

本邦で分離されたゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌について

第3編 アミノグリコシド系抗生物質の耐性機構について

生方 公子・紺野 昌俊

帝京大学医学部臨床病理

白幡 公勝・飯田 孝男

協和醸酵工業株式会社東京研究所

(昭和 56 年 9 月 14 日受付)

Gentamicin を含む種々のアミノグリコシド系 (AGs) 抗生物質に耐性の黄色ブドウ球菌 (ブドウ球菌) から感性菌 MS353 株に GM 耐性を導入した MS 353 (pTU 053) 株および MS 353 (pTU 068) 株を用いて, AGs 抗生物質の不活化に関する検討を行なった。

1. MS 353 (pTU 053) 株から抽出した酵素液には, AGs 抗生物質の 6' 位のアミノ基のアセチル転移酵素, 3' 位の水酸基のリン酸転移酵素および 2'' 位の水酸基のリン酸転移酵素の活性がそれぞれ認められた。
2. MS 353 (pTU 068) 株から抽出した酵素液には, AGs 抗生物質の 6' 位のアミノ基のアセチル転移酵素と 2'' 位の水酸基のリン酸転移酵素の活性が認められた。
3. MS 353 (pTU 053) 株から抽出した酵素液での酵素活性の至適 pH は, リン酸化反応およびアセチル化反応のいずれも pH 6.5 であった。
4. MS 353 (pTU 053) 株から抽出した酵素液を用い, Sisomicin と Amikacin を基質としてそれらのリン酸化による不活化を経時的に調べると, Sisomicin は Amikacin に比べはるかに効率よく不活化された。

アミノ配糖体抗生物質 (AGs 抗生物質) の耐性機構に関する研究は, 既に多くのものがあり, それらの解析に基づいて, Dibekacin (DKB), Amikacin (AMK) および Netilmicin (NLT) などの半合成の AGs 抗生物質も開発されてきた。一方, AGs 抗生物質の臨床での使用の増大は, 側面においてこの種の薬剤に耐性を示す菌の出現をみる結果ともなり, ことにグラム陰性桿菌においては, それらに対する対策が重要な問題となりつつある。

本邦においても, グラム陰性桿菌の AGs 抗生物質に対する耐性菌の検出状況などに関しては, 種々報告されていることであるが, 黄色ブドウ球菌 (ブドウ球菌) の AGs 抗生物質耐性については, 必ずしも十分に解析が行なわれてはいない。著者らは, 最近の臨床検査材料の中から, かなりの頻度で Gentamicin (GM) に耐性を示すブドウ球菌が検出されるようになったことから, その検出状況を統計的に調べ, 検出された菌の薬剤耐性, ファージ型などについても併せて検討し, 第1編¹⁾で報告してきた。また, 第2編²⁾では, それらの GM 耐性菌からファージを誘発し, そのファージによる GM 耐

性の導入と, それによって得られた GM 耐性の導入株について, プラスミド DNA の解析を行ない報告してきた。

本編では, それらの GM 耐性導入株から抽出した酵素液を用いて AGs 抗生物質の不活化状況を検討した成績, さらに Sisomicin (SISO) と AMK を用いて不活化酵素による化学構造上の修飾部位を明らかにした成績について報告したい。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

実験に用いた菌株は, Table 1 に示したように, GM 耐性の導入株である MS 353 (pTU 053) と MS 353 (pTU 068) 株であり, また一部の実験においては比較のために KM 耐性の導入株 MS 353 (pTU 512) 株を用いた。これらの株は, 第2編において報告した菌株と同じ菌株である。

2. 使用抗生物質と標識化合物

実験に用いた AGs 抗生物質は, Kanamycin (KM), Lividomycin (LVDM), Butirosin, AMK, GM, SISO, DKB, Tobramycin (TOB), NTL の計 9 薬剤である。

Table 1 Minimal inhibitory concentrations of various aminoglycoside antibiotics for *Staphylococcus aureus* strains

Antibiotic	Strain		
	MS 353 (pTU 512)	MS 353 (pTU 053)	MS 353 (pTU 068)
Kanamycin	>100	>100	>100
Lividomycin	>100	>100	3.13
Butirosin	>100	>100	1.56
Gentamicin	0.2	>100	>100
Dibekacin	0.39	>100	>100
Tobramycin	0.1	100	100
Sisomicin	0.2	>100	>100
Amikacin	0.78	12.5	6.25
Netilmicin	0.39	25	50

酵素反応を行なうに際しては、標識化合物の [γ - 32 P]-adenosine-triphosphate (ATP), [α - 14 C]-ATP および [14 C]-acetic acid を使用した (Amersham)。

3. 酵素液の調製

上述した被験菌株は、Trypticase soy broth (Difco, 3 liter) 中で 37°C で対数増殖期の後期まで振盪培養し、8,000 rpm 10 分間の冷却遠心により集菌した。菌体は TMK buffer (0.1 M tris(hydroxymethyl)aminomethane, 10 mM Mg(CH₃COO)₂·4 H₂O, 60 mM KCl, 6 mM β -mercaptoethanol, pH 7.5) で 1 回洗浄した後、同一の buffer 液 50 ml に再浮遊して氷冷しながら超音波破碎した (9 kHz, 30 分を 2 回, Kubota 200 M 型)。続いてその破碎液を 8,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清をさらに 40,000 rpm で 60 分間遠心し、得られた上清を粗酵素液とした。

4. AGs 抗生物質の不活化率の測定

上述の 3) 項によって抽出された酵素液は、透析チューブを用いて TMK buffer で透析を行なった後、HAAS ら⁹⁾の方法に準じて AGs 抗生物質 (最終濃度: 0.1 mM) の不活化率を測定した。酵素反応は 30°C で 1 時間行ない、100°C, 3 分間の熱処理によって反応を停止させた後、3,000 rpm で 10 分間遠心し、その上清を Whatman の沓紙 (phosphocellulose paper P81) 上に滴下し、AGs 抗生物質を沓紙に吸着せしめ、無反応物は洗浄によって除去した。この沓紙の比活性を液体シンチレーションカウンターにより測定し、GM の不活化率を 100% として他の抗生物質の不活化率を算出した。

5. 薄層クロマトグラフィーによる AGs 抗生物質の不活化物の検出

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、6) 項に述べる SISO と AMK の不活化物の単離に際して、不活化の経

時的変化を観察するため、さらに他の抗生物質の不活化の状況を観察するために使用した。熱処理によって酵素反応を停止させた反応液を、8,000 rpm 10 分間の遠心により上清を分離し、その上清を薄層上にスポットした。展開溶媒は、KM と LVDM には MeOH : CHCl₃ : NH₄OH (4 : 1 : 3), SISO と NTL には MeOH : NH₄OH (3 : 1), AMK には BuOH : EtOH : CHCl₃ : NH₄OH (4 : 5 : 2 : 8) を用いた。なお、不活化物の検出はヨード法で行なった。

6. SISO および AMK の不活化物の単離とそれらの修飾部位の同定

MS 353 (pTU 053) 株から調製した酵素液による SISO と AMK の不活化物を単離するには、それぞれの薬剤の 100 mg を基質とし、ATP のみを添加した反応系と、ATP+coenzyme A (CoA) を添加した反応系のそれぞれについて行なった。このような反応系によって得られた材料は、その後イオン交換樹脂 (CG-50 Type I) への吸着、NH₄OH による流出、流出物の濃縮、凍結乾燥の操作を順次実施した。得られた不活化物は、さらにシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによって再分離と精製を行なった。そして、精製物について、CMR スペクトル、PMR スペクトルの解析を行ない、被験抗生物質の化学構造上の修飾部位が決定された。

7. アフィニティークロマトグラフィーによる酵素の精製

CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) にリガンドとして SISO をカップリングさせるには、UMEZAWA ら⁴⁾の方法に準じた。そして準備したカラムには、最初に 10 ml (蛋白量: 50 mg/ml) の酵素液を添加して、酵素をリガンドに結合させ、続いてリガンドに結合しない蛋白を溶出用 buffer (10 mM tris·HCl, 10 mM KCl, 10 mM Mg(CH₃COO)₂·4 H₂O, 6 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol, pH 6.8) で十分に洗い流した。その後 0.1M から 1M までの KCl を含む溶出用 buffer のグラディエントにより、リガンドに結合した酵素を分画した。

II. 結 果

1. 抽出した酵素による AGs 抗生物質の不活化

MS 353 (pTU 053) 株および MS 353 (pTU 068) 株から抽出した酵素液を用いて、AGs 抗生物質の不活化率について調べた成績を Table 2 に示す。[γ - 32 P]-ATP の取り込みを示標とする被験薬のリン酸化は、両菌株から抽出されたそれぞれの酵素液でともに認められ、GM のリン酸化による不活化率を 100% として他の薬剤の不活化率を算出すると、表の phosphotransferase activity

Table 2 Aminoglycoside-modifying activities of enzymes isolated from gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* strains MS 353 (pTU 053) and MS 353 (pTU 068)

Substrate	Phosphotransferase activity (%)		Acetyltransferase activity (%)	
	MS 353 (pTU 053)	MS 353 (pTU 068)	MS 353 (pTU 053)	MS 353 (pTU 068)
Gentamicin	100	100	100	100
Lividomycin	100	0	0	0
Kanamycin A	84	64	91	95
Amikacin	53	39	77	80
Netilmicin	94	86	90	85
Sisomicin	107	105	107	101
Tobramycin	67	70	55	46
Dibekacin	80	79	85	92

The results of enzymatic modification of gentamicin are set at 100%

の欄に示した成績が得られた。すなわち、被験薬のリン酸化は両酵素液でほぼ同じような比率で認められるが、AMK の場合は他の薬剤に比べてやや低い傾向が認められた。また、MS 353 (pTU 053) 株から抽出した酵素液では LVDM のリン酸化がみられるが、MS 353 (pTU 068) 株からの酵素液には LVDM のリン酸化は認められなかった。ちなみに、TLC によって不活化物の Rf 値を調べた際にも、MS 353 (pTU 053) 株からの酵素液では LVDM のリン酸化物のスポットが認められ、MS 353 (pTU 068) 株からの酵素液によっては不活化物に相当するスポットは見出せなかった。

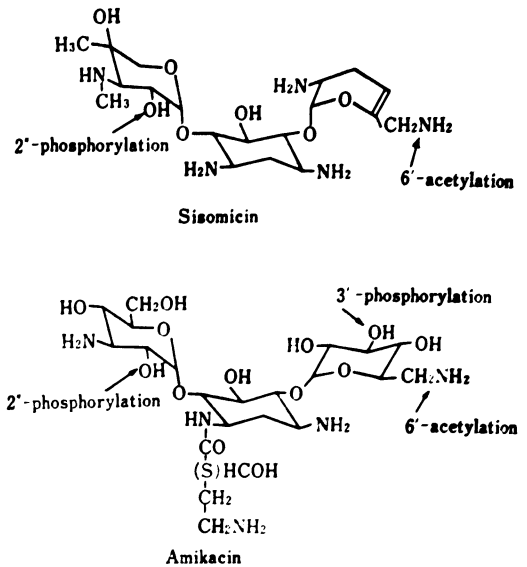
[¹⁴C]-acetic acid を用いて、AGs 抗生物質のアセチル化を測定した成績は、Table 2 の右側の acetyltransferase activity の欄に示したが、いずれの菌株から抽出した酵素液によっても、LVDM を除くすべての被験薬のアセチル化が認められた。それらのアセチル化による不活化率は、GM や SISO で高く TOB ではその約 1/2 という成績であった。

なお、[α-¹⁴C]-ATP を用いたアデニル化に関する実験では、両酵素液には共にアデニル化の活性は認められなかった。

2. 不活化された SISO ならびに AMK の構造決定

MS 353 (pTU 053) 株から抽出した酵素液を用いて得られた SISO と AMK の不活化物を、CMR および PMR スペクトルの解析によって構造決定した結果、Fig. 1 に示した不活化酵素の修飾部位が明らかにされた。酵素反応系に ATP のみを添加した際に得られた SISO の不活化物には 2' 位の水酸基がリン酸化されたもののみが認められ、酵素反応系に ATP と CoA を添加

Fig. 1 The structure of the sisomicin and amikacin. The arrows indicate the sites where these antibiotics are enzymatically modified by N-acetylation and O-phosphorylation



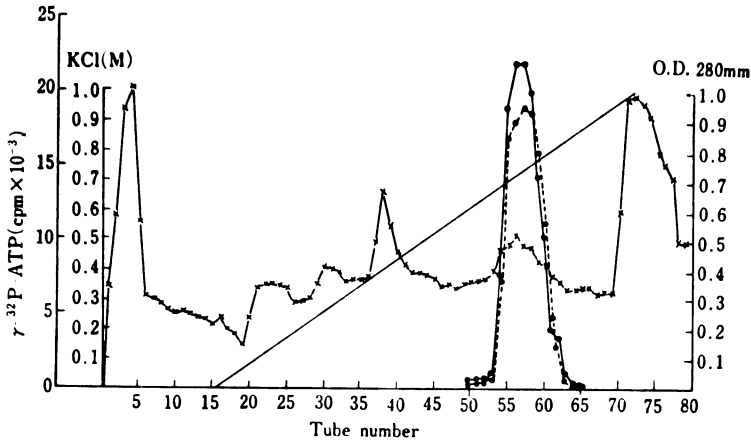
して得られた SISO の不活化物には、2' 位の水酸基のリン酸化と同時に 6' 位のアミノ基がアセチル化された物質が見出された。

一方、ATP を添加した際に得られた AMK の不活化物には、Fig. 1 に示した AMK の 2' 位と 3' 位の水酸基がそれぞれ別々にリン酸化されている物質がほぼ 3:1 の割合で認められた。その他に、6' 位のアミノ基がアセチル化されている物質が 2' 位のリン酸化物とはほぼ同量見出された。酵素反応系に ATP と CoA を添加した場合に得られた AMK の不活化物は、その大部分が 6' 位のアミノ基がアセチル化された物質であり、ごく微量のリン酸化物が含まれていた。

なお、これら不活化物の構造解析についての詳細は、本論文と同一著者らにより別に発表する予定である (J. Antibiotics 投稿予定)。

上述の結果を踏まえて、MS 353 (pTU 053) 株と MS 353 (pTU 068) 株からのそれぞれの酵素液について、さらに NTL, KM, LVDM および Butirosin を基質とした際の不活化状況を TLC によって検討した。NTL を基質とした場合には、両方の酵素液によってともにリン酸化とアセチル化に由来すると思われる 2 つのスポットが明瞭に認められた。KM でもリン酸化およびアセチル化された不活化物のスポットが認められたが、対照として用いた MS 353 (pTU 512) 株からの酵素液によつては、リン酸化された物質のスポットのみが認められ

Fig. 2 Elution pattern of phosphotransferase from *Staphylococcus aureus* MS 353 (pTU 053) on CNBr-activated sepharose 4 B (immobilized sisomicin). Symbols: (●—●) Kanamycin phosphorylating activity; (○—○) Sisomicin phosphorylating activity; (×—×) Absorbance at 280 nm; (—) Gradient of KCl. The experiment was performed with a gradient of KCl in the following buffer: 10 mM tris hydrochloride, 10 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 10 mM KCl, 6 mM β -mercaptoethanol, and 10% glycerol, pH 6.8



た。LVDM では、対照とした MS 353 (pTU 512) 株および MS 353 (pTU 053) 株からの酵素液によるのミノシリン酸化物のスポットが認められた。なお、Butirosin においても LVDM と同様の成績が得られている。

3. アフィニティークロマトグラフィーによる酵素の精製

方法の 7) に従って、SISO-sepharose 4 B のカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、MS 353 (pTU 053) 株からの粗酵素液を溶出させた際の成績のうち、SISO と KM のリン酸化酵素の溶出状況についての成績を Fig. 2 に示す。各分画について、それぞれのリン酸化およびアセチル化の活性を調べたが、KCl の濃度が 0.6M から 0.7M の間分画で最も活性の高い酵素の溶出が認められた。そして、SISO および KM に対する酵素活性のピークは、いずれも同じ分画部分において認められた。なお、SISO と KM のアセチル化についての成績は、リン酸化の場合と同じ分画に酵素活性のピーク位置が認められたので略した。

この酵素活性の最も高い分画部分を、アクリルアミドゲル電気泳動により調べると、分子量 100,000 前後から 20,000 程度のもので 10 本以上の蛋白がバンドとして検出された。

4. 酵素活性の至適 pH

pH を種々に調製した 0.1M リン酸 buffer (pH 5.0~pH 8.0) と 0.1M tris-HCl buffer (pH 7.5~pH 9.0)

Fig. 3 Optimal pH for the sisomicin inactivation reaction. The reaction mixture consisted of 0.3 ml of the partially purified enzyme from *Staphylococcus aureus* MS 353 (pTU 053), 0.1 ml of 1 mM sisomicin, 0.1 ml of 40 mM ATP and 0.5 ml of each buffer solution containing 60 mM KCl, 10 mM $Mg(CH_3COO)_2$ and 6mM 2-mercaptoethanol. After incubation of the mixture for 30 min at 37 C, residual potency of sisomicin was determined by bioassay. Symbols: (○) 0.1 M phosphate buffer; (×) 0.1 M tris-hydrochloride buffer.

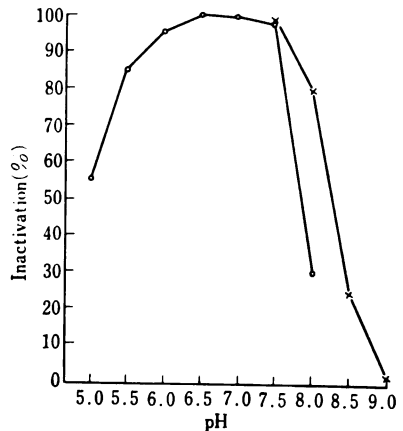
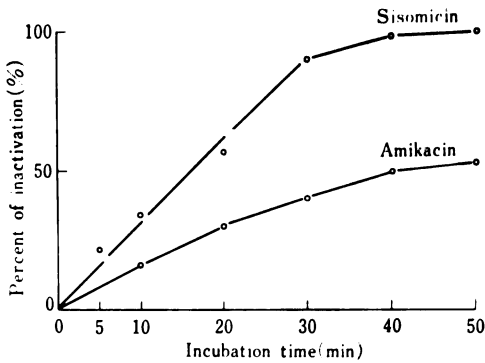


Fig. 4 Kinetics of phosphorylation of sisomicin and amikacin by a partially purified enzyme from *Staphylococcus aureus* MS 353 (pTU 053). The reaction mixture consisted of 30 μ l of enzyme solution, 10 μ l of 1 mM antibiotics, 1 μ Ci of [γ - 32 P]-ATP and 50 μ l of 0.1 M TMK buffer (pH 6.8). The reaction was carried out at 30°C.



を作製し、アフィニティークロマトグラフィーによって部分精製した MS 353 (pTU 053) 株からの酵素液を用いて、酵素活性の至適 pH を検討した。実験では SISO を基質としてリン酸化ならびにアセチル化による不活化を測定したが、両活性ともほぼ同様の結果を示したので、Fig. 3 にはリン酸化における成績のみを示した。酵素活性は pH6.5 で最も高く、酸性側あるいはアルカリ側に傾くに従って徐々に低下し、pH5.5 以下および pH8.0 以上では酵素活性の急速な低下がみられた。

5. SISO ならびに AMK のリン酸化の経時的変化

結果の 1) に述べたように、基質として用いた AGs 抗生物質の種類によっては、その不活化率の値に多少差が認められたが、その中で特に AMK のリン酸化率の低い点が注目された。このことから、アフィニティークロマトグラフィーによって部分精製した MS 353 (pTU 053) 株からの酵素液を用い、SISO と AMK のリン酸化についてその経時的な変化を検討した。Fig. 4 に結果を示したが、反応開始後 50 分における [γ - 32 P]-ATP の取り込みを 100% として SISO のリン酸化率を算出すると、反応開始後 30~40 分の間で SISO のリン酸化は stationary の状態となるのに対し、AMK は徐々にリン酸化され反応開始後 50 分においてもそのリン酸化率は SISO の約 1/2 であった。

III. 考 察

1976 年 BROWN⁵⁾ ならびに SHANNON ら⁶⁾ は、GM に耐性を示すブドウ球菌からの酵素液に、GM や TOB などアセチル化あるいはリン酸化する活性のあることを

指摘した。また、同じ年に、LeGoffic ら⁷⁾ によっては上述とは別のブドウ球菌が、TOB の 4' 位の水酸基をアデニル化するという報告もなされている。以来、ブドウ球菌の GM 耐性機構に関しては、さらに種々の報告⁸⁻¹²⁾ がなされているが、それらの成績の中で著者らが一般的に理解していたのは、GM 耐性のブドウ球菌から抽出した酵素液には主として 6' 位のアミノ基のアセチル化と 2' 位の水酸基のリン酸化とが認められるとする成績である。

しかしながら、上述した報告に用いられている菌株は、すべて欧米で分離されたものであり、本邦で分離され始めた GM 耐性のブドウ球菌の耐性機構が、欧米のそれと同一のものなのか否かということは、疫学上大変重要なことであると考えられた。このようなことから、著者らは臨床材料から分離された GM 耐性のブドウ球菌を用いて、今回の実験を行なったものである。すなわち、複数のプラスミドの混在を避けるため、第 2 編¹⁾ で報告したような GM 耐性の導入株をあらかじめ作製して、それらの耐性導入株の中から、KM, LVDM, Butirosin, GM, SISO, DKB, TOB, AMK および NTL に耐性を示す MS 353 (pTU 053) 株と KM, GM, SISO, DKB, TOB, AMK, NTL には耐性を示すが LVDM と Butirosin には感性である MS 353 (pTU 068) 株を主として実験に用いた。

その結果、前者の株から抽出した酵素液には 6' 位のアミノ基のアセチル転移酵素と 2' 位の水酸基のリン酸転移酵素に加えて、3' 位の水酸基のリン酸転移酵素の活性が見出されたが、その成績の中でいくつかの注目された点がある。その第 1 は、酵素の反応系に ATP と CoA を添加して SISO の不活化物を得た際に、その不活化物は 6' 位のアミノ基のアセチル化と 2' 位の水酸基のリン酸化とが同時に認められる不活化物であったことである。この事実は、6' 位のアミノ基と 2' 位の水酸基の修飾が単一の酵素で起り得る可能性を示唆した LeGoffic¹³⁾ の説明を支持するとも思えるが、しかしながら、著者らがアフィニティークロマトグラフィーによって酵素の分離を試みた限りでは、酵素活性の最も高い分画においても依然として分子量の異なる蛋白のバンドが 10 本以上認められており、単一の酵素がアセチル化とリン酸化の両方の活性を有していると断定するためには、さらに別の実験的手法によって明らかにされるべき問題ではないかと考えられた。注目された点の第 2 は、CMR および PMR スペクトルによって AMK の不活化物を解析した際に、2' 位の水酸基のリン酸化物の方が 3' 位の水酸基のリン酸化物よりも量的に 3 倍近く認められたことである。グラム陰性桿菌における AMK や NTL の不

活 化の研究では、2-deoxystreptamine の1位のアミノ基がこのように置換された薬剤では、3'位の水酸基のリン酸化や2'位の水酸基のアデニル化あるいはリン酸化は起らないものとされており¹⁴⁾、2'位の水酸基のリン酸化はブドウ球菌の酵素における一つの特徴ではないかとも想像された。第3の点は AMK の3'位の水酸基のリン酸化に関するものである。このことに関しては、既に COURVALIN ら¹⁵⁾が指摘しているところであるが、ブドウ球菌の3'位の水酸基のリン酸転移酵素によってAMKのリン酸化も高率で認められるにもかかわらず、MICは高くないという現象である。著者らがSISOとAMKの不活化物を得るために用いた酵素液では、LVDMとButirosinのリン酸化もみられることから、3'位の水酸基のリン酸転移酵素も含まれていることは明らかであり、このようにAMKの3'位の水酸基をリン酸化することのできるブドウ球菌のこの酵素は、厳密にいうならば、3'位の水酸基をリン酸化するグラム陰性桿菌の3種類の酵素とは区別されるべきではないかと考えられた。

もう一つのMS 353 (pTU 068) 株から抽出された酵素液には、LVDMとButirosinを除く被験薬のすべてをリン酸化あるいはアセチル化する酵素活性が見出された。それらの酵素は、基質特異性から6'位のアミノ基のアセチル転移酵素と2'位の水酸基のリン酸転移酵素であることが示唆されたが、それらの酵素が同一のものであるのか否かについては、先に述べた菌株の場合と同様に将来に残された問題である。

次に、AMKやNTLの場合、果してどの部位が修飾されると感性菌と耐性菌のMICの上で差が認められるようになるのかという問題について触れてみたい。本編の実験において、対照として用いたGM感性、KM、LVDM、Butirosin耐性であるMS 353 (pTU 512) 株においても、AMKの3'位の水酸基のリン酸化が認められたが、この菌のAMKに対するMICは0.78 µg/mlであり、いわゆるAMK感性菌であった。したがって、AMKの場合、3'位の水酸基のリン酸化はMICにはほとんど影響を及ぼさないものと思われる。残る2つの修飾部位のうち、AMKでは6'位のアミノ基のアセチル化の方が下記のような理由によって容易に起ることが推定された。すなわち、AMKの不活化物をCMRおよびPMRスペクトルによって解析した際に、ATPのみの添加でも6'位のアミノ基のアセチル化がみられた点である。この原因の一つには、その後の検討の結果、抽出した酵素液を透析して用いなかったための菌体内からのCoAの持ち込みがあったと考えられるが、いずれにしても大量のATP存在下でもリン酸化よりもアセチル化

の方が効率的に行なわれていることが示唆された。これらのことから推定すると、著者らが分離したGM耐性菌のAMKに対する12.5 µg/ml前後のMICは、6'位のアミノ基のアセチル化を反映しているのではないかと推察された。将来、菌体内target siteへの薬物の取り込みに関して、酵素との関連においてさらに動的な解析が必要であることを痛感した。

以上、第1編から第3編にわたって、本邦で分離されたGM耐性のブドウ球菌について検討した成績を述べてきた。これらの報告の中で明らかにしたことは、薬剤の不活化の機構の上では欧米の成績とはほぼ同じであるとしても、検出されたプラスミドの大きさや、AGs抗生物質以外の薬剤との連関導入などに関しては、やや異っているようにも考えられたことである。また、第2編で述べたプラスミドの相同性に関して、用いたプラスミドのひとつであるpTU 512は、かつて著者らが分離したKM耐性のブドウ球菌に由来するもので、PCG-EM-KM耐性が支配されており、もう一つのpTU 053は今回のGM耐性のブドウ球菌由来のもので、PCG-EM-KM-GM耐性が支配されているものである。これらのプラスミドのDNA鎖は、その大部分がhomogeneousであったことは、既に第2編²⁾で述べたとおりであるが、本編で述べてきた酵素の解析によっても、前者のプラスミドには3'位の水酸基のリン酸転移酵素が支配されており、後者のプラスミドではそれに加えて6'位のアミノ基のアセチル転移酵素と2'位の水酸基のリン酸転移酵素とが支配されていることが明らかとなった。これらのことから、pTU 053は先に分離されたpTU 512のDNA鎖にGM耐性を支配するDNA鎖が部分的に挿入されたものではないかということが強く示唆された。もちろん、臨床分離株の中にはpTU 068のようなGM耐性のみを支配する遺伝子が存在しているプラスミドを有する菌株も認められるが、上述したpTU 053のようなプラスミドの存在は、ブドウ球菌の多剤耐性化を考えるうえで一つの重要な示唆を与えてくれるものと思われる。

文 献

- 1) 紺野昌俊, 生方公子, 高橋洋子, 佐々木有字子, 川上小夜子: 本邦で分離されたゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌について, 第1編, 臨床検査材料からのゲンタマイシン耐性菌の分離頻度と薬剤感受性ならびにファージ型について. *Chemotherapy* 30: 86~95, 1982
- 2) 生方公子, 紺野昌俊, 同上, 第2編, ゲンタマイシン耐性の黄色ブドウ球菌から誘発したファージによる薬剤耐性の導入とプラスミドの解析. *Chemotherapy* 30: 96~103, 1982
- 3) HAAS, M. J. & J. E. DOWDING: Aminoglycoside

- modifying enzymes. *Methods Enzymol.* 43: 611~628, 1975
- 4) UMEZAWA, H.; H. YAMAMOTO, M. YAGISAWA, S. KONDO, T. TAKEUCHI & Y. A. CHABBERT: Kanamycin phosphotransferase I: Mechanism of cross resistance between kanamycin and lividomycin. *J. of Antibiotics* 26: 407~411, 1973
 - 5) BROWN, D. F. J.; F. K. KAYSER & J. BIBER: Gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* ii: 419, 1976
 - 6) SHANNON, K. P. & I. PHILLIPS: Gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* ii: 580~581, 1976
 - 7) LE GOFFIC, F.; A. MARTEL, M. L. CAPMAU, B. BACA, P. GOEBEL, H. CHARDON, C. J. SOUSSY, J. DUVAL & D. H. BOUANCHAUD: New plasmid-mediated nucleotidylation of aminoglycoside antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 258~264, 1976
 - 8) DOWDING, J. E.: Mechanisms of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 47~50, 1977
 - 9) LE GOFFIC, F.; A. MARTEL, N. MOREAU, M. L. CAPMAU, C. J. SOUSSY & J. DUVAL: 2''-O-phosphorylation of gentamicin components by a *Staphylococcus aureus* strain carrying a plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 26~30, 1977
 - 10) VOGEL, L.; C. NATHAN, H. M. SWEENEY, S. A. KABINS & S. COHEN: Infections due to gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in a nursery for neonatal infants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 466~472, 1978
 - 11) KAWABE, H.; H. NAGANAWA, S. KONDO, H. UMEZAWA & S. MITSUHASHI: New plasmid-mediated phosphorylation of gentamicin C in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* 22: 515~521, 1978
 - 12) SCOTT, D. F.; D. O. WOOD, G. H. BROWNELL, M. J. CARTER & G. K. BEST: Aminoglycoside modification by gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 641~644, 1978
 - 13) LE GOFFIC, F.: The resistance of *S. aureus* to aminoglycoside antibiotics and pristinamycins in France in 1976~1977. *J. of Antibiotics* 30: 286~291, 1977
 - 14) 三橋 進編: 薬剤耐性機構の生化学。3. アミノ配糖体の耐性機構 (近藤信一), 27~58 頁, 学会出版センター, 1981
 - 15) COURVALIN, P.; J. DAVIES: Plasmid-mediated aminoglycoside phosphotransferase of broad substrate range that phosphorylates amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 619~624, 1977

GENTAMICIN RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS ISOLATED IN JAPAN

PART 3: MECHANISMS OF GENTAMICIN RESISTANCE IN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

KIMIKO UBUKATA and MASATOSHI KONNO

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Teikyo University

KUNIKATSU SHIRAHATA and TAKAO IIDA

Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

Two transductant strains, MS 353 (pTU 053) and MS 353 (pTU 068), derived from *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin and other aminoglycosides have been examined for antibiotic modifying enzymes. From the analysis of substrate profiles and inactivated products of sisomicin and amikacin, it was found that MS 353 (pTU 053) strain is containing three enzymes mediating aminoglycoside resistance, 6'-N-acetyltransferase, 3'-phosphotransferase and 2''-phosphotransferase. Also, two enzymes mediating gentamicin resistance, 6'-N-acetyltransferase and 2''-phosphotransferase, were contained in an extract from MS 353 (pTU 068) strain. The optimal pH of acetyltransferase and phosphotransferase activities for sisomicin was near pH 6.5. The enzymatic phosphorylation of sisomicin by a partially purified enzyme solution from MS 353 (pTU 053) strain occurred at a higher rate than that of amikacin.