

臨床分離緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来ストレプトマイシン耐性の 大腸菌における発現と耐性上昇について

濱島 肇・佐野 敏・川崎 秀且

駒木 葉子・新井 武利

昭和薬科大学微生物学研究室*

(平成3年8月26日受付・平成4年3月3日受理)

臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* から分離された R プラスミドに支配されるストレプトマイシン (SM) 耐性の発現と耐性上昇について大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いて解析した。

(1) *P. aeruginosa* の SM 耐性プラスミド (pSA 1700) を *E. coli* の形質転換により導入する際、得られる SM 耐性形質転換株の SM の MIC は選択薬剤の種類による影響を受けた。

(2) SM 耐性形質転換株の SM の MIC は SM による前処理後、未処理時に比べ2~8倍に上昇した。

(3) プラスミドの解析から SM 耐性上昇に関与する遺伝子は pSA 1700 の BamHI 断片 (3.5 kb) に存在した。

以上のことから *P. aeruginosa* ST 1700 には SM 前処理により SM 耐性値が上昇する性質があることが明らかとなった。

Key words: 緑膿菌, SM 耐性, SM 耐性上昇, R プラスミド

細菌の主な薬剤耐性を支配している R プラスミドによる薬剤耐性機構は詳細に解析され、R プラスミドは遺伝子組換えに応用されるに至っている。しかし、一方でテトラサイクリン (TC)¹⁾、マクロライド系薬剤²⁾あるいはフォスホマイシン³⁾においてプラスミド性の不活化による耐性機構が見いだされるなど、新たな耐性機構も発見されている。著者らは *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤耐性プラスミドについて検討してきたが⁴⁾その過程でストレプトマイシンの前処理により SM 耐性値が上昇するという現象を新たに見いだしたので報告する。

I. 材料と方法

1. 供試菌株およびプラスミド

臨床分離 *P. aeruginosa* ST 1700 株には 32.6 kb のプラスミド pSA 1700 (SM^r, スペクチノマイシン耐性 SPCM^r, 塩化第二水銀耐性 HgCl₂^r およびサルファ剤耐性) と 68.5 kb のプラスミド pSA 1701 (TC^r, カルベニシリン耐性) が存在している⁴⁾。このうちプラスミド pSA 1700 DNA を Birnboim と Doly の方法⁵⁾により精製して本実験に使用した。プラスミド DNA 受容菌として *Escherichia coli* C 600, *E. coli* JM 109 および *P. aeruginosa* PAO 4141 を用いた。また SM 耐

性プラスミドの N 3⁶⁾, R 17⁷⁾ および R 483⁸⁾ がそれぞれ存在する *E. coli* K 12 J 53 も使用した。クローニングベクターとしてアンピシリン ABPC 耐性の pUC 19 を用いた。

2. 使用培地および薬剤

細菌の増殖には L-broth および L 寒天を用いた⁹⁾。MIC 測定は Mueller-Hinton Agar (Difco) を用いた。薬剤はいずれも Sigma 社の製品を用いた。

3. SM 耐性遺伝子のクローニング

プラスミド pSA 1700 DNA を制限酵素 BamHI (TOYOBO) により切断し、pUC 19 の BamHI 部位に T 4 Ligase (TOYOBO) を用いて連結した。その後この DNA を Hamashima らの方法¹⁰⁾により *E. coli* の形質転換を行い導入株を得た。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

日本化学療法学会標準法に準じて寒天平板希釈法で測定した。

5. SM 前処理の菌の増殖に与える影響の検討

Fernandes らの方法¹¹⁾により行った。すなわち対数増殖期の菌液を低濃度の SM (MIC の 1/128~1/16 濃度) で 37°C、一定時間処理し、種々の濃度の SM

* 東京都町田市東玉川学園 3

の一定量を加え菌の増殖をバイオフィトレコーダー TN-112 D (東洋科学産業株式会社) を用いて記録した。

6. SM 前処理後の MIC の測定

小林らの β -lactamase の誘導法¹²⁾ を一部変更して行った。すなわち SM の前処理濃度 (1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む Mueller-Hinton broth に前培養液を 10% (v/v) 接種し、37°C、2 時間振盪培養した。この培養液について SM の MIC を上記 (4) の MIC 測定法により測定した。

7. SM 不活化酵素の検出

Kono ら¹³⁾ の方法にしたがって行った。すなわち SM 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ により 2 時間前処理した細胞を TMK 溶液 (100 mM トリス・塩酸緩衝液, 60 mM 塩化カリウム, 10 mM 塩化マグネシウム, 6 mM 2-メルカプトエタノール, pH 7.8) で洗浄後, 同溶液に懸濁した。この懸濁液を超音波処理し, 遠心上清を粗酵素液として SM 不活化反応を行った。粗酵素液, 40 mM ATP および SM を 37°C, 24 時間反応させたのち, 反応液中の SM の残存活性を *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を検定菌として用いた微生物検定法で測定した。上記の方法における SM 検出限界値は 6.25 μM であった。不活化が認められた反応液については 100°C, 5 分間加熱した後の遠心上清にアルカリ性フォスファターゼ (シグマ社) を加え 37°C, 24 時間反応後, さきの微生物検定法で抗菌活性を測定した。

II. 結 果

1. 選択薬剤の形質転換株の SM 耐性におよぼす影響

プラスミド pSA 1700 DNA を用いた *E. coli* C 600 の形質転換の際, 選択薬剤により得られる形質転換株の SM の MIC に差が認められた。すなわち SM で選択して得られたものは MIC 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 一方, Hg-Cl₂ で選択して得られたものは MIC 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した (Table 1)。さらに詳細に解析を進めるために pUC 19 に pSA 1700 の BamHI 断片 (3.5 kb) を組み込み SM-SPCM 耐性を示す pSA 330 を作製し, 形質転換によりこの組換え体を 2 種類の *E. coli* に導入し, 以後の実験に用いた (Fig. 1)。選択薬剤による SM の MIC の発現の差を Table 1 に示す。受容菌が C 600 あるいは JM 109 においても SM で選択されたほうが高い MIC 値を示した。SM 耐性発現の差は C 600 (2 倍) より JM 109 (16 倍) において明確であった (Table 1)。

受容菌に *E. coli* JM 109 を用いたとき選択薬剤に

Table 1. Influence of selective drugs on SM MICs of transformants

Plasmid	Recipient	Selective drug	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a
pSA 1700	<i>E. coli</i> C 600	SM	200
		HgCl ₂	25
pSA 330	<i>E. coli</i> C 600	SM	200
		ABPC	100
	<i>E. coli</i> JM 109	SM	100
		ABPC	6.25

a: MICs of SM on transformant strains without SM-pretreatment.

SM, streptomycin; ABPC, ampicillin.

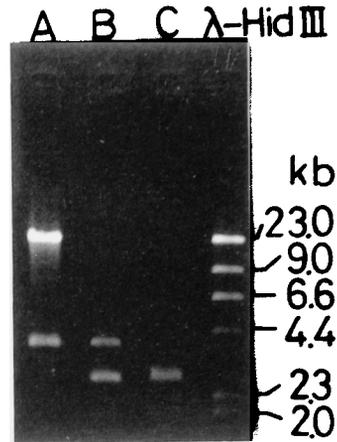


Fig. 1. Bam HI restriction endonuclease analysis of plasmid pSA 1700 (A), and the chimeric plasmid pSA 330 (B) and pUC 19 (C).

Fragment patterns were obtained by agarose gel electrophoresis. The sizes (in kb) of lambda Hind III fragments are indicated on the right.

ABPC を用いて得られる形質転換株の SM の MIC は受容菌のそれとほとんど差がなかった。これについてはさらに以下の実験を行った。選択薬剤として SM あるいは ABPC を用いて得られたそれぞれの形質転換株からプラスミドを精製し, *E. coli* JM 109 の再形質転換を繰り返した。得られた形質転換株について SM の MIC を測定した。さきの Table 1 に示したように SM の MIC が低い (6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 形質転換株から得たプラスミドを用いても, SM で選択すると MIC の高い形質転換株が得られた。逆に, MIC の高い (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 形質転換株のプラスミドを用いても SM で選択しなければ得られる形質転換株の SM の

Table 2. MICs of SM against transformant strains with and without SM-pretreatment

Host strain	plasmid	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		SM		ratio (T/N)	SPCM		ratio (T/N)
		T*	N		T	N	
<i>E. coli</i> C 600	none	3.13	3.13	1	12.5	12.5	1
	pSA 1700	200	50	4	400	100	4
	pSA 330	100	25	4	200	100	2
<i>E. coli</i> JM 109	none	3.13	3.13	1	6.25	6.25	1
	pSA 330	50	6.25	8	50	12.5	4

a: Cells grown in the presence of 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of SM per ml.

SM, streptomycin; SPCM, spectinomycin.

MIC は低かった。

2. SM 前処理の菌の増殖に与える影響

菌の増殖速度の増加は前処理 SM 濃度が 0.39~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で起こり、至適濃度は SM 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった。この前処理により MIC の 2~4 倍濃度の SM を加えても未処理の場合に比べ増殖速度が速く、SM 前処理の効果が明らかに認められた (Fig. 2)。

3. SM 前処理後の MIC の測定

まず、SM 処理による SM と SPCM の MIC におよぼす影響を *P. aeruginosa* ST 1700 と *P. aeruginosa*

PAO 4141 (pSA 1700) について調べた。しかし、ともに MIC が $\geq 1,600 \mu\text{g/ml}$ と高く SM 処理の効果を MIC の差として検出できなかった。よって、以後の実験は *E. coli* について行った。SM 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間処理後、SM と SPCM の MIC を未処理のものと比較した。Table 2 に示すように、C 600 株においては pSA 1700, あるいは pSA 330 を保持する株はいずれも SM 処理により SM の MIC が 100~200 $\mu\text{g/ml}$ まで上昇し、耐性値の上昇が認められた。JM 109 株においても 6.25 $\mu\text{g/ml}$ から 25 $\mu\text{g/ml}$ (4 倍) の上昇が認められた。SPCM の MIC も SM 処理により 2~3 倍の耐性上昇が認められた。一方、対照に用いた N 3, R 1 あるいは R 483 を持つ株では SM の MIC 値の上昇はまったく認められなかった。

4. SM 不活化酵素の検出

SM 前処理後の粗酵素について SM 不活化酵素活性を検討した結果を Table 3 に示す。*P. aeruginosa* ST

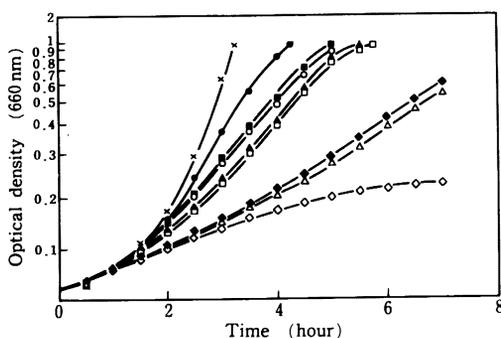


Fig. 2. Growth curves of *Escherichia coli* C 600 (pSA 330) strain in the presence or absence of streptomycin (SM).

E. coli C 600 (pSA 330) was cultured in SM-free medium (x) or in broth containing 50, 100, 200 and 400 μg of SM per ml with (●, ■, ▲, ◆) or without (○, □, △, ◇) SM-pretreatment. SM-pretreatment was performed by incubation in the presence of 1.56 $\mu\text{g/ml}$ of SM per ml.

Table 3. Inactivation of streptomycin

Strains	Inactivation
<i>P. aeruginosa</i> ST 1700	+
<i>P. aeruginosa</i> PAO 4141	-
<i>P. aeruginosa</i> PAO 4141 (pSA 1700)	+
<i>E. coli</i> C 600	-
<i>E. coli</i> C 600 (pSA 1700)	-
<i>E. coli</i> C 600 (pSA 330)	-
<i>E. coli</i> JM 109	-
<i>E. coli</i> JM 109 (pSA 1700)	-
<i>E. coli</i> JM 109 (pSA 330)	-

Crude extract, ATP and SM were mixed and incubated at 37°C for 24 h. Symbols: (+), inactivated; (-), not inactivated.

1700 および *P. aeruginosa* PAO 4141 (pSA 1700) に SM の不活化活性が認められたが、*E. coli* においては いずれも SM 不活化酵素活性は検出されなかった。不活化活性が認められた *P. aeruginosa* ST 1700 と *P. aeruginosa* PAO 4141 (pSA 1700) の反応液についてアルカリ性フォスフォターゼによる脱リン酸化反応を行ったが、SM の再活性化は起こらなかった。

III. 考 察

P. aeruginosa から精製したプラスミド pSA 1700 を用いた *E. coli* の形質転換において、形質転換株の選択の際に用いる薬剤の影響と考えられる耐性発現の差が認められ、SM を選択に用いない場合に比較して MIC に 2~16 倍もの差が見られた。プラスミド pSA 1700 から BamHI 断片として SM・SPCM 耐性領域を pUC 19 に組み込んだプラスミド pSA 330 を使用した場合でも SM 耐性発現の差が認められた。また受容菌を変えても同様の現象が認められた。しかし、*P. aeruginosa* 由来のプラスミド pSA 1700 あるいは pSA 330 を持つ株でも形質転換株を選択する際に、HgCl₂ あるいは ABPC をそれぞれ選択薬剤を用いた場合は SM 耐性の上昇は認められなかった。したがって、SM・SPCM 耐性遺伝子が存在するにもかかわらず、SM による選択圧を受けないかぎりその高い MIC 値は発現しないものと考えられる。

前処理に用いる至適 SM 濃度は 1.56 µg/ml であったが、より低濃度でも SM の耐性値の上昇は起こり得た。これは SM 感受性と思われる株でも微量の SM によって SM 耐性が引き起こされる可能性を示している。薬剤前処理による耐性上昇現象は耐性誘導としてテトラサイクリン¹⁴⁾、エリスロマイシン¹¹⁾、クロラムフェニコール¹⁵⁾、β-ラクタム剤¹²⁾、およびバンコマイシン¹⁶⁾等に知られている。今回検討した SM 耐性上昇はどのようなメカニズムによるのかについては詳細に検討中である。

SM による耐性上昇に関する遺伝子は pSA 1700 の制限酵素 BamHI 断片 (3.5 kb) に SM 耐性領域とともに存在し、解析に用いた受容菌あるいはプラスミドの影響を受けないことが再形質転換実験により明らかになった。*P. aeruginosa* の薬剤耐性あるいは R プラスミドについてはこれまで詳細に検討されてきており報告も数多い¹⁷⁾。しかし、我々の知るかぎりにおいては、*P. aeruginosa* の R プラスミドによる SM 耐性に限らず、SM 前処理によるアミノ配糖体の耐性上昇現象に関する報告はこれまでない。さらに実験方法を検討中であるが、これまでのところ *P. aeruginosa* の前処理による MIC の差が検出できず、*P. aeruginosa* に

おいては耐性上昇が発現しているのか不明であった。また対照として用いた SM 耐性の R プラスミドは *P. aeruginosa* 由来ではないが、この現象は認められなかった。以上のことから SM・SPCM 耐性上昇現象は実験に用いたプラスミド pSA 1700 の特徴的な性質なのか、*P. aeruginosa* の R プラスミドを含め、耐性上昇に関与する遺伝子の分布についても検討が必要である。SM 耐性機構はアデニル化酵素^{13,18)}、リン酸化酵素^{13,19)}などの修飾酵素による不活化、あるいは不活化酵素によらないもの²⁰⁾が知られている。実験に使用した SM 耐性は *P. aeruginosa* においてのみ不活化活性が検出された。不活化が認められた *P. aeruginosa* ST 1700 と *P. aeruginosa* PAO 4141 (pSA 1700) の反応液についてアルカリ性フォスフォターゼによる脱リン酸化反応を行った。SM の再活性化は起こらなかったことから SM 耐性機構はアデニル化酵素によるものと示唆される。さらに *E. coli* では SM 耐性を発現するものの不活化酵素が検出されない点については *E. coli* の SM 耐性値が *P. aeruginosa* ほど上昇しないことから、Bryan¹⁸⁾が述べているように不活化酵素の産生量が *E. coli* ではかなり低いために検出されないのではないと思われる。

前処理により耐性が増加する現象が SM、SPCM 耐性にも見られ、その遺伝子は *E. coli* でも発現した。このことはアミノ配糖体抗生物質の使用および MIC の測定にあたっては今後十分な注意が必要であることを示唆している。

謝 辞

P. aeruginosa PAO 4141 を分与して下さった信州大学医学部細菌学教室、松本 顕樹先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Speer B S, Salyers A A: Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J Bacteriol* 171: 148~153, 1989
- 2) Arthur M, Courvalin P: Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 694~700, 1986
- 3) Arca P, Rico M, Braña A F, Villar C J, Hardison C, Suárez A E: Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1552~1556, 1988
- 4) Arai T, Kusama H, Hasegawa H, Hatanaka H, Hamashima H: Characterization of two plasmids, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pharmacobiodyn.* 8: s-38, 1985

- 5) Birnboim H C, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513~1523, 1979
- 6) Datta N, Hedges R W: Compatibility groups among β -R factors. *Nature* 234: 222~223, 1971
- 7) Hedges R W: R factor from *Providencia*. *J.G.M.* 81: 171~181, 1974
- 8) Datta N, Barth P T: Compatibility properties of R 483, a member of the I plasmid complex. *J Bacteriol* 125: 796~799, 1976
- 9) Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982
- 10) Hamashima H, Nakano T, Tamura S, Arai T: Genetic Transformation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, and *Vibrio cholerae* Non 0-1 with plasmid DNA by electroporation. *Microbiol Immunol* 34: 703~708, 1990
- 11) Fernandes P B, Baker W R, Freiberg L A, Hardy D J, McDonald E J: New macrolides active against *Streptococcus pyogenes* with inducible or constitutive type of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 78~81, 1989
- 12) 小林寅詰, 手塚孝一, 佐藤弓枝, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 西田 実, 五島嵯智子: 抗緑膿菌 β -ラクタム剤による緑膿菌の β -lactamase 誘導と薬剤感受性について。 *Chemotherapy* 37: 1453~1457, 1989
- 13) Kono M, Hamashima H, O'hara K: Modification of aminoglycoside antibiotics by clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. *J Antibiot* 34: 224~230, 1981
- 14) Levy S B: Resistance to the tetracyclines. *In* Antimicrobial Drug Resistance (Bryan L E ed.), p.191~240, Academic press, Orland, Florida, 1984
- 15) Smith A L, Burns J L: Resistance to chloramphenicol and fusidic acid. *In* Antimicrobial Drug Resistance (Bryan L E ed.), p.293~313, Academic press, Orland, Florida, 1984
- 16) Shlaes D M, Bouvet A, Devine C, Shlaes J H, Alobeid S, Williamson R: Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A 256. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 198~203, 1989
- 17) Jacoby G A: Resistance plasmids of *Pseudomonas*. *In* The bacteria., 10, The biology of *Pseudomonas* (Sokatch J R ed.), p.265~282, Academic press, Orland, Florida, 1986
- 18) Bryan L E: Aminoglycoside Resistance. *In* Antimicrobial Drug Resistance (Bryan L E ed.), p.242~273, Academic press, Orland, Florida, 1984
- 19) 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簡便測定法とその臨床分離 *P. aeruginosa* への応用。 *Chemotherapy*: 34: 282~285, 1986
- 20) Kono M, O'hara K: Mechanism of streptomycin (SM)-resistance of highly SM-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Antibiot* 29: 169~175, 1976

EXPRESSION OF INCREASABLE RESISTANCE TO STREPTOMYCIN
IN *ESCHERICHIA COLI* FROM A CLINICAL ISOLATE OF
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Hajime Hamashima, Satoshi Sano, Hidekatsu Kawasaki,
Yoko Komaki, and Taketoshi Arai
Department of Microbiology, Showa College of Pharmaceutical Sciences,
Machida, Tokyo 194, Japan

Expression of increasable resistance to streptomycin (SM) from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* was studied. SM resistance plasmid pSA 1700 was introduced into *Escherichia coli* by transformation.

(1) High-level resistance to SM was expressed in transformants only when SM was used as a selective drug.

(2) The MICs SM for strains of *E. coli* transformants were 2 to 8 times higher after SM-pretreatment than that without pretreatment.

(3) The gene conferring resistance to SM was located on a 3.5 kb BamHI fragment of plasmid pSA 1700.

On the basis of these experiments, *P. aeruginosa* ST 1700 was classified as having increasable resistance to SM.