Citrobacter freundii の セファロスポリナーゼ 誘導産生機構に関する研究

村山琮明

1984年2月

Citrobacter freundii 🔿

セファロスポリナーゼ 誘導産生機構に関する研究

村 山 琮 明

1984年2月

目次

総論の部

序	論		•	•	•	•	٠	•	•	*	•	•	•	•	•	•	•	٠	•	•	•	1
第	1	章	,	<u>Ci</u>	tr	<u>o b</u>	<u>a c</u>	te	<u>r</u>	<u>fr</u>	e u	<u>n d</u>	<u>i i</u>	G	N 3	46	Ø	セ	フ	ፓ	D	
				ス	ポ	ij	ナ	******	ゼ	遺	伝	子	Ø	Þ	D	·	ش	ン	グ	بح	構	
				造	解	析	•	•		•	•	•			•	•	•	•	•	•	•	11
	第	1	節		<u>Ci</u>	tr	o b	a c	te	r	<u>fr</u>	eu	n d	<u>i i</u>	G	N 3	46	Ø	セ	フ	ア	
					n	ス	ポ	ij	ナ	_	ゼ	遺	伝	子	Ø	ク	n		=	ン	グ	11
	第	2	節		ク	п	*****	ت	ン	グ	\$	n	た	乜	フ	ア	n	ス	ポ	ŋ	ナ	
						ゼ	遺	伝	子	Ø	確	認		•	•			•				12
	第	3	節		рT	¥7	1	Ø	制	限	酵	素	切	断	地	図	Ø	作	成	•	•	17
	第	4	節		構	造	遺	伝	子	の	限	定	•	٠	٠	•				٠		35
第	2	章		Ci	tr	ob	ас	te	r	fr	eu	nd	ii	G	N 3	46	Ø	セ	フ	ア	D	
						.,			_				産									
				機	構	の	解	析	•	•						•						47
	第	1	節										nd									
		_											誘		•							47
	第	2	節										nd									
	~!~	•	- SAPP																		~	
																						57

	第	3	節		欠	失	変	異	体	を	用	l,	た	誘	導	産	生	機	構	Ø	解	
					析	•	•	•	•	•	•	٠	•	• ,	•	•	•	•	•	•	•	60
第	3	章		他	Ø	グ	ラ	ム	陰	性	腸	内	細	菌	種	に	お	け	る			
				<u>C i</u>	tr	o b	ас	te	r	fr	eu	n d	<u>i i</u>	G	N3	46	Ø	セ	フ	ア	n	
				ス	米	IJ	ナ	-	ゼ	遺	伝	子	Ø	発	現	•	•	•	•	٠	•	73
	第	1	節		他	菌	種	^	Ø	<u>Ci</u>	tr	ob	ас	te	r	<u>fr</u>	eu	n d	i i			
					GN	34	6	Ø	セ	. フ	ア	n	ス	ポ	IJ	ナ	-	ゼ	遺	伝	子	
					Ø	導	入	ዾ	そ	Ø	発	現	•	•	•		•	•			٠	75
	第	2	節		Es	сh	er	iс	hi	<u>a</u>	co	1 i	染	色	体	変	異	株	C 6	00	M2	
					Ø	分	離	٤	そ	の	性	質	•				•			•		86
	第	3	節		C6	00	M2	変	異	Ø	染	色	体	£	Ø	7	ッ	مع	ン	グ	•	97
結	論		•	•		٠	•		٠	•	•			•	•	•			•			107
謝	辞			•	٠		•		•		•				•			•		•	•	114
芝	題	棄	Q.	Ð	끕	B																
I	•	実	験	材	料																	
	(1)		菌	株	•	•	•		•	٠		•	•	•	•	•	٠	•		٠		115
	(2)		プ	ラ	ス	ì	۴		•	•	•		•	•		•	•		٠	•		115
	(3)		バ	ク	テ	ij	才	フ	ア		ジ				•	•	•	•	•		•	115
	(4)		培	地				•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•.	•	117
	(5)		薬	剤			•	•	•		•	. •		•	•	•		•	•	•		120

	(6)		酵	素	試	料	•	•	٠	٠	٠	•	•	•	٠	•	•	•	•	•	• .	121
	(7)		電	戾	泳	動	用	`	遺	伝	子	操	作	用	試	薬	•	•	•	• •	٠	121
	,																					
П		実	験	方	法																	
	1)	接	合	伝	達	•,	4	•	٠	٠	•	•	•	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	123
	2)	形	質	転	换	•	•	٠	•	٠	•	٠	•	•	•	•	•	•	•	•	123
	3)	形	質	導	入	•	•	•	•	•	٠	•	•	•	٠	٠	•	•	•	•	124
	4)	穾	然	変	異	体	Ø	分	離	•	•	•	٠	•	•	•	• ·	•	•	•	125
	5)	コ	IJ	シ	ン	E 1	Ø	調	製	法	•	•	٠	•	•	•	•	•	•	•	126
	6)	コ	ŋ	シ	ン	E1	産	生	能	Ł	免	疫	能	•	٠	•	•	•	•	•	126
	7)	染	色	体	D N	A	Ø	調	製	٠	٠	٠	•	٠	•	•	•	•	٠	•	127
	8)	プ	ラ	ス	ï	۴	DN	A	Ø	調	製	法	*****	塩	化	セ	シ	ゥ	ム	法	128
	9)	プ	ラ	ス	ï	۴	DN	A	Ø	調	製	法		·簡	易	法	٠	٠	٠	٠	130
	10)	D N	A	Ø	制	限	酵	素	に	ょ	る	切	断	•	• .	•	٠	٠	•	•	132
	11).	DN	A	Ø	ア	ガ	u	_	ス	ゲ	ル	電	戾	泳	動	*	•	•	•	•	134
	12)	コ	п	۳	•	溶	菌	法	を	用	ţì	た	プ	ラ	ス	ì	۴	D N	A	Ø	
		•	検	出	• ,	•	•.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	٠	٠	٠	135
	13)	D N	A	フ	ラ	グ	メ	ン	ŀ	Ø	ク	n	100-0	۳	ン	グ	٠	•	•	٠	136
	14)	制	限	酵	素	に	ょ	る	欠	失	プ	ラ	ス	ï	۴	Ø	作	成	•	•	137
	15)	薬	剤	耐	性	度	Ø	測	定	•	• *		٠	•	•	•	•	•	•	٠	138
	16)	β	_	ラ	Þ	夕	マ	_	ゼ	Ø	粗	酵	素	液	Ø	調	製	بح	活	性	
			測	定	法	• .	٠	•	•	٠.	•	•	•	•	•	•	•	. •	•	•	•	138
	17)	β		ガ	ラ	ク	٢	シ	ダ	******	ゼ	Ø	粗	酵	素	液	Ø	嚻	製	Ł	
		•	活	性	測	定	法	٠	•	٠	٠	•	٠	•	•	•	٠	•	•	•	•	139
	18)	蛋	白	質	Ø	定		法	•		٠	•	.•	•	•	•	•	•	٠	•	140

	19))	栄	養	要	求	性	0	判	定	٠	•	•	•	•	•	•	•	. •	•	•	141
	20)		セ	フ	ブ	n	ス	ポ	IJ	ナ	•	ぜ	Ø	温	度	誘	導	実	験	•	٠	141
	21)		セ	フ	ア	п	ス	ポ	ŋ	ナ	Temper	ゼ	Ø	薬	剤	誘	導	実	験	•	•	142
	22)		抗	血	清	Ø	調	製	法	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	142
	23)		外	膜	蛋	白	Ø	分	離	Ł	電	戾	泳	動	٠	•	•	•	•	•	•	142
文献	:					٠									•			•	•			145

Paul Ehlich は、化学療法の原理の創始者として1904年 Trypanosoma に対し、Trypan redの有効性を立証し、1909年にAlexander Fleming は Penicillium notatum からPenicillinを発見し、初めて抗生物質についての概念を導入した。しかし、Trypan redの有効性が認められた同年、1904年に、早くもTrypan red耐性 Trypanosoma bruceiが現われ、ペニシリン発見からわずか半世紀の今日、耐性菌の分離頻度は、年を経るに従い、増加の一途をたどり、臨床医学上大きな問題となっている。

この過酷な耐性菌との闘いにおいて必要な知識は、耐性遺伝子の起源、発現機構および薬剤耐性の生化学的機構である。薬剤耐性の生化学的機構としては、次の様なものが考えられて来ている。

- (1)阻害を受ける反応を迂回する代わりの代謝経路 (by pass)が出来る。 (スルホンアミド剤、トリメトプリム等のin vitroの耐性菌においてのみ見られる。)
- (2) 薬剤を不活化あるいは分解する作用。すなわち酵素等を獲得するか、増強する。(β-ラクタム抗生物質、クロラムフェニコール、アミノ配糖体抗生物質等に対して。)
- (3)細胞質膜の変化により細菌細胞内透過性が低下する。 (テトラサイクリン等に対して。)
- (4) 薬剤により阻害を受ける酵素、あるいは因子の増加に

よる。 (スルホンアミド剤、トリメトプリム等に対して。)

(5) 薬剤作用点の変化による。(マクロライド群抗生物質、 アミノ配糖体抗生物質、リファマイシン、ナリジキシ ン酸等に対して。)

このうち、(2)(3)(4)のタイプの耐性機構は、プラスミド(Plasmid、染色体とは独立に自律複製、増殖可能な細胞質性因子)によることが多いが、(1)(5)は染色体性遺伝子支配であることが多い(Table 1)。

薬剤耐性菌の起源は、(1)薬剤の存在とは無関係に、もともと自然界に少数存在していた耐性菌が、人間による薬剤の使用により選択的に増加した、(2)染色体遺伝子の突然変異や外部からの耐性遺伝因子の獲得による、(3)本来は別の生理的意義を持つ因子が、たまたま薬剤の阻害を軽減する性質を持ち、その作用が増強された、などの幾つかの可能性が考えられる。

プラスミド性と染色体性の両方の遺伝子支配の例が知られるという意味で興味あるのが、 β - ラクタム環を開製させる酵素 β - ラクタマーゼ(β - 1actamase 、

EC3526) である。 β ーラクタマーゼは、ペニシリナーゼ (Penicillinase 、PCase)型とセファロスポリナーゼ (Cephalosporinase、CSase)型とに大別される。前者 はペニシリン、後者はセファロスポリンをそれぞれ基質 として好む β ーラクタマーゼである(Figure 1)。

ペニシリナーゼは、薬剤耐性プラスミド(Rプラスミ

Table 1 Drug resistance mediated by plasmid (A) or chromosomal gene (B) in pathogenic bacteria.

(A) Penicillins Cephalosporins **Aminoglycosides** Spectinomycin Tetracyclines Chloramphenicol Fusadic acid Novobiocin Trimethoprim Sulfonamides Macrolides Lincomycins Heavy metals - mercury and organomercurials - cadmium - silver - arsenate, arsenite - bismuth - cobalt

(B) Vancomycin
Cycloserine
Phosphomycin
Bacitracin
Gramicidin
Polymyxins
Nalidixic acid
Nitrofurans
Isoniazid

Figure 1 HYDROLYSIS OF PENICILLIN AND CEPHALOSPORIN BY β -LACTAMASE

__ /ı __

ド)に支配されていることが多いのが特徴である。薬剤 耐性プラスミドは、細菌の多くの抗生物質に対する耐性 の最も主要な原因である。最近多剤耐性Rプラスミド上 の薬剤耐性遺伝子は、トランスポゾン(Transposon 、 Tn)の転移が集積されたものであることが明らかとなっ て来た(1)。トランスポゾンとは、一定の構造と機能を 保持したままで、レプリコン間を転移する遺伝ユニット である。HedgesおよびJacob (2)により1974年にペニシ リン耐性遺伝子が5kbの単位で、プラスミド間を転移す ることが発見されたのが最初である。また、1973年に、 Saedler およびStarlinger(3)によって、Escherichia coliのガラクトースオペロンのある種の変異が挿入配列 (Insertion Sequence、IS) と呼ばれるDNA 断片の挿入 により引き起こされたことが発見された。このISに挟ま れ、クロラムフェニコール等多くの耐性遺伝子がレプリ コンからレプリコンへと転移している⁽⁴⁾⁽⁵⁾。 R プラ スミドに支配されるβーラクタマーゼは、現在のところ すべてペニシリナーゼであり、基質特異性および免疫化 学的に、I型(あるいはTEM型)、オキサシリン分解型 (Ⅱ、Ⅲ型、あるいはOXA-1、2、3型)カルベニシリ ン分解型 (IV型あるいはPSE型) の3種に大別されてい る。Rプラスミド上のペニシリナーゼは構成的に産生さ れ、同じ型のペニシリナーゼが、広範囲のグラム陰性菌 種に存在している。このペニシリナーゼ生産の量的調節 は、プラスミドのコピー数と、プロモーターの強弱によ ることが知られている(6)(8)。

これに対し、セファロスポリナーゼ型は、菌種特異的であり、大部分がβーラクタム抗生物質を誘導物質とする誘導酵素として産生され、今までのところグラム陰性菌種では2つの例を除いては、染色体遺伝子支配である。2つの例とは、Proteus mirabilis で見つけられた、R-22K (7)とAchromobacter で見い出されたペニシリンとセファロスポリン双方を100 %近く水解する型である(9)(10)。但し、R22-K はE. coli の染色体性セファロスポリナーゼ遺伝子が自然界でプラスミド上に、おそらく組み換え機構により、移ったものと考えられている。

また、 β - ラクタマーゼは、塩基配列、アミノ酸組成、活性中心等の特徴から、クラスA、B、Cの3分類が最近なされている $^{(11)(12)}$ (Table 2)。

また、Richmond等(13)によれば染色体性βーラクタマーゼは、クラスΙ、Ⅱ、およびⅣに分類される(Table 3)。クラスΙは、最も多く、グラム陰性菌種で見い出される酵素で、セファロスポリン類をペニシリン類より5~100倍水解する。クラスΙ生産菌種としては、Citrobacter、Enterobacter、インドール陽性Proteus、Providencia、Pseudomonas、SerratiaおよびYersiniaの様な誘導型とEscherichia coli、Acinetobacter、Bacteroides fragilis、ShigellaおよびSalmonellaの様な構成型が知られている。

クラスⅡ酵素は、セファロスポリン類をほとんど水解

Table 2 Classification of $\beta\text{--lactamases}$ on the basis of amino acids sequence of DNA sequence

Class	Strain	MW	Cofactor	Essential amino acid resistance in active site
A	Escherichia coli R-TEM Bacillus cereus 569/H Bacillus licheniformis 749/C Staphilococcus aureus PC1	29,000	non	Serine
В	Bacillus cereus 569/H	23,000	Metal (Zn ²⁺)	
C	Escherichia coli K-12 (ampC) Pseudomonas aeruginosa	39,000	non	Serine

Table 3 Chromosomally mediated β -lactamases

Strains which produce class	I chromosomal β -lactamase
Inducible production	Constitutive production
Proteus morganii	Bacteroides fragilis
Proteus rettgeri	Citrobacter koseri
Proteus vulgaris	Enterobacter aerogenes
Chromobacter violaceum	Escherichia coli
Citrobacter aerogenes	Levinea malonatica
Enterobacter aerogenes	Pseudomonas testosteroni
Enterobacter cloacae	Salmonella gallinarum
Pseudomonas aeruginosa	Salmonella typhimurium
Pseudomonas cepacia	Shigella sonnei
Serratia marcescens	Shigella flexneri
Yersinia enterocolitica	Yersinia enterocolitica

Strains which produce class II chromosomal β -lactamase

Aeromonas liquefaciens

Bacteroides clostridiiformis

Pseudomonas aeruginosa (Dalgleish enzyme)

Pseudomonas thomasi

Strains which produce clas IV chromosomal $\beta\text{-lactamase}$

Bacteroides melaninogenicus

Bacteroides oralis

Aerobacter cloacae

Klebsiella aerogenes

Klebsiella ozaonae

Klebsiella pneumoniae

Neisseria catarrhalis

しないペニシリナーゼ型で、<u>Aeromonas liquifaciencs</u>、
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>、<u>Pseudomonas thomasii</u>等で見られる。

クラス IV 酵素は、<u>Klebsiella</u>等で見られる様に、セファロスポリン類、ペニシリン類両者に対して、幅の広い 基質特異性を持つβ-ラクタマーゼである。

プラスミド性の β – ラクタマーゼについては、多くの研究者によってその産生機構、支配遺伝子の伝播様式等について研究されている(14)(15)。しかしながら、染色体性 β – ラクタマーゼについては、Escherichia coli (16)、Bacillus (17)(18)、Pseudomonas (19)等で若干の知見が得られるのみで、特にその誘導産生機構については、ほとんど解明されていない。

そこで著者は、この誘導産生機構の解明を目的として、最も典型的なセファロスポリナーゼ型βーラクタマーゼを生産し、かつ臨床医学的にも重要度の高い菌種である
Citrobacter freundiiのセファロスポリナーゼを対象として、分子遺伝学的研究に着手した。

本論文は、三章から構成される。

第一章では、<u>Citrobacter</u> <u>freundii</u> GN346のセファロスポリナーゼ遺伝子のクローニングと構造解析について記述した。

第二章では、Citrobacter freundii GN346のセファロスポリナーゼの誘導産生様式とその制御機構について、遺伝学的解析を行った結果を記した。

第三章では、クローニングされた <u>Citrobacter</u> freundii GN346のセファロスポリナーゼ遺伝子の、 Escherichia coli等他菌種における発現を検討した結果を記した。

第 1 章 Citrobacter

freundii GN346のセファロスポリナーゼ 遺伝子のクローニン

Citrobacter freundii GN346は、人病巣由来のペニシリンおよびセファロスポリン系 β — ラクタム抗生物質高度耐性菌である。1965年に日本で分離された(36)。

第 1 節 <u>Citrobacter freundii</u> GN346のセファロスポリナーゼ遺伝子のクローニング

Citrobacter freundii GN346の染色体DNA を調製し、制限酵素 EcoRI で切断した。得られたDNA 断片をショットガン法で、制限酵素 EcoRI で切断したベクタープラスミドpMK1にT4リガーゼを用いて結合し、形質転換法により、Escherichia coli K-12 C600へ導入した。トランスフォーマントをカナマイシン25 μ g /mlおよびセファロリジン12.5 μ g /ml含有マッコンキー寒天平板で選択した。得られたクローンをさらに、分離純培養し、12クローンをコロニー溶菌法の0.8%アガロースゲル電気泳動にかけたところ、いずれも同じ大きさのプラスミドDNAを所有することを確認した(Figure 1—1)。そのうち、3クローンから、プラスミドDNAを調製し、制限酵素

EcoRI で切断後、0.8 %アガロースゲル電気泳動を行った(Figure 1-2)。すべての組み換えプラスミドは、2つの共通なEcoRI フラグメント、すなわち、12.0kbのpMK1フラグメントと7.3kb のクローニングされたフラグメントから成り立っていた。このうちの一つをpTY71 と命名し、以後の解析に用いた。

第2節 クローニングされたセファロスポリナーゼ 遺伝 子の確認

E. coli では、染色体地図上94.3分に、E. coli 特異的 β - ラクタマーゼを支配する遺伝子ampCの存在が知られている(20)。但し、この菌種特異的 β - ラクタマーゼの生産量は一般にきわめて低い(21)。得られたpTY71 保持菌が、確かにC. freundii のセファロスポリナーゼ遺伝子を持ち、ampCの変異によるセファロスポリナーゼ遺伝子を持ち、ampCの変異によるセファロスポリナーゼ遺産生量上昇株ではないことを確認する必要がある。形質感性であるが、非常に低いレベルでのE. coli 特異的 β - ラクタマーゼの産生が認められた((Table 1 — 1)。しかし、これはC. freundii のセファロスポリナーゼとの基質特異性の明らかな差異により区別が可能である。E. coli C600/pTY71 + より産生されるセファロスポリナーゼは、その親株である C. freundii GN346 と一致した基質特異性を示していた。E. coli C600 C600



Figure 1-1 Agarose gel electrophoresis of colony lysates prepared from strains carrying parental plasmid and recombinant plasmids. Electrophoresis was performed in 0.8% agarose for 6 hours at 90mA. Tracks: a-1; recombinant plasmids cloned CSase genes of *C. freundii*, m; pTY71 DNA. Chr., CCC, Linear and OC indicate chromosomal DNA, plasmid covalently closed circular DNA, plasmid linear DNA, and plasmid open circular DNA, respectively.

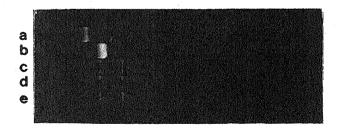


Figure 1-2 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments after endonuclease digestion with EcoRI. Electrophoresis was performed in 0.8% agarose for 4 hours at 80V. Tracks: a; HindIII digested λ DNA, b; pMK1, c-e; plasmid DNA cloned CSase genes of C. freundii.

Table 1-1 Substrate profile of cephalosporinase specified by pTY71.

Strain	Relati	Specific ^b				
	CER	CET	CEZ	CEX	PCG	activity
C. freundii						
GN346	10Q	8	174	21	-2	10.8
E. coli	•					
C600	100	228	ND	41	ND	0.004
C600/pTY71	100	12	174	22	3	0.43

The enzyme activities of C600 were assayed by the micro-iodometric method and the others were done by Perret's method.

a) Abbreviations: CER; cephaloridine, CET; cephalothin, CEZ; cefazolin, CEX; cephalexin, PCG; benzylpenicillin, ND; not determined.

b) Units/mg of total cellular protein.

セファロスポリナーゼ産生量は非常に低いので、pTY71によるセファロスポリナーゼの基質特異性には、何らの影響も与えていない。

次に、 \underline{C} . freundii GN346 のセファロスポリナーゼの家兎抗血清に対する、 \underline{E} . coli C600/pTY71 + の産生するセファロスポリナーゼの反応性を調べた。方法は、ミクロヨード法を用い、実験の部 Π の16) に従った。

GN346 のセファロスポリナーゼの一定量をGN346 のセファロスポリナーゼに対する抗血清と反応させ、セファロスポリナーゼ活性を測定した(Figure 1 — 3)。機軸は加えた抗血清の蛋白量、縦軸は、抗血清と反応後のセファロスポリナーゼ活性の同蛋白量の正常血清を加えた時のセファロスポリナーゼ活性に対する比率を%で表した。Citrobacter freundii は、その抗血清により、セファロスポリナーゼ活性の特徴的な上昇が見られ、飽和曲線を描くことは、すでに報告されている(22)。E. coli C600/pTY71 + の生産する酵素は親株GN346 のセファロスポリナーゼと同様にこの特徴的な現象が観察された。対照として用いた、E. coli 255 の生産するE. coli 特異的セファロスポリナーゼでは(23)、この様な抗血清の効果は見られなかった。

以上の結果より、 \underline{C} . $\underline{freundii}$ GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子が、この組み換えプラスミドpTY71 にクローニングされ、 \underline{E} . \underline{coli} 中でも \underline{C} . $\underline{freundii}$ の菌種特異的セファロスポリナーゼを産生していることが確認さ

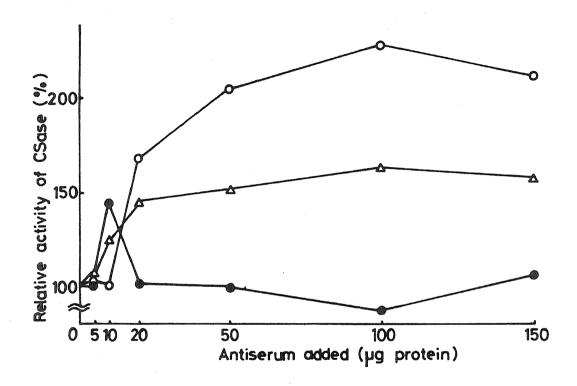


Figure 1-3 Effect of anti-*Citrobacter freundii* cephalosporinase serum on the cephalosporinases activities.

o: C. freundii GN346, \bullet : E. coli 255, \triangle : E. coli C600/pTY71.

れた。

第3節 pTY71 の制限酵素切断地図の作成

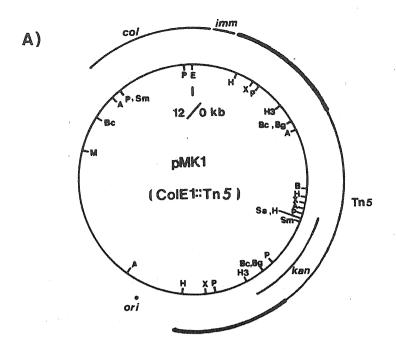
ベクタープラスミドpMK1は、プラスミドCo1E1 にカナマイシントランスポゾンTn5 の転移したプラスミドである。その制限酵素切断地図は、EcoRI 、BamHI 、HindIII 、PstI、Sa1I、SmaI、XhoIに関してはYamamoto等(24)によって作成されている。プラスミドCo1E1 の全塩基配列はYamada等(25)によって、Tn5 のIS50R およびIS50L (Tn5 両末端のinverted repeat 構造)のDNA 塩基配列はAuerswald 等(26)によって、また、Tn5 のカナマイシン耐性遺伝子部位のDNA 塩基配列もBeck等(27)によって既に決定されているので、その他の制限酵素切断部位を調べることができた。上記の報文を基にして作ったpMK1の制限酵素切断地図をFigure 1 — 4 に示した。

用いた制限酵素は、AccI、BamHI、BclI、BglII、EcoRI、HincII、HindIII、KpnI、MluI、PstI、SalI、SmaI、XhoIである。BclIで切断する時は、dam + (DNA adenine methylase)の株より調製したDNAでは、切断部位のアデニン塩基がメチル化され切断不能なので、E.coli GM33 (dam -) (28)にpTY71を形質転換で導入した GM33/pTY71 + より調製したプラスミドDNAを解析に用いた。Figure 1 — 5 およびFigure 1 — 6 にこれら制限酵素で切断したpTY71 DNA を0.8 %および1.5 %アガ

ロースゲル電気泳動を行った結果を示した。 $\underline{HindIII}$ で切断した λ ファージDNA 、および \underline{HinfI} で切断した pBR322DNA をサイズのマーカーとして、制限酵素切断フラグメントの大きさを求めた。それぞれのフラグメントの長さを $Table\ 1-2$ に示した。数字は、大きさの順につけた。

EcoRI では12kbのE1と7.3kb のE2とに分けられ、E1はpMK1、<math>E2がクローニングされたフラグメントであることはすでに述べた。

まずBamHI 切断部位であるが、B1~B4までのフラグメ ントが認められるので、4箇所切断部位があることが判 明する。pMK1内に一箇所あるので、E2フラグメント内に 3箇所切断部位が存在する。BamHI とEcoRI の二重切断 により、B2(5.4kb)は、3.2kb と2.2kb に切断され、 B1(11.7kb)は8.8kb と2.9kb に切断たれた。以上の結 果より、EcoRI 切断部位からの距離により、2箇所は決 定された。B3およびB4は、E2内部のフラグメントと考え られるが、B3およびB4の順序が明らかでない。そこで、 BamHI の部分切断を行った。1 μg のpTY71 DNA を1ユ ニットのBamHI で 5、10、15、30分と反応時間を変化さ せて処理し、0.6 %アガロースゲル電気泳動を行った結 果をFigure 1 ― 7 に示した。フラグメントの大きさは、 Table 1 — 3 に示した。部分切断の場合、完全切断では 観察されないフラグメントが存在するが、これは2つ以 上のフラグメントが切断されずに結合したものである。



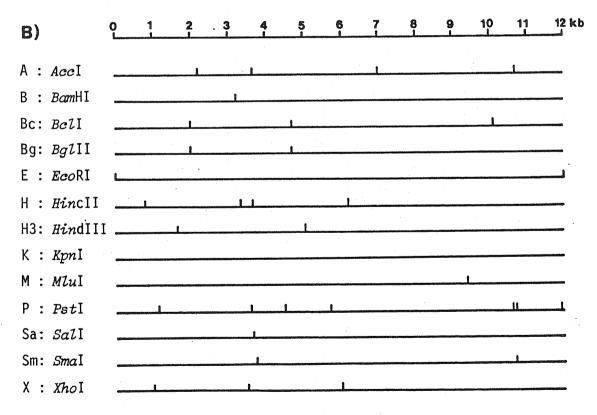


Figure 1-4 Restriction cleavage map of pMK1.

- (A) Heavy lines indicate inverted repeats (IS50)of Tn5.
- (B) Map was opened at the EcoRI cleavage site.

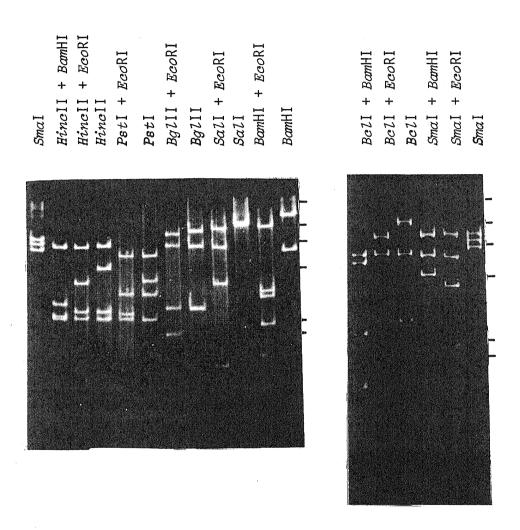


Figure 1-5 Agarose gel electrophoresis patterns of DNA fragments from pTY71 DNA digested with various restriction endonucleases indicated on the top of gels. The digested products were electrophoresed on 0.8% agarose gels. Small bars on the right side of gels represent the migration position of *HindIII*-digested DNA, whose sizes are presented in Materials and Methods.

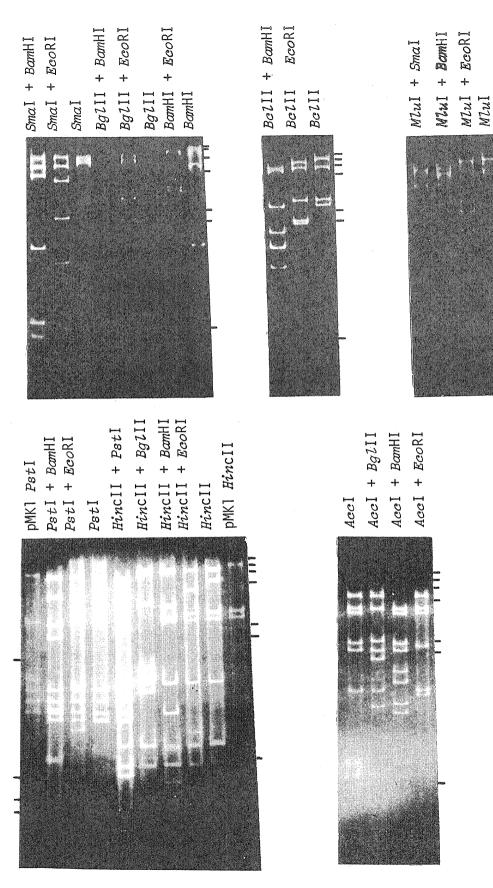


Table 1-2 Sizes of DNA fragments generated by complete digestion of pTY71 DNA with various restriction endonucleases^{a)}

Eco	RI	Bam	HI	Bcl	I	Bgl	II	Sal	I
Frag- ment		Frag- ment		Frag- ment	Size (kb)	Frag- ment	Size (kb)	Frag- ment	
E1 °E2	12.0	B1 B2 B3 B4	11.7 5.4 1.55 0.65	Bc1 °Bc2 °Bc3 Bc4	2.71	Bg2 °Bg3			9.76 9.54

Acc	I	Hin	cII	MZu	I	Pst	I	Sma	I
Frag- ment	Size (kb)	Frag- ment	Size (kb)	Frag- ment	Size (kb)	Frag- ment	Size (kb)	Frag- ment	Size (kb)
A1 °A2 °A3 A4 A5 °A6 A7 A8	4.82 3.68 3.36 2.25 2.12 1.44 0.60 0.53 0.50	H1 H2 °H3 °H4 H5 H6 H6' H8 °H9	5.92 4.67 2.58 2.54 1.30 0.70 0.70 0.60 0.29	M1 M2 M3 M4 M5 M6	11.26 4.85 1.33 0.77 0.72 0.37	°P1 P2 P3 °P4 °P5 °P6 °P7 P8 P8' °P10	4.95 3.70 3.16 2.37 1.19 1.14 0.92 0.89 0.89 0.09	°Sm1 Sm2 Sm3	6.98 6.44 5.88

a) The fragments were designated according to increasing migration in 0.8% and 1.5% agarose gel electrophoresis patterns.

Figure 1-6 Agarose gel electrophoresis of pTY71 DNA fragments digested with various endonucleases. pTY71 DNA was completely digested with the restriction endonucleases indicated on the top of gels and electrophoresed on 1.5 % agarose gels. Small bars at the right and left side of gels represent the migration of HindIII- digested λ DNA and HinfI- digested pBR322 DNA, respectively.

[°] indicate the fragments within pMK1 plasmid.

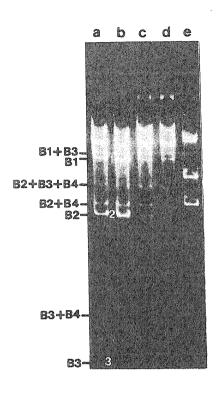


Figure 1-7 0.6% agarose gel electrophoresis of pTY71 DNA partially digested with BcamHI. 1 µg of pTY71 DNA was digested with 1 unit of BcamHI for 5 min (d), 10 min (c), 15 min (b) and 30 min (a). Lane e: $\textit{HindIII-digested}\ \lambda\ DNA$. Completely BcamHI digested pTY71 DNA indicated by numbers.

Table 1-3 Size of DNA fragments generated from partial digestion of pTY71 with BamHI endonuclease.

Size	13.25	11.7	7.6	6.05	5.4	2.2	1.55
Fragment	B1+B3	B1	B2+B3+B4	B2+B4	B2	B3+B4	В3

これら部分切断フラグメントの大きさにより相互に隣り合うフラグメントの推定が可能である。2.2kb=1.55kb (B3) + 0.65kb (B4) 、また6.05kb=5.4kb (B2) + 0.65kbd (B4) と考えられるので、 $B4はB2とB3フラグメントの間にはさまれており、<math>B2\longrightarrow B1\longrightarrow B3\longrightarrow B4\longrightarrow B2$ の順であると決定した。

pTY71 は、Bc1IによりBc1、Bc2、Bc3、Bc4 に分断され、切断部位は 4 箇所である。pMK1にはBc1I切断部位が 3 箇所あり、Bc2、Bc3 はその大きさよりpMK1内部のフラグメントである。Bc1I + EcoRI の二重切断により、Bc1 は 6.81kb と 1.9kb に、Bc4 は 2.01kb と 0.49kb に分断される。このうち、1.9kb と 2.01kb がpMK1に由来するフラグメントであることは明らかなので、Bc4 $\rightarrow Bc3$ \rightarrow Bc2 $\rightarrow Bc1$ $\rightarrow Bc4$ の順であり、E2内の 1 箇所のBc1I 部位が決定された。

Bg1 II 切断では、Bg1 、Bg2 、Bg3 のフラグメントが観察された。pMK1内の2箇所の切断部位と照らし合わせると、Bg3 はpMK1内部のフラグメントと考えられる。しかし、Bg1 、Bg2 、Bg3 を足しても、全長19.3kbにはならなかった。Bg1 II + EcoRI の二重切断で、6フラグメントに分断されることは、EcoRI 切断部位が2箇所なので、Bg1 II 切断部位は4箇所である。以上の結果とアガロースゲル上のでバンドの濃度から、Bg3 はダイマー(dimer)であると考えられる。Bg3 をBg3 + Bg3'とした。Bg1 II + EcoRI の二重切断により、Bg3'が2.01kb +

0.65kbに、Bg1 が7.28kb + 0.87kb に切断されるので、 それぞれE2内の 2 箇所の切断部位が決定され、Bg3'→ Bg3 →Bg1 →Bg2 →Bg3'の順と決定された。

SalIでは、ほぼ等しい 2 つのフラグメントが観察された (Sal とSa2)。pMK1内にSalI切断部位は 1 箇所存在するのでE2内には 1 箇所存在することになる。SalI + EcoRI の二重切断により、Sal は、1.4kb + 8.36kbに、Sa2 は3.64kb + 5.9kbに切断され、E2内のSalI切断部位は中央のEcoRI 切断部位より1.4kb 右側と決定される。

<u>Sma</u>Iでは、Sm1、Sm2、Sm3 の 3 フラグメントが観察され、pMK1内には 2 箇所切断部位が存在するので、E2内には 1 箇所存在することになる。<u>Sma</u>I + <u>Eco</u>RIの二重切断により、Sm2 は1.29kb + 5.15kb に、Sm3 は2.15kb + 3.73kbに切断された。ゆえにSm1 はpMK1内部のフラグメントであり、中央の<u>Eco</u>RI 切断部位から右側5.15kbにSmaI切断部位が決定された。

AcclではA1~A8までの8フラグメントが認められた。pMK1内には4箇所切断部位があり、フラグメントの大きさにより、A6、A3、およびA2はpMK1内部のフラグメントと考えられた。Accl + EcoRIの二重切断により、A5が1.32kb + 0.8kbに分断され、A5は中央のEcoRI 切断部位を含むフラグメントと考えられた。またA4が二重切断によりわずかに小さくなっているが、A4の分断により出て来るもう一つのフラグメントはごく小さく、この条件の電気泳動ゲル写真では検出できなかった。Accl + BamHI

の二重切断では、pMK1内部のA6が1.1kb + 0.34kbになり さらにA1が1.55kb (B3) + 1.50kb + 1.15kb + 0.65kb (B4) のフラグメントとして分断された。すなわちA1内に は、BamHI 切断部位が3箇所存在する。Sa1I認識切断部 位、G↓TCGACは、AccI認識切断部位、

G
ightarrow T
ightarrow T
ightarrow A C に包含され、<math>A1の左側がこのSa1I 切断部位と一致し、次いでA1の右側の切断部位がB4より右側 1.12kbと決定された。A5とA1の間にできるフラグメントの大きさは、A7に一致した。未決定の領域は、A1とA4の間、マップの右端であるが、残るフラグメントA8はその領域に 2つ入る大きさであった。また、AccI+Bg1IIの二重切断により、A8が両脇のバンドに比べ薄くなっていた。このことはA8がダイマーであったことを示すものであり、A8あるいはA87のどちらかがBg1IIで切断されたと考えられた。すなわちAccI1 切断部位は 9 箇所であり、Ac40 Ac60 Ac30 Ac21 Ac50 Ac70 Ac11 Ac87 Ac80 Ac40 Ac81 Ac40 Ac81 Ac40 Ac61 Ac40 Ac61 Ac40 Ac61 Ac62 Ac61 Ac63 Ac64 Ac64 Ac65 Ac64 Ac65 Ac65 Ac76 Ac76 Ac76 Ac87 Ac86 Ac87 Ac88 Ac89 Ac81 Ac81 Ac81 Ac81 Ac81 Ac82 Ac83 Ac84 Ac85 Ac8

 $\underline{M1uI}$ 切断部位は、 $\underline{pMK1}$ 内に $\underline{1}$ 箇所あり、電気泳動では $\underline{5}$ フラグメント観察されるので、 $\underline{E2}$ 内には $\underline{4}$ 箇所切断部位が存在すると考えられた。 $\underline{M1uI}$ + \underline{EcoRI} の二重切断で $\underline{M1}$ が $\underline{9.4kb}$ + $\underline{1.86kb}$ に、 $\underline{M2}$ が $\underline{2.6kb}$ + $\underline{2.25kb}$ になるので $\underline{M1}$ 、 $\underline{M2}$ は \underline{EcoRI} 切断部位を含むことが明らかとなり、その切断部位が決定された。 $\underline{M1uI}$ + \underline{BamHI} の二重切断では $\underline{M1}$ が $\underline{6.2kb}$ + $\underline{5.06kb}$ ($\underline{M2}$ と $\underline{9}$ イマーとして検出) になり、

M3、M4のバンドが認められなくなった。M3およびM4は、BamHI 切断部位を含むと考えられた。M5にはBamHI 切断部位は含まれないので、M5はB3内にしか存在し得ず、残る問題はM3およびM4がM5のどちら側に存在するかということになる。M1uI + BamHIの二重切断でB4が変化せずに検出されることは、B4内にM1uI切断部位は無いことを示している。M3はM5の右側、M4はM5の左側に位置し、おそらくこのゲルでは観察し得ないフラグメントM6がM2とM4の間に存在すると思われる。M1uI + SmaI の二重切断では、M1が5.59kb + 5.67kb (ダイマーとして検出)、M2が3.54kb + 1.31kb 、M3が1.04kb + 0.29kb になることからもM4、M5、およびM6の位置が確認できた。ゆえに切断部位は6箇所で、M1→M2→M6→M4→M5→M3→M1の順と断定された。

PstI切断では、8 バンドが検出されるが、8番めのバンドは明らかに7番めのバンドより濃く、ダイマーであると推察された。ゆえに、9 フラグメントで、切断部位は9箇所と考えられた。このうち6箇所はpMK1内にありpMK1プラスミドDNAのPstI 切断パターンと比較して、P4、P7、P6、P1、およびP5はpMK1内部のフラグメントであった。著者の実験条件では検出出来なかったが、文献的(25)に、P1とP5の間に0.09kbとごく小さいPstIフラグメントが報告されているので、これをP10とした。PstI+ EcoRI の二重切断により、P2が2.47kb+1.23kb、またP8のうち一方が0.79kb+0.09kb (検出されない)に

なった。ゆえに、EcoRI 切断部位を含んだP8およびP2の位置が決定された。P8とP2の間のP8'とP3の位置のみが未決定である。PstI+BamHIの二重切断で、P3が、2.25kb+1.05kbに、P8'が0.55kb+0.33kbになる。これよりB3はPstI切断部位を有することが明らかとなった。以上のDNA フラグメントの配列条件を満たすのは、P2→PttodetarrowP4→PttodetarrowP7→PttodetarrowP5→PttodetarrowP8'→PttodetarrowP2であった。

HincII切断では、 8 本のバンドが観察できたが、 6 番 めのバンドは明らかに濃く、ダイマーであった。ゆえに 9 箇 所 切 断 部 位 が 存 在 し 、 そ の う ち 4 箇 所 は pMK1 内 部 に あると考えられた。pMK1プラスミドDNA のHincII切断パ ターンとの比較により、H3、H9、H4はpMK1内部のフラグ メントと判断された。HincII + EcoRIの二重切断で、H2 が3.9kb + 0.77kbになるが、他のフラグメントに変化は なかった。ゆえに中央のEcoRI 切断部位近傍にHincII切 断部位が決定された。次いで、HincII + BamHIの二重切 断により、H2が2.97kb + 0 95kb + 0.65kb (B4) に、H6 が0.5kb + 0.2kb になった。ゆえに、H6はBamHI 切断部 位を含み、それはB1とB3の間のBamHI 切断部位であるか ら、H6はH2の左隣に決定された。HincII + Bg1IIの二重 切断により、H5、H6、およびH6'のバンドには変化が無 いが、H8が小さくなっていた。さらにHincII + PstI の 二重切断で、H5、H8、およびH6は分断されないが、H6' は切断され、H6はダイマーでなくなりバンドが薄くなっ ていた。ゆえにH8およびH5はP3の中にあり、H6'にはP3 とP8の間の<u>Pst</u>I切断部位が含まれ、H8にはBg1 とBg2 の間の<u>Bg1</u>II 切断部位が含まれるので、H2→H3→H9→H4→ H1→H6'→H8→H5→H6→H2の順に決定した。

なお $\underline{\text{HindIII}}$ (pMK1内に 2 箇所)、 $\underline{\text{KpnI}}$ 、 $\underline{\text{XhoI}}$ (pMK1内に 3 箇所)の切断部位はE2内には認められないので省略した。Table 1-4 にpMK1、pTY71 およびE2フラグメント内の制限酵素切断部位数を示した。以上の様にして決定したpTY71 の制限酵素切断地図をFigure 1-8 に示す。これよりE2フラグメントの制限酵素切断地図を抜き出して書いたものがFigure 1-9 である(50)。

現在、グラム陰性菌の染色体性 β ーラクタマーゼ遺伝子でクローニングされ、制限酵素切断地図が作成されているものは、Escherichia coli (29)、Shigella sonnei (30)、Enterobacter cloacae (31)のセファロスポリナーゼ遺伝子とK. pneumoniae のペニシリナーゼ遺伝子がある。この四者と、C. freundii のセファロスポリナーゼ遺伝子の制限酵素切断地図を比較したのがFigure 1 —10である。Escherichia coli、Shigella sonnei はきわめて類似しているが、他の菌種では、明白な類似性は認められない。Bergström等(30)は、E. coli のfrdA-frdB (fumarate reductase) およびampC (セファロスポリナーゼ) 遺伝子部分をプローブとして、さまざまなグラム陰性菌の染色体DNA とハイブリダイゼイション

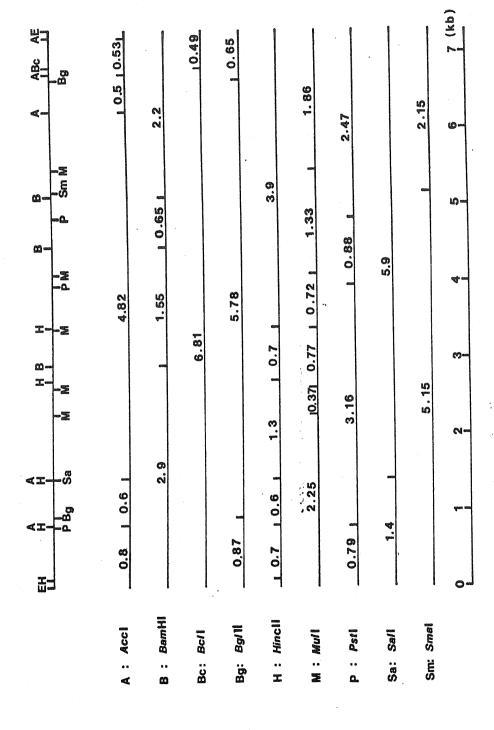
(Hybridization) を行い、類似性を検討した。その結果を簡単にまとめたのがTable 1─5であるが、E. coli

Table 1-4 Restriction enzyme cleavage site frequencies in pMK1 and pTY71.

Restriction	# sites o	bserved in	# aitaa in F2
enzyme	рМК1	pTY71	# sites in E2
AccI	4	9	5
BamHI	1	. 4	3
BclI	3	4	7
BglII	2	4	2
<i>Hin</i> cII	4	9 .	5
MluI	.1	6	5
PstI	7	10	3
SalI	1	2	1
SmaI	2	3	1
<i>Hin</i> dIII	2	. 2	0
KpnI	0	0	0
Xho I	3	3	0

	0		0.5 0.53	B2					Σ	P2		Sm3
E2	7.3	A1	4.82	B3 B4	1.55 - 0.65		Bg2 5.78	H6 H2	M6 M5 M3 1 10770721 1.33 1	; @	Sa2	
S ECTION SECTION SECT		A5 A	2.12 1		. •	Bc1 8.71	-	H6' H8 H5 0.7 0.6 1.3	M2 4.85	P5 P8 P P P P P P P P		Sm2 6.44
K1)		A2	3.68	Bi		Bc2 5.38	Bg1 8.15	H1 5.92		P1 4.95	Sa1 9.76	Sm1 6.98
E1 (pMK1)	12.0	A6 A3	3		nadagasan,	Bc3 2.71	Bg3 2.71	H9 H4 1	M1 11.26	P7 P6 0.92 1.14	+	
		A 4 - A		B2	2.4	Bc4 2.15	Bg3' 2.66	H2 H3 4.67 2.58		P2 P4 3.7 2.37	Sa2 9.54	Sm3 5.88
EcoRi		Acci		BamHi		Bc/I	Bg/II	HincII	MluI	Pst1	Sall	Smal

Figure 1-8 Restriction cleavage map of pTY71. The numbers in the map show each size of fragment as a kb.



GN346 cephalosporinase gene. The numbers in the map show each size of fragments as a kb. Figure 1-9 Restriction cleavage map of EcoRI fragment containing Citrobacter freundii

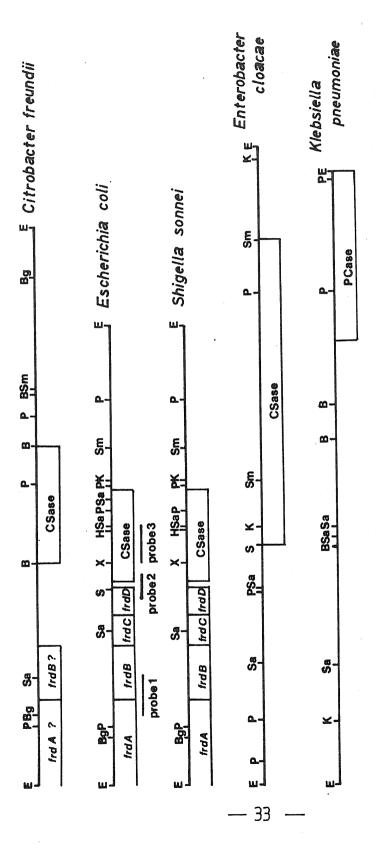


Figure 1-10 Comparison of restriction cleavage maps of species-specific A-lactamases of gram and those of E. cloacae and K. pneumoniae were presented by T. Murata et al and R. Okamoto et al., respectively, at Proceedings of the 11th Gunma Symposium on Microbial Drug Resistance $^{(3)}$ X: XhoI , K: KpnI . The maps of $\mathit{E.~coli}$ and $\mathit{S.~sonnei}$ are reported by S. Bergstrom et al (30)negative bacteria. E: $\it Eco$ RI, B: $\it Bcm$ HI, P: $\it Pst$ I, Bg: $\it Bg1$ II, H: $\it Hin$ dIII, Sm: $\it SmaI$, Sa: $\it Sg1I$ I

Table 1-5 Hybridization of chromosomal DNA to frd and ampC probes of Escherichia coli.

(J. Bacteriology <u>155</u>: 1297, 1983 S. Bergstrom et al.)

Strain	Probe 1a)	Probe 2	Probe 3
Escherichia coli K-12	++ b)	++	++
Shigella sonnei	++	++	++
Shigella flexneri	++	++	++
Salmonella typhimurium	++	+	-
Citrobacter freundii	++	+	_
Enterobacter cloacae	++	+	+
Klebsiella pneumoniae	- ++	-	_
Serratia marcescens	++	_	_
Yersinia enterocolitica		- .	-
Yersinia pseudotuberculosis	++	_	-
Proteus mirabilis	++	-	_
Vibrio cholera	++	-	, -
Bacillus fragilis	+	_	_
Pseudomonas ae ru ginosa	· 4.		_
Desulfovibrio desulfuricans.	. +	· _	
Neisseria gonorrhoeae	+	-	_
calf-thymus DNA	-	· -	

a) Probe 1: frdA-frdB gene, probe 2: frdD and ampC promoter region, probe 3: ampC structural gene (see Figure 1-10).

b) ++: strongly hybridized, +: weekly hybridized, -: not hybridized.

のfrdA-frdB 部分は、Table 1-5に示した多くの菌株 と強弱の差はあってもハイブリダイゼイションする。一 方、E. coli の amp C 構造遺伝子部分は、Shigella sonnei、Shigella <u>flexneri</u> とは強く、<u>Enterobacter</u> cloacae とは弱くハイブリダイゼイションし、その他の 菌種の染色体DNAとは、反応しなかった。しかし、 Salmonella typhimuriumとCitrobacter freundiiでは、 ampCのプロモーター部分とは、弱くハイブリダイゼイシ ョンした。以上よりフマレートリダクターゼは、多くの グラム陰性菌で共通の塩基配列を保持していると思われ る。しかし、β-ラクタマーゼ遺伝子は2、3の菌種で 類似性があるものの、E. coli のampCとはかなり違った 構造遺伝子を持つものと思われ、著者の得た制限酵素切 断地図での比較結果と一致するものである。また、類似 性のあったE. coli 、S. sonnei 、およびS. <u>flexneri</u> は構成的に産生するセファロスポリナーゼを支配し、C. freundiiおよび E. cloacae は誘導的に産生するセファ ロスポリナーゼを支配し、K. pneumoniae は構成的に産 生するペニシリナーゼを支配することを考え合わせると、 上記の制限酵素切断地図の比較、ハイブリダイゼイショ ンの結果は興味深い。

第4節 構造遺伝子の限定

Sawai 等(33)によると、<u>C</u>. <u>freundii</u> GN346 のセファ

ロスポリナーゼはセファデックスゲルろ過法で、分子量 34,000と測定された。セファロスポリナーゼの構造遺伝 子はほぼ 1 kbと換算される。そこで、クローニングされ たEcoRIフラグメントから構造遺伝子を限定するために、 pTY71 およびpACYC184をBamHI で切断し、T4リガーゼで 処理し、E. coli C600へ形質転換法で導入した。トラン スフォーマントは、セファロリジン12.5 μg /ml含有マ ッコンキー寒天平板で選択した。pACYC184は、テトラサ イクリンおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子を荷な うプラスミドであるが、BamHI で切断し、他のBamHI フ ラグメントをクローニングすることにより、テトラサイ クリンの構造遺伝子が切断されるため、テトラサイクリ ン感受性になる。そこで、テトラサイクリン12.5 μg / m1感受性、クロラムフェニコール25μg /m1およびセフ ァロリジン12.5 μg / ml耐性のクローンから、プラスミ ドDNA を調製した。クローニングされたことを確かめる ためにBamHIで切断し、クローニングされた方向を確か めるためにHincIIで切断し、1.0 %アガロースゲル電気 泳動を行った(Figure 1 ─11)。その結果pTY71 の1.55 kbのBamHI フラグメントが異なる向きにクローニングさ れたpTY93 とpTY94 が得られた(Figure 1 ─12)。同様 にプラスミドpMK1をベクターにして、pTY91 とpTY92 が 得られた(Figure 1 ---13、Figure 1 ---14)。pTY91 と pTY92 も、pTY71 の1.55kbのBamHI フラグメントが異な る向きにクローニングされたものである。これらの1.55

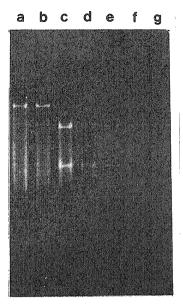


Figure 1-11 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments after digestion with endonuclease HincII. Electrophoresis was performed in 1.0 % agarose for 5 hours at 80V. Tracks: a-f; recombinant plasmids cloned 1.55kb-BamHI fragment (B3) to pACYC184, g; HindIII-digested λ DNA.

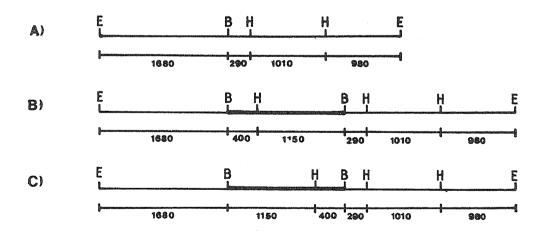


Figure 1-12 Restriction cleavage maps of pACYC184, pTY93 and pTY94. Size of fragments are indicated in bp. A) pACYC184, B) pTY93, C) pTY94. E: *EcoRI*, B: *BamHI*, H: *HincII*.

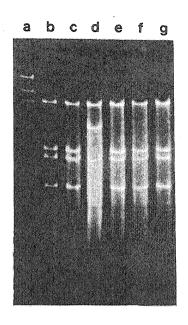


Figure 1-13 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments after digestion with endonuclease HincII. Electrophoresis was performed in 1.0 % agarose for 5 hours at 80V. Tracks: a; HindIII-digested λ DNA, b-g; recombinant plasmids cloned 1.55kb-BamHI fragment (B3) to pMK1.

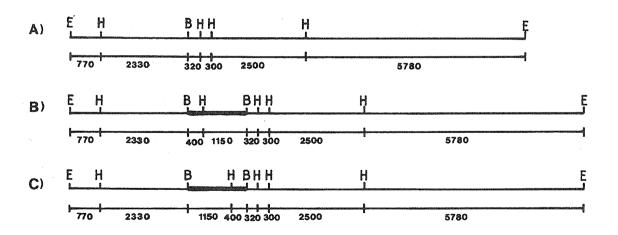


Figure 1-14 Restriction cleavage maps of pMK1, pTY91 and pTY92. Size of fragments are indicated in bp. A) pMK1, B) pTY91, C) pTY92. E: *Eco*RI, B: *Bam*HI, H: *Hinc*II.

kbBamHI フラグメントを持つ組み換えプラスミド保持菌はすべて、セファロリジン12.5μg /ml耐性で得られた。またそのセファロスポリナーゼ活性は、Table 1—6に示したが、C. freundii 特異的セファロスポリナーゼを産生していた。以上より、この1.55kbのBamHI フラグメント内にセファロスポリナーゼの構造遺伝子を決定することができた(Figure 1—15)。

Table 1—6に示した結果は、1.55kbBamHI フラグメントをクローニングされたプラスミドの保持菌株間に、セファロスポリナーゼ産生量の差異があることを示している。pTY94 はpTY93 の4.5 倍、pTY92 はpTY91 の1.5 倍、産生量の差が認められた。この結果は、BamHI フラグメント内のセファロスポリナーゼ遺伝子は、自己のプロモーターからではなく、ベクタープラスミド内からのプロモーターによるread throughにより転写が行われていることを示唆している。自己のプロモーターからのすに加え、ベクタープラスミドのプロモーターからのread throughが重なる可能性も考えられるが、下記のpTY77 へのこの1.55kbBamHI フラグメントのクローニング実験により否定された。

pTY77 は、incWでトリメトプリムおよびサルファ剤耐性遺伝子を持ち、接合伝達能のあるプラスミドR388⁽³⁴⁾を制限酵素Bg1II で切断し、セルフライゲーションすることにより得られた。pTY77 は、トリメトプリム耐性、サルファ剤感受性、接合伝達不能になったプラスミドベ

Table 1-6 Substrate profile of *Citrobacter freundii* cephalosporinase.

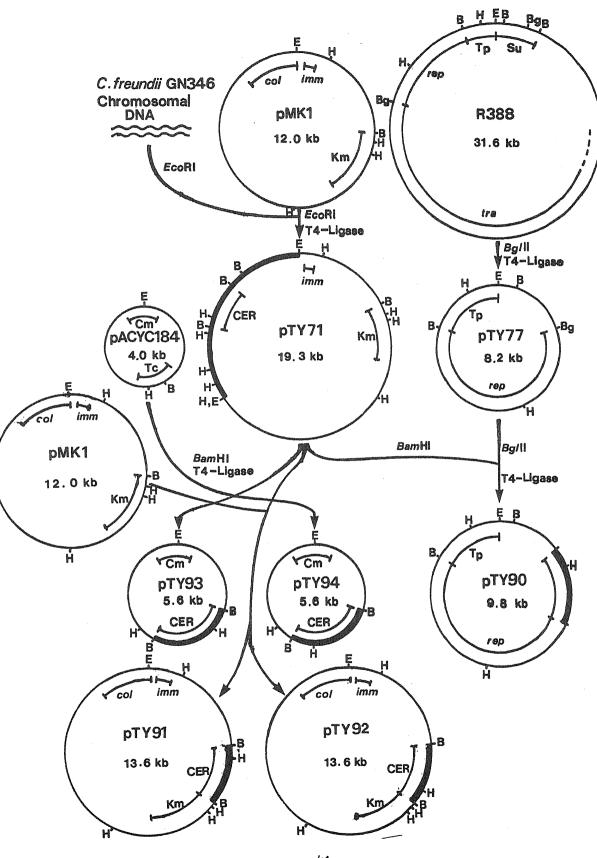
Strain	Relat	Specific ^{b)}				
	CER	CET	CEZ	CEX	PCG	activity
C. freundii						
GN346	100	8.4	174	21.3	1.7	10.8
E. coli						
C600/pTY71	100	12.3	174	22.4	3.0	0.43
C600/pTY93	100	9.9	165	20.8	2.4	0.12
C600/pTY94	100	11.2	159	23.2	2.5	0.54
C600/pTY91	100	13.2	161	25.3	3.2	0.39
C600/pTY92	100	11.0	155	21.8	2.0	0.56
C600	100	228	ND	40.8	ND	0.004

The enzyme activities of C600 was assayed by the microiodometric method and the others were done by Perret's method.

Figure 1-15 Cloning of cephalosporinase gene(s) of *Citrobacter freundii* GN346 to various plasmids. E: *EcoRI*, B: *Bam*HI, H: *HincII*, Bg: *BqIII*.

a) Abbreviations: CER; cephaloridine, CET; cephalothin, CEZ; cefazolin, CEX; cephalexin, PCG; benzylpenicillin, ND; not determined.

b) Units/mg of total cellular protein.



___ 41 ___

クターである。pTY77 は、EcoRI 、HindIII 、Bg1II の 切断部位をただ1箇所持ち、incWなので広域宿主ベクタ ーとして用いることができる(Figure 1 —16、Figure 1 ─17)。pTY77 のBglII 切断部位に1.55kbBamHI フラグ メントのクローニングを試みた。BglII の認識切断部位 は、AJGATCTであり、BamHIの認識切断部位は、 G ↓ G A T C C であり、いわゆるcohesive end (sticky end) が共通のため、ライゲーション可能であるが、ク ローニングされたプラスミドの結合部位は、<u>Bam</u>HI およ び<u>Bgl</u>II では切断できない。pTY77 をBglII で切断し、 pTY71 をBamHI で切断し、これらをT4リガーゼで処理し E. coli C600を形質転換したが、セファロリジン12.5 μg /ml含有選択平板ではトランスフォーマントが得ら れなかった。そこで、トリメトプリム25 µg /m1耐性の みでトランスフォーマントを選択し、コロニー溶菌法で 37クローンを調べたところ、1クローンのみがpTY77 よ り大きいプラスミドを有していた(Figure 1 — 18 A)。 このクローンよりプラスミドDNA を調製し、PstIあるい はHincIIで切断し、0.8 %アガロースゲル電気泳動で調 べたところ、1.55kbのBamHI フラグメントがpTY77 にク ローニングされていることが確かめられた(Figure 1 — 18B)。Figure 1 ─19に示す様に、pTY77 に1.55kbの (Figure 1 ─ 3) がクローニングされた場合、 A BamHI およびB、2つの相違な方向へのクローニングが考えら れる。 A 向きの場合、HincIIで3.95、3.24、2.56kb、ま

た PstIで6.85、1.95、1.0kb のフラグメントに切断される。 B向きの場合、 HincIIで3.95、3.31、2.49kb、またPstIで8.3、1.0、0.45kbのフラグメントに切断される。 Figure 1 — 18で示した様に、Aの向きでクローニングされたことが確認された。このプラスミドをpTY90 と命名した。 Table 1 — 7 に示した様に、E. coli C600/pTY90 + からは、C. freundii 特異的 β — ラクタマーゼ活性は検出されなかった。わずかに認められる β — ラクタマーゼ活性はE. coli C600と同様の基質特異性であり、その産生量は、E. coli C600のbasal なレベルであった。自己のプロモーターを持つDNA フラグメントの場合、ベクタープラスミドの種類にかかわらず発現するはずであるので、この1.55kbのBamHI フラグメントは、セファロスポリナーゼの構造遺伝子は含むが、プロモーターは存在しないと考えられる(50)。

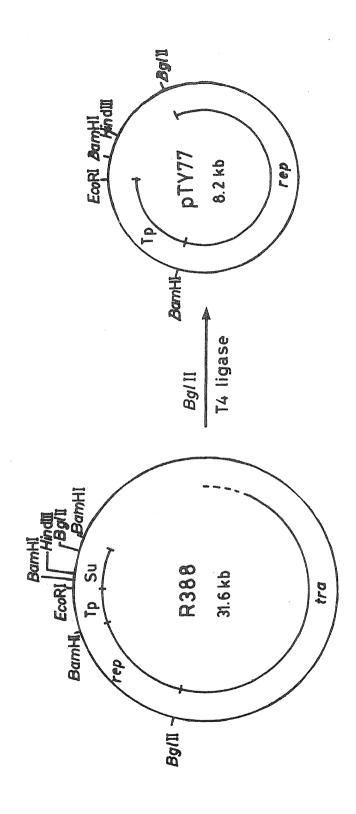


Figure 1-16 Construction of the cloning vector pTY77 from R388.



Figure 1-17 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments after endonuclease digestion with BgLII. Electrophoresis was performed in 0.8 % agarose gel for 5 hours at 80V. Tracks: a; HindIII digested

λ DNA, b; pTY77, c; R388.



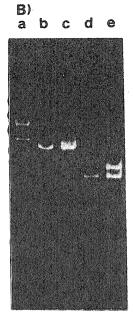


Figure 1-18 Agarose gel electrophoresis of pTY90.

- (A) 0.5 % agarose gel electrophoresis of colonylysates prepared from strains carrying trymethoprim resistant plasmid. Tracks: e and f; pTY77 plasmid DNA, i; pTY90. Plasmids shown in other tracks migrated just with pTY77.
- (B) Electrophoresis was performed in 1.0 % agarose for 6 hours at 90V. Tracks: a; HindIII-digested λ DNA, b; PstI-digested pTY90, c; PstI-digested pTY77, d; HincII-digested pTY90, e; HincII-digested pTY77.

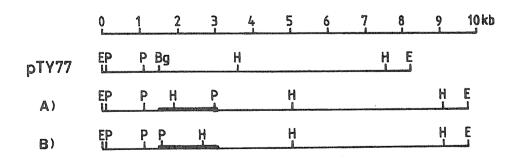


Figure 1-19 Restriction cleavage maps of pTY77, and pTY90. There are two possible direction of cloned fragment, B3 (A, B).

E: EcoRI, P: PstI, Bg: BglII, H: HincII.

Table 1-7 Substrate profile of pTY90.

Strain	Relative 1	Specific ^{b)}		
	CER	CET	CEX	activity
C. freundii				
GN346	100	8.4	21.3	10.8
E. coli				
C600/pTY90	100	274	44.4	0.005
C600 ·	100	229	40.8	0.004

a) Abbreviation: CER; cephaloridine, CET; cephalothin, CEX; cephalexin.

b) Units/mg of total cellular protein.

第 2 章 Citrobacter

freundii GN346のセファロスポリナーゼの誘導産生様式とその制御機構の解析

染色体に支配されている多くのβーラクタマーゼは、誘導的に産生されるセファロスポリナーゼ型であり、多種のグラム陰性菌種で見出されている。Citrobacter sp. (36)、Enterobacter sp. (37)(38)、インドール陽性Proteus sp. (39)(40)、Pseudomonas (41)(42)、Serratia (43)およびYersinia (44)等である。しかしながら、セファロスポリナーゼ産生制御の分子機構はいずれの菌種においても今だに明らかにはされていない。そこでC. freundii GN346、および第1章においてクローニングしたそのセファロスポリナーゼ遺伝子を用いてこの機構を検討した。

第 1 節 <u>Citrobacter freundii</u> GN346のセファロスポリナーゼの誘導産生様式

腸内細菌のセファロスポリナーゼ産生系では、ベンジルペニシリンが効率の良い誘導物質であり⁽⁴⁵⁾、

<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>のセファロスポリナーゼは6APA (6-aminopenicillanic acid) が良い誘導物質であると 報告されている(46)。

C. freundii GN346 について種々のβ-ラクタム抗生 初を誘導物質として酵素誘導を実験の部Ⅱ─22)に従っ て行った。Figure 2 — 1 は、培養液 1 mlあたりのセファ ロスポリナーゼ活性、Figure 2 - 2 は細胞総蛋白量あた りのセファロスポリナーゼ活性を用いた誘導物質濃度に 対してプロットしたものである。ベンジルペニシリンは 400 ~1600μg /m1で50~60倍の酵素誘導が見られ、セ フォキシチンは $6.3 \mu g / ml$ で、セフスロジンは $20 \sim 50$ μg /mlで、セファマンドールは25μg /ml以上でそれ ぞれ約40倍の酵素誘導が見られた。なお、C. freundii GN346 に対するベンジルペニシリンのMIC は8,000 μg /m1であり、400 ~800 μg /m1では菌の成長速度には 影響を与えないことを確認している。Sawai 等(35)によ ると、C. freundii GN346 に対して6-アミノベンジル ペニシラン酸は、特に効率の良い誘導物質ではなく、 100 μg /mlで、約 8 倍の誘導産生が見られるにすぎな 15

Figure 2 ─ 3 は、GN346 の20℃培養液が対数増殖期に達した時、ベンジルペニシリンを終濃度800 μg /mlになる様に加え、2.5 時間振とう培養し、遠心集菌および生理食塩水で2回洗浄した後、もとの0Dの1/5になる様に新たなブロスを加えて培養し、各時間ごとのセファロスポリナーゼ活性を測定したものである。対照は、同操作を行い、ベンジルペニシリン800 μg /ml含有の新

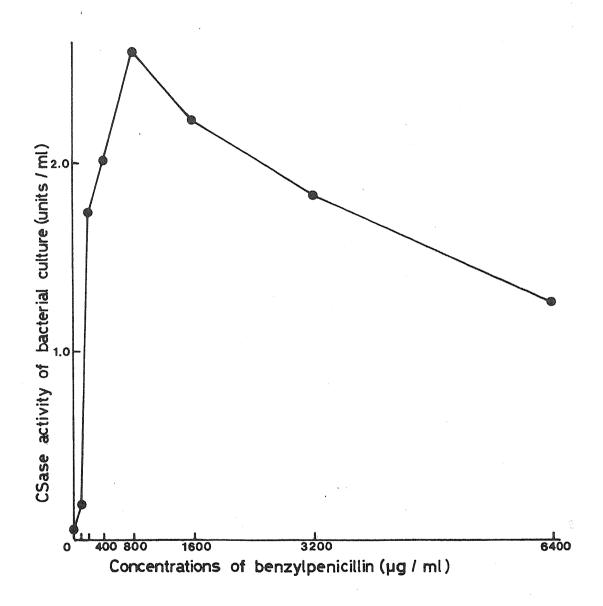


Figure 2-1

Effect of benzylpenicillin as an inducer on CSase synthesis of *Citrobacter freundii* GN346 at 20°C

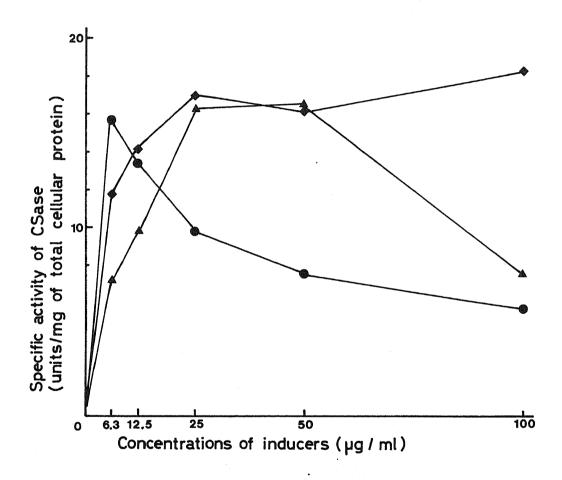
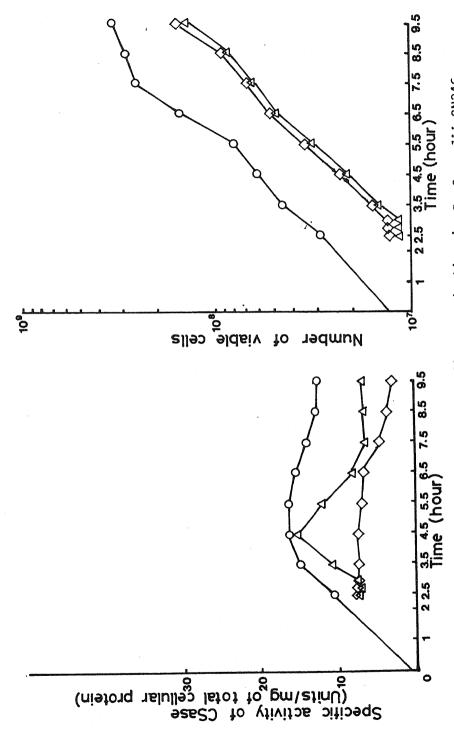


Figure 2-2 Effect of inducers on cephalosporinase synthesis of $\it Citrobacter\ freundii\ GN346\ at\ 20°C.$

Symbols: ● ; CFX (Cefoxithin), ▲ ; CFS (Cefsulodin),

• ; CMD (cefamandole).



hours (O). Cells were washed two times and suspended either with fresh broth (\diamondsuit) Cells were grown at 20°C and added 800 µg/ml of benzylpenicillin and grown for 2.5 Figure 2-3 Effect of benzylpenicillin on CSase-production in ${\it C.\ freundiv}$ GN346. or with fresh broth containing 800 $\mu g/ml$ of benzylpenicillin (riangle).

たなブロスに希釈したものと、遠心集菌せず、もとの培 養液のまま振とう培養を続けたものについて活性を測定 した。誘導物質、ベンジルペニシリンを除くと約一世代、 2 時間の間は産生量を保持しているが、その後次第に産 生量は減少した。誘導物質を除去せず培養を続行したも のは、最大産生量に達し以後次第に減少した。集菌洗浄 し、新たにベンジルペニシリン含有の培地を加えた場合 では、産生量の上昇は見られるものの、すぐに減少した。 この場合も加えた誘導物質としてのベンジルペニシリン は、菌の増殖速度に影響していない。十分な上昇が見ら れなかった原因としては、新たにベンジルペニシリンを 加えた段階では、すでにセファロスポリナーゼが十分に 産生されており、加えたベンジルペニシリンはセファロ スポリナーゼによって、ほとんど分解はされないものの 酵素との親和性が高いために、ペリプラズム内のセファ ロスポリナーゼと結合して、その誘導を引き起こすため の作用点へ到達できないためと考えられる。

Sawai 等(35)は、誘導物質、ベンジルペニシリンの添加で、C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ活性が、25℃では3倍、30℃、37℃では2倍の上昇が見られるにすぎないことを報告している。この時注目すべきことは、30℃、37℃では誘導物質を添加しなくてもすでに高い活性が見られることである。すなわち、C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼは、20℃では誘導的に産生され、37℃では半構成的に産生されることが明らかで

— 52 **—**

ある。

次に温度による誘導産生を検討した(Figure 2 — 4)。 方法は実験の部Ⅱ-20) に記した。横軸は、37℃で振と う培養を始めてからの時間、縦軸は、セファロスポリナ ーゼ活性を細胞総蛋白量あたりのユニットで表わしてあ る。30分後には誘導産生が観察され、120 分後には約40 倍の産生量が認められた。誘導酵素として良く知られて いるE. coli のβーガラクトシダーゼの場合、誘導物質 添加後に、すみやかな抑制解除が起こることと比較する と非常に遅い誘導現象である。この様な特異な誘導の原 因として、次の3つの可能性が考えられる。(1)この30分 間に活性化物質(activator)が生産される、②誘導物 質と抑制物質(リプレッサー)の親和性が低い、あるい は温度によるリプレッサーの不活化速度が遅い、(3)セフ ァロスポリナーゼの合成速度が遅い。しかしながら、20 ℃において 1 時間の薬物の誘導で、すでに50~60倍の活 性上昇を示していたことから(3)は否定される。

また、この実験で42℃処理を行った方が、37℃で行った方と比較して、若干産生量が上まわった。37℃においても誘導物質の存在で、さらに 2 倍程度の産生の誘導が起こることと考え合わせると、37℃では誘導は限界に達していないと考えられる。しかしながらC. freundii GN346 は、42℃で増殖を行うと、菌が凝集状態

(aggrregation)になり、正常な増殖を示さないので、 42℃で増殖を続け酵素産生量を測定することは不可能で

— 53 **—**

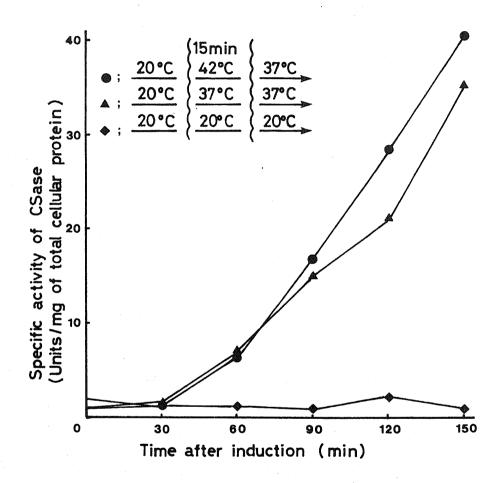
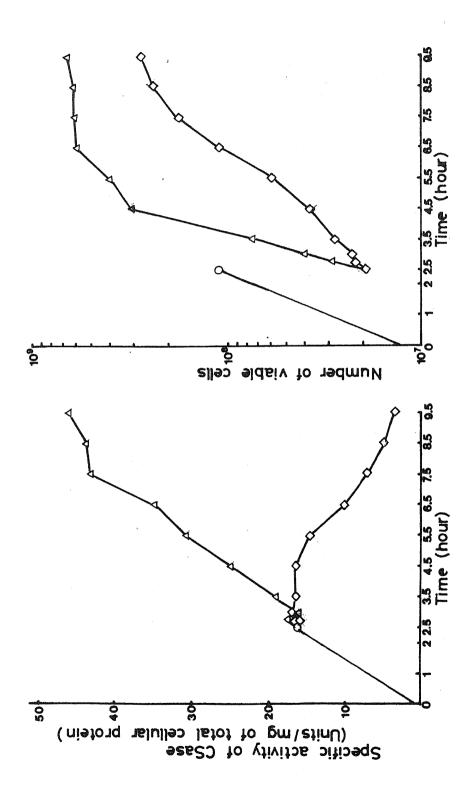


Figure 2-4 Induction of *Citrobacter freundii* GN346-cephalosporinase synthesis by temperature shift up.



Effect of temperature on CSase-production in C. freundii GN346 Figure 2-5

Cells were grown at 20°C and then at 37°C for 2.5 hours (0) and then diluted 5 times with fresh broth. Cells were grown at either 37°C (\triangle) or 20°C (\diamondsuit).

あった。

Figure 2 - 5 は培養温度のshift upとshift downによ るセファロスポリナーゼ産生の変化を検討した結果であ る。左図はセファロスポリナーゼ活性、右図は各培養時 間での生菌数を培養液1mlあたりの数で表わしている。 20 ℃ 培養液が対数増殖期に達した時を 0 timeとして、こ こで増殖温度を37℃に上げ、2.5 時間振とう培養すると、 Figure 2 — 4 と同様に約40倍の温度誘導が見られる。こ こで、新たなブロスに約5倍希釈し、増殖温度を20℃(◇) あるいは37℃ (△) にして、振とう培養を続けた。 増殖温度37℃の場合は、さらに3倍程度酵素産生量が上 昇し、菌が静止期に入ると、最大量に達した。20℃で培 養した場合は、約2時間、すなわち約一世代の間は産生 量を保持しているが、以後次第に減少していた。温度に よるセファロスポリナーゼ産生の誘導は、誘導物質、ベ ンジルペニシリンで見られた場合(Figure 2 -- 3)とき わめて類似していた。

以上の結果を基に、C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ産生の制御は次の2つの機構がに考えられる。
(1)少量でも有効でしかも長時間安定な正の制御物質(アクティベーター)を作る。その物質は、培養温度の上昇や誘導物質の添加により新たに合成されるか、または温度による3次構造または4次構造の変化、あるいは、誘導物質との結合によって、アクティベーターに転換する。その結果、セファロスポリナーゼ構造遺伝子の転写が促

進される。この様な制御機構は、アラビノースオペロンで知られている(47)。(2)ラクトースオペロンで知られる様な(48)リプレッサーが作られ、リプレッサーは誘導物質と結合することにより、不活化される。またそのリプレッサーはits (temperature sensitive)変異(49)と類似の性質を持ち、培養温度の上昇により、リプレッサーが不可逆的に変形して失活し、抑制が解除される。その結果、セファロスポリナーゼ遺伝子の転写が開始される。その後、低温で培養しても新たにリプレッサーが生合成されるまでの1ag timeは酵素合成が構成的に進む。

この2つの機構のいずれでも実験結果を現象的には説明できる。また第2章第3節においては(1)の考えを支持する実験結果を得た。しかし、(1)、(2)両方の制御系を持つ複雑な系である可能性は否定できない。また、E. coliのセファロスポリナーゼ遺伝子で知られている様なアテニュエーター(attenuator)(51)や、グラム陰性菌のBacillus sp.で知られている様なアンティリプレッサー(antirepressor)(52)等の関与も可能性として残される。

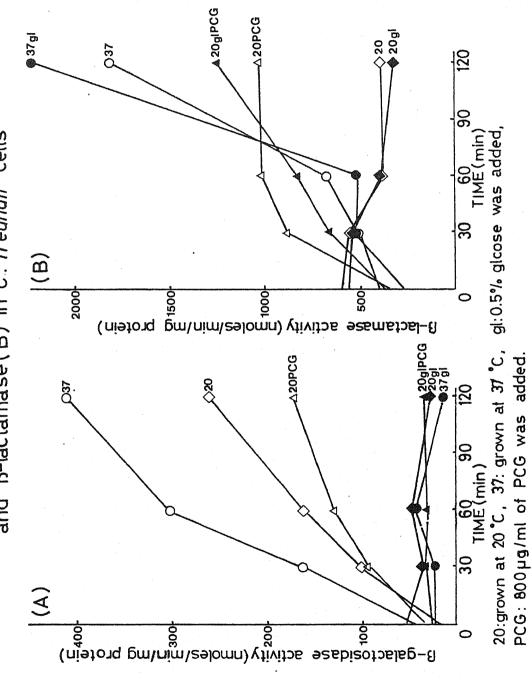
第 2 節 <u>Citrobacter freundii</u> GN346のセファロスポリ ナーゼ産生と菌体内cAMPレベルとの関係

一般に、細菌はある化合物を唯一の炭素源として与えると、それを用いるのに必要な酵素を産生する。たとえ

ば、肉エキス等を含む通常の培地でE. coli を増殖させると、ラクトースの代謝に必要なガラクトシド透過酵素も、βーガラクトシダーゼも作らない。しかし、ラクトースを唯一の炭素源として与えると、これらの酵素を大量に産生する。しかし、ラクトースと共にグルコースを培地に加えると、これらのラクトース利用の酵素の住止まる。この様なグルコース効果(glucose effect)あるいは、異化代謝産物抑制(catabolite repression)が関与することが明らかにされている(54)。この様な制御がかかる遺伝子としては、lac 、ara 、gal 、mal の各オペロン、マンニトールおよびソルビトールの利用、走化性、繊毛、クロラムフェニコールアセチルトランステーゼ、クロアシン産生遺伝子等が知られている。

そこで、 $Citrobacter\ freundii\ GN346$ のセファロスポリナーゼ遺伝子の発現における、グルコース効果を検討した。実験方法は方法の部II—17)に記した。 $Figure\ 2$ — 6 はIPTG (Isopropylthio- β -galactoside) を加えて誘導をかけた時を 0 timeとして、酵素活性を測定した結果である。 (A) が β -ガラクトシダーゼ活性、 (B) が β -ラクタマーゼ活性を表わしている。それぞれ、pH 7.0 、0.1Mリン酸バッファの条件で、 (A) ONPG (0-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) および (B) セファロリジンを基質として測定を行った。

Figure 2-6 Effect of glucose on induction of B-galactosidase (A) and B-lactamase (B) in C. freundii cells



- C. freundii GN346 の β ガラクトシダーゼ活性は、0.5%のグルコースの添加で明らかに抑制された。グルコース無添加での β ガラクトシダーゼ産生量は、(1)37で増殖、(2)20で増殖、(3)ベンジルペニシリン存在下20で増殖、の順に減少しているが、これは、細胞の増殖速度の差によると考えられる。
- C. freundii GN346 の β -ラクタマーゼ活性は、20 $^{\circ}$ 、 37 $^{\circ}$ いずれの温度においても、また、誘導物質、ベンジルペニシリンの添加の有無にかかわらず、グルコースの影響は見られなかった。

以上の結果より、C. freundii GN346 の β – ラクタマーゼ産生は、菌体内CAMP レベルに、その産生が制御される β – ガラクトシダーゼなどの酵素系とは異なる制御を受けていると考えられる。また非異化代謝酵素を支配する酵素、トランスポゾンTng に支配され、構成的に産生されるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(55)、などとも産生様式を異にするものと思われる。

第3節 欠失変異体を用いた誘導産生機構の解析

第2章第1節で述べた誘導産生の機構を、さらに、遺伝学的な手法を用いて検討するために、第1章で得られた、C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子をクローニングしたプラスミドpTY71 を用いて、次の研究を行った。

-- 60 --

まず、pTY71 をC. freundii GN346-16に形質転換法で 導入し、その発現を調べた。トランスフォーマントは、 25 μg /mlのカナマイシン含有マッコンキー寒天平板で 選択した。得られたトランスフォーマントの一つから、 DNA を簡易法で調製し、0.8 %アガロースゲル電気泳動 を行い、E. coli C600/pTY71 + より得られたプラスミ ドDNA と比較した(Figure 2 ─ 7)。確かにpTY71 プラ スミドが、C. freundii GN346-16中に導入されているこ とが確かめられた。GN346-16は、GN346 をNTG 処理して 得られた変異株で(35)、セファロスポリナーゼ産生量は 親株の1%程度であり(Table 2-1)、また温度誘導 能も失っている(Figure 2 — 8)。GN346-16/pTY71 + の37℃における酵素産生量は、親株GN346 と同レベルで あった (Table 2-1)。Figure 2-8 は温度誘導能を 第2章第1節と同様の方法で検討した結果である。さら に、GN346-16/pTY71 + は、GN346 と同様の典型的な温 度誘導能が認められ、酵素産生量はGN346 と同レベルに 達した。この結果より、クローニングされた7.3kb の EcoRI フラグメント内には、セファロスポリナーゼの構 造遺伝子と共に、プロモーター、オペレーター領域を含 むことが明らかとなった。

次に、7.3kb <u>Eco</u>RI フラグメント内の制御遺伝子を検 討するために、制限酵素<u>Hin</u>cIIによる部分切断をおこなった。1 μg のpTY71 DNA に対して、1 ユニットの <u>Hin</u>cIIを加え、37℃で5、10、15、30、および45分間反

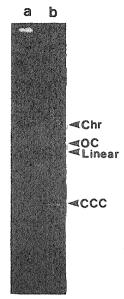


Figure 2-7 Agarose gel electrophoresis of pTY71 DNA prepared from $GN346-16/pTY71^+$ (a) and $C600/pTY71^+$ (b). Electrophoresis was performed in 0.8 % agarose for 5 hours at 100mA.

Table 2-1 Cephalosporinase activity of the $\it Citrobacter\ freundii$ cells grown at 37°C.

Strain	Specific activity (Units/mg of total cellular protein)
GN346	10.8
GN346-16	0.09
GN346-16/pTY71	11.5
GN346-16/pTY132	0.63
GN346-16/pTY133	0.78

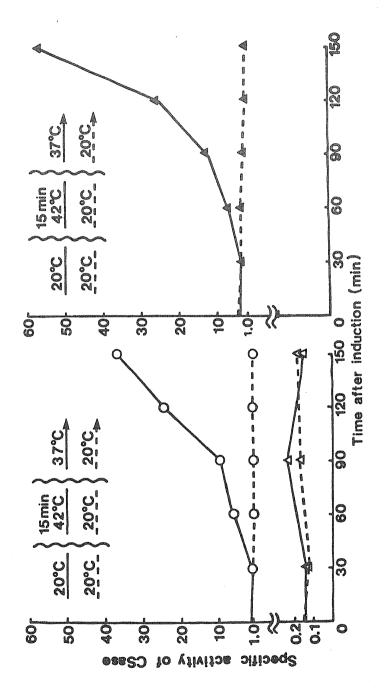


Figure 2-8 Induction of CSase synthesis by temperature shift up O:GN346, A:GN346-16, A:GN346-16/pTY71

応後、直ちに65℃、15分加温し反応を停止させた。0.8 % の ア ガ ロ ー ス ゲ ル 電 気 泳 動 で 部 分 切 断 を 確 認 し た (Figure 2 — 9) 。 15分および30分切断処理したサンプル をT4リガーゼでライゲーションし、E. coli C600を形質 転換した。セファロスポリナーゼ12.5 µg /mlで得られ たトランスフォーマントを6株、コロニー溶菌法で0.8 % (EPバッファ) アガロースゲル電気泳動にかけた結果 がFigure 2 -10である。いずれもpTY71 電気泳動より移 動度が大きく、分子量が小さくなっていることを示唆し た。この6クローンよりプラスミドDNAを簡易法で調製 し、制限酵素HincIIで切断して、0.8 %アガロースゲル 電気泳動を行った結果がFigure 2 --11である。1.3kb の HincIIフラグメントが欠失したプラスミド (No.2) を、 pTY132、0.6kb 、0.7kb (ダイマー) および1.3kb HincIIフラグメントが欠失したプラスミド (No.1) を、 pTY133とした (Figure 2 -13) 。 それぞれのプラスミド DNA をC. freundii GN346-16へ形質転換法で導入し、カ ナマイシン25μg /ml耐性のトランスフォーマントを選 択した。得られたトランスフォーマントよりプラスミド DNA を簡易法で調製し、0.8 %アガロースゲル電気泳動 を行い、E. coli C600より調製したプラスミドDNA と比 較した (Figure 2 ---12)。この結果より、pTY132および pTY133がC. freundii GN346-16に保持されていることを 確認した。GN346-16/pTY132+ 、およびGN346-16/ pTY133+ のセファロスポリナーゼ産生量をTable 2-1

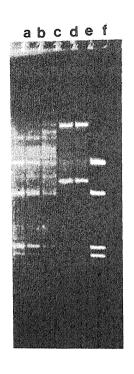


Figure 2-9 Agarose gel electrophoresis of pTY71 DNA partially digested with HincII endonuclease. Electrophoresis was performed in 0.8 % agarose at 100V for 4 hours. 1 µg of pTY71 DNA was digested with 1 unit of HincII for 5 min (e), 10 min (d), 15 min (c), 30 min (b) and 45 min (a). Lane f: pTY71 DNA completely digested with HincII.

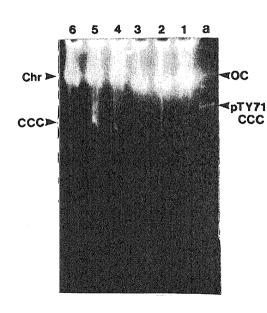


Figure 2-10 Agarose gel electrophoresis of colony lysates prepared from strins harbouring deletion plasmids (1 to 6). Lane a: pTY71 DNA. Chr and CCC indicate chromosomal DNA and covalently closed circular plasmid DNA. Electrophoresis was performed in 0.8 % agarose gel at 100 mA for 6 hours.

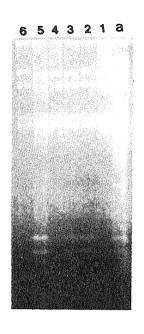


Figure 2-11 Agarose gel electrophoresis of *HincII*-digested plasmid DNAs prepared from just the same strains of Figure 2-10. Electrophoresis was performed in 1.5 % agarose gel at 80 V for 5 hours.

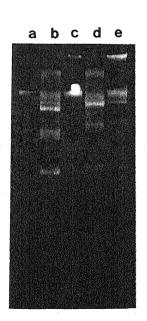


Figure 2-12 Agarose gel electrophoresis of no-digested DNAs. Electrophoresis was performed in 0.8 % agarose gel at 80 V for 4 hours.

Lane a: GN346-16, b: C600/pTY133 c: GN346-16/pTY133, d: C600/pTY132,

and e: GN346-16/pTY132.

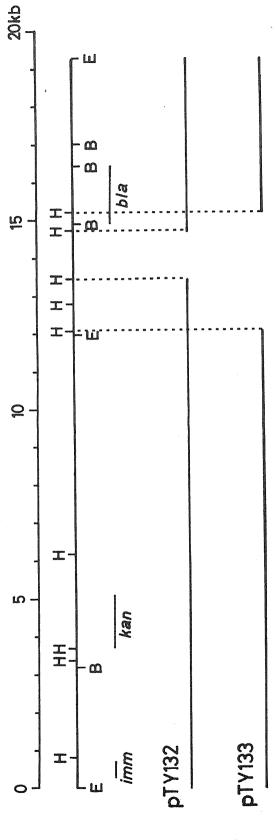


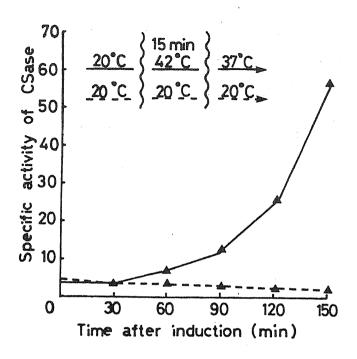
Figure 2-13 Construction of deletion plasmids, pTY132, pTY133 by partial digestion Abbreviations: E; EcoRI, B; BcmHI, H; HincII, imm; Colicin El immunity gene, kan; kanamycin resistance gene, b1a; β -lactamase gene. with restriction endonuclease $\mathit{Hin}\mathsf{cII}$.

に示した。GN346-16中でpTY132およびpTY133はpTY71 の約5%の産生量しか発現していない。また、それらの温度誘導能を検討したのがFigure 2 —14である。GN346-16/pTY71 + は、典型的な温度誘導を示すが、GN346-16/pTY132+、およびGN346-16/pTY133+ は温度誘導能を失っていた。

pTY71 の構造遺伝子の左側、少なくとも1.3 kbllincII フラグメントを欠失することにより、温度誘導能は失われ、さらに酵素産生量は、顕著に低下することが明らか となった。この結果は、C. freundii のセファロスポリナーゼ産生には、ポジティブな制御系が関与していることを示唆している。

次に、誘導物質に対する反応性を見るために、GN346-16/pTY71 + の培養菌液へベンジルペニシリンを添加し、酵素産生量を検討した(Figure 2 ─ 15)。培養温度20℃において、ベンジルペニシリンによる誘導産生は、ほとんど認められなかった。この条件下で、3,200μg/ml以上のベンジルペニシリンを添加した時、GN346-16/pTY71 + は、明らかに溶菌を起こしていた。また、GN346-16はGN346 に比較し、37℃の増殖中に凝集しやすく、菌細胞表層に変異を起こしている可能性が考えられた。Figure 2 ─ 16は、GN346 とGN346-16の膜蛋白を、実験の部Ⅱ ─ 23)の方法で調製し、10%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたものである。主な膜蛋白の電気泳動パターンでの差異は、認められなかっ

た。しかし、GN346 とGN346-16とで誘導物質の菌細胞表層透過が異なるため、GN346-16/pTY71 + が、酵素誘導能を示さない可能性も否定出来ない。その他、GN346-16/pTY71 + で誘導物質による酵素誘導が低い理由として、GN346 は、2種のセファロスポリナーゼ産生制御系を持つことが考えられる。一つは、温度誘導に関係し、他は誘導物質による誘導に関するものである。GN346-16/pTY71 + では、温度誘導能を示す制御系しか働いていないとすれば、実験的に得られた現象を説明可能である。一段階の変異の中でも、温度誘導能を失った変異体が実際に分離されている(56)。しかし、この様な制御系を実証するためには、さらに多くの実験的根拠が必要である。



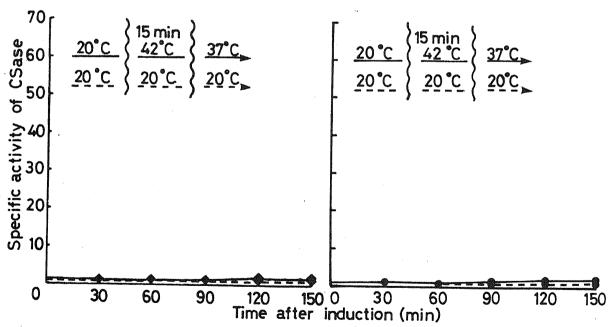


Figure 2-14 Induction of CSase synthesis by temperature shift up •: GN346-16/pTY71, •: GN346-16/pTY132, •: GN346-16/pTY133.

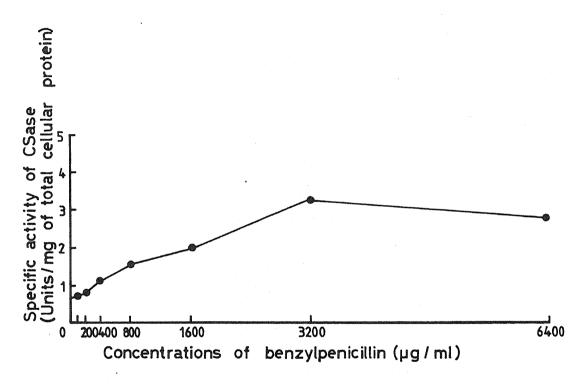


Figure 2-15 Effect of benzylpenicillin as an inducer on CSase synthesis of $\it Citrobacter\ freundii\ GN346-16/pTY71\ at\ 20°C.$

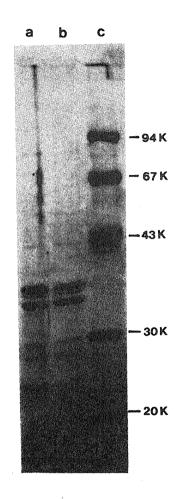


Figure 2-16 $\,$ 10 $\,$ % SDS polyacrylamide gel electrophoresis of outer-membrane proteins.

Tracks: a; GN346, b; GN346-16, c; markers.

第 3 章 Citrobacter

freundiiのセファロスポリナーゼ遺伝子の他のグラム陰性腸内細菌における発現

typhimurium、Proteus mirabilis、Proteus morganii、Proteus vurgalisに、クローニングしたC. freundii のセファロスポリナーゼ遺伝子を入れ、その発現を検討した。

E. coli は、K-12の亜株C600を用いたが、K-12は、染色体94.3分にE. coli 特異的 β -ラクタマーゼを支配する遺伝子ampCの存在が知られている。この β -ラクタマーゼは、セファロスポリナーゼで、構成的に産生され、菌の増殖速度の上昇と共に産生量が増加する。その理由は、リボソーム量により構造変化を受ける、染色体のアテニュエーター(attenuater)構造によって説明されている $^{(51)}$ 。また、この遺伝子のプロモーターと、 frdD(fumarate reductase)のターミネーター(terminater)とは、重なっていることが明らかにされており $^{(57)}$ 、他に調節遺伝子は発見されていない。用いたC600を含め、多くのE. coli 株はセファロスポリナーゼの産生はきわめてわずかであるが、この遺伝子の変異によって、 β - ラクタマーゼ産生が上昇することが知られている。その

遺伝的機構として、(1)遺伝子の重複増幅(58)(59)、(2)プロモーター構造のconsensus sequenceへの変異、すなわち、 E. coliで知られているより効率の良いプロモーター塩基配列への転換(60)、(3)アテニュエーター構造の変異(61)、の3つの原因が知られている。

Proteus morganii 特異的 βーラクタマーゼには、構成的酵素と誘導的酵素の両方が知られている。誘導的酵素は、ベンジルペニシリン等で誘導され、構成的酵素は、培養温度に影響されずに高い酵素産生量を示す(62)。用いたP. morganii 1510/9 は、構成的にきわめて高い酵素産生量を示す、P. morganii 1510をNTG 処理し、酵素産生量が顕著に低下した株である。

P. vurgalis は、誘導的セファロスポリナーゼを産生するが、用いたP. vurgalis K22-2 は、 β — ラクタム抗生物質に対するMIC が高いにもかかわらず、 β — ラクタマーゼは検出されない菌株である。

P. mirabilis は、染色体性ベニシリナーゼを構成的に 産生することが知られている菌種である。使用菌株 P. mirabilis 25は、β-ラクタマーゼ産生が認められない 菌株である。

S. typhimurium は、E. coli と類似し、構成的なセファロスポリナーゼを支配する遺伝子をその染色体上に持つが、使用菌株S. typhimurium LT-2 は、β – ラクタマーゼをほとんど産生しない菌株である。

-- 74 --

第 1 節 他菌種への<u>Citrobacter freundii</u>GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子の導入とその発現

<u>C. freundii</u> GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子の導入には、プラスミドpTY75 を用いた。pTY75 は、incWのプラスミドR388 (Figure 3 — 1) の一個所存在する、<u>Bco</u>RI 切断部位に、pTY71 のE2フラグメント (7.3 kb <u>Bco</u>RI フラグメント) をクローニングしなおしたものである。R388とpTY71 を<u>Bco</u>RI で切断し、T4リガーゼでライゲーションし、<u>E. coli</u> C600を形質転換し、トリメトプリム50μg /m1、セファロリジン12.5μg /m1耐性、カナマイシン12.5μg /m1感受性のクローンを選択した。得られたクローンの1つよりプラスミドDNA を調製し、制限酵素<u>Eco</u>RI で切断し、0.8 %アガロースゲル電気泳動を行った(Figure 3 — 2)。R388にpTY71 の7.3 kb <u>Eco</u>RIフラグメントがクローニングされていることが確認された。

E. coli 以外の他菌種へのpTY75 の導入方法は、Lブロス中での接合伝達により行った。メイティング時間は6時間で行った。P. mirabilis 25、S. typhimurium LT-2、P. vurgalis K-22-2、P. morganii 1510/9 からいずれも、リファンピシン耐性マーカー(MAC 200 μg/ml)をつけた変異株を分離して用いた。トランスコンジュガントの選択は、トリメトプリム50μg/mlおよびリファンピシン50μg/ml含有マッコンキー寒天平板で

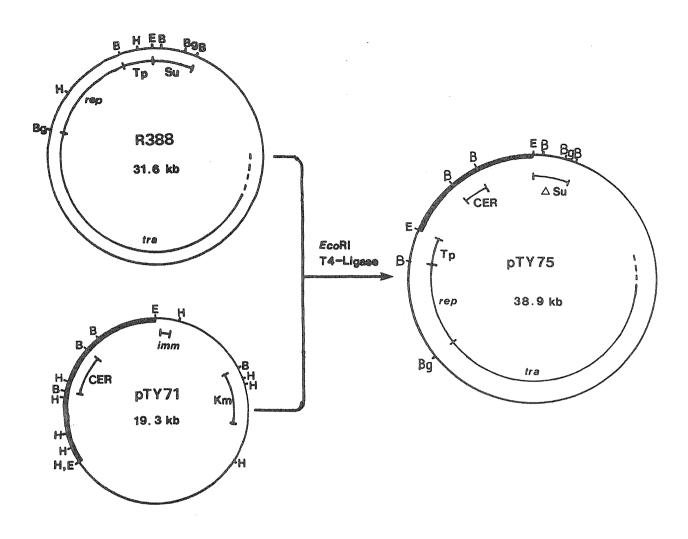


Figure 3-1 Construction of transferable plasmid, pTY75 carrying cephalosporinase gene(s) of *Citrobacter freundii*.



Figure 3-2 Agarose gel electrophoresis of EcoRI-digested pTY71 (a), pTY75 (b), and R388 (c).

Table 3-1 Substrate profile of cephalosporinase of *Citrobacter freundii* GN346 in various strains.

Strain	Relative rate of hydrolysis (%)						Specific ^{a)}		
Strain	CER CET		CEZ	CEX	PCG		activity		
C. freundii					•				
GN346	100	8.4	174	21.3	1.7		10.8		
GN346-16	100	- .	154	25.7	***		0.09		
GN346-16/pTY75	100	13.3	149	19.8	1.7		111.7		
GN346-16/pTY71	100	7.3	195	21.4	1.7		11.5		
E. coli				NOTE THAT SHEET IN	MAIN				
C600/pTY75	100	12.1	180	21.1	5.6		0.21		
C600/pTY71	100	12.3	174	22.4	3.0		0.43		
C600/pTY91	100	13.2	161	25.3	3.2		0.39		
C600/pTY92	100	11.0	155	21.8	2.0		0.56		
C600/pTY93	100	9.9	165	20.8	2.4		0.12		
C600/pTY94	100	11.2	159	23.2	2.5	•	0.54		
P. mirabilis		paga palida palida solee	and tree	ofice Males stops make			re ann 1001 san 1015 res		
25/pTY75	100	604	187 ⁻	_ :.	٠		0.03		
S. typhimurium			ATOM COMP		1700 ina		Man grow storm, stole stole stole		
LT-2/pTY75	100	12.7	206	23.1	1.8		0.33		
P. morganii			\$100 Brow	Maga Mada Milita Milita			an gran india nata gala shai		
1510/9/pTY75	100	8.7	159	-	-		0.65		
P. vurgalis				TO 2000 Rate 0.000			on also has been too too		
K22-2/pTY75	100		NATION		-	•	0.05		

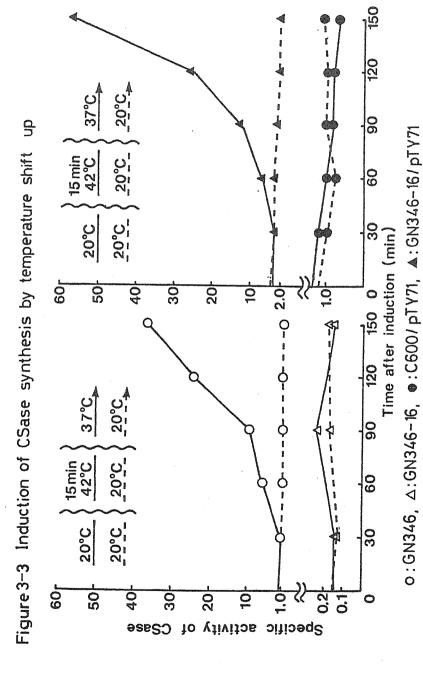
a) Units/mg of total cellular protein.

行った。但し、<u>C. freundii</u> GN346-16の場合は、トリメトプリム50μg /ml含有シモンズクエン酸寒天平板で選択した。<u>E. coli</u> は、クエン酸利用能が無いので、<u>C. freundii</u>のみを選択できる。Table 3 — 1 に37℃における、これらトランスコンジュガントの酵素産生量および基質特異性を示した。

E. coli , P. mirabilis , S. typhimurium , P. vurgalis、P. morganii いずれにおいても、C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子の発現が確認され た。しかし、きわめて低いレベルでしか発現していない。 P.mirabilis およびP. vurgalis においてはGN346 の 0.3 %~0.5 %程度であり、他菌種ではGN346 の3~6 %程度の酵素活性であった。E. coli においては、その セファロスポリナーゼ遺伝子の転写が、pTY71 および pTY95 での自己のプロモーターによる場合も、また、 pTY91 、pTY92 、pTY93 、pTY94 、で見られるベクター プラスミドのプロモーターからのread throughによる場 合も、GN346 の 4 %程度であった。また、興味ある点は、 C. freundii GN346-16中で、pTY71 とpTY95 では酵素産 生量が10倍異なることである。pTY71 は、プラスミド ColE1 にカナマイシントランスポゾンIn5 の転移したpM K1をベクターとしており、E. coli 中で通常そのコピー 数は20~30とされている⁽⁶³⁾。また、pTY95 はincWのプ ラスミドR388をベクターとしており、E. coli 中では通 常そのコピー数は2~3程度と考えられている⁽⁶⁴⁾。

Table 3—1 に記したプラスミドは、いずれもその宿主において、安定であったが、コピー数は、E. coli 中と同じとは必ずしも考えられない。従って、酵素産生量の相違は、(1)プラスミドのコピー数が、E. coli 中とC. freundii中とでは異なるため、(2)コピー数は、E. coli 中と同様であり、ポジティブな制御の他にネガティブな制御系が存在し、セファロスポリナーゼ遺伝子発現に対するnegative gene dosage effect が働いたため、(3)プラスミドベクターからの強力なread throughが、C. freundiiにおいてのみ働く、等の理由が考えられる。

E. coli 中での、このセファロスポリナーゼナーゼ遺伝子の発現に対する培養温度の影響を検討した(Figure 3 → 3)。 E. coli C600/pTY71 + は、温度による誘導産生は認められなかった。次に、E. coli C600/pTY71 + のベンジルペニシリンによる誘導を検討した(Figure 3 → 4)。方法は実験の部Ⅱ → 22)に記した。培養液 1 m1 あたりの酵素活性値を測定した。なお、200 μg/m1以上のベンジルペニシリンの添加では、溶菌が観察された。この結果は、E. coli C600/pTY71 + では十分な誘導物質存在下でも、20℃においては酵素誘導がほとんど起こらないことを示している。さらに、種々の培養温度におけるベンジルペニシリンの効果を検討した(Table 3 → 2)。対数増殖期中期(0D610nm = 0.5)の菌培養液を新たなブロスで5倍希釈し、ベンジルペニシリン12.5μg/m1を加え、さらに、各培養温度で0D610nm = 0.5



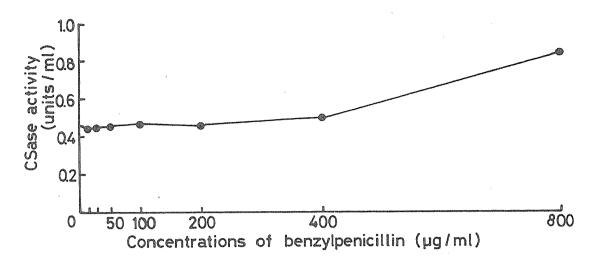


Figure 3-4 Effect of benzylpenicillin on CSase synthesis in E. coli C600/pTY71 at 20°C.

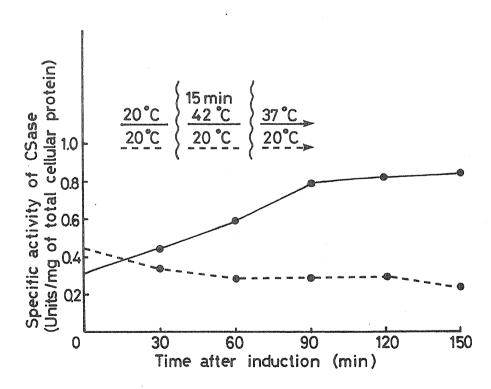
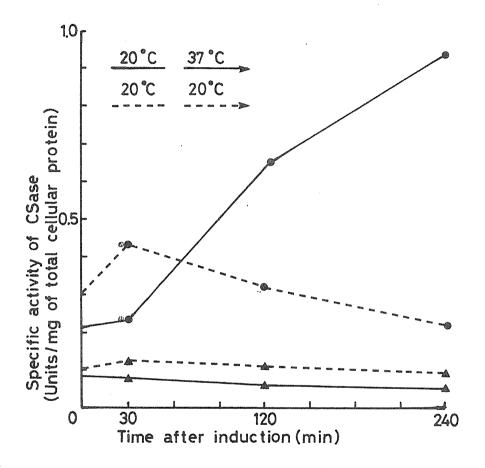


Figure 3-5 Induction of CSase synthesis in $S.\ typhimurium$ LT-2/pTY75 by temperature shift up.



Symbols: •; Proteus morganii 1510/9/pTY75

♠; Proteus vurgalis K22-2/pTY75.

Table 3-2 Cephalosporinase activity in $E.\ coli$ C600/pTY71 grown at various temperature in the presence or absence of benzylpenicillin.

Growth temperature	Inducer concentration (μg/ml)	Cephalosporinase activity (Units/mg of total cellular protein)
25°C	0 12.5	0.58 0.61
30°C	0 12.5	0.52 0.56
37°C	0 [°] 12 . 5	0.68 0.73
42°C	0 12.5	0.69 0.73

A bacterial culture growing exponentially in BHI broth at an indicated temperature was diluted 5-fold with a fresh medium to give an optical density of about 0.1 at 610nm. In the case at cultivation in the presence of an inducer, the indicated amount of benzylpenicillin was added to the culture. The diluted culture was incubated with shaking at the indicated temperature until its optical density at 610nm reached about 0.5. Cephalosporinase activity was measured by Perret's method. Cefazolin was used as substrate.

になるまで振とう培養後、酵素活性を測定した。対照として、ベンジルペニシリンを添加しない以外は同様の操作を行った菌培養液の酵素活性を測定した。この結果より、E. coli C600/pTY71 + は、<math>20 $^{\circ}$ $^{\circ}$

S. typhimurium LT-2 /pTY95 + 、P. morganii 1510 /9 /pTY95 + およびP. yurgalis K22-2 /pTY95 + の培養温度上昇によるセファロスポリナーゼの誘導を検討した結果がFigure 3 ─ 5 およびFigure 3 ─ 6 である。これらの酵素産生量は、C. freundii におけるよりもいずれも低く、37℃においても20℃の、2~3倍程度の増加しか示さない。すなわち、菌種により差は認められるが、E. coli におけるのと同様、これらの菌においても、C. freundiiのセファロスポリナーゼは、十分に誘導産生が起こらないことが明らかとなり、その結果、産生量が低いものと思われる。

この事実は染色体性のセファロスポリナーゼ遺伝子がプラスミド上に転移して、Rプラスミド化しても、他菌種内では宿主菌の耐性には大きく寄与できないことを示唆している。プラスミド性のセファロスポリナーゼが、自然界よりほとんど分離されない一因と考えられる。現

— 84 —

在報告されている唯一のプラスミド支配セファロスポリナーゼの例は、序論でもふれたが、P. mirabilis 22 で発見された、E. coliのampC遺伝子が転移したプラスミド、R22Kである。このプラスミドはすでに保存中に消失しており、現在他に例は無い。著者の得た結果から、耐性値の低い菌株を多くスクリーニングすれば、染色体性セファロスポリナーゼの転移したプラスミドが自然界より検出可能と思われる。

また、C. freundii のセファロスポリナーゼ遺伝子の 発現が他菌種において低い原因と関連して、Blumenberg およびYanofskyの興味ある報告がある(65)。彼らは、C. freundiiのトリプトファンオペロンをクローニングし、 E. coli 中でその発現を調べた。E. coli 中では、最小 培地で培養しても、また、トリプトファンオペロンのリ プレッサーであるtrpRとアテニュエーターから脱抑制(derepression) させるIAA (Indole-3- acrylic acid) を加えても、トリプトファンオペロンの発現はきわめて 低いことを観察している。すなわち、E. coli 中では、 セファロスポリナーゼと同様、発現が低く、しかも誘導 がかからない。。しかし、C. freundii 中では、trpRの 抑制、脱抑制の発現は顕著に行われ、脱抑制により、ト リプトファンオペロンの支配する酵素群の産生量は、き わめて髙かった。また、彼らは、C. freundii 、E. coli, Shigella dysenteriae, S. typhimurium, K. aerogenes 、Serratia marcescens のトリプトファンオ ペロンのプロモーター領域を比較している。C. freundiiを除く、これら腸内細菌のトリプトファンオペロンのプロモーターの塩基配列はきわめて類似しているが、C. freundiiのそれは、RNA polymeraseの認識部位の塩基配列が、他の菌種と異なっている。これが、C. freundiiのセファロスポリナーゼ遺伝子のE. coli 中における発現の低さの一因かもしれない。

また、トリプトファンオペロンのオペレーター部分、すなわちtrpRの支配するリプレッサー結合領域は、すでにE. coli において明らかにされており、きわめて特徴的なdyad symmetry を形成している。C. freundii のトリプトファンオペロンのオペレーター部分にも、このdyad symmetry は認められるが、E. coli のそれとは明らかに異なるパターンである。E. coli 中で、C. freundiiのセファロスポリナーゼ産生がトリプトファンオペロンの支配する酵素産生と同様に、構成的性質を示す一因が、このことにあるのかもしれない。

第2節 E. coli 染色体変異株C600M2の分離とその性質

第 3 章第 1 節で述べたように、<u>E. coli</u> 中では、<u>C.</u> freundiiのセファロスポリナーゼ遺伝子の発現は低く、かつ構成的であった。この原因が、<u>E. coli</u> すなわち宿主側にあるのではないかと予想して、<u>E. coli</u> C600/pTY71 + の37 ℃ におけるセファロスポリナーゼ高度産生

— 86 —

株を、セファロリジン高度耐性を指標にNTG処理により 分離した。NTG 処理は100 μg /ml、30℃、30分で生存 率1%の条件で行った。得られたセファロリジン耐性株 を50株調べたところ、MAC 400 µg /mlを示す株が2株 得られた。この2株をC600M2/pTY71 + と C600M3/ pTY71 + と命名した。分離頻度は、およそ10 であった。 この2株の耐性値の上昇が、プラスミドpTY71 の変異で ないことを調べるために、一度プラスミドを脱落させ、 新たにプラスミドpTY71 を導入した。プラスミド脱落法 には、高温処理法、色素(アクリジン系、エチジウムブ ロマイド等)処理法、界面活性剤(SDS等)処理法等が あるが、他の変異が誘起されるおそれがあるため、ここ ではプラスミド間の不和合性を利用する方法を用いた。 pTY48 はpTY71 と同じ不和合性群に属するプラスミド であり、Figure 3 — 7 に示す様に作成した。ColE1 のミ ニプラスミドpA03にアンピシリントランスポゾンTn2601 をRGN14 (Rms212) より転移させて得たpA03:Tn2601‡ 38のただ一箇所存在する制限酵素BamHI 切断部位に、 pMC81 のラクトースオペロンを含むBamHI フラグメント をクローニングしたのがpTY48 である。lacZ、lacY、 lacA遺伝子は、トランスポゾン内の trpR (転移遺伝子 の一つ)のプロモーターからの転写によって発現されて いる。pTY48 はColE1 免疫能、アンピシリン高度耐性(>3200 µg /m1) およびラクトース利用能を示し、さら

に、一夜、薬剤を無添加の培地で培養すると、95%以上

脱落するという性質を示す。脱落は、アンピシリン感受性、あるいは、マッコンキー寒天培地等のラクトース利用能を見る培地でのコロニーの色で容易に判別できる。

前述したセファロリジン高度耐性変異株に、pTY48 を形質転換法で導入し、アンピシリン400 μg /m1で選択した。C600/pTY71 + のセファロリジン高度耐性株はアンピシリンのMAC が200 μg /m1であり、pTY48 あるいはpTY48 とpTY71 の共存株のみが選択される。pTY48 が共存あるいは単独に存在している株は、C600が1acY - なので、pTY48 が導入さされることにより、マッコンキー平板で、赤色に着色したコロニーを作ることで判別できる。この様なアンピシリン高度耐性株より、カナマイシン感受性を指標に、pTY48 のみを持つ菌株を分離した。得られたC600M2/pTY48 + およびC600M3/pTY48 + を、薬剤無添加のマッコンキー平板に、コロニーが200 ~300検出される様に塗布した。約50%の割合でラクトース利用能マイナスのコロニーが検出され、そのうちアンピシリン感受性株を選び、C600M2およびC600M3とした。

C600M2およびC600M3にpTY71 を形質転換法で入れ直し、セファロリジンの耐性を調べたところMAC でC600M2/pTY71 + は400 μg /m1であり、C600M3/pTY71 + は、C600/pTY 71 + と同じ100 μg /m1であった。これより最初に得られたC600M3/pTY71 + で得られたセファロリジン高度耐性はプラスミドの変異であり、C600M2/pTY71 + は染色体性変異によることが明らかとなった。

— 88 —

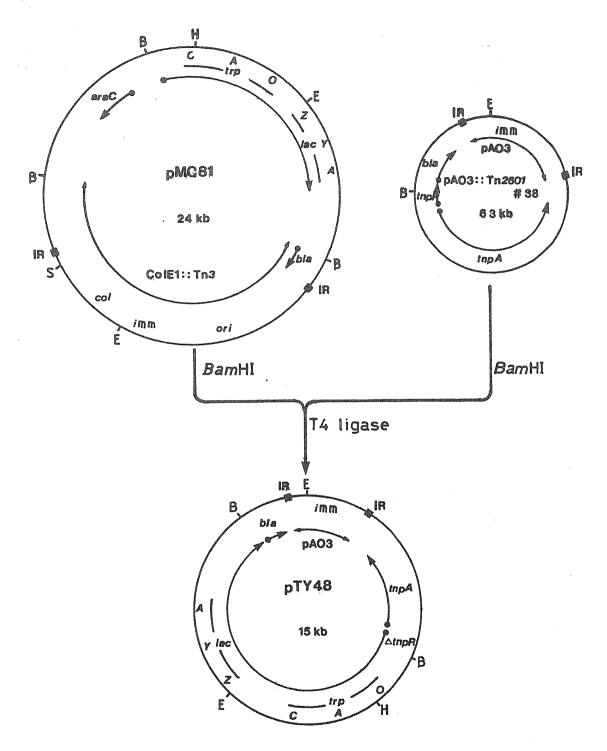


Figure 3-7 Construction of pTY48.

E: EcoRI, B: BamHI, H: HindIII, S: SmaI.

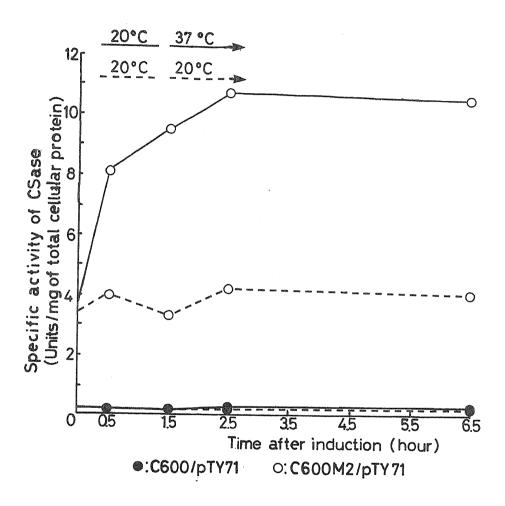


Figure 3-8 Induction of cephalosporinase synthesis by temperature shift up.

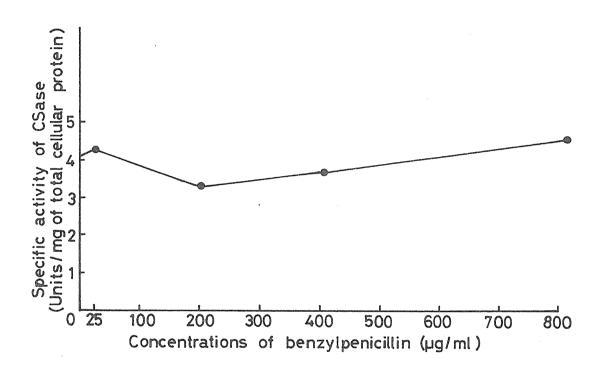


Figure 3-9 Effect of benzylpenicillin on cephalosporinase synthesis in C600M2/pTY71 at $20^{\circ}C$.

以後C600M2を用いて解析を行い、この変異をM2変異と称する。

次に、M2変異の性質を検討した。まずC600/pTY 71+ とC600M2/pTY71 + の温度誘導を検討したところ、 C600M2/pTY71 + は、C600/pTY 71+ に比べ、20℃にお けるbasal な活性が約10倍上昇しており、37℃に増殖温 度を上げると、さらに2.5 倍程度酵素産生量の上昇が認 められた(Figure 3 — 8)。

Figure 3 — 9 は、C600M2/pTY71 + のセファロスポリナーゼ産生のベンジルペニシリンによる影響を見たものである。Figure 3 — 4 に示したC600/pTY 71 + のセファロスポリナーゼ産生と同様、ベンジルペニシリンの添加による影響は認められなかった。C600M2の変異は、pTY71の支配するC. freundii のセファロスポリナーゼ産生量を、20℃においても37℃においても、また、誘導物質の有無にかかわらず、10倍以上上げる様な変異である。

C600M2に第3章第1節で分離した、pTY71 の制御遺伝子部分が欠損した変異プラスミドpTY132を形質転換法で導入した。C600M2/pTY132+ およびC600/pTY132+ の温度誘導を見た結果をFigure 3 - 10に示す。C600M2/pTY132+ とC600/pTY132+ のセファロスポリナーゼ産生の20℃におけるbasal level は、ほとんど差が無く、また、温度による誘導も認められなかった。すなわち、M2変異は、制御遺伝子の欠損したpTY132には影響が無く、pTY71 の制御遺伝子に作用して、セファロスポリナーゼ

— 92 —

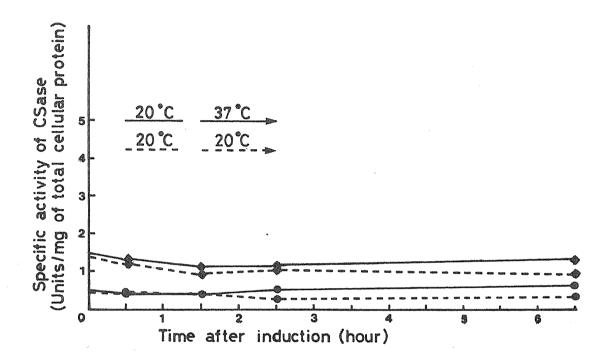


Figure 3-10 Induction of cephalosporinase synthesis by temperature shift up.

Cephalosporinase activity was measured by Perret's method α and cephaloridin was used as substrate.

Symbols: •; Escherichia coli C600/pTY132

♦; Escherichia coli C600M2/pTY132.

Table 3-3 β -lactamase activity in *E. coli* strains at 37°C

Strain	Specific activity (Units/mg of total cellular protein)
C600/pMK1::Tn <i>2601</i> #4	3.1 ^{a)}
C600M2/pMK1::Tn <i>2601</i> #4	3.3 ^{a)}
C600/pTY136	2.5 ^{a)}
C600M2/pTY136	2.2 ^{a)}
C600	0.0032 ^{b)}
C600M2	~ 0.0035 ^{b)}

a) $\beta\text{-lactamase}$ activities were measured by Sargent's method and benzylpenicillin was used as substrate.

b) $\beta\text{--lactamase}$ activities were measured by Microjodometrical method and cephaloridin was used as substrate.

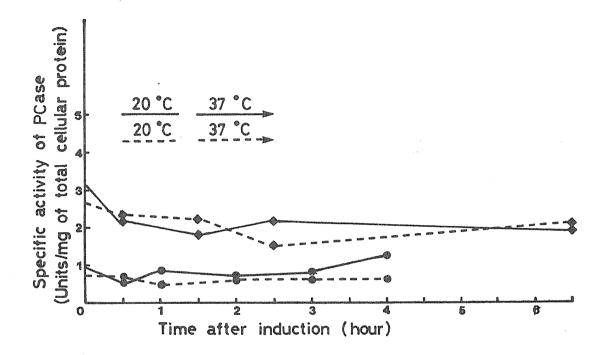


Figure 3-11 Induction of penicillinase synthesis by temperature shift up.

Penicillinase activity was measured by Sargent's method and penicillin was used as substrate.

Symbols: •; Klebsiella pneumoniae D8 his.

♦; Escherichia coli C600M2/pTY132.

産生量を上昇させると思われる。

C600M2に I 型ペニシリナーゼを支配するアンピシリントランスポゾンをpMK1に転移させたプラスミド、pMK1:
Tn2601 # 4 (6) およびpTY136を導入し、その酵素産生量を、C600の場合と比較したのがTable 3 - 3である。
pTY136は、Figure 1 - 15に示したベクタープラスミド、pACYC184のBamHI 切断部位に、K. pneumoniae D8 his つの染色体性ペニシリナーゼ遺伝子(3.5kb BamHI フラグメント)をクローニングしたプラスミドである。 K. pneumoniae D8 his は、構成的なペニシリナーゼを産生し、その遺伝子の染色体上の位置もすでにmapping されている(65)。

C600 / pMK1: Tn2601 # 4 とC600M2 / pMK1: Tn2601 # 4 は、37℃において同レベルの酵素産生量を示した。
pMK1: Tn2601 # 4 の支配する I 型ペニシリナーゼに、M2 変異が影響を及ぼさないことは、M2変異がプラスミドのコピー数には影響を与えないことを示唆している。

また、染色体性ペニシリナーゼを支配するpTY136も、C600中とC600M2中とで酵素産生量は同レベルである。C600M2/pTY136+の支配するペニシリナーゼは、親株<u>K.</u>pneumoniae D8 his 「同様、温度による影響を受けず、構成的であった(Figure 3 - 11)。C600/pTY136+は3日間薬剤無添加で継代培養すると、71%の割合でpTY136が脱落するが、pTY136はC600M2中では非常に安定であった(脱落度0%)。M2変異は、プラスミドの安定化にも

— 96 **—**

何らかの影響を示すものと思われる。しかしながら、pTY132およびpTY71 はC600中でもC600M2中と同様に安定なので、pTY71 の酵素産生量の上昇は、プラスミドの安定性に起因するものではない。

以上述べた結果から、M2変異によるセファロスポリナーゼ発現の上昇は、プラスミドのコピー数の増加や、宿主菌内での安定性、およびプラスミド上の遺伝子の転写効率の上昇に起因するものではないと結論できる。また、C600M2のampC遺伝子に基づくbasal なセファロスポリナーゼレベルは、C600と同程度なので(Table 3 - 3)、この発現の上昇は、ampCに関連した変異に基づくセファロスポリナーゼ産生量の上昇の可能性も除外できる。このE. coli の染色体上のM2変異は、C. freundii のセファロスポリナーゼの制御遺伝子に特異的に影響を与えていると考えられる。

第3節 M2変異の染色体上のマッピング

染色体上の変異位置のおおよその位置決定を行うために、F因子による接合伝達実験を試みた。しかし、M2変異の付与されているE. coli K-12 C600 はthr 、leu 、thi と、栄養要求性等のマーカーが少なく、この目的には不適当である。そこで、多くの有用マーカーを持つ、E. coli K-12 AB1157 / pTY71 + (thr 、leu 、thi 、lac 、gal 、ara 、xyl 、mtl 、pro 、his 、arg 、

— 97 **—**

str)およびGM31/pTY71 + (thr 、leu 、his 、thi 、ara 、lac 、gal 、xyl 、mtl 、str)へP1ファージを用い、C600M2よりM2変異を形質導入した。M2変異は、C600/pTY71 + とC600M2/pTY71 + のセファロリジンのMAC がそれぞれ200 μg /m1と400 μg /m1と近いため、MAC 差の大きいアンピシリン(12.5μg /m1および200μg /m1)を用いて選択した。、M2形質導入は、アンピシリン50μg /m1で選択した。この時AB1157およびGM31の持つ他の染色体せいマーカーには変化がなかった。

得られたAB1157M2/pTY71 + とGM31M2/pTY71 + を受容菌とし、W1895 (met、Hfr)を供与菌として、Lブロスで、2時間接合伝達を行った。集菌し、2回生理食塩水で洗浄後、ストレプトマイシン100 μg /m1を選択マーカーとして、また、AB1157およびGM31の持つ栄養要求性をcounter selection とし、さらにプラスミドpTY71の選択のためカナマイシン25μg /m1含有のDavis の最小培地を用いて選択した。

matingブロス 1 ml あたりのそれぞれの選択培地で得られた組み換え体数をTable 3 - 4 に示した。一部の例外もあるが、pro からleu 、ara と染色体地図で逆時計方向に、組み換え体の数が減少している。この結果は、Hfr の先端が、pro の前であり、逆時計方向にHfr が入りこんでいることを示している。用いたHfr 、W1895 はCavalli (67)のHfr であり、purE (12分)を先端部として、逆時計方向に染色体DNA を伝達させることが知られ

Table 3-4 Numbers of Recombinants^a)

Recipient	AB1157/	рТҮ71	GM31/p	Mapb)		
Expt. No. Selection marker	I	11	. I	II	position	
pro	. •••	1.7 x 10 ⁵	445		6	
leu	. 1.3 x 10 ⁶	7.0 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁶	3.0 x 10 ⁵	1.8	
ara	9.0 x 10 ⁵	4.0 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁶	3.0 x 10 ⁵	1.5	
thr	5.0 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁵	7.5 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	100/0	
arg	-	4.0 x 10 ⁴	-	-	89.5	
mtl	7.0 x 10 ⁵	6.0 x 10 ³	1.4 x 10 ⁵	1.0 x 10 ³	81	
xyl	2.0 x 10 ⁴	6.0 x 10 ³	2.0 x 10 ⁵	2.0 x 10 ³	80	
his	1.0 x 10 ⁴	1:0 x 10 ³	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ³	_. 44	
gal	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ²	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ²	17'	

a)_{E. coli} W1895 (met, HfrC) was used as a donor and mating was interrupted at 120 min. The results were expressed as No. of recombinants/ml of mating broth. b)_{B.} J. Bachmann, Microbiol. Rev. <u>47</u>:127-284 (1983)

ている(6%) (Figure 3 —12)。

得られた組み換え体の非選択マーカーをTable 3-5 に示す。counter selection をイタリックの100 で表し、他のマーカーのHfr 側対立E. coli の出現頻度を相対%で表した。これより、M2形質の出現頻度の値は、thr とarg の間、すなわち染色体地図上100 分と89.5分の間に位置すると推定される。

次に100 分から89.5分までの間をさらに詳細にマッピングするために、ファージP1による形質導入を行った。
C600M2 (thr 、leu 、thi 、M2+) で増殖させたP1ファージを受容菌AB1157/pTY71 + (thr 、leu 、thi 、lac 、gal 、ara 、xyl 、mtl 、pro 、his 、arg 、str 、M2-) 、RA11/pTY71 + (me1A- 、△lacYZ 、M2-) 、RA11/pTY71 + (me1B- 、△lacYZ 、M2-) に、moi 0.2 で感染させ、アンピシリン50μg /m1で選択し、M2変異とlinkする89.5分から100 分までのマーカーを調べた(Table 3-6)。 thr が高率にM2形質にlinkして伝達されていることが明らかとなった。cotransductionの頻度が求められると、次に示したWuの式(69)より、用いたマーカーの2点間の距離が求められる。

cotransduction frequency = $1 - \left(\frac{\text{distance between two markers}}{\text{length of transducing particle}}\right)^3$

P1ファージは90kb、すなわち<u>E. coli</u> 染色体地図で 2 分のDNA を運ぶ。この値を、Wuの式のlength of transduction particle に代入し、cotransduction frequency にRA11/pTY71 + を受容菌とした時は0.4、RE16/pTY71 + を受容菌とした時は0.63を代入すると、distance between two markers、すなわちthr とM2変異との距離が、それぞれ0.53分および0.29分と算出された。調べたtransductantの数が十分多くなく、またC600のthr からthr + へのrevertant (復帰変異)の出現頻度が未測定のため、得られた値を、M2とthr 間の確定的な距離と断定することは困難である。しかし、少なくともM2変異は、thr (100 分)から99分の間に存在することが確認された。

Figure 3-12に、用いたE. coli 染色体上の遺伝子のマーカーの位置、および $99\sim100$ 分までの染色体地図を表示した。Table 3-7 はそれらの遺伝子の変異によって起こる表現形質等を記載した(79)。

Table 3-5 Genetic constitution of the recombinants

	Markers and their map position									Tabanian kapada pala	
Recipient	M2	pro	leu	ara	thr	arg	met	mtl	xy l	his	gal
Continue		5.9	1.8	1.5	100/0	89.5	89.0	80.7	79.7	44.0	17.0
AB1157M2/pTY71	73	60	100	86	80	20	6	Ó	0	0	0
	80	80	90	100	90`	10	0	0	0	0	0
ti.	58	97	100	100	100	21	8.	5	5	0	0
GM31M2/pTY71	92	1040 4845	100	100	92	46	0	0	0	0	0
	71		100	100	78	14	0	0 .	0	0	0
	73		85	88	100	3	0	. 0	0	0	0

 $E.\ coli$ W1895 (met, HfrC) was used as a donor. The marker used for selection was rpsL and those used for counterselection were shown by 100 (italicized). The results were expressed as percentage.

The recipient's markers are as follows.

AB1157: pro leu ara thr arg met mtl xyl his gal GM31: leu ara thr arg met mtl xyl his gal

Table 3-6 Frequencies of cotransduction with M2a)

Marker Recipients	M2	ara	thr	mel		Distance between M2 and <i>thr</i> (min) ^{c)}
AB1157 /pTY71	100%	0%	40000	cnes	0%	
RAII/pTY7I	100%	com	40%	0%	chaps	0.53
RE16/pTY71	100%	and the second	63%	0%	600p	0-29

a) Phage P1 propagated in C600M2 was used for transduction.

b) The markers of recipients are as follows.

AB1157: lac pro leu ara thr thi arg mtl xyl his gal Str

RAII: mel A - AlacYZ Str RE16: melB \(^\Delta lacYZ\) Strr

c) The value was caliculated by Wu's formula. $cotransduction frequency = \left(1 - \frac{distance between two markers}{length of transducing particle}\right)^3$

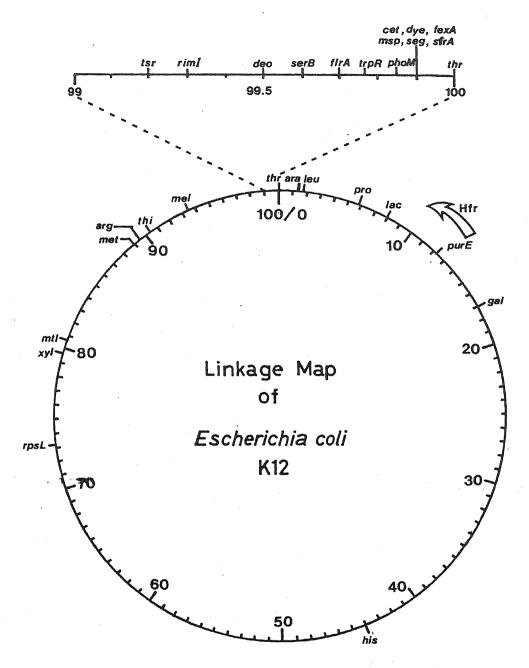


Figure 3-12 Linkage map of Escherichia coli K-12.

Table 3-7 Genetic markers of Escherichia coli K-12.

Gene symbol	Map position (min)	Mnemonic	Alternative gene symbols; phenotypic trait affected
ampC .	94.3	Ampicillin	β-lactamase; penicillin resistance
ara	1.4	Arabinose	Arabinose-utilization
arg	89.4	Arginine	Arginine-synthesis
cet ·	99.9	Colicine E2	ref, reflitolerance to colicineE2
deo	99.5	Deoxyribose	
fexA	99.9		sfrA; F-pilus synthesis conjugal donor activity, and surgace exclusion
flrA	99.7	Fluoroleucine	Regulation of <i>ilv</i> and <i>leu</i> genes; fluoroleucine resistance
gal	17	Galactose	Galactose-utilization
his	44	Histidine	Histidine-synthesis
lac	8	Lactose	Lactose-utilization
leu	1.8	Leucine	Leucine-synthesis
melA	93.4	Melibiose	mel-7; α-galactosidase
melB	93.4	Melibioșe	<i>mel-4</i> ; thiomethlgalactoside permease II
met	89	Methionine	Methionine-synthesis
msp	99.9	Male-specific phage	Sensitivity or resistance of male strains to male-specific phages R17 and $\mu2$
dye	99.9		Resistance or sensitivity to methyleneblue

Table 3-7 -Continued

Gene symbol	Map position (min)	Mnemonic	Alternative gene symbols; phenotypic trait affected
mtl	80.7	Mannitol	Mannitol-utilization
phoM	99.85	Phosphate	Positive regulatory gene for <i>pho</i> regulon
pro	5.9	Proline	Proline-synthesis
purE	12.2	Purine	ade3, adef, Pur2; phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
rimI	99.3	Ribosomal modification	Modification of 30S ribosomal subnit protein S18; acetylation of N-terminal alanine
rpsL	73.4	Ribosomal protein small	strA;30S ribosomal subunit protein S12
seg	99.9	Segregation	Replication of F-factors
se r B	99.6	Serine	Phosphoserine phosphatase
sfrA	99.9		Expression of F-factor conjugation cistrons; antiterminator
thi	90.3	Thiamine	Thiamine-synthesis
thr	100/0	Threonine	Threonine-synthesis
trpR	99.8	Tryptophan	Rtry; regulation of trp operon and aroH; trp aporepressor
tsr	99.2		<pre>cheD; methyl-accepting chemotaxis protein I</pre>
xyl	79.7	Xylose	Xylose-utilization

B - ラクタム抗生物質耐性菌の研究は、臨床医学上重 要な課題として取り上げられ、とりわけセファロスポリ ン 型 β - ラ ク タ ム 剤 を 不 活 化 す る セ ファ ロ ス ポ リ ナ ー ゼ は、この薬剤の主な使用対象である腸内細菌群に広く分 布している。各種病原菌に分布するセファロスポリナー ゼの研究は、セファロスポリナーゼに不活化されないβ - ラクタム剤の開発、既存のβ-ラクタム剤と共に使用 することにより薬剤の不活化を防ぐ、セファロスポリナ ーゼ阻害剤の開発、また、抗菌作用と共にβーラクタマ - ゼの誘導物質の性質を持つため、その効果が減じるβ - ラクタム剤の改良等についてきわめて有益な基礎的知 見が得られるものと考えられる。また、これらの菌種特 異的セファロスポリナーゼは、染色体遺伝子に支配され ており、β-ラクタム抗生物質の水解という薬剤耐性機 構の他に、細菌での何らかの生理的意義が推測されうる。 ゆえに、このセファロスポリナーゼの持つ性質等を研究 することにより、この酵素の本質的な役割を明らかにで きれば、自然界における薬剤耐性菌の起源あるいは発生 機 序 を 考 察 す る 上 に 、 重 要 な 手 が か り が 得 ら れ る と 期 待 される。

著者は、菌培養温度の上昇およびβ-ラクタム剤によって誘導されるというユニークな性質を持つ、染色体性セファロスポリナーゼを産生するCitrobacter freundii

を対象として、遺伝子操作法を用い、分子遺伝学的な研究を诵じて、以下に述べることを明らかにした。

まず、Citrobacter freundii GN346の支配するセファロスポリナーゼ遺伝子のプラスミドへのクローニングとその遺伝子の構造解析を行った(第1章)。得られた知見は以下の様にまとめられる。

- (1) C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼを支配する遺伝子群は、制限酵素 EcoRI で切断される7.3kb のフラグメント内に存在する。
- (2)7.3kb のEcoRI フラグメント内には、AccI5箇所、BamHI 3箇所、Bc1I1箇所、Bg1II 2箇所、HincII5箇所、M1uI5箇所、PstI3箇所、SalI1箇所、SmaI1箇所の切断部位を有し、XhoI、HindIII、KpnIの切断部位は認められなかった。既知のβーラクタマーゼと比較すると、その構造遺伝子部分は、構成的セファロスポリナーゼを支配する、Escherichia coliやShigella sonnei の遺伝子とは異なっている。
- (3)7.3kb のEcoRI フラグメントのほぼ中央、1.55kbの

 BamHI で切断されるフラグメント内にセファロスポリナーゼの構造遺伝子は存在するが、この1.55kbBamHI
 フラグメント内にはプロモーターは存在しない。

さらに著者は、C. freundii のセファロスポリナーゼ 遺伝子のクローニングと構造解析を基礎として、酵素産 生の誘導様式とその制御機構を明らかにすることを試み た(第2章)。得られた知見は以下の様にまとめられる。

- (1) C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ産生は、増殖温度20℃において、菌の増殖を阻害しない濃度のベンジルペニシリン、セフォキシチン、セファマンドール、およびセフスロジンにより40~50倍の上昇が起こる。増殖温度37℃においては、誘導物質の添加によりさらに2倍程度の産生量の上昇が見られるにすぎない。すなわち、増殖温度20℃では誘導的であり、増殖温度37℃では半構成的性質を示す。
- (2) 増殖温度を20℃から37℃に上げた時、または誘導物質ベンジルペニシリンを加えた時、いずれの場合も、酵素産生量の上昇には30分の時間的1ag があり、この間に制御物質が不活化されるか、あるいは制御物質が生合成されていると思われる。
- (3) 温度による誘導の場合も、ベンジルペニシリンによる 誘導の場合も、培養温度を低下あるいはベンジルペニ シリンを除去しても、その後約一世代(20℃で2時間) の間は酵素産生が続き、以後次第に減少する。この現 象より、長時間安定で、かつ少量でも有効な制御物質 の存在が推測される。
- (4) C. freundii GN346 のβーガラクトシダーゼ産生はグルコース効果を受けるが、セファロスポリナーゼ産生にはその効果は認められなかった。セファロスポリナーゼの産生は、菌のcAMPレベルには依存していないと

推定される。

- (5) C. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子を クローニングしたプラスミドpTY71 を、C. freundii に形質転換法で導入することに成功し、その発現を見 たところ、温度誘導が示されたが、ベンジルペニシリ ンによる誘導は認められなかった。温度による誘導と βーラクタム抗生物質による誘導とが別の系である可 能性が考えられる。
- (6) 構造遺伝子の左側1.3kb のHincIIで切断されるフラグメントを含む部分に、C. freundii 中で温度誘導発現を支配する遺伝子群が存在する。この部分の欠失により、温度誘導性を失い、酵素再生量が顕著に低下する。この結果より、C. freundii のセファロスポリナーゼ産生にはポジティブな制御系が関与していると推定される。

グラム陰性菌のβ-ラクタマーゼ産生の制御系において、ポジティブな制御系の存在を示唆した知見を示したのは、本研究が最初である。次に、他のグラム陰性腸内細菌種でのC. freundii GN346 のセファロスポリナーゼ遺伝子の発現を検討した(第3章)。得られた知見は次の様にまとめられる。

(1) Escherichia coli、Salmonella typhimurium、Proteus morganii、Proteus vurgalis、Proteus mirabilis いずれにおいても、C. freundii のセファロスポリナー

ゼ遺伝子は、確かに発現しているが、きわめて低いレベルでしか発現しない。

- (2) E. coli においては、C. freundii のセファロスポリナーゼ遺伝子の転写が、自己のプロモーターによる場合でも、きわめて低いレベルでしか発現されない。また、E. coli 中では、C. freundii のセファロスポリナーゼ産生は、増殖温度上昇によっても、誘導されない。すなわち、E. coli において、C. freundii のセファロスポリナーゼ産生量が低い原因は、誘導が何らかの理由で発現しない結果と考えられる。
- (3) S. typhimurium、P. morganii においては、温度による誘導産生は2~3倍認められるが、産生量はきわめて低い。P. vurgalis では誘導産生が認められない。これらの菌種においても、C. freundii のセファロスポリナーゼはE. coli での場合と同様の理由により、その産生量が低いと思われる。
- (4) <u>E. coli</u> より、<u>C. freundii</u> のセファロスポリナーゼ 遺伝子の発現を37℃において高める染色体性変異、M2 を分離した。
- (5) M2変異によるセファロスポリナーゼ発現の上昇は、プラスミドのコピー数の増加や、プラスミド遺伝子の転写効率の上昇、あるいは、E. coli の染色体性βーラクタマーゼ遺伝子ampCに関連した変異に基づくものではなく、C. freundii のセファロスポリナーゼ産生の

制御系に作用する結果と考えられる。

(6) このM2変異は、染色体地図上99分から100 分の間に存在する遺伝子であることが明らかとなった。

第3章においては、C. freundii のセファロスポリナーゼ遺伝子の発現が他菌種では低く、その原因は宿主菌の側にあるという興味深い現象を見い出した。すなわち染色体性のセファロスポリナーゼ遺伝子が、プラスミド化しても他菌種では、宿主菌の耐性に大きく寄与できないことが実験的に明ら然界よりほとんど分離されない一因と考えられる。このでは、McClintockの発見以来、IS、Tn等のmovable geneticelementsによって染色体性遺伝子より運ばれたと考えるのが、最も理論的であるとされてきた耐性菌の起源、出現、およびその拡散について、疫学的な観点からも重要な手がかりを与えたと考えられる。

C. freundii でHfr による接合伝達系(71)、およびファージによる形質導入の系(72)がすでに成功している。今後、これらの実験系の利用により、本研究で明らかにされたセファロスポリナーゼの産生調節系がさらに詳細に判明すると期待される。

また、腸内細菌群に属するグラム陰性桿菌は、その形態学的、生理学的諸性質より、系統発生的にきわめて近い関係にあると考えられる。そのほとんどは誘導性のセ

ファロスポリナーゼを支配するが、その誘導機構の分子 遺伝学的解析が行われているのはMatsumoto ら(19)によるPseudomonas aeruginosaの研究のみであり、本研究結 果は、今までほとんど未知の分野であった染色体性セファロスポリナーゼの誘導産生機構の究明に寄与するものと考える。

部 音字

本研究を行うにあたり、終始御指導と御助言を賜りました千葉大学薬学部、故山岸三郎教授、澤井哲夫教授、山本友子助手、また、数々の遺伝学的御助言を賜りました東京大学付置医科学研究所細菌研究部、吉川昌之介教授、檀原宏文博士に心より感謝の意を表します。

また、多大なる御協力をいただきました共同研究者の鈴木郁子氏に深く感謝いたします。

さらに、数々の御助言をいただきました千葉大学薬学部、山口明人講師、田中道裕博士、渡辺正人修士、 浅野誠氏に深く感謝いたします。

最後に、貴重な菌株、プラスミド等を御分与いただき ました諸先生方に、心より感謝申し上げます。

実験の部

I 実験材料

- (1) 菌株: 本研究に使用した菌株は、Table 4に示した。
- (2) プラスミド:使用したプラスミドは、Table 5 に示した。

Table 5 Plasmids used.

Plasmid	Relevant markers	Source/reference
R388	Tp, Su	(34)
pMKl (ColEl::Tn5)	Km (col, imm)	Given by H.Ogawa
pACYC184	Tc, Cm	(73)
pMC81	Ap (trp, lac)	(74)
pA03::Tn2601#38	Ap (<i>imm</i>)	(15)
pMK1::Tn2601#4	Ap, Km (col, imm)	(6)
pBR322	Ap, Tc	(75)

(3) バクテリオファージ:使用したバクテリオファージ P1は、Dr. W. Arberより分与いただいた WA921/P1⁺ より分離した。このファージは普遍形質導入ファージ で約90kbのDNA を導入できる。

Strain	Genotype	Sour	rce
Escherichia coli K-12			
C600	thr leu thi supE44 lacY tonA λ F	Dr.	Hosoya
AB1157	thr leu thi lacY galK ara xyl mtl proA his argE str tsx sup37 \lambda F		
GM33	$\frac{dan3}{dam3} \lambda F$	Dr.	Matsubara
KP77	$\Delta lac \lambda F$		Miki
ΦRow	colicinEl sensitive		
GM31	thr leu thi lacY galK galT ara xyl mtl his_	Dr.	Matsubara
	str_dcm tonA tsx supE44		
CR34	λ F thr leu thi thy lac		
CR34	tonA str λ F		•
WA921	thr leu thi met lac hsdK(m R) λ F $P1$	Dr.	W.Arber
W1895	$mo + \lambda^{-}$ Hfr	Dr.	Yoshikawa
RA11	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Dr.	Tsuchiya
RE16	melA'B $\Delta lacZY$ str λ F'	Dr.	Tsuchiya
AT2459	thi serB λ F		ginally derived m Dr. D.A.Glase
Citrobacter freundii			
GN346		our	laboratory
GN346-16 Salmonella thyphimurium		our	iaboratory
LT2		our	laboratory
Proteus mirabilis			
25		our	laboratory
Proteus vulgaris			
K22-2		our	laboratory
Proteus morganii 1510/9		our	laboratory
Klebsiella pneumoniae D8 his		our	laboratory

(4) 培地

BHI (ブレインハートインフュージョン) ブロス:

(栄研化学)

コウシ脳浸出液

200g

ウシ心臓浸出液

250g

ペプトン

10g

ブドウ糖

2g

塩化ナトリウム

5 g

リン酸水素ナトリウム 2.5g /1 pH 7.4

BHI 寒天培地 (栄研化学) は寒天1.5 %含有。

マッコンキー (MacConkey) 寒天培地:

ポリペプトン

20g

乳糖

10g

塩化ナトリウム

10g

中性紅

0.03g

クリスタルバイオレット 0.001g

寒天

14g / 1 pH 7.0

pHを合わせてから、中性紅とクリスタルバイオレッ トを加える。

MH (ミューラーヒントン) ブロス (Difco):

ウシ浸出物

300g

カザミノ酸テクニカル 17.5g

バクト可溶性澱粉

1.5 g / 1 pH 7.4

MH寒天培地は、1.7 %寒天末 (和光純薬) をMHブロ スに添加した。

トリプトソイブイヨン培地(栄研化学):

トリプトン

17g

ソイペプトン

3 g

ブドウ糖

2.5g

リン酸1水素カリウム

2.5g

塩化ナトリウム

5g /1 pH 7.3

トリプトソイ寒天培地は寒天 1.5%含有。

L ブロス、L 寒天培地

ポリペプトン

10g

酵母エキス

5g

プトウ糖

1g

塩化ナトリウム

5g / 1 pH 7.2

(注1) L Agarは、寒天15g を加える。

Davis minimul medium

リン酸2カリウム

7 g

リン酸1カリウム

2g

硫酸マグネシウム

0.1g

硫酸アンモニウム

1 g

クエン酸 3 ナトリウム 0.5g /1

滅菌後に別に滅菌した硫酸マグネシウム、および必 要に応じて20%の糖類50m1、アミノ酸は終濃度40 μg /ml、ビタミンB1 (チアミン) 1 μg /ml加え る。固形培地を作る場合には、濃い濃度の塩類と寒 天を別々に滅菌し、平板を作る直前に混合する。

K-med

<u>K-medium</u>		* * * * * * * * * * * * * * * * * * *
リン酸	1ナトリウム	1g
リン酸	1カリウム	6 g
塩化ナ	トリウム	3g
塩化ア	ンモニウム	0.5g
カザミ	ノ酸 (Vitamine free 、	Difco) 10g
グルコ	ース	15g
硫酸マ	ケグネシウム	0.125g
チアミ	×	1mg
塩化カ	ルシウム	10mg /1
ろ紙でる	過してから滅菌する。ク	ブルコース、硫酸
グネシウ	、ム、塩化カルシウムは質	成菌後に加える。
PYP 基礎培	<u> </u>	目能をみる。
ペプト	· y	0.5g
酵母工	・キス	0.5g
塩化ナ	トリウム	5g
リン酸	1水素カリウム	0.3g
フェノ	ールレッド	0.02g
寒天		3g /1 pH7.2
これに多	『天12g を加え、固形培り	也として用いた。
).). 1 0,	くいかス緒にfinラス	

糖 ۲ は、1%になる様に加える。

糖分解試験用半合成基礎培地 (ニッスイ):

2.5g ペプトン 2.5g 無水硫酸ナトリウム 塩化アンモニウム 5.0g リン酸 1 水素カリウム 0.5g

リン酸水素 2 ナトリウム 1.5g

塩化ナトリウム 5g

ブロモチモールブルー 0.024g/1 pH 7.2

これに寒天15g を加え、固形培地として用いた。糖は、1%になる様に加える。

Bacto-Penassay ブロス (Antiboitic Medium 3)
(Difco):

Bacto-Beef extract 1.5g

Bacto-Yeast extract 1.5g

Bacto-Peptone 5g

Bacto-Dextrose 1g

塩化ナトリウム 3.5g

リン酸水素 2 カリウム 3.68g

リン酸水素 1 カリウム 1.32g /1

(5) 薬剤:アンピシリンナトリウム(Ap)、ベンジルペニシリンナトリウム(PCG)、硫酸ストレプトマイシン(Sm)、クロキサシリン(MCIPC)、セファロチン(CET)、塩酸テトラサイクリン(Tc)、硫酸カナマイシン(Km)、セファロスポリンC は明治製菓kkより、オキシリン(MPIPC)は万有製薬kkより、スルファメラジンナトリウム(Su)、トリメトプリム(Tp)は田辺製薬kkより、クロラムフェニコール(Cm)は山之内製薬kkより、ナリジキシン酸(NA)、リファンピシン

- (Rif) は第一製薬kkより、セファゾリン(CEZ)は 藤沢製薬 kkより、セファロリジン(CER)は鳥居薬 品kkより、セファレキシン(CEX)は富山化学kkより、セファマンドール(CMD)はシオノギ製薬kkより、セフスロジン(CFS)は武田製薬kkより、分与された。 硫酸スペクチノマイシン(Sp)は群馬大学医学部井上 松久博士より分与を受けた。いずれも力価の明らかな ものが使用された。塩化第二水銀は半井化学kkより購入した。
- (6) 酵素試料:制限酵素AccI、BamHI、BglII、EcoRI、HaeII、HincII、HindIII、KpnI、MluI、PstI、SalI、SmaIおよびXhoIは宝酒造kkより、BclIはNew England Biolabs より購入した。T4DNA リガーゼは宝酒造kkより、リゾチーム、リボキシヌクレアーゼA、およびデオキシリボキシヌクレアーゼ I は、Sigma より購入した。
- (7) 電気泳動用、遺伝子操作用試薬:アガロースはドータイト (アガロースI) および宝酒造kk (H14) を用いた。アクリルアミド、N-N ビスメチレンアクリルアミドはBDH chemicals LTD より、過硫酸アンモニウム、N,N,N',N',テトラメチレンジアミン、2-メルカプトエタノール、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) はEASTMAN KODAK Coより、ホウ酸、EDTA・2Na、グリシン、イソ

プロピルアルコール、クマシーブリリアントブルー、メタノール、酢酸、エチジウムブロマイド、ジチオスレイトール(DTT) は半井化学kkより、アデノシン-3-リン酸(ATP) はベーリンガーマンハイムよりブロモフェノールブルー(BPB)、グリセロールは和光純薬より、トリス(Trizma base) はSigma より購入した。DNA 電気泳動用分子量マーカーの ADNA は宝酒造kkより、蛋白質電気泳動用分子量マーカーはPharmacia Fine Chemicalsを用いた。

その他表示の無い限り、試薬は特級試薬を使用した。

I 実験方法

(1) 接合伝達(7.6)

液体培地は目的、条件によりLブロス、MHブロス、BHI ブロスを使用した。前培養菌液を10倍希釈し、Lチューブにて振とう培養し、対数増殖期中期
(0D610nm = 0.4~0.6)において、供与菌:受容菌の比を1:10の比率で混合し、新しいブロスを5~10m1加え、37℃で2時間~一夜培養を行い、受容とプラスミドの耐性を選択できる様な選択薬剤を含む寒天平板上で、transconjugantを選択する。

(2) 形質転換(77)

使用菌一夜前培養液を、LブロスあるいはBHI ブロスに10~20倍希釈し、対数増殖期中期(0D610nm = 0.4~0.6)までLチューブにて振とう培養する。 2℃で遠心集菌(5000rpm 、 7分、Hitachi 05PR-7)し、培養液量の10mM塩化ナトリウムに懸濁集菌後、 1 / 2容量の50mM塩化カルシウムに懸濁し、 0℃ 5 分あるいは20分〔5分〕放置した。遠心後、 1 m1の塩化カルシウム50mM CaC1 に懸濁し、 0℃ 5 分あるいは40分〔5分〕静置し、 1~5 μg のDNA と混合し、60分あるいは20分〔40分〕 0℃で静置後、45℃で2分〔1分〕加温する。急氷冷後、Lブロス、BHI ブロスあるいはMHブロス(トリメトプリムで選択の場合)を5~10m1加

え、30℃においてLチューブでゆっくり2~5時間振 とう培養後、適当に希釈あるいは濃縮し、選択薬剤を 添加した平板で、トランスフォーマントを選択した。 〔〕内の条件は、<u>Citrobacter freundii</u> GN346-16 を

(3) 形質導入(78)(79)

(a) ファージ液の調製

形質転換する場合である。

供与菌前培養液0.5 m1を2.5 mM塩化カルシウム含有 L ブロス4.5 m1に加えて、37℃で対数増殖期まで培養する。この菌液0.5 m1に2.5 mM塩化カルシウム含有 L ブロス4.5m1 、P1ファージ0.1 m1 (M0I,0.1)を加えて、37℃で5~6時間激しく振とう培養する。クロロホルムを加え室温で20分放置後、3000rpm 、分遠心し、クロロホルムを数滴加えて保存する。

(b) Titration

ファージ希釈液0.1ml と指示菌(受容菌)0.25ml を混ぜ、37℃15分加温後、2.5ml のLソフトアガー ルを入れ全体をLアガール平板上に上層し、37℃で 培養する。翌日プラーク数を数える。通常 PFU (plaque forming unit) 10 /ml位のファージが調 される。

(c) 形質導入

P1ファージ液0.1m1 と受容菌0.5m1 およびLブロス0.4m1 を混ぜ、37℃15分保温する。原液あるいは

濃縮液を適当な選択平板に塗布する。最小培地で選択の時は、受容菌を緩衝液で2回洗浄してから用いた。MOI は、受容菌により、0.02~1 (phage /cell) で行った。

(4) 突然変異体の分離(80)

使用菌一夜培養液をLブロス 5 m1で10倍希釈し、
0D610nm = 0.5まで振とう培養する。遠心集菌(5000 rpm 5分)し、菌体を生理食塩水に懸濁、2 回洗浄する。菌体を 5 m1の0.1Mクエン酸バッファ (pH 5.5) に懸濁後菌液 1 m1にNTG (ニトロソグアニジン)を加え、30℃で静置保温する。NTG の濃度、処理時間は、予めSurvival 1 ~10%になるように決めておく。冷したLブロス30m1を加えて反応をとめ、5000rpm 10分遠心する。菌体を更に生理食塩水で2回洗浄し、Lブロス5 m1を加え37℃1時間expressionをかける。適当に希釈、濃縮し、菌を選択培地上に塗布する。

Survival 算出方法

上記の様に0.1Mクエン酸バッファ (pH 5.5) に懸濁した菌液を各 1 ml づつ5 本用意し、終濃度 0、50、100、150、200 μg /ml のNTG を加え、30℃20~30分保温後、素早く希釈し、Lアガール平板に塗布する(各平板100~300 コロニー出現する程度)。コロニー数を測定し、Survivalを算出する。

Survival (%) = No. of colonies of NTG

treated fraction / No. of colonies of untreated fraction

(5) コリシンE1の調製法(81)

E. coli CR34thy / ColE1 を10ml BHIブロス (thymine 100 μg /ml添加)で一夜培養し、同培地11で希釈後37℃で振とう培養する。0D610nm = 0.5に達したら、2 mg/mlMitomycin 溶液を2 ml加え、37℃で20~30分ゆっくり振とう培養する。遠心集菌(8,000rpm、10分)後、0.01M リン酸バッファ(pH7.0)に懸濁し、ソニケーターにより破砕する。細胞破砕液を遠心(30,000rpm、90分)し、上清を取り、硫酸アンモニウム50%飽和になるように加え、0℃30分攪拌する。遠心(8,000rpm、10分、0℃)にて沈澱を集め、30mlの0.01M リン酸バッファに懸濁後、グリセロールを等量加え、ミリポアフィルターを用いてろ過滅菌し、—20℃で保存する。

(6) コリシンE1産生能と免疫能

(a) コリシンE1 産生能

試験菌をトリプトソイアガールに接種し、試験菌の生えた平板にクロロホルムを浸したろ紙をふたの方に置き、10分ほど放置する。ろ紙を除きふたを開け、バーナーのそばでクロロホルムをとばす。この平板にE. coli Ø Row トリプトソイブロス培養液

- 0.1 mlを加えた 3 mlのトリプトソイソフトアガール (50℃)を重層する。37℃で 6 ~ 24時間培養し、阻 止円の見られた菌をコリシンE1産生能陽性とする。
- (b) コリシンE1免疫能

0.1 mlのコリシンE1を塗布した平板に、ミクロプランター等で試験菌の培養液を接種する。6~24時間培養し、増殖するかどうかで判定する。

(7) 染色体DNA の調製(6)

【試薬】

- ①0.14M 塩化ナトリウム
- ②TEバッファ (0.04M Tris-HC1、0.025M EDTA pH8.5)
- \mathfrak{B} RNase (2 mg/ml)
- ♠Lysozyme (50mg/ml)
- ⑤ Sarkosyl (0.75% in TEバッファ)
- ⑥飽和フェノール(TEバッファで飽和する。)
- ⑦3M酢酸ナトリウム
- ⑧ エタノール (-20℃)

【操作】

- ①10mlのBHI ブロス前培養液を200 mlのBHI ブロスに移し、坂口コルベンで一夜振盪培養する。
- ②8,000rpm、10分、2℃にて集菌し、0.14M 塩化ナト リウムで洗う。
- ③ 5 mlのTEバッファに懸濁し、RNase を0.3 ml加える。
- ④Lysozymeを0.4 ml加え、0℃で20分置く。

- ⑤ Sarkosylを5.7 ml加え、65℃、8分加温する。
- ⑥ブレンダーにかけ、粘性を落とす。
- ⑦RNase を 1 m1加え、37℃、1 時間加温する。
- ⑧飽和フェノールを12m1加え、1 分間振とうする。
- ⑨5,000rpm、10分、2 ℃で遠心し、キャピラリーある いは、100 µ1 の λピペットで、水層 (上部) を取 る。
- ⑩ ⑧ ⑨ を繰り返し、水層に1.4 m1の3M酢酸ナトリウムと25m1のエタノール(─20℃)を加え、─20℃で2時間エタノール沈澱する。
- ①TEバッファ9 m1でペレットを懸濁し、3M酢酸ナトリウム1 m1と20m1のエタノール (──20℃) を加え、再びエタノール沈澱を行う。
- ②①をフェノール臭が無くなるまで繰り返し、適宜希釈して、OD280nm とOD260nm を測定する。OD280nm / OD260nm ≤ 0.53 であればサンプルとする。
- (8) プラスミドDNA の調製法―塩化セシウム法(82) 100 ~1000μg のDNA の調製が可能である。

【試薬】

- ①0.14M 塩化ナトリウム
- ②25% Sucrose溶液: 25% Sucrose in 0.05M Tris-HCl (pH8.0)、0.001M EDTA · 2Na
- ③RNase A 溶液: 2 mg/mlRibonucrease A in 0.025M 酢酸バッファ (pH 5.0)、100 ℃ 5 分処理

- ④Lysozyme溶液:50 mg /ml Lysozyme水溶液
- (5) Triton Lytic Mixture: 0.1 % Triton X-100, 2.5 mM EDTA · 2Na · 10 mM Tris-HC1 (pH8.0)
- ⑥TES バッファ: 0.05M Tris-HCl (pH8.0),0.05M EDTA・2Na 、 0.05M NaCl
- ⑦エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液:2.5 mg/mlエチジウムブロマイド水溶液
- ⑧50%ポリエチレングリコール6000水溶液

【操作】

- ① L ブロスあるいはBHI ブロス5~10mlで5~6時間振とう培養後、同ブロス200 ml (坂口コルベン)に加え、一夜振とう培養する。調製するプラスミドが、Co1E1 あるいはpACYC184由来である場合、0D610nm = 0.5において、クロラムフェニコール150 μg /ml添加した。
- ②遠心集菌し(Hitachi, RPR12-2ローター)、0.14 M 塩化ナトリウム15mlに懸濁する。菌液を、Hitachi 30PA遠心管へ移し、8,000rpm、10分あるいは5,000 rpm 、15分遠心する。
- ③ 菌体を8 m1の25% Sucrose溶液に懸濁し、0.2 m1の RNase A 溶液を加えミキサーで攪拌する。
- ④0.3 mlLysozyme溶液を加え、0℃、10~20分放置する。
- ⑤ 0.5 M EDTA (pH 8.0) を1.6 m1加え、転倒混和し、 10分氷冷する。

- ⑥氷冷したTriton Lytic Mixture 12.8ml を加え転倒 混和し、15分放置する。
- ⑦Hitachi RP50-2ロータを用いて30,000rpm 45分遠心し、上清をHitachi 50PAチューブへ移し、6m1 の50%ポリエチレングリコールを加え、さらに5M塩化ナトリウム3.3 m1を加え転倒混和する。 2 時間~1 晩氷冷する。
- ⑨ベックマンTY65ローターを使用して37,000rpm 18~20時間、15℃で遠心する。
- ⑩遠心チューブの横に布絆創膏を張り、21G 注射針を刺してプラスミドバンドを分画する。イソプロパノールでエチジウムブロマイドを抽出後、0.1M Tris-HC1 (pH7.5) で2回透析する。0D260nm を測り、収量を出す。
- (9) プラスミドDNA の調製法―簡易法(83)1~5 μg のDNA の調製が可能である。

【試薬】

- ①Solution 1:lysozyme 2mg/ml、50mMグルコース、 10mM EDTA 、25mM Tris-HCl (pH8.0) 、用時調製
- ②Solution 2: 0.2N 水酸化ナトリウム、1%SDS、

用時調製

- ③ Solution 3 : 3M酢酸カリウム (pH4.8) あるいは3M酢酸ナトリウム (pH4.8) 、室温保存
- ④ Solution 4: 0.1M酢酸ナトリウム、50mM Tris-HC1 (pH 8.0)
- ⑤ Solution 5: RNase 1mg /ml、5 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 ℃、10分、加熱処理後、 —20℃保存
 - ① LブロスまたはBHI ブロスで菌株を 3 時間~一晩培養する。クロラムフェニコールによる増幅を行っても良い。
 - ②1.5 mMのエッペンドルフチューブで 3 m1培養液を 2 回に分けて、0.5 ~ 1 分遠心集菌する。
 - ③ペレットにSo1.1 100 μ1 を加え、懸濁し、0 ° 5 ~10分放置する。
 - ④So1.2 200 μ1 を加え、ガラス棒で混ぜ、0°5分 放置する。
 - ⑤ Sol. 3 150 μ1 を加え、転倒混和後、0 ℃、45~60 分放置する。
 - ⑥15分遠心後、上清を300 µ1 取り、新たなチューブに移し、冷エタノール600 µ1 を加え、─20℃で10~30分放置する。
 - ⑦ 2 分遠心後、ペレットにSol.4 100 μ1 を加え懸濁し、冷エタノール200 μ1 加え混ぜて─20℃ 10 ~30分放置する。

- ⑧ 2 分遠心後、チューブをアスピレーターで約30分ひき、エタノールを完全にとばし、目的に応じたバッファに懸濁する。制限酵素で切断する時は、100μ1の制限酵素用バッファおよび10μ1のSol.5で溶解し、37℃30分加温後、制限酵素で切断する。形質転換に用いる時は50mM塩化カルシウムで懸濁して用いる。
- ® 2 分遠心後、チューブをアスピレーターで約30分ひき、エタノールを完全にとばし、目的に応じたバッファに懸濁する。制限酵素で切断する時は、100μ1の制限酵素用バッファおよび10μ1のSol.5で溶解し、37℃30分加温後、制限酵素で切断する。形質転換に用いる時は50mM塩化カルシウムで懸濁して用いる。

(10) DNA の制限酵素による切断

(a) 完全切断

DNA 1 μg に対して1~3ユニットの酵素を加え、2~3時間反応させる。反応の停止は、65℃で10分加温するか、BPB-SDS-Glycerol (0.025 %-5%-50%)を20%加える、のどちらかにする。反応条件はTable 6 に示した。二重切断の場合は、HindIII等の反応条件で、同時に行うか、切れ難い方の酵素で切断した後、反応条件を変えて、もう一方の酵素で切断した。1 μg の λ DNA を 1 時間で完全に切断で

Table 6 Composition of reaction mixture of restriction endonucleases

Restriction endonuclease	Tris-HC1	MgC1	NaC1	KC1	2-Mercapto- ethanol	反応温度
EcoRI	· 100 mM	10mM	50mM		·	37 ° ℃
AccI	10 mM	10mM	50mM	-	6 mM	37℃
BamHI						
BglII						
HaeII						
HincII						
Hind III						
HinfI						
MluI						
PstI						
Sall						
BclI ·	10 mM	10mM	50mM	_	6 mM	50℃
KpnI	6 mM	6mM	6mM		6 mM	37℃
SmaI	10 mM	7mM		20mM	6 mM	30℃
XhoI	6 mM	6mM	150mM	100	6 mM	37℃

きる量を1ユニットと普通定義されている。

(b)部分切断

DNA 1 μg に対して、1 ユニットの酵素を加え、5、10、15、30、60分ごとにその一部を取り、65℃で10分加温して反応を止め、アガロース電気泳動で切断状態を確かめる。

(11) DNA のアガロースゲル電気泳動(84)

【試薬・装置】

電気泳動バッファは、Bバッファ (89mM Tris 、89mm tris 、89mm tris 、2.5 mMEDTA・2Na 、pH 8.4) あるいは、EPバッファ (89mm Tris 、8.9 mm か ウ酸、12.5mmEDTA・2Na、pH 8.2) を使用した。ゲル濃度は、0.5 、0.7、0.8、1.0、1.5 %を使用した。泳動装置は、垂直型スラブ電気泳動装置および水平型スラブ電気泳動装置を用いた。ゲルサイズは、垂直型は、140 x 140 x 4mm、水平型は、105 x 100 x 5 mmである。トランスイルミネーターはC-61 (ULTRA-VIOLET PRODUCTS) を使用した。

【操作】

サンプルは、BPB-SDS-グリセロールを20%加えて10~50μ1 を泳動した。垂直型スラブゲルでは、Bバッファを使用した時は、定電圧で80~120V、6~3時間泳動を行い、BPバッファを使用した時は、定電流で80~120mA 7~4時間泳動を行った。水平型スラブゲル

では、定電圧で30~80V 、20~5 時間、B バッファを使用して泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド0.5~2 μg /m1を含む泳動バッファ中で20分染色後、10~60分間泳動バッファあるいは水で脱色した。トランスイルミネーターによりゲル下面から254 nmの紫外線を照射して、写真撮影を行った。各制限酵素切断フラグメントのサイズは、HindIII 切断 λファージDNA あるいは、HinfI 切断pBR322 DNAを同時に泳動し、それらの移動度とサイズより検量線を作成し、各フラグメントのサイズをキロベース(kb)として算出した。 λ DNA の HindIII 切断フラグメントは23.7、9.46、6.67、4.26、2.25、1.96、0.59kbであり、pBR322 DNAの HinfI 切断フラグメントは1.63、0.52、0.51、0.40、0.30、0.22、0.20kbである。

(12) コロニー溶菌法を用いたプラスミドDNA の検出T. Eckhardt (85)の方法を改良した。

20 μ1 Lysozyme mixture (7500 units/ml lysozyme 0.3 units /ml RNase、0.05% BPB、20% Ficoll 400 in EP buffer) にコロニーを楊枝でけし粒2 ~3 個程度懸濁させ、5 分室温放置する。Overlay Mixture (0.2 % SDS、5.0 % Ficoll 400、in EP buffer)を30 μ1 加えvortexミキサーをかけ、65℃30分加温する。加温後すぐにミキサーをしっかりかけ、BPB-SDS-グリセロールを10 μ1 加え、EPバッファを使用したアガロ

ース電気泳動を行う。

(13) DNA フラグメントのクローニング(86)

(a) DNA の制限酵素による切断

DNA 1 μg を容量50 μ1 にして、通常の条件で制限酵素で切断する。クローニングベクターへの制限酵素切断フラグメントのクローニングの場合は、クローニングベクターとつなぎたいフラグメントのルルとする。制限酵素の種類が異なる時は、別々のチューフで切断し、切断反応停止後に合わせ、全DNA 濃度を 1 μg /50 μ1 とする。セルフクローニングの場合は、プラスミドDNA 1 μg を制限酵素で切断した。染色体DNA フラグメントのクローニングはベクタープラスミドDNA : 染色体DNA の重量比を 2 : 1 にして、DNA 2 ~ 3 μg /50 μ1 になる様にした。

(b) ライゲーション (Ligation)

制限酵素による切断反応を65℃で10~15分加温して停止した後、用時調製の 2 倍濃度のライゲーション混合溶液を50 μ1 加え、100 μ1 のライゲーション反応液の終濃度を60mM Tris-HC1 pH 7.5、10mM塩化マグネシウム、10mM DTT、0.05mM ATPに合わせる。T4 DNAリガーゼをcohesive endの場合は、0.2units、flush end (HincII) や染色体DNA フラグメントをクローニングする時は、1~2 units / 1 μg DNA

加え、12℃、18時間反応させた。

(c) 形質転換

反応液に塩化カルシウムを終濃度50mMになる様に加え、目的とする菌株へ形質転換を行った。

(14) 制限酵素による欠失プラスミドの作成

欠失プラスミドは制限酵素による完全切断あるいは部分切断後、セルフライゲーションを行うことにより作成した。完全切断によるセルフクローニングの方法は、実験方法(13)に示した。ここでは、制限酵素HincIIによる部分切断による、pTY132およびpTY133の作成法について述べる。

 $20 \mu g$ のプラスミドDNA を用い、 $37 \, ^{\circ}$ に保温した $500 \, \mu 1$ の反応液中へ20ユニットのHincII を加え、5、10、15、30、45、 $60 \, ^{\circ}$ 後に $80 \, \mu 1$ ずつとり、 $65 \, ^{\circ}$ で $15 \, ^{\circ}$ 加温し反応を停止させた。各反応サンプルより $20 \, \mu 1$ をとり、アガロースゲル電気泳動にかけ、プラスミドDNAが部分切断されているサンプルを確認し、そのサンプル $50 \, \mu 1$ を (13) の方法でライゲーションを行った。

C600の形質転換株は、カナマイシン25μg /mlおよびセファロリジン12.5μg /ml含有平板で選択し、耐性パターン、コリシンE1産生能、免疫能、βーラクタマーゼの基質特異性を調べ、またプラスミドDNA を調製し、制限酵素で切断し欠失領域を決定した。

---137 ---

(15) 薬剤耐性度の測定

耐性度は、寒天平板希釈法により測定した。被検菌の18時間培養液を100 倍希釈後、5 μ1 を種々の濃度の薬剤を含有するHI寒天平板あるいはMH寒天平板へ接種し、37℃あるいは30℃において18時間培養後、耐性値を菌の発育を阻止する最小の薬剤濃度(最小発育阻止濃度、MIC、minimal inhibitory concentration)あるいは、発育できる最大の薬剤濃度(最大発育許容濃度、MAC、maximum allowing concentration)を測定し、これをμg/mlで示した。なお接種には、ミクロプランター(TYPE M1 T-P 佐久間製作所Ltd.)を用いた。

(16) β - ラクタマーゼの粗酵素液の調製と活性測定法 (a) 粗酵素液の調製

BHI ブロスー夜前培養液を新しいBHI ブロス10~200 m1に加え、37℃で対数増殖期中期(0D610nm = 0.5)まで培養する。遠心集菌(8,000rpm、10分、0℃)後、菌体をPBS-Mg(13mMリン酸バッファ pH 7.0、0.68%塩化ナトリウム、1 mM硫酸マグネシウム)で洗浄し、0.1Mリン酸バッファ pH 7.0 (ミクロヨード法の場合は0.05M リン酸バッファ)12~14m1に懸濁後、sonifier(cell disruptor 200、Branson)を使用して氷冷破砕(output 6.5、1~2分)する。遠心(17,000rpm 、20分、0℃、ミク

ロヨード法の場合は32,000rpm 、45分、0℃) によ り細胞破砕断片を除去した上清を粗酵素液とする。

(b) 活性测定法

Sargent 法⁽⁸⁷⁾、Perret法⁽⁸⁸⁾、ミクロヨード法
⁽⁸⁹⁾は、Sawai 等の総説⁽⁹⁰⁾に従った。

なお、1ユニットは、30℃で毎分1 μ mol の基質 を水解するβ-ラクタマーゼ活性である。

- (17) β ガラクトシダーゼの粗酵素液の調製と 活性測定法
 - (a) β ガラクトシダーゼの粗酵素液の調製

C. freundii GN346 をカザミノ酸のみを炭素源とした K 培地で20℃にて前培養する。150 m1の同培地に 5 倍希釈したものを 2 本作り、坂口コルベンで、OD540nm = 0.5まで振とう培養する。一本にグルコースを 5 %加え、10分振とう後、グルコース添加、無添加とも I sopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG)を終濃度0.5mM になるように加え、それぞれ3本の坂口コルベンに50mlずつ分注する。そのうちの一本ずつにベンジルペニシリン800 μg /mlを加え、他の一本とともに20℃で振とう培養する。残りの坂口コルベンー本ずつはすみやかに37℃に培養しの坂口コルベンー本ずつはすみやかに37℃に培養温度を移し、振とう培養する。時間ごとにサンプルを6本の坂口コルベンより10mlずつとり、すばやく終濃度 1 mMになる様にナトリウムアザイドを加え、遠

心集菌 (5,000rpm、10分、0℃) する。0.14M 塩化ナトリウムで菌体を洗浄後、12m1の0.1Mリン酸バッファ (pH 7.0) で懸濁し、超音波破砕し、遠心 (17,000rpm 、20分、0℃) 後、上清を酵素試料として、βーガラクトシダーゼ活性およびβーラクタマーゼ活性を測定した。

(b) β - ガラクトシダーゼ活性測定法(91)

0.1Mリン酸バッファ(pH 7.0)で適宜希釈した酵素試料 5 ml ヘシステイン溶液(20mg/ml) 1 mlを加え37℃で3分加温後、37℃に保った0.01M ONPG溶液(0-nitrophenol galactoside) 1 mlを加え、37℃で15分恒温反応させる。1M炭酸ナトリウム溶液1 mlを加え反応を停止させ、15分間室温放置する。0.1Mリン酸バッファを対照としてA420nmを測定し、検量線より生成した0-ニトロフェノール(ONP)の量を算出した。同時にLowry 法により酵素試料の蛋白量を測定し、細胞壮総蛋白量あたりの酵素産生量で表した。

β-ガラクトシダーゼ活性 1 ユニット = 1 μ mol of ONP / min

(18) 蛋白質の定量法

Lowry 等⁽⁹²⁾の方法に従った。

(19) 栄養要求性の判定

Davis の最小培地にアミノ酸40μg /mlを加えて、アミノ酸要求性を調べた。糖利用能はDavis の最小培地あるいは、ニッスイのPYP 基礎培地、糖分解試験様半合成基礎培地に糖を1%加えて判定した。菌の培養は、LブロスまたはBHI ブロスで行い、0.14M 塩化ナトリウム溶液またはDavis の最小培地のバッファで2回遠心洗浄して、ミクロプランターで接種するか、コンラッジで塗布した。多数のコロニーを判定する時はレプリカ法によった。

(20) セファロスポリナーゼの温度誘導実験(50)

20℃一夜BHI ブロス前培養液を0D610nm = 0.1になる様に5~10倍希釈し、0D610nm = 0.5まで振とうし、0D610nm = 0.1になる様に42℃または20℃の新たなブロスで希釈し、42℃または20℃で15分加温後を0分として、37℃または20℃で振とう培養を続け、サンプルを時間ごとに調製した。20℃で操作した方の値をbase lineとして対照にとった。42℃15分加温する操作は、後に省いても結果にほとんど相違が見られないことがわかり、省いて20℃から37℃にすぐに誘導をかけた場合もある。

長時間の誘導を見た時は、20℃一夜BHI ブロス前培養液を0D610nm = 0.1になる様に5~10倍希釈したものを2本作り、0D610nm = 0.2~0.3 まで振とうし、

一本を37℃に移し誘導を行い、時間ごとにサンプルを 調製した。

(21) セファロスポリナーゼの薬剤誘導実験(35)

20 $^{\circ}$ $^{\circ}$

(22) 抗血清の調製法

C. freundii GN346 の精製したセファロスポリナーゼに対する抗血清はSawai 等(93)の方法に従い調製し、IgG 分画は硫酸アンモニウム沈澱によって調製した(94)。

抗血清のセファロスポリナーゼに対する影響は、30 ℃で10分、0.05M リン酸バッファ中で抗血清とセファ ロスポリナーゼを反応し、ミクロヨード法で残存セファロスポリナーゼ活性を測定した。対照には正常血清 を加えた。

(23) 外膜蛋白の分離と電気泳動

(a) 外膜蛋白の分離

外膜蛋白は松橋等⁽⁹⁵⁾の方法に従い膜画分の Sarcosy1NL-97 不溶画分として調製した。37℃、 Penassayブロス20m1一夜培養菌液を集菌(8,000rpm、 15分、4℃)し、0.01M リン酸バッファ(pH 7.0)で洗浄後、0.14M β — メルカプトエタノール含有
0.01M リン酸バッファ12m1に懸濁し、氷冷下で超音
波破砕し、遠心(10,000rpm 、10分、4℃)して、
上清を分取した。更にこの上清を遠心(33,000rpm 、
30分、4℃)し、得られた膜画分(ペレット)を蒸
留水適当量に懸濁し、終濃度2~3%になる様に、
Sarcosy1NL-97 溶液を加え、室温で30分放置後、遠心(33,000rpm 、40分、4℃)し、蒸留水で洗浄後
1 m1の蒸留水で懸濁し、外膜試料として用いた。

(b) 外膜蛋白のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動神尾(96)、Laemmli (97)の方法を一部改良して行った。外膜蛋白試料(1~3 mg/m1)に同量のサンプルバッファ (0.5M Tris-HC1 pH 6.8 12.5m1、10%SDS 20m1、β—メルカプトエタノール 5m1、グリセロール 10m1、ブロモフェノールブルー0.002%)を加え、100℃で2分加熱する。5%濃縮ゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=30:0.8 1m1、1.5M Tris-HC1 pH 6.8 1.5m1、10% SDS 0.06 m1、TEMED 3 μ1、蒸留水3.38m1、10%過硫酸アンモニウム0.06m1)、10%分離ゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド:ビスアクリルアミド:ベスアクリルアミド=30:0.8 5 m1、1.5M Tris-HC1 pH 8.8 3.75m1、10% SDS 0.15 m1、TEMED 5 μ1、蒸留水6.02m1、10%過硫酸アンモニウム0.075m1)および泳動バッファ(Tris 3.1g、グリシン14.4g、

SDS 1.0g/1 pH 8.4)を用いて、垂直型スラブゲル電気泳動装置で1mm厚さのゲルで、定電流12.5mA
2.5 時間泳動後25mA 1.5時間泳動した。染色は染色液 I、II、IIで一時間ずつ行い、10%酢酸で一夜脱色した(98)。染色液 I は25%イソプロパノール、0.025 %クマシーブリリアントブルー、10%酢酸混液で、染色液 II は10%イソプロパノール、0.025 %クマシーブリリアントブルー、10%酢酸混液で、染色液 II は10%イソプロパノール、0.025 %クマシーブリリアントブルー、10%酢酸混液で、染色液 II は0.0025%クマシーブリリアントブルー、10%酢酸混液である。分子量マーカーは次に示した。

蛋白質	分子量
Phosphorylase b	94,000
Albumin	67,000
Ovalbumin	43,000
Carbonic Anhydrase	30,000
Trypsin Inhibitor	20,100

文献

- 1) Cohen SN (1977) In DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes (Bukuhari A. Shapiro JA, Adhya SL eds.) pp672 Cold Spring Harbour New York
- 2) Hedges RW, Jacob AE (1974) Mol Gen Genet 134:31
- 3) Saedler H, Besemer J, Kemper B, Rosenwirth B, Starlinger P (1973) Mol Gen Genet 115: 258
- 4) Terakako N, Sekizaki T, Hashimoto K, Yamagata S, Yamamoto T (1981)
 Antimicrob Agents Chemother 20:382
- 5) Terakako N, Sekizaki T, Hashimoto K, Yamagata S, Yamamoto T (1982) In Drug Resistance in Bacteria (Mitsuhashi S ed.) pp93 Japan Scientific Societies Press Tokyo, Thieme-Stratton Inc New York
- 6) Yamamoto T, Yamagata S, Horii K, Yamagishi S (1982) J Bacteriol 150:269
- 7) Bobrowski NM, Matthew M, Barth PT, Datta N, Grionter NJ, Jacob AE, Kontomichalou P, Dale JW, Smith JT (1976) J Bacteriol 125:149
- 8) Yamamoto T, Tanaka M, Yamagata S, Motegi A, Takei T, Baba R, Watanabe M, Yamagishi S (1981) J Pharm Dyn 4: s-53
- 9) Levesque R, Roy PH, Letarte R, Pechere JC (1982) J Infecious Diseases 145 : 753
- 10) Levesque R, Roy PH (1982) Gene <u>18</u>:69
- 11) Ambler RP (1980) Phil Trans R Soc Lond B289-321
- 12) Knott-Hunziker V, Petursson S, Jayatilake GS, Waley SG, Jaurin B, Grundstrom T (1982) Bioche J <u>201</u>:621
- 13) Richmond MH, Sykes RB (1973) In Advances in Microbial Physiology (Rose AH, Tempest DW eds.) Vol 9 pp31 Academic Press London and New York

- 14) Yamamoto T, Tanaka M, Nohara C, Fukunaga Y, Yamagishi S (1981) J Bacteriol 145:808
- 15) Yamamoto T, Yamagata S, Hashimoto Y, Yamagishi S (1980) Microbiol Immunol 24:1139
- 16) Burman LG, Park JT, Lindstrom EB, Boman HG (1973) J Bacteriol 116:123
- 17) Mezes PSF, Wang W, Keh ECH, Lampen 0 (1983) J Biol Chem 258: 11211
- 18) Imanaka T, Oshihara W, Himeno T, Alba S (1983) J Gen Microb 129: 2621
- 19) Matumoto H, Terawaki Y (1982) In Proceeding of the 11th Gunma Symposium on Microbial Drug Resistance pp69
- 20) Jaurin B, Grundström T (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78: 4897
- 21) Jaurin B, Normark S (1979) J Bacteriol 138:896
- 22) Sawai T, Ando-Kuroda I, Murata T, Yamagishi S (1980) J Pharm Dyn 3:364
- 23) Takahashi I, T Sawai, T Ando, Yamagishi S (1980) J Antibio 33:1037
- 24) Yamamoto T, Yokota T (1980) Mol Gen Genet 178:77
- 25) Yamada M, Ebina Y, Miyata T, Nakazawa T, Nakazawa A (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79: 2827
- 26) Auerswald EA, Ludwig G, Schaller H (1981) Cold Spring Harbor Quant Biol <u>45</u>: 107
- 27) Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H (1982) Gene 19:327
- 28) McGraw BR, Marinus M (1980) Mol Gen Genet 178: 309
- 29) Grundström T, Jaurin B, Edlund T, Normark S (1980) <u>143</u>:1127
- 30) Bergström S, Linderberg P, Olsson O, Normark S (1983) 155 : 1297
- 31) Murata T, Inoue M, Mitsuhashi S (1982) In Proceedings of the 11th Gunma Symposium on Microbial Drug Resistance pp47

- 32) Okamoto R, Inoue M, Mitsuhashi S (1982) In Proceedings of the 11th Gunma Symposium on Microbial Drug Resistance pp45
- 33) Sawai T, Kanno M, Tsukamoto K (1982) J Bacteriol <u>152</u>:567
- 34) Ward JM, Grinsted J (1978) Gene 3:87
- 35) Sawai T, Nakajima S, Morohoshi T, Yamagishi S (1977) Microbiol Immunol <u>21</u>:
- 36) Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S (1968) Jap J Microbiol 12:423
- 37) Earrar WE, Krause JM (1970) Infect Immun $\underline{2}$: 610
- 38) Gootz T, Sanders CC (1983) Antimicrob Agents and Chemother 23:91
- 39) Hamilton-Miller JMT (1963) Biochem Biophys Res Commun 13:43
- 40) Sykes RB, Matthew M (1976) J Antimicrob Chemother 2:115
- 41) Sabath LD, Jago M, Abraham EP (1965) Biochemical J <u>96</u>:739
- 42) Sykes RB, Richmond MH (1971) Lancet II : 342
- 43) Farrar WE, Newsom JK (1973) Antimicrob Agents and Chemother $\underline{4}$: 109
- 44) Cornelis G, Abraham EP (1975) J Gen Microbiol 87:273
- 45) Aylifle GAJ (1965) J Gen Microbiol <u>40</u>: 119
- 46) Crompton B, Jago M, Crawford KO, Newton GGF (1962) Biochem J 88:52
- 47) Englesberg E, Wilcox G (1974) Ann Rev Genet 8:219
- 48) Gilbert W, Muller-Hill B (1966) Proc Natl Acad Sci USA <u>56</u>: 1891
- 49) Horiuchi T, Horiuchi S, Novick A (1961) J Mol Biol 3:703
- 50) Yamamoto T, Yamagata Murayama S, Sawai T (1983) Mol Gen Genet 190:85
- 51) Jaurin B, Grundstrom T, Edlund T, Normark S (1981) Nature 290: 221
- 52) Imsard J (1973) Genetics <u>75</u>:1
- 53) Magasanik B (1961) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 26:249
- 54) Perlman RL, Pastan I (1968) Biochem Biophys Res Commun 30:656

- 55) Grice SFJL, Matzura H, Marcoli R, Iida S, Bickle T (1982) J Bacteiol 150 : 312
- 56) Sawai T, Nakajima S, Yamagishi S, Mitsuhashi S (1975) In Drug-Inactivating Enzymes and Antibiotic Resistance (Mitsuhashi S, Rosival L, Krcmery V eds) pp59 Springer-Verlag Berlin Heidelber New York
- 57) Grundström T, Jaurin B (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:1111
- 58) Edlund T, Grundström T, Bjork GR, Normark S (1980) Mol Gen Genet 180:249
- 59) Edlund T, Grundström T, Normark S (1979) Mol Gen Genet 173:115
- 60) Jaurin B, Normark S (1983) Cell 32:809
- 61) Jaurin B, Grundström T, Normark S (1982) The EMBO Journal 1:875
- 62) Fujii-kuriyama Y, Yamamoto M, Sugawara S (1977) J Bacteriol 131:726
- 63) Clewell PB (1972) J Bacteriol 110 : 667
- 64) Datta N, Hedges RW (1972) J Gen Microbiol 72:349
- 65) Blumenber M, Yanofsky C (1982) J Bacteriol <u>152</u>: 57
- 66) Matsumoto H, Sawai T, Tazaki T, Yamagishi S, Mitsuhashi S (1972) Jap J

 Microbiol 16: 169
- 67) Cavalli LL, Lederberg J, Lederberg EM (1953) J Gen Microbiol 8:89
- 68) Ishibashi M, Sugino Y, Hirota Y (1964) J Bacteriol 87:554
- 69) Wu TT (1966) Genetics 54:405
- 70) Bachman BJ (1983) Microbiol Rev <u>47</u>: 180
- 71) Graaff JD, Kreuning PC, Stouthamen AH (1974) Antonie van Leeuwnhoek <u>40</u>: 161
- 72) Richard BG, Blender RA, J Bacteriol 118:810
- 73) Chang ACY, Cohen SN (1978) J Bacteriol 134:1141

- 74) Cohen SN, Cabello F, Casadaban M, Chang ACY, Timmis K (1977) In Molecular Cloning of Recombinant DNA (Scott WA, Werner R eds.) pp35 Academic Press New York
- 75) Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW (1977) Gene 2:75
- 76) Datta N, Hedges RW, Shaw EJ, Sykes RB, Richmond MH (1971) J Bacteriol 108:
- 77) Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Proc Natl Acad Sci USA 69:2110
- 78) Lennox ES (1955) Virology 1:190
- 79) 小関治男 (1972) 細菌・ファージ遺伝実験法 pp64 共立出版株式会社
- 80) Adelberg EA, Mandel M, Chen GCC (1965) Biochem Biohys Res Commun 18:788
- 81) Bolivar F, Backman K (1979) Methods in Enzymol 68:245
- -82) Womble DD, Taylor DP, Rownd RH (1977) J Bacteriol 130 : 148
- 83) Birnboim HC, Doly J (1979) Nucleci Acids Res <u>7</u>: 1513
- 84) Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S (1976) J Bacteriol 127: 1529
- 85) Eckhardt T (1978) 1 : 584
- 86) Tanaka T, Weisblum B (1975) J Bacteriol 121:354
- 87) Sargent MG (1968) J Bacteriol 95:1493
- 88) Perret CJ (1954) Nature (London) 174:1012
- 89) Novick RP (1962) Biochem J 83:236
- 90) 澤井哲夫、髙橋郁子(1978)蛋白質核酸酵素 23:391
- 91) Smith JT, Wyatt JM (1974) J Bacteriol 117:931
- 92) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J Biol Chem 193 : 265
- 93) Sawai T, Takahashi I, Nakajima H, Yamagishi S (1978) J Bacteriol <u>135</u>:281
- 94) Deutsch HF (1967) In Methods in Immunology and Immunochemistry (William CS, Chase MW eds.) Vol 1 pp315 Academic Press New York

- 95) 松橋通生、野口浩、玉城成夫 (1979) Chemotherapy <u>27</u>:827
- 96) Kamio Y Personal communication
- 97) Laemmli UL (1970) Nature (London) 222 : 680
- 98) Fairbanks UK, Steck TL, Wallach DH (1971) Biochemistry 10:2606