

リンコマイシンによる TEM 型 β -ラクタマーゼの 産生増強メカニズム

岡山大学医学部細菌学教室 (指導: 金政泰弘教授)

松 下 治

(昭和63年3月11日受稿)

Key words : lincomycin, *Escherichia coli*, TEM β -lactamase,
mRNA, DNA-RNA hybridization

緒 言

リンコマイシン系抗生物質は主としてグラム陽性菌感染症の治療に外科領域を中心として広く使用されている。しかしこれらの抗生物質は副作用として下痢症と偽膜性大腸炎を惹起することがある。これらの症例では患者の便から *Clostridium difficile* が常在菌数の10~100倍量で検出され、リンコマイシン系抗生物質の投与により腸内細菌叢の菌交代現象がおこり *C. difficile* が異常に増殖したことが本症の原因であると示唆されていた。偽膜性大腸炎の組織病変として、大腸粘膜の壊死を伴った急性炎症像とフィブリン、粘液、炎症細胞、脱落した上皮よりなる偽膜の形成が特徴的であるが、これらは *C. difficile* の産生する毒素によることが明らかにされた。さらにリンコマイシン系抗生物質には、この毒素産生を増強させる作用があることが報告され、この抗生物質が本症の発症病理に直接的に関与していることが確実となった^{1)~3)}。

リンコマイシン系抗生物質のこのような細菌毒素の産生を増強させる作用は、コレラ菌や毒素原性大腸菌 (ETEC) の易熱性エンテロトキシンにおいても認められている。特に ETEC においては、培地にリンコマイシン (LCM) を添加すると毒素の産生が増強されることが菌種の同定に応用されている^{4)~8)}。

リンコマイシンは、細菌リボソームの50Sサブユニットに結合して mRNA 上でのリボソームのトランスロケーションを阻害し蛋白合成を阻害

することが知られている⁹⁾。しかし、この作用だけでは、毒素の産生増強効果のメカニズムを説明することはできない。これらの毒素はいずれもエキソトキシンであるが、その定量測定が煩雑であるため、この現象の定量的な解析が困難である。そこで、LCM の作用メカニズムを詳しく検討するために、測定が簡便な他の分泌性蛋白質をモデルにする必要がある。分泌性蛋白質に対する LCM の効果を調べたところ、*Escherichia coli* の β -ラクタマーゼの産生を増強することがわかったので、この系をモデルに用いて LCM の作用メカニズムについて分子論的に解析検討した。

材 料 と 方 法

1. 菌株及び培養条件

供試した菌株、プラスミド、バクテリオファージは、表1に示したとおりである。基礎培地には L 培地を用いた。前培養は、アンピシリン 50 μ g/ml を含んだ 5 ml の L 培地で、37 $^{\circ}$ C にて 120 rpm の振盪で一夜培養した。本培養は LCM 150 μ g/ml を添加した 100 ml の L 培地に前培養液 1 ml を接種し、同様の条件で培養を続けた。菌の生育は、OD₆₀₀ の濁度測定によりモニターした。

2. 酵素活性の定量

β -ラクタマーゼ活性はマイクロヨード法により¹⁰⁾、 β -ガラクトシダーゼ活性は Schleif らの方法により¹¹⁾、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 活性は Shaw の方法により¹²⁾それぞれ測定した。

表1 菌株, プラスミド, およびバクテリオファージ

備 考	
<i>E. coli</i>	
K-12 YA21	F ⁻ , <i>met</i> , <i>leu</i> , λ^{-}
K-12 C600	F ⁻ , <i>thi</i> -1, <i>thr</i> -1, <i>leu</i> B6, <i>lac</i> Y1, <i>ton</i> A21, <i>sup</i> E44, λ^{-}
HB101	F ⁻ , <i>hsd</i> S20 (<i>r</i> _B ⁻ , <i>m</i> _B ⁻), <i>rec</i> A13, <i>ara</i> -14, <i>pro</i> A2, <i>lac</i> Y1, <i>gal</i> K2, <i>rps</i> L25 (<i>Sm</i> ^r), <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>sup</i> E44, λ^{-}
112-2	<i>Hfr</i> C/ <i>pur</i> - <i>leu</i> S, <i>met</i> B, <i>pro</i> A3, <i>met</i> D88, <i>lac</i> -3, <i>tsx</i> -76, <i>rel</i> A, <i>Zaf</i> :: Tn3, λ^{-}
JM105	Δ <i>lacpro</i> , <i>thi</i> , <i>str</i> A, <i>sbc</i> B15, <i>hsd</i> R4, λ^{-} /F' <i>tra</i> D36, <i>pro</i> AB, <i>lacI</i> ^q <i>Z</i> Δ M15
Ymel	<i>mel</i> , <i>sup</i> E, <i>sup</i> F, λ^{-}
プラスミド	
pBR322	汎用プラスミドベクター. Ap ^R , Tc ^R
pJL3	pMB8 由来の <i>ori</i> 領域を持ったプラスミド. Ap ^R , Tn9
pTY98	Col EI :: Tn3, Tn5.
pBR322 Δ P1	pBR322から P1 プロモーターを含む377塩基対の EcoRI-BamHI 断片を欠失させて得たプラスミド.
pBR322 Δ P3	pBR322から P3 プロモーターを含む191塩基対の EcoRI-Ssp I 断片を欠失させて得たプラスミド.
pBR322 Δ Dra IBC	pBR322から <i>bla</i> 構造遺伝子の下流側約 4 分の 3 を含む Dra I B, C 断片を欠失させて得たプラスミド.
pAT153	pBR322の高コピー数プラスミド. Ap ^R , Tc ^R
pAT153 Δ Dra IBC	pAT153から <i>bla</i> 構造遺伝子の下流側約 4 分の 3 を含む Dra I B, C 断片を欠失させて得たプラスミド.
バクテリオファージ	
λ bb	λ cI857, S7, <i>xis</i> 6, b515, b519.
M13mp19	クローニング用ファージベクター.
M13mp19 <i>bla</i> '	pBR322の <i>bla</i> 遺伝子の上流側約 3 分の 2 を含む752塩基対の EcoRI-Pst I 断片を M13mp19に挿入した組み換えファージ.

3. DNA の組み換え

各制限酵素, T4 DNA リガーゼ, DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメント等の酵素は宝酒造, 東洋紡績, New England Biolabs 製のものをを用いた. DNA の制限酵素切断, 連結, 形質転換, 電気泳動等の条件は, Maniatis らの方法に準じて行なった¹³⁾.

4. λ ファージによる形質導入

アンピシリン添加 L 培地で前培養した *E. coli* K-12 C600 λ bb/pTY98 0.5mlを, アンピシリン 50 μ g/ml を含む L 培地50mlに接種し30℃, 120 rpm で振盪培養した. 菌の生育が0.3OD₆₀₀に達したとき, 培養液を45℃で15分間加温しファージを誘導後, さらに37℃, 180rpm, 90分間の振盪培養を行った. 培地にクロロホルムを数滴加えて溶菌させ λ bb 浮遊液とした. この液のファ

ージ力価は, *E. coli* Ymel を用いて測定した.

E. coli K-12 C600 を λ 培地で37℃, 14時間培養後, 4 mlの菌液を25℃, 2,100 \times g で20分間遠心し集菌した. 菌体を10mM MgSO₄ 0.4ml中に懸濁し, λ bb 浮遊液0.6mlを加えた後, 30℃にて15分間静置した. L 培地4.2mlを加え, 30℃にて2時間の振盪培養後, アンピシリン25 μ g/mlを含んだ L 平板培地 (15g/lの寒天末を L 培地に加えたもの)に, その100 μ l を接種して一夜培養しアンピシリン耐性菌を選択した.

得られた溶原菌 (*E. coli* K-12 C600 λ bb::Tn3)から上記と同様の方法でファージを調製し, *E. coli* K-12 C600に形質導入し, 形質導入効率を求めた.

5. *bla* mRNA の定量

a) RNA のパルスラベル

アンピシリン添加 L 培地で前培養した *E. coli* K-12 YA21/pBR322 50 μ l を、10 μ g/ml のアンピシリンを添加した T₁₀Y₁ 培地 (1 l 中 Bacto-Tryptone 10g, Bacto-Yeast Extract 1 g, NaCl 5 g を含む) 5 ml に接種し、16 時間の 2 次前培養を行なった。リンコマイシン 80 μ g/ml を含む T₁₀Y₁ 培地およびリンコマイシンを含まない T₁₀Y₁ 培地各 100 ml にそれぞれ 1 ml の 2 次前培養菌液を接種し、37 $^{\circ}$ C で振盪培養し、その 5 ml を、あらかじめ 100 μ Ci の [³H]-Uridine を入れた 50 ml の遠心管に移し、37 $^{\circ}$ C で 1 分間振盪した。氷冷した反応停止液 (10mM Tris-HCl (pH 7.3), 10mM NaN₃, 5mM MgCl₂, クロラムフェニコール 150 μ g/ml) 30 ml を加えて反応停止後、4 $^{\circ}$ C, 8,000 \times g, 10 分間の遠心を行い集菌した。菌体を溶菌緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 7.3), 10mM NaN₃, 5mM MgCl₂, DNase I 30 μ g/ml, Lysozyme 0.6mg/ml) 3 ml に懸濁し、ドライアイス・エタノール中で凍結融解を 3 回繰り返し溶菌させた。これに 0.1M CH₃COONa (pH 5.2) 100 μ l と 5% SDS 200 μ l を加え、ついで、フェノール (10mM Tris-HCl (pH 7.3), 10mM NaN₃, 5mM MgCl₂ で飽和) 3.5 ml を加え、60 秒間激しく振盪し混和した。25 $^{\circ}$ C, 3,500 \times g, 10 分間遠心し、水層 2.5 ml を 50 ml 遠心管に移し、エタノール沈澱を 2 回繰り返した。その沈澱を、2 \times SSC (300mM NaCl, 30mM Sodium citrate) 1 ml に溶解して RNA 画分とした。

b) *bla* mRNA に対する ssDNA プロープの調製

M13mp19 を *E. coli* JM105 に感染させ、Birnboim らの方法¹⁴⁾により Replication Form DNA を抽出し、CsCl-EtBr 密度平衡勾配遠心法で精製した。pBR322 プラスミド DNA は、同様の方法で *E. coli* HB101/pBR322 より精製した。それぞれの DNA を、EcoRI, Pst I で切断後、 β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*) 断片 (約 0.75 kb; *bla* mRNA 全長の約 3 分の 2 を含む) を、M13mp19 ベクターに T4 DNA リガーゼを用いて挿入し、*E. coli* JM105 にトランスフェクションし

た。得られた組み換えファージ M13mp19*bla'* が *bla* 遺伝子のアンチセンス鎖を持つことは、制限酵素地図の作成および塩基配列の決定で確認した。このファージ一本鎖 DNA を Messing の方法^{15), 16)}でファージ粒子より精製し、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) に溶解しプローブとして供試した。

c) *bla* mRNA の定量

15 ml のポリプロピレン遠心管に、a) で調製した [³H]-RNA 標品 30 μ l と b) で調製したプローブ 60 μ l (M13mp19*bla'* ssDNA 20 μ g/ml) をとり、2 \times SSC を加えて全量を 200 μ l とし、67 $^{\circ}$ C, 3 時間 DNA-RNA ハイブリダイゼーションを行なった。氷冷後、RNase 溶液 (DNase free RNaseA 10 μ g/750 μ l 2 \times SSC) 750 μ l を加え、20 秒混和の後、37 $^{\circ}$ C, 30 分間保温し、ハイブリダイズしていない RNA を消化した。氷冷後、洗浄用緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M KCl) 5 ml を加え、DNA-RNA ハイブリッドをニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell BA85) に濾過吸着させた。フィルターを 40 ml の同緩衝液で洗浄し、乾燥後、その放射活性をシンチレーター (2, 5-diphenyloxazole 15.1g, 1, 4-Bis-2-[4-methyl-5-phenyloxazolyl]-benzene 0.38g を 1 l の toluene に溶解) 8 ml 中で、シンチレーション・カウンター (Aloka LSC-1000) により測定した。また、非特異的にファージ DNA にハイブリダイズしフィルターに結合する RNA 量を測定するため、RNA 標品を同量の M13mp19 ベクターの一本鎖 DNA (*bla* 遺伝子断片を含まない) とハイブリダイズさせフィルターに濾過吸着させて、両者の放射活性の差を *bla* mRNA のハイブリダイゼーション量とした。なお、この実験はトリプリークで行なった。また、あらかじめ ssDNA プロープが *bla* mRNA を飽和する条件を予備実験で調べ、プローブに使用する ssDNA 量を決定した。

結 果

1. LCM による β -ラクタマーゼ産生増強効果

E. coli K-12 株は、染色体上 94 分の位置にアンピシリン耐性遺伝子 (*amp^rC*) を持っていること

が知られている¹⁷⁾。この遺伝子産物がTEM型の β -ラクタマーゼ活性値の測定に影響を及ぼしている可能性があるため、TEM型 β -ラクタマーゼ遺伝子を持たない *E. coli* K-12 YA21を用いて β -ラクタマーゼ活性の測定を行なった。その結果は、図1に示したように、アンピシリンを基質としたマイクロヨード法では染色体由来の β -ラクタマーゼ活性は検出できなかった。

次に、*E. coli* K-12 YA21/pBR322を用いて増殖、 β -ガラクトシダーゼおよび β -ラクタマーゼ活性に対するLCMの効果調べた。図2に示したように、LCMは150 μ g/mlの濃度で、菌の増殖を約46%に抑制した。このとき β -ガラクトシダーゼ活性は約24%に抑制されたが、 β -ラクタマーゼ活性は約2.6倍の活性増加が観察された。

2. プラスミドコピー数の影響

pBR322上の *bla* 遺伝子は Tn3に由来しているが¹⁸⁾、このTn3を λ ファージを用いて染色体上に組み込んだ、得られた溶原菌は、アンピシリン (25 μ g/ml) 耐性、カナマイシン (25 μ g/ml) 感受性を示した。また、この菌を誘導して得たファージは、*E. coli* K-12 C600 λ bb/pTY98か

ら得たファージの約10⁶倍の頻度でアンピシリン耐性の形質導入が可能であった。さらに、この株からは Birnboim らの方法ではプラスミドを得られなかった。これらのことから、この株は *E. coli* K-12 C600 λ bb::Tn3であるとした。この株をL培地にて30℃で培養し、LCMの効果調べた。図3に示すように発育は約80%に抑制されたが、活性は約1.6倍の増加を認めた。なお *E. coli* K-12 C600/pBR322からの β -ラクタマーゼの産生は、*E. coli* K-12 YA21/pBR322の場合と同様にLCMによって増強された。これらの結果は、染色体上に *bla* 遺伝子を組み込んだ場合でもプラスミドの場合と同様に、LCMは β -ラクタマーゼの産生を増強することを示している。

また、pBR322と同じく ColEI 由来の複製開始領域を持ち、さらにクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*cat*) をコードしているプラスミド pJL3¹⁹⁾を保有した *E. coli*

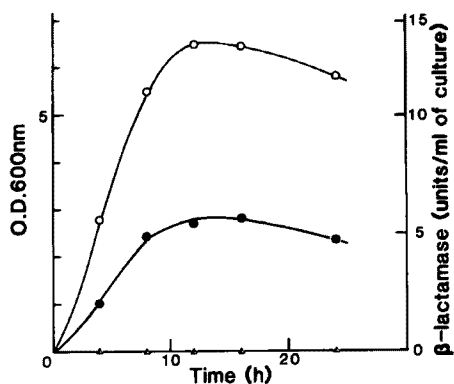


図1 *E. coli* K-12 YA21の *ampC* 由来 β -ラクタマーゼ産生に対するLCMの効果。図中のOpen SymbolはLCM非存在下(LCM(-))での、Closed SymbolはLCM存在下(LCM(+))での結果を表わしている。LCM(-)のOD(\circ)、 β -ラクタマーゼ活性(\triangle)とLCM(+)のOD(\bullet)、 β -ラクタマーゼ活性(\blacktriangle)を経時的に測定した。いずれの時期においても、また、LCMの存否を問わず、 β -ラクタマーゼ活性は見られなかった。

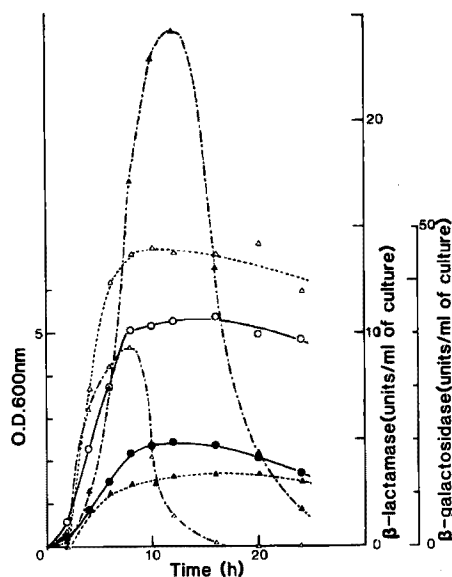


図2 *E. coli* K-12 YA21/pBR322の β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ産生に対するLCMの効果。LCM(-)のOD(\circ)、 β -ラクタマーゼ活性(----- \triangle -----)、 β -ガラクトシダーゼ(----- \triangle -----)とLCM(+)のOD(\bullet)、 β -ラクタマーゼ活性(----- \blacktriangle -----)、 β -ガラクトシダーゼ(----- \blacktriangle -----)を経時的に測定した。

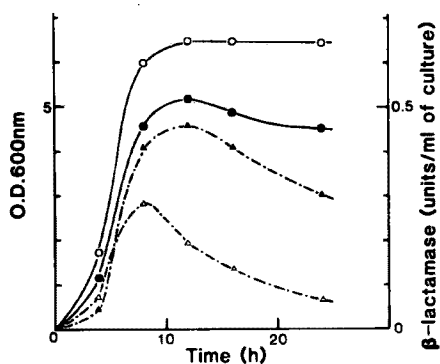


図3 *E. coli* K-12 C600 λ bb::Tn3の β -ラクタマーゼ産生に対する LCM の効果。
LCM (-) の OD (○), β -ラクタマーゼ活性 (△) と LCM (+) の OD (●), β -ラクタマーゼ活性 (▲) を経時的に測定した。

K-12 C600を用いて, CAT 活性に対する LCM の効果を調べた。図4で示したように LCM は, K-12 C600/pJL3からの CAT 産生は増強させなかった。

3. 転写に対する影響

a) *bla* mRNA の定量

bla 遺伝子の転写に対する LCM の影響を調べるため, *bla* mRNA をパルスラベル法で測定し

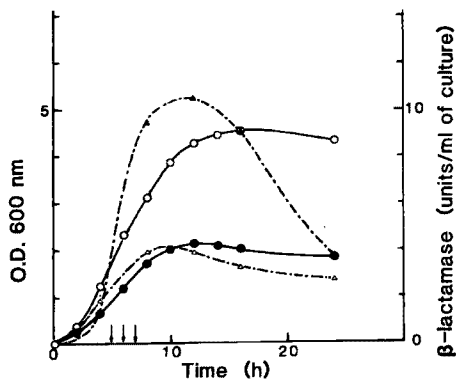


図5 *E. coli* K-12 YA21/BR322の β -ラクタマーゼ産生と *bla* mRNA の測定時期。LCM (-) の OD (○), β -ラクタマーゼ活性 (△) と LCM (+) の OD (●), β -ラクタマーゼ活性 (▲) を経時的に測定した。図中矢印で示した5, 6, 7時間後に, *bla* mRNA をパルスラベル法で測定した。

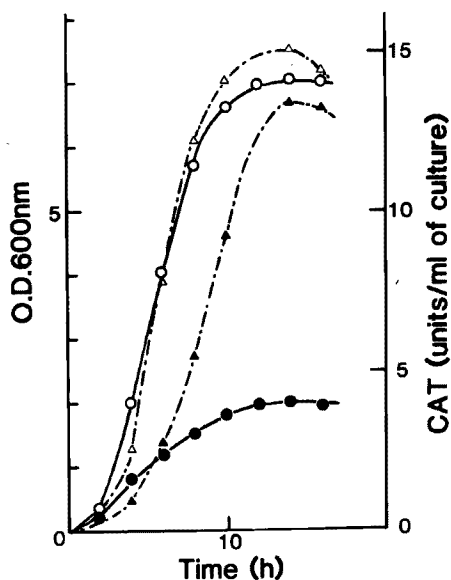


図4 *E. coli* K-12 C600/pJL3のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ産生に対する LCM の効果。
LCM (-) の OD (○), CAT 活性 (△) と LCM (+) の OD (●), CAT 活性 (▲) を経時的に測定した。

た, LCM 80 μ g/mlを含むヌクレオチド含量の低い T₁₀Y₁培地で培養を行った。このときの培養時間と, 増殖, β -ラクタマーゼ活性の関係を図5に示した。LCM の β -ラクタマーゼ産生増強効果が, この条件においても L 培地の場合と同様に認められた。 β -ラクタマーゼの活性が増加する5, 6, 7時間後に, [³H]-Uridineを用いて *bla* mRNA 量を測定した。結果は表2のように, いずれの時期においても, LCM の添加により培地 1 ml中の菌体に含まれる *bla* mRNA 量が約

表2 *E. coli* K-12 YA21/pBR322の *bla* mRNA 量に対する LCM の効果

Culture (hr)	<i>bla</i> ' mRNA (10 ³ DPM/ml)			β -lactamase activity
	LCM (-)	LCM (+)	LCM (+)/LCM (-)	LCM (+)/LCM (-)
5	24	57	2.4	1.2
6	52	93	1.8	1.4
7	91	198	2.2	1.9

1.8~2.4倍に増加していた。

b) 転写リプレッサー存在の可能性

bla 遺伝子からの転写開始を抑制するようなりプレッサーの存在を仮定すると、次のように LCM の効果が説明できる。すなわち、通常の状態では *bla* 遺伝子の転写がリプレッサーによって抑制されているが、LCM はこのリプレッサーの産生を抑制することで、結果的に *bla* の発現の抑制を解除している可能性がある。染色体上に *bla* 遺伝子を持つ *E. coli* に、*bla* のプロモーター領域のみを多量に投与した場合、もしリプレッサーが存在するならば、投与したプロモーター領域がリプレッサー分子を消費して、染色体上の *bla* 遺伝子からの β -ラクタマーゼ産生を増強させる可能性がある。そこで図 6 で示すように pBR322、及びその高コピー数プラスミドである pAT153²⁰⁾ の *bla* 構造遺伝子の下流側約 4 分の 3 を含む 711 塩基対を *Dra* I を用いて欠失させ、プロモーター領域は持つが β -ラクタマーゼ産生能はないプラスミドを作製した。このプラスミドを、染色体約 5~6 分の位置に Tn3 を持つ *E. coli* 112-2 に形質転換して遺伝子投与実験を行なった。いずれの場合にも、プラスミド投与による β -ラクタマーゼ活性の有意な増加は観察されなかった。(表 3)

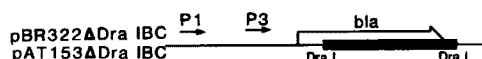


図 6 *bla* の構造遺伝子部分を欠失させたプラスミドの作製。
欠失断片は、黒色の太線 (■) で表わしている。

表 3 染色体上の Tn 3 由来 β -ラクタマーゼ産生に対する *bla* プロモーター投与の効果
LCM (150 μ g/ml) 存在下および非存在下で培養を行い 1 時間おきに β -ラクタマーゼ活性を測定して、その最大値を表中に示した。

Strain/plasmid	β -lactamase activity (units/ml of culture)
112-2	0.139
112-2/pBR322ΔDra IBC	0.141
112-2/pAT153ΔDra IBC	0.157

c) プロモーターに特異的な転写開始の促進
pBR322 の *bla* 遺伝子は 2 つのプロモーターから転写開始されている。一つは本来のプロモーター P3 であり、他の一つは、人工的に連結されたテトラサイクリン耐性遺伝子領域に存在する P1 プロモーターである²¹⁾。

もし LCM が特定のプロモーターからの転写開始を特異的に促進させるのであれば、その部位を欠失させれば LCM の効果は認められなくなるはずである。そこで図 7 のように pBR322 から P1 プロモーターを含む *Eco*RI-*Bam*HI 断片 (約 0.38 kb)、または、P3 プロモーターを含む *Eco*RI-*Ssp*I 断片 (約 0.19 kb) を欠失させたプラスミドを作製し、それぞれを pBR322ΔP1、pBR322ΔP3 と名づけた。これらのプラスミド上の *bla* 遺伝子は、P3 または P1 プロモーターのみから転写開始される。両者のプラスミドを *E. coli* K-12 C600 に形質転換し、L 培地にて LCM の効果を調べると、転写開始部位の違いにかかわらず β -ラクタマーゼの産生が増強された。(表 4)

考 案

Stringent 型の RP4 プラスミド上には、 β -ラクタマーゼ遺伝子を持った Tn1 が存在している。RP4 を保有した *E. coli* を LCM 存在下で培養すると、 β -ラクタマーゼ活性が増加した。この現象は、酵素蛋白の産生の増加によるものであり、酵素蛋白の分解抑制による見かけ上の活性増加によるものではなかった²²⁾。

LCM は複製、転写のいずれかの段階で、 β -ラクタマーゼの産生を増強すると考えられた。さらに詳細に LCM の作用メカニズムを解析しようとしたが、RP4 は約 36 Mdalton の巨大プラスミドであり、遺伝学的手法を用いた解析は困難であると思われた。RP4 上の β -ラクタマーゼは Tn1 に由来し、pBR322 上の β -ラクタマーゼは Tn3 に由来しているが、両者のトランスポゾン TnA グループに属し、これらの β -ラクタマーゼ蛋白には高い類似性がある。そこで、すでに全塩基配列の決定されている小型プラスミド pBR322 を用いて LCM による β -ラクタマーゼ産生増加のメカニズムを検討した。

β -ラクタマーゼの活性測定は、アンピシリン

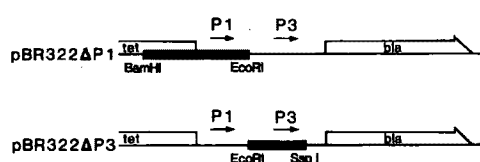


図7 pBR322上の各々のプロモーターを欠失させたプラスミドの作製。
欠失断片は、黒色の太線(■)で表わしている。

表4 単一のプロモーターから発現した β -ラクタマーゼ産生に対する LCM の効果
LCM (150 μ g/ml) 存在下および非存在下で培養を行なった。リンコマイシンの添加により菌の増殖はどの場合も約60%に抑制された。2時間おきに培地の一部を-80℃で保存し、 β -ラクタマーゼ活性を測定してその最大値を表中に示した。

Strain/plasmid	β -lactamase activity (units/ml of culture)	
	LCM(-)	LCM(+)
K-ab C600/pBR322	10.3	27.3
K-12 C600/pBR322 Δ P 1	4.6	23.8
K-12 C600/pBR322 Δ P 3	12.3	26.9

を基質としたマイクロード法で行なった。染色体上の *ampC* 遺伝子産物である β -ラクタマーゼの活性が、この方法では検出されなかったことから、この方法による β -ラクタマーゼの活性測定は、TEM 型 β -ラクタマーゼに特異的であると判断した。*ampC* 由来の β -ラクタマーゼは、その産生量が低いためかまたは反応条件が異なるためにその活性が観察されないのではなかろうか。

LCM の添加により pBR322 からの β -ラクタマーゼの活性は RP4 の場合と同様に増加した。このとき培養の Stationary phase において β -ラクタマーゼ活性が減少しているが、これは培地栄養の枯渇による蛋白分解であろう。

pBR322 は、ColE1 プラスミド由来の複製開始領域を持ち、複製開始に新たな蛋白合成を必要としないため、クロラムフェニコールなどの蛋白合成阻害剤によって、そのコピー数を増加させることができる²⁴⁾。LCM も蛋白合成阻害剤で

あり、同様の作用によりプラスミドのコピー数を増加させて、その上にコードされている β -ラクタマーゼの産生を増加させる可能性がある。そこで pBR322 の β -ラクタマーゼが由来する Tn3 を、 λ ファージを用いて染色体上に組み込み、*bla* 遺伝子数を固定して LCM の効果を調べたが、この場合でも β -ラクタマーゼの産生は増強された。pBR322 の場合に比し LCM の増殖抑制効果がやや低くそれにとまって β -ラクタマーゼ産生増強効果がやや弱いのは、温度感受性 (cIts) である溶原化ファージの誘導をさける目的で 30℃ での培養を行なったためと考えられた。

しかし、トランスポゾンとはゲノム上の他の位置への転移が可能であるので、LCM 存在下の培養で転移が頻発し、 β -ラクタマーゼの遺伝子数が増加した可能性が否定しきれない。そこで複製開始領域が同じである上、定量の容易な CAT をコードしている pJL3 を使い、CAT 活性に対する LCM の効果を調べたが、この酵素の活性は LCM 添加による増強を受けなかった。これらの実験から、LCM の β -ラクタマーゼ産生増強効果は、gene-dose 効果によるものではないと結論した。

そこで次に *bla* 遺伝子の転写に対する LCM の効果を検討した。³H]-Uridine で mRNA をラベルするには、十分な比活性を得るために培地中のヌクレオチド濃度を下げる必要がある。L 培地の Yeast Extract 含量を 5 分の 1 に下げた T₁₀Y₁ 培地を用いてパルスラベル実験を行なった。1 分間でパルスラベルされた *bla* mRNA 量を培地あたりで比較すると、LCM の添加により 2 倍前後に増加していた。

遺伝子発現の制御は一般に最初の段階である転写開始時でなされることが多い。そこで LCM の転写開始に対する効果を検討した。*bla* 遺伝子に対する転写リプレッサーの存在を作業仮設とし、*bla* プロモーター領域を大腸菌細胞に投与し転写リプレッサーを結合させて、染色体に組み込んだ Tn3 の発現に対する効果を調べた。pAT153 の場合コピー数は 1 細胞あたり約 45 コピーであると言われているが、これだけの数のプロモーター領域が 1 細胞内に存在しても β -ラクタマーゼ産生量はほとんど増加しなかった。し

たがって転写リプレッサーの存在は否定的であると判断された。

また、LCM の存在により RNA ポリメラーゼが修飾を受けたり、 σ サブユニットが交換されることで、特定のプロモーターからの転写開始が選択的に促進される可能性がある。*bla* 遺伝子のプロモーターを交換して LCM の効果を調べればプロモーターに特異的な作用を検討できるが、pBR322 の場合 *bla* 遺伝子は 2 つのプロモーターから発現しているため、1 つのプロモーターを欠失させ他方のプロモーターで *bla* 遺伝子を発現させれば、欠失させたプロモーターに特異的な LCM の効果を検討することが可能である。このような目的で作成した 2 つのプラスミドからの *bla* 遺伝子発現に対する LCM の作用はどちらの場合も pBR322 とほとんど同じであった。したがって、LCM はプロモーターに特異的な転写開始の促進により *bla* mRNA の産生を増強するのではないと考えられた。

bla mRNA の半減期は、30℃ で菌の培養を行った場合、約 3 分であると報告されている²⁴⁾。37℃ においてはさらに短い半減期が予想されるので、1 分間のパルスラベルにより測定した mRNA 量は、産生量のみならず、分解量も反映していると考えられる。転写開始の促進に対する LCM の効果が否定的であるので、LCM は *bla*

mRNA 分解を抑制することにより、1 分子の mRNA から翻訳量を増加させていると推察された。

結 論

1. LCM は、*E. coli* の β -ラクタマーゼの産生を増強した。
2. この LCM の効果は、 β -ラクタマーゼ遺伝子のコピー数とは関係がない。
3. LCM によって、 β -ラクタマーゼの mRNA 量が増加していた。しかし、この現象が転写開始とは無関係であることを示唆する実験結果を得た。
4. LCM の効果は、 β -ラクタマーゼの mRNA の安定性が増加することが原因らしい。

稿を終わるに臨み、本研究の遂行のため御懇親なる御指導、御校閲を賜りました恩師金政泰弘教授に深謝いたします。また本研究の推進にあたり絶えず御援助いただきました香川医科大学微生物学講座の林 英生教授、岡部昭延助教授および教室の皆様に深く感謝の意を捧げます。

さらに菌株を快くお譲りいただきました東京大学応用微生物研究所・吉岡 泰先生、千葉大学薬学部・山本友子先生、国立遺伝学研究所・西村昭子先生に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Tedesco FJ, Stanley RJ and Alpers DH : Diagnostic features of clindamycin-associated pseudomembranous colitis. *N Eng J Med* (1974) **290**, 841—843.
- 2) Bartlett JG : Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Rev Infect Dis* (1979) **1**, 530—539.
- 3) Burdon DW, George RH, Mogg GAG, Arabi Y, Thompson H, Johnson M, Alexander-Williams J and Keighley MRB : Faecal toxin and severity of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *J Clin Pathol* (1981) **34**, 548—551.
- 4) Levner M, Wiener FP and Rubin BA : Induction of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. *Infect Immun* (1977) **15**, 132—137.
- 5) Levner MH, Urbano C and Rubin BA : Lincomycin increases synthetic rate and periplasmic pool size for cholera toxin. *J Bacteriol* (1980) **143**, 441—447.
- 6) Yoh M, Yamamoto K, Honda T, Takeda Y and Miwatani T : Effects of lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* (1983) **42**, 778—7782.
- 7) Young DB and Broadbent DA : The effect of lincomycin on exoprotein production by *Vibrio cholerae*.

- J Med Microbiol (1986) **21**, 13—17.
- 8) Honda T, Taga S, Takeda Y and Miwatani T : Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol (1981) **13**, 1—5.
 - 9) Monro RE, Fernandez-Munoz R, Celma ML and Vazquez D : Mode of action of lincomycin and related antibiotics ; in Drug Action and Drug Resistance in Bacteria. 1. Macrolide antibiotics and lincomycin, Mitsuhashi S ed, University of Tokyo Press (1971) pp305—336.
 - 10) Ross GW and O'Callaghan CH : β -Lactamase assay ; in Methods in Enzymology Hash JH ed, Academic press, New York (1975) **43**, 69—85.
 - 11) Schleif RF and Wensink PC : Practical Methods in Molecular Biology. Springer-Verlag, New York (1981) pp 43—45.
 - 12) Shaw WV : Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria ; in Methods in Enzymology Hash JH ed, Academic Press, New York (1975) **43**, 737—755.
 - 13) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J : Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
 - 14) Birnboim HC and Doly J : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research (1979) **7**, 1513—1523.
 - 15) Messing J : New M 13 vectors for cloning ; in Methods in Enzymology Wu R, Grossman L and Moldave K eds, Academic Press, New York (1983) **101**, 20—78.
 - 16) Messing J and Vieira J : A new pair of M 13 vectors for selecting either DNA strands of double digest restriction fragments. Gene (1982) **19**, 269—276.
 - 17) Jaurin B and Grundstrom T : *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamase of the penicillinase type. Proc Natl Acad Sci USA (1981) **78**, 4897—4901.
 - 18) Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH and Falkow S : Construction and characterization of new cloning vehicles. A multipurpose cloning system. Gene (1977) **2**, 98—113.
 - 19) Machida C, Machida Y, Wang H-C, Ishizaki K and Otsubo E : Repression of cointegration ability of insertion element IS1 by transcriptional readthrough from flanking regions. Cell (1983) **34**, 135—142.
 - 20) Twigg AJ and Sherratt D : Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. Nature (1980) **283**, 216—218.
 - 21) Brosius J, Cate RL and Perlmutter AP : Precise location of two promoters for the β -lactamase gene of pBR 322. S1 mapping of ribonucleic acid isolated from *Escherichia coli* or synthesized in vitro. J Biol Chem (1982) **257**, 9205—9210.
 - 22) Okabe A, Matsushita O, Katayama S and Hayashi H : Lincomycin stimulates synthesis of TEM-2 β -lactamase by *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother (1986) **30**, 82—87.
 - 23) Clewell DB : Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. J Bacteriol (1972) **110**, 667—676.
 - 24) Gabain AV, Belasco JG, Schottel JL, Chang AC and Cohen SN : Decay of mRNA in *Escherichia coli* : Investigation of the fate of specific segments of transcripts. Proc Natl Acad Sci USA (1983) **80**, 653—657.

**Mechanism of stimulation by lincomycin
of TEM β -lactamase production in *E. coli*.**

Osamu MATSUSHITA

**Department of Microbiology, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

The effect of lincomycin on the production of TEM β -lactamase by *E. coli* was studied to elucidate the mechanism of the stimulation by this antibiotic of the production of enterotoxins by certain bacteria. TEM β -lactamase was consistently measurable by a microiodometric assay. Lincomycin enhanced the activity of the enzyme encoded on the plasmid pBR322 2.4 times, while chromosomal β -galactosidase activity was inhibited. Lincomycin also stimulated the production of β -lactamase coded for by the *bla* gene integrated into the chromosome, but the antibiotic did not stimulate that of chloramphenicol acetyltransferase encoded on a ColEI-derived plasmid. The effect was independent of the copy number of the gene, suggesting that the effect takes place after transcription.

The amount of *bla* mRNA was measured by [3 H]-uridine pulse-labeling of mRNA followed by DNA-RNA hybridization. Lincomycin caused a 1.8 to 2.4-fold increase in the amount of *bla* mRNA. The possible presence of the repressor of the *bla* gene was examined by transducing the excess *bla* promoter region into *E. coli* 112-2, which carries Tn3 on its chromosome, but the repressor was not detected. The effect of *bla* promoters was examined by the construction of promoter deletion mutants of pBR322, each of which lacked one of two *bla* promoters. Lincomycin stimulated the production of β -lactamase coded by these plasmids at the same level as that coded by original pBR322, indicating that the effect was not due to increased transcription initiation. Preliminary examination of the degradation rate of *bla* transcripts showed that lincomycin increased half-life of *bla* mRNA.