

## ニューキノロン薬耐性に関わる表皮ブドウ球菌の *norA* 遺伝子について

生方 公子・杉 浦 睦・紺野 昌俊  
帝京大学医学部臨床病理\*

(平成3年7月31日受付・平成3年9月17日受理)

ニューキノロン薬に耐性を示す *Staphylococcus epidermidis* から norfloxacin (NFLX) 耐性遺伝子を含む 2.2 kb の *Hind* III 染色体 DNA 断片をクローニングした。*Staphylococcus aureus* SA 113 に対する NFLX, enoxacin (ENX), ciprofloxacin, ofloxacin, tosufloxacin および sparfloxacin (SPFX) の MIC は、それぞれ 0.39, 0.39, 0.1, 0.2, 0.01, および 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であったが、このクローン化 DNA 断片の導入によりそれぞれ 25, 12.5, 3.13, 1.56, 0.2 および 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と MIC は明らかに上昇した。MIC 上昇の程度は、比較的疎水性の SPFX が最も小さかった。クローン化 DNA 断片中には NFLX 耐性遺伝子と思われる 1,161 塩基からなるオープンリーディングフレームが認められ、387 個のアミノ酸残基よりなる分子量 42,118 のポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドは疎水性アミノ酸に富む膜蛋白であると推定され、*S. aureus* の *norA* 遺伝子より作られる NorA ポリペプチドより 1 アミノ酸残基少なく、両ポリペプチドのアミノ酸一致率は 79% であった。また、クローン化 DNA 断片を鋳型として *in vitro* 翻訳系により作られたポリペプチドの分子量は 42,000 であり、塩基配列から推定された分子量と近似していた。したがって、*S. epidermidis* よりクローニングした NFLX 耐性遺伝子は、*S. aureus* の *norA* 遺伝子に相当するものと考えられた。標識されニューキノロン薬を用いたブドウ球菌の菌体内への薬剤取り込み実験において、*S. epidermidis* 由来の *norA* 遺伝子を保持する形質転換株は、非形質転換株より ENX の取り込みが少なく、carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone を添加することにより取り込みは明らかに回復した。これらの成績より、*S. epidermidis* 由来 *norA* 遺伝子にコードされた NorA ポリペプチドは、細胞膜上に存在していて、エネルギー依存的なニューキノロン薬の汲みだし機構に関与している可能性が示唆された。

**Key words:** New quinolone resistance, Staphylococci, *norA* gene, Nucleotide sequence, Hydrophobic membrane protein

近年、細菌検査室に提出される臨床検査材料から、ニューキノロン薬に耐性を示す菌株の検出率が上昇しつつある<sup>1-4)</sup>。この増加傾向は、本邦のみならずニューキノロン薬が使用されている諸外国<sup>5-9)</sup>においても認められている。そして、菌種の中で特に耐性化が著しいのは、ブドウ球菌と *Pseudomonas aeruginosa* である。

著者らは、1986 年に入院患者の尿より分離されたニューキノロン薬耐性の *Staphylococcus aureus* からその耐性に関与していると推定される遺伝子 (*norA*) をクローニングし、*Escherichia coli* ならびに *S. aureus* における形質発現を報告した<sup>10)</sup>。さらに、*norA* 遺伝子の全塩基配列を決定し、それにコードされている NorA ポリペプチド

の性質についてもその一部を明らかにしてきた<sup>11)</sup>。これらの解析によると、*norA* 遺伝子に支配されるポリペプチドは疎水性の高い膜蛋白であり、*S. aureus* の細胞質膜上に存在していて、エネルギー依存的なニューキノロン薬の菌体外排出機構 (active efflux) に関与していることが示唆された。

一方、菌種の異なる *Staphylococcus epidermidis* においても、*S. aureus* と同様にニューキノロン薬に耐性を示す菌株が分離され始めている。このようなことから、*S. epidermidis* を含めたコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) にも、*S. aureus* の *norA* と同じような遺伝子が存在し、ニューキノロン薬の耐性に関わりを有している可

能性が想定された。そして、これらを解明していくことが、ブドウ球菌に対するニューキノロン薬の作用機序とその耐性機構を明らかにする一つの方法と考えた。

本論文では、*S. epidermidis* からのニューキノロン薬耐性に関わる遺伝子のクローニングと、その全塩基配列の決定、さらにはその遺伝子にコードされたポリペプチドの性状について報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 使用菌株

臨床検査材料から分離された norfloxacin (NFLX) に種々の耐性度を示す 3 株の *S. epidermidis* を実験に用いた。すなわち、Table 1 に示すように、NFLX に対する耐性レベルから、1) 耐性度の比較的高い TK-1223 株、2) 中等度耐性の TK-2135 株、3) NFLX には明らかに耐性であるが、他のニューキノロン薬にはやや MIC が低い TK-2291 株を選出した。形質転換実験の受容菌として用いた *E. coli* TG 1 株、ならびに *S. aureus* SA 113 株に対するニューキノロン薬の MIC は Table 2 に示した。

### 2. 使用抗菌薬

実験に使用した抗菌薬は、ampicillin (ABPC: 万

有製薬株式会社), chloramphenicol (CP: 三共株式会社), NFLX (杏林製薬株式会社), ciprofloxacin (CPFX: バイエル薬品株式会社), ofloxacin (OFLX: 第一製薬株式会社), tosusfloxacin (TFLX: 富山化学工業株式会社), enoxacin (ENX: 大日本製薬株式会社), sparfloxacin (SPFX: 大日本製薬株式会社) の計 8 薬剤である。その他に、大日本製薬株式会社より標識化合物の [<sup>14</sup>C] ENX と [<sup>14</sup>C] SPFX の分与を受け、実験に用いた。

3. 被験菌株からの染色体 DNA の採取と形質転換  
上述した被験菌株からの染色体 DNA 採取は、すでに報告した方法<sup>10)</sup> に従った。精製した DNA からの目的遺伝子のクローニングは、常法<sup>12)</sup> に従った。その際の受容菌には、前述した *E. coli* TG 1 株を用いた。クローニングの過程は Fig. 1 に示したとおりである。

### 4. プラスミド

*E. coli* の形質転換用に用いたベクタープラスミドは pUC 19, *S. aureus* の形質転換用に用いたものは pSU 40 (Fig. 1) である。*S. epidermidis* TK 2135 株、TK 2291 株および TK 1223 株の染色体 DNA か

Table 1. Quinolone susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains used in this study

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	Enoxacin	Norfloxacin	Ciprofloxacin	Ofloxacin	Tosufloxacin	Sparfloxacin
<i>S. epidermidis</i> TK 2135	100	100	25	12.5	6.25	3.13
<i>S. epidermidis</i> TK 2291	6.25	12.5	3.13	1.56	0.1	0.1
<i>S. epidermidis</i> TK 1223	>100	>100	>100	>100	>100	12.5

MICs were determined with serial twofold dilutions of the agents in sensitivity test agar.

Bacteria cultured overnight were inoculated onto the agar plates at  $10^6$ CFU per spot and incubated for 24 h at 37°C.

Table 2. Quinolone susceptibility of transformant strains harboring the *Staphylococcus epidermidis* *norA* gene

Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	Enoxacin	Norfloxacin	Ciprofloxacin	Ofloxacin	Tosufloxacin	Sparfloxacin
<i>E. coli</i> TG 1 (pTUS 33)	1.56	3.13	0.2	0.2	0.01	0.01
<i>E. coli</i> TG 1 (pTUS 36)	1.56	1.56	0.1	0.2	0.01	0.01
<i>E. coli</i> TG 1 (pTUS 38)	1.56	1.56	0.1	0.1	0.01	0.01
<i>E. coli</i> TG 1	0.05	0.1	0.01	0.05	0.01	0.01
<i>S. aureus</i> SA 113 (pTUS 105)	12.5	25	3.13	1.56	0.2	0.1
<i>S. aureus</i> SA 113	0.39	0.39	0.1	0.2	0.01	0.02

MICs were determined with serial twofold dilutions of the agents in sensitivity test agar.

Bacteria cultured overnight were inoculated onto the agar plates at  $10^6$ CFU per spot and incubated for 24 h at 37°C.

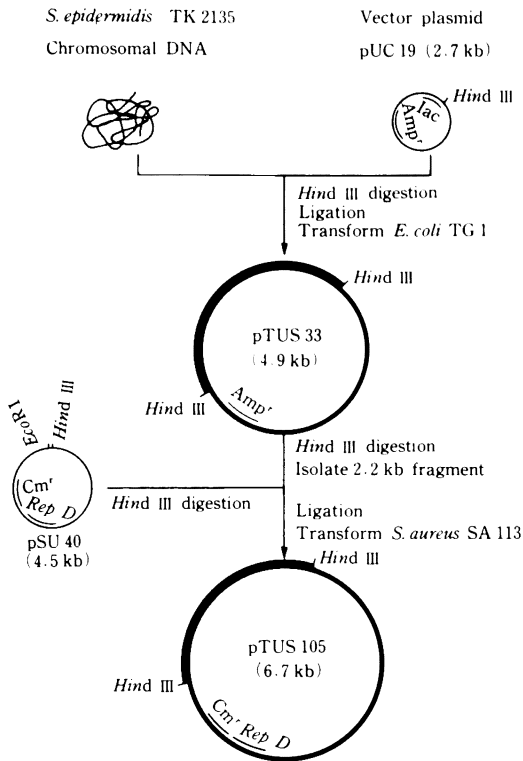


Fig. 1. Cloning of the new quinolone resistance gene in *Staphylococcus epidermidis*. Recombinant plasmid pTUS 33 was constructed by inserting a 2.2 kb *Hind* III fragment of chromosomal DNA from *S. epidermidis* TK 2135 into a vector plasmid pUC 19 for *Escherichia coli*. A 2.2 kb *Hind* III fragment purified from pTUS 33 was ligated at the *Hind* III site of a vector plasmid pSU 40 to construct pTUS 105 for *Staphylococcus aureus*.

らクローニングした NFLX 耐性遺伝子を含むと考えられる 2.2 kb の *Hind* III DNA 断片が挿入された *E. coli* 用プラスミドは、それぞれ pTUS 33, pTUS 36, および pTUS 38 と命名した。また、TK 2135 の 2.2 kb DNA 断片を *E. coli* から再び *S. aureus* へ戻した際に作られた *S. aureus* 用プラスミドは、pTUS 105 と命名した。

#### 5. 塩基配列の決定

pTUS 33 にクローニングされた 2.2 kb の *Hind* III DNA 断片は、その塩基配列を決定するためにさらに 1.0 kb 以下の DNA 断片として M 13 mp 18 あるいは M 13 mp 11 ヘサブクローン化し、*E. coli* TG 1 株に

感染させた。感染菌株からの 1 本鎖 DNA の回収は、PEG 6,000 によって行い、次いでフェノール:クロロホルム抽出によりその DNA を精製した。DNA 塩基配列の決定は、T7 DNA ポリメラーゼと [<sup>35</sup>S] dATP を用い、ジデオキシ法<sup>11)</sup> により行った。その他の手技は、すべて Maniatis ら<sup>12)</sup> の方法に準じた。

#### 6. 薬剤の取り込み実験

*S. aureus* SA 113 株と SA 113 (pTUS 105) におけるニューキノロン薬の取り込みは、0.1 mM の carbonyl cyanide *m* chlorophenyl hydrazone (CCCP) を添加した際と、非添加時における細胞内 [<sup>14</sup>C] ENX と [<sup>14</sup>C] SPFX の濃度を調べることにより測定した<sup>11)</sup>。

#### 7. サザンハイブリダイゼーション

臨床分離の CNS における *norA* 遺伝子に類似した遺伝子の検索は、検査材料から分離された CNS より無作為に菌株を選び、既報に従って行った<sup>12)</sup>。

## II. 結果

### 1. NFLX 耐性遺伝子のクローニング

NFLX に耐性を示した *S. epidermidis* の 3 株から抽出した全 DNA を制限酵素の *Hind* III で切断し、それらを用いて目的とする遺伝子のクローニングを行った。いずれの場合も、NFLX 2 μg/ml を含有する選択培地上に形質転換株と思われるコロニーの発育が認められた。NFLX に対する感受性が変化したと思われるこれらのコロニーを無作為に釣菌して、それらの菌のプラスミド DNA を抽出し、組み込まれた DNA 断片を解析すると、検索した 72 株の形質転換株は、すべて 2.2 kb の *Hind* III DNA 断片を持つプラスミドを有していた。各被験菌株由来の 2.2 kb DNA 断片を持つプラスミドで形質転換された *E. coli* TG 1 株の各種ニューキノロン薬に対する感受性成績を、Table 2 に示す。表中に記した pTUS 33, pTUS 36, および pTUS 38 は、それぞれ *S. epidermidis* TK 2135 株, TK 2291 株ならびに TK 1223 株からの 2.2 kb *Hind* III DNA 断片が組み込まれたプラスミドである。3 株の形質転換株は、ニューキノロン薬に対して同じような MIC を示した。すなわち、NFLX に対しては受容菌 TG 1 株の MIC 0.1 μg/ml の 16 ~ 31 倍の MIC である 1.56 から 3.13 μg/ml の値を示し、ENX に対しては 31 倍の 1.56 μg/ml, CPFX に対しては 10 ~ 20 倍の 0.1 から 0.2 μg/ml, OFLX に対しては 2 ~ 4 倍の 0.1 から 0.2 μg/ml の MIC を示した。しかしながら、TFLX と SPFX に対する MIC には変動を認めなかった。つまり、この成績から、クローニングされたそれぞれの 2.2 kb DNA 断片上には、

NFLX を始めとするニューキノロン薬の感受性を左右する何らかの遺伝子が存在している可能性が示唆された。

さらに、耐性発現の面から遺伝子の存在を再確認する目的で、*S. epidermidis* TK 2135 株からクローン化した 2.2 kb の DNA 断片を *S. aureus* 用のベクタープラスミドである pSU 40 へ再結合し、その組み換え DNA 分子 pTUS 105 で *S. aureus* SA 113 株を形質転換した (Fig. 1 の下方部分)。形質転換株の *S. aureus* SA 113 (pTUS 105) 株は、Table 2 に示したように、受容菌とした SA 113 株に比べ、NFLX には約 64 倍の MIC (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示し、ENX には 32 倍 (12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、CPFX には 31 倍 (3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、OFLX には 8 倍 (1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、TFLX には 20 倍 (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) および SPFX には 5 倍 (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の MIC の上昇を認めた。この結果からみられるように、得られた形質転換株は、比較的疎水性といわれるニューキノロン薬に比べ、NFLX、ENX あるいは CPFX のような比較的親水性のニューキノロン薬に対する MIC の上昇がより著明であった。この成績から、クローン化された 2.2 kb の *Hind* III DNA 断片上には、ニューキノロン薬の耐性に関わりを有すると考えられる遺伝子がコードされている可能性が示唆された。

## 2. 2.2 kb の *Hind* III DNA 断片の全塩基配列の決定

前述した pTUS 33 にクローン化された 2.2 kb の

DNA 断片は、Fig. 2 に示した方法に従ってその全塩基配列を決定した。解析された結果は Fig. 3 に示したが、上段に記した記号は塩基を表し、下段に記した 3 文字は塩基から翻訳されるアミノ酸の略号である。2.2 kb DNA 断片上の 571 番目の塩基から 1,731 番目の塩基にわたって、1 個のオープンリーディングフレームが認められ、このフレームは 387 個のアミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。また、このアミノ酸残基から推定されるポリペプチドの分子量は 42,118 であった。*In vitro* 翻訳系により生産されたポリペプチドの分子量測定では、42,000 と算出され (データ省略)、アミノ酸配列より推定した分子量と近似していることから、上述したオープンリーディングフレームは、実際にポリペプチドをコードしていると考えられた。

一方、この遺伝子における推定プロモーター領域は、Fig. 3 にアンダーラインで示してあるように、塩基番号 453 から 458 (TACAAT) と塩基番号 429 から 435 (TTGTCAT) に見いだされた。それらは *E. coli* におけるプロモーターの -10 および -35 領域におけるコンセンサスシーケンス (TATAAT と TTGACAT) に類似していた。また、リボゾームの推定結合部位は、開始コドン (ATG) の上流域 8 から 14 塩基のところ存在し (AAGGGGG)、Shine-Dalgarno 配列 (AAGGAGGT) に非常に似通っていた。

ポリペプチドの転写終結部位として機能すると思わ

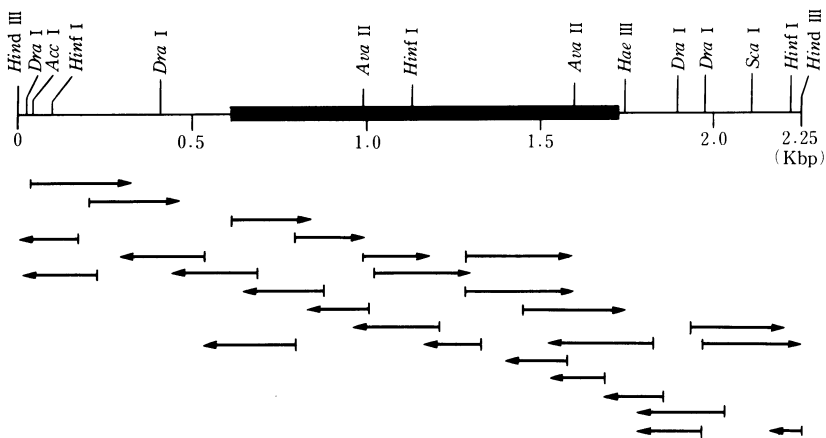


Fig. 2. Restriction map of the 2.2 kb *Hind* III fragment derived from pTUS 33 and the strategy for determining the nucleotide sequence. The arrows below the map indicate the direction and extent of sequence analysis.

1	AAG	CTT	TGA	CTG	GTT	TGA	ACA	ATT	TTA	AAA	GTA	GAC	AAA	GTT	CAA	ATG	48
49	GCA	CGT	ATG	CTA	AAA	ATA	AAT	TTA	ACG	TCA	TAA	AGT	TAA	AAA	TAT	GTG	96
97	ATT	CAG	TCA	TAG	ATA	TAA	CAA	ATA	AGA	TAA	TAA	AGT	ATA	TTC	TTG	CAA	144
145	AGT	AAC	GAG	ATT	GCA	TAA	CCA	CGC	ACT	ACT	TTC	TAT	AGA	GTT	TGA	TAA	192
193	TCG	AGA	GTT	AAT	GAT	AAC	TTT	TAC	AGT	GAG	GCA	TTT	CAA	ACA	ATT	TGA	240
241	GGT	GTT	TTC	TGT	TTA	TAC	AGA	TGT	GAA	AGC	GAA	GAA	AAA	TTA	TAC	CGT	288
289	ATG	TTC	ATT	AGA	CTT	TAG	TCA	ATT	GGA	TAA	AGG	TTT	TGT	CGA	AAG	TTT	336
337	ATG	AAG	ATA	CAG	GTT	CGT	TTA	ATT	ATA	TGT	TAA	ATT	TTT	AAC	TAA	AAA	384
385	ATT	AGA	GTT	TAG	TGA	AAT	TTA	AAA	ATT	AAA	GTT	TTT	CAA	AAT	GAT	TGT	432
433	<u>CAT</u>	GTC	ACG	TTA	AAT	TGT	<u>TAT</u>	<u>ACA</u>	<u>ATG</u>	TAG	AAA	CTT	TTA	GTA	AAG	TAA	480
481	AGT	TCT	TAT	GTG	GGA	CAT	TAA	AAA	TAA	ATT	TGC	GAT	AAA	TTT	CAA	AAT	528
529	TAT	TGG	TAT	GCT	TAC	TAT	ATT	AGA	AAA	AAA	GGG	GGG	GTT	CCT	ATG	AAA	576
1															Met	Lys	2
577	AAA	CAA	TTA	TTC	ATT	CTT	TAT	TTT	AAT	ATA	TTT	CTT	ATA	TTT	TTA	GGG	624
3	Lys	Gln	Leu	Phe	Ile	Leu	Tyr	Phe	Asn	Ile	Phe	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	18
625	ATT	GGA	TTA	GTT	ATT	CCT	GTA	CTT	CCT	GTA	TAT	TTG	AAG	GAT	TTA	GGA	672
19	Ile	Gly	Leu	Val	Ile	Pro	Val	Leu	Pro	Val	Tyr	Leu	Lys	Asp	Leu	Gly	34
673	TTA	AAA	GGT	AGT	GAC	TTA	GGA	ATG	CTA	GTT	GCT	GCT	TTT	GCA	TTA	TCA	720
35	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Ala	Leu	Ser	50
721	CAA	ATG	ATT	ATT	TCA	CCA	TTT	GGT	GGG	ACA	CTA	GCT	GAT	AAA	TTG	GGT	768
51	Gln	Met	Ile	Ile	Ser	Pro	Phe	Gly	Gly	Thr	Leu	Ala	Asp	Lys	Leu	Gly	66
769	AAA	AAA	TTA	ATT	ATA	TGT	ATC	GGT	TTA	GTA	TTC	TTT	GCT	GTC	TCT	GAA	816
67	Lys	Lys	Leu	Ile	Ile	Cys	Ile	Gly	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Val	Ser	Glu	82
817	TTT	ATG	TTC	GCA	GCC	GGT	CAA	AGT	TTT	ACC	ATT	TTA	ATC	ATT	TCA	CGT	864
83	Phe	Met	Phe	Ala	Ala	Gly	Gln	Ser	Phe	Thr	Ile	Leu	Ile	Ile	Ser	Arg	98
865	GTT	TTA	GGT	GGC	TTT	AGT	GCA	GGC	ATG	GTC	ATG	CCT	GGT	GTA	ACA	GGT	912
99	Val	Leu	Gly	Gly	Phe	Ser	Ala	Gly	Met	Val	Met	Pro	Gly	Val	Thr	Gly	114
913	ATG	ATT	GCA	GAT	ATT	TCT	CCA	GGA	GCT	GAT	AAA	GCT	AAA	AAC	TTT	GGT	960
115	Met	Ile	Ala	Asp	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Lys	Asn	Phe	Gly	130
961	TAC	ATG	TCG	GCA	ATT	ATT	AAT	TCA	GGT	TTT	ATA	TTA	GGA	CCT	GGA	TTT	1008
131	Tyr	Met	Ser	Ala	Ile	Ile	Asn	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	Gly	Pro	Gly	Phe	146
1009	GGA	GGC	TTT	TTA	GCT	GAA	ATT	TCA	CAT	AGA	TTA	CCT	TTC	TAT	GTT	GCT	1056
147	Gly	Gly	Phe	Leu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Arg	Leu	Pro	Phe	Tyr	Val	Ala	162
1057	GGA	ACA	TTA	GGT	GTT	GTT	GCA	TTC	ATT	ATG	TCA	GTT	TTA	TTA	ATT	CAT	1104
163	Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Phe	Ile	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	His	178
1105	AAT	CCT	CAA	AAA	GCA	ACT	ACA	GAT	GGA	TTC	CAC	CAA	TAT	CAA	CCT	GAA	1152
179	Asn	Pro	Gln	Lys	Ala	Thr	Thr	Asp	Gly	Phe	His	Gln	Tyr	Gln	Pro	Glu	194

Fig. 3-1. Nucleotide sequence of the 2.2 kb fragment containing the *norA* gene. The nucleotide sequence of the sense strand of the *norA* gene from the 5' (left) to 3' (right) end is shown. The amino acid residues of the *norA* gene product are given below the DNA sequence. The -35 and -10 sequences of the promoter, the Shine-Dalgarno (SD) sequence, and a possible transcription terminator are underlined.

1153	TTA	TTC	ACT	AAA	ATT	AAT	TGG	AAA	GTA	TTT	ATT	ACT	CCA	GTC	ATA	TTA	1200
195	Leu	Phe	Thr	Lys	Ile	Asn	Trp	Lys	Val	Phe	Ile	Thr	Pro	Val	Ile	Leu	210
1201	ACA	CTT	GTA	TTA	GCA	TTT	GGT	TTA	TCT	GCT	TTT	GAA	ACA	TTA	TTT	TCT	1248
211	Thr	Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Ala	Phe	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	226
1249	TTA	TAT	ACA	GCT	GAC	AAA	GTA	AAT	TAT	ACT	CCT	AAA	GAT	ATT	TCG	ATA	1296
227	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asp	Lys	Val	Asn	Tyr	Thr	Pro	Lys	Asp	Ile	Ser	Ile	242
1297	GCT	ATT	ATC	GGT	GGA	GGC	GTG	TTT	GGC	GCA	TTA	TTC	CAA	GTA	TTC	TTC	1344
243	Ala	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Val	Phe	Gly	Ala	Leu	Phe	Gln	Val	Phe	Phe	258
1345	TTT	GAT	AAA	TTT	ATG	AAA	TAT	ATG	AGT	GAA	CTT	AAI	TTT	ATT	GCA	TGG	1392
259	Phe	Asp	Lys	Phe	Met	Lys	Tyr	Met	Ser	Glu	Leu	Asn	Phe	Ile	Ala	Trp	274
1393	TCA	TTA	CTA	TAT	TCA	GCC	ATT	GTT	CTC	GTT	ATG	TTA	GTG	CTT	GCA	AAC	1440
275	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile	Val	Leu	Val	Met	Leu	Val	Leu	Ala	Asn	290
1441	GGT	TAT	TGG	ACG	ATT	ATG	ATT	ATT	AGC	TTT	GTT	GTT	TTT	ATA	GGT	TTT	1488
291	Gly	Tyr	Trp	Thr	Ile	Met	Ile	Ile	Ser	Phe	Val	Val	Phe	Ile	Gly	Phe	306
1489	GAT	ATG	ATT	AGA	CCA	GCT	TTA	ACC	AAT	TAC	TTC	TCG	AAI	ATA	GCA	GGC	1536
307	Asp	Met	Ile	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Asn	Tyr	Phe	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	322
1537	AAA	CGG	CAA	GGT	TTT	GCA	GGT	GGA	TTG	AAT	TCA	ACT	TTT	ACC	AGT	ATG	1584
323	Lys	Arg	Gln	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Leu	Asn	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Met	338
1585	GGT	AAC	TTT	ATA	GGT	CCT	CTT	GTA	GCT	GGT	GCA	TTA	TTC	GAT	GTT	AAT	1632
339	Gly	Asn	Phe	Ile	Gly	Pro	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Phe	Asp	Val	Asn	354
1633	TTA	GAG	TTT	CCT	TTA	TAT	ATG	GCT	ATT	GCG	GTT	TCA	TTA	AGT	GGA	ATT	1680
355	Leu	Glu	Phe	Pro	Leu	Tyr	Met	Ala	Ile	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile	370
1681	ATC	ATT	ATT	TTT	ATT	GAA	AAA	GGA	CTT	AAG	TCA	CGC	CGT	AAA	GAA	GCA	1728
371	Ile	Ile	Ile	Phe	Ile	Glu	Lys	Gly	Leu	Lys	Ser	Arg	Arg	Lys	Glu	Ala	386
1729	AAT	TAA	TAC	GGG	GCC	CCA	ACA	AAG	AGA	ATT	TCG	CCG	AGA	AAT	TCT	ACG	1776
387	Asn	***															388
1777	GAC	AGA	GCA	AGT	TTT	GGG	GAC	GAG	<u>GTG</u>	<u>GGA</u>	<u>CAC</u>	AGT	GTT	CAA	GAC	<u>GAA</u>	1824
														Transcription terminator			
1825	TTC	<u>TGT</u>	<u>GTC</u>	<u>CCA</u>	<u>CTT</u>	<u>CTT</u>	<u>TTG</u>	<u>TTT</u>	TAT	AAC	TTG	TAA	TGT	AAA	GTT	GAT	1872
1873	GTT	ATC	TCA	AAT	ATA	AGT	TTT	AAA	AGA	TTA	TGA	GTT	ATT	AGT	GGT	TTA	1920
1921	TGT	AAC	AAA	AAT	AAC	AAC	TAT	ATT	AAT	GTT	AGT	GTT	ACA	AAT	ATT	ACA	1968
1969	ATC	TAT	TTA	AAT	TGT	AAT	CTA	CAT	ATC	TTT	TAT	TAA	AAG	TTG	TTG	TGT	2016
2017	TAA	GAT	AGA	ATA	AAT	CTT	AAG	AGA	AAT	GTG	GGT	AAG	GAG	ATG	AAA	TTG	2064
2065	AAA	AAC	TTA	TTT	TTA	AGT	TCT	GTT	GCA	GTT	ATT	TTA	TCA	ATT	TGT	TTA	2112
2113	GTA	CTT	TTA	TTA	TTT	TTA	GCT	ACA	AAC	CAA	AAT	GCA	TTA	GCG	AAA	GTC	2160
2161	CAT	AAA	ACA	ATT	TGT	ACT	TTT	ACT	AAA	GTG	AAA	ACA	GTA	TCT	CAT	AAC	2208
2209	GAT	ATA	TTC	CCT	AAC	TTA	AAT	ATG	AAT	CAT	GTT	GCT	GAA	GCT	T		2251

Fig. 3-2. Nucleotide sequence of the 2.2 kb fragment containing the *norA* gene. The nucleotide sequence of the sense strand of the *norA* gene from the 5' (left) to 3' (right) end is shown. The amino acid residues of the *norA* gene product are given below the DNA sequence. The -35 and -10 sequences of the promoter, the Shine-Dalgarno (SD) sequence, and a possible transcription terminator are underlined.

	1	10	20	30	40	50	60
A:	MNKQIFVLYFNIFLIFLIGLVIPVLPVYLKDLGLTGSDDLGLLVAAFALSQMIISPFGGT						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	MKKQLFIFYFNIFLIFLIGLVIPVLPVYLKDLGLKGSDDLGLLVAAFALSQMIISPFGGT						
	1	10	20	30	40	50	60
	61	70	80	90	100	110	120
A:	LADKLGKKLIICIGLILFSVSEFMFAVGHNFVLMLSRVIGGMSAGMVMPGVTGLIADIS						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	LADKLGKKLIICIGLVFFAVSEFMFAAGQSFTILIIISRVLGGFSAGMVMPGVTGMIADIS						
	61	70	80	90	100	110	120
	121	130	140	150	160	170	180
A:	PSHQKAKNFGYMSAIINSGFILGPGIGGFMAEVSHRMPFYFAGALGILAFIMSVL-IHD						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	PGADKAKNFGYMSAIINSGFILGPGFGGFLAEISHRLPFYVAGTLGVVAFIMS-VLLIHN						
	121	130	140	150	160	170	180
	181	190	200	210	220	230	240
A:	PKKSTTSGF-QKLEPQLLTKINWKVFITPVILTLVLSFGLSAFETLYSLYTADKVNYSK						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	PQKATTDGFHQYQ-PELFTKINWKVFITPVILTLVLAFLSAFETLFSLYTADKVNYPK						
	181	190	200	210	220	230	240
	241	250	260	270	280	290	300
A:	DISIAITGGGIFGALFQIYFFDKFMKYFSELTFAWSLLYSVVVLLLVFANGYWSIMLI						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	DISIAIIGGGVFGALFQVFFDKFMKYMSELNFAWSLLYSAIVLVMLVLANGYWTIMI						
	241	250	260	270	280	290	300
	301	310	320	330	340	350	360
A:	SFVVFIGFDMIRPAITNYFSNIAGERQGFAGGLNSTFTSMGNFIGPLIAGALFDVHIEAP						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	SFVVFIGFDMIRPALTNYSNIAGKRQGFAGGLNSTFTSMGNFIGPLVAGALFDVNLEFP						
	301	310	320	330	340	350	360
	361	370	380	390			
A:	IYMAIGVSLAGVVIVLIEKQH--RAKLKEQNM*						
	:	:	:	:	:	:	:
B:	LYMAIAVSLSGIIIFIEKGLKSRK--EAN-*						
	361	370	380	390			

Fig. 4. Amino acid sequence homology between NorA polypeptides from *Staphylococcus aureus* (A) and from *Staphylococcus epidermidis* (B). Matched amino acids (:) and gaps (-) introduced for optimal alignment are indicated.

れるインバートリピート配列は、終止コドン（塩基番号1,732～1,734の位置）の下流1,801番目から1,837番目（配列のアンダーライン部分）に位置していた。

次に、この *S. epidermidis* 由来の遺伝子と、*S. aureus* 由来の *norA* 遺伝子<sup>11)</sup>との相同性をアミノ酸残基から比較した成績を Fig. 4 に示す。図中にコロンで示した箇所は両遺伝子間で同じアミノ酸であったことを表している。両遺伝子にコードされるポリペプチドは、*S. epidermidis* のそれが387個のアミノ酸残基からなるのに対し、*S. aureus* のそれは388個であり、アミノ酸残基数では1個の相違であり、また、両者のアミノ酸配列には79%の非常に高い相同性が認められた。

このような成績から、*S. epidermidis* の NFLX 耐

性遺伝子は *S. aureus* の *norA* 遺伝子に相当すると考えられたので、以後この遺伝子を *S. epidermidis* 由来の *norA* 遺伝子と呼称することにした。

### 3. NorA ポリペプチドの性状

*S. epidermidis* 由来の *norA* 遺伝子から演繹される NorA ポリペプチドのアミノ酸組成を *S. aureus* 由来のそれと比較した成績を Table 3 に示す、両者とも疎水性のアミノ酸であるロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンおよびメチオニン等に富むのが特徴である。*S. epidermidis* では、387個のアミノ酸のうち、疎水性のアミノ酸が44.7%を占めていた。この割合は *S. aureus* の場合もほとんど同様であった。

次に、Kyte および Doolittle のアルゴリズム<sup>14)</sup>を用いて、*S. epidermidis* および *S. aureus* の NorA

Table 3. Amino acid composition of the deduced NorA polypeptides of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*

<i>S. epidermidis</i>				<i>S. aureus</i>			
Amino Acid		Count	Mol%	Amino Acid		Count	Mol%
Gly	G	41	10.59	Gly	G	40	10.31
Ala	A	32	8.27	Ala	A	28	7.22
Val	V	27	6.98	Val	V	28	7.22
Leu	L	46	11.89	Leu	L	47	12.11
Ile	I	43	11.11	Ile	I	45	11.60
Ser	S	25	6.46	Ser	S	30	7.73
Thr	T	16	4.13	Thr	T	15	3.87
Cys	C	1	0.26	Cys	C	1	0.26
Met	M	16	4.13	Met	M	17	4.38
Asp	D	11	2.84	Asp	D	10	2.58
Asn	N	14	3.62	Asn	N	13	3.35
Glu	E	8	2.07	Glu	E	9	2.32
Gln	Q	8	2.07	Gln	Q	9	2.32
Arg	R	6	1.55	Arg	R	5	1.29
Lys	K	20	5.17	Lys	K	19	4.90
His	H	3	0.78	His	H	6	1.55
Phe	F	41	10.59	Phe	F	36	9.28
Tyr	Y	12	3.10	Tyr	Y	13	3.35
Trp	W	3	0.78	Trp	W	3	0.77
Pro	P	14	3.62	Pro	P	14	3.61
Asx	B	0	0.00	Asx	B	0	0.00
Glx	Z	0	0.00	Glx	Z	0	0.00
(Total 387)				(Total 388)			
Molecular Weight				Molecular Weight			
=42,117.9				=42,263.1			



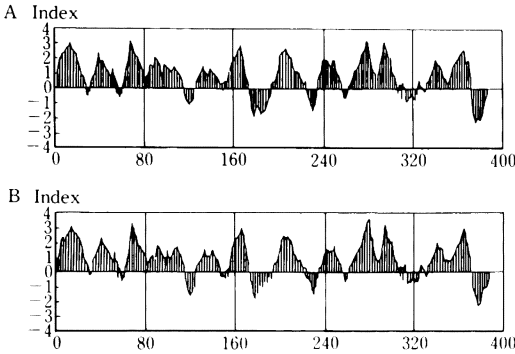


Fig. 5. Hydropathic profiles of the predicted amino acid sequence of the NorA polypeptides. The hydropathy was calculated according to the algorithm of Kyte and Doolittle<sup>14)</sup> A, *Staphylococcus epidermidis*; B, *Staphylococcus aureus*.

ポリペプチド疎水性プロファイルを解析した成績を Fig. 5 に示す。図中のプラス側は疎水性であることを表し、マイナス側は親水性を表している。両ポリペプチドとも 12 個の疎水性領域を有している。また、両ポリペプチドの平均ハイドロパシーが 0.5 以上であることから、これらは膜蛋白であることが示唆された。

#### 4. *norA* 形質転換株におけるニューキノロン薬の菌体内への取り込み

*norA* 形質転換株の *S. aureus* SA 113 (pTUS 105) 株におけるニューキノロン薬の菌体内への取り込みを、受容菌の SA 113 株と比較しながら検討した。標識化合物として [<sup>14</sup>C] ENX を用いた成績を Fig. 6 に示す。*norA* 形質転換株においては、SA 113 株に比して ENX の取り込みは約 50 % 程度に減少していたが、CCCP の添加によって、取り込み量は両菌株とも増し、*norA* 形質転換株では SA 113 株の約 70 % 程度までその取り込みが回復した。

一方、[<sup>14</sup>C] SPFX を用いた場合は、Fig. 7 に示すように、*norA* 形質転換株と SA 113 株との間にほとんど差を認めなかった。

#### 5. *S. epidermidis* を含めた CNS における *norA* 遺伝子の検索

pTUS 33 にクローン化された 2.2 kb の DNA 断片をプローブとして、CNS における *norA* 遺伝子と相同性のある遺伝子の検索を行った。その成績は Fig. 8 に示す。カラムの A から H までが *S. epidermidis*, I と J が *S. haemolyticus*, K と L が *S. simulans* である。これらの菌株のうち、*S. epidermidis* の D, E,

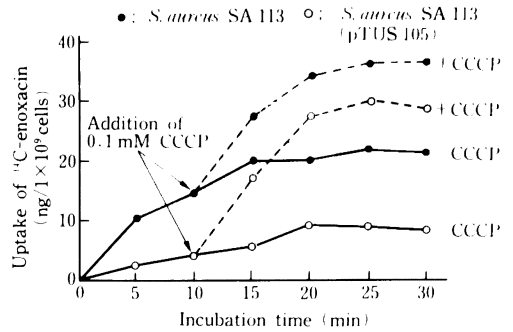


Fig. 6. Uptake of [<sup>14</sup>C] enoxacin by *Staphylococcus aureus* cells with or without 0.1 mM CCCP ●, *S. aureus* SA 113 (recipient strain); ○, *S. aureus* SA 113 (pTUS 105) containing the *norA* gene from *Staphylococcus epidermidis*.

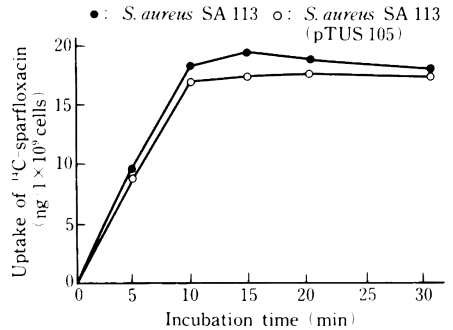


Fig. 7. Uptake of [<sup>14</sup>C] sparfloxacin by *Staphylococcus aureus* cells. ●, *S. aureus* SA 113 (recipient strain); ○, *S. aureus* SA 113 (pTUS 105) containing the *norA* gene from *Staphylococcus epidermidis*.

F, G および H, *S. haemolyticus* と *S. simulans* の菌株は、ニューキノロン薬感性の菌株である。M はコントロールのニューキノロン薬耐性の *S. aureus* から得た 5.5 kb の *Hind* III DNA 断片、N はこの実験に使用したプローブ DNA である。この図からも明らかのように、DNA 断片の長さは菌種により異なるが、菌種のいかに関わらず、*S. epidermidis* 由来のプローブ DNA とハイブリダイズする DNA 断片が認められた。

### III. 考 察

1980 年代の初期より臨床に登場したニューキノロン薬は、従来のキノロン薬に比べ、抗菌スペクトラムの飛躍的な拡大と、抗菌力の著しい増強がその特徴で

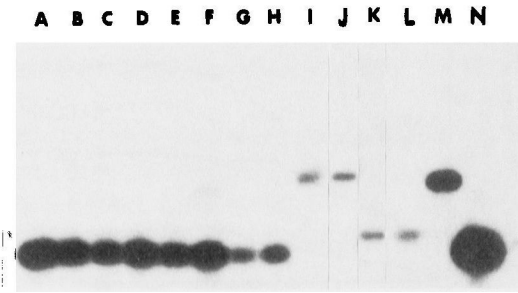


Fig. 8. Southern blot hybridization of *Hind* III-digested chromosomal DNA isolated from coagulase negative staphylococci. Purification of total DNA from each strain and subsequent hybridization procedures were done by the method described previously<sup>10)</sup>. The samples in each lane are as follows: A through H are from *Staphylococcus epidermidis*; A, TK 2135 (NFLX<sup>r</sup>); B, TK 2291 (NFLX<sup>r</sup>); C, TK 1223 (NFLX<sup>r</sup>); D, TK 1166 (NFLX<sup>s</sup>); E, TK 2198 (NFLX<sup>s</sup>); F, TK 2155 (NFLX<sup>s</sup>); G, TK 2214 (NFLX<sup>s</sup>); H, TK 2331 (NFLX<sup>s</sup>); I and J are from *Staphylococcus haemolyticus*; I, TK 2384 (NFLX<sup>s</sup>); J, TK 1350 (NFLX<sup>s</sup>); K and L are from *Staphylococcus simulans*; K, TK 1284 (NFLX<sup>s</sup>); L, TK 1286 (NFLX<sup>s</sup>); M, 5.5 kb DNA fragment containing the *norA* gene from *Staphylococcus aureus*; N, probe DNA containing the *norA* gene from *S. epidermidis*.

ある<sup>15)</sup>。それは、基本骨格の6位の側鎖にフッ素、7位にピペラジニル基、あるいはそれに近似した置換基を導入することによりもたらされたものである。これらのニューキノロン薬は、グラム陰性桿菌のみならず、グラム陽性球菌や嫌気性菌にも優れた抗菌活性を示すことから臨床の場において広く使用されている。ことに、経口薬でありながら、入院患者に対しても感染予防をも含めて使用されていることが特徴である。

これらのニューキノロン薬は、試験管内実験では、自然耐性菌の出現頻度が低い<sup>16)</sup>とされているのにも関わらず、入院患者においては、比較的早い時期から耐性菌が出現してきた。そして、その代表がMRSAにみられるニューキノロン薬耐性菌である<sup>1)</sup>。

言うまでもなく、ニューキノロン薬の主たる標的は、細菌細胞内においてDNA合成に関わる酵素のDNAジャイレースであり、薬剤がこの酵素活性を阻

害することによって抗菌力が発揮されることは、*E. coli* や *P. aeruginosa* の研究で明らかにされていることである<sup>17-21)</sup>。しかしながら、そのためには薬剤がまず細胞内の標的酵素に到達することが必要であり、薬剤の膜透過性の良否も重要な要素であることが知られている。このことを耐性機構の面から考えると、①膜透過性のレベルにおける耐性、②DNAジャイレースのレベルにおける耐性、③あるいはそれらが重複した耐性、等が考えられる。事実、*E. coli*<sup>22-27)</sup> や *P. aeruginosa*<sup>28-31)</sup>、あるいはその他の腸内細菌においては、そのような耐性機構による耐性菌の存在が報告されている。しかしながら、グラム陽性球菌におけるこのようなニューキノロン薬の耐性機構は、ほとんど未解明であった。

そのようなことから、著者らはMRSAの研究過程において、1986年にNFLX耐性の *S. aureus* の分離状況を1年間にわたって検索し、その報告を行うと同時に、なぜMRSAにおいてニューキノロン薬耐性菌が多く出現してくるのかということをも論及した。また、NFLX耐性の *S. aureus* から耐性に関わる遺伝子のクローニングを行い<sup>10)</sup>、クローン化された *norA* 遺伝子は、ニューキノロン薬に感性の *S. aureus* を中等度耐性へと変化させること、さらにはNorAポリペプチドは薬剤の菌体外排出機構に関わりを有する膜蛋白であることが推測されることをも報告してきた<sup>11)</sup>。

一方、*S. aureus* と同じく耐性菌が増加しつつあるCNSにおいても、ニューキノロン薬に対して耐性度の低い菌と比較的高い菌とが存在することから、CNSにおいても同様の耐性機構が働いているのではないかと考えた。すなわち、その耐性を支配する遺伝子を解析すれば、冒頭に述べたようにブドウ球菌のニューキノロン薬耐性の一端が明らかにできるのではないかと考えたのである。

結果の項で示したように、ニューキノロン薬耐性の *S. epidermidis* においても、*S. aureus* の *norA* ときわめて高い相同性を示す遺伝子が存在しており、それにコードされたNorAポリペプチドは、*S. aureus* のそれと同じ働きをしていることが示唆された。しかしながら、この遺伝子はニューキノロン薬耐性菌のみならず、感性のブドウ球菌にも存在していることがサザンハイブリダイゼーションにより示唆された。つまり、当該遺伝子はブドウ球菌に広く分布しているものと思われ、その遺伝子にコードされた疎水性の高いポリペプチドは、膜貫通性の蛋白として、本来は物質透過のチャンネルとして、もしくは菌体外への能動的な

物質汲みだし系として機能しているものと推察された。

ただし、この遺伝子によるニューキノロン薬耐性は、NorA ポリペプチドの産生が量的に増加するように変化したために菌体外へ汲みだされる薬剤量が相対的に多くなった結果生ずるものなのか、あるいは *norA* の特定部位の塩基が変異したことによって菌体外への薬剤の汲みだしが高まったものなのかについては、今回の実験成績からは明らかにできなかった。いずれにしても、比較的親水性の NFLX、ENX、CPFX、OFLX に比して、比較的疎水性の SPFX において MIC の変動が少なく、菌体外へ汲み出される薬剤量が著しく異なるという現象は、きわめて興味ある点である。*E. coli* においても NFLX 菌体外排出機構の存在が知られている<sup>32)</sup>が、それらを含めて今後解明されるべき重要な現象である。

もうひとつ、今回の実験から MRSA に限らずブドウ球菌のニューキノロン薬耐性機構を考える際に重要なことが示唆された。それは、耐性度の異なった菌株を用いて *norA* 遺伝子のクローニングをしても、MIC は確かに上昇するもののその値にはほとんど差がみられなかったこと、および *norA* 遺伝子のみでは必ずしも親株と同じ耐性度を惹起できなかったことである。*S. aureus* の *norA* 形質転換株は NFLX に対しては MIC 25  $\mu\text{g/ml}$  と非形質転換株より 64 倍耐性であったが、ENX には 12.5  $\mu\text{g/ml}$  (32 倍の MIC 上昇)、OFLX と CPFX には 1.56 ~ 3.13  $\mu\text{g/ml}$  (10 ~ 31 倍の MIC 上昇) の MIC を示し、TFLX には 0.2  $\mu\text{g/ml}$  (20 倍の MIC 上昇)、SPFX には 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (5 倍の MIC 上昇) の MIC であった。このように、耐性菌ではあるが MIC としてはやや低い値を示す菌株は、ニューキノロン薬耐性のブドウ球菌が出現し始めた 1986 年頃に多く分離されていた菌株であり、現在検出されている TFLX や SPFX に対しても 25  $\mu\text{g/ml}$  以上の MIC を示す高度耐性菌とは大きく異なっている。このような MIC の違いは、本論文で述べた薬剤の透過性レベルにおける耐性機構だけでは到底説明がつかない。膜透過性の変化は、臨床においてブドウ球菌がいち早くニューキノロン薬に耐性を示す主因ではあったとしても、現在みだされる高度耐性菌は、DNA ジャイレースのレベルにおける耐性が主たる耐性機構であるとも考えられるのである。

しかしながら、ブドウ球菌の DNA ジャイレースに関する研究<sup>33)</sup>とその遺伝子の解析は緒についたばかりである。今後それらを解明していくことによって、ブドウ球菌におけるニューキノロン薬の作用機序とそ

の耐性機構とが明らかにできるものと考えている。

本論文は、1990 年 5 月に長崎において開催された第 38 回日本化学療法学会総会において受賞した、第 1 回「上田 泰学術奨励賞」の援助により達成されたものである。

#### 文 献

- 1) 紺野昌俊, 大成 滋, 伊藤直子, 生方公子, 橋本ゆかり, 川上小夜子: フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性菌の動向。感染症誌 62: 641 ~ 651, 1988
- 2) 後藤 元, 後藤美江子, 岡 慎一, 島田 馨, 清水喜八郎, 五島瑳智子, 上野一恵, 原 耕平: 本邦における ofloxacin 耐性菌の現況。1986 年から 1988 年にかけての分離状況と他の抗菌薬に対する感受性。Chemotherapy 38: 1 ~ 8, 1990
- 3) 出口浩一, 他 9 名: 臨床分離のニューキノロン耐性菌, 多剤耐性菌の年次的推移に関する検討。I. グラム陽性球菌。Chemotherapy 38: 1013 ~ 1019, 1990
- 4) 藤原政治, 白井 亜, 瀬尾一史, 西本憲治: 尿中分離菌の ofloxacin に対する感受性。Chemotherapy 39: 124 ~ 128, 1991
- 5) Grimm H: Resistance trend of ofloxacin and ciprofloxacin: Monitoring of more than 300,000 strains in the last 5 years. 3rd International Symposium on New Quinolones (Vancouver, Canada) 1990; Abstr no 123
- 6) Desgrandchamps D, Munzinger J: Changes of *in vitro* resistance to ciprofloxacin and norfloxacin from 1987 through 1989. 3rd International Symposium on New Quinolones (Vancouver, Canada) 1990; Abstr no 124
- 7) Soussy C J, Acar J F, Bergogneberezin E, Thabaut A, Courtieu A L, Dabernat H, Duval J, Fleurette J, Morel C: Evolution and present status of resistance to pefloxacin among hospital bacteria. 3rd International Symposium on New Quinolones (Vancouver, Canada) 1990; Abstr no 205
- 8) Allouch P, Alvarez C, Barthel V, Pangon B, Ghnassia J C: Changes in resistance to pefloxacin after three years intensive use in a French Hospital. 3rd International Symposium on New Quinolones (Vancouver, Canada) 1990; Abstr no 128
- 9) Shalit I, Berger S A, Gorea A, Frimerman H: Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a general hospital. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 593 ~ 594, 1989
- 10) Ubukata K, Itoh-Yamashita N, Konno M: Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1535 ~ 1539,

- 1989
- 11) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M: Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriology* 172: 6942 ~ 6949, 1990
  - 12) Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1982
  - 13) Messing J: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101: 20 ~ 78, 1983
  - 14) Kyte J, Doolittle R F: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105 ~ 132, 1982
  - 15) 上田 泰, 清水喜八郎, 紺野昌俊, 松本文夫編: キノロン薬 ライフサイエンス, 東京, 1991
  - 16) 佐藤謙一, 井上松久, 三橋 進: DL-8280 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性評価. *Chemotherapy* 32 (S-1): 1 ~ 12, 1984
  - 17) Bourguignon G J, Levitt M, Sternglantz R: Studies on the mechanism of action of nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 479 ~ 486, 1973
  - 18) Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M H, Ito T, Tomizawa J: Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4772 ~ 4776, 1977
  - 19) Higgins N P, Peebles C L, Sugino A, Cozzarelli N R: Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1773 ~ 1777, 1978
  - 20) Horowitz D S, Wang J C: Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 262: 5339 ~ 5344, 1987
  - 21) Wolfson J S, Hooper D C, Swartz M N: Mechanism of action and resistance to quinolone antimicrobial agents. In *Quinolone antimicrobial agents* (Wolfson J S and Hooper D C ed.), p 5 ~ 34, American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1989
  - 22) Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone-resistant strain of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 777 ~ 780, 1986
  - 23) Hirai K, Aoyama H, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 248 ~ 253, 1986
  - 24) Nakamura S, Napamura M, Kojima T, Yoshida H: *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 254 ~ 255, 1989
  - 25) Hooper D C, Wolfson J S, Souza K S, Tung C, McHugh G L, Swartz M N: Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 639 ~ 644, 1986
  - 26) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1271 ~ 1272, 1990
  - 27) Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, Nakamura S: Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 367 ~ 373, 1986
  - 28) Chamberland S, Bayer A S, Schollaardt T, Wong S A, Bryan L E: Characterization of mechanisms of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in vitro and in vivo during experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 624 ~ 634, 1989
  - 29) Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 582 ~ 586, 1987
  - 30) Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Nakamura S: Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1273 ~ 1275, 1990
  - 31) 加藤広行, 都築 博, 伊豫部志津子: 臨床由来緑膿菌のニューキノロン剤耐性変異について. *Chemotherapy* 38: 1003 ~ 1012, 1990
  - 32) Cohen S P, Hooper D C, Wolfson J S, Souza K S, McMurry L M, Levy S B: Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1187 ~ 1191, 1988
  - 33) Takahata M, Nishino T: DNA gyrase of *Staphylococcus aureus* and inhibitory effect of quinolones on its activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1192 ~ 1195, 1988

THE *norA* GENE CONFERRING NEW QUINOLONE RESISTANCE  
IN *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Kimiko Ubukata, Mutumi Sugiura and Masatoshi Konno

Department of Clinical Pathology, Teikyo University, School of Medicine,

2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

A 2.2-kb *Hind* III DNA fragment containing the norfloxacin (NFLX) resistance gene was cloned from chromosomal DNA of new quinolone-resistant *Staphylococcus epidermidis*. The cloned DNA fragment was introduced into quinolone-susceptible *Staphylococcus aureus* SA 113, for which MICs of NFLX, enoxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, tosufloxacin and sparfloxacin were 0.39, 0.39, 0.1, 0.2, 0.01 and 0.02  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The resultant transformant was resistant to the above new quinolones with MICs of 25, 12.5, 3.13, 1.56, 0.2 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The cloned DNA fragment has an open reading frame of 1,161 base pairs that encoded a polypeptide of 387 amino acid residues with the molecular weight of 42,118. This polypeptide was rich in hydrophobic amino acids and was estimated to be membrane-associated. The amino acid sequence of the polypeptide was one amino acid fewer than that of the NorA polypeptide of *S. aureus* in numbers, and showed 79% amino acid identity with the latter polypeptide. The polypeptide produced by DNA-directed translation using the cloned DNA fragment as a template showed the molecular weight of about 42,000 which was consistent with the estimated value. Therefore, the open reading frame was considered to be the *norA* gene of *S. epidermidis*, a homologue of the *S. aureus norA* gene cloned previously. The cells of *S. aureus* SA 113 having the *S. epidermidis norA* gene uptook less enoxacin (about 50% of *S. aureus* SA 113 lacking the *norA* gene) and the uptake was recovered to about 70% when carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone was added. These results suggest that the NorA polypeptide encoded by the *norA* gene of *S. epidermidis* is located in the cell membrane and concerns energy-dependent active efflux of hydrophilic new quinolones.