

臨床分離緑膿菌のホスホマイシン不活化酵素

小原康治・小竹次郎・大宮敬一・河野 恵

東京薬科大学第二微生物学教室*

(昭和 63 年 7 月 30 日受付)

日本における臨床分離緑膿菌 192 株におけるホスホマイシン (FOM) 感受性を調べ、FOM 高度耐性の 2 株 (T-75, T-92) が FOM 不活化酵素を持っていることを明らかとした。これらのうち T-75 株を用いて FOM 不活化酵素の性状を検討した。FOM 不活化酵素は細胞膜近傍に存在していることが示唆された。また、FOM 不活化酵素を 810 倍精製した。この酵素の分子量は Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーで 32 kd であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 11 kd であった。また、FOM 不活化反応の至適反応温度、pH および等電点は各々 25°C、pH 7.8、pI 5.4 であった。

Key words: 緑膿菌, Fosfomycin, 不活化酵素

FOM¹⁾ は細菌の細胞壁合成の初期段階の酵素 (UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase) に不可逆的に結合し細胞壁合成を阻害し²⁾、グラム陽性菌や *Serratia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Proteus* 属を含むグラム陰性菌に広い抗菌性を示す³⁾。

FOM 耐性に関しては高頻度で染色体性 FOM 耐性変異株が出現すること、およびその FOM 耐性機構が膜変化による FOM 透過阻害によることなどが報告されている^{4,5)}。そして、今までに *Serratia marcescens* におけるプラスミド性 FOM 耐性株^{6,7)} の FOM 耐性機構が研究されている^{8,9)}。その結果、11.8 キロベースのトランスポゾン Tn 2921^{10,11)} 上の FOM 耐性遺伝子から作られる 16 kd¹²⁾ ないし 18 kd⁷⁾ 蛋白による FOM 不活化反応において、補酵素の必要性が示唆されている^{13,14)}。しかしながら、FOM 不活化酵素の性状に関しては全く知られていない。

一方、緑膿菌の FOM 耐性に関しては、その感受性試験が行なわれ^{15,16)}、耐性株の存在が報告されているのみである³⁾。この論文では臨床分離緑膿菌の FOM 高度耐性株における FOM 不活化酵素の存在および精製 FOM 不活化酵素の酵素学的性状について述べる。

I. 材料と方法

使用菌株：臨床分離緑膿菌の 192 株を用いた。これらの内、T-75 株を FOM 不活化酵素産生株の代表として用いた。耐性伝達実験における受容菌には FOM 感受性株の緑膿菌 K-Ps 47 rif (K-Ps 47 のリファンピシン耐

性変異株)¹⁷⁾ を用いた。また、FOM 力価測定 of 微生物検定には *Proteus* sp. MB 838 を用いた。

使用培地：通常の場合は普通ブイオン培地 (NB)、普通ブイオン寒天培地 (NA, 栄研化学) を、最小発育阻止濃度 (MIC) の測定にはミューラーヒントン液体培地 (MB, BBL 社, USA) を用いた。微生物検定用培地は日本医薬品基準解説に従って調整した¹⁸⁾。

薬剤：ホスホマイシンナトリウム (FOM) は明治製菓株式会社の製品を使用した。

試薬の調製：TMK 溶液¹⁹⁾ は 100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.8, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 60 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol を用いた。

MIC の測定：MIC 2000 (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, Va., USA) を用いて行なった。すなわち、MB を用いて各菌を 37°C、一夜培養した。この培養液を MB で 10 倍希釈して、各薬剤濃度含有 MB 0.1 ml に 5 μl 接種した。37°C、18 時間培養後、菌の増殖を判定した。

粗抽出液の調製：NB 500 ml の 37°C、一夜培養液を用いて調製した¹⁹⁾。蛋白含量測定は Lowry らの方法²⁰⁾ により行なった。

FOM 不活化反応：生菌を用いた場合は、河野らの方法²¹⁾ に従って調製した菌体を TMK 溶液 0.36 ml に懸濁し、31.3 μg/ml FOM を 0.04 ml 加えて 0.4 ml 反応液とし、37°C、一夜反応させた。粗酵素液を用いた場合は、粗酵素液 0.18 ml に TMK 溶液 0.18 ml と 125

* 東京都八王子市堀之内 1432-1

$\mu\text{g/ml}$ FOM を 0.04 ml 加えて 0.4 ml 反応液とし, 37°C, 1 時間反応させた。いずれの場合においても, 100°C, 3 分加熱した遠心上清の FOM 抗菌活性を微生物検定した。

浸透圧ショック法による FOM 不活化酵素の存在位置の検討: 培養液 300 ml (OD, 600 nm, 0.7) を用いて NEU らの方法に準じて^{21,22)}行なった。そして, 各分画の FOM 不活化酵素活性とマイクロヨードメトリー法²³⁾による β -lactamase 活性とを測定した。FOM 不活化酵素活性は各分画に同量の K-Ps 47 rif の粗抽出液を加え, 最終 FOM 濃度 12.5 $\mu\text{g/ml}$ とし 37°C で 1 時間反応させ, 微生物検定により測定した。この反応系は, 部分精製 FOM 不活化酵素標品の活性測定に関しても用いられた。

FOM 不活化酵素の至適反応条件の検討: T-75 株の FOM 不活化酵素を用い検討した。至適 pH 測定には 0.1 M の酢酸緩衝液 (pH 4~6), リン酸緩衝液 (pH 6~8), Tris 緩衝液 (pH 7~10) を用い, 10 mM Mg (CH_3COO)₂, 60 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol とともに反応させた。

等電点電気泳動: 等電点は等電点電気泳動装置 FEB 3000 (ファルマシア) とファルマライト (pH 3~10, ファルマシア) を用いて行なった²⁴⁾。泳動後ゲルを 20 等分し試験管に入れ, TMK 溶液 0.3 ml を加え 4°C で一夜放置した。この液を用いて FOM 不活化反応を行なった。ゲル板の pH 測定は pl カリブレーションキット pH 3~10 (ファルマシア) をクマシーブルーで染色して行なった。

0.2% SDS-14% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE): HANCOCK らの方法²⁵⁾で行なった。分子量 (MW) 測定用マーカーとしては牛血清アルブミン (MW, 68 kd), オブアルブミン (MW, 45 kd), キモトリプシノーゲン (MW, 25 kd), チトクロム C (MW, 12.5 kd) を用いた。そして, MERRIL らの方法²⁶⁾ によって蛋白を銀染色した。

FOM 不活化酵素の精製: 硫安分画 (20, 40, 60%), DEAE-Sephadex A-50 (ファルマシア) と Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーおよび 14% PAGE により行なった。

II. 結 果

日本で分離された臨床分離緑膿菌 192 株について FOM 感受性を調べたところ, FOM 耐性 (MIC 800 $\mu\text{g/ml}$ 以上) の 14 株 (7.3%) が見出された (Fig. 1)。そして, これら耐性株に関して生菌および粗抽出液を調整し, FOM 不活化について検討したところ, 粗抽出液を用いた場合に高度耐性 (MIC: $\geq 12,800 \mu\text{g/ml}$) の T-

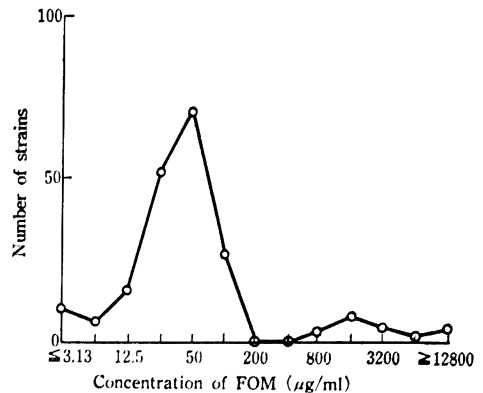


Fig. 1. MIC distribution of FOM against 192 strains of *P. aeruginosa*

75 株, T-92 株の 2 株において FOM が各々 100, 74% 不活化された。

この内, FOM 不活化酵素活性のより高い T-75 株に関して FOM 不活化機構を検討した。この不活化反応は直線的に進行し, 2-mercaptoethanol, KCl が必要とされた。また, 粗酵素液の透析内液 (酵素液) と透析外液 (補酵素の凍結乾燥濃縮液) が同時に必要であることが明らかとなった。透析外液は凍結乾燥後, TMK 溶液で元の粗酵素液量と同量にして用いた。この補酵素は耐性株特有のものではなく感受性株にも存在し, 熱に不安定なものであった。

また, FOM 耐性の誘導に関しては種々濃度の FOM で前処理したが, FOM 耐性上昇は観察されなかった。また, 不活化活性も上昇しなかった。すなわち, FOM 不活化酵素産生は非誘導型であることがわかった。

この FOM 不活化酵素の局在性が浸透圧ショック法によって調べられた (Table 1)。この FOM 不活化酵素活性は β -lactamase の存在する細胞間隙部位にも検出されたが, 粗酵素分画 (crude enzyme solution) と細胞破砕断片分画 (cell debris) にも検出された。このことは, FOM 不活化酵素の存在位置が細胞間隙よりも内側, すなわち, 細胞膜近傍であることを示唆していた。

FOM 不活化酵素の精製に関しては, NB 10 リッター培養液を用いて行なった (Table 2)。Stage II では硫安分画を透析用セルロースチューブ (seamless cellulose tubing, size 27/32, Union Carbide Corp.) を用いて 10 倍希釈 TMK 溶液で 4°C, 一夜透析した。この液を DEAE-Sephadex A-50 カラム (stage III) に充填し, 10 倍希釈 TMK 溶液 200 ml, 続いて 0~1 M NaCl 含有同溶液 400 ml (直線濃度勾配) で FOM 不活化酵素を流出させた。そして, 各分画 (5 ml) を OD, 280 nm で

Table 1. Liberation of FOM-inactivating enzyme by osmotic shock from *P. aeruginosa* T 75

Fraction	Enzyme activity (%)	
	FOM inactivating enzyme	β -lactamase
1. Supernatant of culture* ¹	0	0
2. Washed buffer of cells	0	0
3. 20% Sucrose 10mM EDTA 30mM Tris buffer	0	61
4. Cold water* ²	100* ³	100* ⁴
5. Supernatant of sonicated cells* ⁵	92	10
6. Cell debris	20	0

*¹: 7,000 × g for 15 min at 4°C*²: Suspended for 10 min at 0°C (periplasmic enzyme fraction obtained by osmotic shock)*³: 5.9 units (nmol of FOM inactivated/h at 25°C, pH7.8)*⁴: 4.4 units (μ mol of penicillin G hydrolyzed/h at 37°C, pH7.0)*⁵: 20,000 × g for 30 min at 4°C (crude enzyme solution)Table 2. Summary of the purification of FOM-inactivating enzyme from *P. aeruginosa* T-75

Stage	Procedure	Enzyme activity recovered (units* ¹)	Specific enzyme activity (units/mg protein)
I	Ultrasonic disintegration and ultracentrifugation* ² (40 ml)	8,044	1.86[1]* ³
II	Saturation of ammonium sulfate (20–40%) and dialysis (18 ml)	6,436	3.79[2]
III	DEAE-Sephadex A-50 column (2.0 × 36 cm)	409	80.1 [43]
IV	Sephadex G-100 column (1.8 × 43.5 cm)	180	423.0 [227]
V	14% polyacrylamide gel electrophoresis	101	1,507.5 [810]

*¹: 1 unit; 1 nmol of FOM inactivated/h at 25°C, pH7.8*²: 105,000 × g for 2 h at 4°C*³: Purification factor

測定し、FOM 不活化活性画分を凍結乾燥した。これを TMK 溶液 0.6 ml に溶解し Sephadex G-100 カラム (Stage IV) に通した。活性画分 No. 15 (2 ml) における本酵素の分子量は 32 kd であった。この画分を同カラムで再画分すると 32 kd の部分と約 11 kd の部分の二方性ピークを示し、前者は FOM 不活化活性を示したが、後者は示さなかった。この部分精製酵素を用いて 14% PAGE を行ない、泳動ゲルを 20 分画し TMK 溶液 1 ml を加え 4°C で一夜放置した。この不活化活性画分は、810 倍精製されていた。

精製段階における SDS-PAGE を Fig. 2 に示した。

Fig. 2 左側に示した標準蛋白の分子量と比較した最終精製標品の分子量は 11 kd であった。

一方、部分精製酵素 (Table 2, Stage IV) を用いた FOM 不活化反応により、この不活化反応の至適反応温度は 25°C、至適反応 pH は 7.8 であることが明らかとなった。また、この酵素の等電点 (pI) は 5.4 であった (Table 3)。

III. 考 察

臨床分離緑膿菌の FOM 耐性機構には FOM 不活化酵素型と非不活化酵素型が存在していることがわかった。

Table 3. Properties of FOM inactivating enzyme from *P. aeruginosa* T-75

Strain	Optimum temperature	Optimum pH*	Isoelectric point	Molecular weight	
				Sephadex G 100	SDS PAGE
T-75	25°C	7.8	5.4	32,000	11,000

* Incubated at 25°C

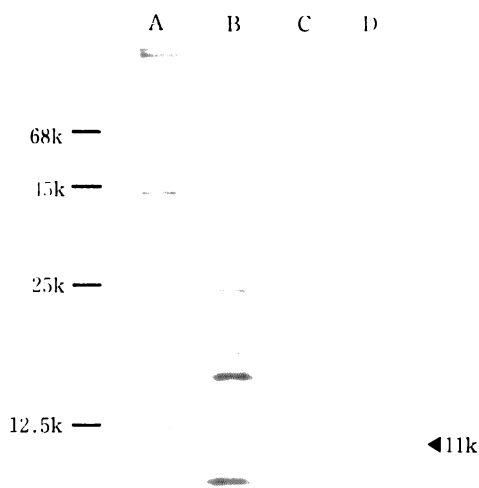


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of FOM-inactivating enzyme at various stages of purification.

Lane A: stage II, lane B: stage III, lane C: stage IV, lane D: stage V

このうち、FOM不活性化酵素型耐性緑膿菌に関しては、細胞膜近傍に存在しているFOM不活性化酵素によりFOMが抗菌性を失うものと考えられる。また、この型のFOM耐性は、FOM非活性化型耐性(MIC: 800~6,400 µg/ml)とともに存在しより高度耐性化(MIC: ≥12,800 µg/ml)していることが考えられる。

このFOM不活性化酵素型耐性はFOM感受性株K-Ps 47 rifへ接合伝達しなかった。更に、42°C処理やエチジウムブロマイド処理によってもFOM耐性の脱落は見られず、プラスミドDNAも検出されなかった。

FOM耐性緑膿菌T-75株のFOM不活性化酵素の精製過程において、本酵素(32 kd 蛋白)が11 kdのサブユニットからなっていることが示唆された。また、酵素精製過程における低収率の原因は、この酵素のサブユニットへの解離や安定性が関与していることが考えられる。

一方、FOM感受性菌粗酵素液の透析外液を補酵素含有物として用いたFOM不活性化酵素反応がEDTA, NADPH₂, NaNO₃⁻により部分阻害された。したがって、この不活性化反応の補酵素としては2価金属や酸化還

元反応が関係している可能性があるが今のところ不明である。

以上より、FOM高度耐性緑膿菌におけるFOM不活性化酵素の存在およびその酵素性状が初めて明らかとなった。

(謝辞) 実験に協力して頂いた、村上研一郎氏および田中美加氏に感謝します。

文 献

- HENDLIN D, STAPLEY E O, JACKSON M, WALICK H, MILLER A K, WOLF F J, MILLER T W, CHAIET L, KAHAN F M, FOLTZ E L, WOODRUFF H B, MATA J M, HERNANDEZ S, MOCHALES S: Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 166: 122~123, 1969
- KAHAN F M, KAHAN J S, CASSIDY P J, KROPP H: The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N.Y. Acad Sci* 235: 364~386, 1974
- WOODRUFF H B, KAHAN F M, WALICK H, MILLER A K, STAPLEY E O: Fosfomycin, a cell-wall active antibiotic not inactivated by episome mediated enzymes. *Microbial drug resistance*, University Park Press, Baltimore (MITSUHASHI S, HASHIMOTO H) pp. 539~559, 1975
- VENKATESWARAN T S, WU H C: Isolation and characterization of a fosfomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol* 110: 935~944, 1972
- DULANEY L E, RUBY C L: *In vitro* development of resistance to fosfomycin. *J. Antibiot* 30: 252~261, 1977
- MENDOZA C, GARCIA J M, LLANEZA J, MENDEZ F J, HARDISSON C, ORTIZ J M: Plasmid-determined resistance to fosfomycin in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 215~219, 1980
- VILLAR C J, HARDISSON C, SUAREZ J E: Cloning and molecular epidemiology of plasmid-determined fosfomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 309~314, 1986
- LEON J, GARCIA-LOBO J M, ORTIZ J M: Fosfomycin-resistance plasmids do not affect

- fosfomycin transport into *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 21 : 608~612, 1982
- 9) LEON J, GARCIA-LOBO J M, ORTIZ J M : Fosfomycin inactivates its target enzyme in *Escherichia coli* cells carrying a fosfomycin-resistance plasmid. Antimicrob Agents Chemother 24 : 276~278, 1983
- 10) GARCIA-LOBO J M, ORTIZ J M : Tn 2921, a transposon encoding fosfomycin resistance. J. Bacteriol 151 : 477~479, 1982
- 11) NAVAS J, GARCIA-LOBO J M, LEON J, ORTIZ J M : Structural and functional analysis of the fosfomycin-resistance transposon Tn 2921. J Bacteriol 162 : 1061~1067, 1985
- 12) GARCIA-LOBO J M, LEON J, NAVAS J, ORTIZ J M : Cloning and expression in minicells of the determinant of resistance to fosfomycin from the transposon Tn 2921. Plasmid 11 : 243~247, 1984
- 13) LLANEZA J, VILLAR C J, SALAS J A, SUAREZ J E, MENDOZA M C, HARDISSON C : Plasmid-mediated fosfomycin resistance is due to enzymatic modification of the antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 28 : 163~164, 1985
- 14) LEON J, GARCIA-LOBO J M, NAVAS J, ORTIZ J M : Fosfomycin-resistance plasmids determine an intracellular modification of fosfomycin. J Gen Microbiol 131 : 1649~1655, 1985
- 15) 石山俊次, 中山一誠, 岩本英男, 岩井重富, 鷹取睦美, 川辺隆道, 坂田育弘, 水足裕子 : 外科における静注用 Fosfomycin の吸収, 排泄, 代謝と臨床応用. Chemotherapy 23 : 3469~3477, 1975
- 16) Fosfomycin の評価, アンケート集計成績。第22回日本化学療法学会総会, 7~24 頁, 1974
- 17) KONO M, O'HARA K : Mechanisms of streptomycin (SM)-resistance of highly SM-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Antibiot 29 : 169~175, 1976
- 18) ホスホマイシンナトリウム, 日本抗生物質医薬品基準解説, 厚生省薬務局監修, 569~574 頁, 1986
- 19) O'HARA K, KONO M, MITSUHASHI S : Enzymatic inactivation of a new aminoglycoside antibiotic, sisomicin, by *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 5 : 558~561, 1974
- 20) LOWRY O H, TOSENVROUGH H J, FARR A L, RANDALL R J : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265~275, 1951
- 21) 河野 恵, 小原康治, 佐藤 郁, 大宮敬一 : 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. Chemotherapy 34 : 281~285, 1986
- 22) NEU H C, CHOU J : Release of surface enzymes in enterobacteriaceae by osmotic shock. J Bacteriol 94 : 1934~1945, 1967
- 23) NOVICK R P : Micro-iodometric assay for penicillinase. Biochem J 83 : 236~240, 1962
- 24) KONO M, OHMIYA K, KANADA T, NOGUCHI N, O'HARA K : Purification and characterization of chromosomal streptomycin adenyltransferase from derivatives of *Bacillus subtilis* Marburg 168. FEMS Microbiol Lett 40 : 223~228, 1987.
- 25) HANCOCK R E W, NIKAIIDO H : Outer membrane of Gram-positive bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. J Bacteriol 136 : 381~390, 1978
- 26) MERRIL C R, GOLDMAN D, SEDMAN S A, EBERT M H : Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211 : 1437~1438, 1981

FOSFOMYCIN-INACTIVATING ENZYME FROM
CLINICALLY ISOLATED *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

KOJI O'HARA, JIRO KOTAKE, KEIICHI OHMIYA and MEGUMI KONO

Department of Microbiology, Tokyo College of Pharmacy,
1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

We clinically examined the fosfomycin (FOM) susceptibility of 192 strains of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*. FOM-inactivating enzyme was detected in two strains (T-75 and T-92) showing high FOM-resistance. The enzymological properties were investigated using strain T-75. We suspected that the FOM-inactivating enzyme was located near the inner membrane of the cell. The enzyme was purified to 810-fold. Molecular weight of the enzyme estimated by Sephadex G-100 gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was 32 Kdal and 11 Kdal, respectively. The optimum temperature, optimum pH for the inactivation of FOM and isoelectric point of the enzyme, were 25°C, pH 7.8, and pI 5.4, respectively.