

魚類病原細菌 *Lactococcus garvieae* より分離された 薬剤耐性プラスミドの構造解析

廣野育生 青木 宙

東京水産大学資源育成学科遺伝生化学講座 (〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

はじめに

Lactococcus garvieae はグラム陽性球菌で、ブリのレンサ球菌症の原因菌である¹⁾。本菌による感染症は1974年に九州および四国のブリ養殖場で突発的に発生し、今日もなお全国各地の養殖場で頻発し、養殖業者に多大な経済的被害を与えている。本菌感染症の治療には主としてマクロライド系抗生物質やリンコマイシンおよびオキシテトラサイクリンが使用されて来た。1980年代前半までは本菌の薬剤耐性株は見られなかったが²⁾、1980年代中頃より多剤耐性株が出現するようになった³⁾。これら薬剤耐性株は、マクロライド系抗生物質あるいはリンコマイシンに中等度の耐性を示すタイプ、マクロライド系抗生物質、リンコマイシン、テトラサイクリンに高度耐性を示すタイプおよびマクロライド系抗生物質、リンコマイシン、クロラムフェニコールに高度耐性を示す3つのタイプに分類された⁴⁾。これらの多剤耐性株の内、高度耐性を示す株は伝達性のRプラスミドによるものであった³⁾。また、1987年から1988年に分離された *L. garvieae* 370株のうち約15%はマクロライド耐性を示し、同時にテトラサイクリン耐性あるいはクロラムフェニコール耐性を示した。1999年から2000年に分離された41株のうち約30%の株はマクロライド耐性とテトラサイクリン耐性を示した。

そこで、本研究ではマクロライド系抗生物質、リンコマイシン、テトラサイクリンに高度耐性を示す株より検出された伝達性Rプラスミドの構造

を解析し、さらに、Rプラスミドがコードする薬剤耐性遺伝子の起源を考察することを目的とした。

材料と方法

L. garvieae の R プラスミドの構造

L. garvieae EH8632株より伝達性RプラスミドDNAを抽出精製した。伝達性Rプラスミドを制限酵素 *Sau3A1*、*EcoRI* および *HindIII* で消化し、それぞれのDNA断片をベクタープラスミドにクローン化し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列はGenBankに登録されている塩基配列あるいはタンパク質配列に対するの相同性検索をBLASTプログラムにより行った。

結 果

伝達性Rプラスミド pSY8632は制限酵素による消化断片の比較解析により約30kbの大きさであった。pSY8632がコードしているマクロライド耐性遺伝子はブドウ球菌由来のマクロライド耐性遺伝子 (*ermB*) と最も相同性が高かった。また、pSY8632がコードしているテトラサイクリン耐性遺伝子は *Lactococcus lactis* 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetS*) と最も高い相同性を示した。マクロライド耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子は約1kb離れて存在していた(図1)。両遺伝子間には *Enterococcus faecalis* のプラスミドにコードされている機能不明なタンパク質と相同な配列が2個存在した(図1)。

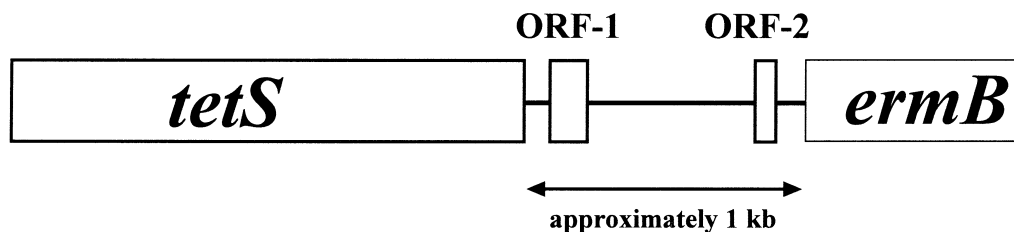


図1 *L. garvieae* の伝達性 R プラスミド pSY8632 上のテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetS*) と エリスロマイシン耐性遺伝子 (*ermB*) の物理的地図

表1 *L. garvieae* の伝達性 R プラスミド pSY8632 上に存在した既知遺伝子のホモロジー

菌種およびプラスミド, トランスポゾン	遺伝子
<i>Streptococcus pyogenes</i> plasmid pDB101	ORF-alpha, ORF-gamma, ORF-eta, ORF-delta, ORF-zeta, cops
<i>Streptococcus pyogenes</i> plasmid pDB101	RepS
<i>Streptococcus</i> sp. plasmid pIP501	ORF-3, ORF-5, ORF-6
<i>Lactococcus lactis</i> plasmid pMRC01	<i>TrsK</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> Tn916	ORF-14
<i>Enterococcus faecalis</i> plasmid pAM-beta-1	Resolvase

エリスロマイシン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子が連座している領域の端には IS 様の配列が存在した。このことは、これら薬剤耐性遺伝子がトランスポゾンとして R プラスミド、染色体内あるいは細菌間で動いている可能性が示唆された。しかし、今回解析したようにエリスロマイシン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子が連座して存在している R プラスミドの報告はなく、本菌内で新たに構築された遺伝子群である可能性も示唆された。PCR による薬剤耐性遺伝子検出の結果、1999 年および 2000 年に分離された薬剤耐性菌は伝達性 R プラスミド pSY8632 と同じマクロライド耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子をコードしていることが明らかとなった。このことから、1980 年代後半から 2000 年までの長期間に渡り、同一あるいは類似の構造の伝達性 R プラスミドが存在し続けている可能性が示された。

伝達性 R プラスミド pSY8632 がコードしている薬剤耐性遺伝子領域以外の領域には、*L. lactis* あるいは *Streptococcus pyogenes* 由来のプラスミドにコードされている遺伝子と高い相同性を示す配列が多数見られた (表 1)。しかし、グラム陰性桿菌由来の R プラスミドあるいはゲノム配列と高い

相同性を示す配列は見られなかった。このことから、今回解析したプラスミドの起源はグラム陽性の球菌由来のものであると考えられた。

最後に、本菌感染症に対するワクチンが開発され、養殖場で使用されるようになったにも関わらず、薬剤耐性菌感染症が発生していることから、今後も本菌の薬剤耐性機構の解明ならびに疫学的な調査を行なう必要があると思われた。

要 約

Lactococcus garvieae の伝達性 R プラスミド pSY8632 は制限酵素による消化断片解析により約 30kb の大きさであることがわかった。pSY8632 上にコードされていたマクロライド耐性遺伝子はブドウ球菌由来のマクロライド耐性遺伝子 (*ermB*) と最も相同性が高く、テトラサイクリン耐性遺伝子は *Lactococcus lactis* 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetS*) と最も高い相同性を示した。マクロライド耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子は約 1kb 離れて存在していた。pSY8632 上にコードされていた薬剤耐性遺伝子領域以外は、*L. lactis* あるいは *Streptococcus pyogenes* 由来のプラスミドにコードされている遺伝子と高

い相同性を示す配列が多数見られた。このことから、今回解析したプラスミドの起源はグラム陽性細菌のものであると考えられ、今後、薬剤耐性プラスミドの起源を研究する上で重要な情報になると思われた。

文 献

1. Kitao, T. : Fish Pathology 17, 17-26 (1982)
2. Aoki, T., Takeshita, S., and Kitao, T. : Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 49, 1673-1677(1983)
3. Aoki, T., Takami, K., and Kitao, T. : Dis. Aquat. Organ. 8, 171-177(1990)
4. Aoki T., Takami, K., and Kitao, T. : Proceedings of the Second Asian Fishries Forum, 697-699(1990)

Characterization of Structure and Genes of R Plasmid from Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae*

Ikuo HIRONO and Takashi AOKI

*Laboratory of Genetics and Biochemistry, Tokyo University of Fisheries,
Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan*

We characterized the structure and genes of R plasmid pSY8632 detected in fish-pathogenic *Lactococcus garvieae*. This R plasmid encoded with resistance to erythromycin and tetracycline. The erythromycin resistance gene was most identical to *ermE* gene originated from *Staphylococcus aureus*. The tetracycline resistance gene was most identical to *Lactococcus lactis tetS* gene. We also found several genes which were homologue genes of R plasmids of *L. lactis* or *Streptococcus pyogenes*. These results suggest that the origin of R plasmid pSY8632 is some of R plasmid from Gram-positive bacteria.

討 論 (座長：畑井喜司雄，日獣畜大)

質問 (岡野圭介，藤沢薬品)

ハマチはオールイン，オールアウトの飼育形態である。エコサイクルをつなげるものは何でしょうか。

答 (廣野育生，東京水産大)

よく分からないのが事実です。しかし，耐性遺伝子やそれらをコードするRプラスミドの構造が年により異なることがあるのも事実です。今後，さらに

研究が必要かと思われまます。

質問 (片岡 康，日獣畜大)

EM，TC 耐性遺伝子が Tn 由来であることから，ハマチ由来の他の細菌への耐性の転移はみられませんか。

答 (廣野育生，東京水産大)

ハマチ由来の他の細菌への耐性遺伝子の転移はみられません。