

キノロン系薬耐性の分子遺伝学

山 岸 純 一・清 水 當 尚

大日本製薬株式会社創薬研究所*

(平成 13 年 4 月 2 日受付・平成 13 年 4 月 12 日受理)

キノロン耐性は、標的酵素である DNA ジャイレース（ジャイレース）ならびに DNA トポイソメラーゼⅣ（トポⅣ）の変異および外膜による菌体内へのキノロン透過性障壁や排出ポンプの亢進による菌体内キノロン濃度の低下によりおこることが明らかになっている。ジャイレースやトポⅣのサブユニット A をコードする *gyrA* 遺伝子あるいは *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域（QRDR）に変異が生じると、細菌はキノロン耐性を獲得する。大腸菌の場合、キノロン耐性変異のホットスポットは、GyrA では 83 番目のセリンと 87 番目のアスパラギン酸であり、ParC では 80 番目のセリンと 84 番目のグルタミン酸である。*gyrA* と *parC* との 2 重変異はキノロンに高度耐性を示すことが知られている。ジャイレースやトポⅣのサブユニット B をコードする *gyrB* 遺伝子あるいは *parE* 遺伝子のキノロン耐性変異は、臨床分離株での検出頻度は低いが、キノロン耐性メカニズムの解明のためには重要である。キノロン耐性トポⅣ変異の変異部位およびアミノ酸変異の種類は、ジャイレース変異の場合と類似していることより、トポⅣのキノロン耐性メカニズムはジャイレースと類似していると思われる。キノロンの 2 種類の標的酵素のうち、より感受性のよい酵素が菌の感受性を決定すると考えられている。キノロンの一次標的酵素は、グラム陽性菌ではトポⅣであり、グラム陰性菌ではジャイレースである。しかし、肺炎球菌ではスパルフロキサシンの一次標的はジャイレースである。このようにトポⅣあるいはジャイレースのどちらの酵素が一次標的であるかは菌種およびキノロンの種類に関連している。キノロン耐性メカニズムに関し、排出ポンプの亢進機構は菌体内キノロン蓄積量低下の主たる原因となる。排出ポンプとして黄色ブドウ球菌では NorA そして肺炎球菌では PmrA が見出されている。緑膿菌では、少なくとも 4 種類の異なったマルチコンポーネント型の排出ポンプシステムつまり MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN および MexXY-OprM が存在しており、それらの発現が多剤耐性化を引き起こすことが知られている。キノロン耐性メカニズムの研究は、耐性菌に有効な薬の開発あるいは臨床での薬剤選択に役立つのみならず、細菌の生理機能をより深く理解することにつながるものと考えられる。

Key words: mechanisms of quinolone resistance, DNA gyrase, DNA topoisomeraseⅣ, efflux pump

1962 年にナリジクス酸（NA）が発見されて以来、キノロン薬としてピロミド酸、シノキサシン、ビペミド酸が次々と開発されたが、これらオールドキノロンは、主としてグラム陰性菌に対して抗菌力を示し、主に尿路感染症および腸管感染症に使用されていた。したがって、オールドキノロン時代（1960 年～1970 年代）には、キノロン薬の使用量はそれほど多いものではなかった。また広域ペニシリンやセフェムが数多く開発され、全身感染症のみならず尿路や腸管感染症にも広く使用されていた。このような環境下では、キノロン薬は多くの使用薬剤のひとつにすぎず、キノロン耐性菌の分離頻度はあまりめだたなかった。また、このころの薬剤耐性菌の蔓延は、主として多剤耐性 R プラスミドの菌種間の伝達によるものであったが¹⁾、キノロン耐性のプラスミドによる伝達が認められなかったことも²⁾、キノロン耐性菌の出現頻度が低かった一因と思われる。しかし、1980 年代に入り、スペクトルが広く抗菌力の強いニューキノロン薬が次々と開

発され、組織移行性も良好なことから、種々の感染症に広く使用されるようになり、ニューキノロン薬の使用量は飛躍的に増大した。特に尿路感染症では、ニューキノロン薬は特効薬として高頻度で使用されるようになり、それに伴いキノロン耐性菌が次第に増加した。とりわけ、黄色ブドウ菌や緑膿菌などの院内感染菌では、キノロン耐性菌の分離頻度が高いことが報告されている^{3,4)}。病院内では抗菌薬の使用頻度が高いため、キノロン薬も大量に使用されており、また黄色ブドウ球菌とりわけ MRSA や緑膿菌感染症は難治であることが耐性菌の分離頻度を高くしている理由と考えられている。以上のような背景により、キノロン耐性菌が出現し増加したものであると思われる。キノロン耐性菌の耐性メカニズムについては、近年多くの研究者により精力的に行われ、分子レベルで解析が可能になってきた。また一方そのことにより病原菌の巧みな防御機構も明らかになりつつある。

一般的に抗菌薬の耐性メカニズムとしては、1 標的酵素の

*大阪府吹田市江の木町 33-94

変異, 2 菌体内薬剤蓄積量の変化, 3 薬剤不活化酵素の産生, などが知られている。キノロン耐性は, 標的酵素である DNA ジャイレース (ジャイレース) ならびに DNA トポイソメラーゼ IV (トボIV) の変異によるキノロン薬との親和性の低下, および外膜による菌体内へのキノロン透過性障壁や排出ポンプの亢進による菌体内キノロン濃度の低下によりおこることが明らかになっている。本総説では, 研究の進んでいる大腸菌, 緑膿菌, 黄色ブドウ球菌および肺炎球菌などのキノロン耐性メカニズムを中心に概説する。

I. 標的酵素の変異

キノロン薬の標的酵素は, 長い間ジャイレースのみであると考えられてきたが, 現在ではトボIVもキノロン薬の標的酵素であることが明確になっている。これら標的酵素に変異がおこると, 作用部位の荷電や局所構造が変化してキノロン薬に対する親和性が低下し, その結果キノロン薬との結合が弱まることにより, 標的酵素はキノロン薬に耐性化すると考えられている。

1. DNA ジャイレース変異

ジャイレースは, 1976 年, Gellert らにより発見された酵素である⁵。この酵素は, 2 本鎖 DNA を一時的に切断し再結合する II 型トポイソメラーゼで, DNA スーパーコイルリング反応などを触媒することにより, DNA の高次構造を変換する⁶。Table 1 に示すように, 大腸菌のジャイレースは, *gyrA* 遺伝子⁷⁻⁹ (染色体地図上: 48 分に位置) がコードする GyrA サブユニット (875 アミノ酸, 分子量 97 kDa) 2 分子と, *gyrB* 遺伝子^{10,11} (83 分に位置) がコードする GyrB サブユニット (804 アミノ酸, 分子量 90 kDa) 2 分子からなる 4 量体である¹²。GyrA サブユニットの N 末端側 59 kDa のドメインが, DNA の切断と再結合活性を担っており, GyrB サブユニットの N 末端側 43 kDa のドメインには, ATP 加水分解活性を有している¹³⁻¹⁵ (Fig. 1 参照)。ジャイレースは, DNA 複製, 転写, 組換えという重要な機能に関係しており, 細菌が生存するために必須の酵素である。この酵素は, 真核生物に存在せず, 細菌に特有の酵素の

ため, 抗菌薬の優れたターゲットである。キノロン作用機構の初期の研究で, NA が細菌の DNA 複製を阻害することが見出された^{16,17}。そこで, DNA 複製に関与している蛋白, たとえば DNA polymerase I, endonuclease I などに対する作用が検討されたが, NA が阻害作用を示すものは認められず, キノロンの標的酵素は不明のままであった。しかしジャイレースが発見されると, ジャイレースのスーパーコイルリング活性が NA, オキシリン酸 (OA) によって阻害されることが Gellert や杉野らにより見出され, NA 耐性菌より精製されたジャイレースの場合 OA の感受性が耐性化することが報告され

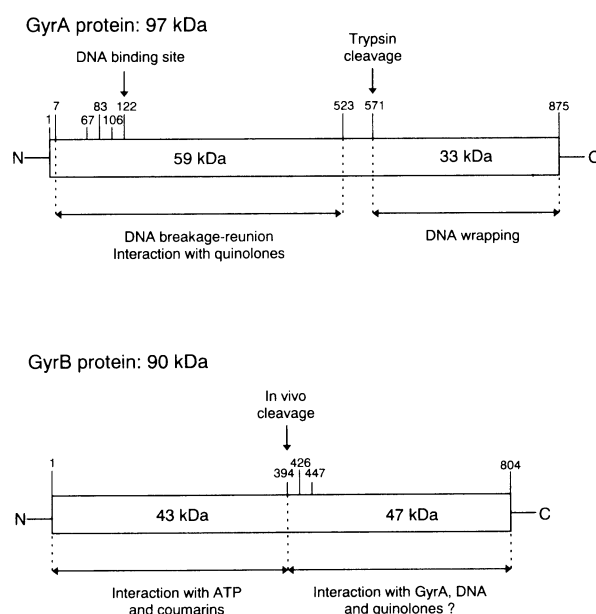


Fig. 1. Proposed domain structure of *Escherichia coli* DNA gyrase. The gyrase proteins are represented as linear blocks, with the positions of various amino acids shown. Quinolone-resistance mutations are indicated at positions 67, 83, and 106 of the GyrA protein and 426 and 447 of the GyrB protein. The active tyrosine site is also shown at position 122 of the GyrA protein. Adapted from reference 15.

Table 1. Properties of *Escherichia coli* DNA gyrase and *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV

<i>E. coli</i>		
	DNA gyrase	DNA topoisomerase IV
Gene (min)	<i>gyrA</i> (48) <i>gyrB</i> (83)	<i>parC</i> (65) <i>parE</i> (65)
Subunit	GyrA (875 aa, 97 kDa) GyrB (804 aa, 90 kDa)	ParC (752 aa, 84 kDa) ParE (630 aa, 70 kDa)
Homology (%)		GyrA : ParC (36) GyrB : ParE (49)
Subunit structure	Tetramer (GyrA) ² · (GyrB) ²	Tetramer (ParC) ² · (ParE) ²
Reactions	Supercoiling Decatenation Relaxation	Decatenation Relaxation

た^{18,19)}。これらのことより、キノロンの標的酵素は、ジャイレースであることが明らかになった。また、NA 耐性遺伝子 *nalA* がコードする NalA 蛋白が、ジャイレースの GyrA サブユニットと同一であること¹⁹⁾、ならびにクーママイシン耐性遺伝子 *cou* がコードする Cou 蛋白がジャイレースの GyrB サブユニットであること²⁰⁾が明らかにされるに伴い、ジャイレースの GyrA サブユニット変異がキノロン耐性を惹起し、GyrB サブユニット変異は、クーママイシン耐性に関係していると思われた。しかし、新しい NA 耐性遺伝子 *nalC* および *nalD* が山岸らによって解析された結果、これらの耐性遺伝子は *gyrB* 遺伝子の対立遺伝子変異であることが判明した^{21,22)}。現在では、キノロン耐性は、*gyrA* あるいは *gyrB* 遺伝子のいずれの変異によっても生じることが知られている。

大腸菌 GyrA のキノロン耐性変異は、*gyrA* 遺伝子内の点変異によって惹起され、その変異部位は GyrA 蛋白の N 末端近くのアミノ酸番号 67~106 番目までの比較的狭い領域に局在することが吉田らにより明らかになった⁹⁾。この領域は、キノロン耐性変異が生じやすいホットスポットであり、quinolone resistance-determining region (QRDR) と名づけられている⁹⁾。キノロン耐性度は GyrA 変異の種類やキノロン薬により異なるが、83 番目のセリン (Ser-83) がロイシンやトリプトファンに変異した場合、および 87 番目のアスパラギン酸 (Asp-87) がアスパラギンに変異した場合、一般に高い。キノロン耐性臨床分離株から *gyrA* 変異株とりわけ Ser-83 変異株が高頻度に検出されるが、これは Ser-83 変異株の耐性度が高く、そのため選択されやすいと考えられる。*gyrA* 変異株は一般にすべてのキノロン薬に耐性を示すが、シプロフロキサシン (CPFX) に耐性で NA に感受性を示す特異な *gyrA* 変異株 (Q-2) も報告されている。この変異は、81 番目のグリシンがアスパラギン酸に変化している²³⁾。またキノロン耐性 *gyrA* 変異遺伝子は野生型 *gyrA* 対立遺伝子に対し劣性であることが知られている²⁴⁾。Table 2 および Fig. 2 に大腸菌、緑膿菌、淋菌、黄色ブドウ菌、肺炎球菌、腸球菌などのキノロン耐性 GyrA 変異について、その変異部位および変異アミノ酸の種類について比較した。この他に種々の菌種については、中村および Piddock の総説を参照されたい^{55,56)}。結論として、種々の菌株のキノロン耐性 GyrA 変異はいずれも QRDR 内に局在し、変異部位や変異アミノ酸の種類は大腸菌の場合と同様であることが判明した。

大腸菌 GyrB のキノロン耐性変異として現在までに、426 番目のアスパラギン酸 (Asp-426) がアスパラギンに変わる変異と 447 番目のリジン (Lys-447) がグルタミン酸に変わる変異が見出されている¹⁰⁾。Asp-426 変異株はすべてのキノロン薬に耐性であるが、Lys-447 変異株は NA のような酸性キノロン薬に耐性である

が、ニューキノロン薬のような両性基のキノロン薬には高度感受性を示す⁵⁷⁾。キノロン耐性臨床分離株から *gyrB* 変異株はほとんど検出されないが、これは *gyrB* 変異株のキノロン耐性度が *gyrA* 変異株より低いためと考えられる。実験室内で適当な選択条件を用いれば *gyrB* 変異株は、*gyrA* 変異株とはほぼ同じ頻度で検出される²⁴⁾。キノロン耐性 *gyrB* 変異遺伝子も野生型 *gyrB* 対立遺伝子に対し劣性であることが知られている²⁴⁾。Table 3 および Fig. 3 に大腸菌、サルモネラ、淋菌、黄色ブドウ菌、肺炎球菌のキノロン耐性 GyrB 変異を示すが、それらの変異部位や変異アミノ酸の種類は大腸菌の場合と同様である。種々の菌種のキノロン耐性株の GyrA および GyrB 変異が類似しているということは、キノロン耐性メカニズムが菌種間で類似していることを類推させるものである。

Maxwell らは、大腸菌 GyrA の N 末端側 59 KDa ドメインの三次元構造を決定した⁶³⁾。その結果、DNA 鎖が十分に通過できるホールが形成されていること、DNA との結合に関与している 122 番目のチロシンが上部サドル様構造のくぼみに存在していること、さらに GyrA のキノロン耐性変異のホットスポットつまり QRDR が、活性中心である Tyr-122 と非常に近い位置に局在しており、キノロン耐性変異の大多数はダイマー上部接合部の境界面である Head dimmer interface と呼ばれる領域に存在していることが判明した (Fig. 4 に示す酵母トポイソメラーゼ II 断片の模式図を参照)。その他の遺伝学的、生化学的解析データをふまえて考えると^{64~66)}、QRDR における変異が GyrA ダイマーにより形成されるサドル様構造上での DNA と Tyr-122 との共有結合状態に影響を与え、キノロン・ジャイレース・DNA の三者複合体が形成されにくくなると推測できる。一方、大腸菌 GyrB についても N 末端側 43 KDa ドメインの三次元構造が明らかになったが⁶⁷⁾、GyrB のキノロン耐性変異は C 末端側 47 KDa ドメイン内の末端部位に存在し、43 KDa ドメイン内に認められない (Fig. 1 参照)。そこで、Wang らが報告した酵母トポイソメラーゼ II の 92 KDa 断片 (GyrB の C 末端側 47 KDa ドメインと GyrA の N 末端側 59 KDa ドメインが連結したものに相当) の三次元構造のデータを参考にする⁶⁸⁾、意外なことに GyrB のキノロン耐性変異部位に対応する部位は活性中心である Tyr-122 および GyrA の QRDR と離れていることが判明した。これら GyrB 変異がどのようにしてキノロンとジャイレースとの結合に影響をおよぼすのか不明であったが、最近 Fass らによりコンフォーメーション変化の構造が示され、それによると GyrB 変異部位が QRDR と空間的に接近する可能性が示唆されている⁶⁹⁾。

2. DNA トポイソメラーゼ IV 変異

トポ IV は、1990 年、加藤らにより見出された新しい

Table 2. Quinolone resistance mutations in GyrA and ParC (GrlA) subunits

Organism	GyrA		ParC (GrlA)	
	amino acid change	reference	amino acid change	reference
<i>E. coli</i>	Ala-67→Ser Gly-81→Cys, Asp Ser-83→Ala, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Val Ala-84→Pro Asp-87→Ala, Asn, Gly, His, Lys, Thr, Tyr, Phe, Ser, Val Gln-106→Arg, His	9, 25-33	Gly-78→Cys Ser-80→Arg, Ile Glu-84→Gly, Lys	87, 89-91
<i>E. faecalis</i>	Ser-83→Arg, Asn, Ile Glu-87→Gly	34-36	Ser-80→Arg, Ile Glu-84→Ala	35
<i>H. influenzae</i>	Ser-84→Leu, Tyr Asp-88→Asn, Tyr	37	Ser-84→Ile Glu-88→Lys	37
<i>K. pneumoniae</i>	Ser-83→Phe, Tyr Asp-87→Ala, Asn, Gly	38, 39	Ser-80→Arg, Ile Glu-84→Gly, Lys	39
<i>N. gonorrhoeae</i>	Ala-75→Ser Ser-91→Phe, Tyr Asp-95→Asn, Gly	40-44	Gly-85→Cys Asp-86→Asn Ser-87→Ile Ser-88→Pro Glu-91→Gly Arg-116→Leu	41, 85, 92, 93
<i>P. aeruginosa</i>	Thr-83→Ile Asp-87→Asn, Gly, His, Tyr	45, 46	Ser-80→Leu Glu-84→Lys	94
<i>S. pneumoniae</i>	Ser-84→Phe, Tyr Glu-88→Lys	47, 48	Ser-79→Phe, Tyr Ser-80→Tyr Asp-83→Gly Asp-84→His	47, 48
<i>S. aureus</i>	Asp-73→Gly Ser-84→Ala, Leu, Phe, Val Ser-85→Pro Glu-88→Gly, Lys	49-54	Ser-80→Phe, Tyr Ser-81→Pro Glu-84→Lys Ala-116→Glu, Pro	49, 77, 78, 95, 96

Abbreviations of amino acids: Ala: alanine, Cys: cysteine, Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, Phe: phenylalanine, Gly: glycine, His: histidine, Ile: isoleucine, Lys: lysine, Leu: leucine, Met: methionine, Asn: asparagine, Pro: proline, Glu: glutamine, Arg: arginine, Ser: serine, Thr: threonine, Val: valine, Trp: tryptophan, Tyr: tyrosine

II型トポイソメラーゼである⁷⁰⁾。Table 1に示すように大腸菌のトポIVは、ジャイレースと同様にデカテネーション活性ならびにリラクシング活性を有しており、デカテネーション活性は、ジャイレースよりも強いことが知られている。しかし、ジャイレースとは異なり、スーパーコイル活性を保持していない。大腸菌のトポIVは、*parC* 遺伝子（染色体地図上約 65 分に位置）がコードする ParC サブユニット（752 アミノ酸、分子量 84 kDa）2 分子と *parE* 遺伝子（約 65 分に位置）がコードする ParE サブユニット（630 アミノ酸、分子量 70 kDa）2 分子から構成される 4 量体で、ジャイレースと相同性が高い^{70,71)}。ParC 蛋白は、GyrA と 36%、ParE は GyrB と 49% のアミノ酸配列が同一である。トポIVは、DNA 複製終了直後の娘 DNA をデカテネートして分離させるという重要な機能をもっており、細菌が生存するために必須の酵素である⁷²⁾。最近トポIVもジャイレ

ースと協調して DNA 複製に重要な役割を担っていることが明らかになった⁷³⁾。トポIV発見後、間もなく、加藤らおよび Peng らは、キノロンがトポIVのリラクシング活性を阻害することを見出したが^{72,73)}、その阻害濃度は、ジャイレースの場合よりも 30 倍以上高かった。また、星野らは、トポIVのデカテネーションを阻害するキノロン濃度と抗菌活性との間に相関関係を認め、トポIVにおけるデカテネーション活性の重要性を示した⁷⁴⁾。しかし、トポIV変異をもつキノロン耐性株が分離されなかったことから、トポIVがキノロンの標的酵素であるのか否かは不明であった。

1994 年、Ferrero らは黄色ブドウ球菌より *gyrase-like* 遺伝子をクローニングし、*grlA* および *grlB* と命名し、これら遺伝子のコードする蛋白の混合物がトポIV特有の DNA リラクシング活性および DNA デカテネーション活性を有することを見出した⁷⁵⁾。一方、小島らは、

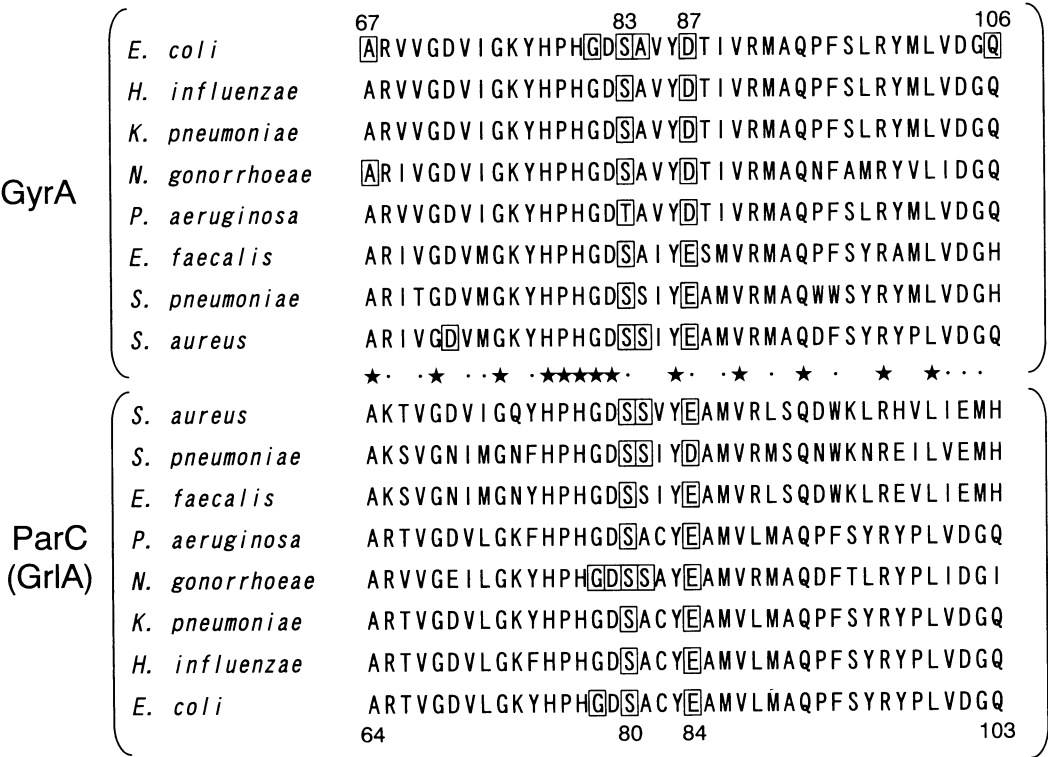


Fig. 2. Alignment of the quinolone-resistance-determining regions of GyrA and ParC (GrlA) and a comparison of mutation sites responsible for quinolone resistance. The major mutation sites are numbered on either the top or bottom of the wild-type amino acid sequences of GyrA and ParC in *Escherichia coli*. Identical and conserved amino acids aligned with all sixteen QRDR sequences are represented in the GyrA group and ParC group by stars (★) and dots (·), respectively. Sites associated with quinolone-resistance are indicate by squares (□).

Table 3. Quinolone resistance mutations in GyrB and ParE (GrlB) subunits

Organism	GyrB		ParE (GrlB)	
	amino acid change	reference	amino acid change	reference
<i>E. coli</i>	Asp-426→Asn Lys-447→Glu	10	Leu-445→His	98
<i>N. gonorrhoeae</i>	Asp-419→Asn	58, 59		
<i>S. pneumoniae</i>	Glu-475→Lys	60	Asp-435→Asn Pro-454→Ser	60, 101
<i>S. typhimurium</i>	Ser-464→Tyr	61		
<i>S. aureus</i>	Asp-437→Asn Arg-458→Gin Pro-456→Ser	54, 62	Asp-432→Val Arg-470→Asp	62, 96

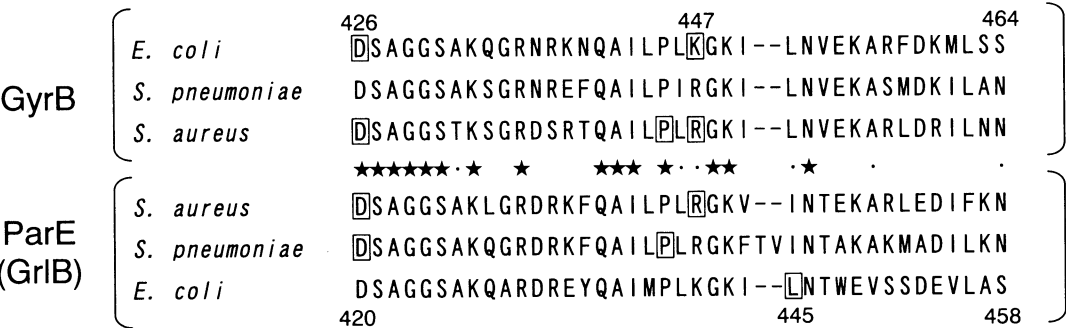


Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of GyrB and ParE (GrlB) and a comparison of mutation sites responsible for quinolone-resistance.

キノロン耐性 MRSA 株から新規キノロン耐性遺伝子をクローニングし、そのうちのひとつが変異 *grlA* 遺伝子であることを明らかにした⁷⁶⁾。このことより、トポIV変異がキノロン耐性を惹起することが証明されたと同時に、トポIVもまたキノロンの標的酵素であることが明らかになった。臨床分離キノロン耐性株のすべてに *grlA* 変異が認められたが、*gyrA* 変異は、耐性度の高い株でしか検出できなかった。また、実験室内で黄色ブドウ球菌から段階的に耐性株を分離すると *gyrA* 変異株よりも *grlA* 変異株が優先的に選択されることが明らかになった⁷⁷⁾。これらのことより、黄色ブドウ球菌の場合、トポIVがキノロンの一次標的酵素であり、ジャイレースは、

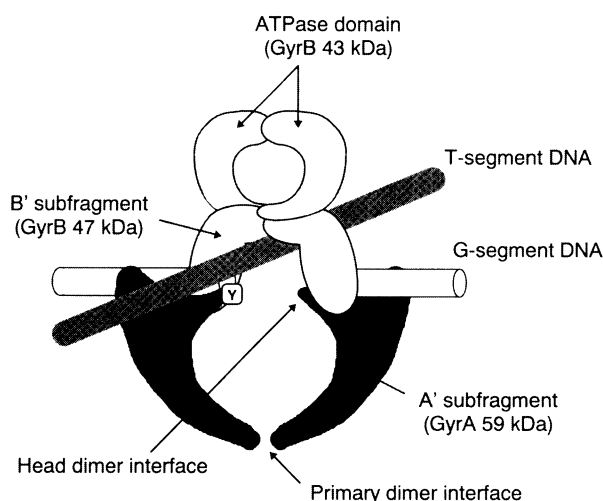


Fig. 4. A hypothetical molecular model for the catalytic reaction of yeast DNA topoisomerase II. This figure shows the T-segment transport step into the central hole according to the two-gate model. The B' and A' subfragments of the yeast DNA topoisomerase II correspond significantly with the C-terminal 47 kDa domain of GyrB and the N-terminal 59 kDa domain of GyrA, respectively. The active tyrosine site is indicated by [Y]. Adapted from reference 68.

二次標的酵素であろうと推定された。山岸らは、*grlA* 変異とキノロン耐性との関係をクローン化 *grlA* 遺伝子を用いた相補性試験で解析した⁷⁸⁾。Table 4 に示すように、キノロン感受性 RN 4220 に変異 *grlA* 遺伝子をもつプラスミド (pRK 3) を入れるとキノロンに耐性化し、染色体上の *gyrA* 変異によりさらに耐性化する。ところが、この高度耐性株から pRK 3 プラスミドを脱落させると、染色体上には *gyrA* 変異があっても、キノロンに感受性化することが明らかになった。この結果から、変異 *grlA* 遺伝子はジャイレースの場合とは異なり野生型対立遺伝子に対し優性であること、キノロン高度耐性を惹起するためには *grlA* 変異と *gyrA* 変異の両方が必要であること、さらにノルフロキサシン (NFLX) や CPFXX の一次標的はトポIVであることが結論づけられた。両標的酵素のうち、キノロン薬により感受性の高い酵素 (一次標的酵素) が菌のキノロン感受性 (MIC) を決定すると考えられた。そこで、小山田および藤本らはジャイレース単独変異株およびトポIV単独変異株の抗菌力を比較することにより、各種キノロン薬の一次標的を推定した^{79,80)}。その結果、Table 5 に示すように、黄色ブドウ球菌では NFLX, CPFXX およびレボフロキサシン (LVFX) などの大部分のキノロン薬の一次標的はトポIVであったが、ナジフロキサシン (NDFX) の場合はジャイレースであり、スパルフロキサシン (SPFX) の場合はトポIVとジャイレースの両方を一次標的にしていることが推測された。この結果は酵素レベルの実験データによっても裏づけされた。

Fisher らは、実験室内で段階的に SPFX 耐性肺炎球菌を分離すると、*parC* 変異よりも *gyrA* 変異が優先的に選択されることから、肺炎球菌では SPFX の一次標的はジャイレースであると推察した⁸¹⁾。また福田らも SPFX およびガチフロキサシン (GFLX) の一次標的はジャイレースであり、トロバフロキサシン, LVFX, NFLX, CPFXX の一次標的はトポIVであることを報告し

Table 4. Increase in quinolone susceptibility of quinolone-resistant *gyrA* mutants of *Staphylococcus aureus* RN 4220 caused by eliminating the plasmid carrying the mutated *grlA* gene

<i>S. aureus</i>	Chromosome <i>gyrA</i>	Plasmid <i>grlA</i>	MIC (μg/mL)		
			SPFX	NFLX	CPFXX
RN 4220	Wild type	no gene	0.1	0.78	0.39
RN 4220/pRK 3	Wild type	S 80 F, E 84 K	0.2	6.25	1.56
RN 4220-G 1/pRK 3	S 84 L	S 80 F, E 84 K	12.5	100	50
RN 4220-G 2/pRK 3	S 84 L, S 85 P	S 80 F, E 84 K	100	100	50
RN 4220/pUB 110	Wild type	no gene	0.1	0.78	0.39
RN 4220-G 1/pUB 110	S 84 L	no gene	0.1	0.78	0.39
RN 4220-G 2/pUB 110	S 84 L, S 85 P	no gene	0.1	0.78	0.39

S 84 L, Ser-84→Leu; S 85 P, Ser-85→Pro; S 80 F, Ser-80→Phe; E 84 K, Glu-84→Lys

SPFX: sparfloxacin, NFLX: norfloxacin, CPFXX: ciprofloxacin

First-step and second-step *gyrA* mutants of RN 4220 with pRK 3 carrying the mutated *grlA* gene (S 80 F and E 84 K). RN 4220-G 1/pRK 3, and RN 4220-G 2/pRK 3 were transformed with pUB 110, a plasmid that lacks the *grlA* gene and is incompatible with pRK 3. All transformants became as quinolone-susceptible as the transformant of the parent strain, RN 4220/pUB 110.

Table 5. Quinolone susceptibility of quinolone-resistant mutant of *Staphylococcus aureus* RN 4220 and inhibitory activity of quinolones on DNA gyrase and DNA topoisomerase IV

Quinolone	MIC (μg/mL)			Ratio ¹	IC ₅₀ (μg/mL)		Ratio ²
	RN 4220 ¹	RN 4220-T 1 ²	RN 4220-G 1 ³		Gyrase ⁵	TopoIV ⁶	
ENX	0.78	6.25	0.78	8	300	50	6
NFLX	0.78	12.5	0.78	16	75	12.5	6
CPFX	0.39	1.56	0.39	4	25	9.4	3
LVFX	0.2	0.39	0.2	2	12.5	6.25	2
SPFX	0.1	0.2	0.2	1	12.5	12.5	1
NDFX	0.025	0.025	0.1	0.25	6.25	25	0.25

ENX: enoxacin, NFLX: norfloxacin, CPFX: ciprofloxacin, LVFX: levofloxacin, SPFX: sparfloxacin, NDFX: nedifloxacin

¹ wild-type strain² GrlA (Ser-80→Phe) mutant of RN 4220³ GyrA (Ser-84→Leu) mutant of RN 4220⁴ MIC against RN 4220-T 1/MIC against RN 4220-G 1⁵ inhibition on supercoiling activity⁶ inhibition on decatenation activity⁷ IC₅₀ against DNA gyrase/IC₅₀ against DNA topoisomerase IV decatenation

た⁸²⁾。クリナフロキサシンは *gyrA* 変異あるいは *parC* 変異をもつキノロン耐性肺炎球菌に対し親株とほぼ同等の抗菌力を示すこと、さらに *gyrA* 変異株の分離頻度は $5 \sim 8.5 \times 10^{-10}$ と低いことから、クリナフロキサシンの一次標的はジャイレースとトポIVの両酵素であると考えられている⁸³⁾。最近、一次標的がトポIVである CPFX の7位のピペラジン基をベンゼンスルホンアミド基に置換すると、一次標的がトポIVからジャイレースに変換することから、7位の置換基が一次標的酵素の選択に関与していると考えられ興味深い⁸⁴⁾。

淋菌のキノロン高度耐性株では、*gyrA* 変異と *parC* 変異の両変異が認められたが^{85, 86)}、キノロン低度耐性株では黄色ブドウ菌の場合とは異なり *gyrA* に変異が見出された。このことは、淋菌の場合、キノロンの一次標的酵素は、ジャイレースであることを示唆している。すなわち、キノロンの一次標的酵素は、グラム陰性菌とグラム陽性菌では異なる可能性がある。Heising らおよび Khodursky らは、大腸菌の場合、トポIVはキノロンの二次標的酵素であると結論づけている⁸⁷⁻⁸⁹⁾。また、*parC* 単独の変異株は検出されていないが、*gyrA* 変異に *parC* 変異が加わることによりさらに高度耐性化することが知られている。以上のことより、ジャイレースとトポIVは、いずれもキノロンの標的酵素であるが、どちらの酵素がキノロンの一次標的になるかは、キノロン薬の種類によっても、また菌種によっても異なることが明らかになってきた。

Table 2 および Fig. 2 に大腸菌、緑膿菌、淋菌、黄色ブドウ菌、肺炎球菌、腸球菌のキノロン耐性 *parC* (*grlA*) 変異を示す。それらの大部分の変異部位は大腸菌 GyrA の QRDR に対応する領域に局在していたが、例外として黄色ブドウ球菌で GrlA の 116 番目のアラニンからグルタミン酸あるいはプロリンへの変異が認められた⁹⁵⁾。この変異は黄色ブドウ球菌の GrlA と GyrA で高度に保

存された領域にあり、大腸菌 GyrA の活性中心である Tyr-122 に対応する 120 番目のチロシンの近傍にある。さらに黄色ブドウ球菌で珍しい変異つまり GrlA の 43 番目のアルギニンからシステインへの変異、157 番目のプロリンからロイシンへの変異および 176 番目のアラニンからスレオニンへの変異が見出された⁹⁷⁾。これらの変異は、いずれも大腸菌 GyrA の QRDR に対応する領域に局在しないことから、これら変異株の選択に用いたブレマフロキサシンが従来のキノロン薬とは異なった作用様式でトポIVと相互作用をするというメカニズムが想定されている。

Hooper らは、大腸菌で NFLX に耐性を示す *nfxD* 変異を見出したが、この変異は *parE* 遺伝子の対立遺伝子変異であった⁹⁹⁾。*nfxD* 変異は、445 番目のロイシンがヒスチジンへ変化しており、*gyrA* 遺伝子の変異に伴いキノロン耐性を惹起した。Fig. 3 に示すように、この変異は大腸菌 GyrB の 451 番目のロイシンに対応しており、447 番目のリジンの4アミノ酸下流に位置していた。黄色ブドウ球菌 GrlB 変異として、432 番目のアスパラギン酸からアスパラギンへの変異および 470 番目のアスパラギンからアスパラギン酸への変異が見出され、これらの変異はキノロンに低度耐性を示した⁹⁹⁾。興味深いことに、470 番目の変異はキノロン耐性を示すと共にノボビオシンに高感受性を示した⁹⁹⁾。このような耐性パターンを示す特殊な変異は、GrlA の 116 番目のアラニンからグルタミン酸に変わる変異でも見つかつており⁹⁵⁾、キノロン薬とはジャイレースの作用点異なるノボビオシンの感受性にどのようにして影響を与えるのか、関心がもたれる。*parE* (*grlB*) 変異株も *gyrB* 変異株と同様にキノロン耐性度が低いために、キノロン耐性株からほとんど分離されない。いままでに検出された *parE* (*grlB*) 変異株は少ないが、Fig. 3 に示すように、ParE (GrlB) 変異部位もほとんど大腸菌 GyrB の 426

番目あるいは447番目の近傍に局在している。以上のことから、トポIVのキノロン耐性メカニズムは、トポIV変異が多くの場合ジャイレース変異と対応していることより、ジャイレースの場合と類似している可能性が高いと考えられる。

II. 菌体内薬剤蓄積量の変化

グラム陰性菌では、外膜の透過性障壁によるキノロン耐性が以前から指摘されていたが¹⁰⁰、最近キノロンの菌体外への排出を亢進させることにより、菌体内のキノロン濃度を低下させるという薬剤排出蛋白質に関する研究が緑膿菌や黄色ブドウ球菌などで著しく進展している。

1. グラム陰性菌

大腸菌においては、Fig. 5に示すように、外膜のリポポリサッカライド (LPS) や物質透過孔であるポーリン蛋白質の変異による透過性障壁および排出蛋白質による汲み出し機能亢進などのメカニズムの連携により、キノロン耐性を惹起することが知られている。ポーリン蛋白質 OmpF は、キノロン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンおよびβ-ラクタムの主要透過孔と考えられ、その欠損あるいは減少変異株は多剤耐性を示すことが報告されている¹⁰²。さらに、MarRAB オペロンと SoxRS オペロンの両方が、キノロンを含む多剤に耐性を与えることが知られている。抗菌薬の存在あるいはリプレッサーである MarR の変異により MarA 蛋白質が発現し、*micF* 遺伝子の転写活性化により、ポーリン蛋白質 OmpF が減少して透過性が低下する。同時に MarA は他の遺伝子の転写活性化に関与して薬剤排出蛋白質の亢進も惹起する¹⁰³⁻¹⁰⁵。大腸菌の排出ポンプは、*acrAB-tolC* システムであり、AcrB は細胞質膜、AcrA はペリ

プラズムに存在し、TolC は外膜蛋白質である^{106,107}。一方酸素ストレスに対して活性化された *soxRS* オペロンは、リプレッサーである SoxR 変異により SoxS 蛋白質の発現を促し、各種遺伝子の転写活性化を引き起こすとともに、*marRAB* オペロンにも働きかけて MarA 蛋白質の発現を亢進させる¹⁰⁸という複雑なメカニズムが明らかになっている。

緑膿菌においては、キノロンの菌体内蓄積量を減少させる変異として、*nalB*、*nfxB* および *nfxC* 変異が知られている。*nalB* 変異株は、キノロンの他に構造の異なるβ-ラクタム、クロラムフェニコールなどに耐性であるが、アミノ配糖体には高感受性を示す¹⁰⁹。キノロンの取り込みを調べると、キノロンの蓄積量の低下が見られるが、この低下が carbonylcyanoide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) 添加により解除されることから、菌体外への排出促進によってキノロン耐性を獲得していると結論された。この *nalB* 変異株では、OprM 外膜蛋白質の増加が認められており、これがキノロンの排出促進にかかわっていると考えられた。OprM 蛋白質は、*mexAB-oprK* オペロンの *oprK* の遺伝子産物であることが後藤らにより判明し、*mexAB-oprM* と修正された^{110,111}。オペロンの塩基配列解析から、MexB (1046 アミノ酸残基) は細胞質膜に、MexA (383 アミノ酸残基) はペリプラズムに存在して、外膜の OprM (477 アミノ酸残基) と協力して、薬剤を菌体外へ排出するというシステムが考えられている。OprM は、野生株においても一定量の発現が認められており、これが緑膿菌の自然耐性の原因であると考えられている¹¹²。*nalB* 変異は *mexAB-oprM* オペロンのリプレッサー遺伝子 *mexR* の対立遺伝子変異であることが明らかになった。*mexR*

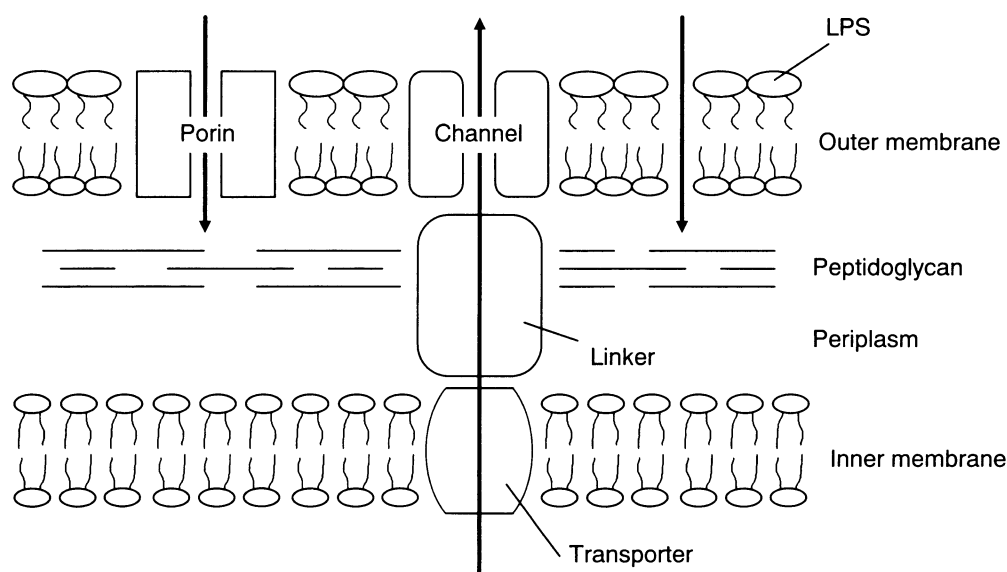


Fig. 5. Schematic model of the cell envelope showing the major outer membrane uptake systems and the multidrug efflux systems. Adapted from reference 100.

(*nalB*) 変異により MexA, MexB, OprM が過剰発現し、その結果、大量の薬剤排出ポンプが構築され、キノロンに耐性化するものと考えられる¹¹³ (Fig. 6 参照)。

nfxB 変異株では、 β -ラクタムやアミノ配糖体に高感受性を示すとともにキノロン耐性を示し、NFLX の蓄積量の減少¹¹⁴ ならびに、OprJ 外膜蛋白質の出現が認められている¹¹⁵。*nfxB* 変異を相補する遺伝子として野生株からクローン化された野生型 *nfxB* 遺伝子は、すでに知られている DNA 結合蛋白質と相同性が高く、何らかの遺伝子の調節遺伝子と推測されていた。後藤らは OprJ の部分アミノ酸配列を用いて、*mexAB-oprM* と類似した *mexCD-oprJ* オペロンをクローン化した¹¹⁶。さらに、*mexR (nalB)* 遺伝子が *mexAB-oprM* の上流に存在することと同様に、*nfxB* 遺伝子が *mexCD-oprJ* の上流に位置していることが判明した (Fig. 6 参照)。*nfxC* 変異株では、キノロン、イミペネム、クロラムフェニコールに耐性を示すが、 β -ラクタムやアミノ配糖体には高感受性である¹¹⁷。*nfxC* 変異株では、OprN 外膜蛋白質 (50 KDa) の出現とともに、OprD 外膜蛋白質 (46 KDa) の減少が見られた^{117,118}。OprD の減少はキノロン感受性と関係ないと考えられている¹¹⁹。精製された OprN の部分アミノ酸配列を用いて、3 番目のオペロン *mexEF-oprN* がクローン化された¹²⁰。Fig. 6 に示すように、この場合も上流に *nfxC* 遺伝子が存在することが明らかになった。MexEF-OprN のそれぞれの遺伝子がコードするアミノ酸配列は、MexAB-OprM および MexCD-OprJ のそれぞれと約 50% のホモロジーをもっていた。最近、*mexAB*, *mexCD*

および *mexEF* と類似した排出蛋白遺伝子として *mexXY* がクローン化された¹²²。MexXY は OprM を利用することによりマルチコンポーネント型の排出システムを構築し、アミノ配糖体やテトラサイクリンを排出することが判明した¹²³。以上のことより緑膿菌には少なくとも 4 種のマルチコンポーネント型の排出システムが同定されたが、今後それらの発現調節機構の総括的な解明が期待される。

2. グラム陽性菌

1989 年、生方らは臨床分離キノロン耐性黄色ブドウ球菌から、キノロン耐性遺伝子 *norA* 遺伝子をクローン化した¹²⁴。塩基配列の解析から、NorA 蛋白は分子量約 4.2 万の疎水性蛋白で、12 個の膜貫通領域を有しており、グラム陰性菌のテトラサイクリン排出ポンプ (TetA, B, C) と高い相同性を持つ膜蛋白質であることが判明した¹²⁵。*norA* 遺伝子をプラスミド上に保有する形質転換体は、NFLX や CPFx などの親水性キノロン薬に中等度耐性を示すが、NA, OA, SPFX などの比較的疎水性のキノロン薬には、ほとんど耐性を示さない^{125,126}。しかし、竹之内らによりキノロン分子全体の親水性あるいは疎水性の程度が、NorA ポンプにより排出されやすさの要因でなく、キノロン骨格の 7 位置換基の嵩高さおよび 8 位置換基の親水性および嵩高さが関係していることが明らかにされた¹²⁷。NorA 発現亢進株は NFLX をエネルギー依存的に菌対外へ汲み出すので、*norA* はキノロン排出ポンプの構造遺伝子であると考えられている。NorA はキノロンのみならず、エチジウムブロミド (EtBr)、アクリジンオレンジ (AO)、ピ

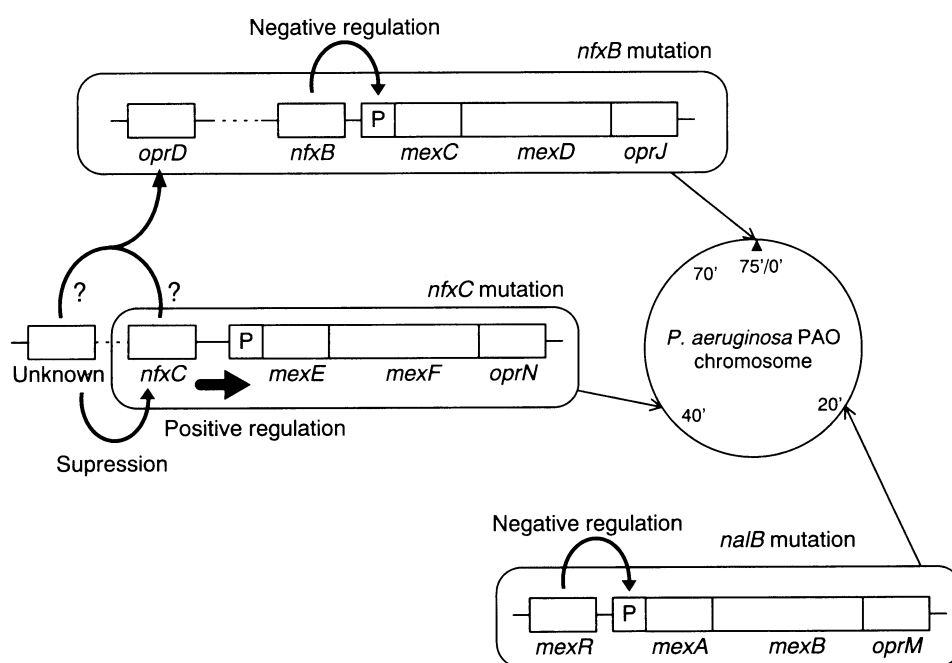


Fig. 6. Three multidrug efflux operons on the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO and their regulation. Adapted from reference 121.

ユーロマイシン、クロラムフェニコールのようなキノロンとは構造的にまったく関係のない化合物も排出する機能をもっている¹²⁵⁾。

NorA ポンプの亢進によるキノロン耐性化は、野生型 NorA 蛋白の増加によりおこると考えられている¹²⁸⁾。キノロン耐性 *flqB* 変異は *norA* 遺伝子のプロモーター領域の変異であり、その結果、*norA* 遺伝子の転写活性化がおこることが証明されている¹²⁹⁾。さらにキノロン耐性臨床分離黄色ブドウ菌において、*norA* 遺伝子のプロモーター領域にトランスポゾン *Tn* 4001 由来の挿入配列 *IS* 256 が挿入されていることが見出された⁷⁶⁾。*IS* 256 には強力なプロモーターが存在し、それにより *norA* の転写活性化がおきていることが推測されている。この他に NorA の発現亢進が低濃度の NFLX によって誘導されるキノロン耐性株も報告されている¹³⁰⁾。最近、Hooper らにより、NorA の発現調節機構が報告された¹³¹⁾。それによると、NorA の発現調節には二成分情報伝達系である *arlR*–*arlS* が関与しており、ArlS (histidine kinase) に変異が生じると、18 KDa 蛋白質が *norA* プロモーター上流領域に結合し、*norA* 遺伝子の転写が亢進されるということである。このように二成分情報伝達系による薬剤耐性の制御はまったく新しい耐性獲得メカニズムであり興味深い。

III. おわりに

現在、約 30 種類の微生物について全ゲノム配列が決定されており、さらに約 100 種類の全ゲノム配列がまもなく決定されようとしている。このような状況をふまえ、細菌の薬剤耐性メカニズムの研究方法も変貌しつつある。全ゲノム配列の情報にもとづき、バイオインフォマティクス解析により興味深い知見が得られている。たとえばキノロン耐性に関連のあるものとして、結核菌やピロリ菌ではトポIVが存在しないこと^{132, 133)}、緑膿菌ではマルチコンポーネント型排出蛋白質が 10 個も存在していること¹³⁴⁾などである。今後、キノロン耐性メカニズムの研究も、全ゲノム配列の知見を活用しながら、菌種特異的なメカニズムの検討が行われ、全体像の解明に向けて進むものと考えられる。

細菌は、キノロン薬の作用に対し、外膜透過性障害や排出ポンプ亢進のほか 2 種類の標的酵素の変異を菌種特異的に巧妙に組み合わせることにより、高度耐性を獲得する。しかし、キノロン高度耐性株は一段階で起こるものではなく、多段階の変異によりはじめて出現する。キノロン高度耐性株を出現させないためには、キノロン低度耐性株を段階的に選択しないようにすることが不可欠である。そのためにはキノロン薬を各種感染症に使用する場合、キノロン間の耐性メカニズムの相違を考慮し、耐性菌の生じにくい適切なキノロンを用いる工夫が必要と思われる。ひとたび高度耐性変異を生じた標的分子に強い作用を有する薬剤を創製するのは容易でない。

作用メカニズムの異なる新しい骨格の抗菌薬を探索することは、なおさら時間がかかることが予想される。現在市販の薬剤で作用機構が異なるものを組み合わせて使用する薬剤ローテーションも、耐性菌抑制上重要であると考えられる。耐性メカニズムなどの基礎研究の成果が、耐性菌に有効な薬の開発あるいは臨床の場での薬剤選択に生かされることが大切であると思われる。一方抗菌作用機作、耐性機構、菌の防御機構などが分子レベルやゲノムレベルで解明されてゆくことは、細菌の営みへのより深い理解につながるであろう。

文 献

- 1) 井上松久, 岡本了一: 薬剤耐性とトランスポゾン。最近の薬剤耐性菌とトランスポソンの関わり。感染症 26: 1~12, 1996
- 2) Courvalin P: Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? Antimicrob. Agent Chemother. 34: 681~684, 1990
- 3) 厚生省安全課: 抗生物質感受性状況調査報告書 (平成 5 年度厚生省委託事業), 同 (平成 6 年度厚生省委託事業), 同 (平成 7 年度厚生省委託事業), (財)医療情報システム開発センター, 東京, 1994, 1995, 1996
- 4) 紺野昌俊, 荒川宜親: 薬剤耐性菌の動向とそれらに起因する感染症をめぐる国内外の状況。日治療会誌 48: 251~277, 2000
- 5) Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M H, et al.: DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 3872~3876, 1976
- 6) Wang J C: DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. 65: 635~692, 1996
- 7) Swanberg S L, Wang J C: Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* *gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. J. Mol. Biol. 197: 723~736, 1987
- 8) Hussain K, Elliot E J, Salmond G P C: The ParD mutant of *Escherichia coli* also carries a *gyrA* mutation. The complete sequence of *gyrA*. Mol. Microbiol. 1: 259~273, 1987
- 9) Yoshida H, Kojima T, Yamagishi J, et al.: Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 211: 1~7, 1988
- 10) Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, et al.: Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 204: 367~373, 1986
- 11) Adachi T, Mizuuchi M, Robinson E A, et al.: DNA sequence of the *E. coli* *gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. Nucleic Acids Res. 15: 771~784, 1987
- 12) Klevan L, Wang J C: Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an $\alpha_2\beta_2$ core. Biochemistry 19: 5229~5234, 1980
- 13) Sugino A, Cozzarelli N R: The intrinsic ATPase of DNA gyrase. J. Biol. Chem. 255: 6299~6306, 1980
- 14) Maxwell A, Gellert M: Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. Adv. Protein Chem. 38: 69~107, 1986

- 15) Maxwell A, Critchlow S E: Mode of action. Handbook of experimental pharmacology, Vol 127, Quinolone antibacterials. Editors; Kuhlmann J, Dalhoff A, Zeiler H J: P 199~166, Spriger-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1998
- 16) Goss W A, Deitz W H, Cook T H: Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Bacteriol. 89: 1068~1074, 1965
- 17) Deitz W H, Cook T H, Goss W A: Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. III. Conditions required for lethality. J. Bacteriol. 91: 768~773, 1966
- 18) Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M H, et al.: Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 4772~4776, 1977
- 19) Sugino A, Peebles C L, Kreuzer K N, et al.: Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking and closing enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 4767~4771, 1977
- 20) Gellert M, O'Dea M H, Itoh T, et al.: Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 4474~4478, 1976
- 21) Yamagishi J, Furutani Y, Inoue S, et al.: New nalidixic acid resistance mutations related to deoxyribonucleic acid gyrase activity. J. Bacteriol. 148: 450~458, 1981
- 22) Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, et al.: Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 204: 367~373, 1986
- 23) Cambau E, Borden F, Collatz E, et al.: Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1247~1252, 1993
- 24) Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, et al.: *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 254~255, 1989
- 25) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1271~1272, 1990
- 26) Cambau E, Borden F, Collatz E, et al.: Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1247~1252, 1993
- 27) Oram M, Fisher L M: 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 387~389, 1991
- 28) Cullen M E, Wyke A W, Kuroda R, et al.: Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 886~894, 1989
- 29) Hallett P, Maxwell A: Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 335~340, 1991
- 30) Yonezawa M, Takahara M, Banzawa N, et al.: Analysis of the NH₂-terminal 83 rd amino-acid of *Escherichia coli* *gyrA* in quinolone-resistance. Microbiol. Immunol. 39: 243~247, 1995
- 31) Everett M J, Jin Y-F, Ricci V, et al.: Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* isolated from humans and animals. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2380~2386, 1996
- 32) Ouabdesselam S, Hooper D C, Tankovic J, et al.: Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by SSCP analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1667~1670, 1995
- 33) Conrad S, Oethinger M, Kaifel K, et al.: *gyrA* mutations in high-level fluoroquinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 38: 443~455, 1996
- 34) Korten V, Huang W M, Murray B E: Analysis by PCR and direct sequencing of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 2091~2094, 1994
- 35) Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, et al.: Alterations in the *gyrA* subunit of DNA gyrase and the *parC* subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 433~435, 1998
- 36) Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin P, et al.: Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in DNA gyrase *gyrA* gene. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2258~2261, 1996
- 37) Georgiou M, Munoz R, Roman F, et al.: Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous position of *gyrA* and *parC*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1741~1744
- 38) Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, et al.: In-vitro antimicrobial activity of HSR-903, a new fluoroquinolone against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* with fluoroquinolone resistance associated amino acid alterations in *gyrA* and *parC*. J. Antimicrob. Chemother. 40: 907~909, 1997
- 39) Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, et al.: Alterations in the *gyrA* subunit of DNA gyrase and the *parC* subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 699~701, 1997
- 40) Tanaka M, Matsumoto T, Sakamoto M, et al.: Reduced clinical efficacy of pazufloxacin against

- gonorrhoea due to high prevalence of quinolone-resistant isolates with the *gyrA* mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 579~582, 1998
- 41) Ison C A, Woodford P J, Madders H, et al.: Drift in susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin and emergence of therapeutic failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2919~2922, 1998
- 42) Tanaka M, Takahashi K, Saika T, et al.: Development of fluoroquinolone resistance and mutations involving *gyrA* and *parC* proteins among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan. *J. Urol.* 159: 2215~2219, 1998
- 43) Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al.: Rapid screening of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae* *parC* gene associated with resistance to quinolones. *J. Clin. Microbiol.* 35: 948~950, 1997
- 44) Deguchi T, Yasuda M, Asano M, et al.: DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 561~563, 1995
- 45) Kureishi A, Diver J M, Beckthold B, et al.: Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO 1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1944~1952, 1994
- 46) Pumbwe L, Everett M J, Hancock R E W, et al.: Role of *gyrA* mutation and loss of OprF in the multiple antibiotic resistance (MAR) phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* G 49. *FEMS Microbiol. Lett.* 143: 25~28, 1996
- 47) Janoir C, Zeller V, Kizis M D, et al.: High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2760~2764, 1996
- 48) Tankovic J, Perichon B, Duval J, et al.: Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutations of *Streptococcus pneumoniae* obtained in-vivo and in-vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2505~2510, 1997
- 49) Wang T, Tanaka M, Sato K, et al.: Detection of *grlA* and *gyrA* mutations in 344 *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 236~240, 1998
- 50) Sreedharan S, Oram M, Jenson B, et al.: DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 7260~7262, 1990
- 51) Goswitz J J, Willard K E, Fasching C E, et al.: Detection of *gyrA* gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1166~1169, 1992
- 52) Tokue Y, Sugano K, Saito D, et al.: Detection of novel mutations in the *gyrA* gene of *Staphylococcus aureus* by nonradioisotopic single-stranded conformational polymorphism analysis and direct DNA sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 428~431, 1994
- 53) Takenouchi T, Ishii C, Sugawara M, et al.: Incidence of various *gyrA* mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. *Antimicrob. Agent Chemother.* 39: 1414~1418, 1995
- 54) Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M, et al.: Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2014~2023, 1994
- 55) Nakamura S: Mechanisms of quinolone resistance. *J. Infect. Chemother.* 3: 128~138, 1997
- 56) Piddock L J V: Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994~1998. *Drugs* 58 (Suppl. 2): 11~18, 1999
- 57) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1647~1650, 1991
- 58) Belland R J, Morrison S G, Ison C, et al.: *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol. Microbiol.* 14: 371~380, 1994
- 59) Stein D C, Danaher R J, Cook T M: Characterization of a *gyrB* mutation responsible for low-level nalidixic acid resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 622~626, 1991
- 60) Pan X S, Fisher L M: DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of ciprofloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2810~2816, 1998
- 61) Gensberg K, Jin Y F, Piddock L J V: A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 137: 293, 1996
- 62) Takahashi H, Kikuchi T, Shoji S, et al.: Characterization of *gyrA*, *gyrB*, *grlA* and *grlB* mutations in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 49~57, 1998
- 63) Cabral J H M, Jackson A P, Smith C V, et al.: Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* 388: 903~906, 1997
- 64) Shen L L, Kohlbrenner W E, Weigl D, et al.: Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2973~2978, 1989
- 65) Yosida H, Nakamura M, Bogaki M, et al.: Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 839~845, 1993
- 66) Willmott C J R, Maxwell A: A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 126~127, 1993

- 67) Tsai F T F, Singh O M P, Skarzynski T, et al.: The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins* 28: 41~52, 1997
- 68) Berger J M, Gamblin S J, Harrison S C, et al.: Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379: 225~232, 1996
- 69) Fass D, Bogden C E, Berger J M: Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movements of two DNA strands. *Nature Struct. Biol.* 6: 322~326, 1999
- 70) Kato J, Nishimura Y, Imamura R, et al.: New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63: 393~404, 1990
- 71) Peng H, Marians K J: *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 268: 24481~24490, 1993
- 72) Adams D E, Shekhtman E M, Zechiedrich E L, et al.: The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* 71: 277~288, 1992
- 73) Khodursky A B, Peter B J, Schmid M B, et al.: Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: Use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 9419~9424, 2000
- 74) Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, et al.: Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2623~2627, 1994
- 75) Ferrero L, Cameron B, Manse B, et al.: Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* 13: 641~653, 1994
- 76) Kojima T, Yamagishi J, Oyamada Y, et al.: Analysis of quinolone resistance genes in a clinical isolate of quinolone-resistant MRSA. *Drugs* 49 (Suppl.2) : 182~184, 1995
- 77) Ferrero L, Cameron B, Crouzet J, et al.: Analysis of *gyrA* and *grrA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1554~1558, 1995
- 78) Yamagishi J, Kojima T, Oyamada Y, et al.: Alterations in the DNA topoisomerase IV *grrA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1157~1163, 1996
- 79) 小山田義博, 山岸純一, 藤本孝一, 他: 黄色ブドウ球菌におけるキノロンの一次標的酵素。臨床と微生物 24: 133, 1997
- 80) 藤本美佳, 吉田博明, 藤本孝一, 他: キノロン系抗菌剤の黄色ブドウ球菌Ⅱ型トポイソメラーゼ阻害作用。第70回日本細菌学会総会講演抄録, p.248, 1997
- 81) Pan X-S, Fisher L M: Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: Selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 471~474, 1997
- 82) Fukuda H, Hiramatsu K: Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 410~412, 1999
- 83) Pan X-S, Fisher L M: DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2810~2816, 1998
- 84) Alovero F L, Pan X-S, Morris J E, et al.: Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: Benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 320~325, 2000
- 85) Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al.: Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*-correlation of alterations in the *gyrA* subunit of DNA gyrase and the *parC* subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1020~1023, 1996
- 86) Belland R J, Morrison S G, Ison C, et al.: *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol. Microbiol.* 14: 371~380, 1994
- 87) Heisig P: Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 879~885, 1996
- 88) Khodursky A B, Zechiedrich E L, Cozzarelli N R: Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 11801~11805, 1995
- 89) Kumagai Y, Kato J, Hoshino K, et al.: Mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 710~714, 1996
- 90) Lee S, Lee Y: Laboratory developed fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* has a new missense mutation in QRDR of *parC*. *J. Microbiol.* 36: 106~110, 1998
- 91) Vila J, Ruiz J, Goni P, et al.: Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 491~493, 1996
- 92) Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al.: Uncommon occurrence of mutations in the *gyrB* gene associated with quinolone resistance in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2437~2438, 1996
- 93) Trees D L, Sandul A L, Whittington W L, et al.: Identification of novel mutation patterns in the *parC* gene of ciprofloxacin-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2103~2105, 1998
- 94) Nakano M, Deguchi T, Kawamura T, et al.: Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2289~2291, 1997

- 95) Fournier B, Hooper D C: Effects of mutations in GrlA of topoisomerase IV from *Staphylococcus aureus* on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2109~2112, 1998
- 96) Tanaka M, Zhang Y X, Ishida H, et al.: Mechanisms of 4-quinolone resistance in quinolone-resistant and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Japan and China. *J. Med. Microbiol.* 42: 214~219, 1995
- 97) Ince D, Hooper D C: Mechanisms and frequency of resistance to premaroxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug-target interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3344~3350, 2000
- 98) Breines D M, Ouabdesselam S, Ng E Y, et al.: quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 175~179, 1997
- 99) Fournier B, Hooper D C: Mutations in topoisomerase IV and DNA gyrase of *Staphylococcus aureus*: novel pleiotropic effects on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 121~128, 1998
- 100) Hancock R E W: The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trend in Microbiology* 5: 37~41, 1997
- 101) Perichon B, Tankovic J, Courvalin P: Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1166~1167, 1997
- 102) Hirai K, Aoyama H, Suzue S, et al.: Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 248~253, 1986
- 103) Ariza R R, Cohen S P, Bachhawat N, et al.: Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 143~148, 1994
- 104) Cohen S P, McMurphy L M, Levy S: *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 5416~5422, 1988
- 105) Gambino L, Gracheck S J, Miller P F: Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 2888~2894, 1993
- 106) Fralick J A: Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 5803~5805, 1996
- 107) Okusu H, Ma D, Nikaido H: AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* 178: 306~308, 1996
- 108) Miller P F, Gambino L F, Sulavik M C, et al.: Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1773~1779, 1994
- 109) Rella M, Haas D: Resistane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of β -lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 242~249, 1982
- 110) Gotoh N, Tsujimoto H, Pool K, et al.: The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2567~2569, 1995
- 111) Hamzehpour M M, Pechere J, Plesiat P, et al.: OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2392~2396, 1995
- 112) Li X-Z, Livermore D M, Nikaido H: Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1732~1741, 1994
- 113) Pool K, Tetro K, Zhao Q, et al.: Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2021~2028, 1996
- 114) Hirai K, Suzue S, Irikura T, et al.: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 582~586, 1987
- 115) Hosaka M, Gotoh N, Nishino T: Purification of a 54-kilodalton protein (OprJ) produced in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and production of a monoclonal antibody specific to OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1731~1735, 1995
- 116) Pool K, Gotoh N, Tsujimoto H, et al.: Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21: 713~724, 1996
- 117) Fukuda H, Hosaka M, Hirai K, et al.: New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1757~1761, 1990
- 118) Fukuda H, Hosaka M, Iyobe S, et al.: *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 790~792, 1995
- 119) Huang H, Hancock R E W: Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175: 7793~7800, 1993
- 120) Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, et al.: Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23: 345~354, 1997
- 121) 後藤直正: *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性化に寄与する薬剤排出システム. 日化療会誌 47: 319~328, 1999
- 122) Mine T, Morita Y, Kataoka A, et al.: Expression

- in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 415~417, 1999
- 123) Aires J R, Kohler T, Nikaido H, et al.: Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2624~2628, 1999
- 124) Ubukata K, Itoh N-Y, Konno M: Cloning and expression of *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1535~1539, 1989
- 125) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, et al.: Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. J. Bacteriol. 172: 6942~6949, 1990
- 126) Neyfakh A A, Borsch C M, Kaatz G W: Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 128~129, 1993
- 127) Takenouchi T, Tabata F, Iwata Y, et al.: Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1835~1842, 1996
- 128) Kaatz G W, Seo S M, Ruble C A: Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1086~1094, 1993
- 129) Ng E Y W, Trucksis M, Hooper D C: Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1345~1355, 1994
- 130) Kaatz G W, Seo S M: Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2650~2655, 1995
- 131) Fournier B, Aras R, Hooper D C: Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. 182: 664~671, 2000
- 132) Cole S T, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393: 537~544, 1998
- 133) Tomb J F, White O, Kerlavage A R, et al.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 388: 539~547, 1997
- 134) Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, et al.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1, an opportunistic pathogen. Nature 391: 959~964, 2000

Genetic study of molecular mechanisms of quinolone resistance

Jun-ichi Yamagishi and Masanao Shimizu

Discovery Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.,
33-94 Enoki, Suita, Osaka 564-0053, Japan

Quinolone resistance is induced by mutations on target enzymes such as DNA gyrase (gyrase) and DNA topoisomerase IV (topoIV), and by mutations that prevent drug accumulation due to changes in outer membrane permeability and/or activation of the efflux pump. Mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of the *gyrA* gene, which encodes A subunits of gyrase, and in the *parC* gene, which encodes A subunits of topoIV, usually cause resistance specifically to quinolones. In *Escherichia coli*, the hotspots most favored for causing high-level resistance to quinolones are at serine-83 and aspartic acid-87 of GyrA, and at serine-80 and glutamic acid-84 of ParC. Mutations in both *gyrA* and *parC* are common in clinical isolates highly resistant to quinolones. Mutations in the *gyrB* gene, which encodes B subunits of gyrase, and in the *parE* gene, which encodes B subunits of topoIV, are rare in clinical isolates but important to understanding the molecular mechanism of quinolone resistance. This mechanism in topoIV may be similar to that in gyrase; sites and amino acid changes in quinolone-resistant topoIV mutations are similar to those of quinolone-resistant gyrase mutations in most cases. Quinolones have 2 target enzymes, i.e., gyrase and topoIV, and the more sensitive enzyme determines the quinolone susceptibility of organisms. The primary target of most quinolones appears to be topoIV in gram-positive bacteria and has been described as a secondary target in gram-negative bacteria, but primarily in *Streptococcus pneumoniae*, sparfloxacin targets gyrase. Thus, whether topoIV or gyrase is the primary quinolone target depends on both the organisms and the compound tested. Another mechanism of resistance, the expression of efflux-pump systems, is attracting much attention in current antibiotic resistance research. Quinolone efflux appears to be the major cause of decreased drug accumulation; for *Staphylococcus aureus*, the efflux pump involved in norfloxacin resistance is NorA, and for *Streptococcus pneumoniae*, PmrA. *Pseudomonas aeruginosa* possesses at least 4 different efflux pumps—MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY-OprM systems—whose activation produces an antibiotic multiresistant phenotype. The genetic landscape of quinolone resistance is more complicated than previously thought, but a new feature in this approach is the availability of the nearly complete genome sequences of major human pathogens.