

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3793796号
(P3793796)

(45) 発行日 平成18年7月5日(2006.7.5)

(24) 登録日 平成18年4月21日(2006.4.21)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 D
請求項の数 6 (全 10 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-51023 (P2002-51023)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成14年2月27日 (2002.2.27)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2003-250554 (P2003-250554A)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(43) 公開日	平成15年9月9日 (2003.9.9)	(73) 特許権者	591222245
審査請求日	平成15年11月13日 (2003.11.13)		国立感染症研究所長
前置審査			東京都新宿区戸山一丁目23番1号
		(74) 代理人	100110249
			弁理士 下田 昭
		(72) 発明者	荒川 宜親
			東京都立川市幸町4-7-1 幸町団地2
			6-406
		(72) 発明者	横山 佳子
			東京都武蔵村山市大南2-130-7 パ
			ルクサイド303号
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の塩基配列から成る遺伝子、又は配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項2】

16S rRNAメチラーゼを有する緑膿菌を識別する検査のための請求項1に記載の遺伝子の使用方法。

【請求項3】

請求項1に記載の遺伝子をプローブとする、16S rRNAメチラーゼを有する緑膿菌を識別する検査のための検査薬。

【請求項4】

配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質。

【請求項5】

16S rRNAメチラーゼを有する緑膿菌を識別する検査のための請求項4に記載のタンパク質の使用方法。

【請求項6】

請求項4に記載のタンパク質に対する抗体から成る、16S rRNAメチラーゼを有する緑膿菌を識別する検査のための検査薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、アミノ配糖体に耐性を付与する緑膿菌等グラム陰性桿菌から発見された 16S rRNAメチラーゼ及びその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

アミノ配糖体系抗生物質は抗菌スペクトルがグラム陽性菌、陰性菌、結核菌と広範囲におよぶ。特にカナマイシン系アミノ配糖体は緑膿菌を含むグラム陰性桿菌に対して強力な抗菌力を示し、临床上重要な抗生物質である。

細菌のアミノ配糖体に対する耐性機構として、薬剤を修飾することにより不活化する酵素（修飾酵素）が知られている。修飾酵素にはアミノ配糖体のアミノ基を修飾するアセチル化酵素及び水酸基を修飾するリン酸化酵素ならびにアデニリル化酵素、さらにアセチル化とリン酸化を同時に行う二機能酵素が報告されている（Shawら、Microbiol. Rev.、第57巻、第138-163頁、1993年；Aminoglycoside Resistance Study Groups、Trends Microbiol.、第2巻、第347-353頁、1994年；Daviesら、Trends Microbiol.、第5巻、第234-240頁、1997年）。細菌がこれらの修飾酵素を産生することにより1～数種類のアミノ配糖体に対して耐性化する（Kondoら、J. Infect. Chemother.、第5巻、第1-9頁、1999年）。

【0003】

日本で開発されたアミノ配糖体系抗生物質であるアルベカシンは修飾酵素による耐性化機構を回避することを想定して創製されており、耐性菌が出現しにくい抗生物質といわれており、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示すことを特徴とする。日本では、現在、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染症の治療薬として認可され、用いられている。

アルベカシンに対する耐性菌出現についてはMRSAに関しての報告があり、最小発育阻止濃度が12.5～25 µg/ml、即ち中等度耐性を示すMRSAがわずかながら出現しているという報告がある（出口ら、Jpn. J. Antibiot.、第50巻、第1-11頁、1997年）。その耐性化機構はアセチル化とリン酸化を同時に行う二機能酵素によるものであり、アルベカシンがその6'位のアミノ基と2"位の水酸基が同時に修飾を受けることにより不活化される（Kondoら、J. Infect. Chemother.、第5巻、第1-9頁、1999年）。

【0004】

1997年患者の喀痰から、アルベカシンに対して高度耐性を示す緑膿菌が分離された（AR-2株）。AR-2株の種々のアミノ配糖体に対する最小発育阻止濃度は表1に示すようにカナマイシンやゲンタマイシンなど従来のアミノ配糖体に加え、アミカシン、イセパマイシンなど新型のアミノ配糖体に対しても広範囲に1000 µg/ml以上の高度耐性を示した。

【表1】

(µg/ml)

KM系				GM系					
KM	TOB	AMK	ABK	GM	SISO	ISP	NEO	SM	HYG-B
>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	128	1024

表中各略号は、KM：カナマイシン、GM：ゲンタマイシン、TOB：トブラマイシン、AMK：アミカシン、ABK：アルベカシン、SISO：シソマイシン、ISP：イセパマイシン、NEO：ネオマイシン、SM：ストレプトマイシン、HYG-B：ハイグロマイシンBを示す。

【0005】

院内感染や術後感染の原因菌である緑膿菌でこのような株が臨床現場に広まっている可能性が考えられ、化学療法の実施において将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。

16S rRNAメチラーゼはカナマイシン、ゲンタマイシンなどのアミノ配糖体系抗生物質を産

10

20

30

40

50

生する放線菌等で確認されている。この酵素はアミノ配糖体の標的部位である30Sリボソームにおける16S rRNA(リボゾーマルRNA)をメチル化することによりアミノ配糖体の結合を妨げることで、アミノ配糖体産生菌が自己防衛手段として生来獲得しているものである(Mol Gen Genet (1985) 200:415-421)。

16S rRNAメチラーゼは、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として16S rRNAをメチル化する酵素であるが、この種の酵素はこれまでアミノ配糖体産生菌以外では確認されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は広範囲のアミノ配糖体に対して高度耐性を獲得した緑膿菌の新規な耐性機構を付与する16S rRNAメチラーゼをコードしている遺伝子及びアミノ酸配列の情報を確保することにより、医療機関における細菌検査の業務において耐性菌の識別を容易にする手段を提供することにある。

10

【0007】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】

発明者らは緑膿菌において、アミノ配糖体に対する耐性を付与する遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した後、ホモロジー検索の結果から、本遺伝子が放線菌以外の細菌では報告例のない酵素をコードしていることを解明した。さらに酵素としての特徴づけを行い、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明はグラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼをコードする遺伝子及びそのアミノ酸配列を提供する。

20

【0008】

本発明は、配列番号1の塩基配列から成る遺伝子である。この遺伝子は756塩基(終止コドンを含む。)から成っており、その遺伝子産物は251アミノ酸(配列番号2)から成っている。また本発明は、配列番号1の塩基配列又はその部分の、グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの検査のための使用である。即ち、本発明は、配列番号1の塩基配列又はその部分をPCR増幅するためのプライマーから成る、グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの検査キットであり、配列番号1の塩基配列又はその部分をプローブとする、グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの検査薬である。

更に、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質である。又本発明は、配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質の、グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの検査のための使用である。即ち、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質に対する抗体から成るグラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの検査薬である。

30

上記のプライマー、プローブ、抗体については公知技術により適宜作成すればよく、検査の方法についても現時点で公知の方法により適宜行えばよい。

【0009】

【発明の効果】

本発明の新規16S rRNAメチラーゼ遺伝子を保有している菌は多種類のアミノ配糖体系抗生物質に高度耐性を与えるため、临床上極めて危険性が高いと考えられる。本発明の遺伝子及びアミノ酸配列情報は、医療機関や臨床検査センター等における日常の細菌検査業務の中で、本耐性遺伝子を保有する菌を識別するために有用である。

40

本発明の遺伝子及びアミノ酸配列は、緑膿菌等グラム陰性桿菌の検出手段に利用することができる。例えば、開示された塩基配列の情報をもとにプライマーを設計し、PCR法による検出やDNAマイクロチップなどの遺伝子を直接又は間接的に検出する方法を用いた、臨床検査法への応用が可能である。

【0010】

【実施例】

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

実施例 1

50

まず、緑膿菌AR-2株から全DNAの抽出を行った。クローニングベクターとしてpBluescript由来のpBC SK+ (Stratagene社製)を用い、宿主大腸菌としてXL1-blueを用いた。全DNA及びベクターを制限酵素Hind IIIで処理した後、連結し、electroporation法によりXL1-blueへ形質転換した。アルベカシンを2µg/ml添加した培地に生育したコロニーからアミノ配糖体耐性遺伝子を有する形質転換体を得た。

形質転換体からプラスミドを回収し制限酵素Hind IIIで処理後、電気泳動を行った結果、約7kbのDNA断片が挿入されていることが確認された。

約7kbのDNA断片についてdeletion kit (ニッポンジーン社製)を用いて欠失し、アルベカシンを16µg/ml添加した培地での生育を指標にしながら、欠失クローンを作成した。この操作により、約1.7kbのアミノ配糖体耐性遺伝子を含む領域を有する欠失クローン

10

【0011】

得られた欠失クローンについて塩基配列を決定した。塩基配列は自動DNAシーケンサー (3100 Genetic Analyzer; アプライドバイオシステムズ社製)を用い、ダイデオキシ法により決定した。

得られた塩基配列 (配列番号3)を解析ソフトGENETYX ver.10.1を用いて解析したところ、図1に示すように3つの読み枠 (open reading frame)が存在し、2番目のopen reading frameが目的の遺伝子 (配列番号1: 配列番号3の塩基配列における352~1107番目の塩基配列)であることが推察された。

さらに得られた塩基配列 (配列番号1)をQuery配列として、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)法を用いてBLASTX (DNA配列×アミノ酸配列DB)プログラムによりホモロジー検索を行った。その結果、本遺伝子 (配列番号1)はネブラマイシン産生放線菌であるStreptoalloteichus hindustanusが産生する16S rRNAメチラーゼやゲンタマイシン産生放線菌であるMicromonospora roseaが産生する16S rRNAメチラーゼなど、アミノ配糖体系抗生物質産生放線菌が産生する16S rRNAメチラーゼとアミノ酸配列上約30%のホモロジーを示した。

20

リボソーム構成中にメチル化酵素によってRNAがメチル化を受けることにより、細胞内RNaseによる分解から保護されることが知られている。この際作用するメチル化酵素とホモロジー検索結果より得た16S rRNAメチラーゼの構造及び酵素学的な特性は異なっており、転写後にrRNAを修飾する。

30

【0012】

実施例2

本実施例においては、本発明の遺伝子 (配列番号1)がコードしているタンパク質 (配列番号2)が16S rRNAをメチル化することを示すため、メチル基取り込み実験を行った。

本実施例で用いる粗酵素抽出液及び反応基質となる30Sリボソームサブユニットの抽出を以下のように行った。

配列番号1の塩基配列から成るポリヌクレオチドをpME6032由来の大腸菌-緑膿菌シャトルベクターpT0001にサブクローニングし、緑膿菌の標準株であるPA01へ形質転換した。

得られた形質転換体を培養し菌体を集菌した後、緩衝液A (20mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂, 6mM 2-mercaptoethanol)を加え、120MPaの条件下でフレンチプレスにより菌体を破碎した。次にRNase-free DNase I (終濃度5µg/ml)を加えた後、再び同条件でフレンチプレスを通し、30,000g、45分間遠心後、上清を採取した。得られた上清を緩衝液B (10mM Tris-HCl, pH7.5, 500mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂, 6mM 2-mercaptoethanol)で作成した20%ショ糖溶液に等量重層し、100,000g、15時間、超遠心を行った。上清を脱塩するため緩衝液Aを用いて透析を行い、透析後の溶液を粗酵素抽出液とした。

40

【0013】

緑膿菌にpT0001ベクターを導入した株を培養し、30Sリボソームの抽出を行った。培養した菌体を、前述した条件と同条件でフレンチプレスを用いて破碎後、RNase-free DNase I (終濃度5µg/ml)を加え、再び同条件でフレンチプレスにかけ、30,000g、45分間遠心を行った。得られた上清を緩衝液Bで作成した20%ショ糖溶液に等量重層し、100,000g、15時

50

間、超遠心を行った。得られたペレットを緩衝液Bに溶解し、同緩衝液で作成した40%ショ糖溶液に等量重層し、先と同様の条件で超遠心を行った。得られたペレットを緩衝液Bに溶解し、脱塩をするため緩衝液C (10mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NH₄Cl, 1mM MgCl₂, 6mM 2-mercaptoethanol)を用いて透析を行った。透析後の溶液を緩衝液Cで作成した10 - 30%ショ糖密度勾配溶液に重層し、48,000g、15時間、超遠心を行った。遠心後260nmでモニターを行い、30Sリボソームに相当する分画を採取した。

【0014】

メチル化の証明には、得られた基質、粗酵素抽出液及びメチル基供与体としてトリチウム標識されたS-アデノシルメチオニンを用いた。粗酵素抽出液の代わりにコントロールとして緑膿菌PA01にpT0001ベクターを導入した株から粗酵素の抽出と同様の方法によって得られた上清を用いた。メチル化反応は溶媒として緩衝液D (50mM Tris-HCl, pH7.5, 37.5mM NH₄Cl, 7.5mM MgCl₂, 6mM 2-mercaptoethanol) を用い、基質濃度 (30Sリボソーム) 20 pmol、メチル基供与体2.5 μ Ci (500 mCi /mmol; 18.5 GBq /mmol)、及び粗酵素抽出液を10 μ l添加し、全容量を100 μ lとした。反応温度は35で行った。10分ごとに反応液を20 μ lずつ採取し、取り込まれたメチル基の放射能活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

図2に示すように、コントロールと比較して、時間とともにメチル基の取り込み活性が上昇した。

【0015】

実施例3

本発明の遺伝子は他の緑膿菌との接合により伝達するため、本遺伝子はプラスミド上に存在している。伝達したプラスミドは接合体からも回収でき、電気泳動やDNAハイブリダイゼーション、PCR解析を行うことにより確認することができる。

接合実験にはプラスミド供与株としてAR-2株を、プラスミド受容株として緑膿菌No.105株を用いた。AR-2株はニューキノロン系抗生物質であるシプロフロキサシンに感受性 (最小発育阻止濃度0.25 μ g/ml)を示し、No.105株は同抗生物質に耐性 (最小発育阻止濃度64 μ g/ml) およびアルベカシンに対しては表2に示すようにやや感受性を示すため、接合体を分離するための指標としてアルベカシン64 μ g/mlおよびシプロフロキサシン5 μ g/ml添加したミューラーヒントン寒天培地を用いた。AR-2株とNo.105株をそれぞれ数時間培養した菌液を等量混合した後、13000 rpm、5分間遠心し、ペレットのまま37、2時間インキュベートした。その後前述した寒天培地に100 μ lの菌液を塗布し、37、1晩培養後、生育したコロニーを接合体とした。この接合実験で得られたコロニーを無作為に5つ採取し、接合体1~5とした。

【0016】

これら接合体と供与株 (AR-2) について、最小発育阻止濃度を、米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS) のガイドラインに準じて測定した。その結果を表2に示す。各接合体における種々のアミノ配糖体に対する最小発育阻止濃度は供与株 (AR-2) と同様の値を示した。

【表2】

	KM系				GM系					
	KM	TOB	AMK	ABK	GM	SISO	ISP	NEO	SM	HYG-B
AR-2	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	128	1024
接合体-1	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
接合体-2	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
接合体-3	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
接合体-4	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
接合体-5	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
105	>1024	256	4	4	>1024	>1024	8	>1024	>1024	512

表中の略号は表1に示したのと同様である。

10

20

30

(μ g/ml)

40

50

また、配列番号1の配列の19～38と634～653の配列をもとに作成したプライマーを用いて、熱変性94、1分、アニーリング59、1分、伸長反応72、1分、30サイクルの条件で、AR-2株、No.105株及び接合体-1についてPCR解析を行った。その結果、電気泳動によりAR-2株と接合体-1について本発明の遺伝子を確認した(図3)。

【0017】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation	10
<120> グラム陰性桿菌の16S rRNAメチラーゼの遺伝子	
<130> PS02-1104	
<160> 3	
<210> 1	
<211> 756	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas aeruginosa	20
<400> 1	
atgagctttg acgatgccct agcgtccate ctttccitcaa aaaaatateg ticcctctgc 60	
ccggataaccg tacggcggat tttagatcag gaatgggggc ggcacaaatc gcctaagctg 120	
gcagtggagg ccactcgcac cggctgcac gggatttgcg gggcciatgt cacgccggaa 180	
tcgctcaagg ctgcagcagc ggcattatcg gttagcgatg tgcaaaaggc actgtcgcig 240	
cacgcctcta ccaaggagcg gttagccgaa ttggactgcc tctacgattt tatctttct 300	
ggcggggctgc cccatcgtgt gttagatate gcttgcggcc taaaccgct ggccctcttt 360	30
atacgtgaca taacatctgt atggcgctgc gacatccate aggggttggg cgatgtgatc 420	
acccctttg cccatcatca gggattggac ttcacgttcg cctgcagga tgtgatgtgt 480	
acgccgcca ctgagacggg ggatttggca ctggtattta aattactgcc ttigtctggag 540	
cgagagcaag ctggcgccgc catggcgcta ctgcaggcac tagctacccc tcggattgcc 600	
gtcagcttcc ccaccgcag tttaggcggg cgcggcaagg gcatggaagc aaactattcc 660	
gcatggctcg agggggcact gccigtatgaa ttigaaattg aggataccaa gaccattgga 720	
atagagcttg tgtacatgat aaaaaggaat aagtga 756	40
<210> 2	
<211> 251	
<212> PRT	
<213> Pseudomonas aeruginosa	
<400> 2	
Met Ser Phe Asp Asp Ala Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Lys Lys Tyr	50

1	5	10	15	
Arg Ser Leu Cys Pro Asp Thr Val Arg Arg Ile Leu Asp Gln Glu Trp				
	20	25	30	
Gly Arg His Lys Ser Pro Lys Leu Ala Val Glu Ala Thr Arg Thr Arg				
	35	40	45	
Leu His Gly Ile Cys Gly Ala Tyr Val Thr Pro Glu Ser Leu Lys Ala				
	50	55	60	10
Ala Ala Ala Ala Leu Ser Val Gly Asp Val Gln Lys Ala Leu Ser Leu				
	65	70	75	80
His Ala Ser Thr Lys Glu Arg Leu Ala Glu Leu Asp Cys Leu Tyr Asp				
	85	90	95	
Phe Ile Phe Ser Gly Gly Val Pro His Arg Val Leu Asp Ile Ala Cys				
	100	105	110	
Gly Leu Asn Pro Leu Ala Leu Phe Ile Arg Asp Ile Thr Ser Val Trp				
	115	120	125	20
Ala Cys Asp Ile His Gln Gly Leu Gly Asp Val Ile Thr Pro Phe Ala				
	130	135	140	
His His Gln Gly Leu Asp Phe Thr Phe Ala Leu Gln Asp Val Met Cys				
	145	150	155	160
Thr Pro Pro Thr Glu Thr Gly Asp Leu Ala Leu Val Phe Lys Leu Leu				
	165	170	175	30
Pro Leu Leu Glu Arg Glu Gln Ala Gly Ala Ala Met Ala Leu Leu Gln				
	180	185	190	
Ala Leu Ala Thr Pro Arg Ile Ala Val Ser Phe Pro Thr Arg Ser Leu				
	195	200	205	
Gly Gly Arg Gly Lys Gly Met Glu Ala Asn Tyr Ser Ala Trp Phe Glu				
	210	215	220	
Gly Ala Leu Pro Asp Glu Phe Glu Ile Glu Asp Thr Lys Thr Ile Gly				
	225	230	235	40
			240	

Ile Glu Leu Val Tyr Met Ile Lys Arg Asn Lys

245

250

<210> 3

<211> 1662

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 3

accatcccga gttgtggcct tectactgcg ataattcata tgctattcgc cccgatctgg 60
 tgctcagcgg ccatgcgcat ggcgggcaga tccgcctgcc atggatcggc gggctgctig 120
 cgcccaatca agggttcttc cctaagtata cctcggggca ctatgccgca gacaatggca 180
 cccaaatgat tgtcagccgg gggcttggca atagcatctt tcccgtcgt giattcaatc 240
 gccccattt gccggtgatc acgctaacgg ggggttaggg tgagccgagg tataagggat 300
 catttatgca atcaggcgca gcaattccca ccacaaccaa ggagacacag tatgagcttt 360
 gacgatgecc tagcgtccat cctttctca aaaaaatac gticcctctg cccggatacc 420
 gtacggcgga ttttagatca ggaatggggg cggcacaat cgcctaagct ggcagtggag 480
 gccactcgca cccggctgca cgggatttgc ggggcctatg tcacgccgga atcgtcaag 540
 gctgcagcag cggcattatc ggttggcgat gtgcaaaagg cactgtcgt gcacgccctt 600
 accaaggagc ggttggccga attggactgc ctctacgatt ttatctttc tggcggggig 660
 ccccatcgtg tgttggatat cgcttgcggc ctaaaccgc tggccctctt tatacgtgac 720
 ataacatctg tatgggcgtg cgacatccat caggggttgg gcgatgtgat caccctttt 780
 gcccatcadc agggattgga cttcacgttc gccctgcagg atgtgatgtg tacgccgccc 840
 actgagacgg gggatttggc acttggtattt aaattactgc ctttgcigga gcgagagcaa 900
 gctggcgccg ccatggcgct actgcaggca ctagctacce ctggattgc cgtcagcttc 960
 cccaccgca gtttaggcgg gcgcgcaag ggcattggaag caaactattc cgcattggtc 1020
 gagggggcac tgccgatga atttgaatt gaggatacca agaccattgg aatagagctt 1080
 gtgtacatga taaaaaggaa taagttagct aagccaagga gcaaacccta ccttgcctata 1140
 taaaaagagg aacgaaaaaa tagttttcgt tctcttttg ttatatcgac tacacagct 1200
 atgattgctg tttctttagt aggcgtttat aggtcagttc tatecccaac gccccagcg 1260
 gtgctgtcag caagatagcg agaatcgcca ccgctagtat cgcttccccg ccgctcagcc 1320

10

20

30

40


```

ccatcgacag cgggattgaa ccaatcgacg ccgtgaccgi tgccttgggc agataggcaa 1380
tcatgcaaaa tatgcgttcc ctccaagaaa ggiccgtiacc catcatacat atccacacac 1440
cgagcattct aaacagttagc actgtaatga ccagcaaagc accccicagc cccgccgaga 1500
gcagataatt tatattgacc gtgcgcccaa ccaagacgaa caaccagatt tccgctgcaa 1560
cccaaagitt tgaaaactig ctggatatgc gccttggcaac gggagcattg gitttcaaaa 1620
cgttacacc ctaacccatca ccgctagcaa ccccgaaaag gc 1662

```

10

【図面の簡単な説明】

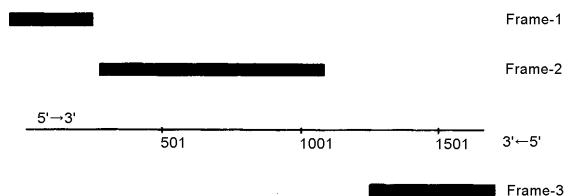
【図1】実施例1で得た、アミノ配糖体耐性遺伝子を含む領域を有する欠失クローンについて塩基配列（配列番号3）の3つの読み枠（open reading frame）を示す図である。

【図2】本発明の遺伝子（配列番号1）がコードしているタンパク質（配列番号2）による30Sリボソームサブユニット（16S rRNA）のメチル化を示す図である（実施例2）。

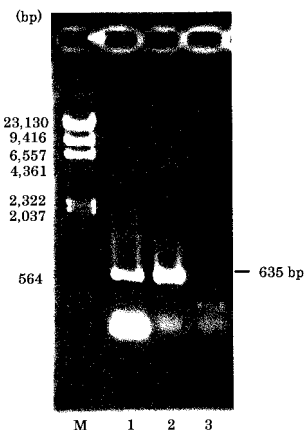
【図3】アルベカシンに対して高度耐性を示す緑膿菌（AR-2株）と緑膿菌NO.105株との接合体についての電気泳動を示す図である（実施例3）。レーンMはサイズマーカー、レーン1はAR-2株、レーン2は接合体-1、レーン3はNo.105株のものを示す。AR-2株と接合体-1の635bpに配列番号1（19～653）の遺伝子が確認された。

20

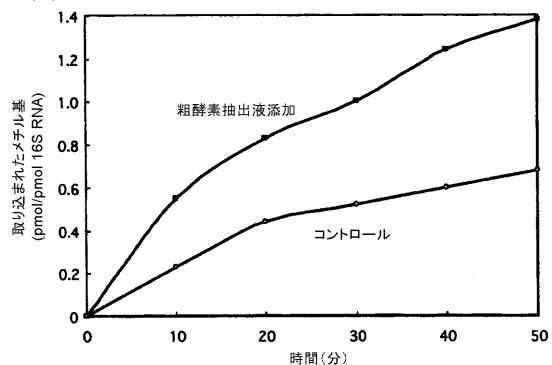
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/01 (2006.01) C 1 2 N 9/10
C 1 2 R 1:01

審査官 坂崎 恵美子

(56) 参考文献 堀田国元, 細菌の薬剤耐性機構の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究研究報告書, 2000年, p.128-133

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09 ZNA
C12N 9/10
C12Q 1/48
C12Q 1/68
G01N 33/569
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq