

[総 説]

薬剤耐性獲得機構～グラム陰性菌を中心に～

和知野純一

名古屋大学大学院医学系研究科微生物・免疫学講座分子病原細菌学

(令和元年 11 月 5 日受付)

薬剤耐性菌の出現・拡散が医療の現場で大きな問題となっている。細菌の薬剤耐性化は、内因性の薬剤耐性化 (DNA Gyrase のアミノ酸置換によるキノロン耐性など) と外因性の薬剤耐性化 (メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子の獲得によるカルバペネム耐性など) に大別される。外因性の薬剤耐性化には、プラスミドなどの mobile element が関与しており、プラスミドの伝達 (conjugation) は、同属細菌同士はもちろん、異属細菌同士でも生じるため、薬剤耐性形質を拡散させる大きな要因となっている。その他、薬剤耐性の獲得には、transformation (形質転換) やファージによる transduction (形質導入) などが関わっているとされている。本稿では、医療現場で特に問題となっている薬剤耐性菌を例に、それらがどのような分子機構を介して薬剤耐性を獲得し、またさらに、それを拡散させるのかについて概説する。

Key words: 薬剤耐性菌, 水平伝播, プラスミド, ファージ

はじめに

細菌の薬剤耐性化は、内因性と外因性に大別される。内因性の薬剤耐性は、大腸菌のニューキノロン耐性や結核菌のリファンシミン耐性などに代表される。これらの耐性菌は、抗菌薬の標的部位に質的变化を生じさせる (多くはアミノ酸置換による) ことで、抗菌薬の親和性を失わせている。このような耐性菌は、抗菌薬の過少投与などにより、抗菌薬の濃度が耐性菌選択域 (MSW=Mutant Selection Window) にある状況下で理論的に生まれやすいとされている。

一方、細菌は、様々な薬剤耐性遺伝子を他の微生物から獲得することで薬剤耐性化することができる。また、獲得した薬剤耐性遺伝子を、さらに他の細菌へと受け渡すこともできる。このような細菌間の薬剤耐性遺伝子の受け渡しを媒介する分子機構として、微生物学清書には、1) 接合伝達 (conjugation), 2) 形質転換 (transformation), 3) 形質導入 (transduction) の3つが併記されている (図1)。しかし、薬剤耐性遺伝子の授受に際し、これら分子機構の関与は一律ではなく、腸内細菌科細菌などのグラム陰性菌においては、形質導入や形質転換よりも、プラスミドを介した接合伝達が最も頻繁に生じていると考えられる。

また、薬剤耐性遺伝子の近傍には必ず、単純トランスポゾン [Insertion Sequence : IS] や複合型トランスポゾン [Tn] などの可動性因子が存在しており、これらは、単一細菌細胞内において、薬剤耐性遺伝子の転移を可能とする (例えば、プラスミド DNA 上の薬剤耐性遺伝子が染色体 DNA 上に移

る。またはその逆)。本項では、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (以下 ESBL) 産生菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (以下 CRE), 薬剤耐性アシネトバクターなど、身近で話題性の高い薬剤耐性菌を例に、これらの耐性菌がどのような分子機構を介し、薬剤耐性遺伝子を獲得または拡散させているかを概説する。

1. 接合とプラスミド

プラスミドとは、宿主染色体とは独立して自立複製し、安定的に娘細胞に受け渡される DNA を指す。ESBL 遺伝子やカルバペネマーゼ遺伝子など、昨今、臨床現場で話題となる薬剤耐性遺伝子のほとんどがプラスミドに媒介されているといっても過言ではない。このような薬剤耐性遺伝子を抱えたプラスミドを薬剤耐性プラスミドと呼び、またさらに、複数種の薬剤耐性遺伝子を抱えたプラスミドを多剤耐性プラスミドと呼ぶ。腸内細菌科細菌、緑膿菌、アシネトバクター属菌などがもつ薬剤耐性プラスミドは環状構造であり、その大きさは数 kb から長くても数 100 kb 程度である。細菌細胞内において、大型のプラスミドのコピー数は1から数個程度、小型のプラスミドであれば、数 10 個程度と考えられている。

プラスミドの分類には IncF, IncN, IncA/C などのように表記される Incompatibility (不和合性) group が用いられる。この不和合性により、1つの細菌細胞は、複製機構が同一または類似しているプラスミドを、選択圧がない状況下では多世代に渡って安定的に保持できない (複製できないわけではない)¹⁾。つまり、仮に IncF プラスミドを2つ持ったとしても、それを安定的に娘細胞に均一分配できず、最終的には、どちらか一方のプラスミドのみを持った娘細胞ばかりになってしまうのである。Incompatibility group は従来、接合伝達性 (後述) を指標に分類されてきたが、現在では、プラスミド上に存在する複製制御関連因子 (RNAI や rep protein など) の塩基配列を調べることで決定する方法が一般的であ

著者連絡先: (〒466-8550) 名古屋市昭和区鶴舞町 65
名古屋大学大学院医学系研究科微生物・免疫学講座
分子病原細菌学
和知野純一
TEL: 052-744-2106
E-mail: wachino@med.nagoya-u.ac.jp

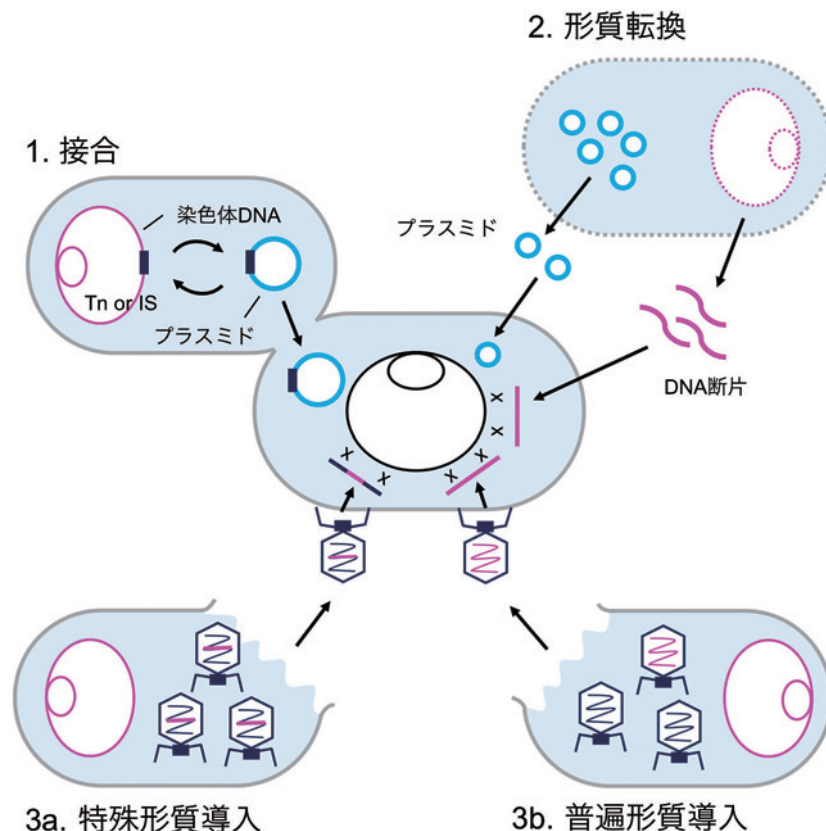


図1. 薬剤耐性遺伝子獲得機構

細菌が他の微生物から薬剤耐性遺伝子を獲得する方法として、1. 接合、2. 形質転換、3. 形質導入（特殊形質導入と普遍形質導入）の3種類が挙げられる。

（標準微生物学第12版図9-11を参照し、筆者が改変）

る²⁾。

プラスミドは菌と菌との接合により、細菌間を移動することができる。接合による遺伝子伝達概念はJoshua LederbergとEdward Tatumによって1947年に提唱された³⁾。彼らは、複数の大腸菌を混合培養すると、いずれの大腸菌とも性質の異なる大腸菌が生じることを発見し、それがDNAの交換により生じるものと予測した。しかし、当時はプラスミドが発見される以前であったため、接合によりプラスミドが移行する現象は後に確定されたものである。

細菌間を移行するプラスミドは一般的に大型で、移行するために必要な遺伝子群であるTra領域を持っている。接合によるプラスミド移行を成立させるには、プラスミドを供与する菌がプラスミドを受容する菌を認識することから始まり、1本鎖プラスミドを移行後、最終的に2本鎖に複製するという一連の工程が、全て適切なタイミングで行われなければならない。それらを担っているのがTra領域に存在する遺伝子群である。以下Tra領域に存在し、プラスミドの移行に重要ないくつかの遺伝子の機能について紹介する（図2）⁴⁾。

性線毛 (Pilus) : 性線毛は中心部に空洞を持つチューブ用の構造物（直径10 nm程度）で、プラスミド供与菌は性線毛を介して受容菌を捕捉する。性線毛の長さや柔軟性には多様性があり、その性質の違いにより、受容菌の捕捉率が変わると言われている。例えば、柔軟性が高く長い線毛は、液体

培地のような流動性の高い環境下でも受容菌を捕まえることができる。その一方で、硬く短い線毛は流動性の高い環境下では受容菌を捕捉できず、固形培地上のような流動性の低い環境下でのみ受容菌を捕まえることができる。IncIプラスミドはいずれの環境でも対応できるよう2種類の線毛を作ることができる。

チャネル (Channel) : 性線毛による捕捉の後、プラスミド供与菌と受容菌はチャネル構造部分で融合し、プラスミドを移行させる経路を作る。

Coupling protein : Coupling proteinはチャネル部分に特異的に結合し、relaxase（後述）の働きを促す。

Relaxase : RelaxaseはプラスミドのoriTと呼ばれる領域に「切れ目 (nick)」を入れ、プラスミド2本鎖DNAのうち片側1本鎖は断裂する。断裂した部分にはRelaxaseが結合し、Relaxaseを先頭に片側1本鎖DNAが受容菌に移行する。移行した1本鎖DNAはRelaxaseの働きにより再環状化する。これまでの工程により、プラスミド供与菌および受容菌に、それぞれプラスミドDNA片側1本鎖のみが存在する状態となる。この後、プラスミド供与菌および受容菌が、それぞれ別々の方法でプラスミドDNA1本鎖を2本鎖へと複製し、プラスミドの複製を終える。

プラスミド供与菌のDNA複製 : プラスミド供与菌においては、1本鎖DNAが受容菌に移行している最中に、nick部

プラスミド供与菌 プラスミド受容菌

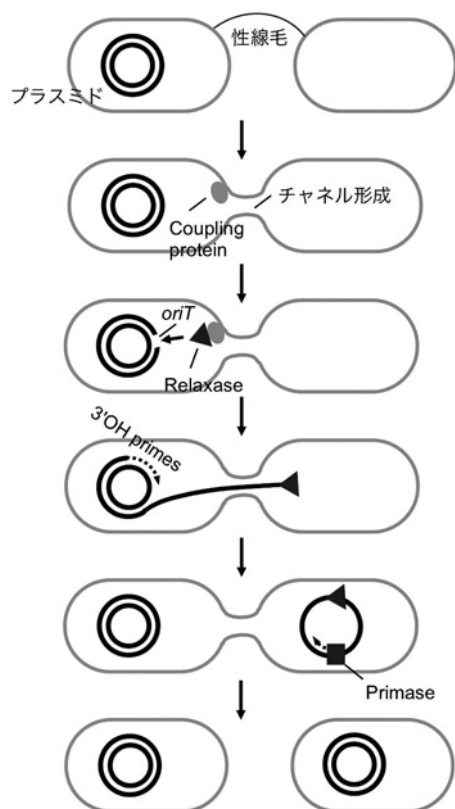


図2. 接合によるプラスミドの伝達

プラスミド供与菌が性線毛によりプラスミド受容菌を捕捉する。細胞融合によりプラスミドの通り道となるチャンネルが形成される。Coupling proteinの膜への結合がきっかけとなり、RelaxaseがoriT領域に切れ目を入れ、2本鎖DNAを断裂する。Relaxaseが1本鎖DNAを引き連れてプラスミド受容菌に移動する。プラスミド供与菌においてはローリングサイクル型様の複製様式により、nick部分から2本鎖DNAへの複製が行われる。プラスミド受容菌においては、プラスミド供与菌から供給されたPrimaseが、複製に必要なRNAプライマーを提供し、その働きにより2本鎖DNAが複製される。なお、本説明は接合現象を極めて簡略化したものであり、実際にはもっと多くのタンパク質が関与している。

(Molecular Genetics of Bacteria 2nd edition, chapter 5, Figure 5.2を参照し、筆者が改変)

分から2本鎖DNAの複製が行われる。ローリングサークル型複製である⁵⁾。

プラスミド受容菌のDNA複製：プラスミド受容菌は、プラスミドDNA一本鎖とともにプラスミド供与菌からPrimaseタンパクを受け取る。このPrimaseがDNA複製に重要な役割を果たしている。PrimaseがDNAの複製に必要なRNAプライマーを提供し、それを元に2本鎖DNAの複製が行われる。

プラスミドによる薬剤耐性遺伝子の伝達は、生体内の局所(例えば腸管など)に存在する細菌同士で起こりうる。実際に、カルバペネマーゼ遺伝子を有する腸内細菌科細菌が1人の患者から複数種分離され、詳しく調べてみると、それらが同じプラスミドを有していたとの報告もある⁶⁾。これは、患

者体内に存在する腸内細菌科細菌同士で、プラスミドの伝達が生じた結果と考えられる。また、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子をコードした単一のプラスミドが、複数種の腸内細菌科細菌に広がり、さらにそれが複数の患者に広がる事例も本邦で報告されている⁷⁾。筆者らも、CMY-9β-ラクタマーゼ遺伝子(セファロsporin耐性遺伝子の一種)を有する単一のプラスミドが*Escherichia coli*や*Klebsiella pneumoniae*に水平伝播した事例を経験した(図3)。さらに問題なことに、本事例では、一部のCMY-9遺伝子が遺伝子変異を起こし、CMY-19へと進化していた(遺伝子変異により第4世代セファロsporinを分解するようになった)。プラスミドが菌種を超えて拡散し、さらにその過程において、β-ラクタマーゼが分子進化を遂げた例であった。このように、薬剤耐性プラスミドを有する細菌が長期間にわたり検出される事例においては、最終的に、薬剤耐性遺伝子そのものの進化まで起こりうるので注意が必要である。次世代シーケンサーの普及により、プラスミドの分子生物学的な解析は、一部の大学や研究所では容易になったものの、残念ながら、微生物検査室で実施するのは現状難しい。しかし、薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドの水平伝達は実際に生じうることであり、それらを念頭に入れた上で、薬剤耐性菌の検査や対策にあたる必要があるものと思われる。

2. 形質転換

形質転換とは、微生物が他の微生物から放出されたDNAを直接取り込む現象を指す。大腸菌は、化学物質で菌体进行处理することにより形質転換を起こすようになるが、通常、形質転換能を持たない。一方、肺炎球菌、インフルエンザ菌、淋菌、*Helicobacter pylori*などの菌種には、生来、能動的に外来性DNAを取り込む能力が備わっているため、これらの菌種は自然形質転換能を有する⁸⁾。本稿では淋菌を例に概説する。

淋菌またはその近縁のナイセリア属菌のDNAが、溶菌や4型分泌装置などにより菌体外に放出されたとする(図4)⁹⁾。そのようなDNAは、淋菌の菌体表面に存在する線毛関連タンパク質群(PilやComなどと名づけられるタンパク質群)に付着後、細胞質内に取り込まれる。取り込まれたDNAが2本鎖DNAであった場合、RecBCDタンパクの働きにより1本鎖となる。取り込まれた1本鎖DNAはRecAタンパクの働きにより、宿主DNAと組換えを起こす。この組換えは相同組換えであるため、取り込まれたDNAの塩基配列が、宿主DNAの塩基配列にある程度似ていなければならない。このことは、自然形質転換を介して置き換えられるDNAは、宿主からみて遺伝的に近縁菌種のDNAであることが多いことと関係している。

近年、セフトリアキソンなどの広域セファロsporinに耐性を獲得した淋菌の出現が大きな問題となっている¹⁰⁾¹¹⁾。淋菌のセフトリアキソン耐性機構は、淋菌が他のナイセリア属菌から、ペニシリン結合タンパク質(penicillin-binding protein 2)をコードするpenA遺伝子を自然形質転換により獲得したためと言われている¹²⁾。Igawaらは、淋菌が*Neisseria cinerea*(セフトリアキソンMIC, 1.0 μg/mL)のpenA遺伝子を獲得することで、セフトリアキソン耐性(セフトリア

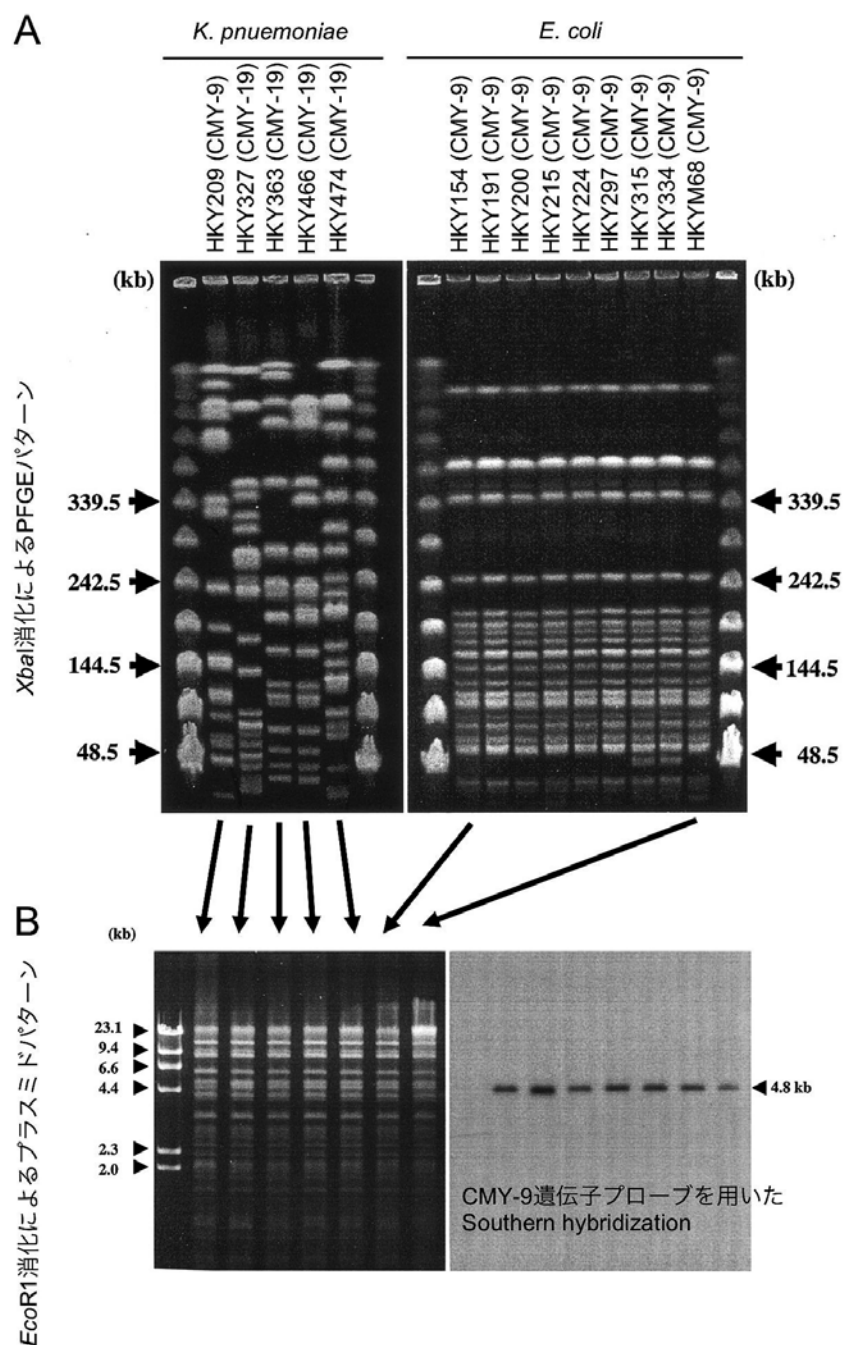


図3. 薬剤耐性プラスミドの水平伝播の1例

E. coli の PFGE パターン (A 右) により単一菌株の水平伝播が示唆された。さらに同時期に分離された *K. pneumoniae* を調べたところ、PFGE パターンは異なった (A 左)。これら *E. coli* および *K. pneumoniae* が持つプラスミドを調べたところ、*EcoRI* による切断パターンが同じであった (B 左)。また、CMY-9 遺伝子プローブを用いた Southern hybridization を行なったところ、全ての検体で同じ位置にシグナルが観察された。これらの結果から、菌種を超えた薬剤耐性プラスミドの水平伝播が生じた可能性が強く示唆された。さらに、一部の CMY-9 遺伝子が CMY-19 遺伝子へと変化していた。

(Wachino et al. Antimicrob Agents Chemother. 2006. 50 : 534-41. Figure 2, 4 を引用し、筆者が改変)

キソン MIC, 0.016 µg/mL から 1 µg/mL に上昇) を示すようになったことを報告している¹³⁾。

3. 形質導入とファージ

ファージとは正式にはバクテリオファージと呼ばれるものであり、細菌に感染するウイルスを指す。ファージはその感染様式の違いにより、ビルレントファージとテンペレート

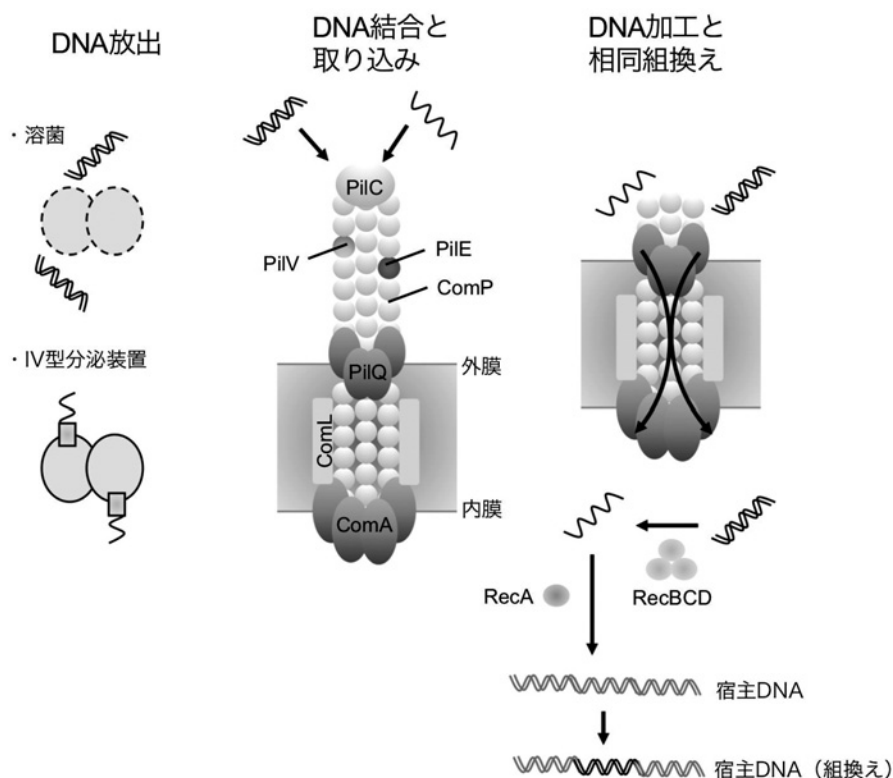


図4. ナイセリア属菌をモデルとした形質転換

ナイセリア属菌が溶菌やIV型分泌装置によりDNAを菌体外に放出、そのDNAが淋菌のIV型線毛(PilやComといった複数のタンパク質で構成されている)に付着することをきっかけに、DNAが細胞質側に取り込まれる。取り込まれるDNAには目印(DUS配列と呼ばれる)があり、淋菌はDUS配列を持つDNAを効率よく取り込む。取り込まれたDNAが2本鎖であった場合、RecBCDタンパクの働きにより1本鎖DNAとなる。1本鎖DNAはRecAタンパクの働きにより淋菌のDNAと相同組換えを起こす。なお、本説明は形質転換を簡略化して説明したものであり、実際にはもっと多くのタンパク質が関与している。

(Hamilton et al. Mol Microb. 2006. 59: 376-85. Figure 1を参照し、筆者が改変)

ファージの2種類に分類される。そして、ファージは遺伝子運ぶ媒体としての役割をもっており、ファージを介して遺伝子が伝達される現象を形質導入と呼ぶ。

形質導入は①特殊形質導入(specialized transduction)と②普遍形質導入(generalized transduction)に大別される。①特殊形質導入とはファージ(プロファージ)が宿主細菌の染色体DNAから離脱する際に、ファージ関連遺伝子とともに、近傍に存在する宿主遺伝子をファージ粒子にpackingし、そのようなファージが感染した細菌に、ファージの遺伝子とともに宿主遺伝子の一部が伝達される現象を指す。一方、②普遍形質導入についてであるが、これもファージが宿主遺伝子をファージ粒子中にpackingするという点においては、特殊形質導入と同じである。しかし、普遍形質導入においてpackingされるDNAは、ファージ関連遺伝子またはその近傍の宿主遺伝子である必要はなく、全宿主遺伝子領域に及ぶ。

さて、上述のようにファージが重要な遺伝子媒体であることは古くからわかっているものの、それにより臨床分離グラム陰性菌の薬剤耐性遺伝子が伝達したという現象を示した文献はほとんどなく、CTX-M ESBL 遺伝子の転移にファージが関与している可能性を示唆する報告がある程度である¹⁴⁾。2016年、Krahnらは *Acinetobacter baumannii* の染色体DNA上にある *bla_{NDM-1}* が、別の *A. baumannii* の染色体DNA

上に転移する現象を実験的に確認し、それを媒介する分子機構としてファージが関与している可能性を強く示唆した¹⁵⁾。しかし、実際にファージの関与を裏付ける実験データは示されていない。

筆者らは最近、臨床で分離された薬剤耐性 *A. baumannii* をモデルに、ファージを介した普遍形質導入により、染色体DNA上に点在する様々な薬剤耐性遺伝子が、他の *A. baumannii* の染色体DNAに伝達する現象を実験的に確認した¹⁶⁾。簡単に述べると、薬剤耐性 *A. baumannii* に潜むプロファージが、ファージ粒子に宿主 *A. baumannii* 由来の薬剤耐性遺伝子をpackingし、それを他の *A. baumannii* に渡すという現象である。外見は普通のファージと何ら変わりはないが、中身は薬剤耐性遺伝子という少し変わったファージ粒子が低頻度ながら存在することも明らかにした。普遍形質導入による薬剤耐性遺伝子伝達モデルの概略を図5に示す。薬剤耐性遺伝子を含んだファージ粒子が、他の *A. baumannii* に感染すると、薬剤耐性遺伝子が *A. baumannii* の菌体内に注入され、さらに、相同組換え(DNAの塩基配列が良く似た部分で生じる組換え)により染色体DNA上に挿入される。このようにファージを介して、ある種の薬剤耐性遺伝子が、薬剤耐性 *A. baumannii* から薬剤感受性 *A. baumannii* へと伝達されると、新たな薬剤耐性 *A. baumannii* が出現すること

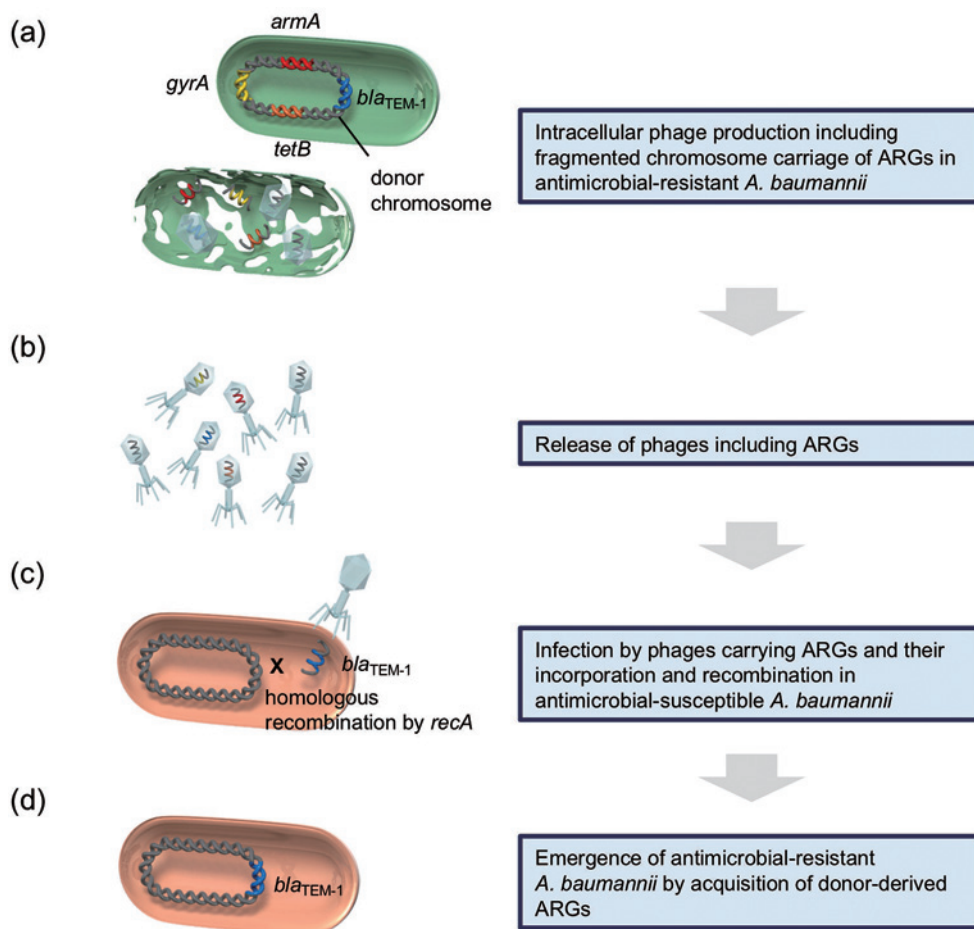


図5. *A. baumannii* をモデルとした普遍形質導入による薬剤耐性遺伝子の水平伝播

(a) ファージが産生される際に、薬剤耐性遺伝子を含む DNA がファージ粒子内に取り込まれる。(b) 薬剤耐性遺伝子を含むファージが放出される。(c) ファージが別の *A. baumannii* に感染し、DNA を注入。注入された薬剤耐性遺伝子含有 DNA 断片は、RecA タンパク質の働きにより、染色体ゲノム DNA の一部領域と相同組換えを起こす (homologous recombination)。(d) 薬剤耐性を獲得した *A. baumannii* が出現する。

(Wachino et al. Antimicrob Agents Chemother. 2019. 63 : e00334-19. Figure 7 を引用)

になる。筆者らの実験では、アミノグリコシド耐性に関わる 16S rRNA methyltransferase *armA* 遺伝子、β-ラクタマーゼ遺伝子である *bla_{TEM-1}*、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet* (B) がファージを介した普遍形質導入により伝達した。その他、筆者らが実験レベルで確認した普遍形質導入による薬剤耐性伝達現象には、以下のような特徴が見られた。

- 1) 伝達する DNA 断片は 30-kb 前後と長く、その中に複数種の薬剤耐性遺伝子が含まれた場合、一度に複数の抗菌薬に対する耐性が移行した。
- 2) ファージの感染は種特異性が高く、筆者が用いた実験系において、ファージを介した薬剤耐性遺伝子伝達現象は *A. baumannii* 間でのみ生じた。
- 3) 染色体 DNA 上に存在するあらゆる薬剤耐性遺伝子が伝達する。その中には *gyrA* (キノロン耐性) など、細菌が増殖する上で必須となる遺伝子も含まれた。

ところで、上述したファージを介した薬剤耐性遺伝子伝達現象は、臨床で分離される薬剤耐性菌の中でどの程度生じているのだろうか？実際に、臨床で分離された薬剤耐性菌をモ

デルに、ファージを介した薬剤耐性遺伝子伝達現象を研究面から証明した例はまだまだ少ない。しかしながら、近年、ファージがリザーバーとなって薬剤耐性遺伝子を拡散させている可能性を示唆する報告が相次いでいる。例えば、嚢胞性緑線症患者の喀痰から薬剤耐性緑膿菌が分離された場合、その喀痰中には、薬剤耐性遺伝子を内包するファージが多数存在しているとの報告がある¹⁷⁾。また、高濃度の薬剤耐性菌に汚染された下水中にも薬剤耐性遺伝子を抱えたファージが多数存在しているとの報告もある¹⁸⁾。このような背景から、薬剤耐性菌が高密度に存在する環境には、薬剤耐性遺伝子を抱えたファージが多数おり、それが循環することで、様々な環境に薬剤耐性遺伝子を運んでいるのではないかと仮説が提唱されている¹⁹⁾。また、DNA は剥き出しの状態よりも、ファージに内包されることで、環境中で安定して存在、運搬されるようになっているのではないかと説も存在する。

これまで、薬剤耐性遺伝子の拡散を助長する分子機構としてプラスミドが主要な役割を果たしていると考えられてきた。その事実が変わりはないと思われるが、周知のように薬剤耐性

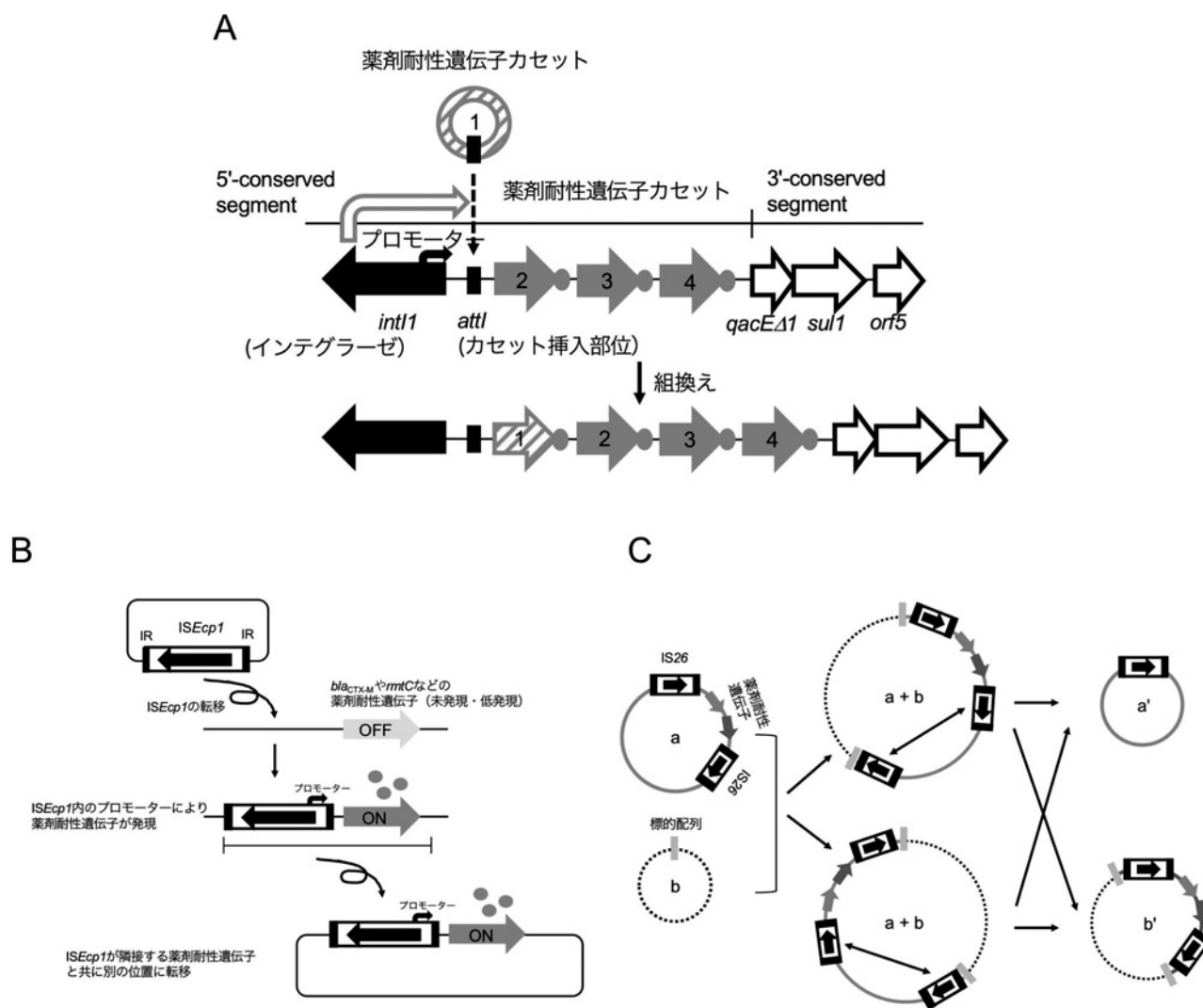


図 6. インテグロンとトランスポゾン

(A) インテグロン：薬剤耐性遺伝子カセットの挿入および脱落を担っているのがインテグラーゼ (*intI1*) である。(B) ISEcp1：ISEcp1 は単体で転移することができ、薬剤耐性遺伝子の近傍に挿入されると、その薬剤耐性遺伝子が発現するようになる。また、ISEcp1 は隣接する薬剤耐性遺伝子と共に転移することもできる。(C) IS26：IS26 に挟まれる領域は composite transposon (以下 CT) と呼ばれる。仮にプラスミド a に CT があった場合、その CT は別のプラスミド b の標的配列に転移することができる。2つのプラスミドは中間体を形成し、その後、IS26 を起点とした相同組換えを起こすことで薬剤耐性遺伝子が脱落したプラスミド a' と薬剤耐性遺伝子を獲得したプラスミド b' に分かれる。(筆者作成)

遺伝子は染色体 DNA 上にも存在する。染色体 DNA 上に存在する薬剤耐性遺伝子は一見可動性に乏しいように見えるが、もしかすると上述したファージを介して、我々が考えている以上に高頻度で細菌間を移動しているのかもしれない。

4. インテグロン

インテグロンとは、薬剤耐性遺伝子集積装置のようなものである²⁰⁾。細菌は、多種多様な薬剤耐性遺伝子を整然とインテグロンに集積させることで、効率よく多種類の薬剤に対する耐性を獲得することができる。インテグロンには5つの型があり、腸内細菌科細菌から発見されるのは1, 2, 3型で、その中でも圧倒的に1型が多い。4, 5型はビブリオ属菌から見つかっている。

クラス1型インテグロンの基本構造を図6Aに示す。クラ

ス1型インテグロンは *intI1* (5'-conserved segment ; 5'-CS), 薬剤耐性遺伝子カセット群, *qacEΔ1-sul1-orf5* (3'-conserved segment ; 3'-CS) の3つの基本部位で構成されている。*intI1* (インテグラーゼ) はインテグロン内の薬剤耐性遺伝子の出し入れを担っている遺伝子である。環状化した薬剤耐性遺伝子カセットを捕捉し、*attI* と呼ばれる領域に、その薬剤耐性遺伝子カセットを挿入する。これを複数回繰り返すと、多種多様な薬剤耐性遺伝子カセットを整然と配置することができる。これまでに発見されたインテグロンは、5つ以下の薬剤耐性遺伝子カセットを保有しているものがほとんどであるが、中には9つの遺伝子カセットを抱えたものも発見されている。また、不要になった? 遺伝子カセットをインテグロンから外すこともできる。さらに、*intI1* にはもう1つ大きな役割がある。それは、薬剤耐性遺伝子を発現させる動力源、

いわゆるプロモーター領域を含んでいることである。一般的に *intII* 遺伝子に一番近い薬剤耐性遺伝子が多く発現し、遠ざかるにつれてその発現量は低下するとされている（例外的に自前のプロモーターを有する薬剤耐性遺伝子カセットも存在する）。薬剤耐性遺伝子カセット群の後ろには、不完全な消毒薬耐性遺伝子である *qacEΔ1*、スルホンアミド耐性遺伝子である *sul1*、機能不明の遺伝子である *orf5* が存在する。しかし、現在発見されるクラス1型インテグロンは他の遺伝子により侵食を受けており、必ずしも5'-CS、遺伝子カセット群、3'-CSの基本構造を有しているわけではない。

さて、本邦で分離される薬剤耐性菌とインテグロンとの関わりに着目してみると、IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)遺伝子が思い浮かぶ。IMP MBL遺伝子は本邦で分離されるCREの主要なカルバペネム耐性機構である。IMP-1 MBL遺伝子は1991年に愛知県で分離されたカルバペネム耐性 *Serratia marcescens* から初めて発見された²¹⁾。この *S. marcescens* から見つかったIMP MBL遺伝子は、クラス1型インテグロンの薬剤耐性遺伝子カセットとして報告された²²⁾。その後、世界的に見て極めて稀なことであるが、1990年頃から2000年頃までに本邦で報告されたIMP MBL遺伝子の多くが、クラス3型インテグロンに関連しており、しかも、腸内細菌科細菌の中でも *S. marcescens* が大部分を占めていた²³⁾。2000年以降、IMP-1 MBL遺伝子は徐々に *E. coli* など他の腸内細菌科細菌にも散見されるようになり、現在、国内の腸内細菌科細菌から見つかるIMP MBL遺伝子はクラス1型インテグロンに担われている場合が多いようである。

また、クラス1型インテグロンに関連する重要なカルバペネマーゼ遺伝子としてGES型β-ラクタマーゼ遺伝子がある。GES型β-ラクタマーゼは、セリン型β-ラクタマーゼの1種で、当初はESBLの1つとして報告された²⁴⁾。その後、170番目のアミノ酸がグリシンからアスパラギンに置換することで、カルバペネム系薬を分解する性質を帯びたGES-2が報告され、カルバペネマーゼとしても認識されるようになった²⁵⁾。筆者らも、過去に、GES型β-ラクタマーゼを産生する *K. pneumoniae* が国内医療機関のNICUで水平伝播した例を経験した²⁶⁾。当時、6株の *K. pneumoniae* が分離されたが、5株がGES-3 (ESBL型) を産生し、1株がGES-4 (カルバペネマーゼ型) を産生していた。GES-3産生株のイミペネムのMICが0.25 μg/mLである一方で、GES-4産生株のMICは8 μg/mLであった²⁷⁾。GES-4は、GES-3の170番目のアミノ酸がグリシンからセリンに置換したものであり、アミノ酸置換によりカルバペネム分解活性を獲得したものと考えられた。本事例は、1年にわたりNICUで分離されたGES型β-ラクタマーゼ産生 *K. pneumoniae* を解析したものである。先に紹介したCMY-9遺伝子の水平伝播の事例同様、長期間、薬剤耐性菌が存在するような状況下では、薬剤耐性遺伝子が水平伝播しながら分子進化をも起こすので注意が必要である。

5. トランスポゾン

トランスポゾンとは、細菌細胞内の染色体やプラスミドDNA上の別の位置に転移する能力を持った可動性因子を指す。トランスポゾンの転移様式には、①カットアンドペースト型（トランスポゾンは痕跡を残さずに移動）と②カットア

ンドコピー型（トランスポゾンがコピーを残して移動）がある。さらに、トランスポゾンは構造的特徴から単純トランスポゾン (IS, Insertion sequence) と複合型トランスポゾン (Tn) に別れる。トランスポゾンは非常に多様性に富んでおり、全てを紹介出来かねるので、腸内細菌科細菌やアシネトバクター属菌などが有する主要な薬剤耐性遺伝子と関連するものについてのみいくつか概説する。

ISEcp1: ISEcp1はInsertion sequenceの1つであり、ESBL遺伝子である *bla*_{CTX-M}、カルバペネマーゼ遺伝子である *bla*_{OXA-181}、16S rRNA methyltransferase である *rmtC*、キノロン耐性遺伝子である *qnrB* など多様な薬剤耐性遺伝子と関わりのあるトランスポゾンである^{28)~31)}。ISEcp1の基本構造を図6Bに示す。ISEcp1は全長1,656-bpであり、両端に14 bp Inverted repeat (IR) を有する。IRからIRまでが1つの可動ユニットである。ISEcp1は近傍に様々な薬剤耐性遺伝子を持っていることが多い。それは、ISEcp1が単体で薬剤耐性遺伝子の近傍に飛び込んだ結果であり、おもしろいことに、さらにそこから再度離脱する際には、隣接する薬剤耐性遺伝子を連れ出すことができる。このようにしてISEcp1は隣接する薬剤耐性遺伝子とともにDNA上を移動しているものと考えられる。ISEcp1にはもう一つ大きな役割がある。それは隣接する薬剤耐性遺伝子の動力源、つまりプロモーター領域を提供することである²⁸⁾。ISEcp1の存在により、隣接する薬剤耐性遺伝子は、可動性と動力源を獲得することができる。

IS26: 様々な菌種の薬剤耐性プラスミド上で最もよく見つかるInsertion sequenceであり、1つのプラスミド上に複数個あることも稀ではない。図6CのようにIS26によって挟まれた領域はComposite transposon (以下CT) と呼ばれる構造をとる。たとえばCTがプラスミドAにのっていた場合、このCTはプラスミドBの標的配列に移動することができる。これはAとBのプラスミドがIS26と標的配列を境に一時的に結合し（その際、IS26と標的配列が1つずつ余分に複製される）、その後、IS26を基準に相同組換えを起こすことで成立する。IS26がさらに複数個存在する場合には、これらの挙動がもっと複雑化する。このようにIS26を中心に多様な遺伝子アレンジメントが薬剤耐性菌の中で生じていると考えられる。IS26を介したDNAの再編成様式は多様なため、詳細は文献を参考にして頂きたい³²⁾。

ISAbal: ISAbalは *A. baumannii* が持つInsertion sequenceである。ISAbalもISEcp1同様、プロモーター領域を含んでいる。*A. baumannii* は染色体ゲノム上に *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子を持っているが、通常、発現していない。*bla*_{OXA-51-like} 遺伝子の近傍にISAbalが挿入されると、そのプロモーター活性によりOXA-51-like β-ラクタマーゼが産生されるようになり、カルバペネムに耐性を示すようになる³³⁾。

6. 細胞外膜小胞 (outer membrane vesicle)

細胞外膜小胞 (outer membrane vesicle: 以下OMV) とは、細菌が外膜を外側に隆起させ、袋状の塊として放出する物体を指す³⁴⁾。OMVの中には、DNAやRNAなどの核酸、毒素や各種タンパク質、低分子シグナルなど、菌が作り出すあらゆる物質が含まれており、細菌の生存戦略上、有利な状

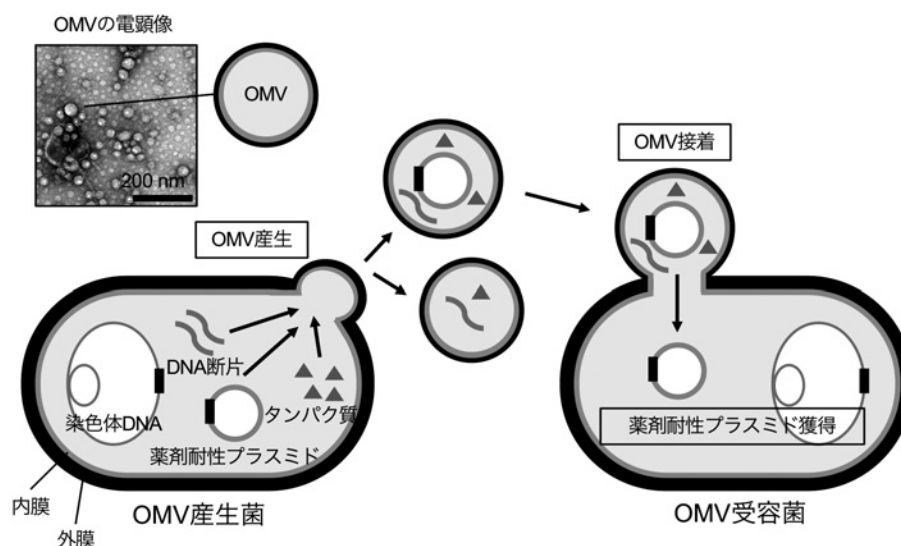


図7. OMV を介した薬剤耐性プラスミドの伝達

OMV は細菌が産生する膜小胞であり、DNA、RNA、タンパク質など様々な細菌由来成分を含む。OMV の中に小型のプラスミドが内包され、OMV が他の細菌に接触することをきっかけに、プラスミドが他の細菌に取り込まれることがある。プラスミドに薬剤耐性遺伝子が存在した場合、プラスミドを受けとった細菌は、薬剤耐性化する。(筆者作成)

表1. 薬剤耐性遺伝子とその起源

遺伝子名	耐性機構	耐性の種類	起源	文献
<i>bla</i> CTX-M-1-group	ESBL	セファロスポリン耐性	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	(37)
<i>bla</i> CTX-M-2-group	ESBL	セファロスポリン耐性	<i>Kluyvera ascorbata</i>	(37)
<i>bla</i> CTX-M-8-group	ESBL	セファロスポリン耐性	<i>Kluyvera georgiana</i>	(37)
<i>bla</i> CTX-M-9-group	ESBL	セファロスポリン耐性	<i>Kluyvera georgiana</i>	(37)
<i>bla</i> CTX-M-25-group	ESBL	セファロスポリン耐性	<i>Kluyvera georgiana</i>	(37)
<i>bla</i> CMY-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Aeromonas hydrophila</i>	(38)
<i>bla</i> CMY-2	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Citrobacter freundii</i>	(38)
<i>bla</i> MIR-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Enterobacter cloacae</i>	(38)
<i>bla</i> MOX-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Aeromonas hydrophila</i>	(38)
<i>bla</i> LAT-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Citrobacter freundii</i>	(38)
<i>bla</i> FOX-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Aeromonas caviae</i>	(38)
<i>bla</i> DHA-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Morganella morganii</i>	(38)
<i>bla</i> ACT-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Enterobacter asburiae</i>	(38)
<i>bla</i> ACC-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Hafnia alvei</i>	(38)
<i>bla</i> CFE-1	Cepharospolinase	セファロスポリン耐性	<i>Citrobacter freundii</i>	(38)
<i>bla</i> OXA-48-like	Carbapenemase	カルバペネム耐性	<i>Shewanella</i> spp.	(39)
<i>fosA3</i>	Glutathione-S-transferase	ホスホマイシン耐性	<i>Kluyvera georgiana</i>	(40)
<i>fosA4</i>	Glutathione-S-transferase	ホスホマイシン耐性	<i>Kluyvera georgiana</i>	(41)
<i>fosA8</i>	Glutathione-S-transferase	ホスホマイシン耐性	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	(42)
<i>npmA</i>	16S rRNA methyltransferase	アミノグリコシド耐性	<i>Clostridioides difficile</i>	(43)
<i>mcr-1</i>	Phosphoethanolamine transferase	コリスチン耐性	<i>Moraxella</i> spp.	(44)
<i>mcr-2</i>	Phosphoethanolamine transferase	コリスチン耐性	<i>Moraxella pluranimalium</i>	(45)
<i>mcr-3</i>	Phosphoethanolamine transferase	コリスチン耐性	<i>Aeromonas</i> spp.	(46, 47)
<i>mcr-4</i>	Phosphoethanolamine transferase	コリスチン耐性	<i>Shewanella frigidimarina</i>	(48)
<i>mcr-9</i>	Phosphoethanolamine transferase	コリスチン耐性	<i>Buttiauxella</i> spp.	(49)
<i>qnrA1</i>	Quinolone resistance protein	キノロン耐性	<i>Shewanella algae</i>	(50)
<i>qnrS1</i>	Quinolone resistance protein	キノロン耐性	<i>Vibrio splendidus</i>	(51)
<i>qnrC</i>	Quinolone resistance protein	キノロン耐性	<i>Vibrio orientalis/V. cholerae</i>	(52)
<i>qnrB</i>	Quinolone resistance protein	キノロン耐性	<i>Citrobacter</i> spp.	(53)

況を作り出すとされている。最近, 多剤耐性アシネトバクターが, *bla*_{NDM-1} や *bla*_{OXA-24} といったカルバペネマーゼ遺伝子を有するプラスミドを, OMV に内包し, それを細胞外に放出, 薬剤感性アシネトバクターがプラスミドを含んだ OMV を受け取ることで, カルバペネムに耐性化するという現象が確認された (図 7)³⁵⁾³⁶⁾。プラスミドを介した薬剤耐性遺伝子伝達機構として新たな発見となった。

7. 外来性薬剤耐性遺伝子の起源

*bla*_{IMP} や *bla*_{NDM} といったメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子, *bla*_{KPC} や *bla*_{GES-5} などのセリン型カルバペネマーゼ遺伝子, *bla*_{CMY} や *bla*_{DHA} といったセファロスポリナーゼ遺伝子, *bla*_{CTX-M} などの ESBL 遺伝子, 2019 年現在, これら薬剤耐性遺伝子がグラム陰性菌に広く拡散しているのは事実である。ところで, これら薬剤耐性遺伝子はどこからやってきたのであろうか? 近年のゲノム解析技術の発展により, その起源が一部明らかになってきた。一覧を表 1 にまとめた。いくつかの薬剤耐性遺伝子は, ある細菌種の染色体ゲノム DNA 上に普遍的に保持されており, 本稿で紹介した様々な遺伝子伝達システムを介して, 腸内細菌科細菌などのグラム陰性菌に取り込まれたものと考えられる。*bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} などは, 発見からかなりの時間が経過しているが, 未だその起源は明らかにされていない。

おわりに

今回, グラム陰性菌の薬剤耐性獲得とそれを司る遺伝子獲得機構について, 筆者のこれまでの研究成果を踏まえながら紹介させて頂いた。21 世紀に入っても, 依然として新しい薬剤耐性グラム陰性菌が出現している。薬剤耐性遺伝子の機能解析や, その転移に関わる分子機構については, 基礎研究レベルで今後も継続的に解析を行っていく必要があるものと考えられる。さいごに, 執筆の機会を与えてくださった日本臨床微生物学会雑誌編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

利益相反: 報告すべき利益相反はありません。

文 献

- 橋下義輝. 2011. pUC プラスミドにまつわるエトセトラ. 生物工学基礎講座—バイオよもやま話 10: 609-613.
- Villa, L, A Carattoli. 2020. Plasmid Typing and Classification. *Methods Mol Biol* 2075: 309-321.
- Tatum, EL, J Lederberg. 1947. Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 53: 673-684.
- Snyder, L, W Champness. 2002. Conjugation. p. 187-216, *Molecular Genetics of Bacteria* 2nd edition ASM press. .
- 中込 治, 神谷 茂. 2015. 標準微生物学第 12 版.
- Richter, SN, I Frasson, C Bergo, et al. 2011. Transfer of KPC-2 Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: first case in Europe. *J Clin Microbiol* 49: 2040-2042.
- 安部朋子, 永田由美, 松井真理, 他. 2017. プラスミド水平伝達を介し多菌種へ耐性伝播した IMP-1 メタロ-β-ラクタ

マーゼ産生腸内細菌科細菌による院内感染事例. *日本臨床微生物学雑誌* 27: 158-167.

- Snyder, L, W Champness. 2002. Transformation. p. 187-216, *Molecular Genetics of Bacteria* 2nd edition ASM press.
- Hamilton, HL, JP Dillard. 2006. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* 59: 376-385.
- Ison, CA, K Town, C Obi, et al. 2013. Decreased susceptibility to cephalosporins among gonococci: data from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP) in England and Wales, 2007-2011. *Lancet Infect Dis* 13: 762-768.
- Ohnishi, M, T Saika, S Hoshina, et al. 2011. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg Infect Dis* 17: 148-149.
- Ohnishi, M, Y Watanabe, E Ono, et al. 2010. Spread of a chromosomal cefixime-resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1060-1067.
- Igawa, G, Y Yamagishi, KI Lee, et al. 2018. *Neisseria cinerea* with High Ceftriaxone MIC Is a Source of Ceftriaxone and Cefixime Resistance-Mediating *penA* Sequences in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
- Oliver, A, TM Coque, D Alonso, et al. 2005. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1567-1571.
- Krahn, T, D Wibberg, I Maus, et al. 2016. Intraspecies Transfer of the Chromosomal *Acinetobacter baumannii* *bla*_{NDM-1} Carbapenemase Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 3032-3040.
- Wachino, JL, W Jin, K Kimura, et al. 2019. Intercellular Transfer of Chromosomal Antimicrobial Resistance Genes between *Acinetobacter baumannii* Strains Mediated by Prophages. *Antimicrob Agents Chemother* 63 (8): e00334-19.
- Brown-Jaque, M, L Rodriguez Oyarzun, T Cornejo-Sanchez, et al. 2018. Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Front Microbiol* 9: 856.
- Colomer-Lluch, M, J Jofre, M Muniesa. 2014. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 69: 1265-1274.
- Calero-Cáceres, W, M Ye, JL Balcázar. 2019. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology* 27: 570-577.
- Gillings, MR. 2014. Integrins: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 257-277.
- Osano, E, Y Arakawa, R Wacharotayankun, et al. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 71-78.
- 荒川宜親. 2003. 広域 β-ラクタム薬耐性に関与する β-ラク

- タマーゼの特徴と遺伝的相関. 日本臨床微生物学雑誌 13: 150-161.
- 23) Senda, K, Y Arakawa, S Ichiyama, et al. 1996. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. J Clin Microbiol 34: 2909-2913.
 - 24) Poirel, L, I Le Thomas, T Naas, et al. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 44: 622-632.
 - 25) Poirel, L, GF Weldhagen, T Naas, et al. 2001. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 45: 2598-2603.
 - 26) Wachino, J, Y Doi, K Yamane, et al. 2004. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. Antimicrob Agents Chemother 48: 1960-1907.
 - 27) Wachino, J, Y Doi, K Yamane, et al. 2004. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G 170S substitution in the omega-loop. Antimicrob Agents Chemother 48: 2905-2910.
 - 28) Wachino, J, K Yamane, K Kimura, et al. 2006. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcp1*. Antimicrob Agents Chemother 50: 3212-3215.
 - 29) Poirel, L, JW Decousser, P Nordmann. 2003. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) β -lactamase gene. Antimicrob Agents Chemother 47: 2938-2945.
 - 30) Potron, A, P Nordmann, E Lefeuvre, et al. 2011. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 55: 4896-4899.
 - 31) Cattoir, V, P Nordmann, J Silva-Sanchez, et al. 2008. *ISEcp1*-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 52: 2929-2932.
 - 32) He, S, AB Hickman, AM Varani, et al. 2015. Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. MBio 6: e00762.
 - 33) Turton, JF, ME Ward, N Woodford, et al. 2006. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 258: 72-77.
 - 34) 渡部邦彦. 2016. 細菌が放出する膜小胞 (Membrane Vesicle) の機能と生合成機構そして応用に向けた研究動向. 化学と生物 54: 720-725.
 - 35) Chatterjee, S, A Mondal, S Mitra, et al. 2017. *Acinetobacter baumannii* transfers the *bla_{NDM-1}* gene via outer membrane vesicles. J Antimicrob Chemother 72: 2201-2207.
 - 36) Rumbo, C, E Fernandez-Moreira, M Merino, et al. 2011. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 55: 3084-3090.
 - 37) Canton, R, JM Gonzalez-Alba, JC Galan. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol 3: 110.
 - 38) Jacoby, GA. 2009. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev 22: 161-182, Table of Contents.
 - 39) Tacao, M, S Araujo, M Vendas, et al. 2018. *Shewanella* species as the origin of *bla_{OXA-48}* genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. Int J Antimicrob Agents 51: 340-348.
 - 40) Ito, R, MP Pacey, RT Mettus, et al. 2018. Origin of the plasmid-mediated fosfomycin resistance gene *fosA3*. J Antimicrob Chemother 73: 373-376.
 - 41) Rodriguez, MM, B Ghiglione, P Power, et al. 2018. Proposing *Kluyvera georgiana* as the Origin of the Plasmid-Mediated Resistance Gene *fosA4*. Antimicrob Agents Chemother 62.
 - 42) Poirel, L, X Vuillemin, N Kieffer, et al. 2019. Identification of FosA8, a plasmid-encoded fosfomycin resistance determinant from *Escherichia coli* and its origin in *Leclercia adecarboxylata*. Antimicrob Agents Chemother doi: 10.1128/AAC.01403-19.
 - 43) Marsh, JW, MP Pacey, C Ezeonwuka, et al. 2019. *Clostridioides difficile*: a potential source of NpmA in the clinical environment. J Antimicrob Chemother 74: 521-523.
 - 44) Kieffer, N, P Nordmann, L Poirel. 2017. *Moraxella* Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. Antimicrob Agents Chemother 61.
 - 45) Poirel, L, N Kieffer, JF Fernandez-Garayzabal, et al. 2017. MCR-2-mediated plasmid-borne polymyxin resistance most likely originates from *Moraxella pluranimalium*. J Antimicrob Chemother 72: 2947-2949.
 - 46) Ling, Z, W Yin, H Li, et al. 2017. Chromosome-Mediated mcr-3 Variants in *Aeromonas veronii* from Chicken Meat. Antimicrob Agents Chemother 61.
 - 47) Eichhorn, I, C Feudi, Y Wang, et al. 2018. Identification of novel variants of the colistin resistance gene mcr-3 in *Aeromonas* spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions. J Antimicrob Chemother 73: 1217-1221.
 - 48) Carattoli, A, L Villa, C Feudi, et al. 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill 22.
 - 49) Kieffer, N, G Royer, JW Decousser, et al. 2019. mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. Antimicrob Agents Chemother 63.
 - 50) Poirel, L, JM Rodriguez-Martinez, H Mammeri, et al. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. Antimicrob Agents Chemother 49: 3523-3525.
 - 51) Cattoir, V, L Poirel, D Mazel, et al. 2007. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 51:

- 2650-2651.
- 52) Wang, M, Q Guo, X Xu, et al. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 53: 1892-1897.
- 53) Jacoby, GA, CM Griffin, DC Hooper. 2011. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. Antimicrob Agents Chemother 55: 4979-4984.

Molecular mechanisms involved in acquiring antibiotic resistance in pathogenic Gram-negative bacteria

Jun-ichi Wachino

Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

The emergence of various antibiotic resistant bacteria is a major clinical concern. Bacterial antibiotic resistance is classified into intrinsic (e.g., amino acid substitutions in DNA gyrase conferring quinolone resistance) and acquired (e.g., acquisition of metallo- β -lactamase genes involved in carbapenem resistance). Acquired antibiotic resistance genes are mediated by mobile genetic elements in bacteria, such as plasmids. The transfer of plasmids via conjugation is a primary cause for the spread of antibiotic resistance genes within bacterial species. Transformation and transduction via phages also contribute to spreading antibiotic resistance. Moreover, integrons and transposons are involved in accumulating and transposing antibiotic resistance genes in bacteria, respectively. This review discusses the molecular mechanisms involved in the acquisition and spread of antibiotic resistance genes in clinically-relevant antibiotic-resistant Gram-negative bacteria.