腸球菌 (Enterococcus) の病原性因子

池 康 嘉^{1,2}

¹群馬大学 名誉教授

²(社) 薬剤耐性菌教育研究会

〒379-2152 群馬県前橋市下大島町 914-4

E-mail: yasuke@silc.plala.or.jp

はじめに

腸球菌 (Enterococcus) はグラム陽性球菌で乳酸発酵菌である。昆虫から人まであらゆる動物の腸管および植物等に生息する。そして宿主との生物学的な関係において共生細菌 (commensal organisms/probiotics) として進化してきた細菌である。乳肉の発酵食品の製造にも用いられてきた。腸球菌属の菌種は 1950 年代以前は主として人腸管に生息する 3 種類 (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*) が知られていたが現在 (2012 年時点) で 44 種類が知られている。菌種により主に生息する動物や環境が異なる。例えば, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* は人腸管に, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* は自然環境や植物に生息する。

人腸管に生息する共生細菌としての腸球菌 (*E. faecalis*) が人に病気をおこすことは MacCallum & Hasting (177) によりはじめて詳しく報告されている。37 歳の患者が Enterococcal (*E. faecalis*) により急性心内膜炎, 菌血症 (敗血症) で死に至っている。この時の *E. faecalis* の性質として β -溶血性で “very hardy and tenacious of life” (丈夫でしつこく頑強な菌である) として腸球菌 (*E. faecalis*) の特性が記載されている。以後 *E. faecalis* は心内膜炎起因菌として認識されてきた。1980 年代以降, *E. faecalis* と *E. faecium* の多剤薬剤耐性菌が病院内感染症の主要な起因菌となってきた。すなわち, 共生細菌から病原細菌へと急速に進化してきたのである。

共生細菌として人と共生してきた腸球菌は, いわゆる病原細菌がもつ病原性因子の有無で病原性が大きく変化するような強毒素や, 明確な人組織定着因子や人組織侵入因子等は保持していない。しかしながら, 人臨床分離腸球菌について解ってきたことは, *E. faecalis*, *E. faecium* が潜在的に保持している病原性因子として機能し得る各種の形質が病院感染原因菌に集積し, 新種の菌に進化してきていることである。それらの形質の中には, 1) 接合伝達性プラスミド 2) 各種転移遺伝子 (transposon)。3) *E. faecalis* の cytolysin (β -hemolysin/ bacteriocin)。4) *E. faecalis* のヒト

細胞外マトリックス蛋白への結合能。5) 菌種に特異的な各種のバクテリオシン (Bac), 6) 薬剤耐性等がある。これらのそれぞれの形質の疫学及び分子遺伝学的発現調節機構が詳しく解析されてきた。

1. 腸球菌の接合伝達性プラスミド

1) 概要

生物の進化のための機構として細菌から高等生物まですべての生物において遺伝子交換機構 (性, sex) が存在する, 細菌では接合伝達, 形質転換, 形質導入が知られている。各種細菌において特異的な機構が存在する。例えば, 多くのグラム陰性桿菌では接合伝達, グラム陽性菌では肺炎レンサ球菌の形質転換, ブドウ球菌の形質導入等が一般的である。腸球菌ではグラム陽性菌ではまれな液体培地中で菌と菌の接合により伝達する高頻度接合伝達性プラスミド (分子サイズ約 60 kbp) が知られている。腸球菌の高頻度接合伝達性プラスミドには 2 種類報告されている。一つは *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド, 他の一つは *E. faecium* で発見された pMG1 型プラスミドでこのプラスミドの接合伝達にはフェロモンは関与しない。

接合伝達性プラスミドの接合伝達には 3 つの主要な過程が存在する。①供与菌 (donor) による受容菌 (recipient) の捕捉と接合凝集塊形成, ② *oriT* (origin of transfer) での plasmid DNA の single strand の切断と伝達の開始, ③ plasmid DNA の供与菌から受容菌への接合 channel を通しての伝達, その後の DNA double strand の合成と DNA 両末端の結合 (ligation) である。

最初の過程の接合凝集塊形成にはグラム陰性菌の F-plasmid, 又は R-plasmid 等を含む供与菌の性線毛 (sex pili) による受容菌の捕捉と接合凝集塊形成について歴史的に詳しく研究されている。グラム陽性菌の腸球菌の接合凝集塊形成には供与菌の細胞表面に形成される凝集物質 (aggregation substance) により, 受容菌と接合凝集塊を形成する。次に relaxase (nickase) によるプラスミド *oriT* site の single strand の切断と plasmid DNA の伝達の開始,

接合 channel を通しての plasmid DNA の受容菌への伝達と plasmid DNA 両端の再結合 (ligation) で伝達が完了する。最初の凝集塊形成はグラム陰性菌と腸球菌の plasmid ではそれぞれ異なる機構が存在する。それ以後の過程はグラム陰性菌、及び腸球菌のプラスミドも基本的な機構は類似している。その機構の概要は以下のようなものである。

プラスミド DNA の受容菌への伝達は plasmid DNA の *oriT* (origin of transfer) から始まる。*oriT* site を relaxase (nickase) と accessory DNA binding protein が認識し結合する。続いて relaxase により *oriT* の nick site で single strand のリン酸結合が切断され 2 重ラセンが unwinding される。切断された DNA の 5' 末端と relaxase は tyrosin 残基を介して結合する。続いて、single strand DNA は、受容菌に接合伝達し、受容菌において double strand DNA 合成が行われ、最終的に DNA 両端が relaxase の cleaving and joining activity (DNA 切断と結合活性) により結合し、伝達が完了する。

plasmid DNA と relaxase の結合物 (relaxosome) が形成され single strand DNA が切断され、super coiled plasmid DNA が relaxation 状態 (環状) となる。この現象は *E. coli* において、mobilizable プラスミド ColE1 を用いた実験で、“relaxation complex” と名付けられ、1969 年 Clewell & Helinsky により最初に発見された (33, 34)。これは plasmid の接合伝達の過程や、rolling circle DNA 合成でおこる共通の必須現象である (54, 107)。

2) *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド

(1) 供与菌の受容菌の捕捉と接合凝集塊形成

E. faecalis のプラスミドを含む供与菌と受容菌の混合培養、又は供与菌に受容の培養口液を加えて培養すると供与菌と受容菌との凝集塊又は供与菌のみの自己凝集塊を形成する。この現象は供与菌が受容菌の生産するフェロモンに反応し、供与菌の細胞表面に凝集物質を生産することによる。フェロモン反応性プラスミドの発見は細菌におけるフェロモンの最初の発見となった (図 1)。

E. faecalis の受容菌は複数のアミノ酸 7~8 個の各々の plasmid に特異的な熱安定性の疎水性ペプチド (フェロモン) を生産し細胞外に分泌する。フェロモン反応性プラスミドを含む供与菌はそのプラスミドに特異的なフェロモンに誘導され蛋白質の凝集物質 (aggregation substance) を生産し、*E. faecalis* 供与菌の細胞表面に凝集物質を形成する凝集物質は *E. faecalis* の細胞表面の lipoteichoic acid (LTA) と結合し、供与菌と受容菌が接合凝集塊を形成する。フェロモンにより誘導され細胞表面に凝集物質が作られた供与菌は受容菌との接合凝集のみならず自己凝集 (self clumping) も起こす。供与菌と受容菌の接合凝集塊形成により供与菌のプラスミドが受容菌に高頻度に接合伝達する (2 時間の接合により供与菌当り 10^{-2} の頻度で接合伝達する)。プラスミドを受けとった受容菌の培養口液中にはそのプラスミドに対するフェロモンが検出できなくなる (図 3) (25, 26, 28, 37, 49, 50, 85)。

これまでフェロモン反応性プラスミド pAD1 (59.3 kb,

図 1 供与菌と受容菌の混合培養による凝集塊形成

図 2 フェロモン (pheromone) 反応性 plasmid を保持する供与菌のフェロモンに対する反応と凝集物質生産

cyl, *uvrB*), pCF10 (67.7 kb, *tetM*, *uvrA*), pPD1 (59 kb, *bac21*), pAM373 (36.8 kb) において生物学的、分子遺伝学的研究が詳しくされてきた。これらのプラスミドのフェロモン反応性と接合伝達性の生物学的機構と遺伝子構成は基本的に同じである (図 4) (26, 37, 39, 49, 50, 64, 85, 86, 124, 148, 153, 154, 168-170)。本項ではフェロモン反応性プラスミドとして最初に発見された pAD1 の知見を中心にまとめる (36)。

フェロモン反応性プラスミドのフェロモン反応機構、接合伝達機構の初期の遺伝学的研究は *E. faecalis* で発見された TnI (Tn3) 型トランスポゾン Tn917 (Em^r) 及び接合伝達性トランスポゾン Tn916 (Tc^r) 等を用いて行われた (32, 85)。TnI (Tn3) 型トランスポゾン Tn917 (Em^r) を用いた *E. faecalis* pAD1 の初期の遺伝学的解析により、*E. faecalis* pAD1::Tn917 の変異株には 2 つの領域 (*traA*, *traB*) に map される恒常的凝集変異株が存在すること、*E. faecalis* (pAD1) 培養口液の中には熱安定性のフェロモン抑制物質 (pheromone inhibitor) が存在すること及び pAD1 に対するフェロモン cAD1 は検出できないことが解った (図 3) (88)。

図3 Model illustrating certain aspects of the pheromone responsive of pAD1 and the shutoff of endogenous cAD1. cAD1, cPD1, cCF10 は腸球菌が産生するフェロモン, BS は lipoteichoic acid 遺伝子で AS の結合物質。TraA は凝集物質遺伝子 (*asa*) 制御蛋白で *iad* promoter に作用, IcaAD1 はフェロモン cAD1 抑制物質, TraB は当該プラスミド (pAD1) の cAD1 細胞外分泌抑制物質, TraC は外来性フェロモン (cAD1) の取り込みのための膜蛋白, pAD1 (plasmid) を保持する菌の培養濾過液中には pAD1 のフェロモン cAD1 は *E. faecalis* (pAD1) を指示菌とした時検出できなく, フェロモン抑制物質 IcaAD1 が検出される。これは TraB の作用により細胞外の cAD1 が少ないことと, cAD1 の TraC への結合過程で IcaAD1 の拮抗作用により cAD1 の取り込みが抑制されることによる。文献 (36) (85) を引用

E. faecalis の受容菌は複数の各々のフェロモン反応性プラスミドに特異的なフェロモンを生産し細胞外に分泌し培養液中に検出される。あるプラスミドを受けとった受容菌はそのプラスミドに特異的なフェロモンの活性が生物学的に検出できなくなるが、他のプラスミドに特異的なフェロモンは続けて生産される。これは、plasmid 上の遺伝子 (*iad*) によるフェロモン抑制物質 (pheromone inhibitor (Inh, IcaAD1)；熱安定性の疎水性のペプチド) が生産され細胞外に分泌される、一方分泌されたそのプラスミドに特異的なフェロモンの細胞内への取り込み過程でフェロモンとフェロモン抑制物質の生物学的拮抗作用により、フェロモンの細胞内への取り込みが抑制されることによる (88)。さらにプラスミドを含む供与菌はそのプラスミドに対するフェロモンの細胞外への分泌が減少する。これはプラスミド上の遺伝子 *traB* 産物 (TraB, 膜蛋白) によりフェロモンの分泌が抑制されることによる。*traB* 変異株は当該プラスミドのフェロモンが細胞外に分泌され、外来性フェロモンとして取り込まれ低度の自己凝集をおこす (4, 25, 26, 36, 37, 85, 88)。

ある plasmid を含む供与菌は当該 plasmid に対応する受容菌の生産する外来性のフェロモンを細胞内に取り込み、通常負に調節されている凝集物質生産から始まる接合伝達機能が誘導される。外来性フェロモンの取り込みは、細胞膜蛋白のフェロモン受容体 TraC に外来性フェロモンが結合しその後宿主菌のペプチド輸送系により細胞内に取り込まれる。フェロモンと pheromone inhibitor の拮抗作用は TraC 蛋白への結合においておこる。

プラスミド上の遺伝子 *traA* 産物 TraA は一連の接合伝達機能遺伝子の発現を抑制する負の調節遺伝子である。外来性のフェロモンが TraA に結合し負の調節機能が解除され、接合伝達機能遺伝子の正の調節遺伝子 (*traE*) 及びその下流の凝集物質生産遺伝子および一連の接合伝達機能遺伝子が発現する (25, 37, 144, 149, 154, 155, 159, 168, 169)。

(2) フェロモン活性の生物学的定量

Plasmid を保持していない *E. faecalis* は複数の異なるフェロモンを生産し、培養液中に分泌する。これまでに詳しく解析されてきたプラスミド pAD1, pCF10, pPD1, pAM373 に対するフェロモンはそれぞれ cAD1, cCF10, cPD1, cAM373 である (表 1) (25, 28, 37)。受容菌の培養液中の各々のフェロモン活性は、*E. faecalis* の受容菌の培養口過液 (培養上清を 0.22 μ m 孔径のミリポマフィルターを通したものを 100°C, 15 分間オートクレーブをかけたもの) を微量液体希釈法で倍々希釈したものにプラスミドを含む供与菌を一定量加え培養し、凝集が見られる最高希釈倍率をフェロモン活性値とする (50, 51)。

(3) Pheromone と Pheromone inhibitor

・pheromone 前駆体と pheromone (表 1)

pheromone cAD1, cCF10, cPD1, cAM373, cOB1 は細胞膜のそれぞれ異なる脂質蛋白 (lipoprotein) の signal sequence の一部である (5, 6)。lipoprotein の signal sequence は 21~22 個のアミノ酸ペプチドで C 末端側の 7 個又は 8 個のペプチドが pheromone となる。アミノ酸 7~8 個のペプチドとなるためには signal sequence の C 末端と、C 末端から上流の 7~8 番目、又は 8~9 番目のアミノ酸の間で切断されなければならない。signal sequence の末端は signal peptidase で切断され、上流側は細胞膜内の蛋白分解酵素 (intramembrane protease) の metallopeptidase (Eep) (442-amino acids 蛋白) によって切断される。この酵素は、prokaryote と eukaryote の細胞膜に広く存在する酵素である。pheromone が由来する各種 lipoproteins は特定のものではなくその機能は解っていない。

・pheromone inhibitor 前駆体と pheromone inhibitor (表 1)

plasmid 上にコードされている pheromone inhibitor 前駆体遺伝子 *iad* は 21~23 アミノ酸の signal sequence 類似のペプチドをコードしている。そのうち C 末端側の 7 個~8 個のアミノ酸が Eep によって切断され pheromone inhibitor として細胞外に分泌される。Eep の欠損株では pheromone (cAD1, cPD1, cCF10, cOB1) および pheromone inhibitor の iAD1 が検出できなくなる (27, 35, 36)。

(4) フェロモン反応性プラスミドのフェロモン反応の制御機構

フェロモン反応性 plasmid のフェロモン反応の遺伝子構成及びそれらの制御機構はフェロモン反応性 plasmid pAD1, pCF10, pPD1, pAM373 等において詳しく研究されている (図 4)。これらの遺伝子構成、制御機構は基本的に類似しており、pAD1 について解説する (図 5)。外来

表 1 Pheromone and inhibitor precursors

Plasmid	Inhibitor-precursor	Pheromone/precursor (total no. of amino acids)
pAD1	MSKRAMKKIIP <big>L</big> IT <big>L</big> FVV <big>T</big> LVG	MKVNKFVKGF <big>A</big> IA <big>L</big> F <big>S</big> LV <big>L</big> AGCGADKK... (309)
pCF10	MKTTLKKLSRYIAVVI <big>A</big> IT <big>L</big> IFI	VKKYKRLLLMAG <big>L</big> V <big>T</big> LV <big>F</big> VLSACGTAPVS... (275)
pPD1	MKQQKKHIAALLF <big>A</big> LIT <big>L</big> VS	MRKLN <big>R</big> WLYGSGL <big>L</big> F <big>L</big> VM <big>F</big> LSGCVKTGA... (234)
pAM373	MKKELILILKWLTPIGL <big>S</big> IFT <big>L</big> VA	MLKKPFL <big>L</big> FFSLL <big>G</big> A <big>I</big> FIL <big>A</big> SCGIGKDAV... (166)
pOB1	Unknown; iOB1 is SLTLILSA	MKKRTLWSVITVAV <big>A</big> V <big>L</big> VL <big>G</big> ACGNKKS... (272)

Large letters indicate amino acids in mature inhibitor or pheromone peptide. Inhibitor precursors, 21–23 amino acids. Pheromone precursors, part of signal sequences of precursors for apparent surface lipoprotein. 文献 (28) より一部改変

図 4 Comparison of pAD1, pCF10, pPD1, and pAM373 in regions that include determinants for regulation of the pheromone response. 文献 (28) より引用

図 5 A genetic model that focuses on key aspects of regulation of the plasmid-encoded sex pheromone response of *E. faecalis* pheromone responsive plasmid pAD1. 文献 (36) より引用

性フェロモン非存在下で凝集物質生産が抑制される。制御機構に関連する遺伝子は制御蛋白 (TraA) 遺伝子 *traA* と *inh* (フェロモン inhibitor) 遺伝子 *iad*, そしてそれぞれのプロモーター (*traA* の Pn, *iad* の Pi) である。これらは凝集物質 (AS) 生産を正に調節する *traE* の上流に位置する。主要制御機構は TraA の Pi への結合による負の調節と、それぞれ逆方向の転写のためのプロモーター Pn と Pi の発現とそれらの転写産物の相互作用により制御されている (25, 36, 37, 59, 63, 64, 85, 88, 99, 149, 168)。これはフェロモンが存在しない時 Pi からの転写が *iad* から下流に進展し凝集物質生産の正の調節遺伝子 *traE* の発現から始まる一連の接合機構の発現を完全に制御するための機構である。Pi はフェロモン抑制物質 inhibitor peptides (*inh*) の前駆物質 (ペプチド) 遺伝子 (*iad*) のプロモーターである。*iad* の terminator の上流に位置する Pn は *mD* のプロモーターで、Pi とは逆向きの転写産物のプロモーターである (25, 36, 37, 85, 99, 155)。Pn は制御タンパク遺伝子 (negative regulator) (*traA* of pAD1, pPD1 and pA373) のプロモーターでもある。フェロモンが存在しない非誘導状態において Pn から多くの転写産物が生産され分子サイズの異なる 2 種類の転写産物が作られる。一部は分子サイズの大きい制御タンパク遺伝子 (*traA* or *neg*) までの転写産物である。多くは、短い RNA (102 nt) の転写産物 (Ant-Inh) である。この転写産物は、制御 RNA (regulatory RNA) の機能を持ち、Pi からの転写産物と部分的な相補結合を行い、Pi からの転写を Pi の terminator での終結を高める役割をしている。フェロモンによる誘導状態において pheromone と TraA (Neg) が結合し TraA による Pi の抑制が解除され Pn による転写は減少し、Pi からの転写は促進され terminator (t) を越し、最終的に一連の接合伝達関連遺伝子 (*traE*, *sea1*, *asa1* (aggregation substance)) の発現に至る。細胞内に取り込まれた外来性フェロモンは TraA 蛋白と相互作用をし、負の制御が解除され *iad* から下流の *traE* の転写が促進される。Pi 下流の TraE1 は自らの蛋白と *asa1* (aggregation substance) 等の発現の正の調節に働く (25, 36, 37)。

3) *E. faecium* のフェロモン非反応性高頻度接合伝達性プラスミド

(1) pMG1 型 gentamicin 耐性高頻度接合伝達性プラスミド

pMG1 (Gm^r) (65.1 kbp) は, Em, Gm, Tet 耐性 *E. faecium* 臨床分離株から分離された plasmid で gentamicin 耐性をコードしている (94)。この型 (pMG1 型) の plasmid の接合伝達にフェロモンは関与しない。*E. faecium* の他, *E. faecalis*, *E. hirae* 等の各種の腸球菌にも液体培地中で高頻度に接合伝達する広い宿主域をもつ plasmid である。

E. faecium 間, *E. faecalis*, *E. faecium* 間, *E. faecalis* 間で液体培地中での 3 時間の接合で供与菌当たり約 10^{-4} の頻度で接合伝達する。供与菌と受容菌の混合培養において顕微鏡下で観察される接合凝集塊が観察される。pMG1 と

pheromone 反応性 plasmid pAD1, 及び固型培地上での接合伝達性プラスミド pIP501, pAM β 1 のいずれとも DNA の相同性はない (94)。

(2) pMG1 型 vancomycin 耐性高頻度接合伝達性プラスミド

VanA 型 vancomycin 耐性 *E. faecium* (10 株), *E. avium* (2 株) より, VanA 耐性が受容菌 *E. faecium*, 又は *E. faecalis* に液培地中で高頻度に接合伝達した。それぞれの接合伝達株から pHT α (65.9 kbp), pHT β (63.7 kbp), pHT γ (66.5 kbp) の 3 種類の高頻度接合伝達性プラスミドが分離された。これらは pMG1 型プラスミドで VanA transposon Tn1546 (10.8 kbp) をコードし, pHT β が prototype で pHT α は IS232 (2.2 kbp), pHT γ は group II intron (2.8 kbp) が挿入されていた (163)。

(3) pHT β の接合伝達機能の遺伝学的解析と供与菌の接合凝集塊形成

pMG1 型 plasmid の接合伝達機構は pMG1 (145, 146) 及び pHT β (159, 160, 163) で詳しく解析されている。それらの機構はそれぞれの plasmid において基本的に同じである。ここでは pHT β で得られた知見をまとめた。

pHT β (63.5 kbp) の plasmid DNA の Tn1546 (10.8 kbp) を除いた 52,890 bp 内に 61 の同一転写方向の遺伝子 (open reading frame, ORF1~61) が存在する。このうち 22 の ORF は *Bacillus anthracis* の病原性 plasmid pXO2 (96.2 kbp) ORFs と高い相同性があるが、これらの機能については不明である。

エリスロマイシン耐性トランスポゾン Tn917-*lac* による挿入変異株の解析で伝達頻度に影響を及ぼす 3 つの領域 (I~III) が存在する。領域 I は 2.8 kbp~42.1 kbp (39.3 kbp) で、ORF3~ORF48 の 46 個の ORF を含む。領域 II は 47.0 kbp~48.7 kbp (1.7 kbp) で ORF56 と ORF57 である。領域 III は 52.0 kbp~52.4 kbp (0.4 kbp) ORF61 である (160)。

pMG1 型プラスミド pHT β を含む *E. faecalis* FA2-2 は自己凝集を行う。液体培地で一夜培養後に自己凝集が観察される (図 6)。pHT β の自己凝集に関連する遺伝子は領域 I の約 6 kbp の領域に含まれる 5 つの ORFs (ORF9~ORF13) である。それぞれの機能は不明である。この領域が自己凝

図 6 Self aggregation of plasmid carrying *E. faecalis*

集に関連することは以下のことによる。それぞれの ORF への Tn5 挿入変異株は凝集が起きなくなることで、ORF10 の in frame 欠損変異株は凝集塊形成の形質が野性株より減少すること、接合伝達頻度が野性株より 1/10 減少すること、この領域は ORF9 の promoter から、ORF13 まで転写される operon 構造をしていることである (160)。

TraII 領域 (1.7 kbp, (ORF56, ORF57)) の ORF56 (187 amino acids) の Tn917 の挿入変異株、及び in frame deletion mutant は接合伝達頻度及び自己凝集能が欠損する。クローニングされた ORF56 はこれらの欠損を相補する。ORF56 の in frame deletion mutant は自己凝集の遺伝子 ORF10 と ORF13 の転写が減少することから ORF56 は凝集と接合伝達を正に調節する働きをもつ。一方、ORF9～ORF13 を含む凝集物質生産領域を cloning したプラスミドを含む *E. faecalis* は ORF56 が存在しない状態で自己凝集を行うこと、及び ORF9 の promoter が強い promoter 活性をもつことから、この領域の転写には負の調節機構が存在し、ORF56 はこの負の調節機構を抑制する働きをもつことが推測される (160)。

4) *oriT* region

一般的に接合伝達性 plasmid の *oriT* region は relaxase 遺伝子の下流又は近傍に存在する。接合伝達性 plasmid の *oriT* region は direct repeats sequences と invert repeat sequence で構成され、invert repeat sequence 内には *oriT* site が存在する (3, 36, 54, 107, 149, 159, 167)。

(1) フェロモン反応性プラスミド pAD1 の *oriT* region

pAD1 の *oriT* region は、6 bp の 5 個の direct repeats sequence とすぐ下流の約 140 bp の invert repeat sequence で構成される。上流側の invert repeat sequence 内に *oriT* site が存在する。フェロモン反応性プラスミド pAD1 の direct repeat sequence と pAM373 の inverted repeat sequence の hybrid plasmid は、pAD1 により効率よく mobilization されるが pAM373 では mobilize されない。このことから *oriT* region の特異性は direct repeats に存在する (36, 58, 59)。

(2) pHT β の *oriT* region

領域 I (ORF3～ORF48) の ORF31～ORF32 の間の non coding region の 192 bp 内に *oriT* region が存在する 192 bp 内に ORF31 側から 3 つの direct repeat sequence と 2 つの invert repeat sequence が存在する。ORF32 の下流の ORF34 は 506 個のアミノ酸の DNA relaxase/nickase 蛋白遺伝子で *oriT* site の single strand の切断と伝達の開始の働きをする。ORF34 蛋白は N 末端側に接合伝達 plasmid の DNA relaxase/nickase 蛋白に保存されている 3 種類 (motif I～III) の塩基配列が存在する。ORF34 への Tn917-*lac* 挿入変異株及び motif III への in frame 欠損変異株いずれも伝達機能が欠損する (36, 159)。

5) plasmid 接合伝達の接合 channel と IV 型分泌機構

IV 型分泌機構 (type IV secretion system, T4SS) は細胞間の蛋白の伝達機構である。プラスミド接合伝達においては蛋白 (relaxase) と plasmid DNA の結合物が IV 型分

泌機構により伝達される。IV 型分泌機構が plasmid の接合伝達に用いられることは Gram 陰性菌の plasmid の接合伝達機構の研究で解明されてきた。Gram 陽性菌では IV 型分泌機構が存在しないと考えられていた。過去約 10 年前頃から、Gram 陽性菌の plasmid の接合伝達にも IV 型分泌機構と類似の機構が用いられることが解ってきた。Gram 陽性菌の plasmid の接合伝達における接合 channel としての IV 型分泌機構については固形培地上の接合伝達性プラスミド pIP501 およびフェロモン反応性プラスミド pCF10 において研究されている (1, 36, 49, 106)。IV 型分泌機構のために必要な蛋白の遺伝子は接合伝達性プラスミド上に存在する。pIP501 の IV 型分泌機構には 15 個の ORFs, 又は蛋白が関与する。フェロモン反応性プラスミド pAD1, pCF10 およびフェロモン非反応性プラスミド pMG1 型プラスミド pHT β において、IV 型分泌機構の蛋白の中で高度に保存されている coupling protein がコードされている。それらは pAD1 (TraW (ORF53)), pCF10 (Pcfc), pHT β (ORF22) 等である。coupling protein は IV 型分泌機構の channel を構成する蛋白の一つで、single strand plasmid DNA-relaxase 結合物 relaxosome が最初に認識、結合する蛋白である (1, 3, 36, 59, 159, 160, 167)。

6) フェロモン反応性プラスミド pAD1 とフェロモン非反応性プラスミド pHT β の遺伝子地図

pAD1, および pHT β の分子遺伝学的解析で解明された、又は推測される凝集物質生産領域およびその発現調節領域、*OriT* 領域、IV 型分泌機構領域等を含む pAD1, pHT β の遺伝子地図をそれぞれ図 7, 図 8 に示す。

2. *E. faecalis* の外分泌蛋白と人組織定着因子

1) 腸球菌の cytolysin toxin

(1) 腸球菌の toxin

E. faecalis が生産する病原性に関連する外分泌蛋白には cytolysin および gelatinase (serine protease) が知られている。いずれも臨床分離菌において高頻度に分離される形質である。cytolysin は *E. faecalis* が生産する唯一の毒素 (toxin) である。

E. faecalis の中に cytolysin (β -hemolysin/bacteriocin) 生産菌が存在することは知られていた (151)。cytolysin は *E. faecalis* の代表的な外分泌蛋白で人赤血球溶血活性 (β -hemolysin) と各種グラム陽性菌に抗菌活性をもつ bacteriocin 活性をもつ (15, 16, 75, 137, 140, 142)。cytolysin が *E. faecalis* の病原性因子の毒素 (toxin) としての働きをもつことはマウスを用いた動物実験により示されている。*E. faecalis* のフェロモン反応接合伝達性プラスミド pAD1 は、cytolysin (*cyl*), UV 耐性 (*uvr*) 遺伝子をもつ。pAD1 (*cyl*, *uvr*) の野生型 cytolysin 生産株は cytolysin 遺伝子欠損変異株より約 10 倍、動物 (マウス) に致死効果 (LD50) がある (表 2) (86, 119)。この発見は *E. faecalis* の外分泌蛋白の一つが動物に致死効果がある毒素 (toxin) 作用があることを示した最初の報告である。こ

の報告以後動物実験により cytolyisin 生産株が致死効果, 心内膜炎, 眼内炎等 (17, 19, 40, 52, 82, 96, 97, 158) をより効果的に発症し得ることが報告された。cytolyisin の毒素活性の機序については解っていない。*E. faecalis* の

cytolyisin が, 人の感染症において毒素として機能し得ることは疫学的な研究からも示唆されている (42, 81, 83, 84, 90, 165, 166)。病院臨床分離 *E. faecalis* は高頻度 (~60%) に cytolyisin を生産する。また入院患者の血液分離 *E. faecalis* 190 株のうち 68 株 (35.8%) が cytolyisin 生産株である等の報告がある。

(2) Cytolyisin の発現調節機構

pAD1 の cytolyisin 遺伝子の遺伝学的解析から L (lysin) 前駆体が A (activator) により細胞外で活性化され cytolyisin 活性を発現することが報告されていた (図 9) (87)。その後分子遺伝学的な cytolyisin 生産調節機構が解明されている (図 10) (14, 40, 41, 77)。cytolyisin 遺伝子は同一方向に転写される *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI* 遺伝子と *cylL_L* の上流に存在し逆方向に転写される *cylR₁*, *cylR₂* から構成されている。*cylL_L*, *cylL_S* は cytolyisin 前駆蛋白の構造遺伝子, *cylM*, *cylA* は, post translational modification 蛋白遺伝子, *cylB* は分泌蛋白遺伝子, *cylI* は, 自己の bacteriocin 活性の免疫機能蛋白である。*cylL_L*, *cylL_S* の産物は cytolyisin 前駆体のそれぞれ 68, 63 amino acids の *L_L*, *L_S*

図 7 Map of pAD1 based on reported papers and the complete nucleotide sequence. 文献 (59), Clewell, D.B. 2002. Plasmid 48: 193–201 より一部改変。

図 8 Map of pHTβ based on reported papers and the complete nucleotide sequence

図 9 Express of β-hemolysin by complementation of two types *E. faecalis* pAD1 (*cyl* (*hly*)) mutant. 文献 (87) より一部改変。

表 2 *E. faecalis* pAD1 (*cyl*+) 株及びその変異株のマウスに対する LD50 と致死時間

Strain ^a (菌数)	Phenotype (形質)	50% Lethal dose ^b (LD50)	Time to death (h) of mice after infection of 10 ⁹ cells (致死時間)
OG1RF1 (pAM710)	Hyperhemolytic	1.6 × 10 ⁸	1–2 ^c
OG1RF1 (pAM714)	Normal hemolytic	2.6 × 10 ⁸	4–5 ^c
OG1RF1 (pAM307)	Nonhemolytic	> 3.0 × 10 ⁹	— ^d
OG1RF1 (pAM211)	Nonhemolytic	> 3.0 × 10 ⁹	— ^d
OG1RF1	Nonhemolytic	> 3.0 × 10 ⁹	— ^d

^a Transposon (Tn917, or Tn916) insertion mutants of pAD1.

^b 50% lethal dose was derived from the data of Fig. 1 of reference 90.

^c All of the mice died within this time.

^d None of the mice died within 7 days of injection of 10⁹ cells. All of the mice died between 18 and 72 h after injection of 10¹⁰ cells.

文献 (90) より一部改変

図 10 Model for the expression of the cytolysin in *E. faecalis*. Garsin, D.A. et al. Pathogenesis and models of Enterococcal infection. Enterococci: 2014. U.S. National Institute of Health NCBI (The National Center for Biotechnology Information) より一部改変

で L_L , L_S は *cylM* の modification 蛋白 M により修飾され L_L^* , L_S^* となる。 L_L^* , L_S^* は *cylB* の分泌蛋白 B の signal peptidase 活性と ATP-binding cassette transporter 機能より細胞外に L_S' , L_L' として分泌される。 L_S' , L_L' は *cylA* の活性化蛋白 A により L_S'' , L_L'' の N 末端の 6 amino acids が除かれ、活性化 L_S'' , L_L'' となる。modification 蛋白 M, 活性化蛋白 A により translation 後に蛋白が修飾されることは lantibiotic bacteriocin の特徴である。 L_L'' は標的細胞 (赤血球) sensor 蛋白として標的に結合し、次に L_S'' が結合し cytolysin 機能を発揮する。*cylR1*, *cylR2* の R1, R2 は制御蛋白である。R2 蛋白は DNA 結合領域をもつ蛋白で *cylL1* promoter 領域の inverted repeat sequence に結合し *cylL1* から下流の *cyl* 構造遺伝子 (オペロン) の発現の制御蛋白である。*cyl* operon 発現時より約 1/40 まで発現が抑制される。

cytolysin 遺伝子の発現は two component regulatory system による quorum-sensing regulator により制御されている。 L_S'' が、膜蛋白 histidine protein kinase R1 蛋白に結合し、R1 が活性化 (リン酸化) され、次に R2 が活性化され cytolysin operon の発現を促進させる。target cell (赤血球菌) が存在しない時は L_L'' と L_S'' は不溶性の結合物を作り、 L_S'' の *cyl* operon 誘導機能を減弱させ、 L_L'' は L_S'' を希釈させる働きをする。target cell が存在する状態で L_L'' は赤血球に結合し free な L_L'' が減少する。そのため free な L_S'' が環境中に蓄積し L_S'' による *cyl* operon の自己誘導が促進される。

(3) *E. faecalis* の cytolysin 遺伝子の存在部位と染色体上の pathogenicity island

臨床分離 *E. faecalis* の多く (約 30~60%) は cytolysin 生産株である。97 株の *E. faecalis* 臨床分離菌の中で約 60% は cytolysin 生産株であった (90)。cytolysin 生産株の約 50% の cytolysin 遺伝子は pheromone 反応性接合伝達性プラスミド上に遺伝子が存在する。それらの接合伝達性プラ

スミドの約 90% はフェロモン cAD1 に反応する pAD1 型プラスミドである。調べられた cytolysin 生産株の約 50% は cytolysin 遺伝子が接合伝達されなかった。これらの cytolysin 遺伝子は非伝達性の plasmid 上又は染色体上に存在する。これらの株の中から *in vitro* で plasmid を除去した株を作製し cytolysin 遺伝子が染色体上にも存在することが解った (89)。vancomycin 耐性 *E. faecalis* MMH59 株の染色体上には 150 kbp の pathogenicity island (PAI) が存在する。PAI 内で相互に近傍に関連する cytolysin (*cyl*), enterococcal surface protein (*esp*) の他, aggregation substance, bile acid hydrolase 等の病原性関連遺伝子が存在する。*E. faecalis* の PAI 上の 5' 末端には *int*, *xis* 遺伝子が存在し, mobile genetic element として機能し得る。実際に PAI の領域が接合伝達により受容菌の plasmid に挿入 (integrate) されることが報告されている (133, 134)。

2) *E. faecalis* の人組織細胞定着因子 (adhesin)

E. faecalis の細胞表面にはいくつかの複数の定着因子が存在する。代表的なものとして aggregation substance (AS) (凝集物質), Enterococcal surface protein (Esp), および adhesin to collagen of *E. faecalis* (Ace) 等がある。

(1) AS は pheromone 反応性プラスミドを持つ *E. faecalis* が生産する。AS は 2 つの Arg-Gly-Asp (RGD) motif が存在する。RGD は動物細胞の fibronectin 分子内にも存在する。それぞれの物質の RGD を介して *E. faecalis* の AS と fibronectin が結合する可能性が推測されている (19, 42, 66, 67, 79-81, 91, 126)。

(2) Esp は 1,873 amino acids 蛋白で, グラム陽性菌の細胞表面に存在する他の類似の蛋白がもつ分泌のための signal sequence や cell wall anchor motif 等が含まれる特性をもっている。*esp* の検出率は血液分離菌の 41%, 心内膜炎分離菌の 42% で, 糞便常在菌は 3% である。Esp 菌は尿路

図 11 (A) Adherence of efficiently adhesive clinical isolate *E. faecalis* strain to T24 cell line. (B) Adherence inefficiently adhesive *E. faecalis* isolates to T24 cell. 文献 (140) より一部改変

図 12 Bacteriocin of Enterococcus clinical isolates

感染由来菌で高頻度に分離されること、動物実験で biofilm 形成に関与することが示されている (43, 120, 135, 136, 165, 166)。

(3) 人への細菌感染は人細胞又は細胞外マトリックス蛋白 (extracellular matrix protein, ECM) への定着 (adherence) から始まる。host cell への定着は細菌細胞表面の定着蛋白 (adhesin) を介して行われる。*E. faecalis* の尿路感染症分離菌、糞便由来菌それぞれ 30 株の T-24 cell line (人膀胱ガン由来細胞) への定着能を調べた実験で、尿路感染由来菌の中に、5 株の T-24 cell line への高頻度定着株が存在する (図 11(A))。糞便由来菌にはそのような株は存在しない (図 11(B))。これらの株は人膀胱粘膜にも高頻度に定着する (138)。これらの株は *in vitro* で細胞外マトリックス蛋白, collagen IV に効率に定着し, *ace* (adherence to

collagen of *E. faecalis*) 遺伝子を保持していた。トランスポゾン (Tn916) 挿入による染色体 *ace* 変異株はコラーゲンに対する定着能が欠損する (151)。

E. faecalis の *ace* の解析から推測される蛋白は, Ace は 674 amino acids で N 末端から 32 amino acids の signal sequence, 335 amino acids の collagen binding domain (A-domain), 90% 以上の相同性がある 47 amino acids の 4.5 個のくり返し構造の B-domain, cell wall domain (W-domain), 18-amino acids の細胞膜貫通部位の疎水性の M-domain, C-末端の cytoplasmic 部位の構造をしている。この構造は細菌の細胞膜表層蛋白に共通する構造である。Ace の A-domain, collagen binding domain の collagen 結合部位は *S. aureus* の collagen binding 蛋白 Cna の同部位と 58% の amino acids の相同性がある (98, 115–119, 151)。

3. 腸球菌の Bacteriocin

1) 概要と分類

bacteriocin (Bac, バクテリオシン) は細菌が生産し一般に近縁の細菌に抗菌活性をもつ外分泌蛋白である。細菌叢において Bac 生産菌は非生産菌に対して生存に優位であるため、細菌叢または感染病巣において定着因子として機能し得る。

腸球菌の bacteriocin は 1990 年中頃までは *E. faecalis* の cytolysin (cyl., または β -hly/bac) と環状蛋白の Bac21 (又は AS-48) の 2 種類が知られていた。1990 年代後半腸球菌 *E. faecalis* (156), と *E. faecium* (95) の臨床分離株の bacteriocin 生産菌の系統的な研究が行われ複数の bacteriocin が報告された。それらは *E. faecalis* の Bacteriocin 31 (156), Bacteriocin 41 (161), *E. faecium* の Bacteriocin 32 (95), Bacteriocin 43 (152), Bacteriocin 51 (163) 等である。これとは別に食品由来 (主として発酵食品) の *E. faecium* の Bacteriocin の系統的な研究が行われた。それらは enterocin L50A/L50B (22), enterocin Q (21), enterocin A (11), enterocin P (20), enterocin B (18, 62) 等である。以来多くの bacteriocin, 又は enterocin (腸球菌の bacteriocin は enterocin と呼ばれる) が、各種の腸球菌から分離されこれまでに約 40 種類の bacteriocin が報告されている (121)。それらのうち 15 種類は *E. faecalis*, 16 種類は *E. faecium* から分離されたものである。その他, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. durans* 等から分離されている。bacteriocin 生産菌の分離材料は、人臨床分離材料、発酵食品、動物、植物、人便等である。腸球菌の bacteriocin は乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) で発見されている各種 bacteriocin の分類に準じていくつかの分類基準で分類されている (48, 53, 61, 102, 121)。本稿では、熱安定性の抗菌性 peptides の bacteriocins を大きく Class I, Class II の 2 つに分類し必要に応じて subclass の分類を行った (表 3) (121)。表 3 には腸球菌の bacteriocin の中で、本稿で述べた bacteriocin を主として記載した。

Class I は bacteriocin, 又は “lantibiotics” と呼ばれる、この bacteriocin は ribosome で合成された peptides が、修飾され活性 bacteriocin となることと、peptides 分子の中に lanthionine と β -methyl lanthionine を含んでいることが特徴である。*E. faecalis* の cytolysin (14, 23, 24, 28, 40, 41, 46, 87) が最も代表的なものである (図 10 参照)。その他 *E. faecalis* の enterocin W (121) がある。

Class II bacteriocin は ribosome で合成された peptides が細胞外に分泌される時に leader peptide, 又は signal peptide が切断される以外は修飾されることはなく、熱安定性の bacteriocins である。腸球菌のほとんどの bacteriocin は Class II に属する。

Class II に属する bacteriocins は蛋白の構造又は bacteriocin 活性等において多様性のある bacteriocins である。

Class IIa には Class II の多くの bacteriocins が含ま

れる。腸球菌の Class IIa bacteriocins は、アミノ酸 43~47 個で、peptides の N 末端側に YGNGVXC (pediocin box) の共通のアミノ酸配列が存在する。pediocin box の意義は解っていないがアミノ酸置換により bacteriocin 活性が減少するとの報告がある (55, 121)。Class IIa bacteriocin は *Listeria monocytogenes* に強い抗菌活性を持つ特徴がある。

bacteriocin の細胞外への分泌機構に関しては Bac 前駆体に leader peptide が存在するもの、signal peptide が存在するもの、いずれも存在しないものがある。leader peptide は double glycine type の leader peptide で、double glycine 端で切断され、ABC transporter により分泌される。この型の bacteriocin 遺伝子 (operon) には ABC transporter 遺伝子が含まれている。signal peptide は疎水性の signal peptides の C 末端に signal peptide 切断のための signal peptidase 認識部位としての共通アミノ酸配列 V-X-A (V-E-A, V-D-A 等) が存在する。この型のバクテリオシンは、宿主細菌の分泌蛋白 (sec) により細胞外に分泌される。leader peptide 又は signal peptide いずれも存在しないバクテリオシンは bacteriocin 遺伝子 (operon) に含まれる細胞外分泌蛋白遺伝子により生産される ABC type 分泌機構の蛋白により細胞外に分泌される (121)。

signal peptide を含む宿主の分泌蛋白により分泌される bacteriocin 遺伝子 (operon) の最小の遺伝子構造は *bacA*, *bacB* で構成される。*bacA* は bacteriocin 構造遺伝子、*bacB* は自らの bacteriocin による殺菌作用に対する防御のための免疫機能蛋白である。*E. faecalis* の bacteriocin 31, *E. faecium* の bacteriocin 32, bacteriocin 43, bacteriocin 51 はこのような遺伝子構造をしている (図 13) (121)。

表 3 に示した各種 bacteriocins の中で Class II bacteriocins のいくつかについて解説する。

2) *E. faecalis* の bacteriocin 31

腸球菌の bacteriocin として知られていた cytolysin, Bac21 (又は AS-48) 以外の bacteriocins で最初に発見された bacteriocin は Bac31 (156) である。bac31 遺伝子は *E. faecalis* YI717 の pheromone 反応性接合伝達性プラスミド pYI17 (57.5 kbp) 上に存在する。Bac31 は、*E. hirae*, *E. faecium*, *L. monocytogene* に抗菌活性を持つ。bac31 は ORF1 (*bacA*), ORF2 (*bacB*), ORF3 より構成される operon である。*bacA* は 67 amino acid の bacteriocin 前駆蛋白の遺伝子で、前駆蛋白のうち N 末端より 24 amino acids は疎水性の典型的な signal peptide である。22~24 番目の 3 個の amino acids は signal peptidase 認識部位の V-E-A 配列をもつ。活性 bacteriocin は N 末端側に pediocin 型 bacteriocins が共通に持つ pediocin box YGNGVXC のアミノ酸配列を含んでいる。そして腸球菌以外の乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) で発見された sakacinA, sakacinP, sakacin674, pediocin 等の Class II bacteriocin と 35~37% のアミノ酸レベルの相同性をもつ (121)。

ORF2 (*bacB*) は 94 amino acid 蛋白で免疫機能をもつタンパク質の遺伝子である。ORF3 の機能は不明である (156)。

表3 Classification of Bacteriocin (Enterocin) of enterococci

Class I	Lantibiotics <i>E. faecalis</i> Cytolysin, <i>E. faecalis</i> Enterocin W
Class II a:	The pediocin-like and strong anti-Listerial enterocins <i>E. faecalis</i> Bacteriocin 31, <i>E. faecium</i> Bacteriocin 43
Class II b:	The two-peptide bacteriocins A two-peptide bacteriocin need to exert antimicrobial activity. <i>E. faecalis</i> Enterocin 1071A/B
Class II	Circular bacteriocin , <i>E. faecalis</i> Bacteriocin 21, Bacteriocin AS48
Class II	Leaderless bacteriocin Secretion by ABC transporters <i>E. faecium</i> Enterocin L50A/L50B, Enterocin Q
Other small heat stable bacteriocin. <i>E. faecium</i> Bacteriocin 32 and bacteriocin 51 are active against <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> and <i>E. durans</i> , but is not active against <i>L. monocytogenes</i> , and bacteriocidal and bacteriostatic, respectively. <i>E. faecium</i> Enterocin B	
Bacterolysins	enzymatic degradation of the cell wall of targeted bacteria <i>E. faecalis</i> Bacteriocin 41

図13 Expression of bacteriocin 41

3) *E. faecium* の bacteriocin 32, bacteriocin 43, bacteriocin 51

bacteriocin 32 (95), bacteriocin 43 (152), bacteriocin 51 (163) は臨床分離バンコマイシン耐性 *E. faecium* (VRE) から分離された bacteriocin である。

Bacteriocin 32, bacteriocin 43 は 1994 年～1999 年にミシガン大学医学部附属病院で分離された 636 株の VRE の bacteriocin 生産を調べ分離されたものである。bacteriocin 51 は日本の 1 つの病院で分離された 6 株の VRE から分離されたものである (95)。

・ **bacteriocin 32** : *E. faecium* VRE200 は gentamycin 耐性高頻度接合伝達性 plasmid pG200 (70 kb) (pMG1 type) と pTI1 (12.5 kbp) の 2 つの plasmids を保持している。

pTI1 は *bac32* をコードするバクテリオシンプラスミドで、pG200 により受容菌に可動化 (mobilization) される。

bacteriocin 32 は *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* に抗菌活性を持つが、*L. monocytogenes* に抗菌活性を示さないことが特徴である。*bac32* は *bacA*, *bacB* の 2 つの遺伝子で構成される。いずれの遺伝子も概報の bacteriocins 遺伝子とは相同性がない。*bacA* 蛋白は、89 amino acids の bacteriocin 32 の前駆蛋白で、N 末端側に 19 amino acids の signal sequence が存在する、活性バクテリオシンは 70 amino acids の蛋白である。*bacB* は signal sequence をもたない 55 amino acids 蛋白で免疫機能蛋白である。

・ **bacteriocin 43** : bacteriocin 43 は *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *L. monocytogenes* に bacteriocin 活性を持つ 21 株の VRE の中の代表株 *E. faecium* VRE82 から分離解析されたものである。*bac43* は、mobilizable plasmid pDT1 (6.2 kb) にコードされている。*bac43* は *bacA*, *bacB* で構成され *BacA* は 74 amino acids の bacteriocin 前駆蛋白

でN末端側に 30 amino acids の signal sequence をもつ。*bacB* は、signal sequence をもたない 95 amino acids 蛋白で免疫機能をもつ。

bacteriocin 43 は、*E. faecalis* YI717 より分離された bacteriocin 31 と 98% の相同性がある。bacteriocin 43 は、bacteriocin 31 と同様に活性化 bacteriocin のN末端側に YGATYYGNGL (pediocin box) のアミノ酸配列をもつ。そして bacteriocin 31 (43 amino acids) と、bacteriocin 43 (44 amino acids) のうち 6 個の amino acids が異なっている。この事がそれぞれの bacteriocin の抗菌活性の違いに影響していると推測されている。

・ **bacteriocin 51** : *bac51* は *E. faecium* VRE38 の mobilizable plasmid pHY (6.037 bp) にコードされている。*E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* に抗菌活性を持つ。

bac51 は *bacA*, *bacB* で構成され、BacA は bacteriocin 前駆体の 144 amino acids 蛋白で N 末端から 37~39 番目の amino acids に signal peptidase 認識部位の V-E-A を含む 39 amino acids の signal sequence が存在する。BacB は、signal sequence をもたない免疫機能蛋白である。BacA の 105 amino acids の活性化 bacteriocin 蛋白は標的細菌に静菌的作用をもつ。

4) Class IIa bacteriocin の作用機構と免疫機構

Class IIa bacteriocin の細菌の標的は細菌の細胞膜の主要な糖の透過機構である sugar phosphotransferase system (mannose-PTS) である (図 14) (100, 101, 121)。細菌細胞膜の mannose-PTS は中央部分の 2 分子の IIC 蛋白、IIC の外側の IID 蛋白で構成されている。Class IIa bacteriocin は IIC 蛋白の 40 amino acids の細胞外 loop (extracellular loop) に結合し 2C 蛋白の結合を開裂させ、pore (穴) を形成し、target の細菌が殺菌される。

bacteriocin の免疫蛋白の C 末端側の 1/2 の領域は bacteriocin 蛋白の C 末端側の 1/2 の領域を認識する機能をもつ。これにより免疫蛋白が直接的、間接的に bacteriocin 蛋白と

相互に作用し合うことを可能にする。免疫蛋白は mannose-PTS の IIC 蛋白と bacteriocin 生産菌の細胞内から結合物を作り、bacteriocin の活性を阻止する働きをもつ (図 14)。

5) Bacteriolysin *E. faecalis* bacteriocin 41

E. faecalis YI714 は pheromone 反応接合伝達性プラスミド pYI14 (61 kbp) を保持している。pYI14 は bacteriocin 41 (*bac41*) をコードしているプラスミドである (92, 121, 161)。

Bac41 は *E. faecalis* にのみ抗菌活性を持つ。*bac41* は pYI14 の 6.6 kbp 領域に存在する。この領域には ORF7 (*bacL₁*), ORF8 (*bacL₂*), ORF9, ORF10, ORF11 (*bacA*), ORF12 (*bacI*) の同方向に転写される 6 個の ORFs が存在する (図 13)。*bacL₁*, *bacL₂*, *bacA*, *bacI* はそれぞれにプロモーター領域が存在し、*E. faecalis* において Bac41 生産に必須の遺伝子である。*bacL₁* は lysin 生産遺伝子、BacL₂ は *bacL₁*, および *bacL₂* 転写促進機能、*bacA* は activation component A を生産する。*bacI* は自らの bacteriocin 活性に対する免疫機能をもつ。BacA と BacL₁ は細菌細胞外で相補的に bacteriocin 活性を発現する。BacL₁ は 595 amino acids の蛋白で N 末端から 21 amino acids は signal sequence である。amino acids 1-151 は *B. subtilis* bacteriophage B103 の lysozyme と、amino acids 160-309 は *S. agalactiae* prophage lambda Sal の lysin と、amino acids 318-595 の C 末端側は *L. plantarium* の muramidase の C 末端側とそれぞれ相同がある。C 末端側の 279 amino acids はほぼ同じ amino acids 配列の 3 つのくり返し構造をしている。この領域は細胞膜の choline 結合領域と考えられている。BacL₂ は 211 amino acids 蛋白で signal sequence は存在しなく、報告されている他の蛋白質との相同性はない。BacA は 726 amino acids 蛋白で signal sequence を持ち、N 末端側から 19-21 番目に V-S-G の signal peptidase 作用部位が存在する。*B. subtilis* の ybyG 遺伝子の lysin activator と相同性がある。BacA の 81-140 amino acids は peptidoglycan binding domain 構造をしていることから細菌表面に直接作用する

図 14 Model of target recognition, mode of killing, and immunity of Class IIa bacteriocins. 文献 (121) より一部改変

と考えられる。BacL₁ は標的細胞の受容体に結合し BacA により活性化されると考えられている。

Bac41 は *E. faecalis* にのみ抗菌活性がある。このことは Bac41 が *E. faecalis* の cell wall の glycan に高度の特異性があることを示している。cell wall を分解する bacteriocin としては *E. faecalis* LMG2333 から分離された bacteriolysin がある (122)。

6) Circular bacteriocin (Bac21, AS-48)

bacteriocin 21 (64, 157) は *E. faecalis* のフェロモン反応性 plasmid pPD1 (59 kbp) にコードされている。bac21 は pPD1 の 8.5 kbp の領域に存在し同一方向に転写される。bacA から bacI の 9 個の ORFs で構成されるオペロンである。bac21 オペロンの N 末端から bacA, B, C, D, E は bacteriocin 発現に必須の遺伝子である。bacF, G, H, I の欠損変異株は bacteriocin 発現が減少することから、bacteriocin の発現に必要な遺伝子である。bacA は 105 amino acids 蛋白の bacteriocin 21 の構造遺伝子である。bacH は ATP binding 分泌蛋白と考えられている。

Bacteriocin 21 は生化学的に解析されている環状 bacteriocin AS-48 (38, 70, 71, 76, 112, 113, 131, 157) と 100% 相同性がある。

AS-48 (112, 113, 131) は、*E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド pMB2 (58 kbp) にコードされているバクテリオシンで bacteriocin 前駆蛋白は 105 amino acids 蛋白で N 末端から 35 amino acids は分泌のための signal sequence で活性化 bacteriocin は 70 amino acids 蛋白で環状蛋白を形成する。環状蛋白 70 amino acids の N 末端の methionine (M⁺) と C 末端の tryptophan の間で peptide 結合 (a peptide head to tail linkage) を行う。bacteriocin 21 は遺伝学的に、AS-48 は生化学的にそれぞれ独立に研究解析されていた、研究の進展に伴って 2 つの bacteriocin がお互い 100% の相同性があり同一の bacteriocin であることが解った。

環状の Bac21 又は AS-48 が 70 amino acids の環状蛋白を形成するために signal peptidase および N 末端と C 末端 head-to-tail linkage のためのいくつかの蛋白が必要とされる。Bac21 にコードされている、BacB から BacI の蛋白は、活性 bacteriocin 形成、bacteriocin の分泌、bacteriocin 活性に対する免疫機能蛋白等の機能をもつことが考えられる。このなかで BacF から BacI 蛋白は Bac21 の分泌、免疫機能に関連する遺伝子と推測される。

7) Bacteriocin 遺伝子と plasmid

腸球菌に bacteriocin 生産菌が多く存在する原因として、bacteriocin 遺伝子が伝達性 plasmid 上に存在することが推測される。

腸球菌の液体培中での接合伝達性 plasmid には pheromone 反応性 plasmid (23, 24, 28, 50) と pheromone 非反応性 plasmid (pMG1 型) (94, 163) が存在する。前者は *E. faecalis* の plasmid でその宿主域は比較的狭い。後者は *E. faecium* で最初に発見されたプラスミドで *E. faecium* の他、*E. faecalis*, *E. hirae* 等各種腸球菌に伝達する比較的

広い宿主域をもつ plasmid である。その他 pIP501 plasmid に代表される固型培地上での接合伝達性 plasmid (28), pheromone 反応性プラスミドや pMG1 型プラスミドによる可動化 (mobilizable) plasmid が存在する (28, 95)。

E. faecalis で発見された bacteriocin の cytolysin (pAD1, 60 kbp), AS-48 (pMB2, 58 kbp), bacteriocin 21 (pPD1, 59 kbp), bacteriocin 31 (pYI17, 57.5 kbp), bacteriocin 41 (pYI14, 61 kbp), enterocin EJ97 (pEJ97, 60 kbp) 等の遺伝子は pheromone 反応性プラスミド上に存在する (121)。

E. faecalis BFE1071 で発見された Enterocin 1071 A/B は pEF1071 (50 kbp) は固型培地上で接合伝達する (121)。

bacteriocin 32, bacteriocin RC71-4, bacteriocin 43, bacteriocin 51 は *E. faecium* で発見された pMG1 型接合伝達性 plasmid の接合伝達機能により可動化 (mobilize) する (95, 121)。

8) Bacteriocin の細菌生態学的意義

bacteriocin 生産菌は広範囲で多様な環境の腸球菌から分離される。発酵食品からは、腸球菌の中で一般的に *E. faecium* が分離されるが、*E. faecalis* も分離されることがある。食品から分離される腸球菌は人、動物の腸管の共生細菌としての腸球菌が起源である可能性が高い。腸球菌は人腸管の LAB の中で、優位に存在する菌であり (生活様式でも異なるが腸球菌は乳幼児では 10⁸ 個/gram 便で、加齢と共に減少するとされている)、その中の多くは bacteriocin 生産菌である (121, 150)。

(1) 臨床分離菌から主として分離される bacteriocin

bacteriocin 32 は、*E. faecium* VRE, 636 株の中で 280 株 (44%), 臨床分離 *E. faecium* VSE の 50%, 健常者 *E. faecium* の 2% が生産し、臨床分離 *E. faecium* が優位に生産する (94, 95)。

bacteriocin 41 は、*E. faecalis* 臨床分離菌の 50~70% が生産する。cytolysin は腸球菌が生産する唯一の毒素 (toxin) である (19, 40, 50, 73, 74, 75, 77, 81, 86, 87, 90, 91, 98, 134)。cytolysin は *E. faecalis* 臨床分離菌の 50~60% が生産するが、健常者の *E. faecalis* の生産菌は 17% である (91)。

bacteriocin 32 は *E. faecium* の臨床分離菌、bacteriocin 41, cytolysin は *E. faecalis* の臨床分離菌の多くが生産する bacteriocin である。

(2) 発酵食品、健常人腸管常在菌から分離される bacteriocin

Enterocin A, Enterocin B は発酵食品の *E. faecium* から分離されるが健康な赤ん坊の便の共生細菌としての *E. faecium* から分離される。Avicin A は *E. avium* から分離された bacteriocin である。この bacteriocin は地理的に離れた Norway と、Ethiopia の健常な乳児の糞便からそれぞれ分離された *E. avium* XA83 と *E. avium* 208 から分離された bacteriocin で、その遺伝子はそれぞれの菌の染色体上に存在する。この情報は、この bacteriocin 生産菌が人腸管細菌生態系環境において生存と定着を促進することに優位となり得ることを示している (12)。

(3) 各種環境腸球菌から分離される bacteriocin

同一の型の bacteriocin が各種の環境から分離されることがある。一つの例は、*E. faecalis* の臨床分離菌から分離された bacteriocin 31 又は bacteriocin 31 型である。この型の bacteriocin である Bac31, BacRC 714, Bac43, Bac T8 は人臨床分離菌、人糞便腸球菌から分離される。Ent SE-L4 と Hiracin JM79 は、それぞれタイの grass silage と Wild Mallard duck から分離されている。他の例は、enterocin L50A/L50B 型 bacteriocin で、この型に属する bacteriocin は enterocin 7A/7B, enterocin MR 10A/10B, enterocin 62-6A/6B, enterocin RJ-10 が含まれる。これらの bacteriocins は各種の環境から分離された腸球菌から発見されている (121)。

このようにある種の bacteriocin が臨床分離菌又は発酵食品等から特異的に分離されることが、また同一の型の bacteriocin を各種の環境から分離される腸球菌が生産することは、bacteriocin が特異的な環境で生息する腸球菌の増殖を促進するためのものではなく、それぞれの環境で bacteriocin 生産菌がより優位に生存することを可能にしていると考えられる。また、同一の型の bacteriocin が異なる環境の腸球菌から分離されることが、その型の bacteriocin 生産菌の起源が同一であると考えられる。

bacteriocin 生産菌の生物学的意義については、bacteriocin 生産菌が細菌の生態系において生存するために非生産菌に対してより有利となり得ると考えられる。この推論は腸管の限局した環境において、bacteriocin 生産腸球菌が高頻度に分離されることが示唆される (121)。

4. 腸球菌の薬剤耐性と感染症

人感染症をおこす臨床的に最も重要な腸球菌は *E. faecalis* と *E. faecium* である。これらの菌の薬剤耐性には自然耐性 (intrinsic resistance)、獲得耐性 (acquired resistance) および tolerance がある。β-ラクタム剤に対しては *E. faecium* は自然耐性である。*E. faecalis* は ampicillin に対しては比較的感受性であるが cephem 系に対しては自然耐性である。PBPs (特に Pbp5) の変異によりさらに親和性が低下し cephem 系、penicillin 系に高度耐性となる。アミノグリコシド (aminoglycosides) に対して自然耐性で、獲得耐性により高度耐性となる。ストレプトグラミン系抗菌剤の quinupristin-dalfopristin (Q/D) には *E. faecalis* は自然耐性で *E. faecium* は獲得耐性となる。その他 erythromycin, tetracycline, rifampicin, fluoroquinolone, chloramphenicol 等臨床使用されるほぼすべての抗菌薬に対して獲得耐性となる。β-ラクタム薬耐性グラム陽性菌に対する重要な治療薬である vancomycin に対する高度耐性菌 (vancomycin resistant enterococci, VRE) は世界的には *E. faecium* で多く分離され、*E. faecalis* では比較的少ない (2, 104)。

1) グリコペプチド (glycopeptide) (バンコマイシン, vancomycin) 耐性

(1) 疫学 (2, 68, 69, 108, 114, 164)

1980 年代に *E. faecium* の高度ペニシリン耐性菌が報告

され増加してきた。β-ラクタム薬耐性グラム陽性菌に対する治療薬としてはバンコマイシンが使用可能なため、ペニシリン耐性 *E. faecium* にはほとんど人々は感心を示さなかった。その後、1988 年 EU (フランス, イギリス) において人感染症から VRE が報告され、同時期米国においても VRE が報告された。当初 EU と米国における VRE はその起原が異なり形質も異なっていた。EU においては家畜農場において家畜の成長促進の目的でグリコペプチドのアポパルシンが長期間使用され家畜の腸管で VRE が選択的に増加し、食肉等を介して健常者の腸管に侵入しそれらのバンコマイシン耐性が人々の腸球菌に伝播し、健常者の腸管の糞便中で VRE が高頻度に分離された。これらの VRE は人との共生細菌 (常在菌) としての腸球菌が起源となっているため病院内で院内感染の原因になることは多くはなかった。米国においては家畜に avoparcin の使用歴はなく、健常者において現在も VRE が検出されることはほとんどない。しかしながら入院患者の *Clostridium difficile* 腸炎の治療薬として内服 vancomycin が使用された結果病院内入院患者の腸管で VRE が選択的に増加しそれらが院内感染として広まったとされている。米国の VRE は元来、健常者の腸管常在菌の病原性の低い腸球菌ではなく病院感染原因菌としての *E. faecium* が起原となっているため入院患者の易感染者に対して院内感染原因菌として拡散し医療上大きな問題となった。

米国においてはバンコマイシン耐性 *E. faecium* の中で病院内の抗菌薬が使用される医療環境に高度に適応し進化した特定遺伝系統 *E. faecium* CC17 (clonal complex 17) が病院内感染原因菌として広がっている (104, 108, 164, 171)。*E. faecium* CC17 は健常者、家畜、入院患者感染症 (院内感染でない感染症) 等から分離される VRE と異なる菌 (*E. faecium* CC17 はこれらとは異なる遺伝系統に属する) である。*E. faecium* CC17 は vancomycin, β-lactam 薬 (cephem 系, penicillin 系) 高度耐性、フルオロキノロン耐性、病原性関連遺伝子 (*esp. enterococcus surface protein* (biofilm 形成に関連)), *hyl* (hyaluronidase), collagen 結合蛋白, および多数の IS16 等を保持している。

E. faecalis の臨床分離菌には複数の遺伝系統の株が存在するとされている (105, 114)。米国, 日本, 英国, デンマーク等の約 100 年前から現在までの臨床分離菌 106 株の調査では、106 株中 61 株の clonal complex (CCs) は、CC2 (15 株), CC8 (11 株), CC9 (12 株), CC21 (9 株), CC40 (14 株) に属していた。これら clonal complex に属する株の多くは多剤耐性で *cyl* (β-*hly/bac*) が存在する pathogenicity island を保持していた (44)。

(2) 耐性機構 (8-10, 32, 36, 44, 45, 47, 65, 78, 93, 94, 110, 123, 125, 145-147, 160, 162, 163, 171, 174, 175)

glycopeptide の標的は peptidoglycan 前駆体の pentapeptide の -D-Ala4-D-Ala5 末端に結合し、細胞壁合成阻害を行う。glycopeptide 耐性は -D-Ala4-D-Ala5 末端が -D-Ala4-D-Lac5

又は -D-Ala4-D-Ser5 に修飾され glycopeptide の親和性が低下することによる。glycopeptide の -D-Ala4-D-Lac5, および -D-Ala4-D-Ser5 に対する親和性は -D-Ala4-D-Ala5 に対する親和性よりそれぞれ~1000 倍及び~7 倍低下する。前者は比較的高度耐性を賦与し、後者は低感受性又は低度耐性を賦与する。腸球菌の glycopeptide 耐性遺伝子群 (オペロン) はそれらの ligase 遺伝子名によって現在までに 9 種類 (VanA, B, C, D, E, G, L, M, N) 報告されている。これらの glycopeptide 耐性遺伝子は (i) 調節遺伝子, (ii) D-Lac 又は D-Ser で修飾された peptidoglycan 前駆体生産のための構造遺伝子, (iii) 正常の細菌細胞が作る UDP-tripeptide-D-Ala4-D-Ala5 を UDP-tripeptide-D-Ala4 と D-Ala5 に分解する carboxypeptidase から構成される。

調節遺伝子は, *vanS/vanR* の two component regulatory system で膜蛋白 VanS (sensor/kinase) は glycopeptide により誘導 (又は感知) され, histidine 基のリン酸化により (autophosphorylation) 活性化され, 次にリン酸基が VanR (調節蛋白) の aspartate に伝達 (VanR のリン酸化) され VanR が活性化される。活性化された VanR は, 構造遺伝子及び調節遺伝子 (*vanS/vanR*) の promoter 領域に結合し, それぞれの遺伝子の転写が亢進する。

現在までに分離されている vancomycin 耐性遺伝子群の中で VanA, VanB, VanD, VanM 型は D-Ala4, D-Lac5 ligase を生産し, 他は D-Ala4, D-Ser5 ligase を生産する。臨床的に最も多く分離される型は VanA 型で次に VanB 型である。VanA 型, VanB 型は *E. faecium*, *E. faecalis* から分離される。VanA 型は高度 vancomycin (64~1000 µg/ml), teicoplanin (16~512 µg/ml) 耐性を賦与する。VanA 型耐性遺伝子は *vanRSvanHAXvanYZ* で構成されている。*vanRS* は調節遺伝子, *vanH* は pyruvate から D-lactate を生産する脱水素酵素 (dehydrogenase) である。*vanA* は D-Ala, D-Lac ligase, *vanX* は D-Ala-D-Ala を D-Ala+D-Ala に切断する dipeptidase である。*vanY* は carboxypeptidase で *vanZ* の機能は未解明である。

VanB 型は vancomycin に比較的高度耐性 (4~1000 µg/ml), teicoplanin 感受性である。これは VanB 型の *vanS/vanR* の VanS が teicoplanin を感知しないことによる。VanB 型遺伝子は *vanRSvanYWHBX* で構成される。*vanW* は VanA 型の *vanZ* に相当する。*vanB* は ligase 蛋白遺伝子である。vancomycin 耐性遺伝子は VanC 型以外は plasmid 上又は染色体上に存在する。VanA 型遺伝子は Tn3 型 (Tn1 型) トランスポゾン Tn1546 (10.8 kbp) 型上に存在する。VanB 型遺伝子は接合伝達性トランスポゾン Tn916 型の Tn1549 (34 kbp) 又は Tn5382 (27 kbp) 上に存在する。これらの転移遺伝子が存在するプラスミドは非伝達性プラスミド, mobilizable (可動性) プラスミド, *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド, pMG1 型高頻度接合伝達性プラスミド等である。

VanC 型は D-Ala, D-Ser ligase を産生する遺伝子で vancomycin 低感受性 (2~32 µg/ml), teicoplanin 感受性

(1 µg/ml) である。*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens* 等の染色体上の遺伝子で内在性 (intrinsic) 耐性遺伝子である。

我が国における vancomycin 耐性腸球菌 (VRE) の分離頻度は比較的少ない。日本の VRE の特徴はタイからの輸入鶏肉の VRE の耐性遺伝子の特性をもつことである。それらは *E. faecalis* (*vanA*) VRE でバンコマイシン高度耐性, テイコプラニン低感受性 (低度耐性) で sensor 遺伝子 *vanS* の sensor 部位の 3 ヶ所に変異が存在する。これにより teicoplanin を感知しないため VanA 型で VanB 型の形質を示す。この型の VRE は日本の家畜環境からは分離されていない。タイや台湾等の家畜や臨床分離株から分離されておりその起源はこれらの国の家禽で選択された VRE である。この型の VRE は日本の臨床分離株 (*E. faecalis*) からも分離され VRE が輸入鶏肉を介して, 人に伝播したことが推測される。また日本では *E. faecalis* の VRE や, VanB 型 VRE が比較的多く分離されること, *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドや *E. faecium* の pMG1 型 plasmid 上の VanA 型, VanB 型 VRE が分離されることである。

2) β-lactam 薬耐性 (7, 56, 57, 68, 69, 109, 127-130, 132, 141, 172, 176)

E. faecalis, *E. faecium* は β-lactam 薬に自然耐性である。耐性値に関しては両菌は cephalosporin (oxymino-aminothiazolyl 7-acyl side chain をもつ, III, IV 世代 cephalosporin) に対して 1,000 µg/ml 以上の高度耐性となる。ampicillin に対する MIC の分布は *E. faecalis* は狭く, 4 µg/ml までの範囲が一般的で比較的感受性である。*E. faecium* は 2 ケタ以上の高度耐性となる。グラム陽性菌の腸球菌, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* 等の β-lactam 薬耐性はそれぞれ遺伝学的には異なるが細胞壁合成酵素 PBPs (penicillin binding proteins) により決定される。腸球菌の *E. faecalis*, *E. faecium* には質量の大きい 6 種類の主な PBPs が存在する。これらの PBPs はその機能により 2 つに分類される。Class A PBPs, PonA (85.4, 86.6), PbpF (79.5, 79.9), PbpZ (88.5, 86.7), Class B PBPs, Pbp5 (74.0, 73.7), PbpB (81.7, 81.0), PbpA (77.9, 78.9) カッコ内の数値は質量 kDa で前者は *E. faecalis*, 後者は *E. faecium* のそれである。Class A PBPs は C-末端側の transpeptidase 活性領域と, N 末端側の glycosyltransferase 活性領域の両機能をもつ蛋白で, Class B は transpeptidase の活性をもつ蛋白である。Pbp5 は transpeptidase 活性をもつ。これらの PBPs は β-lactam 薬との親和性が低い。通常 β-lactam 薬は PBPs に結合し transpeptidase 活性を阻害する。高濃度 β-lactam 薬存在下で, Class A PBPs は transpeptidase 活性は阻害されるが glycosyltransferase 活性は阻害されない。Pbp5 は β-lactam 薬に高度に親和性が低くその transpeptidase 活性は阻害されない。Class A PBPs の (PonA, PbpF, PbpZ) のうち少なくとも PonA 又は PbpF の glycosyltransferase 活性と Pbp5 の transpeptidase 活性が協調的に機能し, peptidoglycan 生産と耐性発現を行う。

全 Class A PBPs 欠損株は薬剤非存在下で生育可能である。この解釈として、glycosyltransferase 活性をもつ未解明の酵素が存在することが推測されている。

E. faecium において ceftriaxone, ampicillin MIC がそれぞれ >2000 µg/ml, 16 µg/ml なのが Pbp5 欠損株では 5 µg/ml, 1 µg/ml と低下する。PonA, PbpF, または PbpZ のそれぞれの欠損株では親株と同じ MIC で変化はない。しかしながら PonA と PbpF 両欠損株では MIC は ceftriaxone 4 µg/ml, ampicillin 16 µg/ml と ceftriaxone の MIC が低下するが ampicillin MIC は親株と同じである。Pbp5 は III 世代 cephalosporin の ceftriaxone に親和性が非常に低くこの薬の存在下で transpeptidase 活性を発現する。Pbp5 の突然変異株、及び生産増加株は β-lactam 薬に高度耐性となる。

3) aminoglycoside 耐性 (2, 104, 111, 139)

aminoglycoside は細菌の 30S ribosome の 16S rRNA に結合し細菌の蛋白合成を阻害する。*E. faecalis*, *E. faecium* は aminoglycoside に自然耐性 (streptomycin, kanamycin の MIC 4~256 µg/ml, gentamycin の MIC 8~64 µg/ml) である。これは、薬剤の細胞壁の通過障壁と、細胞膜の取り込みの低さによる。aminoglycoside と細胞壁合成阻害剤の penicillin や vancomycin と同時に腸球菌を培養することにより aminoglycoside の細胞内への取り込みが上昇するとの報告がある。これはこれらの薬剤が細胞壁を破壊することにより aminoglycoside の細胞壁の通過がよくなることによると考えられている。aminoglycoside の細胞膜による取り込みには電子伝達系によるエネルギーが必要とされている。乳酸発酵菌の腸球菌には酸素を利用する電子伝達系は存在しないそのため薬剤の膜による取り込みが低い。

腸球菌は獲得耐性で aminoglycoside 高度耐性となる。主な耐性機構は aminoglycoside の修飾による不活化である。修飾酵素は phosphotransferases (APHs), acetyltransferases (AACs), および nucleotidyltransferase (ANTs) がある。これらの酵素を生産する腸球菌は aminoglycoside 耐性が 2000 µg/ml 以上になる。臨床分離菌で最も多く分離される修飾不活化酵素は AAC(6')-APH(2'') の 2 つの機能 (a bifunctional enzyme) をもつ酵素で高度 gentamycin 耐性 (MIC ≥ 2000 µg/ml) 腸球菌の 90% 以上が生産する。

4) マクロライド (macrolide) 耐性 (2, 36, 104, 143, 153)

Macrolide は 50S ribosome の 23S ribosomal RNA に結合し蛋白合成阻害を行う。Macrolide 耐性機構には, *erm* (erythromycin ribosome methylation) による 23S ribosomal RNA のメチル化により (薬剤標的修飾) macrolide の 23S ribosome への結合が減少することによるものと, macrolide の細胞外への排出ポンプ (*mef* (macrolide efflux gene)) によるものがある。前者の耐性遺伝子には *ermA*, *B*, *C*, *D*・・・*Z* の subclass が存在するが腸球菌で最も多く分離されるものは *ermB* 遺伝子によるものである。この耐性は MLSB 耐性 (macrolides-licosamide streptogramin B 耐性) とも呼ばれる。これは *ermB* による耐性が同時に

3 薬剤に耐性になることによる。*E. faecalis* の *ermB* (MLSB) 遺伝子は腸球菌の Tn3 (TnI) 型トランスポゾン Tn917 (5.4 kbp) 上に存在することが一般的である。

5) Tetracycline 耐性 (29-32, 36, 60, 72)

tetracycline は細菌の ribosome の 30S に結合し aminoacyl-t RNA の ribosome への結合を阻害し蛋白合成阻害を行う。腸球菌の主な耐性機構は 2 種類ある。一つは tetracycline の細胞質からの排出、他の一つは耐性遺伝子による蛋白が tetracycline の 30S ribosome の結合部位の近傍に結合し ribosome の構造変化により tetracycline が ribosome 結合できなくなることによる。

排出ポンプによる耐性遺伝子は *tetK* 又は *tetL* である。いずれも 14 個の膜貫通領域をもつ高分子蛋白である。ribosome 結合による耐性遺伝子は *tetM*, *tetO*, *tetS* 等がある。これらは tetracycline と minocycline の両薬剤耐性を賦与する。この中で腸球菌で最も多く分離される耐性遺伝子は *tetM* である。*tetM* は腸球菌の接合伝達性トランスポゾン (conjugative transposon) Tn916 (18 kbp) (型) に存在することが一般的でこのトランスポゾンは腸球菌 plasmid 上又は chromosome 上に存在する。腸球菌感染症の治療には tetracycline 系は使用しないが臨床分離腸球菌の約 60% は tetracycline 耐性である。

6) 腸球菌感染症 (13, 103, 104, 108)

腸球菌感染症のほとんどは患者自身の腸内細菌の腸球菌が原因と考えられていた。しかしながら 1980~1990 年代の腸球菌感染症に関連する研究報告から、病院内における病原性腸球菌の患者から患者への感染伝播の主要な原因は医療従事者の手により伝播することが解った。医療従事者の手は腸球菌の一時的な運搬の役割をになっている。清潔な手に接種又は付着した腸球菌は 24 時間、また無機質な医療器具等に付着した腸球菌は 4 ヶ月間の長期間生存することができる。腸球菌は人の手や医療器具、環境等への定着能が高く、大腸菌よりもすぐれた手の衛生状態の指標菌とされている。多剤耐性 vancomycin 耐性腸球菌は院内感染により重度易感染者の腸管に伝播し、数ヶ月、数年間定着する。これは重度易感染者は各種抗菌剤使用により、腸管の正常細菌叢が異常状態になり腸管正常細菌叢による colonization resistance が保たれなくなっていることによる。

腸球菌感染症は、高齢者、糖尿病、悪性腫瘍、心疾患、移植、手術後患者等の基礎疾患をもつ重度の易感染者で発症する。重症感染症は、菌血症、心内膜炎である。米国において菌血症原因菌で 2 番目に多い細菌である。腸球菌による菌血症は心内膜炎が存在することが特徴である。死亡率は 26~46% とされており、*E. faecium* による菌血症は死亡率が高い。腸球菌による菌血症では、*S. aureus* による菌血症と異なり、血行性に伝播し他の臓器に転移性の膿瘍を形成することはない。*E. faecium* の臨床分離菌の 50% 以上は高度 vancomycin, ampicillin, aminoglycoside 耐性でその他マクロライド耐性を保持している。感染症原因の多く

は医療器具関連感染症で、中心静脈カテーテル、尿管カテーテル、気管装着器具等である。

おわりに

腸球菌の分子遺伝学的研究が始まり約 40 年が経過し、現在の研究の発展に至っている。その創生期から現在の研究の発展には米国 The University of Michigan の Dr. Don B. Clewell の功績が非常に大きい。1970 年代後半腸球菌 (*E. faecalis*) の分子遺伝学的研究を行っていたのは世界中でおそらく Clewell の研究室のみであった。当時、pheromone 反応性接合伝達性プラスミド、および Tn917, Tn916 等分子遺伝学的研究の tool にもなり得る発見をし、研究を進展させてきた。さらに腸球菌の解析のために分子遺伝学的研究方法を開発し、現在の腸球菌研究の発展に多大な貢献をしてきた。この間、小生を含め、Harvard 大学 Dr. Mike Gilmore, University of Minnesota, Dr. Gary Dunne, The University of Texas, Dr. Barbara Marry, 等々現在国際的に活躍している多くの研究者が Clewell の Lab. で学んできた。

世界の腸球菌研究者が集まり研究の発展と腸球菌の研究成果を発表、討議し、研究者の共同体を作るため、第一回国際 ASM 腸球菌会議が 2000 年 2 月 27 日～3 月 2 日カナダのバンフで開催された。この時の内容は、“The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance” の総説本として 2002 年に ASM 出版から出版された。その後新しい科学技術の導入による急速な研究の発展により蓄積された腸球菌の知識の全体的な概観を再評価することが重要となってきた。そのため世界中の腸球菌の指導的研究者が協力し科学的に詳細に吟味され寄稿された総説本が出版された。それは、“腸球菌：共生細菌から、薬剤耐性感染症最主要原因菌まで” (“*The Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*”)。そしてこの科学誌は、U.S. National Institute of Health NCBI (The National Center for Biotechnology Information) Bookshelf から、無料で世界的規模で流布するために公開本 (open access) として出版された (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>)。

この記載の一部は総説本 “Enterococci” の Dr. Mike Gilmore の preface を引用した。

謝 辞

これまで多くの先生方の御指導と御支援をいただき、また同僚の支援をいただいたことに深く感謝致します。群馬大学医学部 三橋進先生、橋本一先生、大阪大学 松原謙一先生、東京大学 吉川昌之介先生、信州大学 寺脇良郎先生、同年代の研究仲間として長年変らぬ友情と励まし、支援をいただいた東京大学 笹川千尋先生、千葉大学 山本友子先生、九州大学 林哲也先生、薬剤耐性研究での名古屋大学 荒川宜親先生、群馬大学細菌学教室の同僚である富田治芳、藤本修平、谷本弘一、井上貴子、Elizabeth Kamei、野村隆浩、小澤良之、麻興華、浅野義哉、山下均、

左京志保美、若松恵利、大久保利恵子、高木秀歌、岩崎亮子、大澤明美、中国、韓国、台湾、タイの先生方、Bo Zheng (Peking Univ.), Young Ho Park (Seoul Nat. Univ. Seoul, Korea), Suk-Kyung Lim (NVRQS, Seoul, Korea), Jang-Jih Lu (China Med. Univ. Taiwan), Sasitorn Kanarat (Dep. Livestock Dev. Thailand), 腸球菌の研究において多大な支援をいただいた The University of Michigan, Dr. Don B. Clewell, Dr. Y. Yagi; Harvard University, Dr. M.S. Gilmore; Brown University, Dr. L.B. Rice; Norwegian University, Dr. Ingolf F. Nes.

発表内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業などは無い。

文 献

- 1) Abajy, M.Y., Kopeć, J., Schiwon, K., Burzynski, M., Döring, M., Bohn, C., Grohmann, E. (2007): A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **189**, 2487–2496.
- 2) Agudelo Higueta, N.I., Huycke, M.M. (2014): Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds), *The Enterococci, from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. 2014. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health.
- 3) Alvarez-Martinez, C.E., Christie, P.J. (2009): Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 775–808.
- 4) An, F.Y., Clewell, D.B. (1994): Characterization of the determinant (traB) encoding sex pheromone shutdown by the hemolysin/bacteriocin plasmid pAD1 in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **31**, 215–221.
- 5) An, F.Y., Clewell, D.B. (2002): Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **184**, 1880–1887.
- 6) An, F.Y., Sluvaik, M.C., Clewell, D.B. (1999): Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J. Bacteriol.* **181**, 5915–5921.
- 7) Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J.E., Josseume, N., Dubost, L., Brouard, J.P., Gutmann, L., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M. (2004): Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **186**, 1221–1228.
- 8) Arthur, M., Courvalin, P. (1993): Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1563–1571.
- 9) Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F., Courvalin, P. (1993): Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**, 117–127.
- 10) Arthur, M., Quintiliani, R. Jr. (2001): Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 375–381.
- 11) Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F. (1996): Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ.*

- Microbiol. **62**, 1676–1682.
- 12) Birri, D.J., Brede, D.A., Forberg, T., Holo, H., Nes, I.F. (2010): Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. Appl. Environ. Microbiol. **76**, 483–492.
 - 13) Boehm, A.B., Sassoubre, L.M. (2014): Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds), The Enterococci, from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. 2014. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health.
 - 14) Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.G., Siezen, R.J., Hatter, K.L., Gilmore, M.S. (1996): Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. Mol. Microbiol. **21**, 1175–1184.
 - 15) Brock, T.D., Davie, J.M. (1963): Probable Identity of a Group D Hemolysin with a Bacteriocine. J. Bacteriol. **86**, 708–712.
 - 16) Brock, T.D., Peacher, B., Pierson, D. (1963): Survey of the Bacteriocines of Enterococci. J. Bacteriol. **86**, 702–707.
 - 17) Callegan, M.C., Booth, M.C., Jett, B.D., Gilmore, M.S. (1999): Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. Infect. Immun. **67**, 3348–3356.
 - 18) Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H. (1997): Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology **143**, 2287–2294.
 - 19) Chow, J.W., Thal, L.A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B., Zervos, M.J. (1993): Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 2474–2477.
 - 20) Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. (2000): Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. **182**, 6806–6814.
 - 21) Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S. (1998): Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. **180**, 1988–1994.
 - 22) Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F. (1997): Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 4321–4330.
 - 23) Clewell, D.B. (1981): Plasmid, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. Microbiol. Rev. **45**, 409–436.
 - 24) Clewell, D.B. (1993): Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. Cell **73**, 9–12.
 - 25) Clewell, D.B. (2007): Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. Plasmid **58**, 205–227.
 - 26) Clewell, D.B., An, F.Y., Flannagan, S.E., Antiporta, M., Dunny, G.M. (2000): Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. Mol. Microbiol. **35**, 246–247.
 - 27) Clewell, D.B., An, F.Y., Mori, M., Ike, Y., Suzuki, A. (1987): *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAD1) response: evidence that the peptide inhibitor excreted by pAD1-containing cells may be plasmid determined. Plasmid **17**, 65–68.
 - 28) Clewell, D.B., Dunny, G.M. (2002): Conjugation and genetic exchange in Enterococci. p. 265–300. In Gilmore, M., Clewell, D., Courvalin, P., Dunny, G., Murray, B., Rice, L. (eds), The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. Washington D.C., ASM Press.
 - 29) Clewell, D.B., Flannagan, S.E., Ike, Y., Jones, J.M., Gawron-Burke, C. (1988): Sequence analysis of termini of conjugative transposon Tn 916. J. Bacteriol. **170**, 3046–3052.
 - 30) Clewell, D.B., Flannagan, S.E., Jaworski, D.D. (1995): Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. Trends Microbiol. **3**, 229–236.
 - 31) Clewell, D.B., Flannagan, S.E., Zitzow, L.O., Su, Y.A., He, P., Senghas, E., Weaver, K.E. (1991): Properties of conjugative transposon Tn916. p. 39–44. In Dunny, G.M., Cleary, P.P., McKay, L.L. (eds), Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci, Washington, D.C., American Society for Microbiology.
 - 32) Clewell, D.B., Gawron-Burke, C. (1986): Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. Annu. Rev. Microbiol. **40**, 635–659.
 - 33) Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1969): Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **62**, 1159–1166.
 - 34) Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1970): Existence of the colicinogenic factor-sex factor ColIb-P9 as a supercoiled circular DNA-protein relaxation complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. **41**, 150–156.
 - 35) Clewell, D.B., Pontius, L.T., An, F.Y., Ike, Y., Suzuki, A., Nakayama, J. (1990): Nucleotide sequence of the sex pheromone inhibitor (iAD1) determinant of *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAD1. Plasmid **24**, 156–161.
 - 36) Clewell, D.B., Weaver, K.E., Dunny, G.M., Coque, T.M., Francia, M.V., Hayes, F. (2014): Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds), The Enterococci, from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. 2014. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health.
 - 37) Clewell, D.B., Yagi, Y., Ike, Y., Craig, R.A., Brown, B.L., An, F. (1982): Sex pheromones in *Streptococcus faecalis*. Multiple pheromone systems in strain DS5, similarities of pAD1 and pAMgamma1, and mutants of pAD1 altered in conjugative properties. p. 97–100. In Schlessinger, D. (ed), Microbiology, Washington, D.C., American Society for Microbiology.
 - 38) Cobos, E.S., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdívía, E., Martínez, J.C., Mateo, P.L. (2001): AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. FEBS Lett. **505**, 379–382.
 - 39) Coburn, P.S., Baghdadyan, A.S., Dolan, G.T., Shankar, N. (2007): Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. Mol. Microbiol. **63**, 530–544.
 - 40) Coburn, P.S., Gilmore, M.S. (2003): The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. Cell. Microbiol. **5**, 661–669.
 - 41) Coburn, P.S., Pillar, C.M., Jett, B.D., Haas, W., Gilmore, M.S. (2004): *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. Science **306**, 2270–2272.
 - 42) Coque, T.M., Patterson, J.E., Steckelberg, J.M., Murray, B.E. (1995): Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation

- substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* **171**, 1223–1229.
- 43) Coque, T.M., Willems, R., Cantón, R., Del Campo, R., Baquero, F. (2002): High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 1035–1038.
 - 44) Courvalin, P. (2005): Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 479–486.
 - 45) Courvalin, P. (2006): Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* **42**, S25–S34.
 - 46) Cox, C.R., Coburn, P.S., Gilmore, M.S. (2005): Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 77–84.
 - 47) Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. (2007): Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 79–114.
 - 48) Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H. (2006): The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 564–582.
 - 49) Dunny, G.M. (2007): The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **362**, 1185–1193.
 - 50) Dunny, G.M., Brown, B.L., Clewell, D.B. (1978): Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3479–3483.
 - 51) Dunny, G.M., Craig, R.A., Carron, R.L., Clewell, D.B. (1979): Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid* **2**, 454–465.
 - 52) Dupont, H., Montravers, P., Mohler, J., Carbon, C. (1998): Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect. Immun.* **66**, 2570–2575.
 - 53) Eijsink, V.G., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (2002): Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 639–654.
 - 54) Erickson, M.J., Meyer, R.J. (1993): The origin of greater-than-unit-length plasmids generated during bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.* **7**, 289–298.
 - 55) Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J. (2000): A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* **182**, 2643–2648.
 - 56) Fontana, R., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lopez, H., Sucari, A., Satta, G. (1994): Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1980–1983.
 - 57) Fontana, R., Grossato, A., Rossi, L., Cheng, Y.R., Satta, G. (1985): Transition from resistance to hypersusceptibility to beta-lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 678–683.
 - 58) Francia, M.V., Clewell, D.B. (2002): Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 nic site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Mol. Microbiol.* **45**, 375–395.
 - 59) Francia, M.V., Haas, W., Wirth, R., Samberger, E., Muscholl-Silberhorn, A., Gilmore, M.S., Ike, Y., Weaver, K.E., An, F.Y., Clewell, D.B. (2001): Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. *Plasmid* **46**, 117–127.
 - 60) Franke, A.E., Clewell, D.B. (1981): Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J. Bacteriol.* **145**, 494–502.
 - 61) Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. (2011): Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 125–140.
 - 62) Franz, C.M., Worobo, R.W., Quadri, L.E., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Verderas, J.C., Stiles, M.E. (1999): Atypical Genetic Locus Associated with Constitutive Production of Enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2170–2178.
 - 63) Fujimoto, S., Clewell, D.B. (1998): Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6430–6435.
 - 64) Fujimoto, S., Tomita, H., Wakamatsu, E., Tanimoto, K., Ike, Y. (1995): Physical mapping of the conjugative bacteriocin plasmid pPDI of *Enterococcus faecalis* and identification of the determinant related to the pheromone response. *J. Bacteriol.* **177**, 5574–5581.
 - 65) Fujita, N., Yoshimura, M., Komori, T., Tanimoto, K., Ike, Y. (1998): First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2150.
 - 66) Galli, D., Friesenegger, A., Wirth, R. (1992): Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. *Mol. Microbiol.* **6**, 1297–1308.
 - 67) Galli, D., Lottspeich, F., Wirth, R. (1990): Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol. Microbiol.* **4**, 895–904.
 - 68) Galloway-Peña, J., Roh, J.H., Latorre, M., Qin, X., Murray, B.E. (2012): Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One* **7**, e30187.
 - 69) Galloway-Peña, J.R., Rice, L.B., Murray, B.E. (2011): Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3272–3277.
 - 70) Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M., Valdivia, E. (1989): Purification and amino acid composition of peptide antibiotic, A.S.-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 437–441.
 - 71) Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. (1991): Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**, 886–892.
 - 72) Gawron-Burke, C., Clewell, D.B. (1982): A transposon in *Streptococcus faecalis* with fertility properties. *Nature* **300**, 281–284.
 - 73) Gilmore, M.S. (1991): Enterococcal faecalis hemolysin/bacteriocin. p. 206–213. In Dunny, G.M., Cleary, R.P., McKay, L.L. (eds), *Genetics and Molecular Biology of Streptococci*,

- Lactococci and Enterococci, Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- 74) Gilmore, M.S., Coburn, P.S., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E. (2002): Enterococcal Virulence, p. 301–354. In Gilmore, M., Clewell, D., Courvalin, P., Dunne, G., Murray, B., Rice, L. (eds), The Enterococci, Washington, D.C., ASM Press.
 - 75) Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B. (1994): Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176**, 7335–7344.
 - 76) González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Rico, M. (2000): Bacteriocin, A.S.-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11221–11226.
 - 77) Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S. (2002): Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytotoxin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* **415**, 84–87.
 - 78) Hashimoto, Y., Tanimoto, K., Ozawa, Y., Murata, T., Ike, Y. (2000): Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS. Microbiol. Lett.* **185**, 247–254.
 - 79) Hendrickx, A.P., Willems, R.J., Bonten, M.J., van Schaik, W. (2009): LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* **17**, 423–430.
 - 80) Hirt, H., Schlievert, P.M., Dunne, G.M. (2002): In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. *Infect. Immun.* **70**, 716–723.
 - 81) Huycke, M.M., Gilmore, M.S. (1995): Frequency of aggregation substance and cytotoxin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* **34**, 152–156.
 - 82) Huycke, M.M., Joyce, W.A., Gilmore, M.S. (1995): *Enterococcus faecalis* cytotoxin without effect on the intestinal growth of susceptible enterococci in mice. *J. Infect. Dis.* **172**, 273–276.
 - 83) Huycke, M.M., Sahn, D.F., Gilmore, M.S. (1998): Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 239–249.
 - 84) Huycke, M.M., Spiegel, C.A., Gilmore, M.S. (1991): Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1626–1634.
 - 85) Ike, Y., Clewell, D.B. (1984): Genetic analysis of the pAD1 pheromone response in *Streptococcus faecalis*, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. *J. Bacteriol.* **158**, 777–783.
 - 86) Ike, Y., Clewell, D.B. (1992): Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bacteriol.* **174**, 8172–8177.
 - 87) Ike, Y., Clewell, D.B., Segarra, R.A., Gilmore, M.S. (1990): Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* **172**, 155–163.
 - 88) Ike, Y., Craig, R.A., White, B.A., Yagi, Y., Clewell, D.B. (1983): Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 5369–5373.
 - 89) Ike, Y., Flannagan, S.E., Clewell, D.B. (1992): Hyperhemolytic phenomena associated with insertions of Tn916 into the hemolysin determinant of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1. *J. Bacteriol.* **174**, 1801–1809.
 - 90) Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D.B. (1984): Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect. Immun.* **45**, 528–530.
 - 91) Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D.B. (1987): High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1524–1528.
 - 92) Ike, Y., Inoue, T., Yamashita, H., Tomita, H. (2010): Abstract S6:1. 3rd International ASM Conference on Enterococci. p. 19. Portland, American Society for Microbiology.
 - 93) Ike, Y., Tanimoto, K., Ozawa, Y., Nomura, T., Fujimoto, S., Tomita, H. (1999): Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet* **353**, 1854.
 - 94) Ike, Y., Tanimoto, K., Tomita, H., Takeuchi, K., Fujimoto, S. (1998): Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gm^r) (65.1 kilobases) to *Enterococcus* strains during broth mating. *J. Bacteriol.* **180**, 4886–4892.
 - 95) Inoue, T., Tomita, H., Ike, Y. (2006): Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1202–1212.
 - 96) Jett, B.D., Atkuri, R.V., Gilmore, M.S. (1998): *Enterococcus faecalis* localization in experimental endophthalmitis: role of plasmid-encoded aggregation substance. *Infect. Immun.* **66**, 843–848.
 - 97) Jett, B.D., Jensen, H.G., Atkuri, R.V., Gilmore, M.S. (1995): Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 9–15.
 - 98) Jett, B.D., Jensen, H.G., Nordquist, R.E., Gilmore, M.S. (1992): Contribution of the pAD1-encoded cytotoxin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* **60**, 2445–2452.
 - 99) Johnson, C.M., Haemig, H.H., Chatterjee, A., Wei-Shou, H., Weaver, K.E., Dunne, G.M. (2011): RNA-mediated reciprocal regulation between two bacterial operons is RNase III dependent. *MBio* **2**, e00189–e00111.
 - 100) Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. (2011): Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3335–3342.
 - 101) Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. (2010): An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* **192**, 5906–5913.
 - 102) Klaenhammer, T.R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–85.
 - 103) Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G. (2006): How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.* **6**, 130.
 - 104) Kristich, C.J., Rice, L.B., Arias, C.A. (2014): Enterococcal infection—Treatment and antibiotic resistance. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds), The Enterococci, from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. 2014. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health.
 - 105) Kuch, A., Willems, R.J., Werner, G., Coque, T.M., Hammerum, A.M., Sundsfjord, A., Klare, I., Ruiz-Garbajosa, P., Simonsen, G.S., van Luit-Asbroek, M., Hryniewicz, W., Sadowy, E. (2012): Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 551–558.
 - 106) Kurenbach, B., Kopeć, J., Mägdefrau, M., Andreas, K., Keller, W.,

- Bohn, C., Abajy, M.Y., Grohmann, E. (2006): The TraA relaxase autoregulates the putative type, I.V. secretion-like system encoded by the broad-host-range *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501. *Microbiology* **152**, 637–645.
- 107) Lanka, E., Wilkins, B.M. (1995): DNA processing reductions in bacterial conjugation. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 141–169.
- 108) Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. (2014): *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds), *The Enterococci, from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. 2014. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health.
- 109) Ligozzi, M., Pittaluga, F., Fontana, R. (1996): Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 354–357.
- 110) Lim, S.K., Tanimoto, K., Tomita, H., Ike, Y. (2006): Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6544–6553.
- 111) Ma, X., Kudo, M., Takahashi, A., Tanimoto, K., Ike, Y. (1998): Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2460–2464.
- 112) Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. (1990): A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **172**, 2817–2818.
- 113) Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., Valdivia, E. (1994): Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **176**, 6334–6339.
- 114) McBride, S.M., Fischetti, V.A., Leblanc, D.J., Moellering, R.C. Jr, Gilmore, M.S. (2007): Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* **7**, 1–22.
- 115) Nallapareddy, S.R., Murray, B.E. (2008): Role played by serum, a biological cue, in the adherence of *Enterococcus faecalis* to extracellular matrix proteins, collagen, fibrinogen, and fibronectin. *J. Infect. Dis.* **197**, 1728–1736.
- 116) Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Höök, M., Murray, B.E. (2000): *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type, I.V. and laminin as well as collagen type, I. *Infect. Immun.* **68**, 5218–5224.
- 117) Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Duh, R.W., Weinstock, G.M., Murray, B.E. (2000): Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. *Infect. Immun.* **68**, 5210–5217.
- 118) Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Murray, B.E. (2008): Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **76**, 4120–4128.
- 119) Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Okhuysen, P.C., Murray, B.E. (2008): A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect. Immun.* **76**, 4110–4119.
- 120) Nallapareddy, S.R., Weinstock, G.M., Murray, B.E. (2003): Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the, M.S.CRAMP family. *Mol. Microbiol.* **47**, 1733–1747.
- 121) Nes, I.F., Diep, D.B., Ike, Y. (2014): Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to Niche Control. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds), *The Enterococci, from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. 2014. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health.
- 122) Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H. (2003): Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2975–2984.
- 123) Nomura, T., Tanimoto, K., Shibayama, K., Arakawa, Y., Fujimoto, S., Ike, Y., Tomita, H. (2012): Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 6389–6392.
- 124) Ozawa, Y., Tanimoto, K., Fujimoto, S., Tomita, H., Ike, Y. (1997): Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (uvr) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.* **179**, 7468–7475.
- 125) Ozawa, Y., Tanimoto, K., Nomura, T., Yoshinaga, M., Arakawa, Y., Ike, Y. (2002): Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6457–6461.
- 126) Raad, I.I., Hanna, H.A., Boktour, M., Chaiban, G., Hachem, R.Y., Dvorak, T., Lewis, R., Murray, B.E. (2005): Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, esp gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5046–5050.
- 127) Rice, L.B. (2005): Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J. Infect. Dis.* **24**, 804–814.
- 128) Rice, L.B., Carias, L.L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M., Josseume, N., Dubost, L., Marie, A., Arthur, M. (2009): Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* **191**, 3649–3656.
- 129) Rice, L.B., Carias, L.L., Rudin, S., Lakticová, V., Wood, A., Hutton-Thomas, R. (2005): *Enterococcus faecium* low-affinity pbp5 is a transferable determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5007–5012.
- 130) Rybkine, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E., Gutmann, L. (1998): Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J. Infect. Dis.* **178**, 159–163.
- 131) Samyn, B., Martinez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J., Van Beeumen, J. (1994): The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**, 87–90.
- 132) Scheffers, D.J., Pinho, M.G. (2005): Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 585–607.
- 133) Schlievert, P.M., Chuang-Smith, O.N., Peterson, M.L., Cook, L.C., Dunne, G.M. (2010): *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PLoS One* **5**, e13194.
- 134) Shankar, N., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S. (2002): Modification of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**, 746–750.
- 135) Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W., Gilmore, M. (2004): Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 609–618.

- 136) Shankar, N., Lockatell, C.V., Baghdayan, A.S., Drachenberg, C., Gilmore, M.S., Johnson, D.E. (2001): Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **69**, 4366–4372.
- 137) Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S. (1999): Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* **67**, 193–200.
- 138) Sherwood, N.P., Russell, B.E., Jay, A.R., Bowman, K. (1949): New antibiotic substances produced by beta hemolytic streptococci. *J. Infect. Dis.* **84**, 88–91.
- 139) Shiojima, M., Tomita, H., Tanimoto, K., Fujimoto, S., Ike, Y. (1997): High-level plasmid-mediated gentamicin resistance and pheromone response of plasmids present in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**, 702–705.
- 140) Shiono, A., Ike, Y. (1999): Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells and inhibition of adhesion by fibronectin and trypsin treatment. *Infect. Immun.* **67**, 1585–1592.
- 141) Sifaoui, F., Arthur, M., Rice, L., Gutmann, L. (2001): Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2594–2597.
- 142) Stark, J.M. (1960): Antibiotic activity of haemolytic enterococci. *Lancet* **1**, 733–734.
- 143) Takeuchi, K., Tomita, H., Fujimoto, S., Kudo, M., Kuwano, H., Ike, Y. (2005): Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 347–354.
- 144) Tanimoto, K., An, F.Y., Clewell, D.B. (1993): Characterization of the traC determinant of the *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmid pAD1: binding of sex pheromone. *J. Bacteriol.* **175**, 5260–5264.
- 145) Tanimoto, K., Ike, Y. (2002): Analysis of the conjugal transfer system of the pheromone-independent highly transferable *Enterococcus* plasmid pMG1: identification of a tra gene (traA) up-regulated during conjugation. *J. Bacteriol.* **184**, 5800–5804.
- 146) Tanimoto, K., Ike, Y. (2008): Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly conjugative *Enterococcus faecium* plasmid pMG1: identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**, 186–195.
- 147) Tanimoto, K., Nomura, T., Maruyama, H., Tomita, H., Shibata, N., Arakawa, Y., Ike, Y. (2006): First VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**, 3966–3967.
- 148) Tanimoto, K., Ozawa, Y., Tomita, H., Fujimoto, S., Ike, Y. (1995): Cloning and characterization of the uvr (ultraviolet resistance) gene on conjugative plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis*. *Dev. Biol. Stand.* **85**, 83–87.
- 149) Tanimoto, K., Tomita, H., Ike, Y. (1996): The traA gene of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pPD1 encodes a negative regulator for the pheromone response. *Plasmid* **36**, 55–61.
- 150) Tannock, G.W., Cook, G. (2002): Enterococci as members of the Intestinal Microflora of Humans. p. 101–132. In Gilmore, M., Clewell, D., Courvalin, P., Dunne, G., Murray, B., Rice, L. (eds), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, Washington, D.C., ASM Press.
- 151) Todd, E.W. (1934): A comparative serological study of streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal haemolysin, tetanolysin and staphylococcus toxin. *J. Pathol. Bacteriol.* **39**, 299–321.
- 152) Todokoro, D., Tomita, H., Inoue, T., Ike, Y. (2006): Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6955–6964.
- 153) Tomich, P.K., An, F.Y., Clewell, D.B. (1980): Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **141**, 1366–1374.
- 154) Tomich, P.K., An, F.Y., Damle, S.P., Clewell, D.B. (1979): Plasmid-related transmissibility and multiple drug resistance in *Streptococcus faecalis* subsp. zymogenes strain DS16. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 828–830.
- 155) Tomita, H., Clewell, D.B. (2000): A pAD1-encoded small RNA molecule, mD, negatively regulates *Enterococcus faecalis* pheromone response by enhancing transcription termination. *J. Bacteriol.* **182**, 1062–1073.
- 156) Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y. (1996): Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* **178**, 3585–3593.
- 157) Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y. (1997): Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* **179**, 7843–7855.
- 158) Tomita, H., Ike, Y. (2004): Tissue-specific adherent *Enterococcus faecalis* strains that show highly efficient adhesion to human bladder carcinoma T24 cells also adhere to extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* **72**, 5877–5885.
- 159) Tomita, H., Ike, Y. (2005): Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance *Enterococcus* conjugative plasmid pHTbeta: identification of oriT and a putative relaxase gene. *J. Bacteriol.* **187**, 7727–7737.
- 160) Tomita, H., Ike, Y. (2008): Genetic analysis of the *Enterococcus* vancomycin resistance conjugative plasmid pHTβ: identification of the region involved in cell aggregation and traB, a key regulator gene for plasmid transfer and cell aggregation. *J. Bacteriol.* **190**, 7739–7753.
- 161) Tomita, H., Kamei, E., Ike, Y. (2008): Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI14: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (Lysin and activator). *J. Bacteriol.* **190**, 2075–2085.
- 162) Tomita, H., Pierson, C., Lim, S.K., Clewell, D.B., Ike, Y. (2002): Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3326–3333.
- 163) Tomita, H., Tanimoto, K., Hayakawa, S., Morinaga, K., Ezaki, K., Oshima, H., Ike, Y. (2003): Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* **185**, 7024–7028.
- 164) Top, J., Willems, R., van der Velden, S., Asbroek, M., Bonten, M. (2008): Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 214–219.
- 165) Van Tyne, D., Martin, M.J., Gilmore, M.S. (2013): Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins* **5**, 895–911.
- 166) Vergis, E.N., Shankar, N., Chow, J.W., Hayden, M.K., Snyderman, D.R., Zervos, M.J., Linden, P.K., Wagener, M.M., Muder, R.R. (2002): Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to

- Enterococcus faecalis*. Clin. Infect. Dis. **35**, 570–575.
- 167) Wang, A., Macrina, F.L. (1995): Streptococcal plasmid pIP501 has a functional oriT site. J. Bacteriol. **177**, 4199–4206.
 - 168) Weaver, K.E., Clewell, D.B. (1990): Regulation of the pAD1 sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: effects of host strain and traA, traB, and C region mutants on expression of an E region pheromone-inducible lacZ fusion. J. Bacteriol. **172**, 2633–2641.
 - 169) Weaver, K.E., Jensen, K.D., Colwell, A., Sriram, S.I. (1996): Functional analysis of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded stability determinant par. Mol. Microbiol. **20**, 53–63.
 - 170) Weaver, K.E., Rice, L.B., Churchward, G. (2002): Plasmids and Transposons. p. 219–263. In Gilmore, M., Clewell, D., Courvalin, P., Dunne, G., Murray, B., Rice, L. (eds), The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance, Washington, D.C., ASM Press.
 - 171) Willems, R.J., Top J, van Santen, M., Robinson, D.A., Coque, T.M., Baquero, F., Grundmann, H., Bonten, M.J. (2005): Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg. Infect. Dis. **11**, 821–828.
 - 172) Williamson R, le Bouguénec, C., Gutmann, L., Horaud, T. (1985): One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. J. Gen. Microbiol. **131**, 1933–1940.
 - 173) Yamashita, H., Tomita, H., Inoue, T., Ike, Y. (2011): Genetic Organization and Mode of Action of a Novel Bacteriocin, Bacteriocin 51: Determinant of VanA-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **55**, 4352–4360.
 - 174) Zheng, B., Tomita, H., Inoue, T., Ike, Y. (2009): Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, Encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac). Antimicrob. Agents. Chemother. **53**, 735–747.
 - 175) Zheng, B., Tomita, H., Xiao, Y.H., Wang, S., Li, Y., Ike, Y. (2007): Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from mainland China. J. Clin. Microbiol. **45**, 2813–2818.
 - 176) Zorzi, W., Zhou, X.Y., Dardenne, O., Lamotte, J., Raze, D., Pierre, J., Gutmann, L., Coyette, J. (1996): Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. J. Bacteriol. **178**, 4948–4957.
 - 177) MacCallum, W.G., Hastings, T.W. (1899): A Case of acute endocarditis caused by micrococcus zymogenes (Nov. Spec.), with a description of the Microorganism. J. Exp. Med. **4**, 521–534.

Pathogenicity of Enterococci

Yasuyoshi IKE^{1,2}

¹Professor Emeritus, Gunma University Graduate School of Medicine

²Representative Director, Association for Education in Bacterial Drug Resistance

Enterococci belong to the group of lactic acid bacteria (LAB), and inhabit the gastrointestinal tracts of a wide variety of animals from insects and to human, and the commensal organism in humans and animals. The commensal/probiotic role of enterococci has evolved through thousands of years in mutual coexistence. Enterococcus have many favorable traits that have been appreciated in food fermentation and preservation, and many serve as probiotics to promote health. While lactobacillus have been shown to confer numerous benefits on and often regarded as health bringing organisms, enterococci have become more recognized as emerging human pathogens in recent years. Mac Callum and Hastings characterized an organism, now known to be *Enterococcus faecalis*, which was isolated from a lethal case of endocarditis on 1899. The report was the first detailed description of its pathogenic capabilities. Over the past few decades, multi-drug resistance enterococci have become as important health-care associated pathogen, and leading causes of drug resistance infection. The modern life style including the broad use of antibiotics in medical practice and animal husbandry have selected for the convergence of potential virulence factors to the specific enterococcus species such as *E. faecium* and *E. faecalis*. The development of modern medical care of intensive and invasive medical therapies and treatments for human disease, and existence of severe compromised patients in hospitals has contributed to the increased prevalence of these opportunistic organisms. The virulence factors converged in *E. faecalis* and *E. faecium* which have been isolated in nosocomial infections, include antibiotic resistance, extracellular proteins (toxins), extrachromosome and mobile genetic elements, cell wall components, biofilm formation, adherence factors, and colonization factor such as bacteriocin, etc. In these potential virulence factors, I presented characteristics of enterococcal conjugative plasmid, cytolysin, collagen binding protein of adhesion, bacteriocins, and drug resistances. I made reference to our original reports, and review books for this review. The review books are “Enterococci: from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection, NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institute of Health. Ed. by Michael S Gilmore, Don B Clewell, Yasuyoshi Ike, and Nathan Shankar”, and “The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance, Gilmore M., Clewell D., Courvadin P, Dunne G., Murray B., Rice L., (ed) 2002. ASM Press”.