

Vibrio anguillarum 由来テトラサイクリンおよび
クロラムフェニコール耐性遺伝子の構造解析

趙 江

1992

①

Vibrio anguillarum 由来テトラサイクリンおよび

クロラムフェニコール耐性遺伝子の構造解析

第一巻「マツノサイエンス」創刊号に収録

目次

1. 概要	11
2. 材料と方法	12
3. アミノ酸配列の決定	14
4. 遺伝子構造の解析	17
5. 塩基配列	17
6. 塩基配列の比較	18
7. 塩基配列の決定	20
8. 塩基配列の決定	20
9. 塩基配列の決定	20

鹿児島大学大学院連合農学研究科 水産資源科学専攻

海洋生産環境学連合講座

趙 江

1992

目 次

序 論	1
第一章 テトラサイクリン耐性遺伝子について	
材料および方法	
1. 使用菌株およびプラスミド	17
2. 使用培地	18
3. プラスミドDNAの調製	19
4. 制限酵素によるプラスミドDNAの切断	21
5. 電気泳動	21
6. 制限酵素地図の作製	22
7. 塩基配列決定法	23
8. 転写開始点の解析	28
9. 遺伝子産物の分析	29
結果	
1. 制限酵素地図および塩基配列決定の strategy	35
2. Tet G の塩基配列	35
3. 他の <u>tet</u> との比較	40
4. 遺伝子産物の分析	46
考察	52

第二章 クロラムフェニコール耐性遺伝子について

材料および方法

1. 使用菌株およびプラスミド 62
2. コロニーハイブリダイゼーション 63

結果

1. 制限酵素地図 67
2. cat の塩基配列 68
3. 他の cat との比較 69
4. 遺伝子産物の同定 74
5. コロニーハイブリダイゼーション 74

考察

79

第三章 1989年から1991年にかけて分離された *Vibrio anguillarum* の薬剤耐性の動向と検出されたRプラスミドについて

材料および方法

1. 使用した菌株およびプラスミド 86
2. 使用培地 86
3. 使用薬剤 87
4. 薬剤感受性試験 87
5. Rプラスミドの伝達性試験 87
6. 制限酵素によるRプラスミドの切断パターンの比較 88
7. サザンブロットハイブリダイゼーション 88

結果

1. 薬剤感受性 91
2. 耐性菌株および検出されたRプラスミドの耐性マーカー 92
3. Rプラスミドの制限酵素切断パターンおよび類似性 95

考察 98

要約 102

謝辞 105

参考文献 106

序 論

Vibrio anguillarum はグラム陰性短桿菌で、魚類のビブリオ病の原因菌として古くから知られている。本菌は18世紀の初めイタリア沿岸や汽水域のウナギの red pest 病あるいは red disease の原因菌として最初に見い出された。その後、地中海沿岸のみならず、バルト海や北海沿岸においてもウナギの red pest 病がしばしば流行したことが報告されている。Canestrini(1893)がこの red pest 病の原因が細菌感染症であることを報告し、その原因菌を Bacillus anguillarum と名付けた。その後、Bergman(1909)はこの原因菌を Vibrio 属に分類し、Vibrio anguillarum と命名した(江草、1978)。

Vibrio anguillarum は海水、汽水および淡水域に広く分布し、本菌による感染症は養殖魚のみならず野生魚においても見られるのが特徴である。アメリカおよびカナダにおいてニジマス、マスノスケ、サケ、ベニザケおよびカラフトマスなどにこの菌による感染症例(ビブリオ病)が報告されている(Ross et al., 1968; Cisar and Fryer, 1969; Evelyn, 1971; Levin et al., 1972)。ヨーロッパにおいて野生海産魚やサケ科魚類においてビブリオ病が観察されている(Smith, 1961; Holt, 1970; Haastein and Holt, 1972)。日本においても、ウナギ(城・室賀、1972; 室賀ら、1976)、ニジマス(室賀、1975)、マダイ(安永、1972)、ブリ(木村、1964)などのビブリオ病が挙げられるが、特に産業的に大きな被害をもたらし、今日もなお各地の養殖場で問題になっているのがアユのビブリオ病である。

アユ養殖は日本各地で盛んに行われており、全国の養殖生産量は1989年には

13,390 トンに達している。室賀ら（1967）は浜名湖の海産稚アユのピブリオ病は *V. anguillarum* が起因していることを初めて見つけた。次いで利根川河口および伊豆の海産稚アユにおいても本菌による感染症を観察している（室賀・元信、1967）。さらに、室賀らは 1968 年から 1970 年にかけて滋賀県および長野県下の淡水養殖中のアユからも本菌を分離し、淡水中に本菌感染症の存在することを確認している（室賀、江草、1970）。1972 年頃まで各地のアユ養殖場で本菌感染症はしばしば発生していたが、水産用医薬品として市販されている薬剤：サルファ剤、テトラサイクリン、ニトロフラン誘導体およびクロラムフェニコールでその治療が可能であったため、さほど問題になっていなかった。

しかし、1973 年に日本各地のアユ養殖場において *V. anguillarum* の薬剤耐性株による感染症が出現し、養殖業者にとって大きな問題となって来た。Aoki ら（1974）は同年に徳島県、静岡県、愛知県、岡山県および東京都下のアユ養殖場で流行した *V. anguillarum* 78 株を集め、各種薬剤に対する感受性を調べたところ、全ての供試薬剤に対して感受性を示したのは 3 株のみで、残り 75 株はクロラムフェニコール（CP）、ナリジキシン酸（NA）、ニトロフラン誘導体（NF）、サルファ剤（SA）、ストレプトマイシン（SM）あるいはテトラサイクリン（TC）を組み合わせた 4 剤から 6 剤の多剤耐性を示すことを明らかにした。これら多剤耐性株は伝達性 R プラスミドによるものであることを初めて明らかにした。検出された伝達性 R プラスミドは TC 単剤耐性、CP、SA、SM 3 剤耐性あるいは CP、TC、SA、SM 4 剤耐性をコードしていた。その中でも 4 剤耐性をコードする R プラスミドが最も多く検出された。

次いで、Aoki らは 1974 年から 1977 年にかけて全国各地のアユ養殖場における *V. anguillarum* 薬剤耐性株の疫学調査を行った。分離菌 259 株のうち、CP、NA、NF、SA、SM、TC、およびトリメトプリム（TMP）のすべての薬剤に対して感受性を示したのはわずか 9 株のみで、残り 250 株は CP、NA、NF、SA、TC

および TMP の 1 剤から 6 剤の耐性を示した。耐性 250 株中 165 株は伝達性 R プラスミドによる耐性で、その耐性マーカーは CP、SA、TC の組み合わせの 1 剤から 3 剤耐性であった (Aoki *et al.*, 1981)。薬剤耐性株による感染症は 1978 年と 1979 年に一時期低迷したが、1980 年再度発生し、ますます多剤耐性化して来ている。1980 年に検出された R プラスミドはアンピシリン (AP)、CP、SA、SM あるいは TMP 耐性をコードしていた。次いで、1981 年以降に検出された R プラスミドはさらに TC 耐性が加わり、6 剤耐性の R プラスミドが非常に多く検出されるようになった (Aoki *et al.*, 1985)。

薬剤耐性菌の出現は化学療法剤の使用に伴って起こるものと考えられている。前述したように魚類病原菌のみならず、ヒトおよび家畜病原細菌においても薬剤耐性株は出現している。耐性菌感染症の治療を目的として種々の化学療法剤が新たに開発されている。しかし、2-3 年後には必ず開発された薬剤に対して耐性菌が出現した。

薬剤耐性菌の出現と増加は染色体の突然変異によって生じた少数の耐性株が、薬剤との接触によって選択され増殖を繰り返すという縦の系と、接合 (conjugation)、形質導入 (transduction) および形質転換 (transformation) 等によって耐性遺伝子が伝達され、薬剤によって選択されるという横の系が考えられる (三橋ら、1985)。これらのうち、細菌間において薬剤耐性の広がり特に重要な役割を果たすのが R プラスミドあるいはトランスポゾンである。1959 年に落合ら (1959)、秋葉ら (1960) が耐性赤痢菌と感受性大腸菌との混合培養により薬剤耐性が大腸菌に伝達する現象を発見した。薬剤耐性の遺伝形質を持つ伝達性の細胞質因子はかつては薬剤耐性因子 (R 因子) と呼ばれていたが、今日では R プラスミドと呼ばれている。その後、各種のグラム陰性およびグラム陽性菌より R プラスミドが検出されている。魚類病原菌において伝達性 R プラスミドは *A. hydrophila*、*A. salmonicida*、*V. anguillarum*、*Edwardsiella tarda*、*Pseu-*

domonas fluorescens、*Pasteurella piscicida*、*Enterococcus seriolicida* (*Streptococcus* sp.) (青木、1990) および *Yersinia ruckeri* (De Grandis and Stevenson, 1985) の耐性株より検出されている。Rプラスミドの他、薬剤耐性遺伝子がトランスポゾン上にあり、トランスポゾンにより転移されることも薬剤耐性の広がりの一つと考えられている。

Rプラスミドは細菌の染色体とは独立に自己複製機能を持ち、細胞増殖の過程で安定に維持されるDNA分子で、細胞内で環状二本鎖の構造をなしている。Rプラスミドは接合伝達能を有するものと有しないものがある。接合伝達能をもつRプラスミドは同一菌種間ばかりでなく、他の菌種へも伝達が可能である。Rプラスミドの基本構造は接合伝達、複製および薬剤耐性の3つの領域よりなっている(飯野ら、1981)。接合伝達領域には20個の遺伝子が集合して存在し、それぞれ性線毛の形成、接合体の安定化、プラスミドDNAの代謝活性および接合伝達の制御等の役割を果たしている。複製領域はほぼ2,000塩基で、そこに複製開始点、複製開始タンパク質をコードする領域および不和合性遺伝子などが存在している。薬剤耐性領域には各種の薬剤 AP、CP、カナマイシン (KM)、SA、SM、TC、TMP、マクロライドおよび2価の重金属 Co^{++} 、 Hg^{++} 、 Ni^{++} 等に対する耐性遺伝子が存在している(三橋、1981)。Rプラスミドにより、薬剤耐性領域に単一の薬剤に対する耐性遺伝子が存在する場合もあるが、むしろ多剤耐性の形で、複数の耐性遺伝子が存在する場合が多い。

一方、伝達能のない非伝達性Rプラスミド(rプラスミドとも言う)もある。通常分子サイズは伝達性Rプラスミドより小さい。それ自身は伝達に関する遺伝子が部分的あるいは全体的に欠損しているが、伝達性プラスミドと共存する場合同時にrプラスミドも伝達されることがある。この伝達現象は mobilization と呼ばれる(松原、1976)。魚類病原菌では *A. salmonicida* より非伝達性Rプラスミドが検出されている(Aoki and Takahashi, 1986)。

薬剤耐性の生化学的機構としては菌が薬剤を不活化する酵素を産生する、細菌の細胞表層が薬剤の通過を阻み細胞内の作用点に到達させない、および菌の薬剤作用点に変化して薬剤が結合できない等があげられる。いずれも遺伝学的機構と組合わさって耐性として表現される。薬剤耐性の中で、最も多く出現するテトラサイクリンおよびクロラムフェニコールの耐性機構を以下に述べる。

テトラサイクリンは強い抗菌性を持つ抗生物質である。1948年に Dugger により Streptomyces aureofaciens からクロルテトラサイクリンが最初に発見され、続いて Finlay (1950年) により S. rimosus からオキシテトラサイクリンが見出された。Stephens らにより 1952年にクロルテトラサイクリンからテトラサイクリンが作られた。その後、レダマイシン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、メタサイクリン等の誘導体が次々と合成された。これらのテトラサイクリン系の抗菌スペクトルは極めて広く、グラム陰性菌、陽性菌および大型ウイルスに対し強い抗菌活性を示し、副作用が少ないので、広くヒトの細菌感染症の治療剤として用いられている (渡辺、1969)。

テトラサイクリンの分子式は $C_{22}H_{24}O_8N_2$ で、分子量は 444.428 である (Fig. 1)。テトラサイクリンの抗菌活性は細菌のリボソームに作用し、蛋白質合成を阻害することによる。細菌のリボソームは 70S で、50S と 30S の 2つのサブユニットからできている。テトラサイクリンは 30S のサブユニットに作用し、アミノアシル tRNA が 30S サブユニット上の A サイトへの結合を阻止することにより、蛋白質の合成を阻害する (Chopra, 1985)。

テトラサイクリンの耐性菌は 1952年に日本で赤痢菌より初めて発見されて以来、多くの人畜病原細菌において見いだされている。魚類病原菌 Aeromonas salmonicida において 1957年にアメリカでテトラサイクリン耐性株が出現し、治療上問題になったことが報告されている (Snieszko and Bullock, 1957)。日

本においても魚類病原菌 *A. hydrophila*、*A. salmonicida*、*E. tarda* および *P. piscicida* の TC 耐性株が養殖場より多く検出されている。*V. anguillarum* においてもすでに記載したようにテトラサイクリン耐性をコードした R プラスミドによる耐性株が 1973 年以來多数養殖場で出現している。

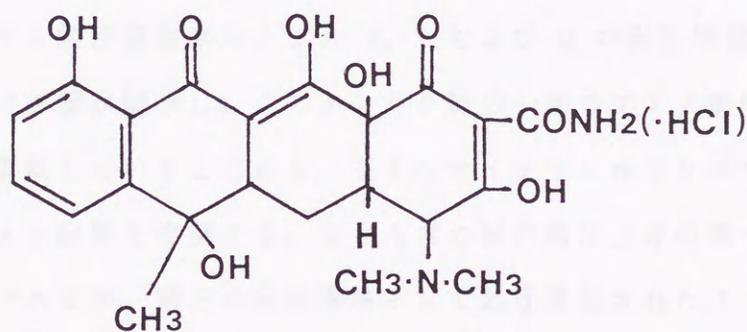


Fig. 1. The structure of tetracycline.

テトラサイクリン耐性の多くは R プラスミド上に存在し、しかも低濃度の TC によって高度耐性を示す、いわゆる誘導耐性型と誘導されない非誘導型に分かれる。テトラサイクリン耐性菌は早くから分離されていたにもかかわらず、その耐性機構について長らく不明のままであった。テトラサイクリン耐性は菌体内への膜透過能の低下によるものと推定されていたが、Levy ら (1974) はテトラサイクリン耐性遺伝子支配により出現してくる 36 Kd のタンパク質が TC 耐性発現に関

与していることを明らかにした。その後、McMurry ら (1980) は大腸菌においてテトラサイクリン耐性は薬剤の排出によることを証明した。

Levy (1988) はテトラサイクリン耐性機構には3つのタイプがあることを報告している。その第一は菌体外へ薬剤の排出によりテトラサイクリン耐性を果たすタイプである。この排出はテトラサイクリン耐性遺伝子にコードされる膜タンパク質 (Tet) が関与しており、Tet タンパク質は2つの互いに依存する領域 Tet α および Tet β よりなっている。いずれもテトラサイクリンの排出にとって不可欠のものである。クラス A - E に属するグラム陰性菌はこのタイプの耐性機構である。また、クラス K、L に属する耐性菌においても類似する排出機構が存在している。しかし、排出に関与するタンパク質はグラム陰性菌のものと異なっている。第二のタイプはグラム陽性菌由来のクラス M、N および O の耐性機構である。1つの細胞質性タンパク質が関与し、このタンパク質の一部のアミノ酸配列がリボソーム伸長因子と類似していることから、テトラサイクリンからリボソームへの作用を防ぐことにより耐性を発現する。ほとんどの耐性菌は上述の第一、第二のタイプの耐性機構であるが、第三の耐性機構として最近発見されたクラス F の耐性機構がある。テトラサイクリンが細胞内で不活化される酵素反応と考えられている。いずれも明確な実験結果は得られていない。

Chopra (1986) は大腸菌耐性株でのテトラサイクリンの流入および排出のモデルを提唱した (Fig. 2)。排出はテトラサイクリン耐性遺伝子にコードされた耐性タンパク質 (Tet) が介在している。Tet タンパク質の大部分は細胞膜の脂質二重層に存在しているが、わずかの親水性の部分が膜外に突出しており、この親水性の部分がテトラサイクリンの binding region になると考えられている。また、テトラサイクリンの binding site は腸内細菌群由来の Tn1721、Tn10 および pBR322 では Tet タンパク質の N 末端から 67/68 あるいは 65/66 番目の Ser-Asp 残基だと推定されている。

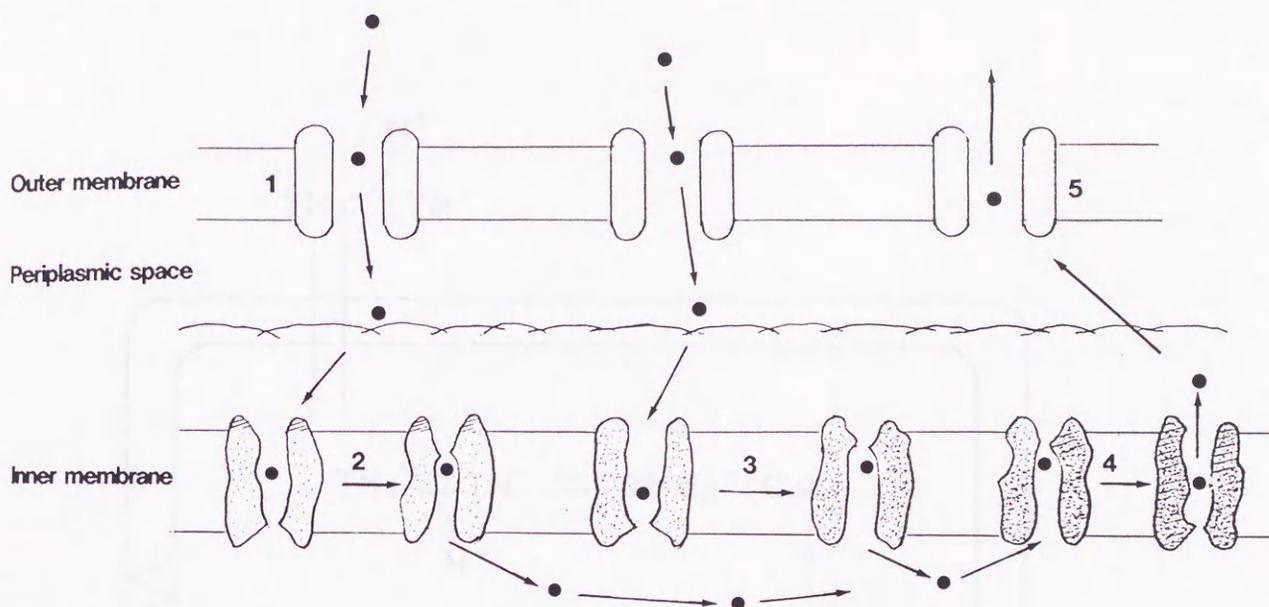


Fig. 2 Model for tetracycline(●) influx(1-3) and efflux(4-5) in *Escherichia coli*. 1, 5, Passive diffusion through outer membrane porins; 2, 3, energy-dependent transport across the cytoplasmic membrane mediated either by an ATP-dependent, osmotic shock-sensitive system(2), or by an osmotic shock-insensitive, protonmotive forcedependent system(3). 4, Protonmotive force-dependent efflux mediated by a tetracycline resistance protein. From Chopra(1986).

山口(1991)はクラス B に属する Tn10 を用い菌体内のテトラサイクリンの輸送系について検討し、テトラサイクリンの菌体内蓄積と耐性菌による能動的排出の機構のモデルを提出した (Fig. 3)。

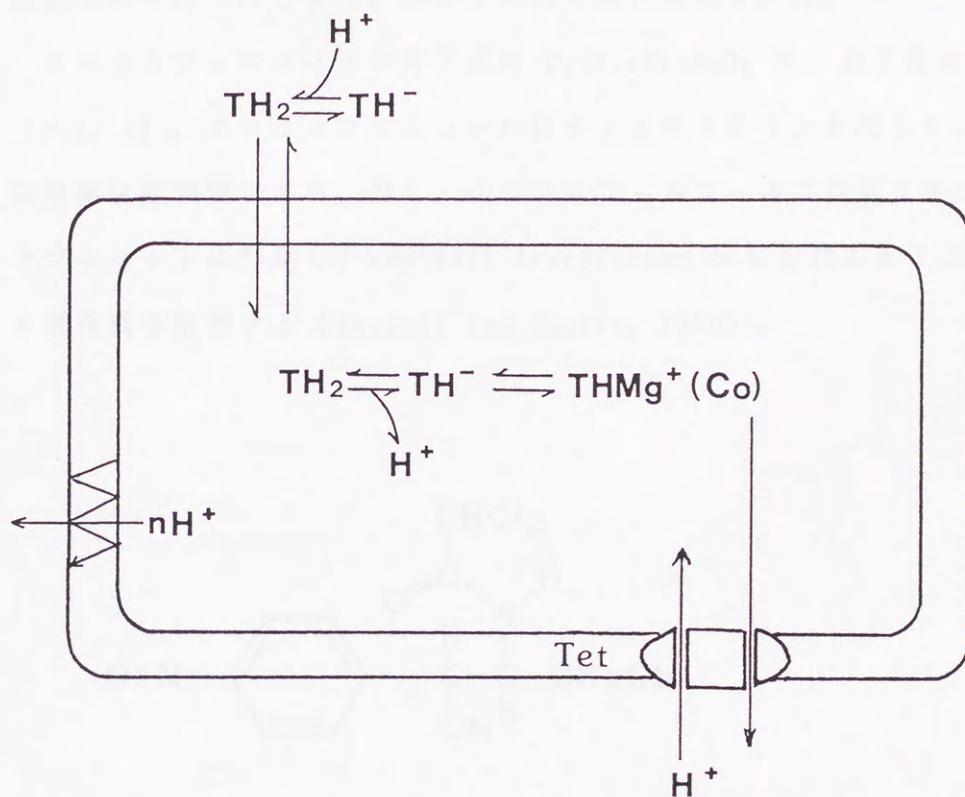


Fig. 3 Proposed mechanism for tetracycline accumulation in bacteria cells. 山口ら (1991) より.

テトラサイクリンは中性形 TH_2 として脂質二重層を拡散により透過し、菌体内のより高い pH のため解離し、さらに Mg^{2+} 等の二価カチオンと膜不透過性のキレートを形成して蓄積する。耐性菌の産生する耐性タンパク質 Tet は $THMg^+$ を基質として、 H^+ とのアンチポートにより能動的に排出する。

クロラムフェニコールは 1947 年 Ehrlichらにより *Streptomyces venezuelae*

から発見され、翌年に結晶として分離され、現在では合成法により製造されている。クロラムフェニコールも抗菌スペクトルが広く、特にグラム陰性菌に顕著な抗菌活性を持つことより、かつては広く用いられていた。

クロラムフェニコールの分子式は $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ で、分子量は 323.13 である (Fig. 4)。クロラムフェニコールはテトラサイクリンと同じく、タンパク質合成阻害抗生物質である。但し、クロラムフェニコールは細菌リボソームの 50 S サブユニットに作用し、peptidyl transferase 反応を抑えることにより、タンパク質合成を阻害する (Russell and Chopra, 1990)。

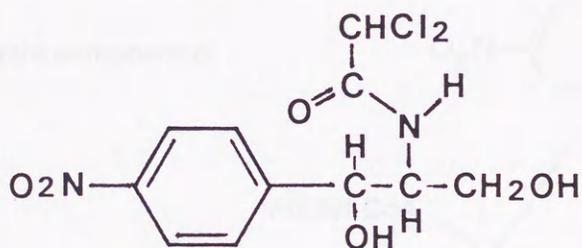


Fig. 4 The structure of chloramphenicol.

クロラムフェニコール耐性菌は人畜病原細菌のみならず、魚類病原細菌においても多数出現している。Okamoto and Suzuki (1965) はクロラムフェニコールの耐性機構は、耐性菌が産生したクロラムフェニコールをアセチル化して、不活化する酵素 (Chloramphenicol acetyltransferase, CAT) によるものであることを明らかにした。CAT の作用機序については Sykes and Bonner (1984) によって次のようなモデルが提案された。

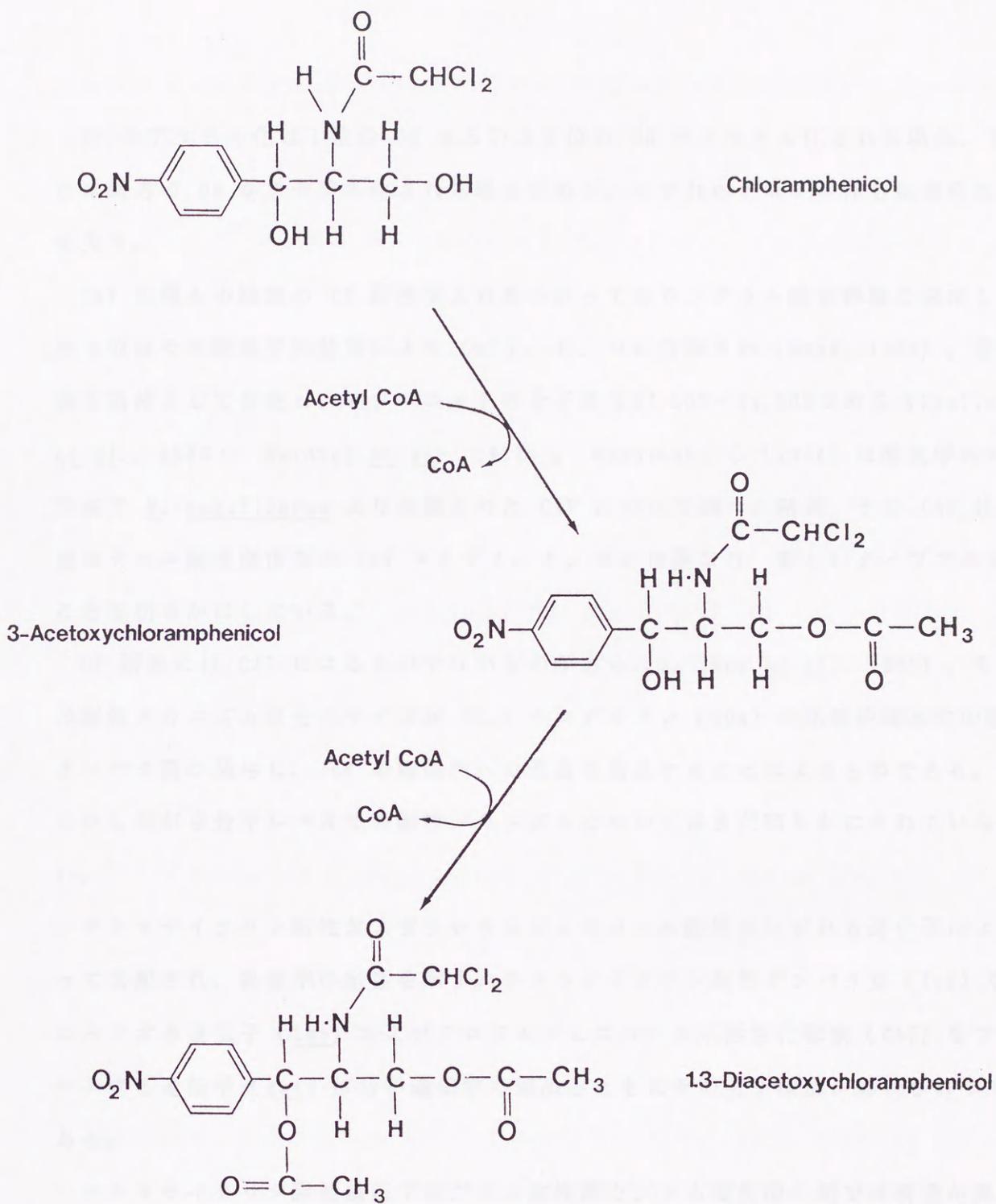


Fig. 5 Modification of chloramphenicol by chloramphenicol acetyl transferase. From Sykes and Bonner(1984).

CP のアセチル化は1位の OH あるいは3位の OH がアセチル化される場合、または両方の OH がアセチル化される場合がある。いずれのアセチル体も抗菌活性を失う。

CAT は種々の細菌の CP 耐性株より見つかり、グラム陰性桿菌に由来したものはその酵素学的特徴により CAT I、II、III に分類され (Shaw, 1983)、普通3量体として存在し、サブユニットの分子量は22,500-24,500である (Leslie *et al.*, 1986; Harding *et al.*, 1987)。Masuyoshi ら (1988) は酵素学的方法で *V. anguillarum* より分離された CAT について調べた結果、その CAT は他のグラム陰性菌由来の CAT タイプ I、II、III とは異なり、新しいタイプであることを明らかにしている。

CP 耐性には CAT によるものでないものがある (Gaffney *et al.*, 1981)。その耐性メカニズムは分子サイズが 33.8 キロダルトン (KDa) の比較的疎水性の膜タンパク質が関与し、CP の細胞内への透過を阻止することによるものである。しかしながら分子レベルでの耐性メカニズムについてはまだ明らかにされていない。

テトラサイクリン耐性およびクロラムフェニコール耐性はいずれも遺伝子によって支配され、各薬剤の耐性を示す。テトラサイクリン耐性タンパク質 (Tet) をコードする遺伝子 (*tet*) およびクロラムフェニコール不活性化酵素 (CAT) をコードする遺伝子 (*cat*) は分子遺伝学の進歩とともにその分子構造が解明されつつある。

テトラサイクリン耐性遺伝子はグラム陰性菌とグラム陽性菌の間では構造が異なっている。グラム陰性桿菌がコードするテトラサイクリン耐性遺伝子はほとんどプラスミドによって支配されており、その耐性遺伝子がコードしている Tet タンパク質の分子サイズはおよそ 36 KDa である。Mendez *et al.* (1980) および

Levy (1988) はすでに報告されたテトラサイクリン耐性遺伝子についてそれらの DNA 構造によりクラス A、B、C、D、E および F のグループに分類した。クラス A の tet は腸内細菌群、pseudomonads、Aeromonas および Vibrio に分布し、プラスミド RP1 およびトランスポゾン Tn1721 にコードされたテトラサイクリン耐性遺伝子はその代表的なものである。クラス B の tet は腸内細菌群、Yersinia、Haemophilus および Vibrio に広く分布し、R100 (R222) にコードされているトランスポゾン Tn10 に代表される。クラス C の tet は腸内細菌群、pseudomonads および Salmonella より検出されたもので、代表的な tet はプラスミド pSC101 および pBR322 にコードされているものである。クラス D の tet は A. hydrophila から検出されたプラスミド RA1 にコードされるもので、他の魚類病原菌 E. tarda、P. piscicida 由来の R プラスミドにも広く分布している (Aoki and Takashima, 1987)。クラス E の tet は E. coli から検出されたプラスミド pSL1456 にコードされていたもので、Aeromonas sp. から検出されている (Marshall et al., 1986)。さらに、Bacteroides fragilis よりクラス F の tet が検出されている (Park et al., 1987)。

一方、グラム陽性菌 Staphylococcus、Streptococcus、および Enterococcus 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子はそれらの DNA 構造よりクラス K、L、M、N、O および P の 6 クラスに分けられている。

これらのグループに属するテトラサイクリン耐性遺伝子の内クラス A、B、C の代表的なものの構造が明らかにされている (Waters et al., 1983; Hillen and Schollmeier, 1983; Postle et al., 1984; Sutcliffe, 1978; Unger et al., 1984a)。また、クラス D、E の調節遺伝子の塩基配列が報告されている (Unger et al., 1984b; Tovar et al., 1988)。

いずれのテトラサイクリン耐性遺伝子でも耐性遺伝子とその遺伝子発現の調節に関与する調節遺伝子からなっている。調節遺伝子は耐性遺伝子と逆向きに存在

し、2つの遺伝子間にプロモーター、オペレーターを含むコントロール領域が存在していることが明らかにされている (Klock *et al.*, 1985; Tovar *et al.*, 1988)。さらに、これらの遺伝子間において塩基配列の相同性が認められている。

グラム陽性菌に由来したテトラサイクリン耐性遺伝子についてもその一部のものは構造がすでに明らかにされている (Hoshino *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1986; Sakaguchi *et al.*, 1988)。それらの塩基配列間においてもある程度の塩基配列の相同性が認められている。

魚類病原菌由来 R プラスミドにコードされているテトラサイクリン耐性遺伝子がクラス D に属するものが多いことはすでに述べたが、*V. anguillarum* 由来 R プラスミドがコードしているテトラサイクリン耐性遺伝子について、分離年代により違うタイプであることがすでに明らかにされている (Aoki *et al.*, 1987)。1977 年以前に分離された *V. anguillarum* 由来の R プラスミドがコードしているテトラサイクリン耐性遺伝子はクラス B と強く DNA 相同性を示し、同じ構造であることが示唆された。一方、1981 年以降に分離された株に由来するものはクラス A、B、C、D および E のいずれにも相同性を示さず、新しいタイプであることが明らかにされている。

クロラムフェニコール不活化性酵素 (CAT) をコードするクロラムフェニコール耐性遺伝子は多数の細菌から発見され、それらは染色体 DNA、R プラスミドあるいはトランスポゾン上に位置している。グラム陰性桿菌では常に発現しているが、グラム陽性菌では誘導耐性を示すことが明らかにされている (Shaw, 1983)。すでに、いくつかのクロラムフェニコール耐性遺伝子についてその構造が決定されている。Shaw (1983) らが CAT の物理化学的性状より分類した CAT I、II および III タイプの遺伝子もその DNA 構造が異なっていた。グラム陰性菌では、*E. coli* 由来トランスポゾン Tn 9 にコードされたクロラムフェニコール耐性遺伝子

(タイプ I) (Alton and Vapnek, 1979)、Proteus mirabilis 由来の cat (Charles et al., 1985)、Shigella flexneri 由来プラスミド R 3 8 7 にコードされた cat (タイプ III) (Murray, 1988)、E. coli および Haemophilus influenzae 由来の cat (タイプ II) (Murray, et al., 1990) および Campylobacter coli 由来プラスミド pNR9589 にコードされた cat (Wang and Taylor, 1990) はそれぞれすでに塩基配列が決定されている。

グラム陽性菌では、Staphylococcus aureus 由来プラスミド pC194 にコードされた cat (Horinouchi and Weisblum, 1982)、同じ菌種由来プラスミド pC221 および pUB112 にコードされた cat (Shaw et al., 1985; Bruckner and Matzura, 1985)、Bacillus pumilus の染色体 DNA 由来 cat (Harwood et al., 1983)、Clostridium perfringens および C. difficile 由来 cat (Steffen and Matzura, 1989; Wren et al., 1989) 等の塩基配列が明らかにされている。これらのクロラムフェニコール耐性遺伝子の由来は異なるが、構造上に類似した点がいくつか認められており、特に、これらの塩基配列に基づき翻訳されたアミノ酸配列の C 末端には共通の配列が存在することが注目されている (Shaw, 1983; Lesilie et al., 1988)。

魚類病原菌由来 R プラスミドがコードするクロラムフェニコール耐性遺伝子については A. hydrophila、A. salmonicida および E. tarda 由来のものは CAT II クラスに、P. piscicida 由来のものは CAT I クラスに属することがすでに明らかにされている (Aoki, 1988)。V. anguillarum 由来 R プラスミドにコードされたクロラムフェニコール耐性遺伝子について、Aoki (1988) は DNA-DNA hybridization により調べたところ、その DNA 構造が菌の分離年代によって違うタイプを示し、1977 年以前に分離されたものは報告された既知 CAT I、II および III のクロラムフェニコール耐性遺伝子とは DNA 構造が異なり、新しいタイプであることを明らかにしている。

V. anguillarum 由来 R プラスミドがコードするテトラサイクリンおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子は分離年代によって既知のものと異なることはすでに述べたが、いずれも、その耐性遺伝子の構造については明らかにされていない。そこで、本研究は、V. anguillarum 由来 R プラスミドがコードする新しいテトラサイクリン耐性遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子の塩基配列を決定し、その DNA 構造の解析を行った。決定された塩基配列およびアミノ酸配列を他のタイプの耐性遺伝子と比較することにより、その起源および進化について検討した。さらに、これらの耐性遺伝子にコードされた遺伝子産物を調べた。次いで、1989 年よりアユ養殖場においてビブリオ病の予防のために浸漬ワクチンが使用されるようになり、アユの養殖場においてビブリオ病の発生率が減少する兆候がある。それに伴って薬剤の使用が少なくなって来ているものと思われるので、1989 年以降アユより分離された V. anguillarum について薬剤耐性株の疫学調査を行い、耐性株の出現頻度、R プラスミドによる耐性株の有無および R プラスミドの構造について検討した。

第一章 テトラサイクリン耐性遺伝子について

序 言

V. anguillarum 由来 R プラスミドがコードする新しいタイプのテトラサイクリン耐性遺伝子 (Tet G と命名した) の構造解析を中心に行った。

V. anguillarum MZ8122 株由来 R プラスミド pJA8122 よりクローニングした Tet G を含む HindIII 9 Kb 断片について、制限酵素地図を求め、その制限酵素切断サイトを用いてサブクローニングおよびデレーションミュータントの作製を行い、Tet G の塩基配列を決定した。決定した塩基配列より Tet G 遺伝子の耐性発現機序を考察した。さらに、決定した塩基配列および推定したアミノ酸配列を既知のクラス A、B、C、D、E および他のテトラサイクリン耐性遺伝子のものと相同性を求め、その起源および進化について考察した。さらに、Tet G が産生する遺伝子産物についてマキシセル法により調べた。

材料および方法

1. 使用菌株およびプラスミド

本実験に用いた菌株およびプラスミドは Table 1 に示した。

V. anguillarum MZ8122 株は Tet G をコードする R プラスミドの元株として用いた。プラスミド pUC118、119 および *E. coli* HB101、MV1184 株はサブクロニングのベクターおよび形質転換の宿主菌として用いた。*E. coli* CSR603 株はマキシセル法の宿主菌として用いた。また、Tet G の DNA 構造を比較するため、*V. anguillarum* 由来 R プラスミド pJA7601、pJA8115、pJA8120、pJA8122、pJA8202、pJA8325 および *P. aeruginosa* 由来プラスミド RP1 (クラス A)、*S. flexneri* 由来プラスミド R222 (クラス B)、pBR322 (クラス C)、*A. hydrophila* 由来プラスミド RA1 (クラス D) および *E. coli* 由来 pSL1504 (クラス E) を用いた。

2. 使用培地

V. anguillarum の増菌用培地として、0.5% NaCl 添加ハートインフュージョン培地 (1HI) (日水製薬) を用い、*E. coli* の増菌用培地は L 培地 (polypepton 10g、NaCl 5g、yeast extract 5g、dH₂O 1,000ml) および 2×YT (polypepton 16g、yeast extract 10g、NaCl 5g、dH₂O 1,000ml) を用いた。また、マキシセル法に用いた *E. coli* CSR603 株を培養する際、M9 培地 (Na₂HPO₄ 6g、KH₂PO₄ 3g、NaCl 0.5g、NH₄Cl 1g、dH₂O で 1l にした後、pH 7.0 になるように調節し、滅菌後、それに別々に滅菌した 0.01M CaCl₂ 10ml、1M MgSO₄ 1ml および 20% glucose 10ml を添加) および K 培地 (1% casamino acid、0.1 μg/ml thiamine を含む M9 培地) を使用した。

さらに、これらの菌の分離用培地として、上述の液体培地 (1HI、L、2×YT) に 1.5% の濃度になるように寒天を加えたものを使用した。

3. プラスミドDNAの調製

(a) RプラスミドDNAの調製

RプラスミドDNAの少量調製は Kado and Liu (1981) の方法及びその変法により行った。*V. anguillarum* は 5 ml の 1 HI および *E. coli* は同量の L プロースに接種し、一晩振盪培養を行った。菌液を 8,000 rpmで 10 分間遠心し、集菌した。ペレットを 1ml TAE 溶液 (40mM Tris-acetate pH7.4、2mM EDTA) に懸濁し、2ml の Lysing solution (SDS 3g、Tris 0.6g、2N NaOH 6.4ml に dH₂O を100ml になるように加えたもの) を加え、穏やかに混合させ、ときどき攪拌しながら 60°C で 1 時間保温した。フェノール/クロロホルム (1:1) を 6ml 加え、上下転倒して (50-100 回) よく混ぜ、12,000 rpmで 15 分間遠心した。プラスミドDNAを含んだ水層を新しいチューブに移し、2 容量の冷 99% エタノールを加え、-20°C で 2-3 時間放置した。次いで 13,000 rpmで 15 分間遠心し、沈澱を 0.5ml の 50mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1M 酢酸ナトリウム溶液に溶かし、1.5ml の微量遠心チューブに移した。さらに、1ml の冷 99% エタノールを加え、-20°Cに 1 時間放置した。13,000 rpmで 10 分間遠心し、ペレットを冷 75% エタノールでリンスした後、真空乾燥を行った。抽出したDNAは TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5、1mM EDTA) に溶かし、-20°Cにて保存した。

RプラスミドDNAの大量抽出は簡易アルカリ法により行った。菌を 200ml の上述の液体培地で一晩振盪培養し、6,000 rpmで 10 分間遠心し、集菌した。菌体に 1.2ml の Solution I (50mM glucose、10mM EDTA、25mM Tris HCl、pH 8.0) および 800 μ l の lysozyme solution (10mg lyso-zyme/ml Solution I) を加え、氷上に 30 分間放置した。Solution II (0.2N NaOH、1%SDS) を4ml添加し、よく攪拌し、氷上に 5 分間放置した。さらに、5M 酢酸カリウム (pH 4.8) を 3ml 加え、氷上に 1 時間放置した。13,000 rpmで 10 分間遠心した後、上清を新しい

チューブに移し、二容量の冷 99% エタノールを加え、 -80°C で 30 分間放置した。13,000 rpm で 10 分間遠心した後、沈澱を適量の 0.1M 酢酸ナトリウム、50mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液に溶かし、さらに、二容量の冷 99% エタノールを加え、 -20°C にて 10 分間放置した。13,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を捨て、真空乾燥した。ペレットを適量の TE buffer で溶かし、一部をアガロースゲル電気泳動によりプラスミド DNA の存在を確認した。

次いで抽出されたプラスミド DNA を RNase A ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) で処理後、総量 6.4 ml になるように TE buffer を加え、これに 6.90g の塩化セシウムおよび 1ml のエチジウムブロマイド溶液 ($2.5\text{mg}/\text{ml}$) (Et. Br.) を加え、よく攪拌した後、36,000 rpm で 36 時間、 20°C で平衡密度勾配遠心を行った。遠心後、UV ランプ下で 21G 注射針で目的の DNA バンドを採取した。その DNA 溶液に 5M NaCl で飽和したイソプロパノールを加え、Et. Br. を完全に除去した。この溶液を透析チューブに入れ、2 l の TE buffer の中で 4°C にて一晩透析した。精製した DNA 溶液は -20°C にて保存した。

(b) リコンビナントプラスミド DNA の調製

リコンビナントプラスミド DNA の調製はアルカリ法 (Birnboim and Doly, 1979) により行った。宿主菌の大腸菌を 10ml L または $2\times\text{YT}$ ブロースに接種し、一晩振盪培養をした。菌液を 6,000 rpm で 10 分間遠心し、菌体を沈澱させた。上清を捨て、菌体に $120\mu\text{l}$ の Solution I および $80\mu\text{l}$ の lysozyme solution を加え、よく混ぜた後、室温で 5 分間放置した。次に $400\mu\text{l}$ の Soluton II を入れ、上下転倒によりよく混ぜ、氷上で 10 分間放置した後、5M 酢酸カリウム (pH 4.8) を $300\mu\text{l}$ 加え、氷上にて 15 分間置いた。13,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しい微量遠心チューブに移し、等量の TE 飽和フェノールを加え、上下転倒により混合した後、13,000 rpm で 5 分間遠心した。上清に等量のクロ

ロホルム／イソアミルアルコール（24:1）を加え、転倒混合後、13,000 rpmで5分間遠心した。上清を新しい微量遠心チューブに移し、二容量の冷99%エタノールを加え、-80°Cにて15分間放置した。さらに、13,000 rpmで10分間、4°Cで遠心した後、ペレットを75%の冷エタノールでリンスし、真空乾燥した。

次に、ペレットを100 μ l TE bufferに溶かし、RNase A（500 μ g/ml）を5 μ l加え、37°Cにて30分間インキュベートした。20% PEG-2.5M NaCl溶液を60 μ l加え、4°Cにて6時間以上放置した。13,000 rpmで、5分間遠心し、沈澱物を冷75%エタノールでリンスし、真空乾燥した。

4. 制限酵素によるプラスミドDNAの切断

プラスミドDNAに10 \times 制限酵素反応bufferを10分の1容量加え、次いで各々の制限酵素（ニッポンジーン、宝酒造）を2-4 unitを加え、至適温度で1時間反応させた。反応終了後、約1/10量の色素混合液（0.25% bromo-phenol blue、0.25% xylene cyanol (XC)、50% glycerol）を加え、制限酵素により切断されているかどうかをアガロースゲル電気泳動により確認した。

5. 電気泳動

(a) アガロース電気泳動

目的により、0.6%、0.7%、0.8%あるいは1.2%の濃度になるようにアガロースI（和光純薬）粉末を電気泳動用TBE buffer（0.089M Tris base、0.089M boric acid、0.002M EDTA）に加え、115°Cで5分間加温溶解し、溶解したアガロースゲルの一部をゲル床の脚部に注ぎ底固めをした。次に、試料の数に合わせてコームの数およびその大きさを決め、コームをゲル床に固定し、加温溶解したア

ガロースゲルに気泡が入らないようにゆっくり注ぎ、試料溝を作った。ゲルが固まった後、コームをはずしてゲル床を泳動タンクに置き、両側のタンクに TBE buffer を加えた。試料溝に TBE buffer を満たし、DNA 試料に 1/10 容量の色素混合液を加え、マイクロピペットを用い試料溝からもれないように静かに入れた。分子量の標準マーカーとして、制限酵素 HindIII で消化した DNA 断片を使用した。60-80mA で、2-3 時間電気泳動を行った後、ゲルをゲル床から取り出し、0.5mg/ml の Et. Br. を含む dH₂O に入れ、40 分間染色を行い、紫外線ランプ台上に載せ、DNA バンドを観察した。

(b) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

8% ポリアクリルアミドゲルの作製は以下の手順で行った。30% アクリルアミド保存液（アクリルアミド 29g、ビスアクリルアミド 1g、dH₂O を 100ml になるように加えたもの）9.58ml、5×TBE buffer 7.2ml および dH₂O 19.0ml を混合し、真空ポンプで脱気した。次に、400 μ l の過硫酸アンモニウム水溶液および 20 μ l の TEMED を加え、20×20×0.2cm の 2 枚のガラス板の間に流し込んだ。アクリル製コームをガラス板上部の間に挿入し、1 時間以上静置した。50V で 30 分間程度予備泳動し、試料溝内の TBE buffer を新しいものと取り換えてから試料を各溝に入れた。分子量のマーカーとして、pBR322 DNA の HinfI 消化断片を使用した。50V で、ブロムフェノールブルーのバンドが流れきる直前まで泳動した。泳動終了後、ガラス板よりゲルをはがし、0.5mg/ml Et. Br. 溶液に入れ染色を行った。

6. 制限酵素地図の作成

クローニングした DNA 断片を適当な制限酵素で切断し、アガロースあるいは

ポリアクリルアミドゲル（切断したDNA断片が1 Kb 以下の場合）電気泳動を行い、それぞれのDNA制限酵素による切断箇所がいくつ存在するかを調べた。次に、制限サイトが認められた制限酵素を用いて同時に切断し、その相互の切断パターンの比較から、制限酵素の切断箇所の位置を決定した。

同じ反応液で2種類の制限酵素を作用させ得る場合は同時に2つの制限酵素を加えた。しかし、酵素反応液が異なる場合は、まず、低塩濃度要求の制限酵素で消化した後、NaClを加え、塩濃度を変えるか、あるいはTE飽和フェノールで抽出後、クロロホルム/イソアミルアルコール処理、エタノール沈澱および真空乾燥を行って、再び新しい酵素反応液を加えてから別の制限酵素で消化した。

7. 塩基配列決定法

Tet G 遺伝子の塩基配列の決定は、クローニングされた Tet G 遺伝子を含む DNA断片をサブクローニングおよびデレーションミュータントを作製した後、ジデオキシシーケンス法 (Sanger *et al.*, 1977) により行った。

(a) サブクローニング

Tet G を含む 9 Kb HindIII DNA断片を制限酵素地図により制限酵素切断サイトを持つ適当な制限酵素で切断した。また、ベクタープラスミド pUC118 または 119 をインサートしようとするDNA断片の切断に用いたのと同じ制限酵素で切断し、アルカリフォスファターゼで処理し末端の脱リン酸化を行った。この2つのDNA溶液を混合し、滅菌dH₂Oで全量 200 μ lにした。TE飽和フェノール、クロロホルム/イソアミルアルコール処理し、エタノール沈澱、リンス、真空乾燥後、17 μ l の滅菌dH₂Oに溶かし、2 μ l の 10 \times Ligation buffer および 1 μ l の T4 Ligase (宝酒造) を加え、16 $^{\circ}$ C にて 24 時間反応させた。

一方、*E. coli* MV1184 株を 10ml の 2×YT ブロースに接種し、37°C で一晚培養した。この培養菌液 0.1ml を 10ml の新しい 2×YT ブロースに接種し、 $OD_{600}=0.4$ に達するまで 37°C で振盪培養を行い、5,000 rpm で 5 分間、4°C で遠心集菌した。菌体を氷温の transformation buffer (0.5% glucose、10mM 3-N-morpholino propanesulfonic acid、75mM $CaCl_2$) 5ml に懸濁し、5,000 rpm で 5 分間、4°C で遠心した。菌体を 1ml の transformation buffer に懸濁し、氷水中に 5 分間放置し、コンピテントセルとした。

200 μ l のコンピテントセルにリコンビナントプラスミドを加え、水中に 45 分間放置した。次いで 42°C 中に 45 秒間放置後、500 μ l の 2×YT ブロースを加え、37°C で 1 時間培養し、形質転換を行った。この培養液 0.1ml を ampicillin 50 μ g/ml と X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 28 μ g/ml を含む 2×YT 培地に塗抹し、37°C で 1 昼夜培養し、形質を発現させた。さらに、2×YT 培地上に増殖した白色のコロニーを滅菌したつま楊子で同じ平板に穿刺し、37°C で 1 昼夜培養を行った。

(b) デレーションミュータントの作製

デレーションミュータントの作製は宝酒造のキロシークエンス用デレーションキットを用いて行った。原理的には Henikoff (1984) の方法を改良したものである。リコンビナントプラスミドのインサート DNA のシークエンス用プライマーをアニーリングさせる側の末端から順次デレーションを行いミュータントを得た。このミュータントを得るために、プライマーのアニーリングサイトとインサート DNA との間を 2 つの制限酵素 (インサート DNA 側を a、プライマーのアニーリング側を b とする) で切断した。a の酵素は DNA を切断した後 5' 末端が突出したものまたは平滑末端になるもの、b の酵素は 3' 末端が突出するものが必要である。また a、b 両酵素ともインサート DNA にその制限酵素サイトはない

ことが必要である。本実験では、a 酵素は XbaI、b 酵素は SacI および KpnI を使用した。まず、インサート DNA 断片の両側からデレーションされたミュータントを得るため、サブクローニングにより得られた 4.3 kb XhoI DNA 断片をリコンビナントプラスミドから切り出し、Mung Bean nuclease および Klenow enzyme により両側を平滑末端にし、pUC119 の HincII サイトにクローニングした。その DNA 断片上の制限酵素サイトを利用して、逆向きの 2 つのクローンを得た。アルカリ法によりプラスミド DNA を抽出し、それぞれ上述の a、b の酵素で消化した。TE 飽和フェノール、クロロホルム/イソアミルアルコール処理、エタノール沈澱、リンス、次いで真空乾燥を行った。ペレットを 100 μ l の Exonuclease III buffer (50mM Tris-KCl pH 8.0, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM 2-メルカプトエタノール) に溶解し、別のチューブに MB nuclease buffer (40mM Sodium acetate, pH 4.5, 100mM NaCl, 2mM ZnCl₂, 10% glycerol.) を 100 μ l 入れ以下の操作を行った。DNA 溶液に 2 μ l (160 units) の Exonuclease III を加え、よく攪拌し、37°C にてインキュベートした。Exonuclease III で処理した DNA 10 μ l を 30 秒毎に MB nuclease buffer に順次に移した。次に、65°C で 5 分間インキュベートして Exonuclease III を失活させ、37°C に戻した。2 μ l (50 units) の Mung Bean nuclease を加え、37°C にて 45 分間インキュベートした。TE 飽和フェノール、クロロホルム/イソアミルアルコール処理、エタノール沈澱、リンス、次いで真空乾燥を行った後、50 μ l の Klenow buffer に溶解し、1 μ l (2units) の Klenow enzyme を加え、37°C にて 15 分間インキュベートした。2.5 倍量のエタノールを加え、遠心して沈澱を回収し、リンス後、真空乾燥した。得られた DNA を 40 μ l の TE buffer で溶解し、そのうちの 5-10 μ l を 100 μ l の Ligation solution A に加え、12 μ l の Ligation solution B を加え、よく攪拌した後、16°C にて一晩反応させた。エタノール沈澱、リンス、さらに、真空乾燥を行い、その DNA 沈澱を数 unit の制限酵素 a で切断し、そのままコンピ

テントセルに形質転換させた。

サブクローニングおよびデレーションにより得られたクローンを 5ml の 2×YT ブロースで培養し、アルカリ法によりプラスミド DNA を抽出した。抽出した DNA を 50 μ l の TE buffer で溶解した。アガロースゲル電気泳動によりそれぞれの分子サイズを確認し、分子サイズの差がおおよそ 200-300 bp のものを選んで、シーケンスに供試した。二本鎖テンプレートを変性させるため、上述のプラスミド DNA 溶液を 8 μ l 微量遠心チューブに取り、2 μ l の 2N NaOH を加え、室温で 10 分間インキュベートした。3M Sodium acetate (pH 4.5) を 3 μ l および dH₂O 7 μ l を加え、冷 99% エタノールを 60 μ l 加え混合し、-80°C で 15 分間放置した。13,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除き、ペレットを冷 75% エタノールでリンスし、真空乾燥した。変性させた DNA は -20°C に保存し、ジデオキシシーケンス反応に用いる直前に 10 μ l の dH₂O で溶解した。

(c) シーケンス用ゲルの作製

8% シーケンス用ゲルの作製は、まず尿素 16.8g に dH₂O を 14ml 加え、スターラーで溶かし、8ml の 40% アクリルアミドゲル保存液 (アクリルアミド 38g、ビスアクリルアミド 2g を dH₂O で 100ml にしたもの)、4ml の 10×TBE buffer (Tris base 121.1g、EDTA 7.4g、ホウ酸 53.4g を 1 リットルの dH₂O で溶解したもの) および 350 μ l の 10% 過硫酸アンモニウム (APS) を加え、アスピレータにより脱気した。次に、17 μ l の TEMED を加え、よく混合した後、0.35mm のシャーク型コームとスペーサーをはさんだ 40 × 20cm のガラス板の間に静かに注ぎ、ゲルが完全に固まるまで 1 時間以上放置した。また、6% のゲルは 40% ゲル保存液 9ml、尿素 25.2g、10×TBE buffer 6ml、10% APS 360 μ l、TEMED 60 μ l を混合し、同じように作製した。

(d) ジデオキシシーケンス反応

アニーリングおよびジデオキシシーケンス反応は T7 Sequencing Kit (Pharmacia) を用い以下の反応を行った。1本鎖に変性させたDNAを $10\mu\text{l}$ の dH_2O に溶かし、 $2\mu\text{l}$ の annealing buffer と $2\mu\text{l}$ のプライマー溶液を加え、 37°C で 20 分間インキュベートし、プライマーをアニールさせた後、少なくとも 10 分間室温に放置した。

一方、冷却した enzyme dilution buffer を用いて必要量の T7 DNA polymerase を $1.5\text{ units}/\mu\text{l}$ になるように希釈した。また、4本の微量遠心チューブに A、T、G、C の印をつけ、4種類の sequencing mix を $2.5\mu\text{l}$ ずつ対応するチューブに分注した。アニーリングしたテンプレートとプライマーが入っているチューブに $3\mu\text{l}$ の Labelling mix を入れ、続いて $1\mu\text{l}$ ($10\mu\text{Ci}$) の $[\alpha\text{-}^3\text{S}]\text{dATP}$ (New England Nuclear Corp. Boston, Mass) および $2\mu\text{l}$ の T7 DNA polymerase 希釈液を加え、室温で 5 分間インキュベートした。このインキュベーションを行っている間に、分注した4種の sequencing mix を温めるため、微量遠心チューブを少なくとも 1 分間 37°C に置いた。5分間ラベリング反応をさせ、この反応液を $4.5\mu\text{l}$ ずつ4種の sequencing mix に移し、穏やかに攪拌し、 37°C で 5 分間インキュベートした。 $5\mu\text{l}$ の stop solution を各々のチューブに加え、穏やかに攪拌し、軽く遠心して内容物を底に集めた。これらのチューブを $75\text{-}80^\circ\text{C}$ で 2 分間加熱し、反応液をそれぞれ $2\mu\text{l}$ シークエンスゲルのウェルに入れた。

(e) 電気泳動及びオートラジオグラフィー

作製したゲルを $1,000\text{V}$ で 30 分間予備泳動を行い、さきに調製した DNA サンプルをウェルに入れ、放熱板をガラス板につけ、 $1,500\text{-}2,000\text{V}$ で泳動を行った。キシレンシアノールが流れきった所で、一旦泳動を止め、同じサンプルを別の試料溝に注ぎ、再度泳動を行った。そのサンプルのプロモフェノールブルーが流れ

きった時泳動を終了した。ゲルを注意深くガラス板よりはがし、ゲル固定液（10%メタノール、10%酢酸）に30分間浸した。その後、ゲルを3MM濾紙の上に載せ、ゲル乾燥機を用い、80°Cで1時間乾燥させた。乾燥させたゲルをX線フィルムとともにX線フィルムカセットに入れ、室温にて一晩オートラジオグラムを行った。次に、フィルムの現像、定着を行い、水洗、乾燥した後、塩基配列を読み取った。

(f) 塩基配列の解析

決定した塩基配列は塩基配列解析用データベース Genetyx (Software Development Co., Ltd. Japan) により解析を行い、他のテトラサイクリン耐性遺伝子と比較した。

8. 転写開始点の解析

転写開始の解析はプライマー伸長法 (Sambrook *et al.*, 1989) により行った。シーケンスデータにより、転写開始点より下流に存在し、転写される RNA と相補性を持つような約 20 塩基の 1 本鎖 DNA を DNA 合成装置を用い合成し、プライマーとした。

(a) RNA 抽出法

リコンビナントプラスミドを持つ大腸菌を 10ml L ブロースに接種し、37°C で 1 晩振動培養を行った。この培養液を 10ml protoplasting buffer (15mM Tris-HCl, pH 8.0、0.45M Sucrose、8mM EDTA) で溶解し、80 μ l の lysozyme solution (50mg/ml) を加え、氷中に 15 分間放置した。4,000 rpm で 10 分間遠心し、沈澱に 0.5 ml lysing buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0、10mM NaCl、1mM クエ

ン酸ナトリウム、1.5% SDS) および 15 μ l の Diethyl pyrocarbonate を加え、よく混合した後、37°C で 5 分間放置した。250 μ l の飽和食塩水を添加し、水中に放置した後、10 分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、1 ml 冷 99% エタノールを加え、-20°C で 1 晩放置した。4°C で 15 分間遠心し、ペレットを 100 μ l 滅菌 dH₂O で溶解した。

(b) 反応

RNA (数十 μ g) とプライマーに 10mM Tris-HCl (pH 8.3)、1mM EDTA、0.25mM KCl で、20 μ l となるように調製した。60°C で、1 時間放置した後、室温で 1.5 時間ハイブリダイゼーションを行った。この混合液を希釈し、最終濃度 75mM KCl、0.25 mM EDTA、10mM MgCl₂、20mM Tris-HCl (pH 8.3)、10mM DTT、0.25mM 4 dNTP、アクチノマイシン 100 μ g/ml および逆転写酵素 100 units/ml になるように、それぞれ添加し、37°C で 1 時間反応させた。冷 99% エタノールを加え、沈澱した後、75% エタノールで洗浄し、乾燥した。沈澱を色素混合液 (ホルムアミド 90%、BPB 0.05%、EDTA 5mM、XC 0.05%) に溶かし、90°C で 30 分間熱処理後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

9. 遺伝子産物の分析

(a) マキシセルの作製および標識

リコンビナントプラスミド pUC19 (tet G を含む) および対照とした pUC19 をそれぞれ CSR603 株に形質転換し、それらの形質転換株を 10ml の K 培地 (2. 使用培地を参照) に接種し、37°C で一晩振盪培養をした。その培養液 0.1ml を 10ml の新しい K 培地に接種し、OD_{600nm} が 0.2 になるまで 37°C で振盪培養を行った。その培養液を滅菌シャーレに入れ、紫外線ランプ (15W) の真下約 50cm

の距離で、手で動かし菌液を混ぜながら、10 秒間照射した。照射後の培養液を L 字管に戻し、37°C で 1 時間振盪培養を行った。cycloserine を 100 μ g/ml になるように添加し、37°C で 8-12 時間振盪培養した。さらに、cycloserine を 200 μ g/ml になるように入れ、37°C で 1 時間培養した後、4,000 rpm で 10 分間遠心集菌した。菌体を Hershey salt (NaCl 5.4g、KCl 3.0g、NH₄Cl 1.1g、CaCl₂·2H₂O 15mg、MgCl₂·6H₂O 0.2g、FeCl₃·6H₂O 0.2mg、KH₂PO₄ 87mg、Trimza base 12.1g、dH₂O で 1,000ml にしたもの、pH7.4) で 2 回洗浄し、5ml の Hershey 培地 (Hersheysalt 100ml につき、20% glucose 2ml、2% threonine 1ml、1% leucine 1ml、2% proline 1ml、2% arginine 1ml および 0.1% thiamine 0.1ml を加えたもの) に懸濁し、37°C で 1 時間振盪培養した。L-[³⁵S] methionine (New England Nuclear Corp. Boston, Mass) を 50 μ Ci/ml になるように加え、37°C で 1 時間培養した。6,000 rpm で 10 分間遠心集菌し、0.1ml のサンプルバッファー (0.0625M Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、5% 2-ME、10% グリセロール、0.001% ブロムフェノールブルー) に懸濁した後、100°C で 4 分間加熱処理した。

(b) SDS ポリアクリルアミドゲルの作製および電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲルおよび buffer の組成は Table 2 に示した。まず、12.5% の separating gel (下層) を作り、20×20×0.2 cm のガラス板に流し込み、0.1M の SDS 溶液で飽和したブタノールを静かに重層し、30分間放置した。ゲルが固まった後、ブタノールを捨て、dH₂O で洗い、stacking gel (上層) を入れ、すぐにアクリル製コームをガラス板の間に挿入し、ゲルが固まるまで静置した。ガラス板を泳動装置にセットし、1×泳動用 buffer を入れ、15mA で 30分間 - 1 時間予備泳動した。加熱処理したサンプル 5-10 μ l を試料溝に注ぎ、25mA で泳動を行った。その時、サイズマーカーとして [¹⁴C] でラベルしたタンパク質分子量マーカー (Amersham, CFA. 626) をサンプルとともに泳動した。泳動終了後、

ゲルをガラス板からはがし、シーケンスゲルと同様に固定、乾燥し、オートラジオグラフィーにより標識されたタンパク質を検出し、分子サイズを求めた。

Protein Name	Approx. Molecular Weight (kDa)	Approx. pI
Actin	42	4.2
Myosin	200	5.0
Tubulin	55	5.0
G-actin	42	4.2
F-actin	42	4.2
Myosin II	200	5.0
Myosin I	100	5.0
Myosin III	100	5.0
Myosin IV	100	5.0
Myosin V	100	5.0
Myosin VI	100	5.0
Myosin VII	100	5.0
Myosin VIII	100	5.0
Myosin IX	100	5.0
Myosin X	100	5.0
Myosin XI	100	5.0
Myosin XII	100	5.0
Myosin XIII	100	5.0
Myosin XIV	100	5.0
Myosin XV	100	5.0
Myosin XVI	100	5.0
Myosin XVII	100	5.0
Myosin XVIII	100	5.0
Myosin XIX	100	5.0
Myosin XX	100	5.0
Myosin XXI	100	5.0
Myosin XXII	100	5.0
Myosin XXIII	100	5.0
Myosin XXIV	100	5.0
Myosin XXV	100	5.0
Myosin XXVI	100	5.0
Myosin XXVII	100	5.0
Myosin XXVIII	100	5.0
Myosin XXIX	100	5.0
Myosin XXX	100	5.0

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strain and plasmid	Relevant characteristics	Reference or derivation
<u>Vibrio</u>		
<u>anguillarum</u> MZ8122	TC ^r AP ^r CM ^r SM ^r SU ^r	Aoki <i>et al.</i> , 1987
<u>Escherichia</u>		
<u>coli</u> HB101	<u>supE44</u> , <u>ara14</u> , <u>galK2</u> , <u>lacU1</u> , <u>proA2</u> , <u>rpsL20</u> , <u>x15</u> , <u>mtl1</u> , <u>recA13</u> , <u>mcrA+</u> , <u>mcrB-</u>	Bolivar and Bacman, 1979
C600	<u>thr-1</u> , <u>surE44</u> , <u>leuB6</u> , <u>lacY1</u> , <u>tonA21</u> , <u>mcrA-</u> , <u>mcrB-</u> , λ -	Young and Davis, 1983
MV1184	<u>ara-</u> , <u>thi-</u> , <u>rpsL</u> , ϕ 80 <u>dlacZ-M15</u>	Vieira and Messing, 1987
CSR603	<u>uvaA6</u> , <u>recA1</u> , <u>phr</u> , <u>thr</u> , <u>leu</u> , <u>pro</u> , <u>his</u> , <u>thi</u> , <u>arg</u> , <u>lac</u> , <u>gal</u> , <u>ara</u> , <u>xyl</u> , <u>mtl</u> , <u>str</u>	Sancar <i>et al.</i> , 1979
pUC19	AP ^r , <u>lacZ'</u>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC118, 119	AP ^r , <u>lacZ'</u>	Vieira and Messing, 1987
pJA7601	TC ^r , CM ^r , SU ^r	Aoki <i>et al.</i> , 1987
pJA8115	TC ^r , CM ^r , AP ^r , SM ^r , SU ^r	" "
pJA8122	TC ^r , CM ^r , AP ^r , SM ^r , SU ^r	" "
pJA8202	TC ^r , CM ^r , AP ^r , SM ^r , SU ^r	" "
pJA8325	TC ^r , CM ^r , AP ^r , SM ^r , SU ^r	" "
RP1	TC ^r , KM ^r , AP ^r	<u>tet A</u> , Mendez <i>et al.</i> , 1980
R222	TC ^r , CM ^r , SM ^r , SU ^r ,	<u>tet B</u> , " "
pBR322	TC ^r	<u>tet C</u> , " "
RA1	TC ^r	<u>tet D</u> , " "
pSL1501	TC ^r	<u>tet E</u> , cloned from pSL1456, Marshall <i>et al.</i> , 1986

Table 2. Compositions of SDS-polyacrylamide gel solutions

Separating gel component (12.5%)

acrylamide solution(30%)	7.5 ml
ammonium persulfate(10%)	280 μ l
separating gel buffer	4.75ml
TEMED	12.5 μ l
dH ₂ O	6.25ml

Separating gel buffer (per 100ml)

Tris base	18.17g
10% SDS	4 ml

pH to 8.8 with 12N HCl, to a final volume of 100ml with dH₂O

Acrylamide(30%) (per 100ml)

acrylamide	30g
bisacrylamide	0.8g

to a final volume of 100ml with dH₂O

Stacking gel component

acrylamide(30%)	300 μ l
ammonium persulfate(10%)	28 μ l
stacking gel buffer	444 μ l
TEMED	5 μ l
dH ₂ O	1.0 ml

stacking gel buffer(per 100ml)

Tris-base	6.06g
10% SDS	4ml

pH to 6.8 with 12N HCl to a final volume of 100ml with dH₂O

10 \times running buffer (per 1l)

Tris	30.25g
glycine	144g
SDS	10g

to a final volume of 1l with dH₂O

結 果

1. 制限酵素地図および塩基配列決定の strategy

V. anguillarum 由来 R プラスミド pJA8122 よりクローニングされた HindIII 切断断片の制限酵素地図および塩基配列決定の strategy は Fig. 6 に示した。Fig. 6 (a) に 9 kb HindIII DNA 断片の制限酵素地図で、(b) に今回塩基配列を決定した部分の地図および strategy を示した。tet A および tet R はそれぞれ Tet G の耐性遺伝子およびレプレッサー (調節遺伝子) の位置を示した。

塩基配列の決定はサブクローニングで得られた BamHI-XhoI 約 3.4 kb の DNA 断片を含むクローンを用い、deletion mutant を作製して行ったが、オーバーラップしなかった部分について、制限酵素 PstI、AvaIII および XhoI 切断サイトを利用し、サブクローニングして得られたクローンを使用した。

2. Tet G 遺伝子の塩基配列

今回決定した約 2,600 base pair (bp) の塩基配列には、2つの open reading frame (ORF) が確認された。1つは 1,179 bp よりなる ORF で Tet G の耐性遺伝子 tet A (G) にあたり (Fig. 7)、それにコードされたアミノ酸が393 残基であった。算出された遺伝子産物の分子量は 40,895 ダルトンであった。また、この ORF の GC 含量は 57.7% であった。

この ORF の開始コドンの上流に -10 領域 TATATG (5' 末端より 435-440 塩

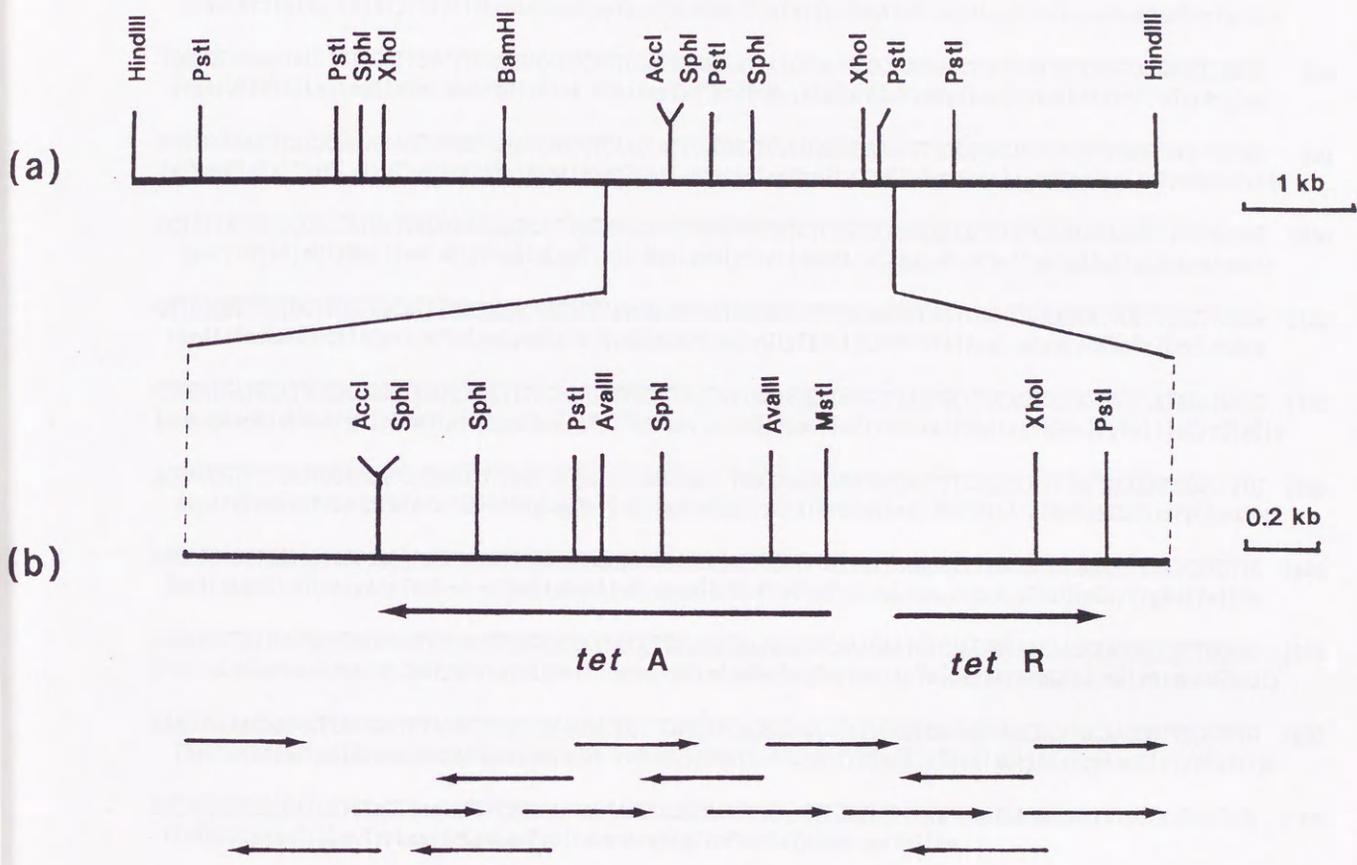


Fig. 6 Restriction map of a *Hind*III fragment cloned from pJA8122 (a) and a sequencing strategy for the Tet G determinant nucleotide sequence within a 2.6 kb region (b). The large arrow shows the extent and the direction of transcription of the *tet A*(G) and *tet R*(G) genes.

CGGCGTCTCGGACGAAAAGCCCTCCGCGCAGAGAAAAGCGTATTGCGTCTCGGCGGTGCCAAAATTCGGTTCTGTCGGTCCGAGTCCCGGCATGGATACG 100
 CGCGCCGTCCCATAAGAGAGCAACGCCGTTCTGAAGCTCAGGGCATTCTCTTCAGGAACACCCGCCAGTCTCTATTCTCTCGGGTAGCGAGCGGGTA 200
 TGGCGTTCCCGCAGCATCGCCTCGGGCAGCGCATCAAGCAGCGCTCGTTTGTCTGGAAATGCCAGTAAAGCGCAGGCTGCTGAACCTTGAGCGGTTACG 300
 CGAGCTTCCGCGTCGTCAGGCTGTCCATGCCAACCTCGTTCAACAGCTCTAGGCCCGCCGATCAGGTTGCCCTGTCCAGTTTGGTCATTACAGTTCC 400
 TTCGCCAGTGTGACAATTTATCACCAGTAAGTTATATGTCATCTCCTATCGTTGATAAAGTCGCTCCATTGAGCGGCGCTGGAGTTTCAGGTGCGC 500
 -35 -10 → *tet A mRNA* ValArg
 AGCTCTGCCATCATTGCCCTGCTGATCGTGGGTCTTGACGCCATGGGTCTCGGCCTCATCATGCCGCTCTTCGACGCTTCTGCGTGAGCTTGTGCCAG 600
 SerSerAlaIleIleAlaLeuLeuIleValGlyLeuAspAlaMetGlyLeuGlyLeuIleMetProValLeuProThrLeuLeuArgGluLeuValProAla
 CAGAGCAGTCTGGACACTATGGTGCCTGCTGCTCTATGCATTGATGCAGGTCGCTTTCGCGCCATGCTTGGACAGCTTTCGGATTCTTACGG 700
 GluGlnValAlaGlyHisTyrGlyAlaLeuLeuSerLeuTyrAlaLeuMetGlnValValPheAlaProMetLeuGlyGlnLeuSerAspSerTyrGly
 TCGGCGTCCGGTACTTCTGGCTTCTTTCGAGGAGCCGAGTCGATTACAGGATTATGGCATCAGCGCCGCTTATGGGTGCTCTATATCGGCCGACTC 800
 ArgArgProValLeuLeuAlaSerLeuAlaGlyAlaAlaValAspTyrThrIleMetAlaSerAlaProValLeuTrpValLeuTyrIleGlyArgLeu
 GTGTCCGGCGTCACGGGCGCAACCGGAGCTGTAGCAGCCTCAACATTGCCGATTGACGGGGAAAGGTTCTCGCGCAGCTGGTTCGGCTACATGGGG 900
 ValSerGlyValThrGlyAlaThrGlyAlaValAlaAlaSerThrIleAlaAspSerThrGlyGluGlySerArgAlaArgTrpPheGlyTyrMetGlyAla
 CCTGTTATGGGCGGGCATGATTGCCGGCCAGCACTTGGTGGCATGCTCGGTGGTATCTCTGCTCATGCCCGTTTATCGCCGCCGCTTCTCAACGG 1000
 CysTyrGlyAlaGlyMetIleAlaGlyProAlaLeuGlyGlyMetLeuGlyGlyIleSerAlaHisAlaProPheIleAlaAlaAlaLeuLeuAsnGly
 GTTCGGTTCCTGCTTGCCTGCATTTTCTCAAGGAGACTCATCAGCCATGGCGGGACCGGAAAGCCGTTTCGCATCAAACCATTCGTTCTGTTACGG 1100
 PheAlaPheLeuLeuAlaCysIlePheLeuLysGluThrHisHisSerHisGlyGlyThrGlyLysProValArgIleLysProPheValLeuLeuArg
 CTGGATGATGCATTGCCGGGCTAGGTGCGCTTTTCGAGTTTTCTCATTATTCAACTGATCGGCCAAGTGCCTGCAGCCCTATGGGTGCATATATGGCG 1200
 LeuAspAspAlaLeuArgGlyLeuGlyAlaLeuPheAlaValPhePheIleIleGlnLeuIleGlyGlnValProAlaAlaLeuTrpValIleTyrGlyGlu
 AGGACCGTTTTAGTGAACACCGCGACCGTTGGTTGTGCTCGCGCGTTTGGGGCAACACATCGCATCTTCCAAGCGTTTGTACCAGCGCCGCTTTC 1300
 AspArgPheGlnTrpAsnThrAlaThrValGlyLeuSerLeuAlaAlaPheGlyAlaThrHisAlaIlePheGlnAlaPheValThrGlyProLeuSer
 AAGCCGGCTTGGAGAGCGGCGCAGCTGCTTTGGCATGGCTGCGGATGGCACTGGCTTCGTTCTTCTGGCTTTTCCACGCGAGGATGGATGGTGTTC 1400
 SerArgLeuGlyGluArgArgThrLeuLeuPheGlyMetAlaAlaAspGlyThrGlyPheValLeuLeuAlaPheAlaThrGlnGlyTrpMetValPhe
 CCGATTCTGTGCTGTTGCCCGGGGGTGTGGCATGCCGCCCTTGAGGCAATGCTCTCAACAATGTCAGCAGTAACAAGCAAGGGGCTTGTCAAG 1500
 ProIleLeuLeuLeuAlaAlaGlyGlyValGlyMetProAlaLeuGlnAlaMetLeuSerAsnAsnValSerSerAsnLysGlnGlyAlaLeuGlnGly
 GAACGCTAACGAGCCTACCAATCTAAGCTCTATCGCAGGACCGTTGGCTTACAGCACTCTATTCTGCCACCGCGGGGCATGGAACGGTTGGGTTTG 1600
 ThrLeuThrSerLeuThrAsnLeuSerSerIleAlaGlyProLeuGlyPheThrAlaLeuTyrSerAlaThrAlaGlyAlaTrpAsnGlyTrpValTrp
 GATTGTGGCGCGATCCTCTATTTAATATGTCTGCCAATACTACGAGACCACTCGCAACTTTCATTGGTGAATTAGTCATGGCATTGGCATGCGTAGA 1700
 IleValGlyAlaIleLeuTyrLeuIleCysLeuProIleLeuArgArgProPheAlaThrSerLeuValIle
 CTTAGGAGAAATGACGGATTAATCTGTTGAGCAATCATCTCTTTCGGGGCGAGTGCCAATGATGACCTTAGTTCACACTGCTCTGTCGCGAATATCTC 1800
 AACTCCGTCACGCCGCCAACCGCTCGGCTTGACAGTCCAGCGTCAGCCCGCGTGAAGGCACTGGAAGAAGACCTCGGCATCCTCTTGTTCGAGC 1900
 GTCATGGCCCGCGGTTCCGGCTGACCGAGGCCGACCCATTTGTCGAGCGGATAGCCGTAGGTATTGACCAACTCGACAGTCCGGTGAACACGCGGC 2000
 ATGGCGCCAGCCGGAGAAGCGGCCGCTCGTATCGGTATCCATGCCCTGATTGCGATAGCTTCTCGCAAAGCTGATCGGCAATACCGCAAGGATT 2100
 ACCCCGATGTTGAAGTCGAGATCGCGAAGGCCCGGCCGTTGAAGCGGTGGTGCACGTTCCGCGCCGCGAGTTGGACGTGGCGTTCGTCGCGCACGCC 2200
 CAACCACCGACTGCCATTCCCGT 2224

Fig. 7 Nucleotide sequence of a 2,224 bp DNA fragment containing the *tet A(G)* resistance gene and predicted amino acid sequence.

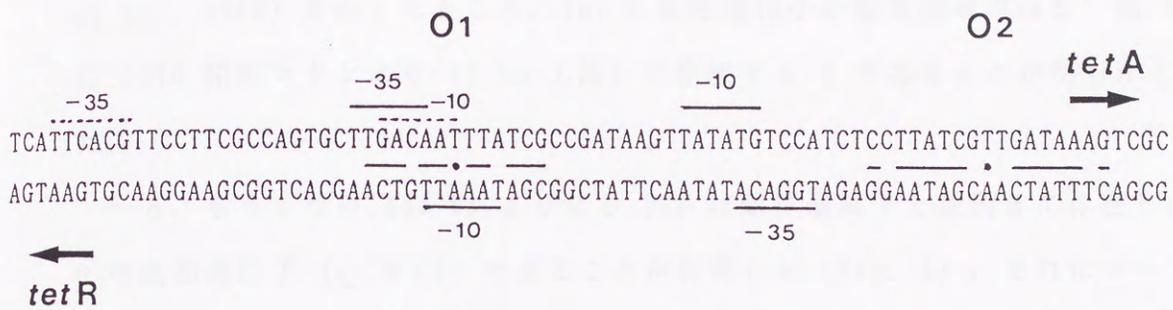


Fig. 9 Portion of the control region (position of 388 to 468 in Fig. 7) of the Tet G determinant. The palindromic operator sequences O₁ and O₂ are marked by bars.

基)、-35 領域 TTGACA (5' 末端より 412-417 塩基) が認められた。

転写開始点を解析するため、このシーケンスデータより 20 塩基のプライマー、5' -GCTGCGCACCTGAAACTCCA (GTG 開始コドンの +9 から -11 に相当する部分) を合成した。このプライマーを用い、*in vitro* transcription (Sambrook *et al.*, 1989) を行ったところ、Tet G 耐性遺伝子の転写開始点は 5' 側 448 番目 (GTG 開始コドンより 47 bp 上流) に位置する C であることが明らかとなった。

一方、もう 1 つの 630 bp よりなる ORF は耐性遺伝子と逆向きに存在し、Tet G の調節遺伝子 tet R (G) であることが判明した (Fig. 8)。それにコードされたアミノ酸は 210 残基で、算出した分子量は 23,595 ダルトンであった。この ORF の GC 含量は 60.1% であった。この ORF の翻訳開始コドンの上流に -10 領域 TAAATT (5' 末端より 82 - 87 塩基)、-35 領域 TGGACA (69 -74 塩基) が認められた。

Tet G 調節遺伝子の転写開始点について、20 塩基の合成プライマー 5' -AACC TCGTTCAACAGCTCTA (ATG 開始コドンの +64 から +41 に相当する部分) を用い調べたところ、ATG 開始コドンの 20 bp 上流に位置する G より転写されることが明らかとなった。

2 つの遺伝子の間に位置するコントロール領域には 3 つのプロモーター様配列が存在していることがコンピューター解析により明らかとなった。そのうちの 2 つは構造遺伝子 (tet A) 用、他の 1 つは調節遺伝子 (tet R) 用と推定された。さらに、この領域には、2 つの palindromic sequence が存在していることが確認できた (Fig. 9)。

3. 他の tet 遺伝子との比較

決定した Tet G 耐性遺伝子および調節遺伝子の塩基配列、さらにそれより推定したアミノ酸配列をデータベースを用いて今までに報告された他のグラム陰性菌およびグラム陽性菌由来の tet 遺伝子と比較し、ホモロジーの解析を行った。耐性遺伝子 tet A (G) はグラム陰性菌由来の RP1/Tn1721 (クラス A) (Waters *et al.*, 1983)、Tn10 (クラス B) (Hillen and Schollmeier, 1983) および pBR322 (クラス C) (Sutcliffe, 1978) 間において、塩基配列レベルで RP1/Tn1721 と 64.2%、Tn10 と 55.2% および pBR322 と 61.2% のホモロジーが認められた (Table 3)。アミノ酸レベルでは RP1/Tn1721 と 61.0%、Tn10 と 50.4%、pBR322 と 60.4% のホモロジーが示された。調節遺伝子 tet R (G) は RP1/Tn1721、Tn10、pSC101 (クラス C、Unger *et al.*, 1984a)、RA1 (クラス D) (Unger *et al.* 1984b) および pSL1456 (クラス E) (Tovar *et al.* 1988) 由来のものとは塩基配列レベルではそれぞれ 65.1%、53.1%、61.0%、56.1% および 54.8% のホモロジーが認められ、アミノ酸レベルではそれぞれ 58.0%、48.8%、56.6%、47.8% および 46.7% のホモロジーが認められた (Table 3)。

一方、Campylobacter jejuni 由来の tet 遺伝子 (Manavathu *et al.*, 1988) およびグラム陽性菌由来の tet 遺伝子：Bacillus 由来の R プラスミド pTHT15 および pNS1981 (Hoshino *et al.*, 1985; Sakaguchi *et al.*, 1988) に由来した tet 遺伝子、Staphylococcus mutans (LeBlanc *et al.*, 1988)、Streptomyces rimosus (Reynes *et al.*, 1988) に由来した tet 遺伝子とは全体的な類似性は認められなかった。

Tet G 遺伝子にコードされた耐性タンパク質のアミノ酸配列はクラス A、B、C と、レプレッサータンパク質のアミノ酸配列はクラス A、B、C、D および E のものとそれぞれ比較し、同じアミノ酸配列を示す箇所が 149 個および 61 個認められた (Fig. 10、Fig. 11)。

Table 3 Homology of nucleotide and amino acid sequences of class G compared with classes A, B, C, D and E

Class	Nucleotide homology (%)		Amino acid homology (%)	
	<i>tet A</i>	<i>tet R</i>	<i>tet A</i>	<i>tet R</i>
G : A	64.2	65.1	61.0	58.0
G : B	55.2	53.1	50.4	48.8
G : C	61.2	61.0	60.4	56.6
G : D		56.1		47.8
G : E		54.8		46.7

A	V	K	P	N	I	P	L	I	V	I	L	S	T	V	A	L	D	A	V	G	I	G	L	I	M	P	V	L	P	G	L	R	D	L	V	H	S	N	D	V	T	A	H	Y	G	I	L	L	A	L	Y	A	L	V	Q	F	A	C	A	P	V	L	G	A	L	S	D	R	F	
B	M	N	S	T	K	I	A	L	V	I	T	L	D	A	M	G	I	G	L	I	M	P	V	L	P	T	L	L	R	E	F	I	A	S	E	D	I	A	N	H	F	G	V	L	L	A	L	Y	A	L	M	Q	V	I	F	A	P	W	L	G	K	M	S	D	R	F				
C	M	K	S	N	N	A	L	I	V	I	L	G	T	V	T	L	D	A	V	G	I	G	L	M	P	V	L	P	G	L	R	D	I	V	H	S	D	S	I	A	S	H	Y	G	V	L	L	A	L	Y	A	L	M	Q	F	L	C	A	P	V	L	G	A	L	S	D	R	F		
G	V	R	S	S	A	I	I	A	L	L	I	V	G	L	D	A	M	G	L	I	M	P	V	L	P	T	L	L	R	E	L	V	P	A	E	Q	V	A	G	H	Y	G	A	L	L	S	L	Y	A	L	M	Q	V	V	F	A	P	M	L	G	Q	L	S	D	S	Y				
A	G	R	R	P	I	L	L	V	S	L	A	G	A	T	V	D	Y	A	I	M	A	T	A	P	F	L	W	V	L	Y	I	G	R	I	V	A	G	I	T	G	A	T	G	A	V	A	G	A	Y	I	A	D	I	T	D	G	D	E	R	A	R	H	F	G	F	M	S	A	C	F
B	G	R	R	P	V	L	L	L	S	L	I	G	A	S	L	D	Y	L	L	A	F	S	S	A	L	W	M	L	Y	L	G	R	L	L	S	G	I	T	G	A	T	G	A	V	A	S	V	I	A	D	T	T	S	A	S	O	R	V	K	W	F	G	W	L	G	A	S	F		
C	G	R	R	P	V	L	L	A	S	L	L	G	A	T	I	D	Y	A	I	M	A	T	T	P	V	L	W	I	L	Y	A	G	R	I	V	A	G	I	T	G	A	T	G	A	V	A	G	A	Y	I	A	D	I	T	D	G	E	D	R	A	R	H	F	G	L	M	S	A	C	F
G	G	R	R	P	V	L	L	A	S	L	A	G	A	A	V	D	Y	T	I	M	A	S	A	P	V	L	W	V	L	Y	I	G	R	L	V	S	G	V	T	G	A	T	G	A	V	A	S	T	I	A	D	S	T	G	E	G	S	R	A	R	W	F	G	Y	M	G	A	C	Y	
A	G	F	G	M	V	A	G	P	V	L	G	G	L	M	G	G	F	S	P	H	A	P	F	F	A	A	A	L	N	G	L	N	F	L	T	G	C	F	L	L	P	E	S	H	K	G	E	R	R	P	L	R	E	A	L	N	P	L	S	F	V	R	W	A	R	G	M	T		
B	G	L	G	L	I	A	G	P	I	I	G	G	F	A	G	E	I	S	P	H	S	P	F	F	I	A	A	L	L	N	I	V	T	F	L	V	M	F	W	F	R	E	T	K	N	T	R	D	N	T	D	T	E	V	G	V	E	T	Q	S	N	S	V	I	T	L	F	K		
C	G	V	G	M	V	A	G	P	V	A	G	L	L	G	A	I	S	L	H	A	P	F	L	A	A	V	L	N	G	L	N	L	L	G	C	F	L	M	O	E	S	H	K	G	E	R	R	P	M	L	R	A	F	N	P	V	S	S	F	R	W	A	R	G	M	T				
G	G	A	G	M	I	A	G	P	A	L	G	G	M	L	G	I	S	A	H	A	P	F	I	A	A	L	L	N	G	F	A	F	L	L	A	C	I	F	L	K	E	T	H	S	H	G	G	T	G	K	P	V	R	I	K	P	F	V	L	L	R	L	D	D	A	L	R			
A	V	V	A	L	M	A	V	F	F	I	M	Q	L	V	G	V	P	A	A	L	W	V	I	F	G	E	D	R	F	H	W	D	A	T	T	I	G	I	S	L	A	A	F	G	I	L	H	S	L	A	Q	A	M	I	T	G	P	V	A	A	R	L	G	E	R	R	A	L		
B	T	M	P	I	L	L	I	I	Y	F	S	A	Q	L	I	G	I	P	A	T	V	W	V	L	F	T	E	N	R	F	G	W	N	S	M	M	V	G	F	S	L	A	G	L	G	L	L	H	S	V	F	Q	A	F	V	A	G	R	I	A	T	K	W	G	E	K	T	A	V	
C	I	V	A	A	L	M	T	V	F	F	I	M	Q	L	V	G	V	P	A	A	L	W	V	I	F	G	E	D	R	F	R	W	S	A	T	M	I	G	L	S	L	A	V	F	G	I	L	H	A	L	A	Q	A	F	V	T	G	P	A	T	K	R	F	G	E	K	Q	A	I	
G	G	L	G	A	L	F	A	V	F	F	I	I	Q	L	I	G	V	P	A	A	L	W	V	I	Y	G	E	D	R	F	Q	W	N	T	A	T	V	G	L	S	L	A	A	F	G	A	T	H	A	I	F	Q	A	F	V	T	G	P	L	S	S	R	L	G	E	R	T	L		
A	M	L	G	M	I	A	D	G	T	G	Y	I	L	L	A	F	A	T	R	G	W	M	A	F	P	I	M	V	L	L	A	S	G	G	I	G	M	P	A	L	Q	A	M	L	S	R	Q	V	D	E	E	R	Q	Q	L	Q	G	S	L	A	A	L	T	S	L	T	S	I	V	
B	L	L	E	F	I	A	D	S	S	A	F	A	F	L	A	F	I	S	E	G	W	L	D	F	P	V	L	I	L	A	G	G	I	A	L	P	A	L	Q	V	M	S	I	Q	T	K	S	H	E	Q	G	A	L	Q	G	L	L	V	S	L	T	N	A	T	G	V	I			
C	I	A	G	M	A	D	A	L	G	Y	V	L	L	A	F	A	T	R	G	W	M	A	F	P	I	M	I	L	L	A	S	G	G	I	G	M	P	A	L	Q	A	M	L	S	R	Q	V	D	D	D	H	Q	Q	L	Q	G	S	L	A	A	L	T	S	L	T	S	I	T		
G	L	F	G	M	A	D	A	T	G	F	V	L	L	A	F	A	T	Q	G	W	M	V	F	P	I	L	L	L	A	A	G	G	V	G	M	P	A	L	Q	A	M	L	S	N	N	V	S	S	N	K	Q	G	A	L	Q	G	T	L	T	S	L	T	N	L	S	S	I	A		
A	G	P	L	L	F	T	A	I	Y	A	A	S	I	T	T	W	N	G	W	A	I	A	G	A	A	L	Y	L	L	C	L	P	A	L	R	R	G	L	W	S	G	A	Q	R	A	D	R																							
B	G	P	L	L	F	T	V	I	Y	N	H	S	L	P	I	W	D	G	W	I	W	I	I	G	L	A	F	Y																																										
C	G	P	L	I	V	T	A	I	Y	A	A	S	A	S	T	W	N	G	L	A	I	V	G	A	A	L	Y	L	V	C	L	P	A	L	R	R	G	A	W	S	R	A	T	S	T	X																								
G	G	P	L	G	F	T	A	L	Y	S	A	T	A	G	A	W	N	G	W	W	I	V	G	A	I	L	Y	L	I	C	L	P	I	L	R	R	P	F	A	T	S	L	V	I																										

Fig. 10 Comparison of amino acid sequences of four Tet A proteins from classes A, B, C and G. Identical amino acids in all four proteins are boxed.

Tet G 耐性タンパク質とクラス A、B、C のものとの codon usage の比較を Table 4 に示した。Tet G の一部の codon 例えば Phe、Leu、Ala および Asn の各コドン構成する塩基の出現頻度はクラス A および C と類似していることが明らかとなった。

推定したアミノ酸配列から算出した Tet 耐性タンパク質の親水性、疎水性について、Tet G はクラス A、B および C と類似しており、ほぼ 20 残基程度の疎水性クラスターが 12 個存在し、中央に大きな親水性領域が存在した。Fig. 12 は Tet G と Tet A との耐性タンパク質のアミノ酸配列の親水性、疎水性の比較を示した。親水性の高い領域の位置および中央に大きな親水性領域が存在する点で両者は類似していた。

Fig. 13 は Tn1721 (クラス A)、Tn10 (クラス B) および pBR322 (クラス C) の Tet タンパク質上のテトラサイクリン binding region (Chopra, 1986) およびその部位と対応する Tet G の部分アミノ酸配列を示した。Tet G のこの親水性部分のアミノ酸配列はクラス A、B および C とかなり類似していた。推定された TC binding sites (67/68 残基あるいは 65/66 残基の Ser-Asp、Chopra, 1986) と対応する Tet G の 65/66 残基は同じ配列 (Ser-Asp) であった。しかし、Tet G のこの親水性部分のアミノ酸配列の 67、68 残基は Ser-Tyr であり、クラス A、B および C のそれ (Arg-Phe) と異なっていた。

Tet G のプロモーターを含むコントロール領域には、2つの palindromic sequence が存在することをすでに述べたが、クラス A、B、C、D、および E の 2つの palindromic sequence はほぼ同じ位置に存在していること、さらに、それらの塩基配列の組成とは若干異なっていることが明らかになっている。Fig. 14 に示したように tet G の 2つの palindromic sequence はコンピュータ検索により同定されたものであるが、operator 2 (O_2) の塩基配列の組成はクラス A および C と類似していた。 O_1 の位置にクラス A および C とかなり類似する配列

(-TTTATCACCGATAA-) が認められたが、palindrome の中心となる配列が異なっていた。

4. 遺伝子産物の分析

Tet G 耐性遺伝子にコードされる遺伝子産物についてマキシセル法により調べたところ、約 35 キロダルトンの Tet タンパク質が検出された (Fig. 15)。

Table 3 Comparison of the codon usage of tet resistance genes of four classes of A, B, C and G

		A	B	C	G			A	B	C	G	
Phe	UUU	3	22	4	6	Thr	ACU	4	5	6	3	
	UUC	18	6	13	14		ACC	7	9	9	8	
Leu	UUA	1	23	-	3	ACA	4	6	3	2		
	UUG	6	13	11	8	ACG	4	6	3	8		
	CUU	8	11	8	17	Trp	UGG	9	12	8	8	
	CUC	17	2	15	13		Ala	GCU	7	13	8	7
	CUA	-	4	9	5	GCC		23	5	24	21	
	CUG	24	7	13	15	GCA		9	13	8	18	
					GCG	22		9	22	12		
Ile	AUU	9	22	6	10	Tyr	UAU	5	4	4	7	
	AUC	16	10	20	11		UAC	3	3	4	3	
	AUA	2	5	1	3	His	CAU	1	3	4	4	
Met	AUG	15	13	17	12		CAC	6	2	3	2	
	Val	GUU	3	7	3	8	Gln	CAA	5	8	4	5
		GUC	13	4	13	10		CAG	5	5	7	6
		GUA	3	6	6	2	Asn	AAU	1	9	1	2
GUG		8	8	7	8	AAC		5	1	5	5	
Ser	UCU	1	4	1	7	Lys	AAA	2	6	2	1	
	UCC	2	-	6	1		AAG	-	3	2	3	
	UCA	2	9	-	5	Asp	GAU	8	9	5	6	
	UCG	7	7	7	4		GAC	5	1	8	2	
	AGU	-	9	1	1	Glu	GAA	3	8	1	1	
	AGC	5	2	7	6		GAG	5	4	4	5	
Pro	CCU	4	5	-	1	Arg	CGU	2	5	3	3	
	CCC	4	3	8	2		CGC	8	2	8	7	
	CCA	1	5	3	5		CGA	1	1	2	1	
	CCG	10	1	5	9		CGG	11	1	5	4	
Cys	UGU	2	1	1	2	AGA	-	1	1	1		
	UGC	2	-	3	1	AGG	2	-	1	-		
Gly	GGU	3	13	4	12							
	GGC	26	9	24	17							
	GGA	6	7	10	9							
	GGG	11	9	5	11							

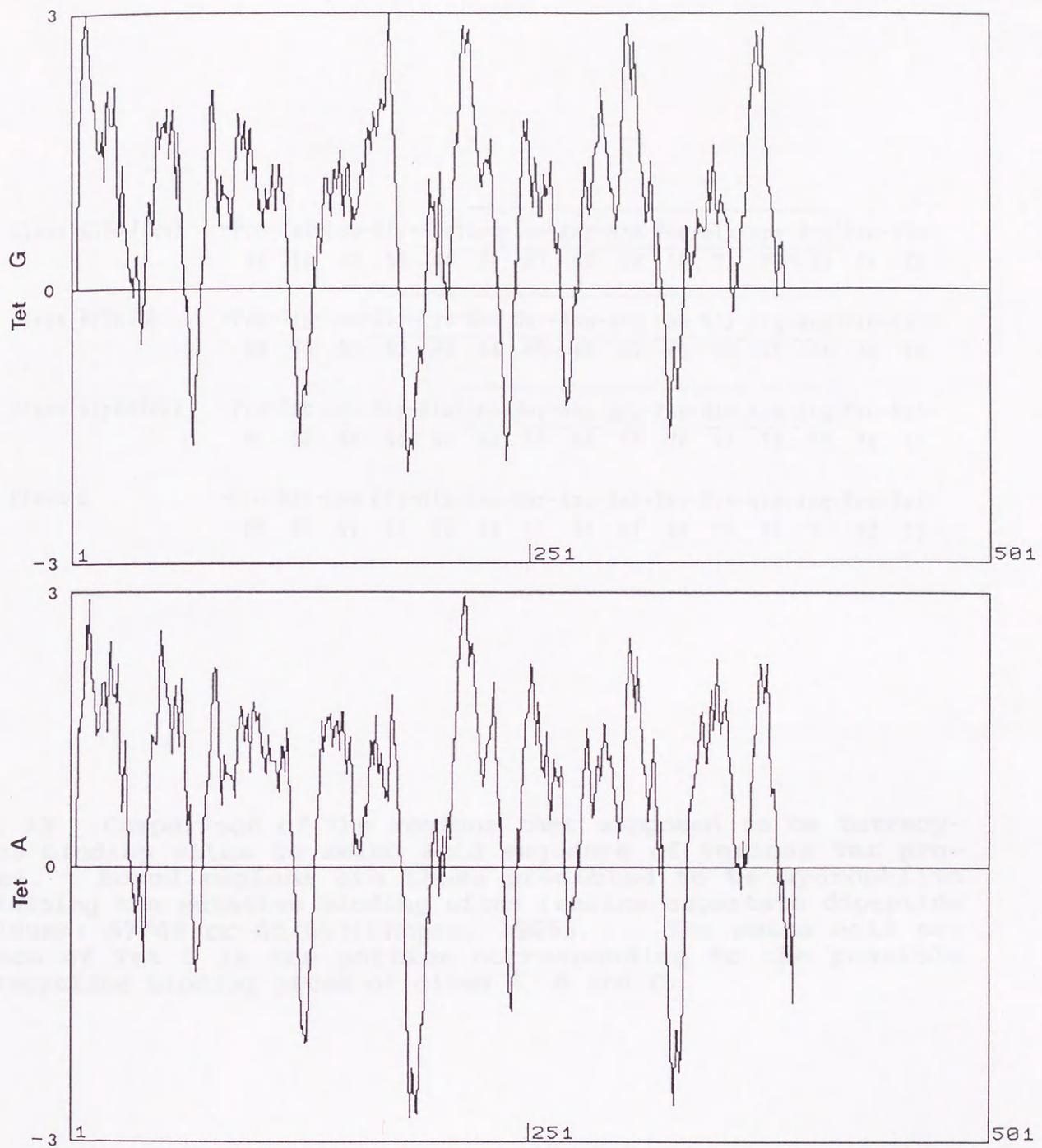


Fig. 12 Comparison of hydropathic profiles of the Tet G and RP1 (class A) encoding tetracycline resistance proteins.

Class A (Tn1721)	-Pro-Val-Leu-Gly-Ala-	Leu-Ser-Asp-Arg-Phe-Gly-Arg-Arg	-Pro-Ile-
	61 62 63 64 65	66 67 68 69 70 71 72 73	74 75
Class B (Tn10)	-Pro-Trp-Leu-	Gly-Lys-Met-Ser-Asp-Arg-Phe-Gly-Arg-Arg	-Pro-Val-
	59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73		
Class C (pBR322)	-Pro-Trp-Leu-Gly-Ala-	Leu-Ser-Asp-Arg-Phe-Gly-Arg-Arg	-Pro-Val-
	61 62 63 64 65	66 67 68 69 70 71 72 73	74 75
Class G	-Pro-Met-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Asp-Ser-Tyr-Gly-Arg-Arg-Pro-Val-		
	59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73		

Fig. 13 Comparison of the regions that supposed to be tetracycline binding sites in amino acid sequence of various Tet proteins. Boxed regions are those predicted to be hydrophilic containing the putative binding sites (serine-aspartate dipeptide residues: 67/68 or 65/66)(Chopra, 1986). The amino acid sequence of Tet G is the portion corresponding to the possible tetracycline binding sites of class A, B and C.

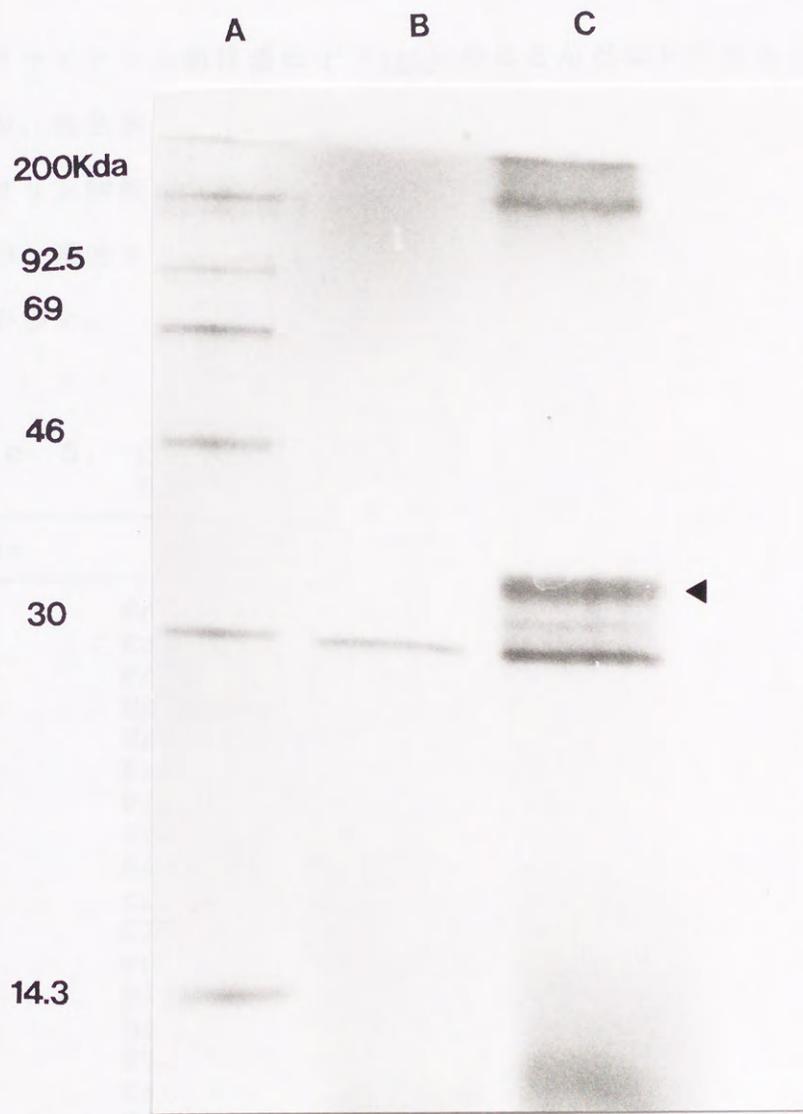


Fig. 15 Autoradiogram of polyacrylamide gel showing the *tet A(G)* gene product in Maxicells. Lane A, size marker; B, pUC19; C, pUC19-*tet A(G)*.

考 察

テトラサイクリン耐性遺伝子 (tet) のほとんどは R プラスミド上にコードされているが、染色体あるいはトランスポゾン上コードされているものもある。テトラサイクリン耐性遺伝子は種々のグラム陰性菌およびグラム陽性菌より発見されているが、現在それらの構造、機能、分布、起源および進化などについてまだ不明な点が多い。

Table 5. Classification of tetracycline resistance determinants (From Levy et al. 1989)

Class	Representative family, genus, or species
A	<i>Enterobacteriaceae; Aeromonas, Pseudomonas, Vibrio</i>
B	<i>Enterobacteriaceae; Yersinia, Haemophilus, Vibrio</i>
C	<i>Enterobacteriaceae; Pseudomonas, Vibrio</i>
D	<i>Enterobacteriaceae; Aeromonas, Pasteurella, Vibrio</i>
E	<i>Escherichia, Aeromonas</i>
F	<i>Bacteroides fragilis</i>
G	<i>Vibrio anguillarum</i>
K	<i>Staphylococcus</i>
L	<i>Bacillus, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus</i>
M	<i>Clostridium, Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Gardnerella, Kingella, Neisseria, Mycoplasma, Ureaplasma, Eikenella, Veillonella, Fusobacterium, Peptostreptococcus</i>
N	<i>Streptococcus agalactiae</i>
O	<i>Campylobacter, Streptococcus, Enterococcus</i>
P	<i>Clostridium perfringens</i>

グラム陰性桿菌由来 R プラスミドがコードする tet はそれらの DNA 構造よりクラス A、B、C、D、E、F および G に分類されている。さらに、グラム陽性球菌

由来の tet はそれらの DNA 構造よりクラス K、L、M、N、O および P に分けられている (Levy et al., 1989)。クラス A、B および C の tet について最もよく研究されており、それらのクラスの代表的な耐性遺伝子の DNA 構造がすでに明らかにされている。

クラス A に属する tet として、Pseudomonas aeruginosa 由来 RP1 および RP4、E. coli 由来 pIP15、Proteus morgani 由来 R446b、Salmonella derby 由来 pIP7 および S. panama 由来 pIP113 等の R プラスミドにコードされたものがある (Mendez et al., 1980)。RP1/Tn1721 由来の tet は 2,709 塩基の DNA 断片に 2 つの open reading frame が存在し、1 つは耐性遺伝子で、他は調節遺伝子である。両遺伝子はコントロール領域を境に向きを反対にしてつながっている。耐性遺伝子は 399 アミノ酸よりなる耐性タンパク質 (Tet A タンパク質) をコードし、調節遺伝子は 216 アミノ酸よりなる Tet R タンパク質をコードしている (Waters et al., 1983)。

クラス B に属する tet は Shigella 由来 R100 (R222)、Providencia 由来 R688、Salmonella typhimurium 由来 R64 および R126 等の R プラスミドにコードされている。その代表的なものとして R100 のトランスポゾン Tn10 にある tet は全塩基配列が明らかにされている (Hillen et al., 1983; Postle et al., 1984)。Tn10 にコードされている Tet A タンパク質および Tet R タンパク質はそれぞれ 401、207 アミノ酸残基からなっている。

クラス C に属する tet は E. coli 由来 pSC101、Salmonella 由来 SP219、pR120、R144 等がある。pSC101/pBR322 に由来する tet の塩基配列はすでに決定されている (Sutcliffe, 1978; Unger et al., 1984a)。それにコードされている Tet A タンパク質および Tet R タンパク質はそれぞれ 397、219 アミノ酸残基からなっている。

クラス D は Aeromonas 由来の RA1 の tet に、クラス E は E. coli 由来の

pSL1456 の tet に代表される。これら 2 つの遺伝子は調節遺伝子の塩基配列のみが明らかにされており (Unger et al., 1984b; Tovar et al., 1988)、それぞれ 218 アミノ酸残基 (クラス D) および 211 アミノ酸残基 (クラス E) よりなる TetR タンパク質をコードしている。クラス F は Bacteroides fragilis より発見され (Park et al., 1987)、その tet の塩基配列はまだ解明されていない。

これらの解明された tet にはいくつもの共通点がある。いずれも耐性遺伝子と調節遺伝子 2 つの遺伝子から構成されている。両遺伝子は隣合って逆方向に転写される。両遺伝子の間に位置するコントロール領域には 2 つの palindromic operator が存在している (Klock et al., 1985)。クラス A、B および C の耐性遺伝子の遺伝子産物である耐性タンパク質はそれぞれ 34 KDa、36 KDa、34 KDa と分子サイズがほぼ一致している (塩基配列から推定された分子量はそれぞれ 42 KDa、43 KDa、42 KDa である)。それに決定されたクラス A、B、C、D および E の塩基配列および推定したアミノ酸配列にはある程度のホモロジーがあることが確認されている (Levy, 1988; Tovar et al., 1988)。

これらの異なる tet は細菌の中での分布が極めて不均一である。Marshall et al. (1983) がヒトおよび動物より分離された 225 株テトラサイクリン耐性大腸菌を用い、クラス A、B、C および D に特異的な DNA 断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法によりその耐性遺伝子のタイプを調べたところ、最も検出頻度の高いのがクラス B (Tn10 タイプ) であった (73.3%)。次いでクラス A (RP1) (21.7%)、クラス C (pSC101) (8%) の順であった。また、3.5% の耐性株は A、B および C の中の 2 つの耐性遺伝子を保有していた。しかし、クラス D (RA1) は検出されなかった。クラス B の tet は大腸菌以外の菌種にも多く分布しており、Salmonella、Shigella、Haemophilus (Levy, 1988) および V. anguillarum (Aoki et al., 1987) より検出されたという報告がある。

V. anguillarum 由来 R プラスミド pJA8122 にコードされた Tet G は 9 Kb

HindIII 断片上に存在していた。今回決定した約 2,600 bp の塩基配列には、2 つの ORF が確認された。1 つは 1,179 bp よりなる ORF は耐性遺伝子 tet A(G) で、393 アミノ酸よりなる耐性タンパク質をコードしている。もう 1 つは 630 bp よりなる調節遺伝子 tet R(G) で、210 アミノ酸よりなるタンパク質をコードしている。両遺伝子の間にあるコントロール領域に 2 つの palindromic sequence が存在し、tet A(G) および tet R(G) のプロモーターと互いに重なり合っている。DNA 構造はクラス A、B、C、D および E と類似していることが明らかになった。

tet A(G) にコードされた耐性タンパク質について、マキシセル法により測定した分子サイズは約 35 KDa で、アミノ酸配列から算定したのは 41 KDa であった。また、アミノ酸配列はクラス A、B および C と 50.4 - 61.0% のホモロジーが認められた。さらに、Tet G とクラス A、B および C 4 つのアミノ酸配列間において 149 個アミノ酸残基が共通で、機能的に重要な部位が高いホモロジーを示し、保存されていることから、Tet G は他のグラム陰性桿菌由来のものと同じ起源であることが示唆された。

これらの耐性遺伝子はテトラサイクリンに対する耐性レベルにも若干の差が認められた。Mendez ら (1980) はクラス A、B、C および D のグループに属する R プラスミドを保持する E. coli C600 株のテトラサイクリンに対する耐性レベル (MIC) を調べたところ、25 (pSC101)、75 (RP1)、100 (RA1) および 150 (R222) μ g/ml というそれぞれ異なる耐性値であった。さらに、クラス E に属する tet をコードする pSL1456 に対してテトラサイクリンの耐性値は 60-70 μ g/ml であった (Marshall et al., 1986)。Tet G をコードする R プラスミド pJA8122 を保有する E. coli C600 株のテトラサイクリンに対する耐性値は 50 μ g/ml であった (Aoki et al., 1987)。

一方、グラム陽性球菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子はいくつかのタイプに分類されている(クラス K、L、M、N、O、P)。クラス Kは *Staphylococci* に共通なプラスミド pT181 由来する tet である(Khan and Novick, 1983)。クラス Lの tet は *Streptococcus*、*Bacillus*、*Staphylococcus* 等に分布している(Polak and Novick, 1982)。クラス Mの tet は最も多くの菌種に分布しており、*Streptococcus*、*Staphylococcus* (Levy, 1989) のみならず、*Mycoplasma*、*Ureaplasma*、*Gardnerella vaginalis* (Roberts and Kenny, 1986)、*Neisseria*、*Kingella*、*Eikenella* の一部の種(Morse et al., 1986; Knapp et al., 1988)、*Clostridium difficile* (Hachler et al., 1987)、*Fusobacterium*、*Peptostreptococcus* および *Veillonella* からも検出されている(Roberts and Moncla, 1988)。この tet は *Enterococcus faecalis* 由来 R プラスミドのトランスポゾン Tn916 より最初に見い出されたものである(Franke and Clewell, 1981)。クラス Oの tet は *Streptococci* 等より発見された。クラス Pの tet は *Clostridium perfringens* より発見されたが、他の *Clostridium* の種からは見つかっていない。

これらのグラム陽性菌由来の各クラスの tet 間で DNA 相同性が認められている。クラス K と L はアミノ酸レベルでは約 65% のホモロジーがあり(Ishiwa and Shibahara, 1985)、クラス M と O との間では塩基配列レベルで 76% のホモロジーがあることがすでに明らかにされている(Sougakoff et al., 1987)。しかし、これらのグラム陽性菌由来の tet はグラム陰性菌由来のものとホモロジーを示さず、それにコードされているタンパク質もグラム陰性菌由来の Tet とは異なっている(Martin et al., 1986; Hachler et al., 1987; Levy, 1988; Schwarz et al., 1992)。今回決定した Tet G は上述のグラム陽性菌由来のものと塩基配列およびアミノ酸配列の比較を行ったが、全体的な類似性は認められなかった。

テトラサイクリン耐性機構は耐性株が吸収したテトラサイクリンの菌体外への排出によることが 1980 年に McMurry と Levy によって証明された。その排出を担うタンパク質 Tet は Tn1721、Tn10 および pBR322 ではそれぞれ 405、402 および 397 アミノ酸残基よりなる単一の膜タンパク質である。分子サイズは電気泳動的には 34 kDa、36 kDa および 34 kDa で、塩基配列より推定された分子量はそれぞれ 42 kDa、43 kDa および 42 kDa である (Chopra, 1985)。最近、Tn10 の Tet タンパク質が精製された (Hickman *et al.*, 1990) が、精製タンパク質からの再構成が成功していない。また、Tn10 の Tet タンパク質について、ハイドロパシー解析によりほぼ 20 残基程度の疎水性クラスターが 12 個存在し、中央に大きな親水性領域を持つことが示されている。この構造は Tn1721 および pBR322 にコードされた Tet タンパク質にも認められ、二次性膜輸送体の基本構造として考えられている。Tet タンパク質は α 、 β 両領域が存在し、中央ループを境にして区分される。*tet* はシストロン内相補性を示すことがすでに報告されており (Curiale *et al.*, 1984)、 α に欠損を持つタンパク質と、 β に欠損を持つタンパク質を同時に発現させると正常な機能が回復される。この性質から Tet タンパク質が多量体として機能していることが示唆されている。

Chopra (1986) は Tet タンパク質中央ループの Ser⁶⁵ - Asp⁶⁶ 残基はテトラサイクリン結合部位と推定した。また、山口 (1991) は中央ループの保存性の高いアミノ酸残基について、部位特異変異導入の方法で、それぞれの機能を調べたところ、Ser⁶⁵ を置換した場合は輸送活性に大きな変化がなかったが、Arg⁷⁰ を Trp、Ala、Leu に置換した場合には、いずれも輸送活性は消失したので、Arg⁷⁰ は輸送に重要な残基であることを提唱した。

Tet G 耐性遺伝子にコードされた Tet タンパク質のアミノ酸は 393 残基であった。算出された分子量は 40,895 ダルトン、マキシセル法により、SDS ポリアクリルアミドゲルで求めた分子サイズは 35,000 ダルトンであった。ハイドロパ

シー解析により、このタンパク質は同じく 12 個のクラスターがあり、中央に親水性のループが存在することが明らかになった。また、アミノ酸組成、特にテトラサイクリン binding site などの機能残基がクラス A、B および C に属する Tet タンパク質と類似しており、アミノ酸配列の 65-66 番目が Ser-Asp であり、70 番目は Arg であることは他の Tet タンパク質と一致した。

これらの結果より Tet G がコードする Tet タンパク質が機能上他のグラム陰性菌由来のものと同じことであるが考えられた。すなわち、Tet G の耐性機構は他のグラム陰性菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子と同様に、Tet タンパク質を介在してテトラサイクリンを菌体外へ能動的に排出することによるものであることと推定された。

Tet G の調節遺伝子がコードしているタンパク質は 210 アミノ酸残基よりなり、推定した分子サイズは 23.6 KDa であった。今まで報告されたクラス A、B、C、D および E の調節タンパク質は 207 から 219 アミノ酸より構成されており、分子サイズは 23.4 - 24.4 KDa であった。Tet G の調節遺伝子が作るタンパク質はこれらの調節遺伝子のタンパク質の分子サイズとほぼ一致した。

Unger *et al.* (1984b) および Levy (1988) は、クラス A、B、C および D の Tet の調節遺伝子の相同性を調べたところ、アミノ酸配列ではクラス A と C 間は 60%、クラス B と D の間は 63% のホモロジーが存在したことが確認された。しかし、この 2 つのグループの間では 45% のホモロジーしか存在しなかった。一方、クラス E の調節遺伝子はクラス A、B、C および D のいずれとも約 50% のホモロジーが存在し、上述の 2 つのグループの間に位置することが明らかとなった (Tovar *et al.*, 1988)。耐性遺伝子において、クラス A、B および C 3 つの *tet* 耐性遺伝子のみ決定されているが、同じ傾向が示されている。RP1/Tn1721 (クラス A) は pBR322 と塩基配列では 74%、アミノ酸配列では 78.3% のホモロジーが認められたのに対して、Tn10 (クラス B) とのホモロジーはそれぞれ 48%

と 45.1% であった。(Waters *et al.*, 1984)。

今回決定した Tet G 耐性遺伝子のクラス A、B および C と、調節遺伝子のクラス A、B、C、D および E とのホモロジーを調べたところ、アミノ酸レベルでは、Tet G はクラス A、C のものとそれぞれおよそ 60% のホモロジーを示し、クラス B、D および E とそれぞれ 50% 前後のホモロジーを示したことから、Tet G は構造上クラス A および C と比較的類似していることが示唆された。

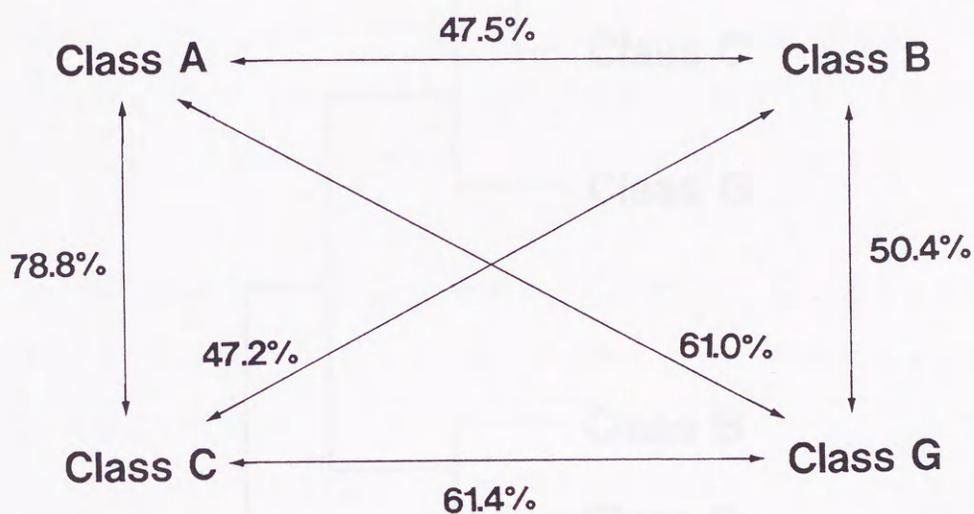


Fig. 16 Amino acid homology in the resistance proteins for tetracycline resistance determinants A, B, C and G.

Fig. 16に Tet G の耐性遺伝子とクラス A (RP1/Tn1721)、B (Tn10) および C (pBR322) の耐性遺伝子とのホモロジーを示した。

以上の結果より、筆者は Tet G は現在までに報告されたグラム陰性菌のテトラサイクリン耐性遺伝子と共通の起源で、進化の過程で、クラス A、C と同じ祖先

配列を持ち、さらに、突然変異を蓄積することにより異なる配列に分岐したものと推察した (Fig. 17)。

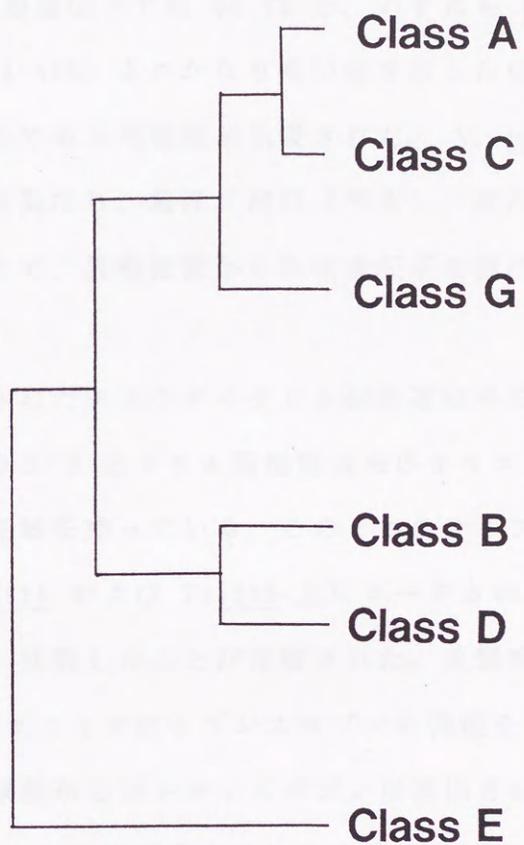


Fig. 17 Supposed phylogenetic relationships of the tet genes from Gram-negative bacteria.

テトラサイクリン耐性遺伝子は各種の魚類病原菌由来のRプラスミドより多く検出されているが、塩基配列はほとんど決定されていない。他のグラム陰性桿菌由来の tet 遺伝子についても、すでに述べたようにごく少数のもののみ、塩基配列が解析されている。Tet G はどのような経路で由来し、どのように拡散して行くのか、関連するデータが少なくまだ不明であるが、Tet G 耐性遺伝子の GC 含量は 57.7%、調節遺伝子では 60.1% と、いずれも V. anguillarum ゲノム DNA の GC 含量 (44-46%) よりかなり高い値を示したので、この遺伝子は他の菌種から由来したものである可能性が示唆された。V. anguillarum は他の菌種例えば腸内細菌群とは異なり、海洋、河口 (汽水)、河川 (淡水) すべての環境水域に分布しているので、異種細菌から外来遺伝子を受け入れる機会が多いと考えられる。

現在まで報告されたテトラサイクリン耐性遺伝子の宿主域から見ると、グラム陰性菌由来のクラス B とグラム陽性菌由来のクラス M が種々の菌種から検出され、最も広い宿主域を持っている。この2つのタイプの tet はそれぞれトランスポゾン Tn10、Tn916 および Tn1545 上にコードされ、トランスポゾンにより異種細菌へ転移され、拡散したことが推察された。魚類病原菌では、A. salmonicida の非伝達性 R プラスミドはトランスポゾンの機能を有することが証明されているが、他の魚類病原菌からはトランスポゾンは検出されていない (Aoki and Takahashi, 1986)。Tet G の起源あるいは由来を究明するのにこの遺伝子をコードする R プラスミドの構造、機能、伝達等についても研究する必要があると考えられる。

第二章 クロラムフェニコール耐性遺伝子について

序 言

Vibrio anguillarum 由来 R プラスミドがコードする新しいタイプのクロラムフェニコール耐性遺伝子 (cat) の構造解析を行った。

V. anguillarum PT24 株由来 R プラスミド pJA7324 (CP、SA、SM、TC 耐性) よりクローニングした cat を含む DNA 断片を用い、サブクローニングおよびデレーションミュータントの作製を行い、cat 遺伝子の塩基配列を決定した。決定した塩基配列および推定したアミノ酸配列をデータベースにより既知の cat と相同性を求め、DNA 構造を比較し、その機能、起源および進化を考察した。cat の遺伝子産物についてマキシセル法により調べた。さらに、この cat が分離由来が異なる *V. anguillarum* の R プラスミドに広く分布しているかどうかを調べるため、この cat を含む DNA 断片をプローブとして、コロニー・ハイブダイゼーション法 (Grunstein and Hogness, 1975) により求めた。

材料および方法

1. 使用した菌株およびプラスミド

本実験に使用した菌株およびプラスミドは Table 6 に示した。

V. anguillarum PT24 株由来 CP、SA、SM および TC 耐性の R プラスミド pJA7324 は *cat* の由来菌株として用いた。pJA7324 より *cat* をベクタープラスミド pUC19 にクローニングしたものを今回塩基配列解析および遺伝子産物分析に用いた。プラスミド pUC118、pUC119 および *E. coli* HB101、MV1184 株はそれぞれサブクローニングのベクターおよび形質転換の宿主菌として使用した。*E. coli* CSR603 株はマキシセル法の宿主菌に用いた。また、このタイプの *cat* は *V. anguillarum* の R プラスミドが保持しているかどうかを調べるため、分離年代の異なる *V. anguillarum* 由来の R プラスミド pJA7601、pJA8122、pJA8202、pJA8325、pPT85045、pPT86029、pPT8789、pAC8903、pSH89114、pSH90060、pSH90075、pSH91037、pWA91011、pWA91025、pWA91026 および Rsm 418 (群馬県水産試験場林 不二雄博士より分与) を使用した。

2. コロニーハイブリダイゼーション

(a) プローブの作成および標識

cat を含むリコンビナントプラスミドを制限酵素 *Pvu*II および *Bam*HI により切断し、アガロースゲル電気泳動を行った。インサート DNA バンドを含むゲル片を切り出し、透析チューブに入れ、TE buffer を適量に加えた後、40 から 60 mA で数時間泳動し、ゲル内の DNA を溶出させた。泳動終了直前に電極の (+) (-) を逆にし、30 秒間泳動した。透析チューブ中の TE buffer をエッペンドルフチューブに移し、フェノール処理、次いでクロロホルム/イソアミルアルコール処理後、エタノール沈澱により DNA 断片を回収した。その DNA 断片を Random Primer DNA Labeling Kit (宝酒造) を用い、³²P による標識を行った。DNA 溶液 5 μl、random primer 2 μl、10× buffer 2.5 μl、dNTP 混合液

(dGTP、dATP、dTTP) 2.5 μ l、dH₂O 7 μ l、[α -³²P]dCTP (ICN Biomedicals Inc. USA) 5 μ l (50 μ Ci) および klenow fragment 1 μ l を混合し、37°C で 3 時間保温した。次に、65°C で 5 分間加熱し、酵素を滅活させた後、95°C で 3 分間加熱変性させ、直ちに氷水に移し急冷し、一本鎖DNAを得、プローブとした。

(b) DNA のニトロセルロースフィルターへの固定

V. anguillarum 由来 CP 耐性の R プラスミドをそれぞれ *E. coli* C600 株に混合培養により伝達させた。これらの R プラスミドを保有する *E. coli* C600 株を L 寒天培地上に載せたニトロセルロースフィルターに接種し、37°C で一晩培養した。フィルターを平板よりはがし、0.5M NaOH 溶液に 10 分間浸し、1M Tris HCl (pH 7.4) 溶液に 5 分間浸した。さらに、新しい 1M Tris HCl (pH 7.4) 溶液に 5 分間 2 回浸した後、0.5M Tris HCl、1.5M NaCl 溶液に浸した。フィルターを 2×SSC 溶液で洗浄し、30 分間風乾させ、80°C で 2 時間ベーキングを行い、DNA をフィルターに固定させた。

(c) ハイブリダイゼーション

DNA を固定したニトロセルロースフィルターを耐熱ビニール袋に入れ、予め 68°C にストックした 4×SSC-0.1% SDS、10×Denhardt 溶液および 50 μ l サケ精子DNA の混合液を入れ、68°C で 3-4 時間保温した。次いで、この溶液を取り出した後、hybridization buffer (4×SSC-0.5% SDS、10×Denhardt、50 μ l サケ精子DNA) を入れ、予め ³²P でラベルし、熱変性してあった DNA プローブを添加した。時々よく混ぜ、68°C で 24 時間反応させた。その後、hybridization buffer を捨て、4×SSC-0.1% SDS 溶液を適量添加し、洗浄後、3×SSC-0.1% SDS 溶液を入れ、68°C で 30 分間洗浄した。次いで、2×SSC-0.1% SDS 溶液で 68°C で 30 分間、1×SSC-0.1% SDS 溶液で 68°C にて 30 分

間洗浄した。バックグラウンドの比活性値を確認後、フィルターを出し、濾紙で十分に溶液を吸収させた。次いで新しい濾紙にはさみ、乾燥機中で 30 分間乾燥した。乾燥したフィルターを濾紙に固定し、サランラップで包み、フジ X 線フィルムとともに X 線フィルムカセットに収納した。次に、 -80°C のフリーザーに入れ、6 時間から 2 日間露出させ、オートラジオグラフィーを行った。フィルムを現像、定着した後、水洗、乾燥した。

使用培地、プラスミド DNA の調製、制限酵素によるプラスミド DNA の消化、電気泳動、制限酵素地図の作製、塩基配列決定法、転写開始の解析および遺伝子産物の分析法は第二章に述べた方法に従って行った。

Table 6. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strain and plasmid	Relevant characteristics	Reference or derivation
<u>Vibrio</u>		
<u>anguillarum</u> PT24	CP ^r SA ^r SM ^r TC ^r	Mitoma <u>et al.</u> , 1984
<u>Escherichia</u>		
<u>coli</u> HB101	<u>supE44, ara14, galK2, lacU1, proA2, rpsL20, x15, mtl1, recA13, mcrA+, mcrB-</u>	Bolivar and Baclman, 1979
C600	<u>thr-1, surE44, leuB6, lacY1, tonA21, mcrA-, mcrB-, λ-</u>	Young and Davis, 1983
MV1184	<u>ara-, thi-, rpsL, φ80dlacZ-M15</u>	Vieira and Messing, 1987
CSR603	<u>uvaA6, recA1, phr, thr, leu, pro, his, thi, arg, lac, gal, ara, xyl, mtl, str</u>	Sancar <u>et al.</u> , 1979
pUC118, 119	AP ^r , <u>lacZ'</u>	Vieira and Messing, 1987
R plasmid from <u>V. anguillarum</u>		
pJA7324	CP ^r SA ^r SM ^r TC ^r	Aoki <u>et al.</u> , 1984
pJA7601	CP ^r SA ^r TC ^r	Aoki <u>et al.</u> , 1984
pJA8122	AP ^r CP ^r SA ^r SM ^r TC ^r	Aoki <u>et al.</u> , 1984
pJA8202	AP ^r CP ^r SA ^r SM ^r TC ^r	Aoki <u>et al.</u> , 1984
pJA8325	AP ^r CP ^r SA ^r SM ^r TC ^r	Aoki <u>et al.</u> , 1984
pPT85045	CP ^r SM ^r TMP ^r	This study
pPT86029	CP ^r SA ^r SM ^r TMP ^r	"
pPT8789	CP ^r SA ^r SM ^r TMP ^r	"
pAC8902	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pAC8903	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pSH89114	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pSH90060	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pSH90075	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pSH91037	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pWA91011	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pWA91025	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
pWA91026	CP ^r KM ^r SA ^r SM ^r TC ^r TMP ^r	"
Rms418	CP ^r SA ^r SM ^r TC ^r	Masuyoshi <u>et al.</u> , 1988

結 果

1. 制限酵素地図

V. anguillarum 由来 R プラスミド pJA7324 よりクローニングした BamHI 切断断片の制限酵素地図は Fig. 18 に示した。この 2.6 Kb DNA 断片上、DraI、EcoRI、HpaI および PvuII サイトがそれぞれ 1 箇所、NcoI サイトが 2 箇所存在した。さらに、サブクローニングしたところ、BamHI - PvuII 断片を含むクローン (pVA 2) は CP 耐性を発現したが、BamHI - EcoRI DNA 断片を含むクローンは感受性を示したので、cat 遺伝子が BamHI - PvuII 約 2.0 Kb 断片上に存在することが確認できた。

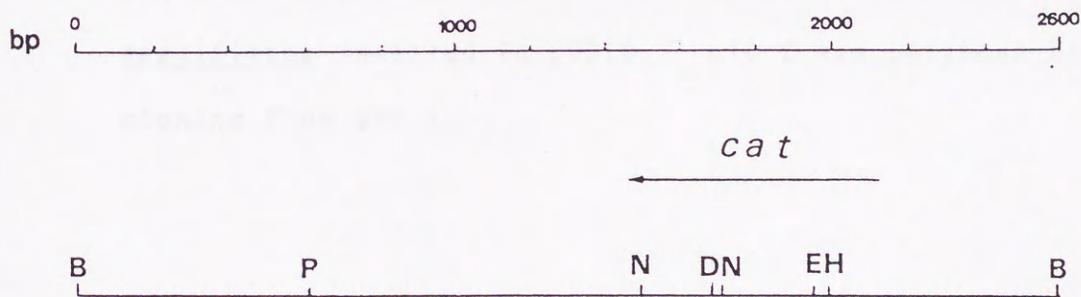


Fig. 18 Restriction enzyme map of a 2.6 Kb BamHI DNA fragment cloned from pJA7324. The restriction sites are: B, BamHI; D, DraI; E, EcoRI; H, HpaI; P, PvuII and N, NcoI.

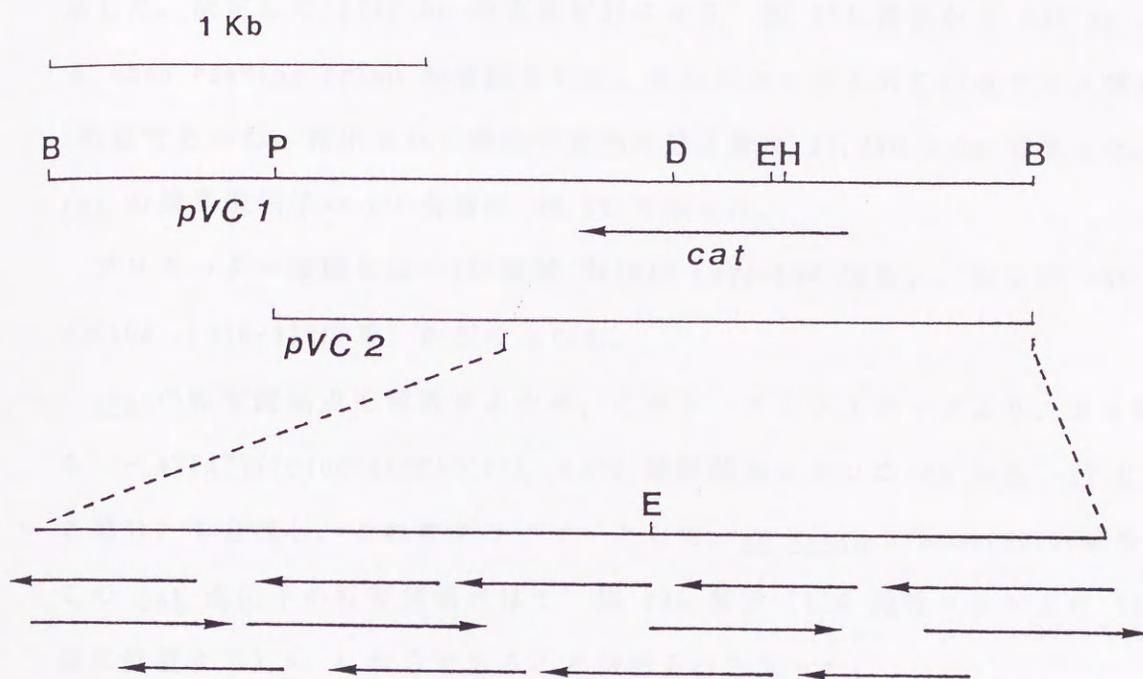


Fig. 19 Sequencing strategy of a specific DNA fragment cloned from pJA7324. pVC 1 was a 2.6 Kb DNA fragment from pJA7324 of V. anguillarum inserted in pUC19. pVC 2 was obtained by sub-cloning from pVC 1.

2. cat の塩基配列

塩基配列決定の strategy は Fig. 19 に示した。塩基配列の決定は PvuII - BamHI DNA 断片 (pVC 2) を用い、deletion mutant の作製および EcoRI サイトを利用してサブクローニングにより得られたクローンを使用した。

決定した塩基配列およびその塩基配列より推定したアミノ酸配列は Fig. 20 に示した。決定した 1348 bp の塩基配列には 5' 側 478 番目から 648 bp よりなる open reading frame が確認された。それにコードされているアミノ酸は 216 残基であった。算出された遺伝子産物の分子量は 25,470.5 Da であった。また、cat の構造遺伝子の GC 含量は 38.9% であった。

プロモーター領域には -10 領域 TATAAT (391-396 塩基)、および -35 領域 ATGACA (368-373塩基) が認められた。

cat の転写開始点を解析するため、このシーケンスデータより、24 塩基 5' -ATTATTTTCTCCTAATCATCATA (ATG 翻訳開始コドンの +2 から -22 に相当する部分) を合成し、これをプライマーとして、in vitro transcription を試みた。この cat 遺伝子の転写開始点は 5' 側 405 番目 (ATG 開始コドンより 73 bp 上流に位置する) の A からであることが明らかとなった。

3. 他の cat との比較

決定した cat の塩基配列および推定したアミノ酸配列 (CAT) をもとにデータベースにより、いままで報告された他のグラム陰性菌およびグラム陽性菌由来のものと比較し、ホモロジー解析を行った。

GGATCCCAAGGAGCTTGCCAAGATTATTAAGTGGGCAAAGCAGCAGGAACGGGAGCAGCCAGTGGCCGTCTGTGCTCGTT 80
CACCTCCTGAGCTTGCTTTGGTGTAGGTATAATACCCAAAAACGAAGTTTATGCGGAACAGGATAACACCTCGAAATCGG 160
AGTTTATATGGCTTCGTGGGGGAGTTATGTGTTTGTGCTTTGTGCGATTAAACGCGAATCAGGGGTTGACGGCAGAAATAG 240
ACTGGAATTACACTTCTTGAGTCCGGCTTGCCGAAAAATTCTGATTGGATTAGTTGTTCCGGGTGCGAAAAACAGTCGTA 320
GTTCCGGGGAAAAACCGAATTTTGACCCGAAACCGCAAAAAACCGAAATGACAGTTCCTATCAGTATCAGTATAATGTC 400
TATAAGAGCCGGGGAAAAACAACATATAAACGATTTTCAAAGGCTATATGGATATGTATGATTAGGAGAAAATAAT 480
→ *cat* mRNA -35 -10
SD Met
GGAGTTTCGTTTGGTTGATCTGAAAACATGAAAAGAAAAGAGTACTTTACGCATTATTTTGAATCTGTGCCTTGCACAT 560
GluPheArgLeuValAspLeuLysThrTrpLysArgLysGluTyrPheThrHisTyrPheGluSerValProCysThrTyr
ATAGCATGACCGTAAAGCTGGATATTACTACGATAAAAACCGTAAAGCGAAATTGTATCCCGCCCTTTTGTATGCCGTT 640
SerMetThrValLysLeuAspIleThrThrIleLysThrGlyLysAlaLysLeuTyrProAlaLeuLeuTyrAlaVal
TCAACAGTAGTTAACCGGCATGAAGAATCCGTATGACTGTGGACGATGAAGGTCAAATCGGGATATTTAGTGAATGAT 720
SerThrValValAsnArgHisGluGluPheArgMetThrValAspAspGluGlyGlnIleGlyIlePheSerGluMetMet
GCCGTGCTATACAATTTCCAAAAGGACACGGAGATGTTTTCAAATATCTGGACCGAGTATATCCGGTATTATACGGAGT 800
ProCysTyrThrIlePheGlnLysAspThrGluMetPheSerAsnIleTrpThrGluTyrIleGlyAspTyrThrGluPhe
TCTGCAAACAGTATGAAAAAGATATGCAGCAATACGGTAAAAACAAGGGCATGATGGCAAAGCCAAATCCCGCTGTGAAT 880
CysLysGlnTyrGluLysAspMetGlnGlnTyrGlyGluAsnLysGlyMetMetAlaLysProAsnProProValAsn
ACTTTCCAGTCTCTATGATTCCATGGACAACCTTTGAAGGATTTAATTTAAATTTGCAAAGGGATATGGGTATCTGCT 960
ThrPheProValSerMetIleProTrpThrThrPheGluGlyPheAsnLeuAsnLeuGlnLysGlyTyrGlyTyrLeuLeu
TCCCATTTTACGTTTGGACGATATTATGAAGAAAACGGAAATATTGGATTCCGTTATCTATTCAGGTACATCATGCGG 1040
ProIlePheThrPheGlyArgTyrTyrGluGluAsnGlyLysTyrTrpIleProLeuSerIleGlnValHisHisAlaVal
TATGCGATGGATTTACATCCTGCCGTTTTATCAATGAATTACAGGATGTAATCCAAAGTTTACAAAACCATGGAGGTGAC 1120
CysAspGlyPheHisThrCysArgPheIleAsnGluLeuGlnAspValIleGlnSerLeuGlnAsnHisGlyGlyAsp
GAAGAATGAGTGAGGAACAGGGACTGACCCCGTATGAAACCAGAGAAATCCTAACAGCATAGTGCAAAGCTAACAACTCT 1200
GluGlu
TTTATTACTATACTCAAGTAAGATTGAAGGGTAATAACTACTACATCTGTACAATAAAATACCTTGAACGAATAACTACTA 1280
TAAAATAATAATCCAGTTACAAGTGTATGTTTTGTTTGCACAATTAAGTATCGAAGCATACTTCAA 1348

Fig. 20 Nucleotide sequence of the DNA fragment containing the *cat* from *V. anguillarum* and predicted amino acid sequence of CAT.

塩基配列レベルでは、*V. anguillarum* の *cat* は *E. coli* 由来の Tn9 にコードされた *cat* (CAT タイプ I) とは 56.4%、*E. coli* および *Haemophilus influenzae* 由来の *cat* (CAT タイプ II) とは 51.5%、*Shigella flexneri* 由来の R387 の *cat* (CAT タイプ III) とは 53% のホモロジーが認められた。また、他の *cat* とともに塩基配列レベルでは 50% 前後のホモロジーが確認できた。*Clostridium difficile* 由来の *catD* 遺伝子とは 65.5%、*Campylobacter coli* プラスミド C-589 由来の *cat* とは 69.4%、これら両 *cat* とは高いホモロジーがあることが明らかとなった。

アミノ酸配列レベルでは *V. anguillarum cat* の推定アミノ酸配列 (CAT) は CAT タイプ I とは 42.9%、CAT タイプ II とは 38.7%、CAT タイプ III とは 37% のホモロジーが認められた。他の CAT ともおおよそ 40% 前後のホモロジーが認められた。*Clostridium difficile* 由来の CAT とは 60.5%、*Campylobacter coli* 由来の CAT とは 68.9% と高いホモロジーが確認できた。

Fig. 21 に *V. anguillarum cat* のアミノ酸配列は一部の代表的な CAT のアミノ酸配列との比較を示した。*V. anguillarum* CAT は全体にわたって他の CAT と一致するかあるいは類似するアミノ酸残基が認められた。とくに、C 末端の近くにある配列 -IPLSIQVHHAVCDGFH- が (N 末端より 178-193 番目) 他の CAT とほとんど一致した。さらに、データベースによる検索で、CAT タイプ I の 193 番目のアミノ酸残基および CAT タイプ III の 188 番目のアミノ酸残基と相応する *V. anguillarum* CAT のアミノ酸残基は 186 番目であった。その残基は CAT タイプ I およびタイプ III と同様にヒスチジンであった (Fig. 22)。

V. anguillarum CAT のアミノ酸配列の 45 番目のリジンと 46 番目のロイシンの間に、4 つのアミノ酸残基が欠失していることが明らかになった。高いホモロジーを示した *C. difficile* および *C. coli* 由来の CAT にも同じ位置に 4 つのアミノ酸残基の欠失が認められている。

CAT-VA. ME-----FRLVDLKTWKRKEYFTHYFESVPCTYSMTVKLDITTIKTGKAK----LYPALLYAVSTVNRHEEFRMTVDDE
 ECOI. MEKKITGYTTVDISQWHRKEHFQSAQCTYNQTVQLDITAFLLKTVKKNKHKFYPAFIIHILARLMNAHPEFRMAMK-D
 PMIR. MDTKRVGILVVDLSQWGRKEHFQSAQCTPSQTVQLDITSLKTVKQNGYKFPYPTFIYIISLLVNHAEFRMAMK-D
 ECOII. MN-----FTRIDLNTWNRREHFALYRQKICGFSLTTKLDITALRTALAEYKFPYPLMIYLISRAVNQFPEFRMALK-D
 ECOIII. MN-----YTKFDVKNWVRREHFYRHLPCGFSLSKIDITLTKSLDSDAYKFPYVMIYLIQAQVNFDELRLMAIK-D
 CCOLI. MM----QFTKIDINWTRKEYFDHYFGNTPCTYSMTVKLDISKLLKDGKK----LYPTLLYGVTTIINRHEEFRTALDEN
 pC194. MN-----FNKIDLNDWKRKEIFNHYNQQT-TFSITTEIDISVLYRNKQEGYKFPYPAFIFLVTRVINSNTAFRTGYNSD
 pC221. MT-----FNIKLENWDRKEYFEHYFNQQT-TYSITKEIDITLTKMIKKKGYEYPSLIYAIMVNVNKNKVFRTGINSE
 CAT-86. M-----FKQID-ENYLKKEHFHHYMTLTRCSYSLVINLDITKLHAILKEKLVVYVQIYLLARAVQKIPFRMDQVND
 CATD. MV-----FEKIDKNSWNRKEYFDHYFASVPCTYSMTVKVDITQIKEKGMK----LYPAMLYYIAMI VNRHSEFRTA INQD
 CATP. MV-----FEKIDKNSWNRKEYFDHYFASVPCTYSMSLKVVDITQIKEKGMK----LYPAMLYYIAMI VNRHSEFRTA INQD
 CATQ. MK-----FNLIDIEDWNRKPYFEHYLNAVRCYSMIANIEITGLLREIKLGLKLYPTLITITTVVNRHKEFRTCFDPQK
 SACR. MDAP IPTPAPIDLDTWPRRQHFHDYRRRVPCTYAMTVEVDVTAFAAALRRSPRKSYLEAQQWALATVNRHEEFRMCLNSS
 * * * * *

CAT-VA. GQIGIFSEMPCYTI FQKDEMPFSNIWTEYIGDYTEFCQYKEDMQYGENKGMMAKPNPPVNTFPVSMIPWTTFEFNL
 ECOI. GELVIWDSVHPCYTVFHEQTETPSSLSWSEYHDDFRQFLHIYSQDVACYGENLAYFPKGF I-ENMFFVSANPWSFTSFDL
 PMIR. GELVIWDSVNPYNI FHEQTETPSSLSWYHDKINRFLKTYSEDIAQYGDLDLAYFPKEFI-ENMFFVSANPWSFTSFDL
 ECOII. NELIYWDQSDPVFTVFKKETETPSALSCRYFDLSEFMAGYNAVTAEYQHDTRLFPQGNL PENHLN ISSLPWVSFDGFNL
 ECOIII. DELIVWDSVDPQFTVFKKETETPSALSOPYSSIDQPMVNYLSVMERYKSDTKLFPQGVTPENHLN I SALPWVNFDSFNL
 CCOLI. GQGVGFSEMLPCYTVFHKETETPSSIWTEFTADYTEFLQNYQKDI DAFGERMGMMSAKPNPPENTFPVSMIPWTSFEFNL
 pC194. GELGYWDLKLEPL YTI FQKDEMPFSNIWTEYIGDYTEFCQYKEDMQYGENKGMMAKPNPPVNTFPVSMIPWTTFEFNL
 pC221. NKLGYWDLNPL YTVFNKQTEKFTNIWTESDNNFTSFYNNYKNDLLEYKDKKEEMFKKPI PENTIPISMI PWIDFSSFNL
 CAT-86. -ELGYWEILHPSYTI LNKETKTPSSIWTPFDENFAQPKYKSCVAD IETPSKSSNLFKPHMPENMFN ISSLPWIDFSSFNL
 CATD. GELGIYDEMI PSYTI FHNDETETPSSLWTECKSDFKSF LADYSDTQRYGNNHRMEGKPNAPEN I FNVSMIPWSTFDGFNL
 CATP. GELGIYDEMI PSYTI FHNDETETPSSLWTECKSDFKSF LADYSDTQRYGNNHRMEGKPNAPEN I FNVSMIPWSTFDGFNL
 CATQ. GKLGYWDSMNPSYTVFHKDNETPSSIWTEYDENFRFYNYLEDIRNYSV LNFMPKTGEPANT INVSSIPWVNFDTGFNL
 SACR. GDPAVWPVVHAPFTVFNPERETFACVWAPYDPDFGTFHDTAAPLLAEHSRATDFPPQGNPPNAPDVSLLPWVSFTGFTL
 * * * * *

CAT-VA. NLQKGYGLLP IFTFGRYEEENGKYWIPLSIQVHHA VCDGFHTCR-----FINELQDVI-QSLQNH-GGDEE- 216
 ECOI. NVANMDFNFFAPVFTMGKYYTQGDKVL MPLAIQVHHA VCDGFHVGR-----MLNVLQQYC-DEWQGG-A---- 219
 PMIR. NMANINNFAPVFTIGKYYTQGDKVL MPLAIQVHHA VCDGFHVGR-----LLNEIQQYC-DE-GC-K---- 217
 ECOII. NITGNDYFAPVFTMAKQQEGDRVLLPVSVQVHHA VCDGFHAAAR-----FINTLQLMC-DN--IL-K---- 213
 ECOIII. NVANFTDYFAP IITMAKQQEGDILLPLSVQVHHA VCDGFHVAR-----FINRLQELC-NS--KL-K---- 213
 CCOLI. NLKKGIDYLLP IFTFGKYYEEGKYYIPLSIQVHHA VCDGFHVCR-----FLDELQDLL-N-----K---- 207
 pC194. NINNNSNYLLP IITAGKFINKGN IYLP LSLQVHHA VCDGFYHAGL-----FMNSIQELS-DR--PNDWL---L 216
 pC221. NIGNNSNLLP IITIGKFSYENNKIYIPVALQLHHA VCDGFYHASL-----FMNEFQDI I-HK--VDDWI---- 215
 CAT-86. NVSTDEAYLLP IFTIGKFKVEEGKIILPVAIQVHHA VCDGFYHAGQYVEYLRWLI EHCDEWL-ND--SLHIT---- 220
 CATD. NLQKGYDYL IPIFTMGKI IKKDNKIILPLAIQVHHA VCDGFHICR-----FVNELQELI-IV--TQVCL---- 212
 CATP. NLQKGYDYL IPIFTMGKI IKKDNKIILPLAIQVHHA VCDGFHICR-----FVNELQELI-IV--TQVCL---- 212
 CATQ. NIYNDATYL IPIFILGKYFQQDNKIILPMSVQVHHA VCDGFYHSR-----FFNEAQELA-SN--YETWLGEK- 219
 SACR. DIRDGDWHLAP IFTLGRYTERDTRLLPLSVQIHHAADGFHTAR-----LTNELQTL LADP--AW--L---- 220
 * * * * *

Fig. 21 Alignment of the amino acid sequence of the *V. anguillarum* CAT with the sequences of CAT variants from other bacteria. CAT abbreviations are as defined in the Table 9. Asterisks indicate conserved amino acids in all CAT monomers.

CAT I -Gln-Val-His-His-Ala-Val-Cys-Asp-Gly-Phe-His-
 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200

CAT III -Gln-Val-His-His-Ala-Val-Cys-Asp-Gly-Tyr-His-
 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195

CAT-VA -Gln-Val-His-His-Ala-Val-Cys-Asp-Gly-Phe-His-
 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193

Fig. 22 Regions of the CAT type I, type III and CAT-VA chloramphenicol acetyl transferases surrounding the active site histidine.

V. anguillarum CAT の codon usage および他の CAT との比較は Table 8 に示した。比較に用いた CAT タイプ I、タイプ III、C. difficile CAT、C. coli CAT および V. anguillarum CAT において一部のコドンの出現頻度が類似することが認められたが、いずれとも特に類似するものが認められなかった。

また、V. anguillarum CAT のハイドロパシー解析の結果および CAT タイプ I、C. coli CAT との比較は Fig. 23 に示した。3つの CAT の親水性、疎水性領域は類似することが認められた。

4. 遺伝子産物の同定

V. anguillarum の cat にコードされる遺伝子産物について、2.6 Kb BamHI DNA断片を含むリコンビナントプラスミドを E. coli CSR603 株に導入したものを、マキシセル法により測定した結果、約 22,500 Da の遺伝子産物が検出された (Fig. 24)。

5. コロニーハイブリダイゼーション

cat を含む PvuII - BamHI DNA断片 (pVC 2) が一部の R プラスミド pPT860 29、pPT8789、pAC8903、Rms418 およびと強いハイブリットを形成し、これら R プラスミドがコードする cat は同じあるいはかなり類似するものであることが確認された。また、pJA7601、pJA8202、pJA8325、pAC8902、pSH89114、pSH90060 および pSH90075 とは弱い相同性が示された。しかし、使用したプローブは pPT850 45、pSH91037、pWA91011、pWA91025 および pWA91026 とは全く相同性を示さなかった (Fig. 25)。

Table 8. Comparison of the codon usage of the pJA7324-encoded CAT with the CAT variants from other bacteria

	I	III	CATD	CCO	VA		I	III	CATD	CCO	VA
Phe UUU	10	14	13	13	11	Thr ACU	2	0	4	5	3
UUC	10	3	1	4	4	ACC	8	3	2	2	5
						ACA	0	6	4	7	5
Leu UUA	3	10	1	6	4	ACG	3	2	2	4	5
UUG	0	5	6	3	4						
CUU	2	0	3	2	2	Trp UGG	5	3	3	3	4
CUC	1	1	0	1	0						
CUA	1	1	1	2	0	Ala GCU	2	2	1	1	0
CUG	6	3	2	3	3	GCC	8	1	0	1	2
						GCA	2	6	7	3	1
Ile AUU	5	6	10	5	6	GCG	3	2	0	0	2
AUC	1	3	2	2	5						
AUA	3	3	9	4	2	Tyr UAU	7	10	10	11	13
						UAC	4	1	2	3	2
Met AUG	9	6	9	6	10						
						His CAU	7	7	3	5	6
Val GUU	8	6	4	6	3	CAC	5	0	4	1	0
GUC	3	1	0	0	1						
GUA	1	7	6	2	5	Gln CAA	6	7	4	4	6
GUG	5	2	1	1	3	CAG	7	3	4	2	4
Ser UCU	0	0	2	2	3	Asn AAU	6	10	8	7	6
UCC	1	1	1	1	0	AAC	4	2	6	4	4
UCA	3	7	3	1	2						
UCG	2	1	0	2	0	Lys AAA	7	9	9	8	9
AGU	4	3	3	2	2	AAG	5	3	6	8	5
AGC	0	3	3	1	1						
						Asp GAU	8	15	10	6	7
Pro CCU	2	2	4	4	2	GAC	4	1	3	6	3
CCC	2	1	0	2	2						
CCA	0	4	2	1	3	Glu GAA	5	5	9	9	13
CCG	3	2	2	3	3	GAG	6	5	4	6	5
Cys UGU	4	2	4	1	0	Arg CGU	2	3	1	1	3
UGC	1	1	1	3	5	CGC	1	2	1	0	0
						CGA	0	0	0	3	1
Gly GGU	2	1	1	1	5	CGG	1	2	1	0	1
GGC	5	1	1	5	1	AGA	1	1	2	0	1
GGA	1	0	5	6	5	AGG	0	0	1	1	0
GGG	2	2	2	1	3						

Abbreviations: I, CAT type I; III, CAT type III; CATD, CAT from *Clostridium*; CCO, CAT from *Campylobacter*; VA, CAT from *V. anguillarum*. See Table 9.

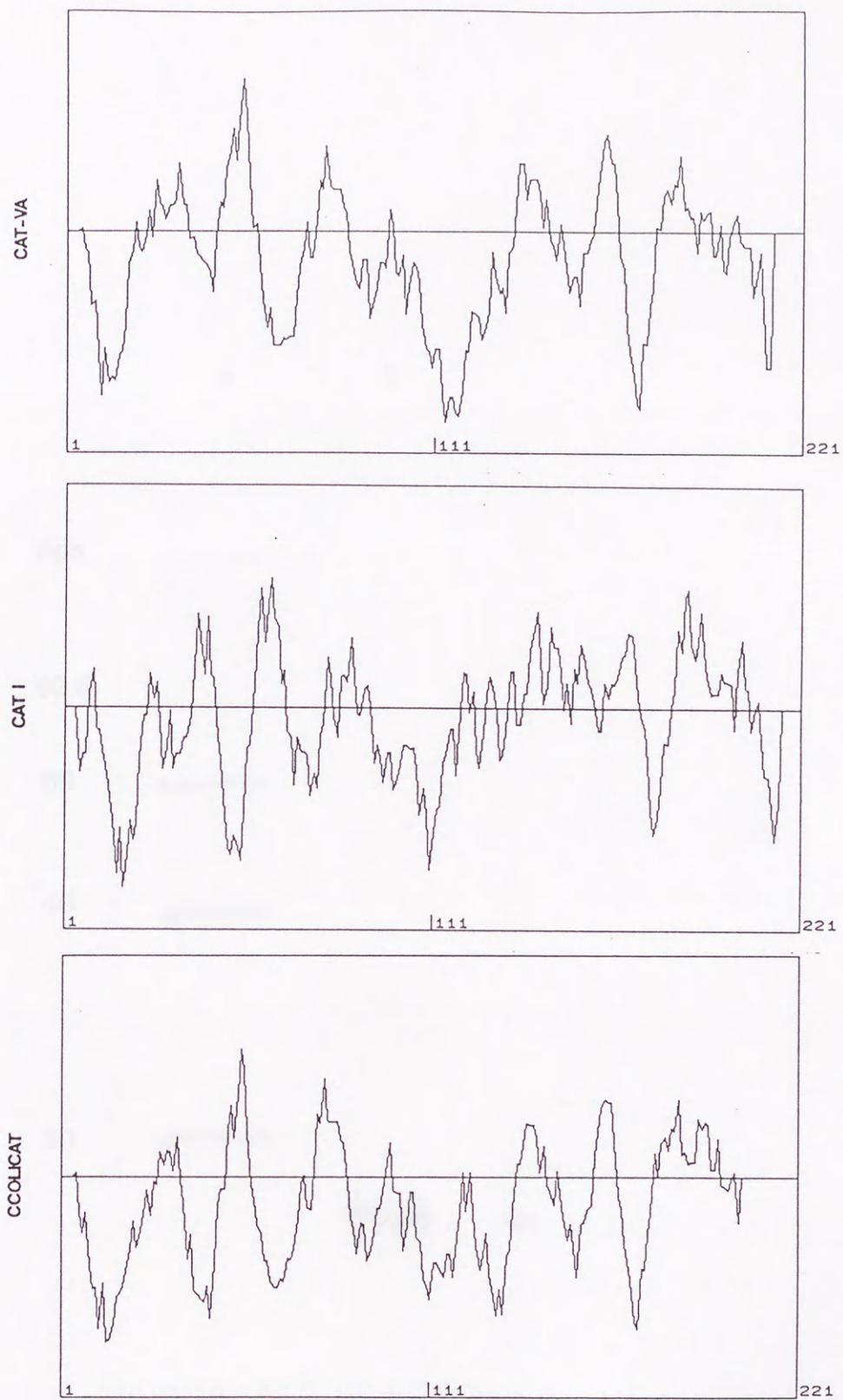


Fig. 23 Comparison of hydrophobic profiles of the *V. anguillarum* CAT(CAT-VA), CAT type I and *Compylobacter coli* CAT(CCOLICAT).

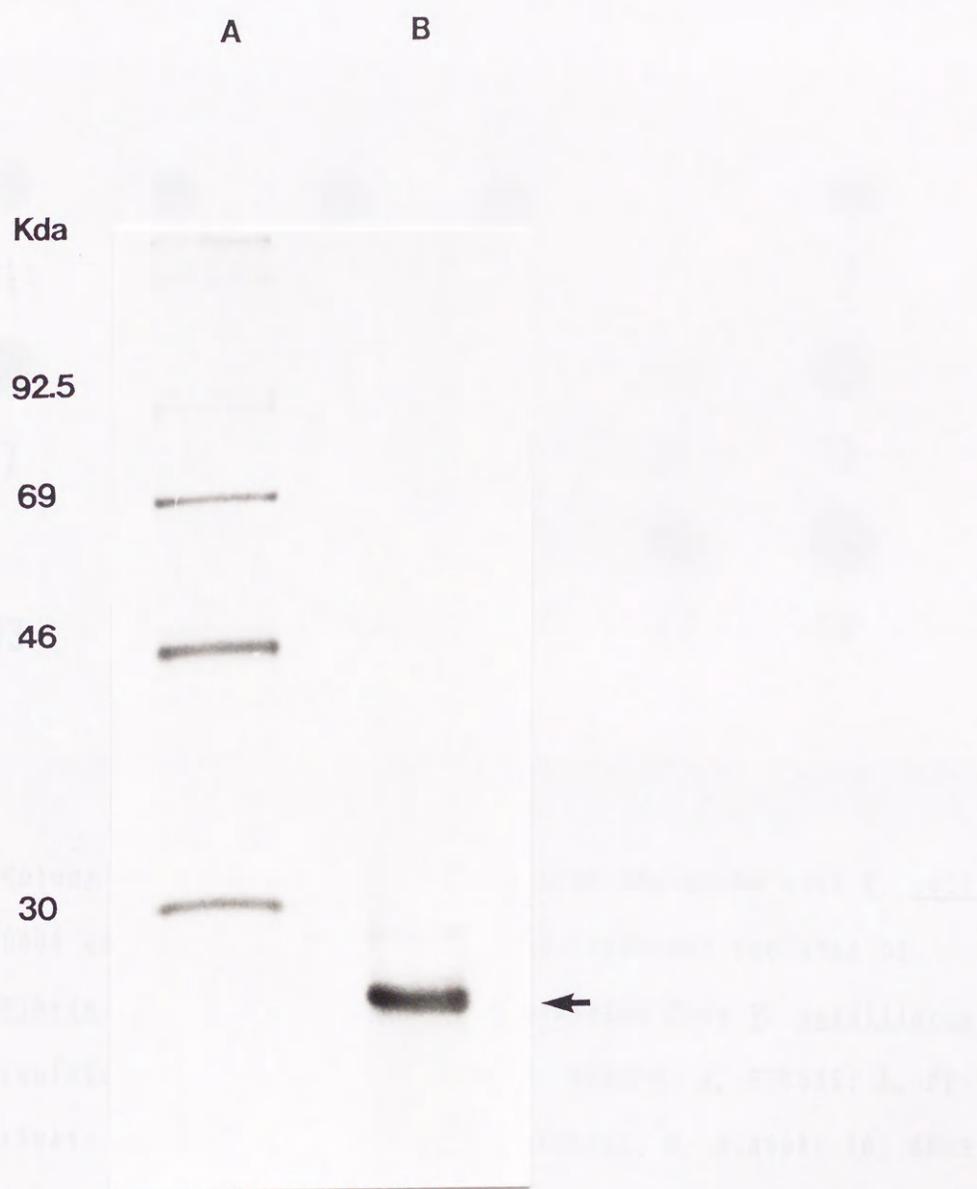


Fig. 24 Autoradiogram of polyacrylamide gel electrophoresis showing the cat gene product in Maxicells. Lane A, size marker; Lane B, pVC 2.

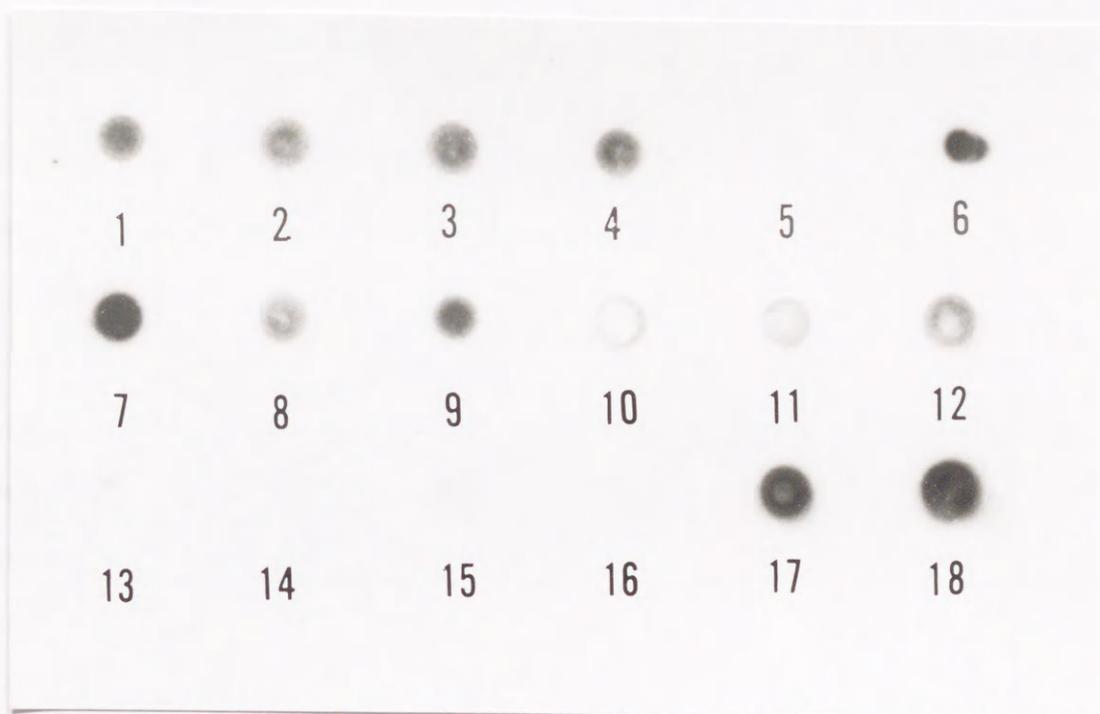


Fig. 25 Colony hybridization of a ^{32}P labeled DNA probe with *E. coli* C600 containing the R plasmid from different isolates of *Vibrio anguillarum*. The used R plasmids from *V. anguillarum* isolates: 1, SG7601; 2, MZ8122; 3, SG8202; 4, PT8325; 5, PT85045; 6, PT86029; 7, PT8789; 8, AC8902; 9, AC8903; 10, SH89114; 11, SH90060; 12, SH90075; 13, SH91037; 14, WA91011; 15, WA91025; 16, WA91026; 17, Rms418 and 18, pVC 2.

考 察

クロラムフェニコール耐性菌は多くの菌種より見つかっている。その耐性機構は耐性菌が産生したクロラムフェニコール不活化酵素 (CAT) によるものであることが 1965 年に Okamoto、Suzuki により発見された。その後、種々の菌が産生する CAT に関し生物学、酵素学的な特徴について研究がなされている。Shaw ら (Shaw、1967、1975、1979、1983; Foster and Shaw、1973) は CAT について精力的に解明し、CAT は 3 量体の形で存在し、サブユニットの分子量は 22,500-24,500 で、クロラムフェニコールをアセチル化することにより不活化することを解明している (Fig. 4)。

一方、分子遺伝学の進歩とともに、CAT をコードするクロラムフェニコール耐性遺伝子 (cat) は種々のグラム陰性桿菌およびグラム陽性球菌より発見され、それらの構造、機能、起源および進化などについて多くの研究がなされている。

Table 8 は現在まで塩基配列が明らかにされた cat および由来菌について示した。これらの cat のうち、5 つはグラム陰性桿菌由来のもので、残り 12 の遺伝子はグラム陽性菌、特に *Staphylococci* および *Clostridium* より検出されたものであった。

グラム陰性桿菌由来の CAT は酵素学的な特徴およびそれらをコードする cat によりタイプ I、II および III に分類されている。タイプ I CAT をコードする cat は *E. coli* 由来トランスポゾン *Tn9* に代表される (Alton and Vapnek、1979)。タイプ II として *E. coli* および *Haemophilus influenzae* 由来の CAT を

コードする *cat* (Murray *et al.*, 1990) およびタイプ III として、R387 由来の CAT をコードする *cat* (Murray *et al.*, 1988) の塩基配列が明らかにされている。さらに、*Proteus mirabilis* 由来の *cat* (Charles *et al.*, 1985)、および *Campylobacter coli* 由来の *cat* についても塩基配列が報告されている (Wang and Taylor, 1990)。

Table 9 Sources of *cat* sequences

Organism	Designation or plasmid	Reference
<i>Escherichia coli</i>	CAT type I	Alton & Vapnek, 1979
<i>Escherichia coli</i>	CAT type II	Murray <i>et al.</i> , 1990
<i>Shigella flexneri</i>	CAT type III	Murray <i>et al.</i> , 1988
<i>Proteus mirabilis</i>	PMIR	Charles <i>et al.</i> , 1985
<i>Campylobacter coli</i>	CCOLI	Wang & Taylor, 1990
<i>Staphylococcus aureus</i>	pC221	Shaw <i>et al.</i> , 1985
<i>Staphylococcus aureus</i>	pUB112	Bruckner & Matzura, 1985
<i>Staphylococcus aureus</i>	pC223	Steffen & Matzura, 1989
<i>Staphylococcus aureus</i>	pC194	Horinouchi <i>et al.</i> , 1982
<i>Staphylococcus intermedius</i>	pSCS1	Schwarz <i>et al.</i> , 1991
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	pSCS5	Schwarz & Cardoso, 1991a
<i>Staphylococcus aureus</i>	pSCS7	Schwarz & Cardoso, 1991b
<i>Bacillus pumilus</i>	cat-86	Harwood <i>et al.</i> , 1983
<i>Clostridium difficile</i>	CATD	Wren <i>et al.</i> , 1989
<i>Clostridium perfringens</i>	CATP	Steffen & Matzura, 1989
<i>Clostridium perfringens</i>	CATQ	Bannam & Rood, 1991
<i>Streptomyces acrimycini</i>	SACR	Murray <i>et al.</i> , 1989

グラム陽性球菌において、*Staphylococci* 由来の *cat* は 5.2 Kb 以下の小さなプラスミドにコードされ、それらの CP 耐性プラスミドは制限酵素解析および DNA hybridization により *S. aureus* 由来の pC221 (Projan *et al.*, 1985)、pC194 (Horinouchi and Weisblum, 1982) および pC223 (Novick, 1976) に代表

される3つのグループに分けられている。また、S. aureus 由来の pUB112 (Bruckner and Matzura, 1985)、S. intermedius 由来の pSCS1 (Schwarz et al., 1991)、S. haemolyticus 由来の pSCS5 (Schwarz and Cardoso, 1991a) および S. aureus 由来の pSCS7 (Schwarz and Cardoso, 1991b) の CP 耐性プラスミドおよびそれらがコードしている cat についても解析されている。さらに、他のグラム陽性菌 Bacillus pumilus 由来の cat-86 (Harwood et al., 1983)、Clostridium difficile 由来の cat D (Wren et al., 1989)、C. perfringens 由来 cat (Steffen and Matzura, 1989)、および Streptomyces acrimycini 由来 cat 遺伝子 (Murray et al., 1989) の構造についても解明されている。

これらの cat はグラム陰性菌由来あるいはグラム陽性菌由来が異なるのみならず、それぞれ遺伝子はプラスミド、染色体あるいはトランスポゾンにコードされている点でも異なっている。しかし、塩基配列解析により、cat の一次構造の一部が類似し、アミノ酸配列にも共通する部分が存在している。

CAT の機能的な構造について、Shaw (1983, 1984) はタイプ I CAT のアミノ酸配列の 193 番目のヒスチジン残基がクロラムフェニコールの不活化には重要な役割を演ずることを明らかにしている。さらに、タイプ III CAT のアミノ酸配列のタイプ I と相同する部位にヒスチジン残基が存在し、その前後のアミノ酸配列もタイプ I と類似していることを解明している (Fig. 22)。その後、数多くのグラム陰性菌およびグラム陽性菌由来の CAT が解析され、それらのアミノ酸配列の C 末端のほぼ同じ場所にも類似する配列が存在することが確認されている (Fig. 21)。いずれの cat においてもよく保存されている部分は CAT の active center と考えられている (Shaw, 1983; Leslie et al., 1988)。また、タイプ III CAT アミノ酸配列の 13 番目 (Arg) と 193 番目 (Asp) が CAT の安定性に必要な構成であることも解明されている (Lewendon et al., 1988) (Fig. 21)。

魚類病原菌において検出された R プラスミドの多くは cat をコードしている。それらの cat は DNA 構造により分類されている。Pasteurella piscicida 由来 R プラスミドがコードする cat は CAT タイプ I に、Aeromonas salmonicida および Edwardsiella tarda 由来の cat は CAT タイプ II に分類されている (Aoki, 1988)。一方、V. anguillarum 由来 R プラスミドがコードする cat について、前述したテトラサイクリン耐性遺伝子と同じく、分離年代により異なるタイプであることが明らかにされている。1980 年前後に検出された R プラスミドがコードする cat は CAT タイプ II に、1977 年以前に検出された R プラスミドがコードする cat は CAT タイプ I、II および III のいずれのものとも相同性を示さない、新しいタイプであることが明らかにされている (Aoki, 1988)。

一方、Masuyoshi ら (1988) は 1976 年に分離された V. anguillarum に由来の CP、SA、TC 耐性の R プラスミド Rms418 が産生するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの物理化学的性状を既知のものと比較し、CAT タイプ I、II、III とは異なり、新しいタイプの CAT であることを明らかにしている。

本研究では 1973 年に分離された V. anguillarum 由来 R プラスミド pJA7324 よりクローニングした cat について塩基配列決定を行い、その DNA 構造を明らかにした。この cat は Rms418 を含む 1977 年以前分離された V. anguillarum の R プラスミドがコードする cat と同一構造であることを、コロニーハイブリダイゼーション法により明らかにした。

今回決定した V. anguillarum の cat は 648 bp よりなっている。塩基配列から推定した CAT は 216 個のアミノ酸を含み、算出した分子サイズは 25,470.5 Da であった。マキシセル法により測定した分子サイズは約 22,500 Da であった。この cat の open reading frame の GC 含量は 38.9% で、V. anguillarum ゲノム DNA の GC 含量 (44-46%) よりやや低かった。

決定された V. anguillarum の cat の塩基配列はデータベースにより、他の

cat と比較し、ホモロジーを求めたところ、前述の 17 個の cat と DNA 構造が異なるものであることが明らかとなった。

Table 10 Relationships between CAT monomers

Determinant	Amino acid sequence similarity (%)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. CAT-VA	100	43	39	37	44	69	44	44	44	40	44	41	45	38	61	59	45	41
2. ECO I		100	46	47	76	44	38	38	40	39	37	35	38	39	45	44	41	38
3. ECO II			100	65	47	42	37	38	39	42	37	37	38	41	45	44	40	42
4. ECO III				100	47	41	37	37	38	40	36	36	36	41	43	43	41	40
5. PMIR					100	44	40	39	40	41	39	38	39	38	44	43	45	35
6. CCOLI						100	45	45	46	44	44	43	45	41	59	58	50	40
7. pC221							100	98	80	54	98	78	80	42	44	44	51	31
8. pUB112								100	80	53	99	77	80	43	44	44	51	31
9. pC223									100	57	80	86	95	41	46	46	51	33
10. pC194										100	53	54	57	42	46	46	48	39
11. pSCS1											100	77	80	42	44	44	49	30
12. pSCS5												100	85	41	47	47	45	30
13. pSCS7													100	42	47	47	49	32
14. CAT-86														100	43	43	44	32
15. CATD															100	98	53	39
16. CATP																100	53	38
17. CATQ																	100	39
18. SACR																		100

CAT abbreviations are as defined in the Table 9.

V. anguillarum CAT (CAT-VA) は現在まで報告された大部分の CAT とは 37-45% のホモロジーが存在した。 C. perfringens 由来の CATP とは 59%、 C. difficile 由来の CATD とは 61%、 C. coli 由来の CAT とは 69%、割合高いホモロジーが存在することが明らかとなった (Table 10)。

V. anguillarum CAT は他の 12 の CAT とは 23 個の共通のアミノ酸残基が認

められた。一部の機能残基、13番目のアルギニン、190番目（CAT IIIの193番目と相当する残基）のアスパラギン酸は保存されていた。さらに、178-183番目の配列 -PLSIQVHHAVCDGFH- は他の CAT の active center と考えられている C 末端の配列とほぼ一致した（Fig. 21）。

V. anguillaum CAT は 216 アミノ酸残基より構成し、SDS ポリアクリルアミドゲルにより測定した分子サイズは 22,500 Da であった。分子サイズは Masuyoshi ら（1988）の Rms418 の CAT（22,000 Da）とほぼ一致した。さらに、既知の CAT（207-220 残基、22,500-24,500 Da）と類似していた。これらの類似点から、*V. anguillarum* *cat* の機能は他の CAT 遺伝子と同じであると考えられた。

V. anguillarum CAT のアミノ酸配列の 45 番目のリジンと 46 番目のロイシンの間に、4 つのアミノ酸残基は欠失していることが認められた（Fig. 20）。高いホモロジーを示した *C. perfringens* CATP、*C. difficile* CATD および *C. coli* 由来の CAT のアミノ酸配列ほぼ同じ位置にも 4 つのアミノ酸残基の欠失しているので、この 3 つの CAT とは最も類似していることが明らかとなった。これら類似する CAT をコードする *cat* は *cat* P および *cat* D グラム陽性菌由来のもので、なお、*cat* P はプラスミド pIP401 にコードされ、*cat* D は染色体由来のものであった。*C. coli* *cat* はプラスミド pNR9589 にコードされ、その由来菌株は日本で分離されたものであった（Wang and Taylor, 1991）。これらの *cat* は分類上異なる菌種から発見され、また、それらはプラスミドあるいは染色体にコードされた点でも異なるが DNA 構造上類似していることは、*cat* の起源および機能を考察する点で興味を持たれる。

筆者は *V. anguillarum* *cat* は他の *cat* と構造および機能上類似することから、その起源は同じではないかと推察した。なお、*Clostridium* の *cat* P および *cat* D、*C. coli* の *cat* とは高いホモロジーを示したこと、アミノ酸配列にも共通の特徴が認められていること、および *V. anguillarum* *cat* の GC 含量（38.9%）

は cat P (36%) および C. coli cat (37.5%) と類似していることから、これらの遺伝子は他の cat 遺伝子と同じ起源から分岐した後、ある共通の祖先配列を経て、さらに突然変異の蓄積により現在の cat の構造ができあがったものではないかと考えられる。

第四章 1989年から1991年にかけて分離された *Vibrio anguillarum* の

薬剤耐性の動向と検出されたRプラスミドについて

序 言

1989年から1991年にかけて日本各地の養殖アユより分離された *V. anguillarum* 114株について、10薬剤に対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定し、伝達性Rプラスミドの有無およびRプラスミドの耐性マーカー等について調べた。さらに、検出されたRプラスミドについて制限酵素切断パターンの比較およびサザンハイブリダイゼーション法(Southern, 1975)により、以前 *V. anguillarum* より検出されたRプラスミドとその構造を比較検討した。

材料および方法

1. 使用した菌株およびRプラスミド

V. anguillarum は1989年から1991年にかけて各地のアユ養殖場から分離された114株を使用した(Table 11)。伝達性Rプラスミドを検出する際、受容菌として *E. coli* RC85株およびC600株を使用した。また、Rプラスミドの構造を比較するため、*V. anguillarum* の1976、1982および1986年の分離株由来のRプラスミド pJA7601、pJA8202 および pPT86029 を使用した。

2. 使用培地

V. anguillarum 分離用培地は1%食塩添加 HI 培地を使用した(第一章)。乳糖分解能をもつ *E. coli* の分離用培地として BTB 乳糖添加寒天培地 (poly-pepton 10g、beef extract 5g、NaCl 10g、lactose 10g、20% BTB solution 40 ml、agar 15g、dH₂O 1000 ml) を使用した。

3. 使用薬剤

薬剤感受性試験に用いた薬剤はクロラムフェニコール (CP) (三共薬品)、テトラサイクリン (TC) (日本レダリー)、カナマイシン (KM) (明治製菓)、スルファモノメトキシシン (SA) (第一製薬)、アンピシリン (ABP) (藤沢薬品)、ナリジキシン酸 (NA) (第一製薬)、ストレプトマイシン (SM) (明治製菓)、フロルフェニコール (FF) (武田)、フラゾリドン (NF) (上野) および トリメトプリム (TMP) (武田) であった。

4. 薬剤感受性試験

MIC の測定は日本化学療法学会 MIC 測定委員会の定める方法 (日本化学療法学会, 1981) に従って行った。MIC 測定用培地は SA および TMP 用として 1% になるように食塩を添加した感受性ディスク用培地 (日水) を用い、他の薬剤の場合は 1% 食塩添加 HI 寒天培地を用いた。

5. R プラスミドの伝達性試験

伝達性 R プラスミドの検出は混合培養法を用いた。*V. anguillarum* の供与菌株

および受容菌の *E. coli* RC85 株をそれぞれ 1% 食塩加 HI および L 培地で 0. D. 550 が 0.4 になるまで振盪培養を行った。各 1ml ずつ試験管内で混合させ、30°C で一昼夜静置培養した。供与菌および受容菌の耐性マーカーの薬剤を含む BTB 乳糖添加寒天培地に混合液を塗抹し、37°C で一昼夜培養した (Aoki *et al.*, 1985)。受容菌の増殖が認められたクローンを 2 回同じ薬剤の入った平板で再分離した。得られたクローンの耐性マーカーをディスク法にて調べた。次いで R プラスミドの抽出のため、再度 *E. coli* C600 株にも接合伝達させた。

6. 制限酵素による R プラスミドの切断パターンの比較

R プラスミド DNA に 1/10 の濃度になるように制限酵素反応 buffer に加え、制限酵素を 2-4 units 添加した後、至適温度で一時間反応させた。約 1/10 量の色素混合液 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 50% glycerol) を加え、0.8% アガロースゲルにより電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 0.5 μg/ml エチジウムブロマイドを含む溶液で染色し、紫外線ランプ上に乗せ、DNA バンドを観察した。

7. サザンブロットハイブリダイゼーション

DNA をニトロセルロースフィルターへの固定は次のように行った。

R プラスミド DNA を制限酵素 *Hind*III で切断し、0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動終了後、ゲル中の DNA 切断パターンを UV ランプ照射下で写真撮影した。ゲルをバットの中に移し、次いでバットの中に 0.25N HCl 溶液 250 ml を加えた。室温にて 15 分間放置し、アスピレーターにより溶液を取り除き、蒸留水で洗浄した後、再度 0.25N HCl 溶液に入れこの操作を繰り返した。

次いで 0.25N NaOH-0.6M NaCl 溶液約 250ml を入れ、室温で 20 分間置き、DNA のアルカリ変性を行った。一度溶液をアスピレーターにより捨て、さらに同じ溶液をいれ、この操作を繰り返した。次に、0.2N Tris HCl (pH 7.4)、0.6M NaCl 溶液 250 ml を加え、室温で 20 分間放置した。この操作を 2 回行い、DNA を中和させた。

バットの中に 6×SSC 溶液を入れ、同溶液に浸した 2 枚の Whatman 3MM 濾紙をガラス板の上に載せ、その両端は 6×SSC 溶液に浸るように置いた。その上に変性させたゲルを置き、ゲルの大きさより縦横 5mm 程度大きく切ったニトロセルロースフィルターをゲルの上に載せた。ゲルの載っていない濾紙の部分をパラフィルムで覆い、フィルターの上に 3mm 濾紙を 4 枚、さらに、ペーパータオルを 15 枚ほど載せ、その上にガラス板を置き、室温で 1 時間ゲルの脱水を行った。濡れたペーパータオルを乾いたものと取り替え、ガラス板の上に 1-2 Kg 荷重をかけ、6 時間以上放置した。フィルターを 2×SSC 溶液で洗浄し、濾紙でフィルター的水分を除き、室温で 30 分間乾燥し、60°C 乾燥機の中に 30 分間放置した後、80°C で 2 時間置き、DNA をフィルターに固定した。

プローブ DNA の標識、ハイブリダイゼーション反応およびオートラジオグラフィ等の操作は第三章に述べた方法に従って行った。

Table 11 Sources of tested strains of *Vibrio anguillarum*

Areas	Years			Total
	1989	1990	1991	
Aichi	4*	5		9
Gifu			1	1
Shiga	6	23		29
Shizuoka	35	14	9	58
Tokushima			8	8
Wakayama		1	8	9
Total	45	43	26	114

* Number of strains.

結 果

1. 薬剤感受性

1989年から1991年にかけて分離された *V. anguillarum* に対する 10 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) は Fig. 26 に示した。

AP の 114 株に対する MIC は $0.2 - 12.5 \mu\text{g/ml}$ を示す感受性 5 株と、25 から $1,000 \mu\text{g/ml}$ を示す耐性 109 株が認められた。

CP の MIC は $0.2 - 1.6 \mu\text{g/ml}$ を示す感受性 93 株と、 $6.3 \mu\text{g/ml}$ から $25 \mu\text{g/ml}$ を示す耐性 21 株とに分かれた。

FF は供試 114 株すべてに $0.2 - 0.8 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、強い抗菌力を示した。

KM、SM、TC および TMP の MIC のヒストグラムは、2 峰性を示し、感受性群 93 株と耐性群 21 株に分かれた。それぞれの MIC は KM で $1.6 - 25 \mu\text{g/ml}$ の感受性群と $500 - 1000 \mu\text{g/ml}$ の耐性群； SM で $3.2 - 12.5 \mu\text{g/ml}$ の感受性群と $25 - 100 \mu\text{g/ml}$ の耐性群； TC で $0.2 - 3.2 \mu\text{g/ml}$ の感受性群と $12.5 - 25 \mu\text{g/ml}$ の耐性群； および TMP で $0.1 - 12.5 \mu\text{g/ml}$ 感受性群と $1000 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性群であった。

NA の MIC 値は 3 つのグループに分かれ、 $0.2 - 1.6 \mu\text{g/ml}$ を示す感受性 28 株、 $3.2 - 50 \mu\text{g/ml}$ を示す中等度耐性 62 株および $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性を示す 24 株が認められた。

NF は 0.0125 から $0.8 \mu\text{g/ml}$ を示す感受性 23 株と 3.2 から $25 \mu\text{g/ml}$ を

示す耐性 91 株が認められた。

SA は 0.8 - 25 $\mu\text{g/ml}$ を示す感受性 65 株および 50 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示す耐性 49 株に分かれた。

全ての薬剤に対して、感受性を示したものは 1 株のみで、全供試菌株の 0.9% に過ぎなかった。

各薬剤に対する耐性株の出現率は、AP に対し最も高く、112 株中 109 株、95.6% を占めた。次いで NF で 79.8% (91 株)、NA は 75.54% (中度耐性と高度耐性株あわせて 86 株)、SA は 43.0% (49 株)、CP、TC、KM、SM および TMP は同じ出現率を示し、全体の 18.4% (21 株) であった。

2. 耐性菌株及び検出された R プラスミドの耐性マーカー

供試 114 株のうち 113 株は AP、CM、FF、KM、NA、NF、SA、SM、TC および TMP に対して 1 剤から 9 剤耐性を示した (Table 12)。そのうち、1 剤耐性は全体の 6.1% (7 株)、2 剤耐性を示した菌株は 19 株で、全体の 16.7% を占めた。3 剤耐性は 59 株で、56.1% であった。4 剤耐性株は 7 株で、6.1% を占めた。7 剤耐性株は 2 株で、1.8% で、8 剤耐性株は 1 株で、0.9% で、9 剤耐性は 18 株で、全体の 15.8% を占めた。

7 剤以上耐性を示した 21 菌株より伝達性 R プラスミドが検出された。これらの R プラスミド全て CP、KM、SA、SM、TC および TMP 6 剤耐性マーカーであった (Table 12)。

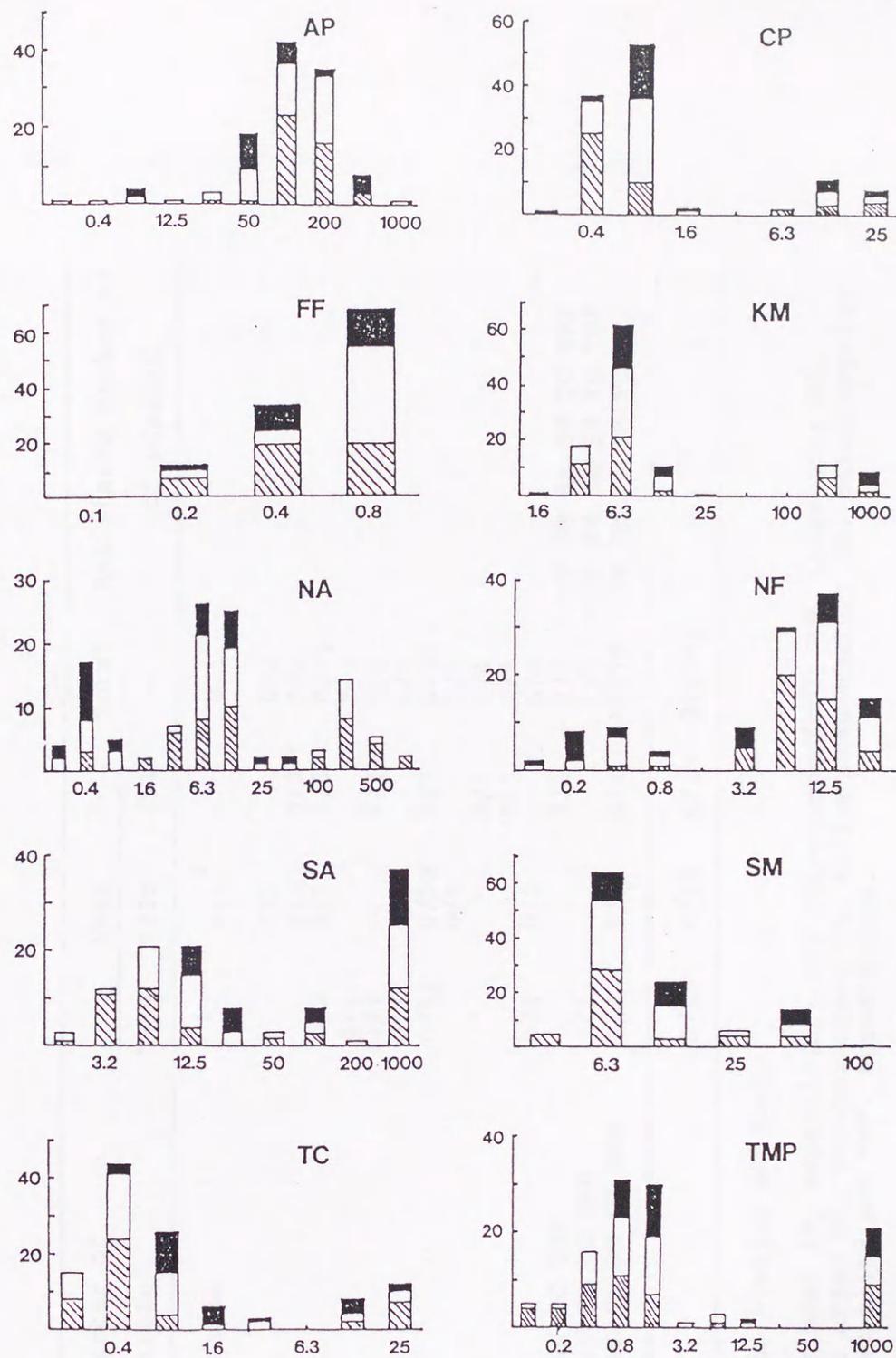


Fig. 24 Minimal inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of 10 chemotherapeutics for 114 strains of *Vibrio anguillarum*. Strains were isolated in 1989 (▨), 1990 (□) and 1991 (■).

Table 12. Resistance markers and transferable R plasmids of Vibrio anguillarum

Resistance marker of original strain	Year			Total	Resistance marker of of plasmid
	1989	1990	1991		
Sensitive strains		0/1*		0/1	
SA**		0/2		0/2	
AP		0/2	0/3	0/5	
AP SA	0/2	0/7	0/6	0/15	
AP NF	0/1			0/1	
NA NF	0/1		0/1	0/2	
NF SA	0/1			0/1	
AP NA NF	0/26	0/23	0/7	0/56	
AP NA SA		0/1		0/1	
AP NF SA			0/1	0/1	
NA NF SA			0/1	0/1	
AP NA NF SA	0/5	0/2		0/7	
CP KM NF SA SM TC TMP			2/2	2/2	CP KM SA SM TC TMP
AP CP KM NF SA SM TC TMP	1/1			1/1	CP KM SA SM TC TMP
AP CP KM NA NF SA SM TC TMP	8/8	6/6	4/4	18/18	CP KM SA SM TC TMP
Total	9/45	6/44	6/25	21/114	

* R⁺ strains/strains studied.

** Abbreviations: AP, ampicillin; CP, chloramphenicol; KM, kanamycin; NA, nalidixic acid; NF, furazolidone; SA, sulfamonomethoxine; SM, streptomycin; TC, tetracycline and TMP, trimethoprim.

3. Rプラスミドの制限酵素切断パターンおよび相同性

検出された 21 の R プラスミドは制限酵素 HindIII で切断後、アガロースゲル電気泳動により、その切断パターンを調べたところ、全ての R プラスミドは類似するパターンを示した。そのうちの pSH89114、pSH90060、pWA91011 および pSH91037、さらに、比較のために以前 V. anguillarum より検出された pJA7601、pJA8202 および pPT86029 の HindIII 切断パターンを Fig. 27 に示した。これらの R プラスミドの由来および耐性マーカーは Table 13 に示した。pSH89114、pSH90060、pWA91011 および pSH91037 は極めて類似するパターンを示した。以前検出された pJA8202 および pPT96029 とは 2.4 kb、4.5 kb と分子サイズが一致するバンドが認められたが、全体としては異なっていた。

1991 年分離された R プラスミド pSH91037 の HindIII 切断断片をプローブとして、サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、プローブは pSH89114、pSH90060、pWA91011 および pSH91037 とは強く相同性を示し、同じ構造であることが示唆された。一方、pJA7601、pJA8202 および pPT86029 とは一部のバンドのみ相同性が認められたが、全体ではその構造は異なっていることが明らかとなった (Fig. 27)。

Table 13 R plasmids from *Vibrio anguillarum*

R plasmid	Resistance marker	Origin of <i>V. anguillarum</i>	
		Date	Area
pJA7601	CP*, SA, TC,	1976	Shiga
pJA8202	AP, CP, SA, SM, TC	1982	Shiga
pPT86029	AP, CP, SA, SM	1986	Tokushima
pSH89114	CP, KM, SA, SM, TC, TMP	1989	Shizuoka
pSH90060	CP, KM, SA, SM, TC, TMP	1990	Shizuoka
pWA91011	CP, KM, SA, SM, TC, TMP	1991	Wakayama
pSH91037	CP, KM, SA, SM, TC, TMP	1991	Shizuoku

* Abbreviations: AP, ampicillin; CP, chloramphenicol; KM, kanamycine; SA, sulfamonomethoxine; SM, streptomycin; TC, tetracycline and TMP, trimethoprim.

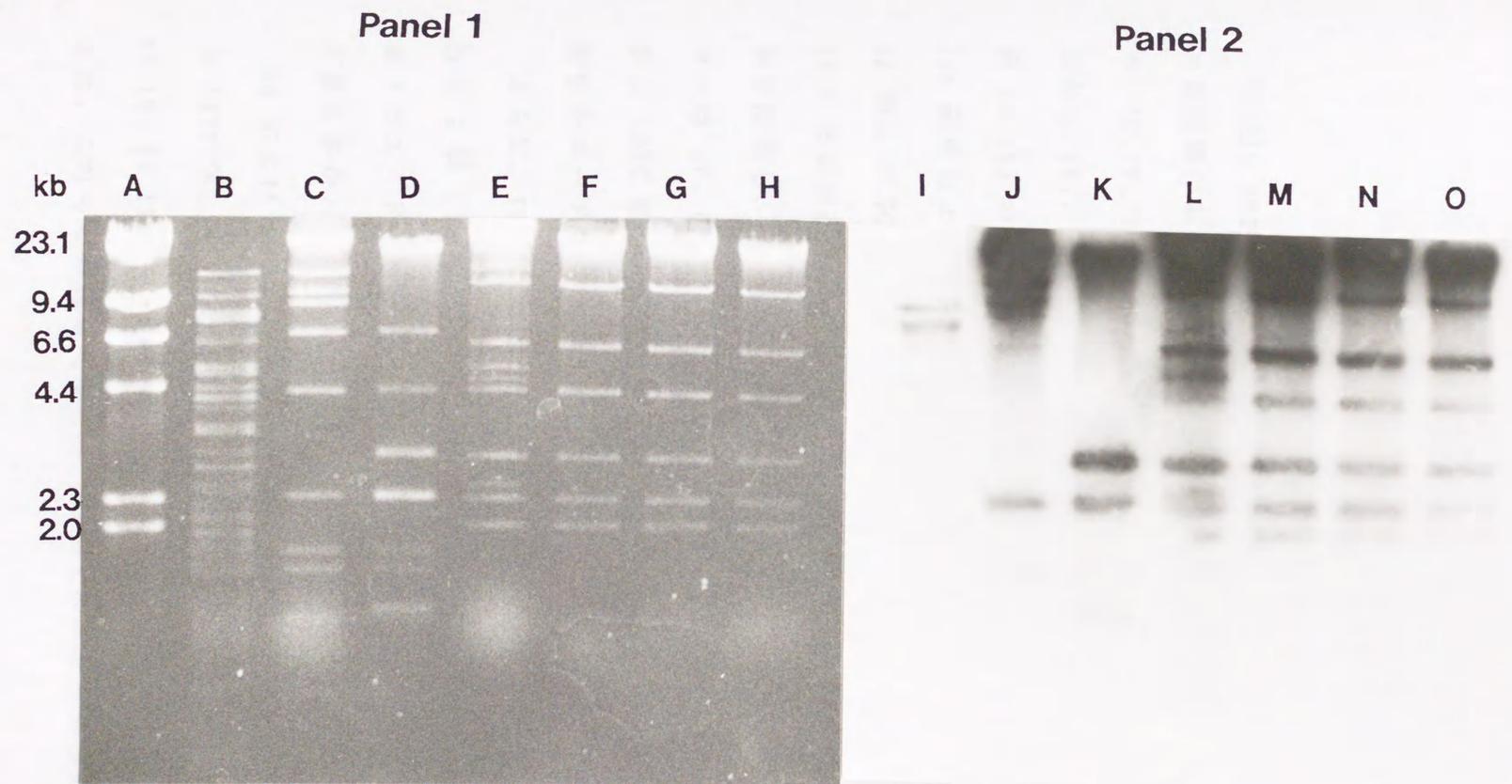


Fig. 27 Southern blot hybridization of a 32 P labeled pSH91037 to R plasmids detected *Vibrio anguillarum*. Panel 1 is an agarose gel electrophoretic profiles of R plasmid DNAs digested by *Hind*III. Panel 2 is an autoradiogram of a nitrocellulose filter blotted with the DNA panel 1 and hybridized with pSH91037. Standard molecular size of λ DNA (lane A) was digested by *Hind*III. Lane B, I, pJA7601; lane C, J, pJA8202; lane D, K, pPT86029; lane E, L, pSH89114; lane F, M, pSH90060; lane G, N, pWA91011; and lane H, O, pSH91037.

考 察

Vibrio anguillarum の R プラスミドによる薬剤耐性株は 1973 年にはじめてアユ養殖場において出現した。1973 年に出現した当初の R プラスミドの耐性マーカーは CP、SA、SM、および TC 4 剤耐性であった (Aoki *et al.*, 1974)。1974 年から 1977 年にかけて日本各地で分離された *V. anguillarum* 259 株のうち 9 株 (3.5%) のみが感受性で、残りの 250 株は 1 剤から 6 剤耐性を示した。なお、165 耐性株より伝達性 R プラスミドが検出され、その耐性マーカーは主に CP、SA および TC 3 剤耐性であった (Aoki *et al.*, 1981)。次いで、1978 および 1979 年には耐性株の出現率は一時期低迷したが、1980 年になると、再度多剤耐性株が出現し、114 株中 75 株が伝達性 R プラスミドによるもので、その耐性マーカーは AP、CP、SA、SM、TMP あるいは AP、CP、SA、TMP が主であった。1978 年から 1980 年までに *V. anguillarum* から検出された R プラスミドのいずれも TC 耐性をコードしていなかった (Aoki *et al.*, 1984)。

さらに、1981 年から 1983 年にかけて各地で分離された 139 株のうち、感受性は 2 株 (1.4%) のみで、137 株は 1 剤から 8 剤耐性を示した。30 耐性株より R プラスミドが分離され、その耐性マーカーは AP、CP、SA、SM、TC および TMP が最も多かった (Aoki *et al.*, 1985)。

NA および NF 耐性株はいずれの年にも多く検出された。NA 耐性株は 1974 から 1977 年、1978 から 1980 年、1981 から 1983 年の分離株にそれぞれ 88%、80.1%、60.1% を占めた。NF 耐性株はそれぞれ 93.8%、70.4%、54.7% を占めた。また、これらの耐性は R プラスミドによるものではなかった。

V. anguillarum の多剤耐性株は各地の養殖場に広く蔓延しており、新しく開発された NA、TMP あるいは AP がアユ養殖場で多く使用されると必ず 1 - 2 年後にそれらの薬剤に対して耐性株が出現して来ている。

薬剤耐性株の耐性マーカーは分離年代により若干異なるが、AP、CP、NA、NF、SA、SM、TC 及び TMP のうち、4 剤から 6 剤の異なる組み合わせの場合が最も多かった。

R プラスミドの構造について、制限酵素切断パターンの比較およびサザンブロットハイブリダイゼーションにより、1970 年代に検出されたものと 1981 - 1983 年に検出されたものとは異なることが解明されている (Mitoma *et al.*, 1984)。第一章あるいは第二章において、TC および CP 耐性遺伝子は 1970 年代と 1980 年代で異なることをすでに述べた。

本実験は 1989 から 1991 年にかけて、各地の養殖場で病魚より分離された V. anguillarum 114 株に対して 10 薬剤の MIC を調べた。供試 114 株のうち 1 株のみ全ての薬剤に対し感受性を示した。残りの 113 株は AP、CP、KM、NA、NF、SA、SM、TC および TMP に対し、1 剤から 9 剤耐性を示した。1989 年よりアユ養殖場においてワクチンが使用され、ピブリオ病の発生の低下に伴い、化学療法剤の使用が減少していることが考えられたが、V. anguillarum の多剤耐性株が各地のアユ養殖場で流行していることはかなり化学療法剤が使用されていることを示唆するものである。

供試 10 薬剤のうち、FF は全ての菌株に対し強い抗菌力を示した。このことは FF はアユのピブリオ病に対して有効であることが明らかとなった。

7 剤以上耐性を示した菌株から伝達性 R プラスミドが検出され、その耐性マーカーは共通であり、いずれも CP、KM、SA、SM、TC および TMP であった。

今回供試した 1989 年から 1991 年まで各地のアユ養殖場で分離した V. anguillarum の薬剤耐性株および耐性株より検出された R プラスミドは以前報告

されたものと下記の点で異なった。

今回 *V. anguillarum* より検出された R プラスミドは KM 耐性をコードしていた。すでに KM をコードする R プラスミドは魚類病原菌 *Pasteurella piscicida* (Takashima *et al.*, 1985) および *Aeromonas hydrophila* (Akashi and Aoki, 1986) より検出されている。カナマイシンは水産用薬品として全く使用されていないが、なぜ KM 耐性が出現したのか、その起因を究明するのは興味深いことである。R プラスミドが構築する際にカナマイシン耐性遺伝子は他の耐性遺伝子 (CP、SA、TC) と連座して伝達された可能性が十分に考えられる。

AP 耐性は *V. anguillarum* において 1980 年に初めて出現した。それらの多くは R プラスミドにコードされていた。しかし、本実験では、AP 耐性は NA、NF とともに *E. coli* に伝達しなかったため、伝達性 R プラスミドによるものではない点で以前と異なった。

今回のデータに示さなかったが、今回検出された 6 剤耐性の R プラスミドがコードしていたテトラサイクリンおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子は、本論文の第二章および第三章で述べた Tet G および *cat*-va とは異なるものであった。これらの耐性遺伝子がいずれのタイプに属するかについては今後検討する必要がある。

今回検出された伝達性 R プラスミドは同じ耐性マーカーを持ち、また、制限酵素切断パターンおよびサザンブロットハイブリダイゼーションにおいても相同性を示し、同じ構造であることが明らかとなった。即ち、同一 R プラスミドを保有する *V. anguillarum* が各地のアユ養殖場で流行していることが示唆された。一方、この耐性マーカーは以前検出されたものと比較すると、若干の変化が認められた (Table 14)。R プラスミドの構造も 1976、1982 および 1986 年検出された R プラスミドと異なっていた。しかし、R プラスミドを構成する一部の DN

A断片に類似性が認められた。これらのDNA断片は *V. anguillarum* のRプラスミドの共通のものと考えられ、今後この断片がどのような機能を有するかを検討することはRプラスミドの構築を考える上で興味深い。

さらに、Rプラスミドを構成する接合伝達領域および複製領域についても今後検討する必要がある。

Table 14 Change of drug resistance markers of R plasmids detected from *Vibrio anguillarum*

Resistance marker of R plasmid	Year						
	1973	1976	1980	1983	1989	1990	1991
TC	1*	3					
SM			1				
SA			1	1			
CP TC		2					
CP SM			3				
CP ABPC			2				
TC SA		2					
CP TC SA		84					
CP SM ABPC			1				
CP SM SA	2			1			
CP ABPC SA			5				
ABPC SA TMP			1				
CP TC SM SA	62						
CP SM SA TMP			10	1			
CP ABPC SA TMP			7				
SM ABPC SA TMP			1				
CP TC SM ABPC SA				3			
CP SM ABPC SA TMP			20	1			
CP TC SM ABPC SA TMP				1			
CP TC KM SM SA TMP					9	6	6
Total	65	91	52	8	9	6	6

* Number of R plasmids.

要 約

Vibrio anguillarum はグラム陰性桿菌で、魚類のビブリオ病の病原菌である。1973年以降、テトラサイクリン、クロラムフェニコールおよびサルファ剤等をコードする伝達性Rプラスミドによる *V. anguillarum* の多剤耐性株による感染症が全国各地のアユ養殖場で流行し、化学療法剤による治療が困難となって来ている。本研究は *V. anguillarum* 由来Rプラスミドが構築するテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet*) およびクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) について、その塩基配列を決定し、遺伝子産物の同定およびその耐性メカニズムを検討し、次いで既知の *tet* および *cat* と比較した。さらに、1989年から1991年にかけて各地で発生したビブリオ病のアユより分離した *V. anguillarum* における薬剤耐性動向およびRプラスミドの構造について既知のものと比較検討した。

V. anguillarum 株由来Rプラスミド pJA8122 がコードする *tet* (クラス G) は耐性遺伝子 (*tet A*) および調節遺伝子 (*tet R*) より構成され、両遺伝子は隣合って存在し、逆方向に転写された。*tet A* の open reading frame (ORF) が 1,179 塩基 (bp) よりなり、それにコードされた耐性タンパク質 (Tet) は 393 アミノ酸残基で、推算された分子サイズは 40,895 Da であった。マキシセル法により測定した遺伝子産物の分子サイズは約 35 KDa であった。

tet R の ORF は 630 bp よりなり、それにコードされたリプレッサータンパク質は 210 アミノ酸残基で、その分子サイズは 23,595 Da と算定された。2つの遺伝子の間に位置するコントロール領域には2つの palindromic operator が存在していた。決定された Tet G は他のグラム陰性菌由来の Tet とクラス A、お

よび C で約 60%、クラス B、D、および E で約 50% のホモロジーであった。これらのホモロジー値より既知の *tet* とは異なるものであることが明らかとなった。*Tet G* は他のグラム陰性菌由来 *tet* と同じ起源で、クラス A、C と共通の祖先配列があり、また分岐したものと推定された。この遺伝子による耐性機構はクラス A、B、C、D および E と同様に Tet タンパク質を介在して、テトラサイクリンを能動的に菌体外への排出によるものと考えられた。

V. anguillarum 由来 R プラスミド pJA7324 がコードする *cat* 遺伝子 (*cat-va*) は 648 bp よりなり、推定したアミノ酸配列は 216 残基で、推算した分子サイズは 25,471 Da であった。マキシセル法により測定した遺伝子産物の分子サイズは 22,500 Da であった。この分子量は Masuyoshi (1988) らは酵素学的方法で調べた *V. anguillarum* 由来 R プラスミド Rms418 にコードされたクロラムフェニコール不活化酵素 (CAT) の分子量と一致した。今回決定した塩基配列および推定したアミノ酸配列は既知のグラム陰性菌および陽性菌由来 *cat* (CAT) と比較したところ、アミノ酸レベルでは *V. anguillarum* 由来の CAT (CAT-VA) は大部分の CAT と約 40%、*Clostridium* 由来の CATD、CATP および *Campylobacter coli* 由来の CAT と 60% 前後のホモロジーが認められた。アミノ酸配列では、CAT 活性に重要な機能残基、特に active center と考えられる C 末端に存在する一部の配列は CAT-VA には良く保存されており、機能に関して他の CAT と同様であることが示唆された。なお、CAT-VA アミノ酸配列の 45 番目と 46 番目の間、4 つのアミノ酸残基の欠失が認められた。高いホモロジーを示した CATD、CATP および *C. coli* CAT アミノ酸配列の同じ位置にも 4 つのアミノ酸残基の欠失が存在したことより、この 4 つの CAT は起源および進化上に密接な関連があると考えられる。*cat-va* を含む DNA 断片をプローブとして、*V. anguillarum* 由来 R プラスミドとハイブリダイゼーションを行ったところ、一部の分離年代の異なる R プラスミド (Rms418 を含む) は強い相同性を示し、同じあ

るいは類似する構造の cat の存在が示唆された。

1989 年から 1991 年にかけて各地のアユ養殖場で分離された V. anguillarum 114 株に対する 10 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定により、フロルフェニコールは全ての供試菌株に対し強い抗菌力を示した。供試株中 1 株のみが全ての供試薬剤に対して感受性を示した。残り 113 株は 1 剤から 9 剤の耐性を示し、アンピシリン、ナリジキシン酸およびフラゾリドン 3 剤耐性が最も多かった。7 剤以上耐性を持つ 21 株より伝達性 R プラスミドが検出された。その R プラスミドの耐性マーカーは全てクロラムフェニコール、カナマイシン (KM)、スルファモノメトキシシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびトリメトプリムで、KM 耐性が V. anguillarum において初めて見つけられた。制限酵素切断パターンおよび サザーンプロットハイブリダイゼーションにより、これらの R プラスミドが同一構造であることが示唆された。分離地域が異なっても同一 DNA 構造を持つ R プラスミドが広くアユ養殖場において分布していることが示唆された。なお、今回検出された R プラスミドは既知の V. anguillarum 由来の R プラスミドのものと DNA 構造が異なった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始多大なる御指導、御鞭撻を賜った宮崎大学農学部生物資源利用学科生物機能工学講座の青木 宙教授に厚くお礼を申し上げます。本研究について、適切な御助言を頂いた元宮崎大学農学部教授北尾忠利博士にお礼を申し上げます。

参 考 文 献

- Akashi, A. and Aoki, T. (1986) Characterization of transferable R plasmid from Aeromonas hydrophila. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52: 649-655
- 秋葉朝一郎、小山恒太郎、一色義人、木村貞夫、福島敏夫 (1960) : 多剤耐性赤痢菌の発生機序に関する研究. 日本医事新報、1866: 46-50
- Alton, N. K. and Vapnek, D. (1979) Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. Nature, 282: 864-869
- Aoki, T., Egusa, S. and Arai, T., (1974) Detection of R factors in naturally occurring Vibrio anguillarum strains. Antimicrob. Agents Chemother. 6: 534-538
- Aoki, T., Kitao, T. and Kawano, K. (1981) Changes in drug resistance of Vibrio anguillarum in cultured ayu, Plecoglossus altivelis Temminck and Schlegel, in Japan. J. Fish Dis. 4: 223-230
- Aoki, T., Kitao, T., Watanabe, S. and Takeshita, S. (1985) Drug resistance and R plasmids in Vibrio anguillarum isolated in cultured Ayu(Plecoglossus altivelis). Microbiol. Immunol. 28: 1-9
- Aoki, T., Kanazawa, T. and Kitao, T. (1985) Epidemiological surveillance of drug resistant Vibrio anguillarum strains. Fish Pathol. 20: 199-208

Aoki, T. and Takahashi, A. (1986) Tetracycline-resistant gene of a nontransferable R plasmid from fish-pathogenic bacteria Aeromonas salmonicida. Bull. Japan. Soc. Scil Fish. 52: 1913-1917

Aoki, T., Satoh, T. and Kitao, T. (1987) New tetracycline resistance determinant on R plasmid from Vibrio anguillarum. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1446-1449

Aoki, T. (1988) Drug-resistant plasmids from fish pathogens. Microbiol. Sciences, 5: 219-223

青木 宙 (1990) 医学細菌学 (5 卷) : pp. 265-291. 魚類病原菌の薬剤耐性および病原性に関するプラスミド (中野 昌康・吉川 昌之介・竹田美文 編集) 菜根出版、東京

Bannam, T. L. and Rood, J. I. (1991) Relationship between the Clostridium perfringens cat Q gene product and chloramphenicol acetyltransferases from other bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 471-476

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research. 7: 1513-1523

Bolivar, F. and Backman, K. (1978) Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods Enzymol. 68: 245-267

Bruckner, R. and Matzura, H. (1985) Regulation of the inducible chloramphenicol acetyltransferase gene of the Staphylococcus aureus plasmid pUB112. EMBO J. 4: 2295-2300

- Charles, I. G., Keyte, J. W. and Shaw, W. V. (1985) Nucleotide sequence analysis of the cat gene of Proteus mirabilis: Comparison with the type I (Tn9) cat gene. J. Bacteriol. 164: 123-129
- Chopra, I. (1985) The Tetracyclines: Handbook of Experimental Pharmacology (Hlavka, J. J. & Boothe, J. H., eds.) Vol. 78, pp. 317-392, Springer-Verlag, New York
- Chopra, I. (1986) Genetic and biochemical basis of tetracycline resistance. J. Antimicrob. Chemother. 18, Suppl. C, 51-56
- Cisar, J. O. and Fryer, J. L., (1969) An epizootic of vibriosis in chinook salmon. Bull. Wildl. Dis. Assoc. 5: 73-76
- Curiale, M. S., McMurry, L. M. and Levy, S. B. (1984) Intracistronic complementation of the tetracycline resistance membrane protein of Tn10. J. Bacteriol. 157: 211-217
- De Grandis, S. A. and Stevenson, R. M. W. (1985) Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen Yersinia ruckeri. Antimicrob. Agents Chemother. 27: 938-942
- 江草周三 (1988) : 魚の感染症、恒星社厚生閣、東京
- Evelyn, T. P. T., (1971) First records of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada, and taxonomic status of the responsible bacterium, Vibrio anguillarum. J. Fish. Res. Board Can. 28: 517-525
- Franke, A. E. and Clewell, D. B. (1981) Evidence for a chromosome borne resis-

- tance transposon(Tn916) in Streptococcus faecalis that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. J. Bacteriol. 145: 494-502
- Foster, T. J. and Shaw, W. V. (1973) Chloramphenicol acetyltransferase specified by fi^- R factors. Antimicrob. Agents Chemother. 3: 99-104
- Gaffney, D. F., Foster, T. J. and Shaw, W. V. (1978) Chloramphenicol acetyltransferases determined by R plasmids from Gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol. 109: 351-358
- Gaffney, D. F., Cundliffe, E. and Foster, T. J., (1981) Chloramphenicol resistance that does not involve chloramphenicol acetyltransferase encoded by plasmids from Gram-negative bacteria. J. General Microbiol. 125: 113-121
- Grunstein, M. and Hogness, D. S. (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961-3965
- Haastein, T. and Holt, G. (1972) The occurrence of vibrio disease in wild Norwegian fish. J. Fish. Biol. 4: 33-37
- Hachler, H., Kayser, F. H. and Berger-Bachi, B. (1987) Homology of a tetracycline resistance determinant of Clostridium difficile with Streptococcus (Enterococcus) faecalis transposon Tn916. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1033-1038
- Harding, S. E., Rowe, A. J. and Shaw, W. V. (1987) The molecular mass and trimeric nature of chloramphenicol acetyltransferase. Biochem. Soc. Trans. 15: 513

- Harwood, C. R., Williams, D. M. and Lovett, P. S. (1983) Nucleotide sequence of a Bacillus pumilus gene specifying chloramphenicol acetyltransferase. *Gene*, 24: 163-169
- Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, 28: 351-359
- Hickman, R. K., McMurry, L. M. and Levy, S. B. (1990) Overproduction and purification of the Tn₁₀-specified inner membrane tetracycline resistance protein Tet using fusions to beta-galactosidase. *Mol. Microbiol.* 4: 1241-1251
- Hillen, W. and Schollmeier, K., (1983) Nucleotide sequence of the Tn₁₀ encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Research*, 11: 525-539
- Holt, G. (1970) Vibriosis (Vibrio anguillarum) as an epizootic disease in rainbow trout(Salmo gairdneri). *Acta Vet. Scand.* 11: 600-603
- Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982) Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* 150: 815-825
- Hoshino, T., Ikeda, T., Tomizuka, N. and Furukawa, K. (1985) Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic *Bacillus* plasmid: Comparison with staphylococcal Tc-R controls. *Gene*, 37: 131-138
- 飯野徹雄、小関治男、広田幸敬 (1981) : 細胞質因子とその利用、共立出版、東京

- Ishiwa, H. and Shibahara, H. (1985) New shuttle vectors for Escherichia coli and Bacillus subtilis. III. Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene of pAM α I and ori-177. Japan. J. of Genet. 60: 485-498
- 城 泰彦、室賀清邦 (1972) 淡水養殖ウナギから分離された Vibrio anguillarum について 魚病研究 6: 117-119
- Kado, C. I. and Liu, S. T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145: 1365-1373
- Khan, S. A. and Novick, R. P. (1983) Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from Staphylococcus aureus. Plasmid, 10: 251-259
- Klock, G., Unger, B., Gatz, C., Hillen, W., Altenbuchner, J., Schmid, K. and Schmitt, R. (1985) Heterologous repressor-operator recognition among four classes of tetracycline resistance determinants. J. Bacteriol. 161: 326-332
- 木村正雄 (1964) : 養殖魚類の疾病に関する研究 - II ハマチの細菌性疾病について (その1)、日水誌、30: 114-121
- Knapp, J. S., Johnson, S. R., Morse, S. A. Roberts, M. C. and Zenilman, J. M. (1988) High-level tetracycline resistance due to tet M in strains of Neisseria species, Kingella denitrificans, and Eikenella corrodens. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 765-767
- LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Titmas, B. M., Smith, C. J. and Tenover, F. C. (1988) Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene tet O

from Streptococcus mutans DL 5. J. Bacteriol. 170: 3618-3626

Leslie, A. G. W., Liddell, J. M. and Shaw, W. V. (1986) Crystallization of a type III chloramphenicol acetyltransferase. J. Mol. Biol. 188: 283-285

Leslie, A. G. W., Moody, P. C. E. and Shaw, W. V. (1988) Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4133-4137

Levin, M. A., Wolke, R. E. and Cabell, V. J. (1972) Vibrio anguillarum as a cause of disease in winter flounder (Pseudopleuronectes americanus). Can. J. Microbiol. 18: 1585-1592

Levy, S. B. and McMurry, L. (1974) Detection of an inducible membrane protein associated with R factor mediated tetracycline resistance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56: 1060-1068

Levy, S. B. (1988) Tetracycline resistance determinants are widespread. Features, 54: 418-421

Levy, S. B. (1989) Evolution and spread of tetracycline resistance determinants. J. Antimicrob. Chemother. 24: 1-7

Levy, S. B., McMurry, L. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C. and Taylor, D. E. (1989) Nomenclature for tetracycline resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1373-1374

Lewendon, A., Murray, I. A., Kleanthous, C., Cullis, P. M. and Shaw, W. V. (1988) Substitutions in the active site of chloramphenicol acetyltransferase:

role of a conserved asparved aspartate. *Biochem.* 27: 7385-7390

Manavathu, E. K., Hiratsuka, K. and Taylor, D. E. (1988) Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from Campylobacter jejuni. *Gene*, 62: 17-26

Marshall, B., Tachibana, C. and Levy, S. B. (1983) Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 835-840

Marshall, B., Morrissey, S., Flynn, P. and Levy, S. B. (1986) A new tetracycline-resistance determinant, class E, isolated from Enterobacteriaceae. *Gene*, 50: 111-117

Martin, P., Trieu-Cuot, P. and Courvalin, P. (1986) Nucleotide sequence of the tet M tetracycline resistance determinant of streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res.* 14: 7047-7058

Masuyoshi, S., Okubo, T., Inoue, M. and Mitsuhashi, S. (1988) Purification and some properties of a chloramphenicol acetyltransferase mediated by plasmids from Vibrio anguillarum. *J. Biochem.* 104: 131-135

松原謙一 (1976) : プラスミド、講談社サイエンティフィック、東京

McMurry, L. M., Petrucci, R. R. and Levy, S. B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in E. coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3974-3977

Mendez, B., Tachibana, C. and Levy, S. B., (1980) Heterogeneity of tetracycline

resistance determinants. *Plasmid*, 3: 99-108

三橋 進 (1981) : 薬剤耐性機構の生化学、学会出版センター、東京

三橋 進、五島瑳智子、清水喜八郎 (1985) : 薬剤耐性菌による環境汚染、学会出版センター、東京

Mitoma, Y., Aoki, T. and Crosa, J. H. (1984) Phylogenetic relationships among Vibrio anguillarum plasmids. *Plasmid*, 12: 143-148

Morse, S. A., Johnson, S. R., Biddle, J. W. and Roberts, M. C. (1986) High-level tetracycline resistance in Neisseria gonorrhoeae is a result of acquisition of streptococcal tet M determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 664-670

Muroga, K. and Egusa, S. (1967) Vibrio anguillarum from an endemic disease of Ayu in Lake Hamana. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33: 636-646

Murray, I. A., Hawkins, A. R., Keyte, J. W. and Shaw, W. V. (1988) Nucleotide sequence analysis and overexpression of the gene encoding a type III chloramphenicol acetyltransferase. *Biochem. J.* 252: 173-179

Murray, I. A., Gil, J. A. Hopwood, D. A. and Shaw, W. V. (1989) Nucleotide sequence of the chloramphenicol acetyltransferase gene of Streptomyces acrimycini. *Gene*, 85: 283-291

Murray, I. A., Martinez-Suarez, J. V., Close, T. J. and Shaw, W. V. (1990) Nucleotide sequence of genes encoding the type II chloramphenicol acetyltransferase of Escherichia coli and Haemophilus influenzae, which are sensitive to

inhibition by thiol-reactive reagents. *Biochem. J.* 272: 505-510

日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会 (1981) : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について、*Chemotherapy*、29: 76-79

室賀清邦・元信堯 (1967) : 利根川河口における稚アユのビブリオ病について、*魚病研究*、2: 74-76

室賀清邦・江草周三 (1970) : 淡水養殖アユより分離した *Vibrio anguillarum* について、*魚病研究*、5: 16-20

室賀清邦 (1975) : *Vibrio anguillarum* およびその感染症に関する研究、*広島大水畜産学部紀要*、14: 101-215

室賀清邦、城 泰彦、西淵光昭 (1976) : 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio* - I 性状と分類学的位置、*魚病研究*、11: 141-146

Novick, R. P. (1976) Plasmid-protein relaxation complexes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 127: 1177-1187

落合国太郎、中山敏樹、木村勝直、沢田収 (1959) : 赤痢菌相互間及びこれと大腸菌との間における薬剤耐性の遺伝に関する研究、*日本医事新報*、1861: 34-46

Okamoto, S. and Suzuki, Y. (1965) Chloramphenicol-, dihydrostreptomycin-, and kanamycin- inactivating enzymes from multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome 'R'. *Nature*, 208: 1301-1303

Park, B., Hendricks, M., Malamy, M. H., Tally, F. and Levy, S. B. (1987) Cryptic tetracycline resistance determinant (Class F) from *Bacteroides fragilis*

mediates resistance in Escherichia coli by actively reducing tetracycline accumulation. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1739-1743

Polak, J. and Novick, R. P. (1982) Closely related plasmids from Staphylococcus aureus and soil bacilli. Plasmid, 7: 152-167

Postle, K., Nguyen, T. T. and Bertrand, K. P. (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the Tn10 encoded tetracycline resistance determinant. Nucleic Acids Res. 12: 4849-4863

Projan, S. J., Kornblum, J. Moghazeh, S. L., Edelman, I., Gennaro, M. L. and Novick, R. P. (1985) Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221, conjugate plasmid replicons from Staphylococcus aureus. Mol. Gen. Genet. 199: 452-464

Reynes, J. P., Calmels, T., Drocourt, D. and Tiraby, G. (1988) Cloning, expression in Escherichia coli and nucleotide sequence of a tetracycline-resistance gene from Streptomyces rimosus. J. Gen. Microbiol. 134: 585-598

Roberts, M. C. and Kenny, G. E. (1986) Dissemination of the tet M tetracycline resistance determinant to Ureaplasma urealyticum. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 141-143

Roberts, M. C. and Moncla, B. J. (1988) Tetracycline resistance and Tet M in oral anaerobic bacteria and Neisseria perflava-N sicca. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1271-1273

Ross, A. J., Martin, J. E. and Formerly, V. B., (1968) Vibrio anguillarum from an epizootic in rainbow trout (Salmo gairdneri). Bull. Off. Int. Epiz. 69:

- Russell, A. D. and Chopra, I. (1990) Understanding antibacterial action and resistance. Ellis Horwood Limited, England.
- Sakaguchi, R., Hitoshi, A. and Shishido, K. (1988) Nucleotide sequence homology of the tetracycline resistance determinant naturally maintained in Bacillus subtilis Marburg 168 chromosome and the tetracycline resistance gene of B. subtilis plasmid pNS1981. *Biochim. Biophys. Acta* 950: 441-444
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York
- Sancar, H., Hack, A. M. and Rupp, W. D. (1979) Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.* 137: 692-693
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Schwarz, S., Spies, U. and Cardoso, M. (1991) Cloning and sequence analysis of a plasmid-encoded chloramphenicol acetyltransferase gene from Staphylococcus intermedius. *J. Gen. Microbiol.* 137: 977-981
- Schwarz, S. and Cardoso, M. (1991a) Molecular cloning purification, and properties of a plasmid-encoded chloramphenicol acetyltransferase from Staphylococcus haemolyticus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1277-1283
- Schwarz, S. and Cardoso, M. (1991b) Nucleotide sequence and phylogeny of a

Chloramphenicol acetyltransferase encoded by the plasmid pSCS7 from Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1551-1156

Schwarz, S., Cardoso, M. and Wegener H. C. (1992) Nucleotide sequence and phylogeny of the tet (L) tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from Staphylococcus hyicus. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 580-588

Shaw, W. V. (1967) The enzymatic acetylation of chloramphenicol by extracts of R factor-resistant Escherichia coli. J. Biol. Chem. 242: 687-693

Shaw, W. V. (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. Methods Enzymol. 43: 737-755

Shaw, W. V., Packman, L. C., Burleigh, B. D., Dell, A., Morris, H. R. and Hartley, B. S. (1979) Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by bacterial plasmids. Nature, 282: 870-872

Shaw, W. V., (1983) Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. CRC Crit. Rev. Biochem. 14: 1-47

Shaw, W. V., (1984) Bacterial resistance to chloramphenicol. Brit. Med. Bull. 40: 36-41

Shaw, W. V., Brenner, D. G., Le Grice, S. F. J., Skinner, S. E. and Hawkins, A. R. (1985) Chloramphenicol acetyltransferase gene of staphylococcal plasmid pC221. Nucleotide sequence analysis and expression studies. FEBS Lett. 179: 101-106

- Smith, I. W., (1961) A disease of finnock due to Vibrio anguillarum. J. Gen. Microbiol. 24: 247-252
- Snieszko, S. F. and Bullock, G. L. (1957) Treatment of sulfonamide-resistant furunculosis in trout and determination of drug sensitivity. Fish. Bull. Fish Wildl. Ser. (Washington, D. C.) 125: 555-564
- Sougakoff, N., Papadopoulou, B., Norman, P. and Courvalin, P. (1987) Nucleotide sequence and distribution of gene tet 0 encoding tetracycline resistance in Campylobacter coli. FEMS Microbiol. Lett. 44: 153-159
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. J. Molec. Biol. 98: 503-507
- Steffen, C. and Matzura, H. (1989) Nucleotide sequence analysis and expression studies of a chloramphenicol-acetyltransferase-coding gene from Clostridium perfringens. Gene, 75: 349-354
- Sutcliffe, J. G. (1978) Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 77-90
- Sykes, R. B. and Bonner, D. P. (1984) Counteracting antibiotic resistance: new drugs. Brit. Med. Bull. 40: 96-101
- Takashima, N., Aoki, T. and Kitao, T. (1985) Epidemiological surveillance of drug-resistant strains of Pasteurella piscicida. Fish Pathol. 20: 209-217
- Tovar, K., Ernst, A. and Hillen, W. (1988) Identification and nucleotide sequence of the class E tet regulatory elements and operator and inducer

- binding of encoded purified Tet repressor. *Mol. Gen. Genet.* 215: 76-80
- Unger, B., Becker, J. and Hillen, W. (1984a) Nucleotide sequence of the gene, protein purification and characterization of the pSC101- encoded tetracycline-resistance gene repressor. *Gene*, 31: 103-108
- Unger, B., Klock, G. and Hillen, W. (1984b) Nucleotide sequence of the repressor gene of the RA1 tetracycline resistance determinant: structural and functional comparison with three related Tet repressor genes. *Nucleic Acids Res.* 12: 7693-7703
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153: 3-11
- Wang, Y. and Taylor, D. E. (1990) Chloramphenicol resistance in Campylobacter coli: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. *Gene*, 94: 23-28
- 渡辺 力 (1969) : 化学療法と耐性菌、朝倉書店、東京
- Waters, S., Rogowsky, P., Grinsted, J., Altenbuchner, J. and Schmitt, R. (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 11: 6089-6101
- Wren, B. W., Mullany, P., Clayton, C. and Tabaqchali, S. (1989) Nucleotide sequence of a chloramphenicol acetyl transferase gene from Clostridium difficile. *Nucleic Acids Res.* 17: 4877
- 山口明人 (1991) テトラサイクリン/プロトンアンチポートの分子機構、生化学、63:

1062-1081

安永統男 (1972) スレに起因する種苗用マダイの細菌性疾病の一原因と薬浴の効果、
魚病研究、7: 67-71

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage
cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and
pUC19 vectors. *Gene*, 33: 103-119

Young, R. A. and Davis, R. W. (1983) Efficient isolation of genes by using
antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1194

