黄色ブドウ球菌におけるマクロライド系抗生物質耐性に関する研究

松岡眞由美

北海道薬科大学微生物学教室, 〒047-0264 小樽市桂岡町 7-1

Study of Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin B Antibiotics
Resistance in *Staphylococcus aureus*

Mayumi MATSUOKA

Division of Microbiology, Hokkaido College of Pharmacy,
7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan

(Received December 22, 1999)

Macrolide antibiotics (Mac) consist of a 12- to 16-membered lactone ring combined with a sugar moiety, and they inhibit protein synthesis *via* binding to 23S ribosomal RNA in bacteria. The 14- and 16-membered Mac are used for treating infectious diseases caused by Gram-positive and other bacteria; e.g., *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter*, *Treponema pallidum* and *Mycoplasma*. Resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin-B (MLS) antibiotics in staphylococci is known to have the following mechanisms: 1) alteration of the target on ribosome due to dimethylation of a specific adenine residue in the 23S ribosomal RNA by the product of the *erm* gene, and consequently a decrease in binding of MLS antibiotics; 2) inactivation of streptogramin-B (STG-B) and lincosamide by the products of the *sbh* (encoding streptogramin B hydrolase) and *linA'* (encoding 3-lincosaminic 4-clindamycin *O*-nucleotidyltransferase) genes, respectively; and 3) active efflux of Mac and STG-B antibiotics determined by the *msrA* and *msrB* genes in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus*, respectively, both of which appear to act as an ATP-dependent efflux pump. I have shown that *Staphylococcus aureus* 8325(pEP2104) exhibits inducible resistance to PMS (partial macrolide and streptogramin B)-antibiotics [the 14-membered macrolides, erythromycin (EM), and oleandomycin (OL), and the 16-membered macrolide mycinamicin (MCM) and STG-B]. The sequence of the *N*-terminal amino acid residues of a 63 kDa protein (MsrSA) that appeared in the membrane of PMS-resistant strains was identical to that of an MsrA polypeptide related to enhanced efflux of [¹⁴C]EM. Ribosomes from PMS-resistant strains showed a similar affinity for EM to those from the PMS-sensitive host strain NCTC8325, and no inactivation of EM by 8325(pEP2104) was observed. In the present study, I showed the DNA sequence of the *msrSA* region on the constitutive PMS-resistant plasmid pMC38, PMS-inducible resistant plasmid pEP2104 and PMS-sensitive mutant plasmid pSP6, and the region that is essential for inducible expression in PMS resistance. In addition, I investigated the relationship between PMS resistance and intracellular accumulation of EM.

Key words—macrolide resistance; *Staphylococcus aureus*; *msr* gene; active efflux; ABC transporter

1. はじめに

1935年 G. Domagk によりサルファ剤が発見され、次いで1941年に Fleming が発見したペニシリンが実用化されて以来、既に半世紀を越える歳月が流れその間に多数の抗生物質あるいは合成抗菌薬(両者を併せて化学療法剤と呼ぶ)が作られ人類福祉にはかりしれぬ大きな貢献をしてきた。サルファ剤を除き抗生物質が国内で全く生産されていなかった頃、死因の大半は細菌感染症によるもので、肺炎、気管支炎、下痢腸炎、結核などによる死亡が上位を占めてきた。その後、良好な改良型サルファ剤、ペニシリン、ストレプトマイシン等の化学療法剤の生

産量の増大に伴い、細菌感染症による死亡率が激減し、化学療法剤を使う感染症の治療法は現代医学における信頼性の高い治療手段を提供してきた。この信頼性の故に化学療法剤に依存する傾向を生み、これが化学療法剤の乱用や多用を招く結果となった。一方、化学療法剤は先天あるいは後天的に宿主感染防御機能が低下した患者 (compromised host) が引き起こす日和見感染や MRSA によって必然的に新たな挑戦を受けることとなった。

筆者はこれまで、細菌感染症における一般的な黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対する、マクロライド系抗生物質耐性機構の解析に取り組んで

きた。

本総説では、黄色ブドウ球菌における従来のマクロライド抗生物質耐性機構、及びこれらとは異なる新しい耐性機構を見出したのでその背景と過程を中心に、臨床から出現しているマクロライド系抗生物質耐性菌の耐性機構について述べる。

2. マクロライド系抗生物質と既知耐性機構

マクロライド抗生物質 (Mac) は、12—16 員環のラクトン環に中性又はアミノ糖が結合した抗生物質の総称である。現在マクロライド系に属する抗生物質は 70 種以上報告されており、そのうち 14, 15 及び 16 員環ラクトンを有するものが医療用として用いられている。Mac は、リンコサマイド (LCMs: リンコマイシンとクリンダマイシン) やストレプトグ

ラミン B 群 (STG-B) 抗生物質であるミカマイシン B (MKM-B) とは化学構造が異なるものの、タンパク質合成阻害様式が類似することから、これらは総称してマクロライド系抗生物質 (MLS) と呼ばれている (Fig. 1)。MLS 抗生物質は、主にグラム陽性菌¹⁾とβ-ラクタム剤やキノロン剤が効力を示さないマイコプラズマ属に抗菌活性を示す。¹⁻³⁾

MLS は、細菌リボソームの 50S サブユニットに結合しタンパク質合成を阻害することが知られている。作用部位はリボソームであるが、詳細には rRNA (約 3kb) domain V に存在するペプチジルトランスフェラーゼ領域の 2058A と 2059A であり、*in vitro* における mutation 実験から、2058A→G の変異では 10^3 倍、2058A→U では 10^4 倍 Mac との親

Fig. 1. Structures of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Antibiotics

Table 1. Resistance Mechanisms and Genes to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Antibiotics in *S. aureus*

Resistance mechanism	Gene	Source
Methylation of 23S rRNA	<i>ermA</i> (encoding for a methyltransferase)	Tn554
	<i>ermB</i> (encoding for a methyltransferase)	pI258
	<i>ermC</i> (encoding for a methyltransferase)	pE194
Inactivation	<i>ereA</i> , <i>ereB</i> -like? (hydrolysis of 14- and 16-membered macrolides)	<i>S. aureus</i> 01A1032
	<i>sbh</i> (streptogramin B hydrolase)	pIP524
	<i>linA'</i> (3-lincosamycin, 4-clindamycin O-nucleotidyltransferase)	pIP855
Active efflux	<i>msrSA</i>	pEP2104

和性が低下すること, 2032, 2058 位の塩基変化が 2063C・2447G の塩基対を開裂させ, その結果 rRNA の立体構造を著しく変化させるという報告がある.⁴⁾ また, Dam らによると, rRNA domain II の 1198—1247 位のヘアピン構造中の mutation により, 当領域下流にコードされている E-peptide (pentapeptide) の発現量が上昇することで EM 耐性が引き起こされるとの報告もある.⁵⁾

黄色ブドウ球菌における MLS 耐性の表現型は, 1. 高濃度 MLS に常時耐性を示す構成型耐性と, 2. 感受性株の増殖が阻害されない低濃度のエリスロマイシン (EM) 又はオレアンドマイシン (OL) に触れて初めて高濃度 MLS に耐性を示す誘導型耐性の 2 つに大別⁶⁻¹¹⁾ され, 構造の異なる LCMs や STG-B にも交差耐性を示すものが多い. 耐性機構としては, (1) 薬剤の作用部位の変化, (2) 薬剤の排出促進, (3) 酵素による薬剤の不活化, の 3 機構が知られている. (1) は, MLS の標的部位の質的变化,¹¹⁻¹⁹⁾ すなわち 23S rRNA の特定アデニン残基が, *erm* 遺伝子由来のアデニンジメチラーゼによってジメチル化されリボソームと MLS の親和性が低下する. (2) は, エネルギーを消費して細胞外へ MLS を能動的に排出¹⁸⁻²⁰⁾ する. (3) は, ラクトン環エステラーゼ (*ere* 遺伝子)^{20, 21)} によるラクトン環の開裂²²⁾, ハイドrolラーゼ (*sbh* 遺伝子) による STG-B の加水分解,²³⁾ 及びヌクレオチジルトランスフェラーゼ (*linA'* 遺伝子) による LCMs の修飾²⁴⁾ 等に基づく不活化である (Table 1).

3. 臨床分離黄色ブドウ球菌の特質

臨床分離された黄色ブドウ球菌 *S. aureus* PM2104 株^{25, 26)} は, プラスミド pEP2104 上に MLS 耐性及び β -lactamase 産生能と重金属耐性を有し, 低濃度 EM 又は OL に触れて初めて高濃度 MLS に耐性を示す誘導型耐性菌で, 河野らの分類⁹⁾ に従うと B 群菌に分類される. しかし, 従来の誘導型耐性菌が EM 又は OL によって 14, 16 員環 Mac 及び LCMs や STG-B にも耐性を示す (MLS 型耐性) のに対し, *S. aureus* PM2104 は, EM 又は OL が耐性誘導剤となっても, 一部の 16 員環 Mac と LCMs には耐性を示さず表現型としては MLS 型耐性と異なっていた.

そこで耐性プラスミド pEP2104 を感受性標準株 *S. aureus* NCTC8325 に形質導入した *S. aureus* 8325 (pEP2104) 株^{25, 26)} と, 本菌から得られた構成型耐性変異株 *S. aureus* 8325 (pMC38), 感受性変異株 *S. aureus* 8325 (pSP6) を用い耐性機構の解析を行った.

3.1 最小発育阻止濃度 (MIC) これら菌株の薬剤耐性パターンをディスク拡散法で, 耐性度を定量的に示すために最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた. マイシナミシン (MCM) を選択薬剤として得た構成型耐性変異株 8325 (pMC38) は, EM, OL, MCM, MKM-B に 100, 50, 12.5, 50 μ g/ml と高度耐性を示していたが, LCMs に属する CLDM には親株 8325 (pEP2104) ないしは感受性株 NCTC8325 とほぼ同等の感受性を示していた. 8325 (pEP2104) 株にニトロソグアニジン作用させて得られた感受性変異株 8325 (pSP6) 株は, 用いたすべての MLS に感受性を示し, それは NCTC8325 とほぼ同じ値を示していた (Table 2). 8325 (pEP2104) 株は, ディスクパターンの結果からも従来の誘導型 MLS 耐性株とは著しく異なっていた (Fig. 2). すなわち 14 員環 Mac (EM, OL) と 16 員環 Mac の 1 つである MCM 及び STG-B に属する MKM-B にのみ誘導型耐性を示しており, このことは液体培地を用いた比濁法で耐性誘導剤に EM を用いた実験においても, EM, OL, MCM, MKM-B の 4 薬剤に対してのみ耐性を誘導していたことから支持される.

8325 (pEP2104) 株は一部の Mac 及び STG-B 型抗生物質にだけ耐性を示すことから, この耐性を PMS (partial macrolide streptogramin B 抗生物質)

Table 2. MIC of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Antibiotics in *S. aureus*

Strain	Antibiotic (μ g/ml)				
	EM	OL	MCM	CLDM ^{a)}	MKM-B
NCTC8325	0.39	0.78	0.20	0.39	3.13
8325(pEP2104)	100	50	0.39	0.39	3.13
8325(pMC38)	100	50	12.5	0.39	50
8325(pSP6)	0.39	0.78	0.20	0.39	3.13

a) CLDM, clindamycin

Fig. 2. Effect of EM on the Susceptibility of *S. aureus* to MLS Antibiotics and Inorganic Compounds

Abbrevs: E, erythromycin (10 µg/disk); OL, oleandomycin (10); SPM, spiramycin (20); MCM, mycinamicin (5); MKM-B, mikamycin B (25); RKM, rokitamycin (20); TL, tylosin (20); LCM, lincomycin (5); PC-G, penicillin G (5); Hg, mercuric chloride (10); Cd, cadmium sulfate (50); As, sodium arsenate dibasic (50); Pb, lead acetate (1000).

Table 3. Apparent Dissociation Constant (K_d) of EM-Ribosome Complex

Source strain of 70S ribosome	K_d (M) of EM
NCTC8325	1.7×10^{-8}
8325(pEP2104)	3.4×10^{-8}
EM-induced 8325(pEP2104) ^{a)}	2.8×10^{-8}
8325(pMC38)	9.5×10^{-9}
8325(pI258)	N. D. ^{b)}

a) PMS-resistance was induced by 1.35 µg EM/ml, an optimum concentration as the inducer.

b) K_d value could not be determined, because ribosome of this strain showed greatly low affinity due to dimethylation of a specific adenine residue in 23S rRNA.

耐性と呼んでいる。

3.2 耐性菌リボソームとEMの解離定数 耐性誘導前の 8325 (pEP2104), 耐性誘導後の 8325 (pEP2104), 構成型耐性 8325 (pMC38) 株におけるリボソームとEMの親和性を調べるため解離定数 (K_d) を求めたところ, 感受性株 *S. aureus* NCTC 8325 と同じ程度 (10^{-8} オーダー) の値を示した (Table 3). このことから, 8325 (pEP2104) 株はEMによる耐性誘導の有無にかかわらず, また構成型耐性に変異してもリボソームは感受性であることが明らかとなった。従来の構成型MLS耐性株 8325 (pI258) が, リボソームの質的变化による耐性であるため解離定数が求まらないのとは異なり, 8325 (pEP2104) から得た構成型耐性株 8325 (pMC38) 株は, 感受性株と同程度の解離定数 ($K_d = 9.5 \times 10^{-9}$) を示しリボソームレベルでの質的变化はなかった。

3.3 不活化活性の有無 各被検菌を EM 20 µg/ml 存在下で培養した上清をペーパーディスクに

しみこませ, *M. luteus* を指示菌とし残存するEMによる阻止帯形成により, 不活化活性の有無を調べた。

対照として用いた *E. coli* BM694/pAT63 株では, EM を 37°C, 24, 72 時間培養した上清には阻止帯が見られず, 不活化により EM の抗菌活性が消失していた。 *S. aureus* 8325 (pEP2104) を 72 時間培養した上清では, 感受性株 NCTC8325 と同じ大きさの阻止帯を形成し, EM の不活化は認められなかった。耐性誘導後の 8325 (pEP2104) 株の上清についても阻止帯を形成しており, 不活化活性は認められなかった (Fig. 3). [^{14}C]EM を用いて TLC を行った後のラジオクロマトグラムのパターンからも同様の結果が得られた。すなわち, EM 単独を培養液に加えたもの及び *E. coli* BM694/pAT63, 8325 (pEP2104), NCTC8325 にそれぞれ EM (20 µg/ml) を加え 24 及び 72 時間培養した。その結果, *E. coli* BM694/pAT 63 は, EM 画分に僅か 7% の放射活性しか認められず, 大部分の放射活性 (93%) は原点付近に存在した。これに対し 8325 (pEP2104), 感受性株 NCTC 8325 とともに, 生物活性を有する EM の画分に放射活性が認められた (Fig. 4)。展開溶媒をクロロホルム:メタノール:トリエチルアミン (90:10:5), 固定層を avicel に変えて行った場合も, 同様の結果が得られた。

8325 (pEP2104) 株における耐性誘導剤としての至適濃度は, EM 及び OL とともに 1.35 µg/ml であるが, 従来の誘導型MLS耐性 ISP447 株では, EM のみが誘導剤となり至適濃度は 8325 (pEP2104) 株より約 30 倍も低く 0.05 µg/ml である。また, ISP447 株では EM 含有ディスク周辺に僅かに阻止帯があ

Fig. 3. Antibacterial Activity of EM after 24 to 72 h- Incubation of *S. aureus* NCTC8325 and 8325 (pEP2104) and *E. coli* BM694/pAT63

Medium BHI containing bacterial cells (about 10^9 cells/ml) and $20 \mu\text{g}$ EM in a total volume of 0.5 ml was incubated for 24 or 72 h at 37°C , following which antibacterial activities in the supernatants of the BHI were determined in terms of a disc diffusion test.

* The cells of strain 8325 (pEP2104) whose PMS resistance were induced by EM ($1.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) also did not inactivate EM.

Fig. 4. TLC of Reaction Mixtures Containing $[^{14}\text{C}]$ EM after 24 h- or 72 h-Incubation of *S. aureus* and *E. coli*

Reaction mixtures containing the radioactive EM were incubated together with no bacteria (A, A') or *E. coli* BM694/pAT63 (B, B') or *S. aureus* 8325 (pEP2104) (C, C') for 24 (A, B and C) and 72 (A', B' and C') h. Five μl of the mixture was chromatographed on a Kieselgur 60 plate with a chloroform : methanol : ammonia water (9 : 1 : 0.1) solvent system. Radioactivity of the chromatographed samples was measured by counting on a radiochromanizer.

* A profile of the chromatogram of radioactivity in the incubated sample with *S. aureus* NCTC8325 was the same as that with the strain 8325(pEP2104).

るものの 8325 (pEP2104) 株では EM, OL とともに阻止帯は全くみられないことから, 8325 (pEP2104) 株の方が, ISP447 より耐性誘導能が高いのではないと思われる。

EM による細胞レベルすなわち発育障害の ID_{50} では, 8325 (pEP2104) 株は感受性株 NCTC8325 より 50 倍高い値を示したにもかかわらず, 細胞下レベルすなわち poly(A) 依存 polylysine 合成系では,

耐性誘導の前と後を問わずいずれのリボソームも NCTC 8325 株と同様に感受性であった。このことは, MLS 耐性 ISP447 株のように, EM で耐性誘導することで 23S rRNA の特定アデニン残基がジメチル化され薬剤との親和性が低下して耐性を示すという従来の誘導型耐性株とは異なる。これまで得られた結果は, 8325 (pEP2104) 株の耐性が, リボソームの質的变化すなわち 23S rRNA の特定アデニン残基のジメチル化に基づく耐性ではないことを示唆するものである。

4. EM の細菌細胞内蓄積

黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌の MLS 抗生物質耐性株には, 一般に薬剤の細胞内蓄積低下が認められる¹⁹⁾ ことから, PMS 耐性株についても細胞内蓄積の低下が認められるか否か検討した。

1 細胞に蓄積する EM の数を知るため, あらかじめイヌリン法により cell volume を求めたところ, *S. aureus* NCTC8325: $9.57 \times 10^{-10} \mu\text{l}/\text{cell}$, *S. aureus* 8325 (pMC38): $8.74 \times 10^{-10} \mu\text{l}/\text{cell}$, *S. aureus* 8325 (pEP2104): $6.83 \times 10^{-10} \mu\text{l}/\text{cell}$, *S. epidermidis* TPR22: $1.25 \times 10^{-9} \mu\text{l}/\text{cell}$ であった。

各被検菌につき, 各時間ごとの cell volume $1 \mu\text{l}$ 当たりの EM 蓄積量 ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) を求めた。感受性菌 NCTC8325 は EM $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 培養液中で細胞内蓄積量は $16 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ であり, 0.1 mM chlorophenylhydrazine (CCCP) 添加により $26 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ に上昇した (Fig. 5A)。耐性誘導前の 8325 (pEP2104) では細胞内蓄積量は $12 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ であり, 0.1 mM CCCP 添加により $26 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ に上昇し (Fig. 5B), 構成型耐性 8325 (pMC38) 株及び耐性誘導後の 8325 (pEP2104) では細胞内蓄積量は $8 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ であり, 0.1 mM CCCP 添加により $28 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ に上昇した (Fig. 5C)。CCCP を加えない場合と比較すると, 耐性誘導前の 8325 (pEP2104), 構成型耐性 8325 (pMC38) 株ともに感受性株より蓄積量は低下しており, またいずれの菌株も EM の細胞内蓄積量は細胞外液濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($1.4 \text{ pmol}/\mu\text{l}$: グラフ内に点線で示した) を 5—10 倍程度上回って蓄積していた。

ここでは示さなかったが, MLS 感受性変異株

Fig. 5. Effect of CCCP on Accumulation of [14 C]EM in *S. aureus* NCTC 8325 (A), 8325 (pEP 2104) (B) and 8325 (pMC38) (C) in the Presence of the Drug ($1\mu\text{g/ml}$)

* The level of EM-accumulated in induced 8325 (pEP2104) strain by EM was the same as that in 8325 (pMC38) strain.

Symbols: —●— accumulated EM in the absence of CCCP,
 ---○--- accumulated EM in the presence of CCCP,
 ----- a level of EM ($1.4\text{ pmol}/\mu\text{l}$) in the surrounding medium.

8325 (pSP6) においては、約 $18\text{ pmol}/\mu\text{l}$ の蓄積が 0.1 mM CCCP 添加により $26\text{ pmol}/\mu\text{l}$ に上昇していた。

EM の細胞内蓄積において、8325 (pEP2104) は感受性株 NCTC8325 より蓄積量が 25% 減少し、構成型 PMS 耐性株 8325 (pMC38) 及び EM 耐性誘導後の 8325 (pEP2104) 株では、NCTC8325 株より蓄積量が約 50% 減少していた。しかし、脱共役剤の 1 つである CCCP の添加により、耐性誘導前と後の 8325 (pEP2104) 及び構成型耐性株 8325 (pMC38) は感受性株とほぼ同じ程度まで蓄積量が増加した。構成型耐性菌 8325 (pMC38) の細胞内蓄積量 $8\text{ pmol EM}/\mu\text{l}$ は、実験的に求めた 1 細胞当たりのリボソーム数 3200 個すべてに、1:1 で結合した EM 量に匹敵していた。CCCP 添加により EM の蓄積量が増加

Fig. 6. 8% SDS-PAGE of Membrane Proteins Obtained from *S. aureus*

The arrows in the left and right sides show molecular weight marker (M.W.) and an apparent 63 kDa proteins, respectively. * Membrane proteins obtained from EM-induced *S. aureus* 8325 (pEP2104).

する現象は、CCCP により ATP の産生が抑制されエネルギーが不足したため、能動的な EM 排出機構が機能しなくなった結果、細胞内の EM が蓄積増加するもので、^{19, 20)} この増加量 ($10\text{ pmol EM}/\mu\text{l}$) が構成型 PMS 耐性株 8325 (pMC38) において耐性発現に寄与していると思われる。

5. PMS 耐性に関与する細胞質膜タンパク質

細胞質膜由来タンパク質の SDS-PAGE を Fig. 6 に示した。耐性誘導後の 8325 (pEP2104) 及び 8325 (pMC38) 株由来細胞質膜タンパク質では、63 kDa 膜タンパク質 (MsrSA) が、耐性誘導前の 8325 (pEP 2104) 由来の細胞質膜タンパク質に比べ著しく増大していた。一方、感受性菌 NCTC8325、MLS 感受性変異株 8325 (pSP6) 及び MLS 耐性株 8325 (pI258) 由来細胞質膜画分のタンパク質に MsrSA はほとんど観察されなかった。このことから 63 kDa タンパク質すなわち MsrSA が PMS 耐性に関与していることが示唆された。

EM で耐性誘導した 8325 (pEP2104) 株の MsrSA タンパク質の N 末端アミノ酸配列 31 個を決定したところ、米国及び英国で臨床分離された 14 員環 Mac に耐性を示す表皮ブドウ球菌に見出された細胞質膜タンパク質 MsrA のアミノ酸配列と全く一致していた (Fig. 7)。

表皮ブドウ球菌由来の誘導型 EM 耐性遺伝子から推定された 2 つの ATP 結合領域を持つ MsrA タンパク質は、脱共役剤 (2,4-ジニトロフェノール、ヒ酸) により EM の細胞内蓄積が増大すること、及び

	1	11	21	31
MsrSA*	MEQYTIKFNQ	INHKLTDLRS	LNIDHLYAYQ	F
MsrA	MEQYTIKFNQ	INHKLTDLRS	LNIDHLYAYQ	F

Fig. 7. Sequence Alignment of 31-NH₂ Terminal Amino Acids of MsrSA and MsrA Proteins

* The protein was obtained from the cell membrane of EM-induced 8325 (pEP2104)

Fig. 8. Restriction Maps of pMC38 and pI258²⁹⁾

Markers are as follows: *BlaI* and *blaZ*, β -lactamase inducibility and structural loci, respectively; *asa*, *asi* and *ant*, resistance to arsenate, arsenite and antimony ions, respectively; *ermB*, constitutive MLS resistance to erythromycin; *incl*, *repA* and *ori*, incompatibility, plasmid replication control, and origin of replication, respectively; *merA*, mercuric reductase; *merB*, organomercurial hydrolase; *cad*, resistance to cadmium. S, *Sal*I; P, *Pst*I; B, *Bgl*II; X, *Xba*I.

薬剤が効力を示さなくなった癌細胞から薬剤耐性細菌細胞にいたるまで共通に見出されるスーパーファミリータンパク質²⁷⁾と類似することから、EMを能動的に排出するポンプと考えられている。²⁰⁾

一方、耐性誘導後の8325 (pEP2104) 株に顕著に増大する細胞質膜タンパク質 MsrSA のアミノ酸配列は、MsrA タンパク質 (56 kDa) のN末端31アミノ酸が一致していた²⁸⁾ことから、黄色ブドウ球菌から見出された MsrSA タンパク質も PMS 抗生物質を能動的に排出するタンパクとして機能していると思われる。

6. PMS 耐性遺伝子のクローニング

PMS 耐性遺伝子をクローニングするため、plasmid pEP2104 及び pMC38DNA の制限酵素地図を作成し、構成型 MLS 耐性菌 *S. aureus* 8325 (pI258)^{29, 30)} との比較より PMS 耐性遺伝子の局在部位を推定した。

構成型 MLS 耐性 plasmid pI258 の制限酵素地図の比較では (Fig. 8), 両者の制限酵素による切断パターンが広範囲にわたって類似しているのが認められ、*Pst*I-*Sal*I 消化断片の fragment C に相当する部分に PMS 耐性遺伝子が存在していると推定した。pI258 の MLS 耐性をコードするトランスポゾン Tn551 に相当する領域が、pEP2104 では欠失していた。つまり *Pst*I では1カ所、*Sal*I では2カ所、*Bgl*II では3カ所、*Xba*I では1カ所の制限酵素認識部位が欠失しており、それ以外の部分である水銀 (*merA*, *merB*) やカドミウム (*cad*), 鉛 (*lea*) などの重金属耐性及び β -lactamas (*blaZ*, *blaI*) 耐性部分は全く同じ

Table 4. MIC of Antibiotics against *S. aureus* and *E. coli*

Strains	Antibiotic (μ g/ml)			
	EM	OL	MCM	MKM-B
<i>S. aureus</i>				
NCTC8325	0.39	0.39	0.05	1.56
8325(pEP2104)	50	25	0.39	3.13
8325(pMC38)	100	50	12.5	50
RN4220	0.39	0.39	0.05	1.56
4220(pMR504)	100	6.25	12.5	25
<i>E. coli</i>				
JM109	50	>100	12.5	>100
JM109(pMU504)	50	>100	12.5	>100

切断パターンを示していた。

Fragment C を大腸菌とのシャトルベクター pRIT 5 に構築して得られた *S. aureus* RN4220 (pMR504) 株では、宿主 RN4220 株より高い MIC 値 (6.2—100 μ g/ml) (Table 4) を示し、構成型 PMS 耐性株 8325 (pMC38) と同程度の耐性を発現していた。しかし、*E. coli* JM109 株を宿主とした JM109 (pMU504) では、宿主と同じ MIC 値を示し大腸菌内での fragment C の耐性発現は認められなかった。

PMS 耐性遺伝子を黄色ブドウ球菌にクローニングして得られた 4220 (pMR504) 株では、サザンハイブリダイゼーションで遺伝子の存在を確認し、SDS-PAGE にて細胞質膜タンパク質の発現を確認した。これより、8325 (pEP2104) 及び 8325 (pMC38) 株由来 plasmid では、構成型 MLS 耐性 pI258 の

Tn551 に相当する部分が欠失したところに PMS 耐性遺伝子は何らかの形で挿入されたと考えられる。

7. DNA 塩基配列決定

誘導型耐性 *S. aureus* 8325 (pEP2104) 株, 構成型耐性変異株 *S. aureus* 8325 (pMC38), 感受性変異株 *S. aureus* 8325 (pSP6) のマクロライド系薬剤耐性に関与する DNA の塩基配列を決定した。

各菌の fragment C に対応する部分の DNA 塩基配列とその open reading frame (ORF) を (Fig. 9) に示した。構成型耐性変異株 *S. aureus* 8325 (pMC38) において *Pst*I site 下流約 3 kb から PMS 耐性に関与する全長約 2 kb の ORF が存在していた。この ORF は, Ross らが報告している *S. epidermidis* 968 (pUL5050) の塩基配列 *msrA* と一致していた。²⁰⁾ *msrA* は, 表皮ブドウ球菌における EM と STG-B の排出遺伝子で, グルタミンを多く含む Q-linker³¹⁾ をはさみ N 末端側と C 末端側に 2 つの ATP-binding domain が存在している。この 2 つの ATP-binding domain を含む ORF (1545 bp) のアミノ酸 hydrophobicity は -0.57 であり, 膜貫通領域 (membrane spanning domain: MSD) は有していなかった。488 アミノ酸の中で, ATP-binding domain の N 末端側 (26 番から 174 番目のアミノ酸) と C 末端側 (320 番から 480 番目のアミノ酸) では疎水性部分と親水性部分が平均して存在している。2 つの ATP binding domain に挟まれた Q-linker 部分 (184 番から 264 番目のアミノ酸) ではほとんどのアミノ酸が親水性を示し, 細胞質の中に露出した形で存在してい

と思われる。また, 38—45 番目と 331—338 番目のアミノ酸には ATP-GTP binding のモチーフが存在し, 410—424 番目には ABC-transporter³²⁾ とのホモロジーがあるものの MSD としての機能ではないようである (Fig. 10)。

pMC38 DNA は構成型 PMS 耐性変異遺伝子であり, 誘導型耐性 plasmid pEP2104 と比較すると調節領域に相当する部分で 44 bp の欠失が見られた (Fig. 9, 10)。44 bp の配列は, AGGAGGATTAAA-ATGACAGCTTCTATGAGACTCAAATAAACCTT で, 下線部において 8 個のリーダーペプチド (MTASMLRK) が合成されており, この配列は *MsrSA* タンパク質の上流 226 bp に存在していた。誘導型 MLS 耐性遺伝子 *erm* gene の上流に位置するリーダーペプチドは, mRNA の立体構造 (stem loop) に変化を与えることで MLS 型耐性の誘導発現に関与している¹⁴⁾ とされている。Fig. 11 に示したように下線で示した配列 (inverted repeat) 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 で stem loop 構造が形成された後, 誘導剤としての EM によって立体構造が崩れたとしても, MLS 型耐性のように 2-3, 4-5, 6-7 が再び stem loop 構造をとる可能性は低く, この場合 stem loop 構造をとらずに RBS2 がオープンの状態で存在していなければ *MsrSA* タンパク質は合成されないことから, PMS 耐性の誘導発現メカニズムは, MLS 型耐性とは異なった誘導耐性機構を有しているものと考えられる。

薬剤耐性がエネルギーを用いた排出によることの

Fig. 9. Schematic Diagram of the 5.04-kb *Sal*I/*Pst*I Fragment (Fragment C) in Plasmid pEP2104 (a), pMC38 (b), and pSP6 (c)

The 44-bp nucleotides (*) that included RBS1 and leader peptide (MTASMLRK) were deleted from pEP2104. ** indicates a location for pSP6 different from that for pEP2104.

MsrA	1	MEQYTIKFNQINHKLTLRLSLNIDHLYAYQFEKIALIGGNGTGKTTLLNMIAQKTKPESG	60
MsrB	1	-----	0
MsrSA'	1	MEKYTIKFNQINHKLTLDFRSLNIENLYAYQFEKIALIGGNGTGKTTLLNMIAQKTKPESG	60
		 Walker A	
MsrA	61	TVETNGEIQYFEQLNMDVENDFNTLDGSLMSELHIPMHTTDSMSGGEKAKYKLRNVISNY	120
MsrB	1	-----	0
MsrSA'	61	TVETDGEIQYFEQLNMDVENDFNTLDGSLMSELHIPMHTTDSMSGGEKAKYKLANVISNY	120
		 Walker B	
MsrA	121	SPILLLDEPTNHLDKIGKDYLNILKYYYGTLLIVSHDRALIDQIADTIWDIQEDGRTIRV	180
MsrB	1	-----	0
MsrSA'	121	SPILLLDEPTNHLDKIGKDYLNILKYYYGTLLIVSHDRALIDQIADTIWDIQEDGRTIRV	180
			
MsrA	181	FKGNYTQYQNYEQEQLQQRKYEYISEKQRLSQAKAKRNQAQQAASSKQKNKSIA	240
MsrB	1	-----	0
MsrSA'	181	FKGNYTQYQNYEQEQLQQRKYEYISEKQRLSQAKAKRNQAQQAASSKQKNKSIA	240
			
MsrA	241	PDRLSASKEKGTVEKAAQQAQKHTEKRMHLEEEVKPQSYHEFNFPQNKIYDIHNNYPII	300
MsrB	1	-----	0
MsrSA'	241	PDRLSASKQKGTVEKAAQQAQKHTEKRMHLEEEVKPQSYHEFNFPQNKIYDIHNNYPII	300
			
MsrA	301	AQNLTLVKGSQKLLTQVRFQIPYGNIALVGANGVGKTTLLAIYHQIEGIDCSPKVQMA	360
MsrB	1	-----MLTQVRFQIPYGNIALVGANGVGKTTLLAIYHQIEGIDCSPKVQMA	48
MsrSA'	301	AQNLTLVKGSQKLLTQVRFQIPYGNIALVGANGVGKTTLLAIYHQIEGIDCSPKVQMA	360
		***** Walker A *****	
MsrA	361	YYRQLAYEDMRDVSLQLYLMDETSSSESFSRAILNGLNEALERSCNVLSGGERTKLSL	420
MsrB	49	YYRQLAYEDMRDVSLQLYLMDETSSSESFSRAILNGLNEALERSCNVLSGGERTKLSL	108
MsrSA'	361	YYRQLAYEDMRDVSLQLYLMDETSSSESFSRAILNGLNEALERSCNVLSGGERTKLSL	420
		***** Walker B *****	
MsrA	421	AVLFSTKANMLILDEPTNFDIKTLEALEMFMNKYPGIIIFTSHDTRFVKHVSDDKKWELT	480
MsrB	109	AVLFSTKANMLILDEPTNFDIKTLEALEMFMNKYPGIIIFTSHDTRFVKHVSDDKKWELT	168
MsrSA'	421	AVLFSTKANMLILDEPTNFDIKTLEALEMFMNKYPGIIIFTSHDTRFVKHVSDDKKWELT	480
		***** Walker B *****	
MsrA	481	GQSIHDIT	488
MsrB	169	GQSIHDIT	176
MsrSA'	481	GQSIHDIT	488

Fig. 10. Comparison of the Deduced Amino Acid Sequences of the EM Resistance Determinant of MsrSA' from *S. aureus* with Those of MsrB from *S. xyloso*s and MsrA from *S. epidermidis*

The ATP-binding domains are boxed and the motifs (Walker A and B) are underlined. The Q-linker is boxed with a dotted line. An indicated arrow represents a position that an amino acid residue of MsrSA' doesn't fit into that of MsrA.

例は、早くからテトラサイクリンの場合でみられているが、近年、数多くの薬剤排出系が様々な菌種で見出され、化学療法剤耐性機構として認識されつつある。

薬剤排出タンパク質は、アミノ酸一次配列の相同性や推定される二次構造から、4つのグループに分けられている。³³⁾ 1. H⁺ 共役型排出系: 12 本貫通型, 14 本貫通型に分類. 2. RND (resistance-nodulation-devision) ファミリー: 細胞内在性タンパク質とペリプラズム空間のタンパク質とが関与する系で、薬剤の細胞質膜の透過性と外膜が直結. 3. 4 本貫通領域から構成される小さなタンパク質. 4. ABC (ATP-

binding cassette) 輸送体ファミリー: 機能的には哺乳動物の P 糖タンパク質に類似しており、ATP 加水分解に依存した薬剤排出を行う。

1—4 はいずれも細胞質膜に存在し、薬剤排出のエネルギー源として H⁺ の電気化学的勾配を用いる 1—3 と、ATP を用いる 4 との 2 種類があり、MsrA 及び MsrSA タンパク質は ATP 結合部位を 2 カ所持つことから後者に分類される。

1 つの ORF に ATP-binding motif の consensus sequence- (A, G) XXXXGK (S, T)- が 2 つ存在 (duplicated domain) するものとしては、Mac を産生する放線菌におけるタイロシン耐性の *tlrC*、カルボマ

Fig. 11. Multiple Alignment of the Promoter Regions of the PMS-Resistant Genes of pEP2104, pMC38, and pSP6 from *S. aureus*

The position of a hairpin-like structure is indicated by horizontal arrows. Gaps are indicated by hyphens. The putative -35, -10 regions and ribosome binding sites (RBS1 and 2) are shown. Positions with identical nucleic acids are marked by asterisks. A vertical arrow indicates the location of a single nucleotide change in the RBS1 of pSP6 which fails to code for PMS resistance. The numbers of nucleotides were numbers in the Accession No.

イシシ耐性の *carA*, スピラマイシン耐性の *srnB*,³⁴⁾ オレアンドマイシン耐性の *oleB*,³⁵⁾ や, EM 産生菌に存在する *ErtX*,³⁶⁾ 黄色ブドウ球菌のストレプトグラミン A 抗生物質耐性 *vga*,³⁷⁾ 人における抗ガン剤耐性 *mdr*,^{27, 33)} などがある。これに対し, ATP-binding domain が 1 つのみ (single domain) 存在するものは, オレアンドマイシン耐性の *oleC*,³⁸⁾ ポリケタイド-ポリエテル系抗生物質テトラサイクリン耐性の *tnrB*,³⁸⁾ 大腸菌におけるヘモリジン exporter の *HylB*,³⁸⁾ ダウノルビシン, ドキソルビシン産生菌での *DrrA*,³⁸⁾ *Staphylococcus xylosus* の EM 耐性 *msrB*,³⁹⁾ などがある。

抗生物質を産生する放線菌における ABC-transporter の存在は, 自己をその抗生物質の効果から保護するためのものと思われるが, 耐性発現に関与していない場合もみられる。また, 癌細胞において ATP の分解と共役して薬剤を排出する P 糖タンパク質は, 抗ガン剤に対する多剤耐性 (multi drug resistance: MDR) の原因となっているが, これも正常細胞での存在がいくつか知られている。²⁷⁾ P 糖タンパク質や生体アミン輸送体といった, 細菌, 放線菌の薬剤排出タンパク質と高い相同性を持つ薬物輸送体が近年報告されつつあり, これらは生物に普遍的に存在する薬剤排出タンパク質あるいは生体にお

ける異物の認識排除機構の担い手であるとも考えられ, ABC-transporter の存在だけで耐性を議論するのではなく, 各々の関連タンパク質の生化学的機能の解析が必要である。

菌種に特徴的に認められる GC 含量は, *S. aureus* では 32—36%, *S. epidermidis* では 30—37%, *S. xylosus* では 30—36%, *E. coli* では 48—52 であり, 放線菌では約 70% の高い GC 含量である。pMC38 における *Pst*I/*Sal*I site (fragment C) の中に存在する *msrSA* の GC 含量は 30% であることから, 本プラスミドの起源は表皮ブドウ球菌である可能性が高い。このことは, DNA の塩基配列におけるホモロジー検索の結果, *msrSA* の 3' 末端側で *S. epidermidis* plasmid pT | 32⁴⁰⁾ と *S. epidermidis pep gene*⁴¹⁾ にホモロジーがあったことから示唆される。さらに *Enterococcus faecalis* Tn5384,⁴²⁾ *S. aureus* pI258 arsenic-efflux pump gene⁴³⁾ 及びマクロライド系耐性遺伝子 (*erm*) をもつ Tn551 のインサージョンサイト⁴⁴⁾ にもホモロジーが認められた。

抗生物質を産生する放線菌に見出された薬剤排出タンパク質は, 細菌の排出タンパク質と類似しその起源のひとつと考えられるが, GC 含量で大きな差があったことより plasmid pEP2104 の PMS 耐性遺伝子は, Mac 産生放線菌由来であったとしてもかな

り変化しているようであり、むしろ表皮ブドウ球菌由来 *msrA* 遺伝子が MLS 耐性 plasmid pI258 上の Tn551 と入れ替わった結果できたプラスミドと考えられる。また、*S. xyloso*³⁹⁾ において *msrB* (C末端 ATP-binding domain のみを保有) が分離 (Fig. 10) されたことは、*msr* 遺伝子がブドウ球菌属の中で拡大しつつある遺伝子であることを示唆している。

8. 究極のマクロライド耐性菌の出現

1971 年日本で分離された Mac 耐性 MS8968 が保有する plasmid pMS97 は、EM を誘導剤とすると全ての薬剤に D 型の発育阻止帯を形成し、OL を誘導剤とすると MCM, MKM-B にのみ D 型阻止帯を形成していた。⁴⁵⁾ この結果より、plasmid pMS97 上には、EM のみが誘導剤となる C 群菌の MLS 耐性

(*erm* gene) と、EM, OL により MCM, MKM-B が耐性誘導される PMS 耐性 (*msrA* gene) の 2 つの遺伝子を有しているものの、*erm* gene の耐性発現が優勢となりこのような耐性発現をしているものと思われる (Fig. 12)。Plasmid pMS97 上の Mac 耐性遺伝子の DNA 塩基配列の結果から、Mac の不活化に関する新たな耐性遺伝子 *mphBM* の存在が明らかとなった。⁴⁶⁾ *mphBM* 遺伝子は、大腸菌における Mac 不活化 (リン酸化) 遺伝子 *mphB* と 50% のホモロジーがあるものの、Mac が抗菌活性を示す黄色ブドウ球菌ではこれまで見出されていなかった。同一 plasmid に *erm* gene と *msrA* gene を持つ耐性ブドウ球菌の報告はあるものの、新たに *mph* gene が加わることですべての MLS 耐性機構 (能動的排出, 不活化, リ

Fig. 12. Effect of EM and OL on the Susceptibility of *S. aureus* MS15009 (pMS97) to MLS Antibiotics and Inorganic Compounds

The amount of all drugs and chemicals impregnated in disks were as follows: EM and E, erythromycin (10 µg/disk); OL and O, oleandomycin (10); SPM, spiramycin (20); MCM, mycinamicin (5); MKM-B, mikamycin B (25); RKM, rokitamycin (20); YM133, 4'-O-(4-methoxyphenyl)acetyltylosin (25); PC-G, penicillin G (5); Hg, mercuric chloride (10); Cd, cadmium sulfate (50); As, sodium arsenate dibasic (50); Pb, lead acetate (1000); LCM, lincomycin (2).

Fig. 13. Structure of Macrolide Antibiotics in Four Generations

ボソームのメチル化)が出揃ったことになり、これは究極の耐性菌の出現といっても過言ではない。

9. マクロライド系薬剤の効果改善

14-, 16- 員環 (それぞれ第一, 第二世代) Mac に加え, 近年 14- 員環 EM の構造をもとにした半合成 Mac のクラリスロマイシン, ロキシスロマイシン, アジスロマイシン (第三世代) が開発され, これらは EM より酸に安定で薬物動態 (半減期延長や組織移行性) の改善がみられ, AZM では *E. coli* にも抗菌力を示すなど抗菌スペクトルが拡大している。第四世代と呼ばれるケトライドは C3 位の中性糖がケトンになった誘導体であり (HMR3647), 酸に安定なことに加え構成型 MLS 耐性 *Streptococcus* 属に有効である (Fig. 13)。

10. おわりに

マクロライド系抗生物質に誘導型耐性を示す黄色ブドウ球菌 *S. aureus* 8325 (pEP2104) は, 1977 年に Hungary で分離され従来の誘導型耐性とは異なる表現型 (PMS 型耐性) を示していた。著者は, 本菌株の Mac に対する特異な耐性機構解明のため詳細な検討を加えるとともに, 日本においてこれまで本菌のような耐性を示す黄色ブドウ球菌の報告がなかったことから, 臨床で分離された保存菌株 (1970—1990 年) の中より, *S. aureus* 8325 (pEP2104) 類似の表現型耐性を示す菌の存在の有無を検討してきた。本邦における遡及調査の結果, 1971 年に *S. aureus* MS15009 (pMS97), 1983 年に MS13368 が出現しており, Hungary で分離された菌より 6 年も早い時期 (1971 年) に能動的排出による MLS 耐性を獲得していたことが判明した。

Plasmid pEP2104 の PMS 耐性遺伝子は保育園を中心とし突発的に流行した感染症の起原因由来であり, 同じ形質発現をする黄色ブドウ球菌が同時に 27 株分離されたが, 起源は 1 種類と考えられている。⁴⁷⁾ 日本でのこの耐性型を示す分離株が少ない理由としては, 14 員環 Mac である EM, OL が耐性誘導能を有するため医療の現場で第一次選択化学療法剤としての役割を終え, 16 員環 Mac が使用されてきた結果と推定している。しかし, 現在 14 員環半合成 EM (ロキシスロマイシン, クラリスロマイシンなど) が現在医療に使用されるようになってきており, 今後 PMS 耐性株の出現が増大する可能性は大きい。

筆者が決定した *msrSA*⁴⁸⁾ と Ross らの *msrA* とは, 同じ DNA 塩基配列の ATP binding domain を有すること, CCCP を作用させた PMS 耐性菌で薬剤の蓄積量増加が認められたことから, 能動的排出はブドウ球菌に共通の耐性機構と考えられる。しかし, 現在のところブドウ球菌属において薬剤排出における直接的な証明はなく, ①作用させた細胞外の EM 濃度よりも高濃度の EM を細胞内に蓄積している, ②pK_a 値 8.6 以上を有する Mac にのみ PMS 耐性を

示す, ③感受性株や MLS 型耐性株においても, CCCP の濃度に依存して EM 蓄積量が増加するの何故か—という疑問が残る。

ブドウ球菌に限らず他の耐性菌においても既知耐性機構に縛られることなく, 耐性機構の解明がなされることがより効果的な耐性菌克服へつながるものと筆者は信じている。このような状況をふまえ, 院内感染防止はもちろんのこと不適切な化学療法剤の使用による耐性菌の出現・拡大を抑制するよう努めるとともに, 新規化学療法剤の開発や薬剤耐性機構に関する研究の一層の充実化が望まれる。

謝辞 本研究を遂行するにあたり終始ご懇篤なご指導, ご鞭撻を賜りました中島良徳 元北海道薬科大学教授に深謝いたします。

本総説における筆者の研究において, ご協力いただきました北海道薬科大学微生物学研究室・遠藤菊太郎講師, 本研究室において共に研究を遂行した大学院修士終了者であります齊藤志織, 加藤三佳, 八木菊野, 藤本育也諸氏に心から謝意を表します。DNA 塩基配列の決定に際し, 終始ご指導ご鞭撻をいただきました札幌医科大学微生物学教室の皆様, 臨床分離株を分与していただきました National Center for Epidemiology, Hungary の Dr. László Jánosi 及び群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設・伊豫部志津子助教授に万謝致します。

REFERENCES

- 1) Kondo M., Oishi T., Tsuchiya K., Goto S., Kuwahara S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**, 149–155 (1973).
- 2) Omura S., Tanaka H., “Macrolide Antibiotics,” ed. by Omura S., Academic Press, New York, 1984, p. 351, 509.
- 3) Hardy D. J., Hensey D. M., Beyer J. M., Vojtko C. E. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 1710–1719 (1988).
- 4) Douthwaite S., Aagaard C., *J. Mol. Biol.*, **232**, 725–731 (1993).
- 5) Dam M., Douthwaite S., Tenson T., Mankin A. S., *J. Mol. Biol.*, **259**, 1–6 (1996).
- 6) Weisblum B., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 797–805 (1995).
- 7) Leclercq R., Courvalin P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1267–1272 (1991).
- 8) Weaver J. R., Pattee P. A., *J. Bacteriol.*, **88**, 574–580 (1964).
- 9) Kono M., Hashimoto H., Mitsushashi S., *Jpn. J. Microbiol.*, **10**, 59–66 (1966).
- 10) Garrod L. P., *Br. Med. J.*, **2**, 57–63 (1957).
- 11) Lai C. J., Weisblum B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 856–860 (1971).

- 12) Gryczan T. J., Grandi G., Hahn J., Grandi R., Dubnau D., *Nucleic Acids Res.*, **8**, 6081–6096 (1980).
- 13) Weisblum B., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 577–585 (1995).
- 14) Horinouchi S., Weisblum B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 7079–7083 (1980).
- 15) Dubnau D., Monod M., “The regulation and Evolution of MLS Resistance,” Levy S. B., Novic R. P. eds. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986, pp. 369–387.
- 16) Lampson B. C., Parisi T., *J. Bacteriol.*, **167**, 888–892 (1986).
- 17) Murphy E., *J. Bacteriol.*, **162**, 633–640 (1985).
- 18) Lampson B. C., David W., Parisi J. T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 653–658 (1986).
- 19) Goldman R. C., Capobianco J. O., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1973–1980 (1990).
- 20) Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J., Baumberg S., Wootton J. C., *Molecul. Microbiol.*, **4**, 1207–1214 (1990).
- 21) Wondrack L., Massa M., Yang B. V., Sutcliffe J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 992–998 (1996).
- 22) Arthur M., Brisson-Noël A., Courvalin P., *J. Antimicrob. Chemother.*, **20**, 783–802 (1987).
- 23) Leclercq R., Courvalin P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1273–1276 (1991).
- 24) Brisson-Noël A., Delrieu P., Samain D., Courvalin P., *J. Biol. Chem.*, **263**, 15880–15887 (1988).
- 25) János L., Bán É., “The Presence and some Properties of Macrolide-Penicillin Resistance Determining Plasmids in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in Hungary in 1977,” Zbl. Bakt. (Suppl. 10) 581, New York, 1981.
- 26) János L., Bán É., *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **29**, 187–200 (1982).
- 27) Tsuruo T., *Yakugaku Zasshi*, **115**, 513–522 (1995).
- 28) Matsuoka M., Endou K., Saitoh S., Katoh M., Nakajima Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1482–1486 (1995).
- 29) Murphy E., Novick R. P., *J. Bacteriol.*, **141**, 316–326 (1980).
- 30) Lyon B. R., Skurray R., *Microbiol. Rev.*, **51**, 88–134 (1987).
- 31) Wootton J. C., Drummond M. H., *Protein Engineering*, **2**, 535–543 (1989).
- 32) Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Baumberg S., *Gene*, **153**, 93–98 (1995).
- 33) Nikaido H., *Science*, **264**, 382–388 (1994).
- 34) Schoner B., Geistlich M., Rosteck P. Jr., Rao R. N., Seno E., Reynolds P., Cox K., Burgett S., Hershberger C., *Gene*, **115**, 93–96 (1992).
- 35) Aparicio G., Buche A., Mendez C., Salas J. A., *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 157–162 (1996).
- 36) O'Neill M. P., Eady E. A., Radford A., Baumberg S., Cove J. H., *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 189–195 (1995).
- 37) Allignet J., Loncle V., EL Solh N., *Gene*, **117**, 45–51 (1992).
- 38) Linton K. J., Cooper H. N., Hunter I. S., Leadlay P. F., *Molecul. Microbiol.*, **11**, 777–785 (1994).
- 39) Milton I. D., Hewitt C. L., Harwood C. R., *FEMS Microbiol. Lett.*, **97**, 141–148 (1992).
- 40) Peschel A., Goetz F., *J. Bacteriol.*, **178**, 531–536 (1996).
- 41) Meyer C., Bierbaum G., Heidrich C., Reis M., Suling J., Iglesias-Wind M. I., Kempter C., Molitor E., Sahl H.-G., *Eur. J. Biochem.*, **232**, 478–489 (1995).
- 42) Rice L. B., Carias L. L., Marshall S. H., Bonafede M. C., *Plasmid*, **35**, 81–90 (1996).
- 43) Ji G., Silver S., *J. Bacteriol.*, **174**, 3684–3694 (1992).
- 44) Sohail M., Oldridge M., Dyke K. G. H., *FEMS Microbiol. Lett.*, **127**, 165–170 (1995).
- 45) Matsuoka M., János L., Endou K., Nakajima Y., *FEMS Microbiol. Lett.*, **181**, 83–90 (1999).
- 46) Matsuoka M., Endou K., Kobayashi H., Inoue M., Nakajima Y., *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**, 221–227 (1998).
- 47) János L., Nakajima Y., Hashimoto H., *Microbiol. Immunol.*, **34**, 723–735 (1990).
- 48) Matsuoka M., János L., Endou K., Nakajima Y., *FEMS Microbiol. Lett.*, **181**, 91–100 (1999).