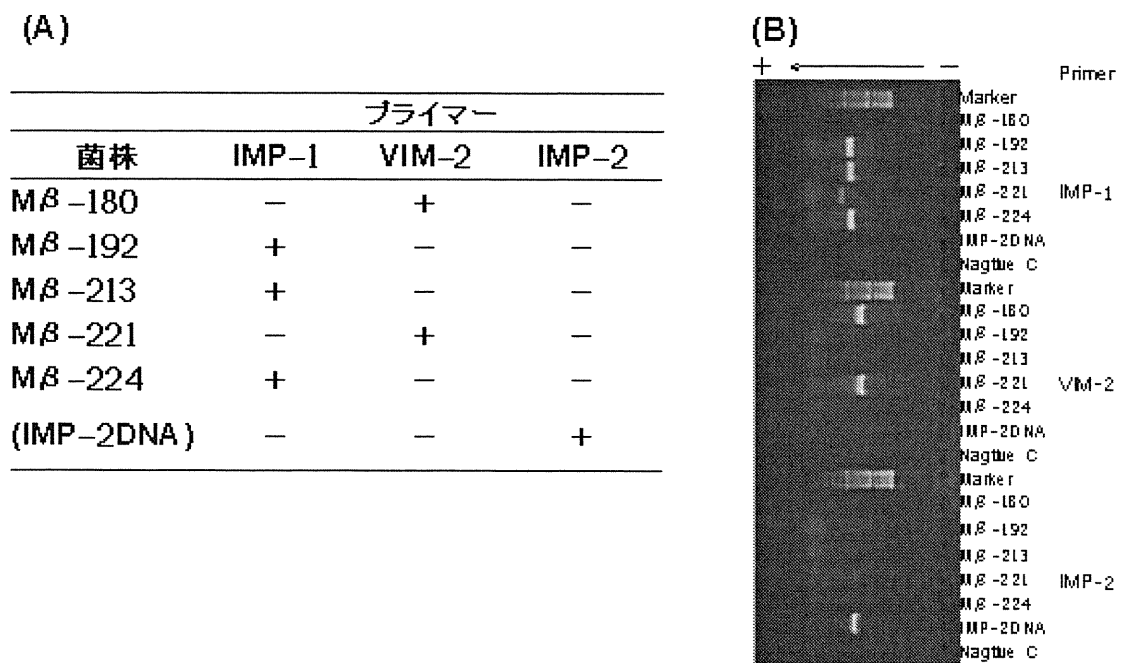


図2. 機関別独自法による MBL 遺伝子検査の精度管理の結果  
(A) 結果表、+,陽性; -, 陰性, (B) 電気泳動像 (代表例)

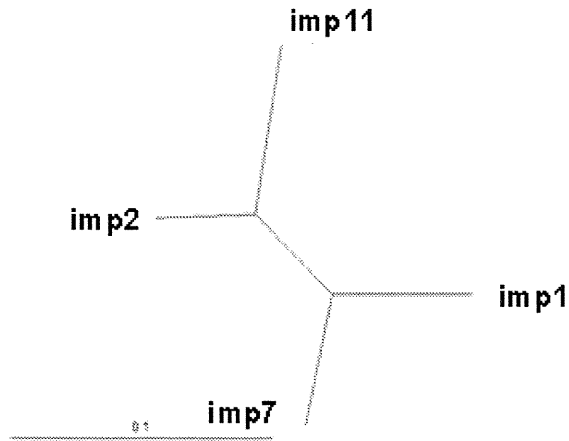


図 3. IMP-1 用プライマーで増幅した産物である imp 型の系統関係

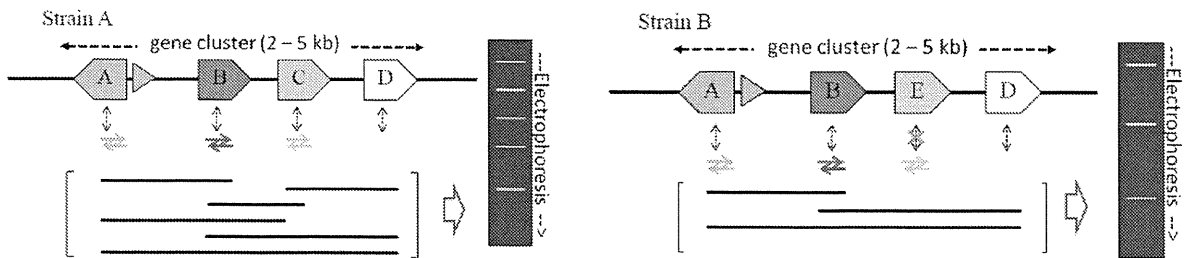


図 4. LinePCR 法の原理

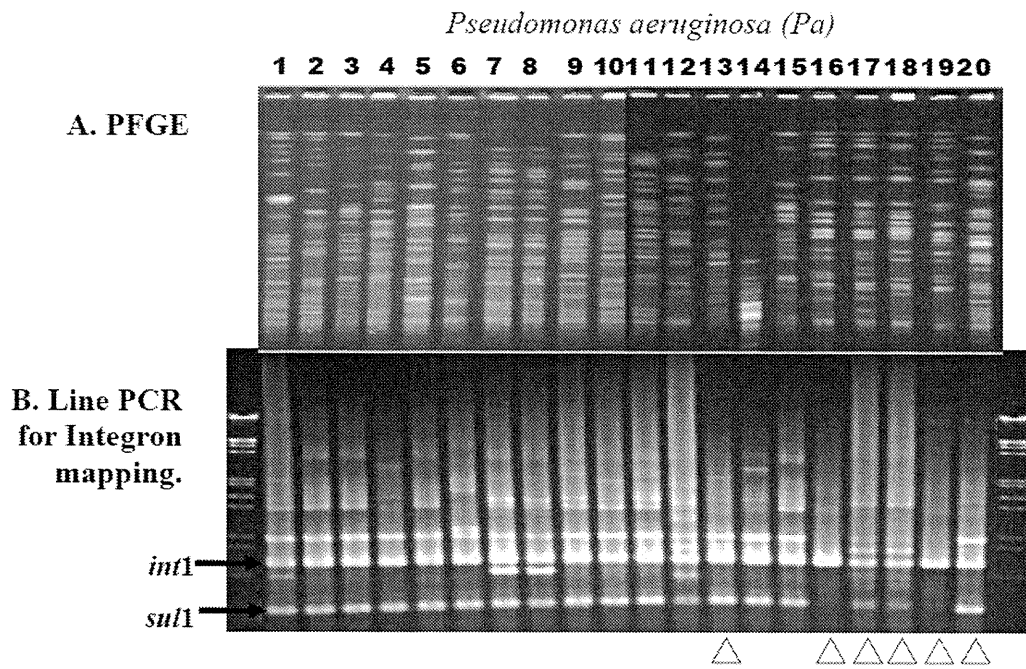


図 5. 臨床分離緑膿菌の PFGE とインテグロンを対象とした LinePCR

Primer direction (vs. insertion)	Target gene Insertion	Primer ID	Sequence (5'→3')
8 oligos	Integron	int1-a673f	GATTCCTGCGCGGTGGTCTG
		int1-a673r	CAAGACACAGCGGCAAGGATG
		int1-a31f	CTGCGTTCGCTTAAAGTTCCTG
		int1-a31r	CAAGACCTTACCGGAGCGGAG
		su11-a292f	GGCTACCTGACAGGATGACGAG
		su11-a292r	CTTGGATATCGTTCAGGTAGCC
su11-a607f	CTTCGCTAATATGCTCGCTTCG		
su11-a607r	CACCTAGACCCATATGCGGAGG		
16 oligos	Integron	int1-a673f	GATTCCTGCGCGGTGGTCTG
		int1-a673r	CAAGACACAGCGGCAAGGATG
		int1-a31f	CTGCGTTCGCTTAAAGTTCCTG
		int1-a31r	CAAGACCTTACCGGAGCGGAG
		su292f-a21f	CTGCGTTCGCTTAAAGTTCCTG
		su292f-a31r	CAAGACCTTACCGGAGCGGAG
		su292f-a673r	GATTCCTGCGCGGTGGTCTG
		su292f-a673r	CAAGACACAGCGGCAAGGATG
		qs2-a27f	GGCGAGGTATGTCGAGACATCC
		qs2-a37r	GGATGTTCGGATTAATCTCGCC
		VIR1-a220f	GTCCGTGATGATGATGATGTTG
		vir1-a220r	CAGCTCATGACATGACGAGAC
		imp1-a409f	CACCTCTCGAGTAACTAGCTGCG
		imp1-a409r	CCACTACTGTTTTCGATGATGTTG
		su11-a292f	GGCTACCTGACAGGATGACGAG
		su11-a292r	CTTGGATATCGTTCAGGTAGCC
su11-a607f	CTTCGCTAATATGCTCGCTTCG		
su11-a607r	CACCTAGACCCATATGCGGAGG		
6 oligos	mexR-mexA-mexB-oprM	mexR242f	TCCGCGCGGAGCGCAGCC
		mexR142r	GGTTCGCTGCTCGGCGGAC
		mexA776f	AGCCATCCGCGCCGTCTCC
		mexA776r	GGACACCGCGCGGATGAT
		oprM470f	TGAGGAGGATGATGATGATGATG
		oprM470r	GGCTGCGGAGGATGATGATGATG
14 oligos	mexT-mexE-mexF-oprN	mexT297f	CACCGACCTTGGACAGGAC
		mexT297r	GATTCCTGCGCGGTGGTCTG
		mexF1064f	TGCTTGTGCTGCTGCTGCTG
		mexF1064r	GGACACGATGATGATGATGATG
		mexF1656f	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexF1656r	CCATGATGATGATGATGATG
		mexF2482f	GCTACAGGAGGCTTTCGCTG
		mexF2482r	GGTANTGAGGCTGCTGATG
		mexF3102f	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexF3102r	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexF614f	CCAGCGCGGAGGATGATGATG
		mexF614r	GGCTTGGCGGATGATGATG
		oprN585f	CTTGGATATCGTTCAGGTAGCC
		oprN585r	GGCTACCGCGGATGATGATG
10 oligos	mexT-mexE-mexF-oprN	mexT297f	CACCGACCTTGGACAGGAC
		mexT297r	GATTCCTGCGCGGTGGTCTG
		mexF1064f	TGCTTGTGCTGCTGCTGCTG
		mexF1064r	GGACACGATGATGATGATGATG
		mexF1656f	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexF1656r	CCATGATGATGATGATGATG
		mexF2482f	GCTACAGGAGGCTTTCGCTG
		mexF2482r	GGTANTGAGGCTGCTGATG
		mexF3102f	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexF3102r	GGCTACCGCGGATGATGATG
6 oligos	mexE-mexC	mexE1091f	AGCTGAGGATGCTGGGAC
		mexE1091r	GCTTGGCGGATGATGATGATG
		mexC72f	GGCTGAGGAGGCTGAGGAG
		mexC72r	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
		mexD1018f	GGTTCGCGGATGATGATGATG
		mexD1018r	GGCTACCGCGGATGATGATG
10 oligos	mexE-mexC-mexD	mexE1091f	AGCTGAGGATGCTGGGAC
		mexE1091r	GCTTGGCGGATGATGATGATG
		mexD1060f	TTCGATGATGATGATGATGATG
		mexD1060r	GGACACGATGATGATGATGATG
		mexD1533f	CTTCTTGGCGGATGATGATG
		mexD1533r	GGTTCGCGGATGATGATGATG
		mexD2028f	CTTCTTGGCGGATGATGATG
		mexD2028r	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexD2686f	TTCGATGATGATGATGATGATG
		mexD2686r	GGACACGATGATGATGATGATG
10 oligos	mexE-mexC-mexD-oprJ	mexE209f	AGCTGAGGATGCTGGGAC
		mexE209r	GGCTTGGCGGATGATGATGATG
		mexC72f	GGCTGAGGAGGCTGAGGAG
		mexC72r	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
		mexD1018f	GGTTCGCGGATGATGATGATG
		mexD1018r	GGCTACCGCGGATGATGATG
		mexD1533f	CTTCTTGGCGGATGATGATG
		mexD1533r	GGTTCGCGGATGATGATGATG
		mexD2028f	CTTCTTGGCGGATGATGATG
		mexD2028r	GGCTACCGCGGATGATGATG
6 oligos	mexE-mexC-mexD-oprJ	mexE209f	AGCTGAGGATGCTGGGAC
		mexE209r	GGCTTGGCGGATGATGATGATG
		mexD1060f	TTCGATGATGATGATGATGATG
		mexD1060r	GGACACGATGATGATGATGATG
		mexD1533f	CTTCTTGGCGGATGATGATG
		mexD1533r	GGTTCGCGGATGATGATGATG

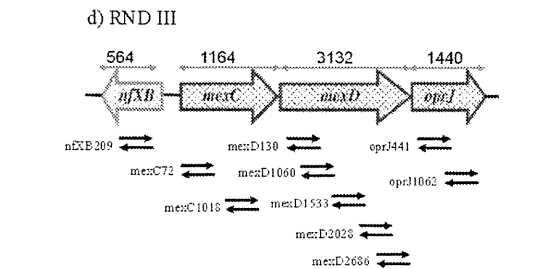
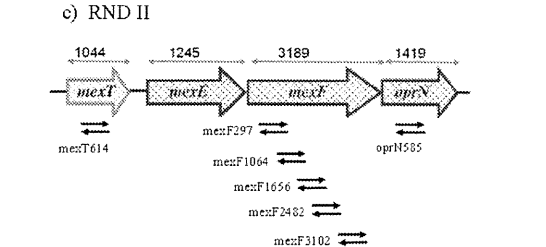
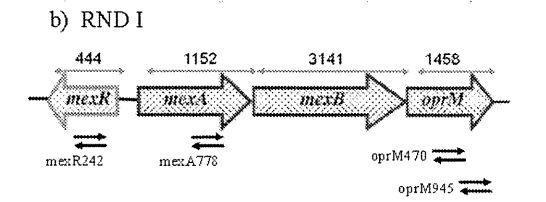
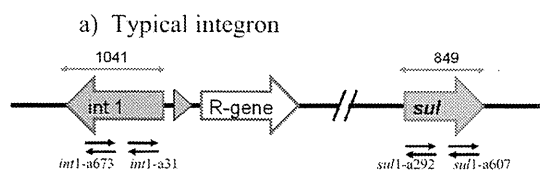
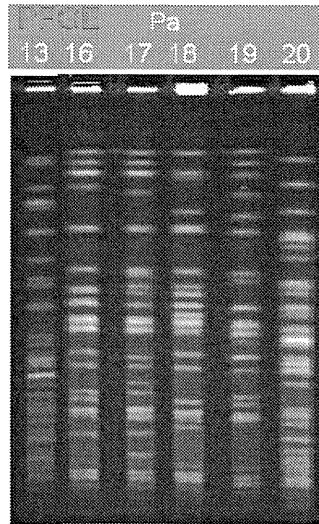


図 6. 薬剤耐性緑膿菌の Multilocus Line PCRn の遺伝子領域と用いたプライマー

### A. PFGE



### B. Multilocus analysis by Line PCR

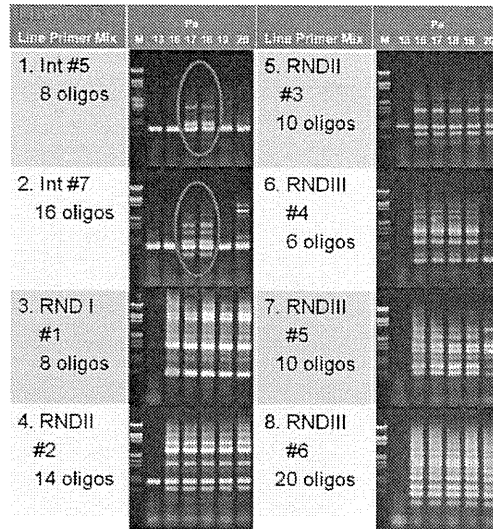


図7. マルチローカス LinePCR と PFGE との比較

カルバペネム耐性菌をはじめとする新型の薬剤耐性菌の構造・機能解析と  
立体構造に立脚した蛍光剤の分子設計並びに迅速・簡易検査法の確立

研究分担者 黒崎博雅 (熊本大学大学院生命科学研究部構造機能物理化学分野)

研究要旨

本研究では、アミノ酸変異に伴う立体構造変化がどのように基質特異性に影響を及ぼすかを明らかにするために、*Acinetobacter spp.*由来の IMP-2 メタロ-β-ラクタマーゼの結晶化と X 線結晶構造解析を行った。IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-2 とは 85% のアミノ酸配列相同性を有する)の構造との比較から、酵素活性ポケットの広さに違いが見られた。IMP-1 の酵素活性ポケットは IMP-2 よりも大きな空間を与えていることがわかった。この違いが両者の基質特異性に影響を及ぼす原因の一つであると考えられる。

研究協力者

山口佳宏 (熊本大学・環境安全センター)

A. 研究目的

メタロ-β-ラクタマーゼの中でも IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ(以下、IMP-1 と略す)の遺伝子(*bla<sub>IMP</sub>*)は、伝達性プラスミド中に存在するインテグロン構造にカセットとして組み込まれている。そのため、水平的に他の細菌に伝播することができ、日本のみならずヨーロッパでも IMP-1 の単離が報告されている。また、IMP-1 はメタロ-β-ラクタマーゼの中でもカルバペネム薬を効率よく加水分解するので、IMP-1 を保持した病原菌の蔓延が危惧されている。現在までに 26 の IMP-1 の亜種の存在が確認されている。

例えば、IMP-2 メタロ-β-ラクタマーゼ(以下、IMP-2 と略す)は 1997 年にイタリアで *Acinetobacter baumannii* から単離され、IMP-1 のアミノ酸配列と比べると 85% の相同性を示す(図 1)。IMP-2 の基質スペクトルは全体的には IMP-1 に類似した基質スペクトル(cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem)を示すが、いくつかの基質(ampicillin, carbenicillin, cephaloridine, meropenem)に対して IMP-1 の加水分解能とは異なっている。<sup>1</sup>

そこで本研究では、IMP-2 のアミノ酸変異に伴う立体構造変化がどのように基質特異性に影響を及ぼすかどうかを明らかにするために *Acinetobacter spp.*由来の IMP-2 の結晶化を行い、X 線結晶解析に立体構造を決定した。さらに IMP-1 の構造と比較検討した。

B. 研究方法

(1) IMP-2 の培養・精製

菌株 *E. coli* HB101 pBC SK(+)*Bam*HI/*bla<sub>IMP-2</sub>* を 50 μg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地にストリークし、37 °C で一晩培養した。形成した菌の白色コロニーから菌体を釣菌し、50 μg/mL アンピシリンを含む 5 mL の LB 液体培地(3 本)中 37 °C で振とう培養(150 rpm)をした。6 時間後、50 μg/mL アンピシリンを含む 27 mL の LB 液体培地(3 本)に培養液を 3 mL ずつ接種し、37 °C で振とう培養(150 rpm)した。14 時間後、50 μg/mL アンピシリンを含む 2 L の LB 液体培地(5 本)に培養液を 10 mL ずつ接種し、37 °C で振とう培養(150 rpm)した。14 時間後、培養液を回収し、4 °C で 15 分間遠心(6,000×g)し菌体を集めた。これを 50 mM リン酸 buffer (pH 7.0)-10 μM Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 30 mL で懸濁し、4 °C で 30 分間遠心(6,500×g)し、湿菌重量で約 30 g の菌体を得た。湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合で前述のそれぞれの緩衝液で菌体を再懸濁させ、氷浴中で 55 秒おきに 5 秒間の超音波破碎を 60 回行った。破碎した菌体液を 2 °C で 75 分間遠心(150,000×g)し、上清液を粗酵素溶液とした。粗酵素溶液の精製はカラムクロマトグラフィーを使って行った。まず SP-Sepharose Fast Flow カラム(φ 26 mm × 10 cm, 流速 60 mL/h)を使い、50 mM リン酸 buffer-10 μM Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (pH 7.0)中の NaCl 濃度(0-0.3 M)によって塩勾配をかけ、溶出させ 10 mL ずつ分取した。各分画に含まれるタンパク質濃度を 280 nm の吸光度を測定し求め、セファロジン加水分解活性を有する分画を集めた。集められた液を Amicon YM-10 で 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.3 M NaCl)に変換し、次いで Centricon YM-10 で約 2 mL に

濃縮した。濃縮した活性分画を Sephacryl HR-100 カラム( $\phi$  16 mm  $\times$  80 cm, 流速 6 mL/h)を使い、50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.3 M NaCl)で 3 mL 毎に分取した。タンパク質を含む活性分画を集め、前述と同様に濃縮し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一バンドであることを確認し、この溶液を精製酵素として-80 °C で保存した。

## (2) 結晶化と X 線結晶構造解析

5 mg/mL のタンパク溶液と次のリザーバー溶液(0.1 M sodium acetate, 0.2 M sodium citrate, pH 6.0, 30% PEG 4000)、20 °C で結晶化を行うと約 1 ヶ月後に大きく厚みのある透明な結晶(0.3  $\times$  0.5  $\times$  0.2 mm)が析出した。X 線解析構造解析は、Rigaku 高速イメージングプレート X 線検出器 R-AXIS VII 装置を用いて 1.00 Å の波長で CCD カメラ (marCCD165, 結晶-detector 距離は 150 mm)を detector として 100 K で測定した。測定時間 30 秒、振動角 0.5 °で 720 枚データを収集した。データは、CrystalClear<sup>2</sup>を使い、indexing、integrating と scaling した。

IMP-2 の構造は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1(PDB code: 1DDK)を search model として分子置換法によって決定した。解析プログラムは CCP4 の REFMAC<sup>5</sup>を用いて精密化し、グラフィックプログラム Cool<sup>4</sup>でモデルの修正を行った。表 1 に回折データと精密化で得られたデータをまとめた。

## C. 研究結果と考察

### (1) IMP-2 の全体構造

IMP-2 の全体構造は $\alpha\beta/\beta\alpha$ のサンドイッチ構造をとり、 $\beta$ -シートの浅くて広い溝に 2 個の Zn(II)が存在していた(図 2A)。この全体構造は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 の結晶構造(図 2B)と類似していることがわかった。<sup>5</sup>

IMP-1 (Lys39-Lys221; the amino acid residues are designated by a BBL numbering)と IMP-2 (Lys39-Lys221)の C $\alpha$ 炭素を重ね合わせた時の r.m.s.d (root mean deviation)は 0.77 Å であった。

IMP-2 は IMP-1 とのアミノ酸配列相同性は 85% (前述)で 36 個のアミノ酸に変異がかかっている(図 1)。シグナルペプチド領域の 10 個のアミノ酸を除く 26 個の内、活性中心から 9 Å の距離にあるアミノ酸残基は Gln198 (IMP-1 では Pro198)、Asp227 (Try227)、Ser261 (Pro260)の 3 残基であることがわかった。しかしながら、IMP-1 の構造との重ね合わせから、変異に伴うこの 3 残基周辺の構造変化は観測されず、これらの 3 残基は基質特異性変化に直接関与するも

のではないと推定される。残りの 23 個のアミノ酸残基はタンパク質表面または活性中心から遠く離れた位置にあった。

### 2. 活性中心構造

IMP-2 活性中心の構造を電子密度マップと共に図 3A に示す。第 1 の Zn(II) (Zn1)には 3 つのヒスチジン残基(His116, His118, His196)が配位し、それらの Zn1-His の平均結合距離は、2.1 Å であった。一方、第 2 の Zn(II) (Zn2)にはアスパラギン酸(Asp120, Zn2-Asp 2.7 Å)、システイン(Cys221)とヒスチジン残基(His263)が配位していた。 $2|F_o|-|F_c|$ の電子密度マップから判断すると Zn2 サイトに存在する Cys221、His263 では、それらの側鎖が alternate している可能性が考えられた。また、Zn2 の占有率を 100%として精密化を行うと、Zn2 の温度因子(B-factor)は Zn1 よりもかなり高くなった。そこで、Cys221 と His263 の側鎖を Zn2 と配位する方向に 30% (Cys221A: Zn2-Cys221A 2.5 Å; His263A Zn2-His263A 2.7 Å)、配位できない方向 (Cys221B: Zn2-Cys221B 1.9 Å; His263B Zn2-His263B 2.8 Å)に 70%の占有率で alternate させたところ、電子密度マップにきれいに当てはまった。Zn2 の占有率を Zn(II)配位子である Cys221A と His263A の占有率(30%)と同じにしたところ、温度因子の値も Zn1 と同程度(Zn1: 31.6 Å<sup>2</sup>, Zn2: 39.8 Å<sup>2</sup>)となった。このことより、Zn2 の親和性は Zn1 よりも低く活性中心から抜けやすいと考えられる。また、酢酸イオンにおいても alternate しており、2 つの酢酸イオンの占有率をそれぞれ 0.5 とした。

IMP-1 と IMP-2 の活性中心部位の構造の重ね合わせから(図 3B)、Asp120 側鎖がほぼ 90 °回転し、Zn2 への配向が異なっていることがわかった。しかしながら、その他の Zn 配位子についてはほぼ同じ配向をとっていた。

Zn1-Zn2 距離は、IMP-1 では 3.3 Å、IMP-2 では 3.4 Å でほぼ同じ距離であった。

### (3) IMP-1 と IMP-2 間の loop 1 の比較

IMP-1 と IMP-2 には基質認識に重要な可動性の loop 1 が存在する(図 2)。この loop 1 は、6 つのアミノ酸残基 (Glu60-Val61-Asn62-Gly63-Trp64-Gly65; 図 1)から構成されている。同じアミノ酸から構成されている loop 1 にも関わらず、IMP-1 と IMP-2 とでは大きな構造変化が観測された。特に loop 1 の頂点付近に位置する Trp64 は IMP-1 では活性中心から大きく離れた位置にあり、一方、IMP-2 では活性中心を覆いかぶさるように配向していた(図 4)。この構造変化の一つの要因としては、

loop 1 の片方の根元付近に位置する 68 位のアミノ酸残基の変異によるものと考えられる。IMP-1 では 68 位は Pro68 に対し、IMP-2 では Ser68 である。IMP-1 ではプロリン環の立体規制によって隣接の 67 位の Val の回転に影響を与えていると考えられる(図 5)。事実、Vla67 の C $\alpha$ 炭素の  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  は IMP-1 では  $\phi = -146.69$ ,  $\psi = 121.59$ ,  $\omega = 179.59$ 、IMP-2 では  $\phi = 99.99$ ,  $\psi = 147.04$ ,  $\omega = 179.44$  で異なっている。

さらに興味深いことは、loop 1 の構造変化に加え活性ポケットの空間の広さにも大きく影響していることである。IMP-1 の酵素活性ポケットは opened cavity を形成しているのに対し、IMP-2 では opened cavity から tunnel-shaped cavity へと変化している(図 4)。CASTP server<sup>6</sup> を用いて酵素活性ポケットの surface area と volume を計算すると、IMP-1 では surface area = 339.5 Å<sup>2</sup>, volume = 303.1 Å<sup>3</sup>、IMP-2 では surface area = 165.9 Å<sup>2</sup>, volume = 297.8 Å<sup>3</sup> であり、IMP-1 の方が IMP-2 より酵素活性ポケットが広いことが明らかとなった。この結果は、基質特異性発現に大きく関与していると考えられる。

#### D. 結論

本研究では、X 線結晶構造解析により *Acinetobacter spp.* 由来の IMP-2 の立体構造を決定した。IMP-1 との構造比較により、IMP-2 の酵素活性ポケットは IMP-1 よりも狭いことがわかった。このことは、基質認識の取り込みと認識に大きく影響を与えるものと考えられる。

今後は、解析した構造を用いて種々の基質とのドッキング実験により、アミノ酸変異に伴う立体構造変化がどのように基質特異性に影響を及ぼすかどうかを詳細に検討する予定であ

る。

#### E. 研究発表

- |         |    |
|---------|----|
| 1. 論文論文 | なし |
| 2. 学会発表 | なし |

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

- |                |    |
|----------------|----|
| 1. 特許取得・実用新案登録 | なし |
| 2. 実用新案登録      | なし |
| 3. その他         | なし |

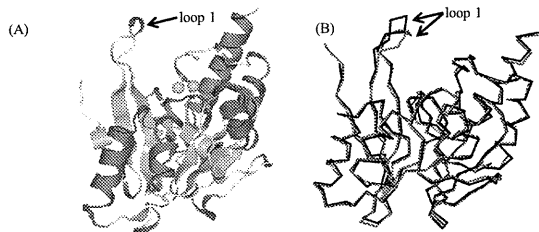
#### F. 研究のため参考とした文献

- (1) Riccio, M. L.; Franceschini, N.; Boschi, L.; Caravelli, B.; Cornaglia, G.; Fontana, R.; Amicosante, G.; Rossolini, G. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1229-1235.
- (2) Rigaku *CrystalClear* **2005**, Rigaku Corporation, Tokyo, Japan.
- (3) Murshudov, G. N.; Skubak, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355-367.
- (4) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Cryst.* **2004**, *D60*, 2126-2132.
- (5) Concha, N. O.; Janson, C. A.; Rowling, P.; Pearson, S.; Cheever, C. A.; Clarke, B. P.; Lewis, C.; Galleni, M.; Frère, J.-M.; Payne, D. J.; Bateson, J. H.; Abdel-Meguid, S. S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4288-4298.
- (6) Dundas, J.; Ouyang, Z.; Tseng, J.; Binkowski, A.; Turpaz, Y.; Liang, J. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W116-118.

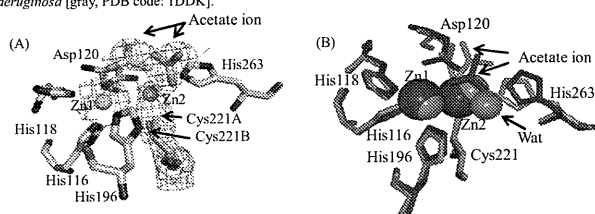


BBL No.		40	50	60	70	80									
IMP-1	-----A	ESLPDLK	IEK-LDE	GVVHTS	FEEVNG	WGVVPK	HGLVL	VLVNAE	AYLIDT	PF	51				
IMP-2	-----A	GARLPD	LKIEK-	LEE	GVVHTS	FEEVNG	WGVVSK	HGLVL	VLVN	TDAYLI	DTFF	52			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....				
BBL No.		90	100	110	120	130	140								
IMP-1	TAKDTE	KLVTW	FV-ER	GY--K	IKGSIS	S	S	STGGIE	WLSR-	S	IPTYA	SELTN	ELLKK	108	
IMP-2	TATDTE	KLNVW	FV-ER	GY--K	IKGTIS	S	S	STGGIE	WLSQ-	S	IPTYA	SELTN	ELLKK	109	
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
BBL No.		150	160	170	180	190	200								
IMP-1	DG-----													149	
IMP-2	DG-----													150	
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
BBL No.		210	220	230	240	250	260	270							
IMP-1	ER--KIL	FGG	FIKP-	YGL--	GNLGD	ANIEA	WP	KS	AKLL	SKY	GK	AKL	VVPS	SE-----	199
IMP-2	EK--KIL	FGG	FVKP-	DGL--	GNLGD	ANLEA	WP	KS	AKIL	MSKY	VK	AKL	VVPS	SE-----	200
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
BBL No.		280	290	300											
IMP-1	-----V	GDASL	LKLT	LEQAV	KGLNES	KRPSK	PS							227	
IMP-2	-----I	GDASL	LKRTE	QAVK	GKGLNES	KRPSQ	PSN							229	

**Figure 1.** Alignment of the amino acid sequence of IND-2 from *Acinetobacter* spp. with that of IMP-1 from *Serratia marcescens*. References for each sequence are as follows: IMP-1 (EMBL/GenBank/DBJ accession number: IMP-1 (S71932) and IMP-2 (AF219129). Sequence comparison was performed by aligning the protein amino acid sequences by use of the MULTALIN program (Corpet, *Nucleic Acid Res.* **1988**, *16*, 10881-10890). The class B metallo- $\beta$ -lactamase numbering scheme is indicated above the sequences (Galleni *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemther.* **2001**, *45*, 660-663). Dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment. Numbers on the right indicate numbers of amino acid residues from the N-terminus for each mature protein. Zinc(II)-coordinating residues are shaded in grey. Substitutions between IMP-1 and IMP-2 are indicated by colons. The region of loop 1 in IMP-1 and IMP-2 is underlined.



**Figure 2.** Overall structure of IMP-2 from *Acinetobacter* spp.. (A) A ribbon diagram of IMP-2. Zinc(II) ions are represented as spheres. The figure was prepared with MolFeat software (FiatLux Corporation). (B) Superposition of the Ca tracing of IMP-1 (black) with IMP-1 from *Pseudomonas aeruginosa* [gray, PDB code: 1DDK].



**Figure 3.** (A) Structure of the active site in IMP-2. The electron density map (mesh) is shown contoured at the  $1.0\sigma$  level in the  $2|F_o|-|F_c|$  map. Zinc(II) ions are shown as spheres. The occupancies of Zn1 and Zn2 are refined with 1.0 and 0.3, respectively. Cys221 and His263 adopted alternative conformations in the IND-7 structure. The occupancies of Cys221A and His263A are refined with 0.3 in each case, whereas those of Cys221B and His263B are refined with 0.7 each. (B) Superposition of the structures of the active site of IMP-2 (black) with IMP-1 from *Pseudomonas aeruginosa* [gray, PDB code: 1DDK]. In the IMP-2 structure, one of the two acetate ions is omitted.

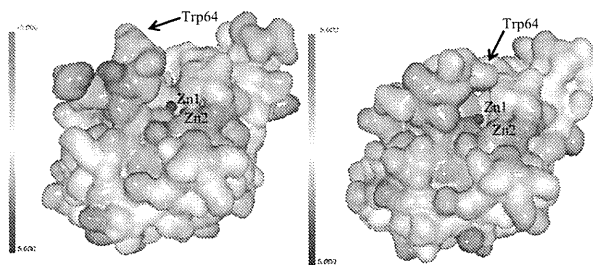


Figure 4. Electrostatic potential representation of IMP-1 from *Pseudomonas aeruginosa* [gray, PDB code: 1DDK] (left) and IMP-2 from *Acinetobacter spp.* (right). Zinc(II) atoms are represented by spheres. A ribbon diagram of IMP-2. Zinc(II) ions are represented as spheres. The figure was prepared with MolFeat software (FiatLux Corporation).

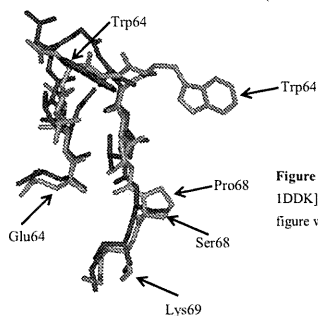


Figure 5. Superposition of residues 60–69 in IMP-1 from *Pseudomonas aeruginosa* [gray, PDB code: 1DDK] and IMP-2 from *Acinetobacter spp.* (black). Zinc(II) ions are represented as spheres. The figure was prepared with MolFeat software (FiatLux Corporation).

Table 1. Crystallographic data-collection and refinement statistics for IMP-2

Resolution limits(Å)	44.161–2.300
Number of used reflections	9994
Percentage observed	97.722
Percentage of free reflections	4.892
Overall R factor	0.210
Free R factor	0.284
Overall weighted R factor	0.211
Free weighted R factor	0.288
Overall figure of merit	0.801
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Rmsd BondLength	0.013
Rmsd BondAngle	1.678
Rmsd ChirVolume	0.109
Completeness(%)	99.0
$R_{merge}$ (%)	0.090
	$a = 37.9$
Cell constant	$b = 68.5 \text{ \AA}$
	$c = 88.3 \text{ \AA}$

## 結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの研究

研究分担者 柴山 恵吾（国立感染症研究所 細菌第二部）

### 研究要旨

ピラジナミド (PZA) は結核菌の菌体内でピラジナミダーゼにより活性型のピラジン酸 (POA) に変換され、酸性条件下において抗結核菌活性を示すことが知られているが、POA の詳細な標的部位については不明な部分が多い。この研究では、結核菌における PZA 作用メカニズムを解明することを目的として、結核菌のニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Rv1330c) と POA の抗菌活性との関連について解析を進めてきた。本年度の研究では、POA による Rv1330c のホスホリボシル基転移反応の阻害が酸性条件下でより増強されることと、POA によって Rv1330c の ATP 加水分解活性が増強され、菌体内 ATP が消耗されることを明らかにした。これらの結果より、POA は Rv1330c を一つの標的部位として抗菌活性を示している可能性が考えられた。今後は Rv1330c の機能構造相関解析を行うことにより、PZA や POA の構造を基にした新規抗結核薬の開発に結びつくことが期待される。

### 研究協力者

森 茂太郎（国立感染症研究所・細菌第二部）

### A. 研究目的

結核症の第一選択薬であるピラジナミド (PZA) はニコチンアミドの構造類縁体であり、菌体内においてピラジナミダーゼ (ニコチンアミダーゼ) によって加水分解されてピラジン酸 (POA) になる。この POA が酸性条件下において結核菌に対して抗菌活性を示すことが明らかにされている。しかしながら、POA の詳細な標的部位については明らかにされておらず、結核菌における PZA 作用メカニズムの全容解明には至っていない。そこで本研究では、結核菌における PZA 作用メカニズムに関する新しい知見を得ることを目的として、結核菌内で PZA や POA の代謝に関わっていることが予想される酵素を選び、その酵素学的諸性質を明らかにするとともに POA による抗結核菌活性との関連について解析を進めてきた。

昨年度までに、POA の構造類縁体であるニコチン酸 (NA) を基質として利用する結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Rv1330c) の詳細な酵素学的諸性質を明らかにし、本酵素が ATP 加水分解反応を利用して効率的にホスホリボシル基転移反応を行っていることを示した。また、POA は Rv1330c によって代謝はされないが、Rv1330c の ATP 加水分解活性を上昇させることも明らかにした。実際に菌体を PZA に 6 時間曝露させた結果、菌体内 ATP 量が有意に減少することが示された。またコロニーカウントの結果から、PZA に曝露 6 時間後の時点では菌は生存していることから、菌体内 ATP 量の減少は菌が死んだことによるものではなく、PZA

の作用であることが示唆された。

本年度は、Rv1330c と POA の抗結核菌活性との関連について詳細な解析を行うため、Rv1330c のホスホリボシル基転移反応に対する POA の阻害活性を測定した。さらに、PZA と菌体内 ATP 量の減少との関連を詳しく調べるため、菌体を PZA や POA に曝露して菌体内 ATP 量の測定を行った。

### B. 研究方法

結核菌として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株を、BCG 株として *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株を用いた。また、結核菌由来ピラジナミダーゼ遺伝子 (*PncA*) を抗酸菌用発現ベクター pVV16 に組み込んだプラスミドを用いて形質転換を行った BCG 株 (BCG\_PncA) を作成して本研究に用いた。Rv1330c のリコンビナントタンパク質は大腸菌内で発現させた後、FPLC を用いて精製を行った。Rv1330c の酵素活性は HPLC を用いて測定した。菌体内における ATP 量の測定では、7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6) または PZA 感受性測定用の液体培地 (pH 5.8) を用いて、PZA もしくは POA に菌体を曝露させた。菌体内 ATP 量の定量については、既存の方法に従った (Vaccine 2008, 26; 4754-4757)。データの統計的な処理やグラフの作成は市販のソフト (Prism; GraphPad Software, Inc.) を用いて行った。

倫理面への配慮 該当なし。実験では、関連法令を遵守した上で、安全性等に十分に配慮して行った。

### C. 研究結果

PZA と POA のそれぞれの Rv1330c のホスホリボシル基転移反応に対する阻害活性を調べたと

ころ、いずれも中性条件下 (Tris バッファー、pH7.4) に比べて酸性条件下 (クエン酸・リン酸バッファー、pH5.4) でホスホリボシル基転移反応を強く阻害することが示された (Figs. 1 and 2)。

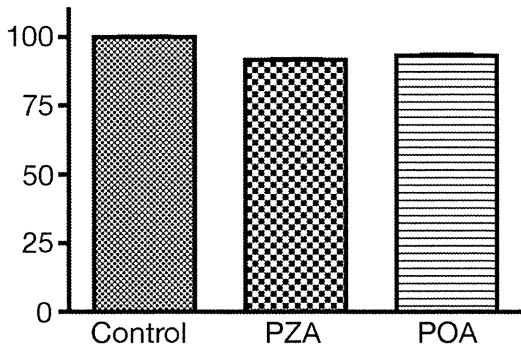


Fig. 1 中性条件下における阻害活性 [縦軸は活性比 (%)]

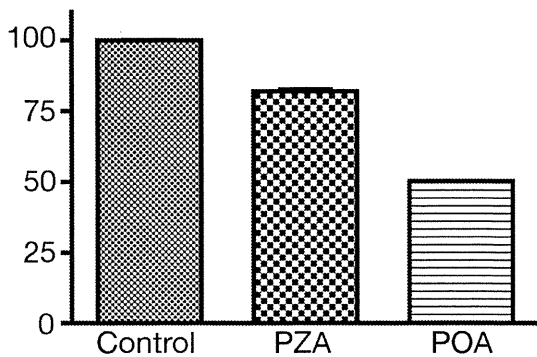


Fig. 2 酸性条件下における阻害活性 [縦軸は活性比 (%)]

さらに POA の濃度を変化させて Rv1330c のホスホリボシル基転移活性を測定したところ、中性条件下でも POA の濃度を上げると阻害活性が強く認められるが、酸性条件下では POA が低濃度でも Rv1330c のホスホリボシル基転移活性を強く阻害することが示された (Figs. 3 and 4)。

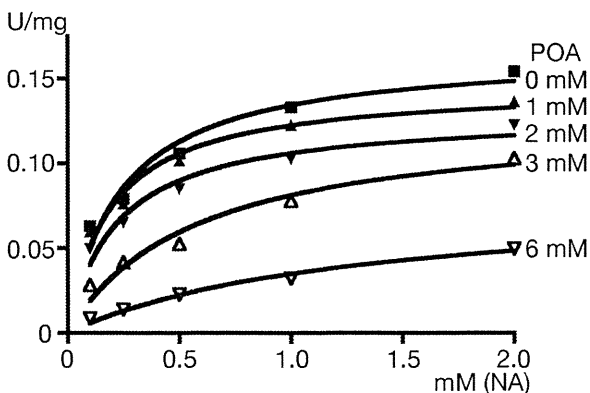


Fig. 3 中性条件下における POA の濃度と Rv1330c のホスホリボシル基転移活性との関連

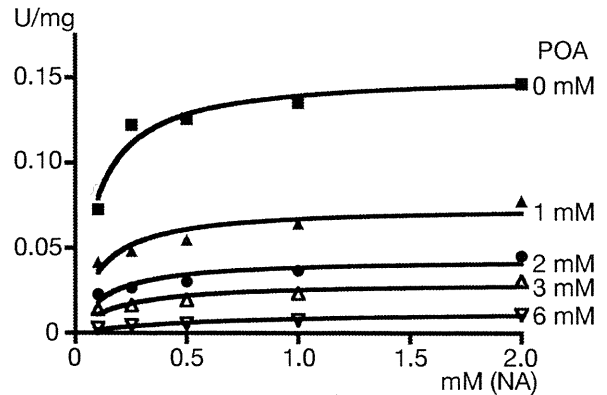


Fig. 4 酸性条件下における POA の濃度と Rv1330c のホスホリボシル基転移活性との関連

7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6) において BCG 株、並びに BCG 株内で結核菌由来 *PncA* 遺伝子を発現させた BCG\_ *PncA* 株をそれぞれ PZA に 6 時間曝露させたところ、BCG 株では菌体内 ATP 量に変化は見られなかったが、BCG\_ *PncA* 株では菌体内 ATP 量が有意に減少していた (Fig. 5)。

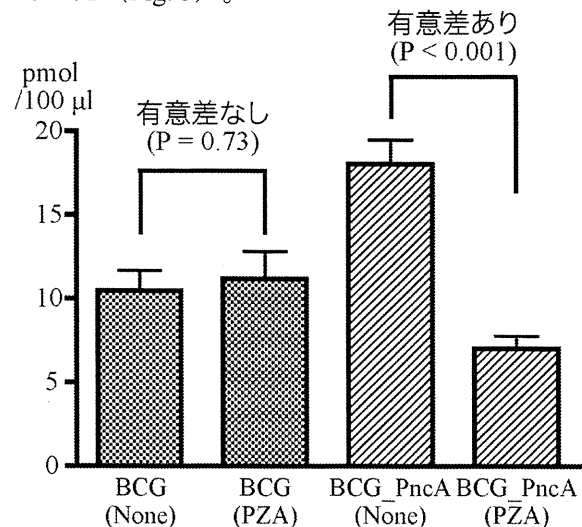


Fig. 5 7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6) において PZA に 6 時間曝露させた時の菌体内 ATP 量

一方、H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6) において BCG 株、並びに BCG\_ *PncA* 株をそれぞれ POA に 6 時間曝露させたところ、菌体内 ATP 量の減少は BCG 株でも認められた (Fig. 6)。

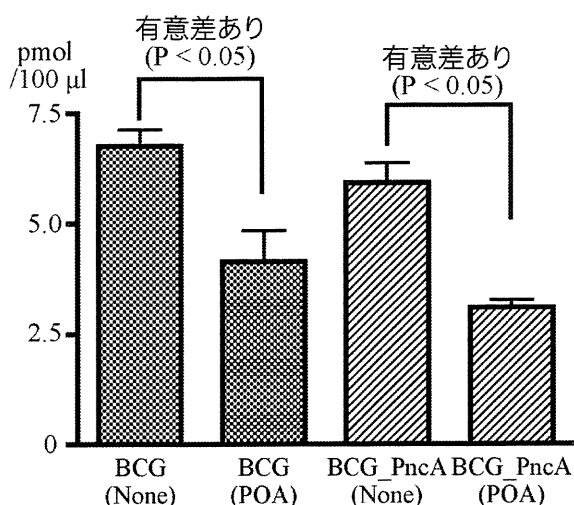


Fig. 6 7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6) において POA に 6 時間曝露させた時の菌体内 ATP 量

また、PZA 感受性測定用の液体培地 (pH 5.8) において BCG 株、並びに BCG\_PncA 株をそれぞれ PZA に 6 時間曝露させたところ、BCG 株では菌体内 ATP 量に変化は見られなかったが、BCG\_PncA 株では菌体内 ATP 量が有意に減少していた (Fig. 7)。

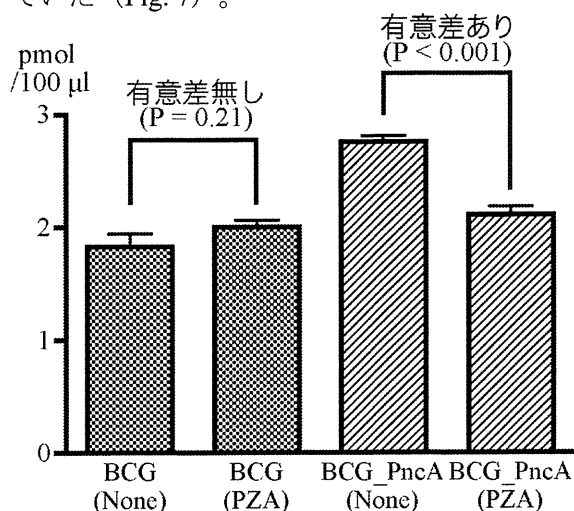


Fig. 7 PZA 感受性測定用の液体培地 (pH 5.8) において PZA に 6 時間曝露させた時の菌体内 ATP 量

さらに、7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6)、並びに PZA 感受性測定用の液体培地 (pH 5.8) において結核菌を PZA に 6 時間曝露させたところ、培地の pH に関係なく菌体内 ATP 量は減少していた (Fig. 8)。

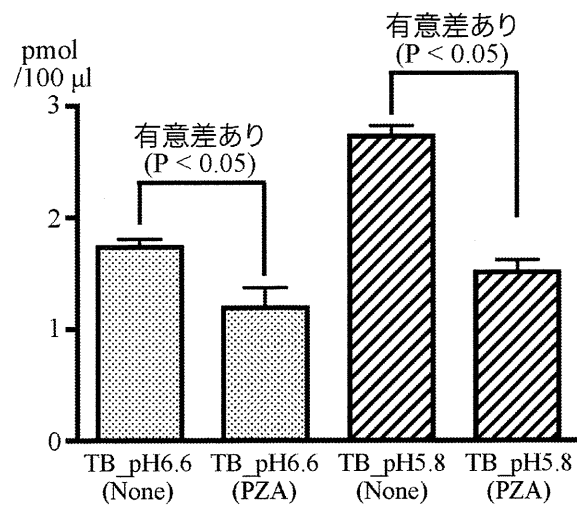


Fig. 8 7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6)、並びに PZA 感受性測定用の液体培地 (pH 5.8) において結核菌を PZA に 6 時間曝露させた時の菌体内 ATP 量

#### D. 考察

中性条件下と比較して酸性条件下において Rv1330 のホスホリボシル基転移反応は POA に強く阻害されることが示された (Figs. 1, 2, 3, and 4)。POA は酸性条件下において抗結核菌活性を示すことから、酸性条件下で POA が Rv1330c のホスホリボシル基転移反応を強く阻害し、その結果、NAD 代謝経路に影響を与えることが POA の抗結核菌活性の一因であることが考えられた。

7H9+ADC+0.05%Tween80 培地 (pH 6.6)、並びに PZA 感受性測定用の液体培地 (pH 5.8) において BCG 株を PZA に 6 時間曝露させても菌体内 ATP 量に有意な変化は認められなかった (Figs. 5 and 7)。これは、BCG 株が PZA を POA に変換できないためだと推測された。実際に BCG 株を PZA ではなく POA に曝露させた場合には菌体内 ATP 量が有意に減少していた (Fig. 6)。さらに、BCG 株内で結核菌由来ピラジナミダーゼを発現させることによって PZA を POA に変換できるようにした BCG\_PncA 株を PZA に 6 時間曝露させると菌体内 ATP 量は有意に減少した (Figs. 5 and 7)。従って、菌体内 ATP 量の減少は POA によって引き起こされていることが明らかとなった。昨年度までの研究より、POA は Rv1330c によって代謝はされないが、Rv1330c の ATP 加水分解活性を促進させることが示されていることから、POA は Rv1330c に作用することによって、菌体内 ATP 量を減少させていることが示唆された。また、PZA が POA に代謝された後に引き起こされる菌体内 ATP 量の減少は、培地の pH には依存しないことも示された (Figs. 5, 7, and 8)。

以上の結果より、PZA が菌体内で活性型の POA に代謝された後、Rv1330c に作用し、酸性条件下でその転移反応を強く阻害して正常な NAD 代謝

を阻害するとともに、Rv1330c が持つ ATP 加水分解活性を促進させて菌体内 ATP 量を減少させることが、ピラジナミド作用メカニズムの一つであることが推測された。今後は、Rv1330c の機能構造相関解析を進めることによって、PZA よりもすぐれた新規抗結核薬の開発に結びつけることが可能であると考えられる。

#### E. 結論

結核菌 Rv1330c がピラジナミドの標的分子の一つである可能性が考えられた。

ピラジナミドの活性型のピラジン酸が Rv1330c に作用することによって酸性条件下で NAD の代謝を強く阻害することが示唆された。

ピラジン酸の作用によって培地の pH にかかわらず短時間で菌体内 ATP 量が減少することが示された。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Shibayama K, Takeuchi H, Wachino J, Mori S, Arakawa Y. Biochemical and pathophysiological characterization of *Helicobacter pylori* asparaginase. *Microbiol Immunol.* 2011 Jun;55(6):408-17.
  2. 学会発表
  - 1) 森茂太郎、柴山恵吾、荒川宜親. 結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析とピラジン酸による抗結核菌活性との関連性. 日本農芸化学 2012 年度大会 2012 年 3 月 京都
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

## 侵襲性感染症を引き起こす市中感染型 MRSA の国内における検討

研究分担者 松本 哲哉（東京医科大学微生物学講座）

研究要旨 市中感染型 MRSA（Community Associated MRSA:CA-MRSA）は院内感染型の MRSA と異なり、一般社会において広がっている耐性の黄色ブドウ球菌である。本菌は米国を中心に 2000 年以降、急激に拡大する傾向にあるが、国内ではその状況がまだ十分に把握されているとは言いがたい。我々は昨年度の本研究班の研究において、国内の皮膚感染症患者から分離された MRSA241 株を対象に SCCmec typing を用いた検討を行い、type IV あるいは type V の CA-MRSA と判定された菌株が 141 株（58.5%）存在し、国内でも高率に CA-MRSA が分離されている状況を明らかにした。さらに今年度は、菌血症など侵襲性の高い感染症における CA-MRSA の分離状況を明らかにするために、血液培養などの検体から分離された MRSA を対象に検討を行った。2011 年 1 月から 12 月までに日本各地の医療機関から検査センターに培養を目的として提出された無菌検体（血液、カテ先、髄液、胸水、腹水）から分離された MRSA のうち、CA-MRSA の感度を上げるために FMOX $\leq$ 16, IPM $\leq$ 4, FOM $\leq$ 16 のいずれか 1 つでも条件を満たす菌株を選択し、130 株を対象として解析を行った。その結果、type IV の株が 19 株（14.6%）確認されたが、type V の株は分離されなかった。さらに CA-MRSA の代表的な病原因子である PVL (Panton-valentine leukocidin) はどの株からも確認できなかった。これらの結果から、国内において CA-MRSA は皮膚感染症に比べれば明らかに低率であるが、まれとは言えない程度に分離されることが明らかとなった。また、PVL 分離株は検出されなかったことから、血液分離株と異なるタイプの CA-MRSA が菌血症などの起炎菌となっている可能性が示唆された。

### 研究協力者

山口 哲央（東京医科大学微生物学講座）

#### A. 研究目的

市中感染型 MRSA（Community Associated MRSA:CA-MRSA）は米国を中心に 1990 年代から増加傾向を示し、2000 年以降さらに拡大傾向が認められている。本菌は小児や青年期の健康人を主として感染が認められ、その大半は皮膚感染で軽症例が多いが、肺炎例では致死率が高い。

米国と比べ日本では、CA-MRSA の報告例が少なく、国内で分離される CA-MRSA の特徴については未だ不明な点が多い。そこで我々は、昨年度、皮膚感染症を対象として検討を行ったが、今回、それに引き続き、菌血症などの侵襲性感染症を対象として、検査センターで分離された MRSA の菌株を用いて、全国レベルでの解析を行った。

#### B. 研究方法

2011 年 1 月から 12 月までに日本各地の医療機関から検査センターに培養を目的として提出された皮膚疾患患者からの検体 1 件を対象とした。

対象菌株は、1) 無菌検体（血液、カテ先、髄液、胸水、腹水）から分離、2) 微量液体希釈法で FMOX $\leq$ 16, IPM $\leq$ 4, FOM $\leq$ 16 のいずれか 1 つでも条件を満たす 130 株を対象とした。なお、同一患者からの検体は除外した。

PCR によって mec 遺伝子複合体及び ccr 遺伝子複合体をそれぞれ検出し、その組み合わせによって SCCmec の型を決定し、IV および V 型を CA-MRSA と判定した。さらに CA-MRSA と判定された菌株については、微量液体希釈法を用いて各種抗菌薬に対する感受性を測定した。また、黄色ブドウ球菌の代表的な病原因子である PVL (Panton-valentine Leukocidin), ET (exfoliative toxin) および TSST-1 (Toxic shock syndrome toxin 1) の有無を PCR にて検索した。

(倫理面への配慮)

今回、対象症例の個人情報の提供は受けておらず、菌株のみの検討を行った。

### C. 研究結果

#### 1) 患者の年齢分布

今回、上記に定める MRSA の条件を設定して菌が分離された患者全体を集計してみると、80 歳代以上が最も多くを占め、70 歳代、60 歳代がそれに続いた (図 1)。薬剤感受性で CA-MRSA を選択しやすい条件を設定したにもかかわらず、この年齢分布は高齢者に偏っていることが判明した。

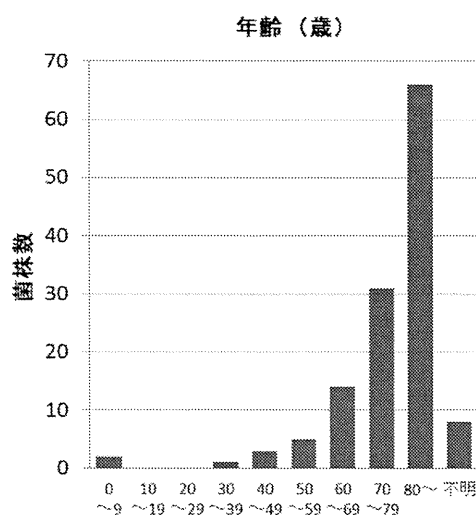
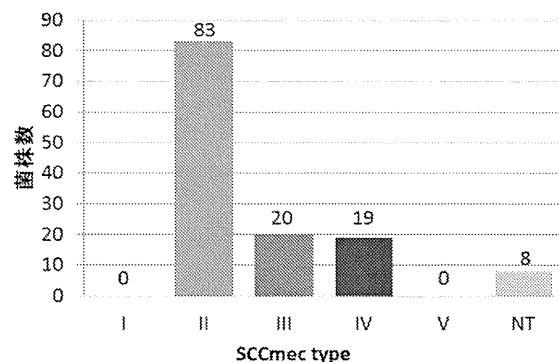


図 1. MRSA 臨床分離株の SCCmec 型別による分類

#### 2) 検体種別

検体種別では静脈血が 77 検体、動脈血が 29 検体と血液検体はそのほとんどを占めていた。それ以外の検体としては、カテーテル 8 検体、胸水 4 検体、髄液 6 検体などであった。



#### 3) MRSA 全体に占める市中感染型の頻度

MRSA 130 株のうち、19 株 (14.6%) が

SCCmec type-IV の CA-MRSA と判定された。

しかし type-V は 1 株も確認できなかった (図 2)。

図 2. MRSA 臨床分離株の SCCmec 型別による分類

#### 4) 病原因子の解析

CA-MRSA の重要な病原因子である PVL は type IV の 19 株のいずれも陰性であった。さらに黄色ブドウ球菌全般的に検出頻度の高い ET についても 1 株のみ *etb* を産生する菌株が確認できた。

一方、黄色ブドウ球菌として重要な病原因子である TSST-1 については、type II の 83 株中 62 株 (74.7%)、type III の 20 株中 19 株 (95%) と院内感染型 MRSA (HA-MRSA) に高率に検出されていた。一方、type IV の菌株では 19 株中 4 株 (21.0%) と検出率は低い傾向にあった。

#### 4) 薬剤感受性成績

今回対象とした 130 株の薬剤感受性成績を表 1 に示した。HA-MRSA として代表的な SCCmec type-II の株については、IPM に感受性を示す割合は 6% と少ないのに対して、type-IV では 89% とほとんどの株が良好な感受性を示した。類似した傾向が CLDM でも認められた。これにより IPM や CLDM の薬剤感受性によって、ある程度 CA-MRSA と HA-MRSA の判別が可能になると思われる。

表 1. CA-MRSA 分離株の感性菌の割合 (%)

抗菌薬および感性の基準 ( $\mu\text{g/ml}$ )	SCCmec type	
	II	IV
CEZ ( $\leq 8$ )	2	68
IPM ( $\leq 4$ )	6	89
GM ( $\leq 4$ )	58	58
LVFX ( $\leq 1$ )	2	42
CLDM ( $\leq 0.5$ )	6	84
EM ( $\leq 0.5$ )	1	37
MINO ( $\leq 4$ )	22	89
ST ( $\leq 2/38$ )	100	100



MINO も IPM や CLDM ほどではないが、感受性に type-II と type-IV で差が認められた。しかし type-III の多くが良好な感受性を示しており、HA-MRSA として一定の傾向は認められなかった。これらの傾向とは逆に GM や ST 合剤に対しては SCCmec のタイプによる差は全く認められなかった。

#### D. 考察

国内における CA-MRSA の状況を明らかにするために本研究班における臨床分離株の検討を開始した。昨年度は皮膚・軟部組織感染症に伴って提出された検体から分離された MRSA 241 株を対象とし、SCCmec typing によって CA-MRSA と判定された菌株は 141 株 (58.5%) に達するという予想以上の高い値を示した。この結果は国内における皮膚・軟部組織感染症においては、CA-MRSA が市中に浸透してきている状況が示唆された。

今年度は、菌血症などの侵襲性の感染症をターゲットとして昨年度と同じ臨床検査センターの協力を得て菌株の収集を行った。そのため、検体の種類は異なるが、同じ医療機関を対象とした調査であると考えて良いと思われる。

患者の年齢分布としては、皮膚・軟部組織感染症から CA-MRSA が検出された症例は 10 歳未満や 10 歳代に多かったが、今回の侵襲性感染症を対象とした検討では、60 代以上の高齢者が大半であった。これは血液培養などから MRSA が分離される場合は、入院患者が多数を占め、その大半は高齢者であることを反映しているものと思われる。そういう意味では、MRSA の薬剤感受性を用いたふり分けを試みたにもかかわらず、HA-MRSA が多く含まれる状況であった可能性が高い。

病原因子の検索については、皮膚・軟部組織感染症から分離された CA-MRSA type IV の株のおよそ 2 割から PVL が分離された。この結果は前回も報告したとおり、私達の予想を遥かに上回るものであった。一方、侵襲性感染症を対象とした検討では、CA-MRSA 株が 19 株含まれていたにもかかわらず、1 株も PVL 陽性株を見つけることはできなかった。その他の病原因子についても皮膚・軟部組織

感染症から分離された株に比べて低い傾向にあった。おそらく、今回対象とした侵襲性感染症については、菌そのものの病原因子よりも、生体側の免疫不全や医原性の要因などの関与が大きかったのではないかと推測される。

薬剤感受性は SCCmec typing を通常行うことが難しい一般検査室において、CA-MRSA と HA-MRSA の違いに関する薬剤別の傾向は、皮膚・軟部組織感染症と侵襲性感染症の間に大きな差は認められず、IPM や CLDM において両者の鑑別が有用な結果が示唆された。

今回得られた菌株は、全国の医療機関から集められた臨床検体から分離されたものであり、現在の国内の状況を反映していると思われる。ただし、各地域の菌株数は偏りがあり、関東およびその周辺地域が多く、それ以外の地方の株数は少ないため、全国おしなべて同じ状況であると結論づけるにはまだ十分なデータは得られていない。他の地域における疫学的調査の結果を含めて判断すると、CA-MRSA の分布状況も地域によって異なる可能性があるため、今後さらに広く菌株を集めて検討することが必要と考えられる。

#### E. 結論

全国の医療機関から菌血症などの侵襲性感染症の診断を目的として、外注検査センターに検査を依頼され、分離された MRSA 130 株を対象として検討を行った。その結果、19 株 (14.6%) が SCCmec type-IV の CA-MRSA と判定されたが、PVL はいずれの菌株からも検出されなかった。この結果は、我々が以前行った皮膚・軟部組織感染症を対象とした結果と大きく異なっていた。国内では菌血症などの侵襲性感染症に占める CA-MRSA の割合はまだ明かに高いとは言えないが、市中に広がっている傾向が認められることから、今後、さらに国内における CA-MRSA の検討を継続し、その状況を把握していく必要があると思われる。

#### 謝辞

今回、菌株の収集にあたっては、ミロクメディカルラボラトリーの方々にも多大なご尽力をいただいた。今回の検討において菌株収集は不可欠であり、全面的にご協力いただいた関係各位に厚く御礼申し上げます。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi T, Nakamura I, Chiba K, Matsumoto T. Epidemiological and Microbiological Analysis of Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated From a Japanese Hospital. Jap. J. Infect. Dis. 2012 (in print).

2. 学会発表

1) 山口哲央, 小山忍, 野竹重幸, 松本哲哉. 日本各地の外来診療において分離された CA-MRSA の検討. 第 85 回日本感染症学会・学術講演会. 東京. 2011. 4

2) Yamaguchi T, Matsumoto T. Epidemiological analysis and molecular characterization of Community-Associated MRSA (CA-MRSA) carrying Panton-Valentine leukocidin (PVL) genes in Japan 51th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago. 2011. 9.

3) Yamaguchi T, Matsumoto T. Epidemiological and microbiological analysis of CA-MRSA strains isolated from outpatient with skin and soft tissue infections in Japan International Union of Microbiological Cosienties 2011 Congress, Sapporo. 2011. 9

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特許取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他

なし

## 多剤耐性菌(特に抗酸菌)の耐性機序に関する研究

研究分担者 松本 智成 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部)

### 研究要旨

本研究では、リファンピシン耐性 *M. heckeshornense* の耐性機構の解明を目的とし、*rpo β* 部位におけるシーケンス解析を行い、リファンピシン感受性 *M. heckeshornense* 株は、リファンピシン感受性 *M. tuberculosis* と DNA 塩基配列は異なっていたがアミノ酸配列は全く同じであった。RFP 耐性 *M. heckeshornense* 株は *M. tuberculosis* の rifampin 耐性化でも報告されている Gln から Lys へのアミノ酸置換が認められた。この成果を得た。その結果、リファンピシン耐性 *M. heckeshornense* の耐性責任遺伝子変異部位について明らかとする事ができ、非結核性抗酸菌症の耐性化機構に貢献する事が期待される。

### 研究協力者

今西 香織 (大阪府立呼吸器・アレルギー  
医療センター臨床研究部)  
平山 幸雄 (同上)  
越井由利子 (同上)

### 【*rpo β* 遺伝子解析】

*Mycobacterium* 属に共通な *rpo β* 配列用 PCR primer

Forward

primer: 5'-CCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCA-3'

Reverse primer:

5'-CGTCGCCGCGTCGATCGCCGCGC-3'

にてPCR増幅を行った後、Sequence primerを作成  
Sequence primer:

5'-TCGCGCACCTCCAGTCCGGCCCGCT-3'

PCR産物を上記3つのprimerを用いてSequence反応を行い、ABI 310 genetic analyzerにて塩基配列を決定した。

### A. 研究目的

リファンピシン耐性化した *M. heckeshornense* とリファンピシン感受性株と比較する事によりリファンピシン耐性化機構を明らかにする。

### B. 研究方法

【菌種同定】16S rRNA遺伝子超可変領域A (*E. coli* での塩基ポジション130-210bp)並びに同B (*E. coli*での塩基ポジション 430-500 bp)を含む54 - 510 bpの塩基配列を決定し、Ribosomal (RIDOM) Databaseによる相同性を検索し、菌種同定した。

使用したプライマー:

PCR増幅: 285F, 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA gene position 9-30); 264R, 5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3' (*E. coli* 16S rRNA gene position 1046-1027) 約1kbpのPCR増幅産物を得た。

シーケンス: 前述のPCR増幅産物を、上述の285Fプライマーを用いてセンス側からの配列解析。

259R (5'-TTTCACGAACAACGCGACAA-3'; *E. coli* position 609-590)を用いてアンチセンス側からの配列解析した。

【薬剤感受性試験】極東製薬のBroth-MIC NTMにてマニュアルに従い測定した。薬剤感受性域は、メーカー推奨域に従った。

### 倫理面への配慮

個人情報が流出しないように配慮した。

### C. 研究結果

*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* 用の *rpo β* hotspot 配列を増幅する primer では、*M. Heckeshornense* 遺伝子は増幅しなかった。Rifampin 感受性株における *M. Heckeshornense* と *M. tuberculosis* の *rpo β* hotspot のアミノ酸配列は同じであったが、DNA 塩基配列は異なっていた。RFP 耐性株において、*M. tuberculosis* の rifampin 耐性化でも報告されている Gln から Lys へのアミノ酸置換が認められた。

### D. 考察

*M. heckeshornense* は、Roth等により免疫不全の無い患者において空洞病変を生じる遅発育性の病原性抗酸菌であると報告された (*J. Clin Microbiol* 2000; 38: 4102-7)。この *M. heckeshornense* は、系統的に *M. xenopi* に近く、DDHにより *M. xenopi* として同定される事が多いが、*M. xenopi* よりも病原性が高いと言われている。

このM. heckeshornenseとM. xenopiの信頼出来る区別の方法は唯一16S rRNAによると言われている(J. Med. Microb 2003; 52, 315-323)。今後、M. xenopi症と診断された症例の中には、M. heckeshornenseが含まれている可能性があるもので16S rRNA遺伝子解析を積極的に行うべきである。Roth等は空洞形成性能を有すると言っているが当センターでの症例は、既空洞例患者で、むしろ経過とともに無治療でも空洞は縮小傾向にあった。しかしながら浸潤影の経時的増大、空洞壁肥厚、繰り返す喀痰塗抹、培養陽性を呈し、加療によりこれらの所見が改善している事よりRoth等の記載通り病原性は有すると判断する。またこの症例では、抗結核薬に対し自然耐性は獲得されておらずRFP, EB, CAMによる加療にて比較的速やかに排菌陰性化し画像上も改善が認められた。M. Heckeshornense症自身の報告がまれでRFP耐性化の機構は報告されていない。Rifampin感受性株におけるM. HeckeshornenseとM. tuberculosisの rpo  $\beta$  hotspotのアミノ酸配列は同じであったが、DNA塩基配列は異なっていた。このため、M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare用の rpo  $\beta$  hotspot配列を増幅するprimerでは、増幅が得られなかったと判断した。M. Heckeshornenseの今回のrifampicin耐性化機構は、M. tuberculosisのrifampin耐性化でも報告されているGlnからLysへのアミノ酸置換によるものと考えられる。

#### E. 結論

RFP 感受性および耐性 M. Heckeshornense 株より rpo  $\beta$  hotspot の遺伝子解析を行った。Rifampin 感受性株における M. Heckeshornense と M. tuberculosis の rpo  $\beta$  hotspot のアミノ酸配列は同じであったが、DNA 塩基配列は異なっていた。M. Heckeshornense の今回の rifampicin 耐性化機構は、M. tuberculosis の rifampin 耐性化でも報告されている Gln から Lys へのアミノ酸置換によるものと考えられる。

#### F. 健康危機情報

該当せず

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
投稿準備中
2. 学会発表  
発表準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録
3. その他