

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-250554
(P2003-250554A)

(43) 公開日 平成15年9月9日(2003.9.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09 9/10	Z N A	C 1 2 N 9/10	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/48		C 1 2 Q 1/48	Z 4 B 0 5 0
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	D 4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 9/10		C 1 2 R 1:01	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	審査請求 未請求 請求項の数 7	OL (全 7 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-51023(P2002-51023)

(22) 出願日 平成14年2月27日(2002.2.27)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 591222245

国立感染症研究所長

東京都新宿区戸山一丁目23番1号

(72) 発明者 荒川 宜親

東京都立川市幸町4-7-1 幸町団地26-406

(74) 代理人 100087631

弁理士 滝田 清暉 (外1名)

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) 【要約】 (修正有)

【課題】 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。

【解決手段】 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、特定の配列を有する本遺伝子が新規の酵素(16S rRNAメチラーゼ)をコードしていることを解明した。

【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。

【請求項2】 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。

【請求項3】 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。

【請求項4】 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。

【請求項5】 配列番号2のアミノ酸配列から成るタンパク質。

【請求項6】 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。

【請求項7】 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。

【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；AminoglycosideResistance 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12.5~25µg/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1000µg/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16SrRNA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。

【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。

【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。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、臨床に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。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

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が得られた。

【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Streptoailloteichus 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。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。

【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, 500mMNH₄Cl, 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。

【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 MgCl

2, 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 µCi (500 mCi /mmol ; 18.5 GBq /mmol)、及び粗酵素抽出液を10 µl添加し、全容量を100 µlとした。反応温度は35 °Cで行った。10分ごとに反応液を20 µl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 µg/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 µg/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 µg/mlおよびシプロフロキサシン5 µg/ml添加したミュ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 °C、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 µlの菌液を塗布し、37 °C、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】

	(µg/ml)									
	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。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 °C、1分、

アニーリング59 °C、1分、伸長反応72 °C、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 A R - 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) 。

【 0 0 1 7 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>; Japan Science and Technology Corporation
<;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
<;400>; 1
atgagctttg acgatgccct agcgtccatc ctttcctcaa aaaaatatcg ttcacctctgc 60
ccggataccg tacggcggat tttagatcag gaatgggggc ggcacaaatc gcctaagctg 120
gcagtggagg ccaactcgac cccggctgcac gggatttgcg gggcctatgt cacgccgaa 180
tcgctcaagg ctgcagcagc ggcaattatcg gttggcgatg tgcaaaaggc actgtcgtg 240
cacgcctcta ccaaggagcg gttggccgaa ttggactgcc tctacgattt tatcttttct 300
ggcgggggtgc cccatcgtgt gttggatcgc gcttgcggcc taaaccgct ggccctcttt 360
atacgtgaca taacatctgt atggcggtgc gacatccatc aggggttggg cgatgtgatc 420
accccccttg cccatcatca gggattggac ttcacgttcg ccctgcagga tgtgatgtgt 480
acgccgccca ctgagacggg ggatttggca ctggtattta aattactgcc ttgctggag 540
cgagagcaag ctggcgccgc catggcgcta ctgcaggcac tagctacccc tcggattgcc 600
gtcagcttcc ccacccgag tttaggcggg cgcggcaagg gcatggaagc aaactattcc 660
gcatggttcg agggggcact gcctgatgaa tttgaaattg aggataccaa gaccattgga 720
atagagcttg tgtacatgat aaaaaggaat aagtga 756
<;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
  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
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
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
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
225 230 235 240
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 tcctactgcg ataattcata tgctattcgc cccgatctgg 60
tgctcagcgg ccatgcgcat ggcgggcaga tccgcctgcc atggatcggc gggctgcttg 120
cgcccaatca agggttcttc cctaagtata cctcggggca ctatgccgca gacaatggca 180
cccaaatgat tgtcagccgg gggcttggca atagcatctt tcccgtgctg gtattcaatc 240
gccccattt gccggtgatc acgctaacgg gtgggtaggg tgagccgagg tataagggat 300
catttatgca atcaggcgca gcaattccca ccacaaccaa ggagacacag tatgagcttt 360
gacgatgcc tagcgtccat cctttcctca aaaaaatc gttccctctg cccgataacc 420
gtacggcgga ttttagatca ggaatggggg cggcacaat cgcctaagct ggcagtggag 480
gccactcgca cccggctgca cgggatttgc ggggcctatg tcacgccgga atcgtcaag 540
gctgcagcag cggcattatc ggttggcgt gtgcaaagg cactgtcgt gcacgcctct 600
accaaggagc ggttggccga attggactgc ctctacgatt ttatctttt tggcggggtg 660
ccccatcgtg tgttgatata cgcttgcggc ctaaaccgc tggccctctt tatacgtgac 720
ataacatctg tatgggcgtg cgacatccat caggggttgg gcgatgtgat caccctttt 780
gcccatac agggattgga ctacagttc gccctgcagg atgtgatgtg tacgccgcc 840
actgagacgg gggatttggc actggtattt aaattactgc ctttctgga gcgagagcaa 900
gctggcgcg ccatggcgt actgcaggca ctagctacc ctcggattgc cgtcagcttc 960
cccaccgca gtttaggcgg gcgcggcaag ggcattggaag caaactatc cgcatggttc 1020
gagggggcac tgcctgatga atttgaatt gaggatacca agaccattgg aatagactt 1080
gtgtacatga taaaaaggaa taagtgact aagccaagga gcaaacccta ccctgtata 1140
taaaaagagg aacgaaaaa tagtttctg tcctctttt ttatatcgac tacacagct 1200
atgattgctg tttcttgagt aggcgtttat aggtcagttc tatcccaac gccccagcg 1260
gtgctgtcag caagatagcg agaatcgcca ccgctagtat cgcttccccg ccgctcagcc 1320
ccatcgacag cgggattgaa ccaatcgcag cctgtaccgt tgccttgggc agataggcaa 1380
tcatgaaaa tatgcttcc ctccaagaaa ggtccgtacc catcatacat atccacacac 1440
cgagcattct aaacagtagc actgtaatga ccagcaaagc acccctcagc cccgccgaga 1500
gcagataatt tatattgacc gtcgccccaa ccaagacgaa caaccagatt tccgctgcaa 1560
cccaaagttt tgaaaacttg ctggatatgc gctttgcaac gggagcattg gttttcaaaa 1620
cgttacacc ataccatca ccgctagcaa ccccgaaaag gc 1662

```

【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。

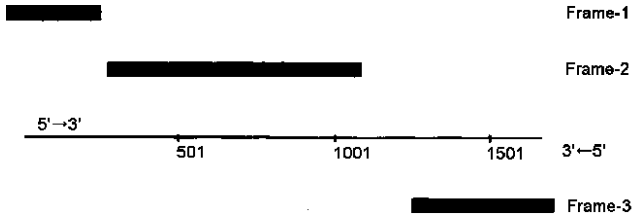
【図 2】本発明の遺伝子（配列番号 1）がコードしているタンパク質（配列番号 2）による 30S リボソームサブユニット（16S rRNA）のメチル化を示す図である（実施例 2）。

【図 3】アルベカシンに対して高度耐性を示す緑膿菌

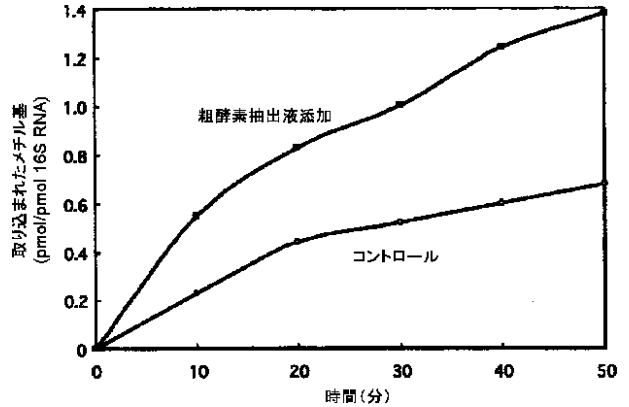
(AR-2株)と緑膿菌N0.105株との接合体についての電気泳動を示す図である(実施例3)。レーンMはサイズマーカー、レーン1はAR-2株、レーン2は接合体-

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。

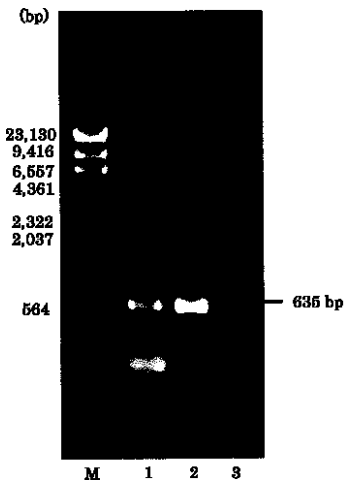
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.7
 C 1 2 R 1:01
 (C 1 2 Q 1/48
 C 1 2 R 1:01)

識別記号

F I

テ-マコード(参考)

(72)発明者 横山 佳子
 東京都武蔵村山市大南2-130-7 パルク
 クサイド303号

F タ-ム(参考) 4B024 AA11 AA13 CA04 CA11 DA05
 EA04 GA14 HA12
 4B050 CC03 DD02 LL01 LL03
 4B063 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR42
 QR56 QS25 QS34 QX02