

生菌によるストレプトマイシン不活化酵素活性簡便測定法と その臨床分離 *P. aeruginosa* への応用

河野 恵・小原康治・佐藤 郁・大宮敬一
東京薬科大学第二微生物学教室

(昭和60年10月21日受付)

臨床分離ストレプトマイシン (SM) 耐性株の SM 不活化酵素活性測定には、粗酵素液を用いたアミノグリコシド (AG) 修飾酵素活性測定法が用いられている。本研究では、AG-3''-フォスフォトランスフェラーゼ [APH(3'')] 産生菌 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) K-Ps 94 株を用いて生菌による SM 不活化酵素の測定を可能としたことについて述べる。また、本反応を利用した SM 不活化酵素活性簡便測定法の至適条件の検討を行なった結果、その反応 pH は 7.8~8.4、ATP 濃度は 32 mM であり、反応温度は 45°C であった。さらに、本簡便法を臨床分離 SM 耐性 *P. aeruginosa* に適用したところ、APH 産生株に対して本法が有用であることが実証された。

臨床分離株におけるアミノグリコシド (AG) 耐性機構の一つとして AG 不活化酵素による AG 不活化が知られている^{1,2)}。1965年にR因子をもつ4剤(クロラムフェニコール (CP), テトラサイクリン, ジヒドロストレプトマイシン (DSM), サルファ剤), 耐性大腸菌の細胞抽出液中に DSM 不活化酵素活性³⁾が発見されて以来、現在まで20数種のAG修飾酵素が知られている^{4,5)}。しかし、AG耐性菌は、他のペニシリンやCP耐性菌と異なり、生菌状態ではAGの抗菌力を消失させない。このためAG耐性菌の修飾酵素活性測定は、菌体を破砕し、その遠心上清(粗酵素液)を用いて行なわれている⁶⁻⁸⁾。

この論文では、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) K-Ps 94 株を用いてその生菌状態下での SM 不活化酵素活性測定法の基礎的検討を行ない、その測定条件を決定するとともに、本簡便法の臨床分離株への適用性について検討した。

I. 材料と方法

使用菌株: SM リン酸化酵素産生菌として当研究室保存株である SM 高度耐性 *P. aeruginosa* K-Ps 94 株^{9,10)}を用いた。本株による SM リン酸化物は日本薬学会主催・第4回微生物をめぐる分子生物学とその薬学領域における応用面シンポジウム(講演要旨集, 11-14, 1978: 八王子)で発表されていた *P. putida* K-Ps 45 株¹⁰⁾の SM-3''-リン酸化物と薄層クロマトグラフィーの Rf 値が一致した。このことから、K-Ps 94 株が APH

(3'') 産生株であると決定した。

適用性の検討には、臨床分離された *P. aeruginosa* 200 株のうち SM に耐性を示した株を用いた。

使用培地: 細菌の増殖には、普通液体培地 (NB: 栄研) および普通寒天培地 (NA: 栄研) を用いた。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定には、ミューラーヒントン (MH) 培地および MH 寒天培地 (BBL 社) を用いた。

試薬および抗生物質: アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) は、ATP·2Na (和光純薬) を用いた。アルカリ性フォスファターゼ (E. C. 3.1.3.1.; 44 units/mg; ALP) およびフォスフォジエステラーゼ (E. C. 3.1.4.1.; 0.022 units/mg; PDE) はシグマ社のものを用いた。SM は SM sulfate (シグマ社) を用いた。

生菌による SM 不活化反応: 600 nm における吸光度 (OD 600 nm) 0.7 の培養液 5 ml を遠心集菌 (4,000×g, 15 分) し、この菌体を TMK 溶液 (100 mM トリス・塩酸緩衝液, 60 mM 塩化カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 6 mM 2-メルカプトエタノール, pH 7.8)^{7,12)} で洗浄後、同溶液 0.5 ml に懸濁し、20 μM SM, 16 mM ATP 下で 37°C にて反応させた。

反応液中の SM 抗菌活性は検定菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を用いた微生物検定で測定した。

タンパク質の定量: タンパク質の定量は Lowry らの方法¹³⁾を用いて行なった。

SM 不活化酵素の局存性: 対数増殖期の菌体 100 ml を New らの方法¹⁴⁾を用いてオスモティック・ショック処理し、各分画の SM 不活化酵素活性を測定した^{2,10)}。

Table 1 Isolation of SM-inactivating enzymes by osmotic shock

Fraction	Relative activities of SM-inactivation (%)
	K-Ps94
1. Whole culture	0
2. Sup.* of fraction 1.	0
3. Washed buffer of cells	4
4. Sucrose-EDTA solution	51
5. Cold water**	100
6. Shocked cells in water	11
7. Sup. of sonicated cells	14
8. Cell debris	0

* Supernatant.

** Periplasmic enzyme fraction.

MIC の測定：日本化学療法学会標準法¹⁵⁾ に準じて測定した。

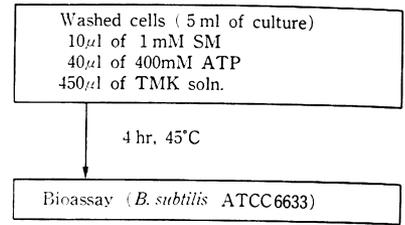
臨床分離株の産生する SM 不活化酵素の判定：SM 耐性株について超音波破碎上清の粗酵素液を用いた従来法¹²⁾による SM 不活化反応を行ない、抗菌力の変化を微生物検定で測定した。そして、SM の抗菌力が低下した株を SM 不活化酵素産生株と判定した。また、SM 不活化酵素産生株については、SM を完全に不活化させた後 100°C、5 分間加熱した。そして、遠心上清に ALP 2 μl (0.1 unit)、または PDE (1 m units) を加えて 37°C、24 時間反応後、抗菌活性が戻った株をそれぞれ APH 産生株、AAD 産生株と判定した。

II. 結 果

生菌による SM 不活化反応：K-Ps94 株の培養液 1 ml に新たに NB 9 ml および最終濃度 50 μg/ml の SM を加えて 37°C、24 時間培養したところ、菌の増殖は認められたが、SM の抗菌力は消失しなかった。また、これらの菌株の培養液 (OD 0.7) 5 ml を集菌し、TMK 溶液 500 μl に懸濁して SM (20 μM) を加えて 37°C、24 時間反応させたが、SM は不活化しなかった。しかしながら、K-Ps94 株の生菌と ATP とを用いて、SM 不活化反応を行なった結果、SM を完全に不活化した。次いで、この不活化酵素の局在性について検討した。その結果、K-Ps94 株のオスモティック・ショックによる各分画中の SM 不活化酵素活性は、Table 1 に示したとおり蔗糖-EDTA 溶液および冷水分画に見出され、後者は最も強い活性を示した。この結果より K-Ps94 株の APH は細胞間隙酵素であることが分かった。

生菌を用いた SM リン酸化酵素活性簡便測定法に関する至適反応条件の検討：OD 0.7 の培養液の使用菌量や、TMK 溶液組成、ATP 濃度および反応温度や pH、

Fig. 1 Optimum conditions of SM-inactivation with living cells

Table 2 SM-inactivation with living cells of clinically isolated SM resistant *P. aeruginosa*

No. of strains	SM-inactivation with		
	Crude extract	Living cells	
		+	-
13	+ (APH)*	13** (100)***	0 (0)
28 (24) (4)	+ (AAD)*	4 (17)	20 (83)
	+ (unknown)	1 (25)	3 (75)
4	-	0 (0)	4 (100)

* Determined by the treatment with phosphatase alkaline or phosphodiesterase.

** No. of strains.

*** Percentage.

反応時間などについて種々検討した結果、Fig. 1 に示すような系が最適不活化反応条件であることが分かった。

平板コロニーを用いた SM 不活化反応：反応液 150 μl (SM 最終濃度：10 μM) に平板コロニー 1 エーゼ分を懸濁し、30 分間反応させた。1 エーゼ分とは OD 0.7 の菌液に換算し約 5 ml に相当している。その結果、SM を明確に不活化した。

臨床分離株への応用：臨床分離 *P. aeruginosa* の SM に対する MIC の測定結果から MIC 800 μg/ml 以上を示した 45 株を SM 耐性菌として以下の実験に用いた。SM 耐性と判定された 45 株の内訳は、APH 産生株 13 株、AAD 産生菌 24 株、不活化した SM が ALI でも PDE でも再活性化しない不活化酵素の種別不明のもの 4 株、従来法によっても SM 不活化を認めなかった不活化酵素非産生株の 4 株であった。これらのうち、APH 産生株については本簡便法によっても 13 株すべて (100%) が SM 不活化酵素産生株と判定された。また、本簡便法によって AAD 産生菌や不活化機構不明の菌のうち SM 不活化酵素産生株と判定されたのは、各々 24 株中 4 株 (17%)、4 株中 1 株 (25%) であった。一方、SM 不活化酵素非産生菌ではすべて不活化は観察されなかった (Table 2)。

III. 考 察

AG 耐性機構の一つとして AG 修飾酵素による抗菌力の不活性化が知られているが、AG 耐性菌は生菌状態では薬剤の抗菌力を消失させないため、AG 修飾酵素活性の測定は、これまで粗酵素液標品で行なっていた。

グラム陰性菌の SM 不活化酵素は、菌体の細胞間隙あるいは細胞内膜上に存在しており、細胞外膜や細胞壁のマトリックスを通して細胞間隙に達した SM を、細胞内膜を通過する以前に不活化する^{1,16)} か、または菌体内で不活化する^{4,17)} と考えられている。本研究に用いられた K-Ps 94 株の SM リン酸化酵素も細胞間隙酵素であることが明らかとされた。しかし、これらの SM 耐性菌は、SM を含む培養液中で増殖しても、培養液中の SM の抗菌活性を低下させなかった。

本研究で我々は、菌体を濃縮洗浄し、ATP を加えることによって、菌体の破碎処理を行なうことなく SM を不活化させることができた。

データは示していないが、不活化反応時には溶菌などによる SM リン酸化酵素の菌体外への遊離はなく、SM のリン酸化は菌体内（細胞外膜の内側）で行なわれていることが分かった。また、リン酸化された SM は反応上清から検出された。ATP を加えた反応系では、加えない系に比較して反応上清の漏出タンパク質の量が

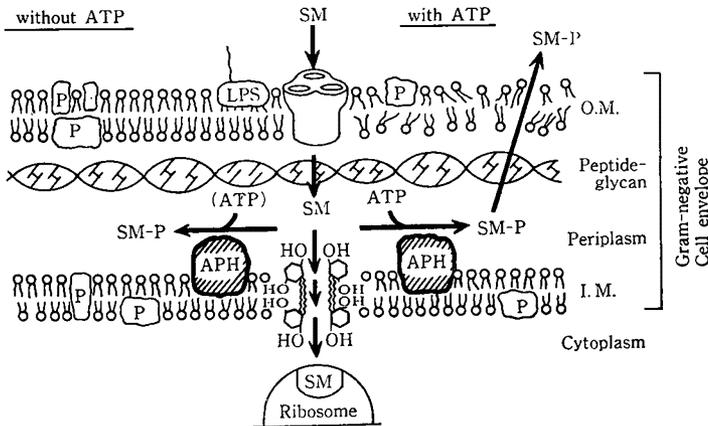
多く、ATP の存在により菌体の膜透過に変化を生じていることが示唆された。

したがって、いままでに膜構造¹⁸⁾ と SM 耐性機構^{14,19)} の関係がいろいろ考察されているが、本反応系においては、SM が外膜を透過し、その SM が細胞間隙部分で ATP 存在下でリン酸化され、そのリン酸化 SM が ATP 処理で外膜変化をきたしている部分から菌体外へ漏れ出すことにより (Fig. 2)、通常の状態では観察されない SM の不活化が、本簡便法で測定可能になったものと考えられる。

反応における諸条件の検討の際には、反応途中の抗菌力の変化を見るために SM 初濃度を 20 μM としたが、SM 初濃度を 5 μM とすれば 2 時間で抗菌力が消失していた。このことから、不活化の有無だけを定性的に見るのであれば 20 μM よりも低濃度で反応を開始した方がより早く判定できるものと考えられる。

また、本簡便法を、臨床分離 SM 耐性 *P. aeruginosa* に対して適用したところ、それらのうち APH 産生株に対して、本法が有用であることが実証された。本簡便法は、従来法に比べて操作も簡単のため、所要日数を大幅に短縮でき、また超音波破碎機や超遠心機といった特殊な機器を必要としない。したがって、臨床検査室などで多数の菌株についてその産生する SM 不活化酵素活性を測定する際に有用であると考えられる。

Fig. 2 Schematic diagram of SM-phosphorylation with living cells



- SM : Streptomycin
 SM-P : Streptomycin phosphate
 APH : Aminoglycoside phosphotransferase
 LPS : Lipopolysaccharide
 P : Protein
 O. M. : Outer membrane
 I. M. : Inner membrane

今後、この測定法が他の AG 修飾酵素産生株へも適用されることにより、臨床での薬剤選択や、新抗生剤開発への応用が期待される。

(謝辞) 実験に協力していただいた、泉屋彰彦氏に感謝します。

文 献

- 1) BRYAN, L. E.: Mechanism of plasmid mediated drug resistance. Academic Press, New York, Plasmids and Transposons (STUTTARD, C. and K. R. ROZEE), pp. 57~81, 1980
- 2) MITSUHASHI, S.; F. KOBAYASHI, M. YAMAGUCHI, K. O'HARA & M. KONO: Enzymatic inactivation of aminoglycoside antibiotics by resistant strains of bacteria. Czechoslovak Medical Press, Prague, Bacterial plasmids and antibiotic resistance (KRCMERY, V., L. ROSIVAL and T. WATANABE), pp. 337~341, 1971
- 3) OKAMOTO, S. & Y. SUZUKI: Chloramphenicol-, Dihydrostreptomycin-, and Kanamycin-Inactivating enzymes from multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome 'R'. Nature 208: 1301~1303, 1965
- 4) FOSTER, T. J.: Plasmid determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev. 47: 361~409, 1983
- 5) MOROHASHI, T.; M. TORIYA, S. YOKOIYAMA, K. FUJIMOTO & K. HAYANO: The acetylation of 6'-amino group of amikacin by a new enzyme prepared from *Serratia* sp.. J. Antibiot. 37: 1687~1691, 1984
- 6) KONO, M.; S. SEI & K. O'HARA: Prevalence of R-plasmid incapable of antibiotic(s) in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios Letters 4: 23~25, 1977
- 7) UMEZAWA, H.; M. OKANISHI, S. KONDO, K. HAMANA, R. UTAHARA, K. MAEDA & S. MITSUHASHI: Phosphorylative inactivation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. Science 157: 1559~1561, 1967
- 8) HASS, M. & J. D. DOWDING: Aminoglycoside-modifying enzymes. Academic Press, New York (J. H. HASS), pp. 611~628, 1975
- 9) KONO, M. & K. O'HARA: Mechanism of streptomycin(SM)-resistance of highly SM-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. J. Antibiot. 29: 169~175, 1976
- 10) KONO, M. & K. O'HARA: Prevalence of R factors in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 91: 191~194, 1975
- 11) KONO, M.; K. O'HARA, K. MAKINO, H. HAMASHIMA & M. SASATSU: R-plasmid from a clinical isolate *Pseudomonas putida* KPS 45. In Current chemotherapy and immunotherapy Proc. 12th Internat'l Congr. of Chemotherapy, pp. 208~210, 1981
- 12) O'HARA, K.; M. KONO & S. MITSUHASHI: Enzymatic inactivation of a new aminoglycoside antibiotics sisomicin, by resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 5: 558~561, 1974
- 13) LOWRY, O. H.; H. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
- 14) NEW, H. C. & J. CHOW: Release of surface enzyme in *Enterobacteriaceae* by osmotic shock. J. Bacteriol. 94: 1934~1945, 1967
- 15) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について (1968 年制定 1974 年改訂)。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 16) BRYAN, L. E. & S. KWAN: Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 835~845, 1983
- 17) PERLIN, M. H. & S. A. LERNER: Localization of an amikacin 3'-phosphotransferase in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 147: 320~325, 1981
- 18) NIKAIDO, H. & M. VAARA: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49: 1~32, 1985
- 19) BRYAN, L. E.: Aminoglycoside resistance. Academic Press, New York, Antimicrobial drug resistance (L. E. BRYAN), pp. 242~277, 1984

SIMPLE ASSAY FOR DETERMINING STREPTOMYCIN
INACTIVATION WITH INTACT CELLS OF
BACTERIA, AND ITS APPLICATIONS TO
P. AERUGINOSA CLINICALLY ISOLATED

MEGUMI KONO, KOJI O'HARA, KAORU SATO and KEIICHI OHMIYA

Department of Microbiology, Tokyo College of Pharmacy

Streptomycin(SM)-inactivating enzymes from SM-resistant strains in clinical isolates have been assayed by using crude enzyme solution. In this paper, SM was inactivated by ATP with living cells of *Pseudomonas aeruginosa* K-Ps 94 producing APH(3''). Optimum pH and ATP concentration of this reaction were 7.8~8.4 and 32 mM, respectively, and optimum temperature was 45°C. From the results of applications to *P. aeruginosa* clinically isolated, it was demonstrated that this simple method was useful for detection of SM-phosphotransferase-producing strains.