細菌におけるキノロン耐性メカニズム

吉 田 博 明

大日本製薬(株) 創薬第二研究所
〒564 大阪府吹田市江の木町33-94

〔受理: 1996年5月20日〕

キノロン系抗菌剤の作用に対し、細菌は菌体内のキノロン濃度を低下させる変異と標的分子の変異によって耐性を獲得する。大腸菌では菌体内キノロン濃度低下のメカニズムとして、ポーリントンパク質の減少による菌体内への薬剤透過性低下、ならびに菌体外への薬剤排出亢進の両者が関与することが判明している。緑膿菌の場合も、薬剤の排出亢進が関わっている。グラム陽性菌においては、内膜に存在する排出タンパク質の増加により、キノロンの排出が亢進される。細菌はこのようなして標的分子に作用する菌体内キノロン量を減少させるとともに、標的分子である DNA ジャイレースならびに DNA トポイソメラーゼ IV の変異を起こし、キノロン親和性を低下させる。両酵素はアミノ酸相同性が高く、変異の位置と種類も類似しており、変異によるキノロン耐性獲得のメカニズムは同様であると推測される。しかし、両酵素の薬剤感受性は菌種によって異なり、感受性の高い酵素が一次標的になり、低い酵素は二次標的になる。これらの変異が重複すると菌はキノロン高度耐性を獲得すると考えられる。

1. はじめに

キノロン系抗菌剤は、ナリジクス酸の合成を端緒に改良が重ねられ、現在では、グラム陽性・陰性いずれの細菌に対しても強い効果を示す広範囲抗菌スペクトルのニューキノロンが主流となっている。ニューキノロンの中には、通常の細菌感染症のみならず、クラミジア感染症やマイコプラズマ肺炎に著効を示す薬剤も登場している。ニューキノロンは、組織移行性が良好で、投与経路はほとんどが経口であるが、静脈内投与とほぼ同等の効果を示す場合も報告されている。これらのキノロン系抗菌剤の作用点は、遺伝学的・生化学的研

究により、II 型トポイソメラーゼ (DNA ジャイレースならびに DNA トポイソメラーゼ IV) であることが明らかになっている。細菌のキノロン耐性メカニズムには、これら標的酵素の変化のほか、薬剤の膜透過性低下や汲み出し亢進が知られている。ここでは細菌がどのようにしてキノロン耐性を獲得するかについて現在までの知見をまとめてみたい。

2. キノロンの菌体内への透過性低下と菌体外への排出によるキノロン耐性

グラム陰性菌では外膜の透過性低下によるキノロン耐性が以前から指摘されてきたが、細菌はこのほかにキノロンの菌体外への排出を亢進させることにより、菌体内のキノロン濃度の低下を図っていることが最近明らかになってきた。これらの変異については、大腸菌、緑膿菌および黄色ブド

Hiroaki YOSHIDA
Mechanisms of Bacterial Resistance to Quinolones
Discovery Research Laboratories II, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Enoki 33-94, Suita-Osaka 564

ウ球菌などで比較的良好に研究されている。

1) 大腸菌

表1に種々の透過性低下ならびに排出亢進によるキノロン耐性変異株をまとめた。ナリジクス酸で選択して得られた *nalB* 変異株 (34) は、ナリジクス酸の膜透過性が低下していることが報告された株である (7)。*nalB* 変異株はニューキノロンには感受性である。ニューキノロンのノルフロキサシンで選択して得られた *norB* 変異株は、ポーリンを形成する OmpF (主要外膜タンパク質) の減少が認められ、ノルフロキサシンの菌体内取り込み量が低下している (40)。このほか、*cfxB*, *nfxC*, *nfxB* 変異の場合も OmpF が減少している (44~46)。*ompF* 遺伝子破壊株がキノロンに低度耐性化することも示されており (12), OmpF の欠失または減少によって、外膜のポーリンを経由して菌体内に取り込まれるキノロン量が低下し、キノロン耐性が惹起されると考えられている。また、キノロンとは骨格の異なるテトラサイクリンまたはクロラムフェニコールで選択した *marA* 変異株は多剤耐性を示し、キノロンにも耐性であることが見出され (13), この株においても OmpF の減少が観察されている。*mar* オペロンの解析 (11) により、*marR* (リプレッサータンパク質をコードする領域) の機能喪失あるいは *marO* 部位 (*MarR* の結合するオペレーター部位) の変異によって *mar* オペロンの転写

が活性化され、*MarA* が OmpF mRNA と相補的なアンチセンス RNA をコードする *micF* 遺伝子を活性化し、OmpF タンパク質を減少させる方向に働くと解釈されている (14, 24, 70)。

OmpF の減少は *soxQ1* 変異株 (28) および *soxR* 変異株 (29) でも観察されている。これらは、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) やヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) を産生する薬物に耐性を示す株として見出されたものであるが、同時にキノロン耐性も示す。*soxQ1* 変異は *marA* 変異と考えられたが (28), *soxR* 変異は酸素ストレス応答に関係したオペロン *soxRS* の変異であった (29)。また、多剤耐性を示す *marC* 変異は *soxR* 変異であることが判明した (71)。*soxR* 変異により SoxS タンパク質が大量に発現して *micF* 遺伝子の転写を活性化した結果、OmpF が減少すると考えられる (10, 29)。実際に、SoxS タンパク質の発現によりキノロンを含む多剤耐性が惹起されることが確かめられている (71)。

興味深いことに、*mar* 変異と同様に染色体地図上34分に変異が見られた *cfxB* 変異株において *marR* の欠失が判明した (3)。*cfxB* 変異株では OmpF の減少とともにキノロンの菌体外への排出が報告されている (45)。*MarA* の過剰生産株は多剤耐性を示すが (24), この場合も、OmpF の減少に加えて、未知の排出系が機能していることが示唆されている。*MarA* (127アミノ酸残基)

表1. 大腸菌における透過性低下ならびに排出亢進によるキノロン耐性変異株

菌株	変異遺伝子	染色体上の位置 (分)	最小発育阻止濃度 MIC ($\mu g/ml$)					文献
			ナリジクス酸	ノルフロキサシン	エノキサシン	シプロフロキサシン	スバルフロキサシン	
KL16	野生型	—	3.13	0.05	0.1	0.013	0.013	120
KL164	<i>nalB</i>	58	25	0.05	—	0.013	—	34
KFA13	<i>norB</i>	34	12.5	0.2	—	0.1	0.025	40
KF700	<i>cfxB</i>	34	—	—	—	0.08	—	45
KF131t	<i>nfxC</i>	34	—	0.32	—	—	—	44
AG100-Tc2.5-1	<i>marA</i>	34	8.3	0.75	—	0.14	—	13
KF131	<i>nfxB</i>	19	16	0.32	—	—	—	46
JF703	<i>ompF</i>	21	8	0.16	—	—	—	46
KEA16	<i>norC</i>	8	0.78	0.2	—	0.05	0.013	40
B66	<i>soxR</i>	92	—	—	0.45	—	—	71
AB1157-81	<i>nalD</i>	89	24	—	—	—	—	49

図1. 大腸菌の多剤耐性化における *marRAB* オペロンと *soxRS* オペロンの関与

抗菌剤の存在,あるいは *marRAB* オペロンの変異により MarA タンパク質が発現し, *micF* 遺伝子の転写活性化により, porin タンパク質 OmpF が減少して透過性が低下する。同時に, MarA はほかの遺伝子の転写活性化に関与して薬剤排出ポンプの亢進も惹起する。一方, 酸素ストレスに対して活性化された *soxRS* オペロンは, SoxS タンパク質の発現を促し, 各種遺伝子の転写活性化を引き起こすとともに, *marRAB* オペロンにも働きかけて MarA タンパク質の発現を亢進させる。文献 (3, 14, 24, 71) を参照に作図。

と SoxS (107アミノ酸残基) とはアミノ酸相同性が高く, いずれも10種類以上の遺伝子のプロモーターに作用して転写活性化することが知られており, *soxRS* オペロンの変異の場合も, OmpF 減少に加えて, 薬剤排出系が活性化されキノロン耐性となっている可能性がある (図1)。

キノロンの排出系の実体はまだ不明であるが, 排出系の一つである EmrAB タンパク質がナリジクス酸を細胞外へ汲み出すことが知られている (66)。*emrAB* オペロンは, プロトノフォアである CCCP (カルボニルシアニド *m*-クロロフェニルヒドラゾン) 耐性菌として得られた多剤耐性大腸菌から単離された。EmrB タンパク質はグラム陽性菌のテトラサイクリン排出タンパク質と同じファミリーに属し, 内膜に存在して H^+ との逆輸送によって薬剤を排出していると考えられる。EmrA タンパク質は全体として親水性であり, 内膜と外膜の間のペリプラズムに存在して, EmrB と共役して薬剤を細胞外へ放出していると推定される。EmrAB タンパク質はノルフロキサシンには耐性を与えないことから, 限られた種類

のキノロンの排出に関与しているものと思われる。最近, ミクロシン B17 の排出に関与する Mcb ポンプがスパルフロキサシンも排出すると報告されている (65)。

大腸菌の外膜の透過性低下ならびに排出ポンプの亢進によるキノロン耐性度はあまり高くないが, 大腸菌がいったん *mar* 変異を獲得すると次に起きる高度薬剤耐性化の頻度が有意に高くなるという報告 (13) は, 菌の高度耐性化のプロセスを考える上で興味深い。

最近, 染色体の複製開始領域に結合するタンパク質として新たに同定された Rob を菌体内で大量発現 (コピー数の上昇) させると, 菌が多剤耐性化し, ニューキノロンにも耐性化することが判明した (4)。さらに, 数種類のストレス応答遺伝子のプロモーターに Rob が結合して, 遺伝子産物である酵素の活性を上昇させることが認められている。Rob は MarA ならびに SoxS タンパク質と相同性が高く, 外膜透過性の低下あるいは薬剤排出系の亢進を促している可能性もある。

norC 変異株はノルフロキサシンやシプロフロ

キサシンなどの親水性キノロンに親株に比べて4倍耐性を示すが、比較的疎水性のスバルフロキサシンやナリジクス酸には感受性を示す(40)。この変異株の場合には、OmpF ポーリン欠失のほかに、LPS (リポ多糖) の変化が推定されていることから、LPS 変化もキノロン透過性を変化させる要因である可能性がある。しかし、Omp の欠失と LPS の変化がこのような耐性パターンをどのようにして作り出しているのか不明である。LPS の変化がポーリンの透過チャンネルに影響を与えている可能性も指摘されているが(43)、詳細は不明である。

nalD 変異 (*gyrB* 変異の一つとして以前に報告された *nalD* 変異とは異なり、染色体地図上89.5分に位置する。) 株は、ナリジクス酸およびグリセロールの取り込み量の低下が報告されている透過性変異株である(49)。

このほかに、メカニズムは不明であるが、ナリジクス酸に低度耐性を与える変異として *crp*, *cya*, *icd*, *purB*, *ctr* が報告されている(43)。

2) 緑膿菌

キノロンの細胞内蓄積量を減少させる変異として、緑膿菌においては *nalB*, *nfxB* および *nfxC* 変異などが知られている。

nalB 変異株は、キノロンのほかに構造の異なるテトラサイクリン、クロラムフェニコール、エ

リスロマイシンなどに耐性を示す(91, 93)。キノロンの取り込みを調べると、キノロンの蓄積量の低下が見られるが、この低下が CCCP 添加により解除されることから、菌体内への透過性低下ではなく、菌体外への排出促進によってキノロン耐性を獲得していると結論された。この *nalB* 変異株では OprM 外膜タンパク質の増加が認められており、これがキノロンの排出亢進に関わっていると考えられる(69)。興味深いことに、477アミノ酸から成る OprM タンパク質は、*mexAB-oprK* オペロンの *oprK* 遺伝子産物であることが判明した(27, 33)。これは鉄イオンの菌体内への取り込みに関与する pyoverdine を輸送するタンパク質であることが知られている。したがって、*nalB* 変異株はこの輸送系を増幅させてキノロンの排出亢進を図っていることになる。オペロンの解析から、MexB (1046アミノ酸残基) は細胞質膜(内膜)に、MexA (383アミノ酸残基) はペリプラズムに存在して、外膜の OprM と協力して薬剤を細胞外へ排出するという図式が想定されている(図2)。大腸菌 *mar* 変異 (*cfxB*) の場合には *marRAB* オペロンにおける *marR* 欠失により MarA タンパク質が増加することを考えると、緑膿菌 *nalB* 変異の場合には、*mexAB-oprK* オペロン上流にリプレッサーをコードする領域が存在し、その機能喪失により OprM (*oprK* 遺伝子産

図2. 緑膿菌における *mexA-mexB-oprM* (以前の *oprK*) オペロン産物によるキノロン排出モデル
OprM が MexA, MexB と共役してキノロンを含む多くの薬剤を菌体外へ排出する。文献(95)を参照に作図。

物)が増加しているのかもしれない。なお、OprM は野生株においても一定量の発現が認められており、緑膿菌の自然耐性の原因であると考えられている (64)。

nfxB 変異株はキノロン耐性であるが、 β -ラクタムやアミノグリコシド系の薬剤には逆に高感受性を示し、ノルフロキサシンの蓄積量の減少が見られる (41)。この株では OprJ 外膜タンパク質 (分子量 54 kDa) の出現が認められている (41, 47, 68)。*nfxB* 変異を相補する (キノロン感受性を引き起こし、OprJ を欠失させる) 遺伝子として野生株から単離された *nfxB^S* 遺伝子は、すでに知られている DNA 結合タンパク質 (制御タンパク質) のアミノ酸配列と相同性が高く、何らかの遺伝子の発現制御に関係していると思われるタンパク質をコードすることが判明した (83)。*nfxB* 変異株では、この相補遺伝子と対応する遺伝子 (*nfxB*) の42番目のコドンに対応するアミノ酸 Arg が Gly に変化しており、この変異により OprJ タンパク質の発現が促され、キノロン排出亢進につながると推定される (21)。*nfxB* 遺伝子産物が *oprJ* 遺伝子発現にどのように関わっているか、今後の問題である。

nfxC 変異株は、クロラムフェニコールおよびイミペネムにも耐性を示すが、 β -ラクタムやアミノグリコシドには高感受性である (22, 23)。この株では OprN 外膜タンパク質 (50 kDa) の出現とともに、OprD 外膜タンパク質 (46 kDa) の減少が見られた。OprD の減少は別のキノロン耐性株でも報告されているが (32)、キノロンの透過性には OprD の関与は少ないという報告もある (50)。*nalB*, *nfxB* などの耐性変異のメカニズムとの類推から、*nfxC* 変異が OprN の発現上昇を引き起こし、キノロンを細胞外へ排出するメカニズムも推察されるが、まだ明らかでない。

このほか、キノロン耐性株における OprF 外膜タンパク質の減少 (89)、OprH 過剰生産によるキノロン高感受性化 (126) などが報告されているが、詳細は不明である。

3) 黄色ブドウ球菌

外膜のないグラム陽性菌においては、主に内膜の変化によってキノロンの蓄積量を低下させると推定される。

ノルフロキサシン耐性遺伝子として、*norA* 遺伝子がノルフロキサシン耐性 MRSA の染色体 DNA から単離された (105)。プラスミドベクターにクローン化した *norA* 遺伝子を持つ黄色ブドウ球菌ならびに大腸菌は、ノルフロキサシン、エノキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシンなどの親水性キノロンに耐性を示し、ナリジクス酸、オキシリン酸、スパルフロキサシンなどの比較的水溶性のキノロンにほとんど耐性を示さない (122)。NorA は388個のアミノ酸残基から成る疎水性タンパク質で、内膜を12回貫通する形で存在していると推定された。NorA はテトラサイクリンの排出ポンプの一つである TetA タンパク質やキノロース輸送タンパク質と類似しており、単離した *norA* 遺伝子をプラスミド上に持つ耐性菌のキノロン蓄積量の減少が CCCP の添加により解除されることから、NorA は H⁺ との逆輸送により親水性キノロンを排出するポンプを形成すると考えられている (122)。

NorA はキノロン感受性の野生株にも存在する。キノロン感受性黄色ブドウ球菌 SA113 株の *norA* 遺伝子をコピー数の異なるプラスミドベクターにクローン化して宿主大腸菌のキノロン耐性の程度を調べると、高コピー数になると親水性キノロンに耐性化することが判明している (118)、*norA* 遺伝子産物の増量が宿主に耐性を与え得ると考えられる。NorA の増加は *norA* 遺伝子の転写活性化によっても起こり、*norA* 遺伝子のプロモーターの変異による *norA* mRNA 量の増加がキノロン耐性を惹起する場合は報告されている (55, 78)。

一方、キノロン感受性黄色ブドウ球菌 209P 株から大腸菌多コピー数プラスミド上にクローン化した *norA* 遺伝子は、キノロン耐性臨床分離株 MR8736 由来の *norA* 遺伝子の場合と異なり、キノロン感受性大腸菌を耐性化しなかったという報告がある (81)。209P 株では NorA の362番目のアミノ酸が Asp, MR8736 株では Ala であり、Asp-362 の Ala への変化が NorA のキノロン排出亢進を引き起こす可能性が示唆されたが、キノロン感受性 SA113 株では 362 番目のアミノ酸は Ala であり (118)、キノロン感受性臨床分離株においても同様であるという別の報告 (78) もあ

るので、NorA ポンプのキノロン排出促進によるキノロン耐性化は野生型 NorA の増加により起こると理解したほうがよいと思われる。209P 株の場合は、NorA 排出ポンプの活性がほかの野生株に比べても有意に低いのかもしれない。

キノロン耐性遺伝子として知られていた *flqB* 変異は *norA* 遺伝子のプロモーターの変異であり、その結果、*norA* 遺伝子の転写活性化が起こることが証明されている (78)。さらに、キノロン耐性臨床分離黄色ブドウ球菌において、*norA* 遺伝子のプロモーターの-35領域と-10領域の間にトランスポゾン Tn4001 由来の挿入配列 IS256 が挿入されていることが見出された。IS256 には強力なプロモーターがあるので、それにより *norA* の転写活性化が起きていると予想される (59, 113)。このほか、NorA の発現亢進が常に起こる (構成的発現) のではなく、低濃度のノルフロキサシンによって誘導される例も報告されている (54)。

NorA の亢進は、親水性キノロンのほかに、さらにローダミン 6G, エチジウムブロマイドなどの化学物質、クロラムフェニコールに対する耐性をもたらす (77)。なお、親水性キノロンが NorA によって排出されるといわれてきたが、排出されにくいと推定される親水性キノロン系化合物も存在するので、NorA によって排出されるキノロンの性質は親水性だけでは規定できないと思われる。

4) その他の細菌

プロテウス菌 (*Proteus vulgaris*) で見出された *pqr* 遺伝子は、テトラサイクリン、セファロスポリン、クロラムフェニコールに対して 8-32倍耐性を与える (51, 52)。Pqr タンパク質 (122アミノ酸) は大腸菌の SoxS ならびに MarA タンパク質と相同性があり、Pqr の発現によって OmpF タンパク質が減少するとともに、スーパーオキシドジスムターゼの活性が1.5倍上昇している。菌体内のキノロンの蓄積量の低下は、外膜透過性の低下とキノロンの排出亢進によると考えられる。

結核菌の一種である *Mycobacterium smegmatis* においては、フルオロキノロン低度耐性を与える変異として *lfr* 変異が知られている。これは H⁺

アンチポーターで、シプロフロキサシンのほかに、エチジウムブロマイド、塩化ベンザルコニウムなどに対する耐性を惹起する。構造的には黄色ブドウ球菌の消毒薬耐性遺伝子 *qacA* と相同性がある。*lfr* 変異がある菌では、キノロンに高度耐性化する頻度が有意に上昇すると報告されている (100)。

Campylobacter jejuni においてもキノロン排出ポンプの存在が示されており、2種の外膜タンパク質 (55 kDa, 39 kDa) の発現亢進が観察されている (9)。詳細は不明であるが、このポンプはキノロンのほかに、テトラサイクリン、セファロスポリン、クロラムフェニコールも排出すると推定されている。

表皮ブドウ球菌においては、黄色ブドウ球菌と同様にキノロン耐性遺伝子として *norA* 遺伝子が見出されている (104)。

枯草菌では、黄色ブドウ球菌 NorA と類似したタンパク質として Bmr が知られている (75)。NorA が *norA* 遺伝子の転写活性化であるのに対し、Bmr の場合は遺伝子増幅によってキノロン耐性を獲得すると結論されている (76)。

キノロンを含む各種抗菌剤の透過性変化、排出亢進の詳細についてはほかの総説を参照されたい (42, 43, 80, 95)。

3. II 型トポイソメラーゼ (DNA ジャイレースならびにトポイソメラーゼ IV) の変異によるキノロン耐性

キノロンの標的分子は DNA ジャイレースのみであると長い間考えられてきたが、キノロン耐性メカニズムの研究ならびに DNA トポイソメラーゼ IV (Topo IV) の遺伝学的、生化学的研究により、Topo IV もキノロンの標的分子であることが明確になっている。

1) DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV (Topo IV)

DNA の負のスーパーコイルは、細菌における DNA 複製、転写などの過程で二本鎖を局所的に解離するために重要であるが、この DNA スーパーコイルを調節する役割を担っているのがトポイソメラーゼである。この一群の酵素の中で、DNA 2本鎖を一時的に2本とも切るものを II

型トポイソメラーゼという (25, 109, 110)。

DNA ジャイレースは、DNA の 2 本鎖切断—他の DNA 鎖部分の切断部位通過—切断 DNA の再結合という反応サイクルを繰り返すことにより DNA に負のスーパーコイルを導入する酵素である。DNA ジャイレースは細菌の生存に必須の酵素で、細菌 DNA の複製、修復、転写、組み換えに関与している。大腸菌 DNA ジャイレースは、*gyrA* 遺伝子 (染色体地図上 48 分に位置) がコードする GyrA サブユニット (875 アミノ酸, MW 97 kDa) 2 分子と、*gyrB* 遺伝子 (83 分に位置) がコードする GyrB サブユニット (804 アミノ酸, MW 90 kDa) 2 分子から成る 4 量体である。キノロンが存在すると、反応中間体である cleavable complex (酵素—基質複合体) が安定化される。

もう一つの II 型トポイソメラーゼである Topo IV も細菌の生存に必須の酵素で、DNA 2 本鎖の切断と再結合の反復によって DNA のリラクゼーションやデカテネーションを行う。Topo IV は主に DNA 複製終了後の DNA 2 本鎖の分離 (デカテネーション) に関与していると考えられている (56, 67)。大腸菌 Topo IV は *parC* 遺伝子産物 (752 アミノ酸, 83.7 kDa) 2 分子と *parE* 遺伝子産物 (630 アミノ酸, 70 kDa) 2 分子から構成される 4 量体で、DNA ジャイレースと相同性が高い (56, 57, 88)。これら 2 つの遺伝子は 6 kb 離れて染色体地図上 65 分に位置する。ParC タンパク質は GyrA と 36%, ParE は GyrB と 49% のアミノ酸同一性を示す。

DNA ジャイレースと Topo IV はいずれもキノロンの標的酵素であり、どちらか感受性の高い方が宿主のキノロン感受性を決定すると考えられている (58, 61, 113)。

2) 大腸菌 DNA ジャイレースの変異

キノロン耐性菌が DNA ジャイレース変異を有していることは、キノロン耐性菌から抽出・精製した DNA ジャイレースのキノロン耐性化や、野生型ジャイレース遺伝子を用いた形質転換によるキノロン感受性化試験などにより調べることができる。精製ジャイレースのキノロン耐性化は、各種細菌で報告されている (43)。キノロン感受性化試験は、野生型 *gyrA* あるいは *gyrB* 遺伝子が

キノロン耐性の対立遺伝子に対して優性の関係にあることを利用した試験であり、変異不明のキノロン耐性菌が、野生型 *gyrA* (あるいは *gyrB*) 遺伝子を持つプラスミドによる形質転換後、キノロンに感受性化すると、その耐性菌は *gyrA* (あるいは *gyrB*) 変異を有していると推定される。キノロン感受性化試験により、多数のグラム陰性菌ならびに黄色ブドウ球菌において、DNA ジャイレースの変異によるキノロン耐性化が報告されている (37, 39, 53, 74, 114, 123, 125)。

野生型大腸菌由来のキノロン耐性 DNA ジャイレース変異株は、遺伝子解析により、GyrA あるいは GyrB のアミノ酸が変化してキノロンに耐性化することが判明している (表 2, 3) (38, 114, 120, 121, 123)。GyrA 変異は Ser-83 の近辺に集中しており、Ser-83 が Leu や Trp に変異した場合や Asp-87 が Asn に変異した場合に、ほかの変異に比べて高い耐性を与える。臨床から分離されたキノロン耐性大腸菌株において、Ser-83 から Leu (86, 87), Trp (15, 86), Ala (30) への変異、Asp-87 から Val (86), Gly (87) への変異 および Gln-106 から Arg への変異 (31) が報告されていることから、Ser-83 およびその近傍のアミノ酸配列は、キノロン耐性を決定する上で極めて重要な領域であると推定される (図 3, 4)。GyrA の Ser-83 を部位特異的変異導入法により変化させて検討した結果、キノロン耐性を与えるためには 83 番目のアミノ酸残基は疎水性アミノ酸である必要があると報告されている (116)。臨床分離キノロン耐性大腸菌の中には Ser-83→Leu 変異に加えて Asp-87→Gly 変異を有する株があり、この二重変異を持つ DNA ジャイレースは GyrA における Ser-83→Leu 変異のみを有する DNA ジャイレースに比べてキノロン耐性度がより高い (36)。この事実、GyrA の Ser-83 と Asp-87 が空間的に近接していることを暗示するとともに、両者の変異の協同作用によりキノロンと DNA ジャイレース—DNA 複合体との相互作用がさらに弱められることを示唆している。興味ある変異として Gly-81→Asp 変異がある (8)。この株は、シプロフロキサシン耐性であるが、ナリジクス酸には感受性を示す。

GyrA 上のキノロン耐性を決定する領域は

表2. 大腸菌 *gyrA* 変異キノロン耐性株の耐性と変異部位

菌株	最小発育阻止濃度 MIC ($\mu\text{g/ml}$)					変異
	ナリジクス酸	オキシリン酸	エノキサシン	シプロフロキサシン	スパルフロキサシン	
実験室株						
KL16(親株)	3.13	0.39	0.1	0.0125	0.0125	野生型
N-51, N-112, N-118, N-119	400	6.25	1.56	0.39	0.2	Ser-83→Leu
P-18	400	6.25	1.56	0.39	0.2	Ser-83→Trp
N-113	200	3.13	1.56	0.2	0.1	Asp-87→Asn
N-97	50	3.13	0.78	0.1	0.05	Gly-81→Cys
P-5	25	1.56	0.39	0.1	0.025	Ala-84→Pro
P-10	25	1.56	0.39	0.05	0.025	Ala-67→Ser
N-89	12.5	0.78	0.2	0.05	0.025	Gln106→His
臨床分離株						
C-58, C-158, C-218, C-231, C-235	128~1000	—	—	0.25	—	Ser-83→Leu
C-227, C-233	256~512	—	—	0.25	—	Ser-83→Trp
SD11.1	—	—	—	0.05	—	Ser-83→Ala
C-202	32	—	—	0.05	—	Asp-87→Val
GM100	—	—	—	0.05	—	Gln-106→Arg
205096	1024	—	—	64	—	Ser-83→Leu & Asp-87→Gly

酸性キノロン

ナリジクス酸

オキシリン酸

エノキサシン

両性キノロン

シプロフロキサシン

スパルフロキサシン

表3. 大腸菌 *gyrB* 変異キノロン耐性株の耐性と変異部位

菌株	最小発育阻止濃度 MIC ($\mu\text{g/ml}$)					変異
	ナリジクス酸	オキシリン酸	エノキサシン	シプロフロキサシン	スパルフロキサシン	
KL16(親株)	3.13	0.39	0.1	0.0125	0.0125	野生型
第1タイプ <i>gyrB</i> 変異株 (9株)	50	1.56	0.78	0.1	0.05	Asp-426→Asn
第2タイプ <i>gyrB</i> 変異株 (4株)	50	1.56	0.025	0.0031	0.0031	Lys-447→Glu

図3. 細菌 DNA ジャイレースの GyrA タンパク質上のキノロン耐性変異

大腸菌の場合のキノロン耐性決定領域を他の菌種の相当領域と比較した。・で示したアミノ酸は大腸菌と同一であり、この領域が菌種間でよく保存されていることがわかる。また、変異部位ならびに変異アミノ酸の種類も類似している。

図4. 細菌 DNA ジャイレースの GyrB タンパク質上のキノロン耐性変異

GyrA の場合（図3）同様、変異の見られた領域が菌種間でよく保存されており、変異部位ならびに変異アミノ酸の種類も類似している。

GyrA の N 末端近くにあり、DNA ジャイレースの作用により切断された DNA の 5' 末端と共有結合する部位である Tyr-122 の近くに位置している。ほとんどの変異はターン（ペプチド鎖の折れ曲がり部分）周辺に位置し、親水性の極大部位の近くであることから、キノロン耐性変異によるアミノ酸変化は GyrA の表層付近に起きていると考えられる。また、耐性度の高い変異ほど局所高次構造の変化の大きい傾向が見られたことは、局所高次構造の変化がキノロンの相互作用を低下させる大きな要因であることをうかがわせる(120)。

GyrB 変異は現在までに Asp-426→Asn 変異と Lys-447→Glu 変異の 2 種類が見出されている(114, 121)。第 1 のタイプ (Asp-426→Asn 変異) の株は調べたすべてのキノロンに耐性であるが、第 2 のタイプ (Lys-447→Glu 変異) の株はナリジクス酸、オキソリン酸などの酸性キノロンには耐性、ニューキノロンには高感受性を示す。実験的には *gyrB* 変異株は *gyrA* 変異株とほぼ同じ頻度で検出されるが(74)、*gyrB* 変異によるキノロン耐性度が *gyrA* 変異の場合に比べて相対的に低いこともあり、キノロン耐性臨床分離株においては *gyrB* 変異株は少ない(74, 108)。

GyrB 上のキノロン耐性変異も GyrA の場合と同様、表層部位の変化であると考えられる。第 1 タイプの変異では、荷電と局所構造の変化が推測され、第 2 タイプの変異では、荷電の変化のみが起きると推測されている。Asp-426→Asn 変異では、負電荷の消失により、両性キノロンの 7 位塩基性置換基（ピペラジニル基など）との相互作用が弱まりキノロンに耐性化するが、Lys-447→Glu 変異では、正電荷から負電荷への変化により、両性キノロンの 7 位塩基性基との相互作用が強まりキノロンに高感受性化すると考えられる。野生型 GyrB の Asp-426 と Lys-447 はイオンの相互作用をしていると推測されている(114, 121)。

野生株ならびに変異の明らかな代表的な 3 株 (GyrA : Ser-83→Leu, GyrB : Asp-426→Asn, GyrB : Lys-447→Glu) から遺伝子工学的に GyrA ならびに GyrB タンパク質が大量生産、精製されている。これらの GyrA と GyrB から

DNA ジャイレースを再構成して、DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性のキノロン感受性変化を調べた結果、この感受性変化は各変異株のキノロン感受性とよく相関していた(124)。GyrA, GyrB 二重変異 DNA ジャイレースのキノロン感受性の変化も GyrA, GyrB 両者の変異の性質を反映しており、キノロン感受性（耐性）は GyrA ならびに GyrB 両サブユニットにより決定されることがわかる。

³H-エノキサシンを用いた DNA ジャイレース—DNA 複合体との結合実験の結果、野生型の場合にはエノキサシンの結合は添加するエノキサシンの増加に伴って二相性に増加し、DNA ジャイレース—DNA 複合体にはキノロン親和性の異なる 2 種類の結合部位が存在すると考えられた(124)。低エノキサシン濃度（最小発育阻止濃度付近）における高親和性部位の *K_d* 値（解離定数）は対応する菌の発育阻止濃度とよく相関し、変異型ジャイレースの場合ではこの *K_d* 値が野生型と比べて変化していた（表 4）。このように、キノロンの DNA ジャイレース—DNA 複合体への結合親和性は、GyrA および GyrB サブユニットにより決定されており、特に高親和性結合部位への結合が菌の増殖阻害を惹起すると考えられる。キノロンは DNA ジャイレースあるいは DNA 単独とは結合せず、DNA ジャイレース—DNA 複合体と結合することから(94, 124)、複合体にはコンフォメーション変化によりジャイレース単独の場合には存在しない空間（ポケット）が生じ、そこにキノロンが結合すると思われる。おそらく、ジャイレースの作用により 2 本鎖 DNA が一時的に切断された時に空間（ポケット）が生じ、キノロンが入り込み、DNA の再結合を阻害しているのではないだろうか。結合実験から、DNA ジャイレース 1 分子に対して、キノロンは高親和性部位では 1～2 分子結合していると算出されている。キノロンと DNA ジャイレース—DNA 複合体との結合には、GyrA の Ser-83 付近との相互作用、GyrB の Asp-426 とキノロンの 7 位塩基性基（ピペラジニル基など）との相互作用のほかに、Mg²⁺ とのキレーションの関与(82)も考えられている。キノロンポケットの少なくとも一部は GyrA および GyrB のキノロン耐性決定

表4. スキャッチャードプロットによる ³H-エノキサシンと大腸菌 DNA ジャイレース—DNA 複合体の結合親和性の解析結果

大腸菌 DNA ジャイレース	対応する菌株に対する エノキサシンの MIC (μM)	Kd (μM)	
		高親和性結合部位 (低エノキサシン濃度)	低親和性結合部位 (高エノキサシン濃度)
野生型 DNA ジャイレース	0.3	0.4	6
GyrA 変異 (Ser-83→Leu) DNA ジャイレース	4.9	4	4
第2タイプ GyrB 変異 (Lys-447→Glu) DNA ジャイレース	0.08	0.1	6

各ジャイレースは、野生型および変異株 GyrA と GyrB タンパク質から再構成した。低エノキサシン濃度における高親和性結合部位の *Kd* 値は、対応する菌の発育阻止濃度とよく相関しており、高親和性結合部位への結合がジャイレース活性阻害、そして菌の増殖阻害を引き起こすと考えられる。文献124より引用。

部位から構成されており、変異が起きると荷電や局所構造が変化して、キノロンに対する親和性が低下し、キノロンとの結合が弱まる。逆に、変異が両性キノロンに対する親和性を高める方向に働くと、キノロン高感受性になる。このようにして、DNA ジャイレースはキノロンに耐性化、あるいは高感受性化すると推測される。GyrA の Ser-83→Trp 変異を持つ DNA ジャイレース—DNA 複合体の場合は、³H-ノルフロキサシンの結合が有意に減少すると報告されている (112)。

最近、酵母の DNA トポイソメラーゼ II (機能的に重要な部分は DNA ジャイレースと相同性が高い) 断片の X線解析が行われた (6)。それによると、GyrA のキノロン耐性変異部位に対応する部位は、Tyr-122 に対応する部位ならびに 2 本鎖 DNA を収納するタンパク質上の溝と立体的に近いことが判明している (6)。GyrB のキノロン耐性変異部位に対応する部位は、Tyr-122 とはかなり離れているが、酵素反応時のコンフォメーション変化により、接近してキノロンポケットを形成する可能性があるのではないかとと思われる。

3) 大腸菌 Topo IV の変異

Topo IV 活性がキノロンによって阻害されることは Topo IV 発見後間もなく見出されていたが (47)、キノロン耐性 Topo IV 変異株は長い間分離されなかった。Topo IV 変異によりキノロン耐性が惹起されることは、*gyrA* 変異株のキノロン耐性度が *parC* 変異によって増大することが発見されてからである (58, 61)。大腸菌の DNA ジャイレース *gyrA* 変異株 (Ser-83→Leu)

の染色体上の野生型 Topo IV *parC* 遺伝子に Ser-80→Leu 変異を導入した菌は、ノルフロキサシンに対してさらに 6 倍耐性を示し、精製した変異 ParC (Ser-80→Leu) と野生型 ParE から再構成した Topo IV は10倍耐性を示す (58)。この Ser-80→Leu 変異は *gyrA* 変異の中で最も高い耐性を与える Ser-83→Leu 変異に対応する *parC* 変異として人工的に作成されたものであるが、キノロン耐性臨床分離株で見出された *parC* (Glu-84→Lys) 変異を同じ *gyrA* 変異株の野生型 *parC* 遺伝子に導入した場合は、菌はノルフロキサシンに10倍耐性化、再構成 Topo IV は25倍耐性化する (58)。同様に、*gyrA* 変異株のキノロン耐性度を上昇させる Topo IV *parC* 変異として Gly-78→Asp, Ser-80→Ile, Arg, Glu-84→Lys が報告されている (61)。キノロン高度耐性化した臨床分離大腸菌株においても、Topo IV *parC* 変異が高度耐性化に関与していることが示されている (36)。キノロン耐性臨床分離株では、これらの変異のほかに Glu-84→Val 変異が見出されている (106)。いずれも DNA ジャイレース GyrA 変異に類似しており、また Topo IV と DNA ジャイレースの相同性から (図5)、キノロンポケットは互いによく似ていると考えられ、Topo IV の変異の場合もキノロンの Topo IV—DNA 複合体に対する親和性低下によってキノロンに耐性化するのではないかと推定される。

単一コピー数のプラスミドに変異型 *parC* 遺伝子をクローン化した菌 (染色体上には野生型 *parC* を持つ) は、染色体ならびに単一コピー数

RN4220 株に入れるとキノロンに 2-8 倍耐性化する (113)。Topo IV *GrlA* 変異は DNA ジャイレース *GyrA* 変異と類似しているが、DNA ジャイレースの場合と異なり、耐性が優性に現れる。興味深いことに、染色体の *grlA* 上に Ser-80→Phe 変異を持つ株に野生型 Topo IV *grlA* 遺伝子をプラスミドとして入れても菌は耐性のままであるが、野生型の *grlA* および *grlB* 遺伝子の両方を入れると感受性化する。したがって、キノロン耐性という表現型は菌体内の酵素量に依存することが示唆される。

他の細菌の場合と異なり、DNA ジャイレース変異株を従来のキノロンで実験的に一段階選択することは困難であり (53, 79), 黄色ブドウ球菌においては Topo IV 変異の後に DNA ジャイレース変異が高い頻度で起きる (79, 113)。臨床分離キノロン耐性株 8 株を調べた結果、すべてに Topo IV *GrlA* における Ser-80→Phe あるいは Tyr 変異が見られるが、DNA ジャイレース変異は耐性度の高い 5 株でしか見られないという報告があり (19), 臨床株においても Topo IV 変異が先に起きると考えられる。表 5 に示すように、染色体上に DNA ジャイレース *gyrA* 変異、プラスミド上に Topo IV *grlA* 変異を持つ高度耐性株からプラスミドを脱落させると、キノロン感受性に戻る (113)。このことはキノロン高度耐性には *grlA* 変異と *gyrA* 変異の両者が必要であることを示している。

黄色ブドウ球菌では、グラム陰性菌に比べて DNA ジャイレースの薬剤感受性が悪いのか、あるいは Topo IV の薬剤感受性が高いために、Topo IV が一次標的酵素になり、Topo IV の薬剤感受性が菌の薬剤感受性を規定する。キノロンの作用に対し、菌はまず Topo IV の変異によって低度耐性化し、これに DNA ジャイレース変異などが加わって高度耐性化すると結論される。

5) その他の細菌における II 型トポイソメラーゼの変異

キノロン耐性淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) では、大腸菌 *gyrA* 遺伝子の塩基配列をもとにハイブリダイゼーションにより、DNA ジャイレース *gyrA* 遺伝子と Topo IV *parC* 遺伝子がクローン化されている (5)。淋菌の GyrA タンパク質は 916 アミノ酸から成り、大腸菌 GyrA (875 アミノ酸) と 52% のアミノ酸同一性を示し、ParC タンパク質は大腸菌 GyrB と 47% の同一性を示す。シプロフロキサシンの濃度を徐々に上げて段階的に耐性株を選択し、最終的に親株に比べて 10,000 倍耐性化した株が得られた。親株 (シプロフロキサシンの MIC が 0.002 $\mu\text{g/ml}$) から 1 段階目の選択株は、*gyrA*, *parC* 以外の変異によりシプロフロキサシンに 7 倍耐性化する。さらに、16 倍耐性化した 2 段階目の株では GyrA の Ser-91 (大腸菌の 83 番に相当) →Phe 変異が見られた。この後、耐性の上昇に伴って GyrA の Asp-95 (大腸菌の 87 番に相当) →Asn, ParC の Ser-88 (大

表 5. キノロン耐性黄色ブドウ球菌におけるキノロン耐性度に及ぼす *gyrA* ならびに *grlA* 遺伝子の変異の影響

黄色ブドウ球菌	染色体	プラスミド	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	DNA ジャイレース <i>gyrA</i>	DNA トポイソメラーゼ IV <i>grlA</i>	スパルフロキサシン	ノルフロキサシン	シプロフロキサシン
RN4220	野生型	なし	0.1	0.78	0.39
RN4220/pRK3	野生型	S80F, E84K	0.2	6.25	1.56
RN4220-G1/pRK3	S84L	S80F, E84K	12.5	100	50
RN4220-G2/pRK3	S84L, S85P	S80F, E84K	100	100	50
RN4220-G1/pUB110	S84L	なし	0.1	0.78	0.39
RN4220-G2/pUB110	S84L, S85P	なし	0.1	0.78	0.39

キノロン感受性野生株 RN4220 に変異 *grlA* 遺伝子を持つプラスミドを入れるとキノロンに耐性化し、染色体上の *gyrA* 変異によりさらに耐性化する。ところが、この高度耐性株からプラスミドを脱落させると、染色体上には *gyrA* 変異があってもキノロンに感受性化する。したがって、キノロン高度耐性には DNA トポイソメラーゼ IV *grlA* 変異と DNA ジャイレース *gyrA* 変異の両者が必要であることがわかる。文献 (113) より引用。

腸菌の81番に相当) →Pro, そして ParC の Glu-91 (大腸菌の 84番に相当) →Lys 変異が加わり, 最終的にシプロフロキサシンの MIC が 16 µg/ml という高度耐性株になる。GyrA における Ser-91→Phe と Asp-95→Asn の二重変異, ならびに ParC における Ser-88→Pro 変異を形質転換により親株 FA-19 に導入すると, シプロフロキサシンに対して前者の変異は250倍, 後者の変異は2,000倍の耐性を賦与することが確かめられた (5)。徐々に増加している臨床分離キノロン耐性淋菌株においては, DNA ジャイレース GyrA における Ser-91→Phe 単独変異, ならびに Asp-95→Asn 変異, あるいは Asp-95→Gly 変異を併せ持つ株が報告されている (16, 17, 84)。また, キノロン低度耐性淋菌において GyrB タンパク質の419番目 (大腸菌の426番目に相当) のアミノ酸が Asn であることが報告されている (98)。これは大腸菌における Asp-426 変異に相当すると考えられる。これらの DNA ジャイレース変異に Topo IV 変異が加わることによって, 臨床株はキノロン高度耐性を獲得しているのであろう。

このほかの細菌においても DNA ジャイレースの耐性変異はいくつか報告されている (図3, 4) (1, 30, 35, 60, 62, 72, 73, 85, 90, 92, 101, 107, 111, 116, 117)。DNA ジャイレースの変異が存在する領域(キノロン耐性決定領域)はこれらの細菌においてもよく保存され, 変異部位ならびに変異アミノ酸の種類も極めて類似している。このことは, キノロン耐性決定領域が DNA ジャイレースの機能にとっても重要な領域であることを示唆するとともに, ほかの細菌における DNA ジャイレースのキノロン耐性変異のメカニズムも, 基本的には大腸菌の場合と同様であることを暗示している。

大腸菌, 淋菌, 黄色ブドウ球菌以外の細菌における Topo IV 変異はまだ報告されていないが, 大腸菌などと同様の DNA ジャイレース変異と Topo IV 変異が相俟って高度耐性化が起きると推測される。

4. お わ り に

キノロンのターゲットが2種類の II 型トポイ

ソメラーゼであることが判明して, 細菌のキノロン耐性化のメカニズムが包括的に理解されるようになってきた。キノロンの作用に対して, 細菌は膜透過性低下や排出亢進のほかに, 2種類のターゲットの変異を組み合わせることにより高度耐性を獲得する。この2つの酵素は相同性が高く, キノロンの作用様式も類似していると考えられるが, 両者のキノロン作用部位の立体構造が菌種によっても若干異なるために, 両者に対するキノロンの作用の強弱の違いがでてくると思われる。現在市販されているキノロンを用いた実験から, キノロンの一次標的分子は大腸菌では DNA ジャイレース, 黄色ブドウ球菌では Topo IV と言われているが, DNA ジャイレースと Topo IV に対するキノロンの作用の強さはキノロンの種類によって異なり, 作用の強弱が従来とは逆の化合物も登場するかもしれない。

今日まで低度耐性はあまり問題視されなかったように思われるが, 1つのメカニズムで低度耐性化した菌の高度耐性化の頻度が上昇することを考慮すると, 低度耐性株といえどもキノロン耐性株の出現を防ぐことがいかに重要か改めて考えさせられる。

謝 辞

本稿執筆の機会をお与え下さいました名古屋大学医学部細菌学教室太田美智男教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Alangaden, G.J., Manavathu, E.K., Vakulenko, S.B., Zvonok, N.M., Lerner, S.A. (1995): Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1700-1703.
- 2) 安藤慎一, 片山知美, 柳岡正範, 名出頼男, 庄内真弓, 吉田博明 (1994) : *Klebsiella pneumoniae* での *gyrA* 遺伝子上のキノロン耐性変異. 第42回日本化学療法学会西日本支部総会プログラム・講演抄録 p. 75.
- 3) Ariza, R.R., Cohen, S.P., Bachhawat, N., Levy, S.B., Demple, B. (1994): Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in

- Escherichia coli*. J. Bacteriol. **176**, 143-148.
- 4) Ariza, R.R., Li, Z., Ringstad, N., Demple, B. (1995): Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. J. Bacteriol. **177**, 1655-1661.
 - 5) Belland, R.J., Morrison, S.G., Ison, C., Huang, W.M. (1994): *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. Mol. Microbiol. **14**, 371-380.
 - 6) Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., Wang, J.C. (1996): Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. Nature **379**, 225-232.
 - 7) Bourguignon, G.J., Levitt, M., Sternglanz, R. (1973): Studies on the mechanism of action of nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother. **4**, 479-486.
 - 8) Cambau, E., Borden, F., Collatz, E., Gutmann, L. (1993): Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1247-1252.
 - 9) Charvalos, E., Tselentis, Y., Hamzehpour, M.M., Kohler, T., Pechere, J.-C. (1995): Evidence for an efflux pump in multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 2019-2022.
 - 10) Chou, J.H., Greenberg, J.T., Demple, B. (1993): Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. J. Bacteriol. **175**, 1026-1031.
 - 11) Cohen, S., Hachler, H., Levy, S.B. (1993): Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**, 1484-1492.
 - 12) Cohen, S.P., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., McMurphy, L.M., Levy, S.B. (1988): Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **32**, 1187-1191.
 - 13) Cohen, S.P., McMurphy, L.M., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Levy, S. (1989): Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic resistant (*Mar*) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. Antimicrob. Agents Chemother. **33**, 1318-1325.
 - 14) Cohen, S.P., McMurphy, L.M., Levy, S. (1988): *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**, 5416-5422.
 - 15) Cullen, M.E., Wyke, A.W., Kuroda, R., Fisher, L.M. (1989): Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **33**, 886-894.
 - 16) Deguchi, T., Yasuda, M., Asano, M., Tada, K., Iwata, H., Komeda, H., Ezaki, T., Saito, I., Kawada, Y. (1995): DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 561-563.
 - 17) Deguchi, T., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Ezaki, T., Saito, I., Kawada, Y. (1995): Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: Correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 1020-1023.
 - 18) Dimri, G.P., Das, H.K. (1990): Cloning and sequence analysis of *gyr* gene of *Klebsiella pneumoniae*. Nucleic Acids Res. **18**, 151-156.
 - 19) Ferrero, L., Cameron, B., Crouzet, J. (1995): Analysis of *gyrA* and *gylA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1554-1558.
 - 20) Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Lagneau, D., Crouzet, J., Famechon, A., Blanche, F. (1994): Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. Mol. Microbiol. **13**, 641-653.
 - 21) 福田秀行 (1995) : 細菌における膜透過性変異によるキノロン耐性機構. 第24回薬剤耐性菌シンポジウム講演記録. p 22-23.
 - 22) Fukuda, H., Hosaka, M., Hirai, K., Iyobe, S. (1990): New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Antimicrob. Agents Chemother. **34**, 1757-1761.
 - 23) Fukuda, H., Hosaka, M., Iyobe, S., Gotoh, N., Nishino, T., Hirai, K. (1995): *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 790-792.

- 24) Gambino, L., Gracheck, S.J., Miller, P.F. (1993): Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**, 2888-2894.
- 25) Gellert, M. (1981): DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. (1985) **50**, 879-910.
- 26) Goswitz, J.J., Willard, K.E., Fasching, C.E., Peterson, L.R. (1992): Detection of *gyrA* gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 1166-1169.
- 27) Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., Nishino, T. (1995): The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 2567-2569.
- 28) Greenberg, J.T., Chou, J.H., Monach, P.A., Demple, B. (1991): Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **173**, 4433-4439.
- 29) Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D., Demple, B. (1990): Positive control of a global antioxidant defence regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 6181-6185.
- 30) Griggs, D.J., Gensberg, K., Piddock, L.J.V. (1996): Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 1009-1013.
- 31) Hallett, P., Maxwell, A. (1991): Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 335-340.
- 32) Hamzehpour, M.M., Lucain, C., Pechere, J.-C., (1991): Resistance to Pefloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 512-518.
- 33) Hamzehpour, M.M., Pechere, J., Plesiat, P., Kohler, T. (1995): OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 2392-2396.
- 34) Hane, M., Wood, T. (1969): *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. J. Bacteriol. **99**, 238-241.
- 35) 長谷川美幸, 小林寅詔, 雑賀 威, 島津光伸, 西田 実 (1996): Fluoroquinolone 系抗菌剤の存在下における *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株の耐性化変異について. 日本感染症学雑誌. **70**, 123-131.
- 36) Heisig, P. (1996): Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 879-885.
- 37) Heisig, P., Schedletzky, H., Falkenstein-Paul, H. (1993): Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 696-701.
- 38) Heisig, P., Tschorny, R. (1994): Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 1284-1291.
- 39) Heisig, P., Wiedemann, B. (1991): Use of a broad-host-range *gyrA* plasmid for genetic characterization of fluoroquinolone-resistant gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 2031-2036.
- 40) Hirai, K., Aoyama, H., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S., Mitsunashi, S. (1986): Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob. Agents Chemother. **30**, 248-253.
- 41) Hirai, K., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S., Mitsunashi, S. (1987): Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **31**, 582-586.
- 42) Hooper, D. C. (1995): Quinolone mode of action. Drugs, **49** (Suppl. 2), 10-15.
- 43) Hooper, D.C., Wolfson, J.S. (1993): Mechanism of bacterial resistance to quinolones, p. 97-118. In Hooper, D. C., Wolfson, J.S. (eds.), Quinolone Antimicrob. Agents., 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington.
- 44) Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Bozza, M.A., Ng, E.Y. (1992): Genetics and regulation of outer membrane protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 1151-1154.
- 45) Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., Ng, E.Y., McHugh, G.L., Swartz, N. (1989): Mechanisms of quinolone resistance in

- Escherichia coli*: characterization of *nfxB* and *cfxB*, two mutant resistance loci decreasing norfloxacin accumulation. Antimicrob. Agents Chemother. **33**, 283-290.
- 46) Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Souza, K.S., Tung, C., McHugh, G.L., Swartz, N. (1986): Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **29**, 639-644.
 - 47) Hosaka, M., Gotoh, N., Nishino, T. (1995): Purification of a 54-kilodalton protein (OprJ) produced in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and production of a monoclonal antibody specific to OprJ. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1731-1735.
 - 48) Hoshino, K., Kitamura, A., Morrissey, I., Sato, K., Kato, J., Ikeda, H. (1994): Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 2623-2627.
 - 49) Hrebenda, J., Heleszko, H., Brzostek, K., Bielecki, J. (1985): Mutation affecting resistance of *Escherichia coli* to nalidixic acid. J. Gen. Microbiol. **131**, 2285-2292.
 - 50) Huang, H., Hancock, R.E.W. (1993): Genetic definition of substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **175**, 7793-7800.
 - 51) Ishida, H., Fuziwara, H., Kaibori, Y., Horiuchi, T., Sato, K., Osada, Y. (1995): Cloning of multidrug resistance gene *pqrA* from *Proteus vulgaris*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 453-457.
 - 52) Ishii, H., Sato, K., Hoshino, K., Sato, M., Yamaguchi, A., Sawai, T., Osada, Y. (1991): Active efflux of ofloxacin by a highly quinolone-resistant strain of *Proteus vulgaris*. J. Antimicrob. Chemother. **28**, 827-836.
 - 53) Ito, H., Yoshida, H., Bogaki-Shonai, M., Niga, T., Hattori, H., Nakamura, S. (1994): Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 2014-2023.
 - 54) Kaatz, G.W., Seo, S.M. (1995): Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 2650.
 - 55) Kaatz, G.W., Seo, S.M., Ruble, C.A. (1993): Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1086-1094.
 - 56) Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H. (1990): New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. Cell **63**, 393-404.
 - 57) Kato, J., Suzuki, H., Ikeda, H. (1992): Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **267**, 25676-25684.
 - 58) Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R. (1995): Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**, 11801-11805.
 - 59) Kojima, T., Yamagishi, J., Oyamada, Y., Yoshida, H., Hattori, H., Inoue, M., Nakamura, S. (1995): Analysis of quinolone resistance genes in a clinical isolate of quinolone-resistant MRSA. Drugs **49** (Suppl. 2), 182-184.
 - 60) Korten, V., Huang, W.M., Murray, B.E. (1994): Analysis by PCR and direct DNA sequencing of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 2091-2094.
 - 61) Kumagai, Y., Kato, J., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K., Ikeda, H. (1996): Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 710-714.
 - 62) Kureishi, A., Diver, J.M., Beckthold, B., Schollaardt, T., Bryan, L.E. (1994): Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 1944-1952.
 - 63) Lehn, N., Stower-Hoffmann, J., Kott, T., Strassner, C., Wagner, H., Kronke, M., Schneider-Brachert, W. (1996): Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. J. Clin. Microbiol. **34**, 597-602.
 - 64) Li, X.-Z., Livermore, D.M., Nikaido, H. (1994): Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 1732-1741.
 - 65) Lomovskaya, O., Kawai, F., Matin, A. (1996): Differential regulation of the *mcb* and *emr* operons of *Escherichia coli*: role of *mcb* in multidrug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 1050-1052.

- 66) Lomovskaya, O., Lewis, K. (1992): *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**, 8938-8942.
- 67) Luttinger, A. (1995): The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. Molec. Microbiol. **15**, 601-606.
- 68) Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S., Nishino, T. (1996): Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 909-913.
- 69) Masuda, N., Ohya, S. (1992): Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 1847-1851.
- 70) Matsuyama, S., Mizushima, S. (1985): Construction and characterization of a deletion mutant lacking *micF*, a proposed regulatory gene for OmpF synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **162**, 1196-1202.
- 71) Miller, P.F., Gambino, L.F., Sulavik, M.C., Gracheck, S.J. (1994): Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 1773-1779.
- 72) Moore, R.A., Beckthold, B., Wong, S., Kureishi, A., Bryan, L.E. (1995): Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 107-111.
- 73) Musso, D., Drancourt, M., Ossicini, S., Raoult, D. (1996): Sequence of quinolone resistance-determining region of *gyrA* gene for clinical isolates and for an in vitro-selected quinolone-resistant strain of *Coxiella burnetii*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 870-873.
- 74) Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T., Yoshida, H. (1989): *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **33**, 254-255.
- 75) Neyfakh, A.A. (1992): The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 484-485.
- 76) Neyfakh, A.A. (1991): Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**, 4781-4785.
- 77) Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., Kaatz, G.W. (1993): Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 128-129.
- 78) Ng, E.Y.W., Trucksis, M., Hooper, D.C. (1994): Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 1345-1355.
- 79) 仁賀俊幸, 伊藤秀明, 吉田博明, 服部宏昭, 中村信一 (1995): 黄色ブドウ球菌の段階的キノロン耐性機構. 第43回日本化学療法学会総会プログラム・講演抄録 p. 97.
- 80) Nikaido, H. (1994): Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science **264**, 382-388.
- 80) Nikaido, H. (1994): Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science **264**, 382-388.
- 81) Ohshita, Y., Hiramatsu, K., Yokota, T. (1990): A point mutation in *norA* gene is responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **172**, 1028-1034.
- 82) Okabayashi, Y., Hayashi, F., Terui, Y., Kitagawa, T. (1992): Studies on the interaction of pyridone carboxylic acids with metals. Chem. Pharm. Bull. **40**, 692-696.
- 83) Okazaki, T., Hirai, K. (1992): Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. FEMS Microbiol. Lett. **97**, 197-202.
- 84) 小野寺昭一, 岸本幸一, 清田 浩, 後藤博一, 五十嵐 宏, 川原 元, 大石幸彦, 岡崎武二郎, 吉田博明 (1995): ニューキノロン薬耐性淋菌の耐性機構の解析. 日本感染症学雑誌. **69**, 511-516.
- 85) Oppengaard, H., Sorum, H. (1994): *gyrA* mutations in quinolone-resistant isolates of fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 2460-2464.
- 86) Oram, M., Fisher, L.M. (1991): 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 387-389.
- 87) Ouabdessalam, S., Hooper, D.C., Tankovic, J., Soussy, C.J. (1995): Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant clinical isolates

- of *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1667-1670.
- 88) Peng, H., Mariani, K.J. (1993): *Escherichia coli* topoisomerase IV. J. Biol. Chem. **32**, 24481-24490.
 - 89) Piddock, L.J.V., Bellido, F., Bains, M., Hancock, R.E.W. (1992): A pleiotropic, posttherapy, enoxacin-resistant mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 1057-1061.
 - 90) Rahman, M., Mauff, G., Levy, J., Couturier, M., Pulverer, G., Butzler, J.P. (1994): Detection of 4-quinolone resistance mutation in *gyrA* gene of *Shigella dysenteriae* type 1 by PCR. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 2488-2491.
 - 91) Rella, M., Haas, D. (1982): Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of β -lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. Antimicrob. Agents Chemother. **22**, 242-249.
 - 92) Reyna, F., Huesca, M., Gonzalez, V., Fuchs, L.Y. (1995): *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1621-1623.
 - 93) Robillard, N.J., Scarpa, A.L. (1988): Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Antimicrob. Agents Chemother. **32**, 535-539.
 - 94) Shen, L.L., Kohlbrenner, W.E., Weigl, D., Baranowski, J. (1989): Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. J. Biol. Chem. **264**, 2973-2978.
 - 95) 染谷雄一, 山口明人 (1995): 細菌の薬剤排出蛋白. 日本細菌学雑誌 **50**, 403-421.
 - 96) Soussy, C.J., Wolfson, J.S., Ng, E.Y., Hooper, D.C. (1993): Limitations of plasmid complementation test for determination of quinolone resistance due to changes in the gyrase A protein and identification of conditional quinolone resistance locus. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 2588-2592.
 - 97) Sreedharan, S., Oram, M., Jensen, B., Peterson, L.R., Fisher, L.M. (1990): DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**, 7260-7262.
 - 98) Stein, D.C., Danaher, R.J., Cook, T.M. (1991): Characterization of a *gyrB* mutation responsible for low-level nalidixic acid in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 622-626.
 - 99) Takenouchi, T., Ishii, C., Sugawara, M., Tokue, Y., Ohya, S. (1995): Incidence of various *gyrA* mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1414-1418.
 - 100) Takiff, H.E., Cimino, M., Musso, M.C., Weisbrod, T., Martinez, R., Delgado, M.B., Salazar, L., Bloom, B.R., Jacobs, W.R., Jr. (1996): Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level-fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**, 1996.
 - 101) Takiff, H.E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W.M., Kreiswirth, B., Cole, S.T., Jacobs, Jr., W.R., Telenti, A. (1994) Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 773-780.
 - 102) Tokue, Y., Sugano, K., Saito, D., Noda, T., Ohkura, H., Shimosato, Y., Sekiya, T. (1994): Detection of novel mutations in the *gyrA* gene of *Staphylococcus aureus* by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis and direct DNA sequencing. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 428-431.
 - 103) Trucksis, M., Wolfson, J.S., Hooper, D.C. (1991): A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **173**, 5854-5860.
 - 104) 生方公子 (1991): ニューキノロン薬耐性に関わる表皮ブドウ球菌の *norA* 遺伝子について. 日本化学療法学会雑誌 Chemotherapy **39**, 1001-1013.
 - 105) Ubukata, K., Itoh, N.-Y., Konno, M. (1989): Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **33**, 1535-1539.
 - 106) Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., De Anta, M.T.J. (1996): Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 491-493.
 - 107) Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A., De Anta, T.J. (1995): Mutation in the *gyrA* gene of

- quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1201-1203.
- 108) Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., De Anta, T.J. (1994): Association between double mutation in the *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 2477-2479.
 - 109) Wang, J.C. (1985): DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. **54**, 665-697.
 - 110) Wang, J. (1996): DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. **65**, in press.
 - 111) Wang, Y., Huang, W.M., Taylor, D.E. (1993): Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 457-463.
 - 112) Willmott, C.J.R., Maxwell, A. (1993): A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 126-127.
 - 113) Yamagishi, J., Kojima, T., Oyamada, Y., Fujimoto, K., Hattori, H., Nakamura, S., Inoue, M. (1996): Alterations in the DNA topoisomerase IV *grrA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 1157-1163.
 - 114) Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamayoshi, M., Nakamura, S. (1986): Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **204**, 367-373.
 - 115) Yonezawa, M., Takahata, M., Banzawa, N., Matsubara, N., Watanabe, Y., Narita, H. (1995): Analysis of the NH₂-terminal 83rd amino acid of *Escherichia coli* GyrA in quinolone-resistance. Microbiol. Immunol. **39**, 243-247.
 - 116) Yonezawa, M., Takahata, M., Matsubara, N., Watanabe, Y., Narita, H. (1995): DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 1970-1972.
 - 117) Yonezawa, M., Takahata, M., Banzawa-Futakuchi, N., Matsubara, N., Watanabe, Y., Narita, H., Matsunaga, T., Igarashi, H., Kawahara, M., Onodera, S. (1995): DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 1065-1066.
 - 118) 吉田博明 (1992) : キノロン耐性 MRSA から分離されたノルフロキサシン耐性遺伝子 *norA* の構造と機能. 日本臨床 **50**, 1042-1048.
 - 119) 吉田博明 (1994) : 薬剤の作用点を変える耐性機構 (1) —DNA ジャイレースのキノロン耐性変異—. 細胞工学 **13**, 888-895.
 - 120) Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Nakamura, S. (1990): Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **34**, 1271-1272.
 - 121) Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., Nakamura, S. (1991): Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 1647-1650.
 - 122) Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., Konno, M. (1990): Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. J. Bacteriol. **172**, 6942-6949.
 - 123) Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J., Nakamura, S. (1988): Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **211**, 1-7.
 - 124) Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M., Ito, H., Kojima, T., Hattori, H., Nakamura, S. (1993): Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 839-845.
 - 125) Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M., Nakamura, S. (1990): Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **34**, 1273-1275.
 - 126) Young, M., Hancock, R.E.W. (1992): Fluoroquinolone supersusceptibility mediated by outer membrane protein OprH overexpression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of a nonporin pathway. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 2365-2369.