

今村賞受賞記念講演

抗酸菌における薬剤耐性

山田 毅・増田 国次*

大阪大学微生物病研究所
(*現所属: 結核予防会大阪府支部)

受付 昭和 51 年 7 月 10 日

DRUG RESISTANCE IN MYCOBACTERIA

Takeshi YAMADA** and Kunitsugu MASUDA

(Received for publication July 10, 1976)

Viomycin-resistant mutants were isolated from *Mycobacterium smegmatis*. Ribosomes were isolated and tested for drug resistance in subcellular systems containing poly (U) as messenger RNA. Resistance to viomycin in these strains was due to altered ribosomes. Further analysis showed that viomycin resistance was due to either altered 50 S or altered 30 S subunits depending on the resistant strain(21). Viomycin-resistant mutants with high level showed co-resistance to streptomycin and kanamycin even though they were selected by viomycin only. On the contrary, streptomycin resistance with high level, selected by streptomycin only, did not show co-resistance to viomycin(20).

Viomycin reduced the amounts of dihydrostreptomycin to ribosomes of *M. smegmatis* and *Escherichia coli*, although they have different modes of action. The dihydrostreptomycin binding to ribosomes could be exchanged with streptomycin or dihydrostreptomycin, but not with unrelated antibiotics, kanamycin, neomycin, spectinomycin, capreomycin, tuberactinomycin-N, chloramphenicol and erythromycin. It was suggested that there is a significant interaction between the binding sites of viomycin and streptomycin on ribosomes(26).

From these evidence, biochemical basis of one-way cross resistance between streptomycin and viomycin was discussed.

1. はじめに

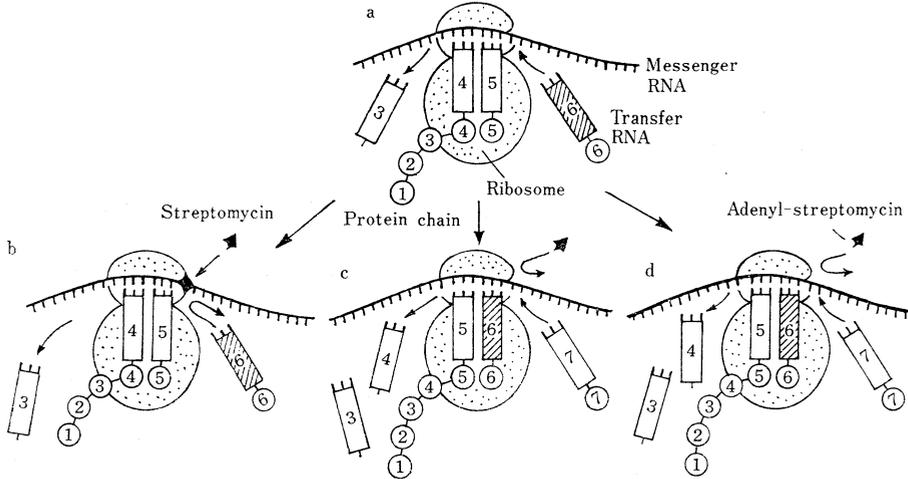
平均寿命の年次推移をみると、昭和の初期から急速にのびている。感染症による死亡率の激減がその主な原因であることが統計的データからうかがわれる。あいつぐ抗生物質の発見、化学療法の進歩が、このような医学の勝利をもたらした。

特に結核症での死者数の減少はこれまで不治の病とされていただけに特筆に値する。例えば、統計によると、

1930年には、人口10万人当り、結核死者数は日本で185.3人、1940年209.6人であつたが、1950年には146.4人に減少し、更に1960年には34.2人に減少している。1944年に Waksman によりストレプトマイシン(SM)が発見され、1952年にはINHの治療効果がわかり、有効な薬剤が実用化されてきた時期を考えると、成程とうなずける。しかし、その後これらの薬剤に対する耐性菌が急速にふえ、化学療法の前に大きく立ちほだかり、再び医療の前進を妨げることとなつた。

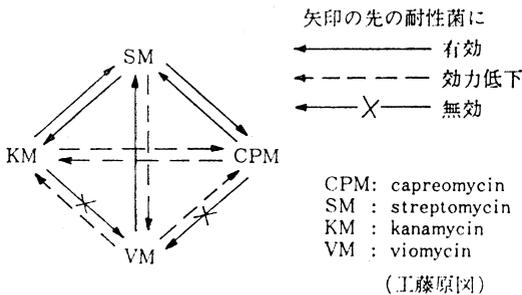
** From the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Yamada-kami, Suita, Osaka 565 Japan.

図1 ストレプトマイシン耐性の生化学的機構 (Clowes 原図)



a) リボソーム, messenger RNA, aminoacyl tRNA は蛋白合成に必要な main component である。b) もし SM が存在すれば 30 S subunit に結合し蛋白合成を阻害するが, c) のように, S 12 の変異を受けたリボソームには結合しえない。d) しかし R 因子による耐性機構はこれと異なり, SM が adenylation, あるいは phosphorylation されることにより, リボソームに結合しえなくなる。

図2 結核菌における各薬剤間の交叉耐性



この耐性菌の征服は、われわれに残された次の大きな課題となつている。この課題を解決するためには、まず耐性の獲得がどのような機構で行なわれているかを十分に理解することが先決であり、それをふまえて理論的に対策をたてるのが確実な道であろう。

事実、このために多くの研究者の努力が集中され、幾多の優れた業績が報告されてきた。この方面の研究業績について、現在次のようにまとめることができる。

a) グラム陰性桿菌は主として、R因子により薬剤耐性を伝達する。

b) ブドウ球菌および連鎖球菌はプラスミッドに薬剤耐性の遺伝子を持つているが、R因子と異なり、接合により耐性を伝達することができない。おそらく bacteriophage により他の菌へ伝達されるのであろう。

c) 淋菌の薬剤耐性は菌体クロモソームの変異とその選択によると考えられている。

d) 結核菌の耐性獲得は菌体クロモソームの突然変異とその選択によるものか、あるいはR因子によるものか、未だ不明であるが、抗酸菌でのR因子に関する確実な報告は未だない。

菌体クロモソームの変異とその選択による薬剤耐性の機構と、R因子およびプラスミッドに起因する薬剤の不活化の機構を理解するために、SM耐性の場合を例にとり、図1に示した。腸内細菌におけるR因子に起因するSM不活化による耐性の機構は、山田ら¹²⁾の研究結果を資料としたものであり、菌体クロモソームの変異による耐性機構は、野村ら³⁾の研究成果をもとにしている。

このような一般論を念頭においた上で、以下本稿では特に抗酸菌に関する薬剤耐性研究の現状について、著者および共同研究者による研究成果を中心に話をすすめていきたい。抗結核剤のうちでも、パイオマイシン (VM)、ツベラクチノマイシン (TUM)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、カプレオマイシン (CPM) 等蛋白合成阻害剤に話題の焦点をしぼることとする。

2. 結核菌における VM, SM, CPM および KM の交叉耐性の関係

結核菌の交叉耐性についての報告は複雑を極めている⁴⁾⁻¹⁹⁾。実験に用いた菌株および報告者により、少しずつ異なるが、図2のようにまとめられる。VM耐性はSM, KM, CPMにも同時に耐性になるが、SM耐性はVM耐性とならない。これは一方交通の交叉耐性として知られている。このような一方交通の交叉耐性はどのような機構で起こっているのか、誰も明らかにすることができず、ただ不思議な現象として扱われてきた。

病原性の強い結核菌は生菌の取り扱いに際して感染の危険性が高いため、生化学的研究の発展を妨げている。加熱死菌を使用する cell wall 画分、リピッド画分を材料にした研究は、免疫、毒素研究の領域で目ざましい進歩をとげたが、加熱すると失活するような酵素反応の

表1 各種抗生物質の *M. smegmatis* に対する最小阻止濃度

Strain	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)					Selection
	VM	TUM	CPM	SM	KM	
Parental	1.25	1.25	1.25	0.31	0.31	None
N	5.0	2.5	5.0	0.63	0.63	One-step VM sesistance (2.5 $\mu\text{g/ml}$)
O	5.0	5.0	10	0.63	0.63	
O-1	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	Two-step VM resistance (10 $\mu\text{g/ml}$) (One-step from strain O)
E	50	100	100	0.63	2,000	Multiple-step VM resistance (20 $\mu\text{g/ml}$)
M	50	50	1,000	2,000	2,000	
A	2,000	2,000	2,000	2,000	0.31	
K S	1.25	1.25	2.5	2,000	0.31	SM resistance (1,000 $\mu\text{g/ml}$)
K-1	1.25	1.25	2.5	2,000	0.31	SM resistance (100 $\mu\text{g/ml}$)
K-2	1.25	1.25	2.5	2,000	0.31	SM resistance (100 $\mu\text{g/ml}$)

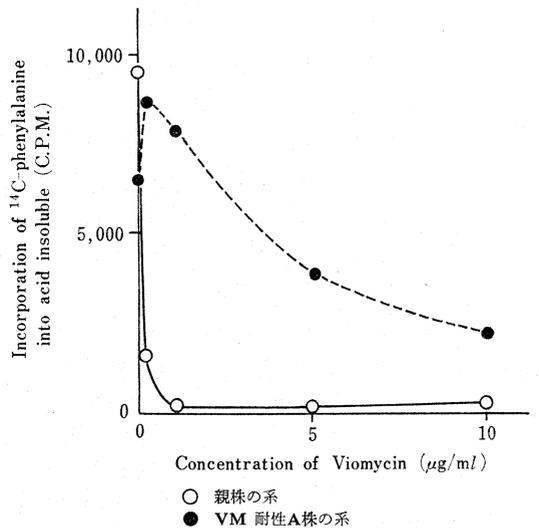
イタリックで示した数字は最小阻止濃度が親株の4倍あるいはそれ以下であることを表し、太文字で示した数字は最小阻止濃度が親株の4倍よりも高いことを表す。

研究は長い間放置されている。著者らはまず抗酸菌の基本的な薬剤耐性機構を明らかにするため、感染の危険性のない *Mycobacterium smegmatis* を取り上げ、薬剤耐性の遺伝生化学的実験を行なった。

3. VM 耐性の多様性²⁰⁾

M. smegmatis から VM 耐性株6株および SM 耐性3株を分離し、他の薬剤に対する感受性を調べた。おのおの最小阻止濃度を求め、表1に示した。N株およびO株は VM を含む寒天培地の上で one-step selection によつて得られた耐性株である。VM 高度耐性株は one-step selection によつて分離することができない。この事実は VM 高度耐性は複数の mutation によつて起こることを示唆している。このNおよびO株は VM のみならず、TUM, CPM, SM, KM 等にも低度ではあるが、同時に耐性を示すので、pleiotropic drug resistance であると考えられる。multiple step selection により、より高度な VM 耐性株、O-1, E, M, A 株が得られた。いずれの株も TUM, CPM, SM に対し耐性である。KM にはA株のみ感受性を示し、他の株は耐性であった。VM 耐性株の SM 耐性度をみると、E株の場合は極めて低い同時耐性を示すが、O-1, A, M 株では高い耐性度を示した。このように VM のみで選択した突然変異株であるにもかかわらず、他の薬剤にも同時に耐性を示すこと、しかもその耐性度には多様性があることが興味ある現象として、浮き彫りにされてきた。一方、SM を含む寒天培地で選択された SM 耐性株 (KS, K-1, K-2) にはそのような現象はみられない。図2に示した疫学的研究結果とよく一致する。この不思議な現象を理解するために、われわれは菌体の内部に立ち入り、詳細に検討することを始めた。

図3 VM 感受性および耐性 *M. smegmatis* の無細胞系での polyphenylalanine 合成に及ぼす VM の影響



4. VM 耐性はリボソームの変異で起こる²¹⁾

VM が抗酸菌の蛋白合成を優先的に阻害することはすでに知られている²²⁾。蛋白合成はリボソームの上で行なわれるが、これにはリボソーム以外に messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), 少なくとも10種の non-ribosomal factor および酵素の働きを必要とする。まず tRNA とアミノ酸は aminoacyl tRNA synthetase の働きで反応し、aminoacyl tRNA を作る。これは Initiation Factor, Elongation Factor, Translocation Factor の働きで、mRNA ribosome の複合体に特異的に配列し、peptide を作る。出来上がった蛋白は Release Factor の働きで、リボソームから release される(図1)。

表2 リボソームにおけるVM耐性の局在

Source of ribosomes	Source of supernatant	Viomycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Incorporation (Counts/min)
Sensitive	Resistant	0	7,382
Sensitive	Resistant	0.1	5,014
Sensitive	Resistant	1.0	490
Resistant	Sensitive	0	12,371
Resistant	Sensitive	0.1	13,349
Resistant	Sensitive	1.0	12,149

表3 リボソーム・サブユニットにおけるVM高度耐性(A株)の局在

Constitution of hybrids		Viomycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Incorporation	
50 S	30 S		Counts/min	%
Sensitive	Sensitive	0	3,120	100
Sensitive	Sensitive	1	481	15
Resistant	Resistant	0	3,086	100
Resistant	Resistant	1	3,320	107
Resistant	Sensitive	0	2,223	100
Resistant	Sensitive	1	3,426	153
Sensitive	Resistant	0	2,291	100
Sensitive	Resistant	1	440	19

この一連の蛋白合成の過程でどの step に VM が作用するのであろうか。また VM 耐性株ではどの step が VM の作用に抵抗するようになるのであろうか。この問題を解明するために以下の実験を行なった。

M. smegmatis を培養し、対数期で集菌し、超音波処理により cell extract を作り、これに polyuridylic acid (poly U) を mRNA として加え、polyphenylalanine を合成する系を作った²³⁾²⁴⁾。この系に VM を加えると polyphenylalanine の合成が明瞭に阻害されることが図3でわかる。VM とリボソームのモル比が 1:1 のとき、ほぼ完全な阻害がみられた。これに対し VM 耐性株では、VM による阻害がみられない。以上の実験結果から蛋白合成系のリボソームに耐性の原因があるのか、あるいは上清画分に含まれる酵素および Factor などに原因があるのか、という疑問が生じてくる。

感受性菌および耐性菌の cell extract を遠心沈殿し、リボソームとその上清画分に分離した。おのおのの画分をそれぞれの菌株の間で相互に交換し、ヘテロの組み合わせの系を作った。どのような組み合わせの系が VM に抵抗するかを調べることにより、どの画分に耐性が局在するか判明するであろう。表2に実験結果を示したが、耐性株のリボソームを含む系にのみ VM 耐性が認められた。すなわち VM 耐性菌はリボソームの変異によって VM の作用を受けなくなっていることが明らかにな

表4 リボソーム・サブユニットにおけるVM中等度耐性(E株)の局在

Constitution of hybrids		Viomycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Incorporation	
50 S	30 S		Counts/min	%
Sensitive	Sensitive	0	4,150	100
Sensitive	Sensitive	0.5	693	14
Resistant	Resistant	0	2,364	100
Resistant	Resistant	0.5	2,010	85
Resistant	Sensitive	0	4,708	100
Resistant	Sensitive	0.5	1,505	32
Sensitive	Resistant	0	2,428	100
Sensitive	Resistant	0.5	2,058	85

表5 細菌のリボソーム阻害剤

A. 30S subunit にその耐性が局在する阻害剤

Streptomycin
Neomycin
Kanamycin
Spectinomycin
Kasugamycin

B. 50S subunit にその耐性が局在する阻害剤

Aminoacyl tRNA と 50S subunit の結合を阻害する薬剤

Macrolide
Thiostrepton
Siomycin A

Transpeptidation を阻害する薬剤

Macrolide

Translocation を阻害する薬剤

Macrolide
Thiostrepton
Siomycin
Lincomycin

C. 30S および 50S subunit のいずれにもその耐性が局在する阻害剤

Viomycin
Tuberactinomycin
Capreomycin

つた。したがって VM はリボソームの機能を阻害する薬剤であることが示唆される。

5. VM 耐性は 30S リボソームの変異でも 50S リボソームの変異でも起こる²¹⁾

リボソームは 50S の particle と 30S の particle から構成されている。これらが associate し、70S の蛋白合成能のあるリボソームを形成する。耐性株ではそのいずれの subunit が変異しているのかを知るために、おのおのの株から 30S と 50S の subunit を分離し、相互に

交換して hybrid 70S ribosome を作り、どのような組み合わせの hybrid ribosome が VM 耐性であるかを cell-free system で調べた。表3に示すように、VM 高度耐性A株では 50S リボソームの変異が VM 耐性の原因であることを示している。しかし VM 耐性度の比較的低いE株の場合は表4に示すように、30S subunit の変異が耐性の原因となつている。

30S リボソームは高濃度の CsCl で処理すると5~7コの蛋白(split protein)と不完全な core particle に解離し、CsCl を除去すると 30S リボソームが再構成される。この性質を利用して、core particle と split proteins をそれぞれ VM 感受性株および 30S に耐性が局在する VM 耐性株から分画し、おのおの間で各分画を相互に交換し 30S リボソームを再構成する。このようにして得た再構成 30S リボソームの薬剤耐性を調べた結果、core particle 部分に VM 耐性が局在することがわかつた²⁵⁾。

以上のように耐性度の低い場合には 30S subunit の変異により、一方高度耐性の場合には 50S subunit の変異によつて、VM 耐性になるということは異例の現象で

ある。表5にわれわれが得た結果を総括した。

従来、腸内細菌における SM, KM, カサガマイシン、スペクチノマイシン等の chromosomal な耐性は、30S リボソームの変異に起因することが知られており、またエリスロマイシン(macrolide)、サイオストレプトンに対しては 50S の変異で耐性となることが知られている。VM の場合はそのいずれの変異でも耐性となるので、表5のCに記載した。このような事実は VM 耐性が複雑な現象であることを示唆しているが、また非常に興味深い現象である。

6. VM 耐性リボソームは一方交通の交叉耐性を示す

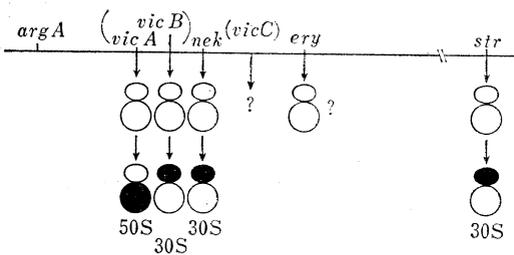
さてこの VM 耐性株は培養のレベルで TUM, CPM, SM, KM にも耐性を示し、その様相は多様であることを前述したが、リボソームの上でもこれが反映されているであろうか。もしリボソームに一方交通の交叉耐性が反映されているならば、われわれは今後このリボソームを更に深く解析することにより、一方交通の交叉耐性の機構を解明することができよう。表6に実験結果の一部を示した。VM 耐性度の比較的低いM株では 30S subunit

表6 VM 耐性 30S リボソームの他の薬剤に対する感受性

Constitution of hybrids		Antibiotics	Strain E		Strain M	
50S	30S		Concn ($\mu\text{g/ml}$)	Incorporation (%)	Concn ($\mu\text{g/ml}$)	Incorporation (%)
Sensitive	Sensitive			100		100
Sensitive	Sensitive	VM	0.5	14	1	11
Sensitive	Sensitive	TUM	1	28	0.5	11
Sensitive	Sensitive	CPM	1	20	0.5	10
Sensitive	Sensitive	SM	1	54	10	69
Sensitive	Sensitive	KM	10	24	10	47
Resistant	Resistant			100		100
Resistant	Resistant	VM	0.5	85	1	59
Resistant	Resistant	TUM	1	63	0.5	48
Resistant	Resistant	CPM	1	48	0.5	49
Resistant	Resistant	SM	1	51	10	95
Resistant	Resistant	KM	10	115	10	104
Resistant	Sensitive			100		100
Resistant	Sensitive	VM	0.5	32	1	13
Resistant	Sensitive	TUM	1	15	0.5	10
Resistant	Sensitive	CPM	1	24	0.5	15
Resistant	Sensitive	SM	1	50	10	43
Resistant	Sensitive	KM	10	42	10	58
Sensitive	Resistant			100		100
Sensitive	Resistant	VM	0.5	85	1	40
Sensitive	Resistant	TUM	1	49	0.5	63
Sensitive	Resistant	CPM	1	50	0.5	51
Sensitive	Resistant	SM	1	57	10	106
Sensitive	Resistant	KM	10	87	10	93

表7 ジヒドロストレプトマイシンと 30S リボソームの結合に及ぼす VM の影響

Antibiotic added	Molar ratio of antibiotic added to [³ H]dihydrostreptomycin	[³ H] dihydrostreptomycin bound	
		cpm	%
None	—	8,268 ± 1,094	100
Viomycin	10	6,909 ± 198	83
	20	6,544 ± 223	79
	30	5,433 ± 295	66
	34	1,493 ± 71	18
Streptomycin	31	8,361 ± 651	101
Kanamycin	30	12,353 ± 1,021	149
Neomycin	37	10,616 ± 953	128
Capreomycin	29	7,840 ± 188	95
Tuberactinomycin-N	33	8,141 ± 240	98
Chloramphenicol	31	8,208 ± 544	99
Erythromycin	25	7,789 ± 292	94

図4 *M. smegmatis* の薬剤耐性に関する遺伝子地図とリボソームの関係

に VM 耐性が局在するが、同時に TUM, CPM, SM, KM にも耐性となっており、培地上での薬剤耐性の関係は十分にリボソームに反映されている。E株においては、TUM, CPM, KM に同時に耐性になっているが、培地のレベルでみられた SM に対する極めて低い耐性はこの系では検出できなかった。

一方、SM 耐性菌を高濃度 SM を含むプレート上で分離しテストすると、培養のレベルでも、リボソームのレベルでも、SM のみに耐性を示し他の薬剤には耐性を示さない。このように一方交通の交叉耐性はリボソームのレベルで実証された。

7. リボソームの上で VM の結合サイトと SM の結合サイトの間には interaction がある²⁶⁾

一方交通の交叉耐性はなぜ起こるか。その機構をうかがい知るための資料になる一つの興味深い現象がある。

[³H] でラベルしたジヒドロストレプトマイシンをリボソームに結合させた後、過剰の VM を加え、Millipore Filter で濾過し、フィルター上に保持されたリボソームを buffer で十分に洗浄した後、放射能を測定すると、VM を加えなかった control のリボソームに比べて、ジ

ヒドロストレプトマイシンの結合量が少ないことがわかった(表7)。この事実はリボソーム上の VM の結合サイトとジヒドロストレプトマイシンの結合サイトは互いに interaction があり、VM がリボソームと結合することにより、SM とリボソームの親和力は減少することを示唆している。

なお VM の結合サイトとジヒドロストレプトマイシンの結合サイトは同じ部位ではなく違う部位であろうと考えざるをえないデータが遺伝子地図とリボソームの研究から得られている^{27)~29)}。すなわち *M. smegmatis* のクロモソームの上で VM 耐性の locus が二つある。一つは 50S リボソームの変異を支配するもので、vic A と呼ばれ、もう一つは 30S リボソームの変異を支配するもので、vic B と名付けられている。これに対し、SM 耐性の locus は全く違う場所にあり、30S リボソームの変異を支配している(図4)。このことは VM 耐性も SM 耐性もリボソームのおのおの異なる component の変異に結びつくものであり、したがってリボソーム上の結合サイトも異なると考えた方が理論的であろう。

8. なぜ一方交通の交叉耐性が起こるか

リボソーム上において、VM の結合サイトと SM の結合サイトは互いに interaction があることは前述した通りであるが、実はこの interaction が一方交通の交叉耐性の原因となつていることが、以下に述べる水口、須賀両博士との共同研究の結果からようやく明らかになつてきた^{30)~33)}。

VM 耐性 A 株は multi-step selection で分離した株であり、このような VM 高度耐性株は multi-step selection によつてのみ得られる。したがって多数の mutation が高度耐性の発現に必要であることが考えられる。A 株と雌となる PM-5 株 (VM 感受性) の間で conjugation を

行なわせ、低度および高度 VM 耐性の recombinant を分離し、その性状を調べると、高度耐性の recombinant は常に SM 耐性を随伴しているが、低度耐性の recombinant は SM 耐性は示さない。SM 耐性が脱落している低度 VM 耐性株に SM 耐性を入れると、VM 高度耐性株に転換する。

リボソームのレベルでこの現象が起こっていることが次の実験からわかる。すなわち 50S リボソームにある低度 VM 耐性は SM 耐性をもつ 30S リボソームと associate することによつて高度 VM 耐性となる。現在進行しつつある実験結果は KM 耐性も高度 VM 耐性の発現に必要であることを示している。

このように、VM 高度耐性獲得の過程で、SM, KM に耐性になることが必要であることが理解できるようになってきた。一方、高度 SM 耐性の獲得には VM 耐性の助けは全く必要がないと考えられる。

9. 薬剤耐性菌を感受性菌に転換させることは可能である

第49回日本結核病学会総会³⁴⁾において、結核病学の未来についての特別講演で、山村雄一先生は薬剤耐性菌を感受性菌に転換できるだろうか、という疑問をわれわれに提示されました。

リボソームの変異は多様である。30S リボソームは 21コのリボソーム蛋白と 16S の 1本の RNA からできている。50S リボソームは34種の蛋白と 23S および 5S の 1本ずつの RNA からできている。このように多数の component はいずれも突然変異により変化しうる。リボソームの構成成分である蛋白または RNA の変化は種々の薬剤に対するリボソーム全体の反応性を変え、薬剤耐性の発現という形をとることになる。おのおの component は互いに影響し合っているため、リボソーム全体としては変異した component に対応する形質に止まることなく、複雑多岐にわたる構成成分の相互作用によつて多様な形質の発現となつてあらわれる。

したがつて複数の突然変異の組み合わせ如何によつては、一つの変異の発現、例えばある特定の薬剤に対する耐性が消える可能性も十分に考えられる。このような議論をおすすめていくと、理論的には、ある薬剤に対する耐性の発現を消すために、他のある特定の薬剤に耐性にさせることによりコントロールすることが可能である。

このような可能性を示唆するものとして、次のような実験事実が報告されている。すなわち Apirion³⁵⁾ は 50S リボソームに変異のあるエリスロマイシン耐性大腸菌は、30S リボソームに SM, スペクチノマイシン耐性を獲得させることにより、エリスロマイシン感受性に転換する事実を示した。

10. おわりに

以上述べたように、抗酸菌における一方交通の交叉耐性の機構を、gene およびリボソームのレベルで理解することが可能な時代を迎えた。同時に将来、一般論として、薬剤耐性リボソームを人為的にコントロールして感受性に転換できる光明を見出しうるものと確信してよい。

残された問題は、患者由来結核菌の薬剤耐性獲得に、どの程度の頻度でリボソームの変異が関与しているかということであり、また R 因子による伝達機構があるのか、もしあればその耐性と頻度はどの程度か、ということであろう。われわれが示した遺伝子およびリボソームのレベルでの一方交通の交叉耐性の現象は疫学的データと一致することから、結核菌においては高頻度でクロモソームの耐性が関与していることは十分予測できる。いづれにしても、薬剤耐性という化学療法で最後に残された問題を解決するためには、基礎的な研究成果を積み重ねることが、遠まわりではあるが確実な道である。梅沢博士らが R 因子による不活化機構の基礎的研究から出発して、deoxykanamycin を作り出したことを大きな教訓としなければならぬ。

謝 辞

本稿を終るにあたり、座長をつとめて下さった主任教授である堀三津夫教授、ならびに兵庫医大庄司宏教授に研究を進めるにあたり、ご助言ならびにご援助を賜わったことに対し謝意を表します。本稿に使用した実験結果は多数の研究者の共同研究によるものであります。特に国立予防衛生研究所水口康雄博士の終始変わらぬご理解と友情に厚くお礼申し上げます。水口博士の共同研究者須賀清子博士ならびに兵庫医大川口久美子博士のご理解とご援助に厚くお礼申し上げます。

なお、この研究に深いご理解を示し、今村賞に推薦して下さいました山村雄一教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Yamada, T., Tipper, D. and Davies, J.: Nature (Lond), 219: 288, 1968.
- 2) Yamada, T., Kvittek, K. and Davies, J.: Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy. Vol.2. University Park Press, Baltimore.
- 3) Ozaki, M., Mizushima, S. and Nomura, M.: Nature (Lond), 222: 333, 1969.
- 4) Coletsos, P. J. and Oriot, M. E.: Ann. Inst. Pasteur Paris, 107: 215, 1964.
- 5) Endo, K., Takahashi, M., Hashimoto, H. and Mitsuhashi, S.: J. Antibiot. Ser. B 20: 251, 1967.
- 6) Koseki, Y. and Okamoto, S.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 16: 31, 1963.
- 7) 前田徹: 結核, 35: 159, 1960.
- 8) Marse, W. C., Sproat, E. F. and Arrington, C.

- W.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 135: 983, 1966.
- 9) 永田彰・間瀬南・山本正彦・中村宏雄: *結核*, 44: 173, 1969.
 - 10) 斎藤健利・福原徳光: *結核*, 49: 91, 1974.
 - 11) Steenken, W., Montabine, W., Jr. and Thurston, J.R.: *Am. Rev. Tuberc.*, 79: 66, 1959.
 - 12) Sutton, W.B., Gordee, R.S., Wick, W.E. and Stanfield, L.V.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 135: 947, 1966.
 - 13) Torii, F., Yamamoto, M. and Hayashi, M.: *J. Antibiot. Ser. A12*: 103, 1958.
 - 14) Tsukamura, M.: *Jap. J. Genet.*, 34: 275, 1959.
 - 15) Tsukamura, M., Noda, Y. and Yamamoto, M.: *J. Antibiot. Ser. A 12*: 323, 1959.
 - 16) 東村道雄・外山春雄・水野松司・東村純雄: *結核*, 42: 399, 1967.
 - 17) Verbist, L. and Gyselen, A.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 90: 640, 1964.
 - 18) 和田退蔵: *結核*, 40: 283, 1965.
 - 19) Welch, H., Wright, W.W., Weinstein, H.I. and Staffa, A.W.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 76: 66, 1958.
 - 20) Yamada, T., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6: 46, 1974.
 - 21) Yamada, T., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: *J. Bacteriol.*, 112: 1, 1972.
 - 22) Tsukamura, M.: *J. Biochem.*, 47: 685, 1960.
 - 23) Yamada, T., Kawaguchi, K., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 106: 769, 1972.
 - 24) Lee, K. J., Yamada, T. and Masuda, K.: *Biken J.*, 19: 71, 1976.
 - 25) Yamada, T.: submitted for *Biken J.*, 1976.
 - 26) Masuda, K. and Yamada, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 435: 333, 1976.
 - 27) Suga, K. and Mizuguchi, Y.: *Japan. J. Microbiol.*, 18: 139, 1974.
 - 28) Mizuguchi, Y., Suga, K., Masuda, K. and Yamada, T.: *Japan. J. Microbiol.*, 18: 457, 1974.
 - 29) Yamada, T., Masuda, K., Mizuguchi, Y. and Suga, K.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, in press, 1976.
 - 30) 水口康雄・須賀清子・山田毅・川口久美子: 第49回日本細菌学会総会(東京), 1976.
 - 31) 山田毅・川口久美子・水口康雄・須賀清子: 第49回日本細菌学会総会(東京), 1976.
 - 32) Mizuguchi, Y., Suga, K., Yamada, T. and Kawaguchi, K.: *International Colloquium on the Genetics of the Actinomycetales*, 29, Sept.-1, Oct., 1976.
 - 33) Yamada, T., Kawaguchi, K., Mizuguchi, Y. and Suga, K.: *International Colloquium on the Genetics of the Actinomycetales*, 29, Sept.-1, Oct. 1976.
 - 34) 山村雄一: *結核*, 49: 363, 1974.
 - 35) Saltzman, L. and Apirion, D.: *Molec. gen. Genet.*, 143: 301, 1976.