

## 総 説

## 抗 酸 菌 に お け る 交 叉 耐 性

— 遺 伝 学 的, 生 化 学 的 考 察 —

水 口 康 雄

九州大学医学部・微生物学教室

山 田 毅

大阪大学微生物病研究所

受付 昭和 52 年 10 月 22 日

## CROSS RESISTANCE IN MYCOBACTERIA

— Biochemical and Genetic Aspects —

Yasuo MIZUGUCHI\* and Takeshi YAMADA

(Received for publication October 22, 1977)

It has been known that cross resistance relationships among aminoglycoside and peptide antibiotics in mycobacteria are very much complicated depending on the different authors and mutants used in the investigations. In this review, discussions were made on the possible nature of the complexity of mycobacterial cross resistance.

From biochemical point of view, mechanisms of drug resistance can be classified into two categories. One is governed by R plasmid, and the resistance to the antibiotics were due to inactivation of the drugs by enzymes. In this case, cross resistances were determined by substrate specificity of the enzymes. For instance, drug resistance pattern of a cell having an enzyme aminoglycoside-3'-phosphotransferase I is different from that having aminoglycoside-3'-phosphotransferase II. There have been no reports on the presence of R plasmid in mycobacteria. Recently, however, a strain of *M. tuberculosis* having kanamycin acetylating enzyme has been isolated. Possibly, at least some of the drug resistant clinical isolates have R plasmids in their cytoplasm.

Most of the resistant mycobacteria isolated in the laboratory and perhaps some of the clinical isolates also, have altered ribosomes. Mutants with altered ribosomal components often show cross resistance of various phenotypes. For instance, mutation in *vicA* gene which determines a component of 50S ribosomal subunits, confers resistance to viomycin and capreomycin but does not show cross resistance to kanamycin. On the contrary, mutation in *vicB* gene which is a structural gene for 30S ribosomal subunits, confers resistance to viomycin, capreomycin and show weak cross resistance to kanamycin.

There are evidences of functional co-operation between different ribosomal components. For instance, the levels of resistance to viomycin due to a change in 50S ribosomal component greatly increased when streptomycin resistant mutation was introduced into the strain. Such a functional co-operation also makes cross resistance complicated.

\* From the Department of Microbiology, Kyushu University, School of Medicine, 3-1-1, Maidashi, Higashiku, Fukuoka 812 Japan.

## 1. はじめに

結核菌の示すアミノグリコシドおよびペプチド系抗生物質に対する耐性ならびに交叉耐性は、これらの薬剤が結核症の治療上重要な位置を占めているのみならず、生化学的・遺伝学的にも興味深い問題であることなどの理由からこれまでに多くの報告がなされ、また最近総説<sup>1)~3)</sup>も発表されている。

これらの総説においては、耐性、交叉耐性の定義、これまでの多くの報告から導かれる交叉耐性の一般的なパターンなどについて詳しい考察がなされているが、それらの本態を理解する上でもっとも重要な生化学的、遺伝学的な面に関してはほとんどふれられていない。

これまで結核菌を用いて耐性の機構を生化学的にしらべた研究はまれであるが、同じミコプラクテリアに属する *Mycobacterium smegmatis* を用いて、著者らを中心として多くの発表<sup>4)~11)</sup> がなされており、またより一般的ではあるが大腸菌やその他の細菌を用いての研究から、結核菌における耐性、交叉耐性の機構を類推することが相当程度可能になつてきているように思われる。そこで本稿においては遺伝生化学的な面に的をしばつた交叉耐性の機序について考えてみたい。

なお、結核菌におけるアミノグリコシド系、ペプチド系薬剤に対する耐性獲得の形式や、交叉耐性のパターンを数多くの文献から拾つてみると、おおまかな所では一致するものの、細かく分析すると、報告によつて、また菌株によつて微妙な違いが認められる。これらの違いがどのような機構で生じるのかについても考察する予定である。

## 2. 遺伝生化学的な観点から耐性菌を2大別する

これまでに知られた事実は耐性の遺伝学的背景に大きく2種類のものがあることを示している。その第1は染色体外性の遺伝因子によつて決定されるものである。この染色体外性の遺伝因子のうちR因子という言葉は感染性(伝達性)を有するものだけに限つて使われ、伝達性をもたないものは、例えばブドウ球菌のペニシリナーゼプラスミドというように呼ばれてきたが、最近では薬剤耐性を決定する遺伝子をもつ染色体外性遺伝因子を伝達性のあるなしにかかわらずRプラスミドと呼ぶような働きかけがなされている<sup>12)</sup>ので、本稿においてもRプラスミドという言葉を使用する。

第2のものは染色体性遺伝子の変更によるもので、アミノグリコシド系薬剤に関する限り、第1のものと第2のものではその生化学的な耐性の機構が全く異なることがよく知られている。例えばRプラスミドによるSM耐性はそのプラスミド上にある耐性遺伝子の産物である酵素が薬剤を化学的に修飾(アデニル化など)してその作

用を不活性化させる<sup>13)14)</sup>ため、このような薬剤はリボソームに結合できなくなる<sup>15)</sup>ことが知られている。この場合、交叉耐性のパターンはその酵素の基質特異性によつて決まるのであるが、染色体性遺伝子の変異によるものは、SMの作用標的であるリボソームを構成する蛋白が変化することによつて生じる<sup>16)</sup>。

Rプラスミドの分布はグラム陰性、陽性菌を問わず非常に広い範囲に及んでおり、臨床上分離される耐性菌の多くはこのRプラスミドによるものである。淋菌はこれまでその例外で、染色体性遺伝子の変異による耐性菌のみが得られるとされていた<sup>17)</sup>が、最近Rプラスミドの存在が確認された<sup>18)</sup>。結核菌の耐性獲得が第1、第2のいずれの機構によるものかというこの論文におけるある意味では根本的な問題が長い間手つかずの状態では放置されてきたが、最近 Mitsuhashi 氏<sup>19)</sup>は臨床分離 KM 耐性結核菌から KM アセチル化酵素を分離しており、Rプラスミドが存在する可能性が強く示唆された。しかしすべての患者由来の耐性菌がRプラスミドによるか否かはまだ不明であり、交叉耐性を論じる場合、常に2つの可能性を考えておく必要があるものと思われる。

## 3. 表現型としての交叉耐性

アミノグリコシド系抗生物質にはストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、ネオマイシン(NM)、パロモマイシン(PM)、ゲンタマイシン、リビドマイシン(LVM)、リボスタマイシン、ブチロシン等数多くの種類があるがこのうち結核菌に有効なものはSM, KM, NM, PM, LVMなどである。一方ペプチド系抗生物質にはバイオマイシン(VM)、カプレオマイシン(CPM)、エンピオマイシン(EVM、またはチュベラクチノマイシン)があり、いずれも結核菌に効力を示すことは周知の通りである。

最近交叉耐性のパターンからこれらの薬剤を3群に分類する試みが提案された<sup>3)</sup>。それによるとI群はSM, II群にはVM, CPM, EVM, III群にはKM, LVM, PMが入り、アミノグリコシド系薬剤がI群のSMとIII群のKM, LVMに分かれ、ペプチド系の3剤はいずれも2群に入っている。種々な報告の結果を総合すると、II群もしくはIII群の薬剤のどれか1つに耐性になつた菌は同じ群の他の薬剤に完全な交叉耐性を示す。いいかえるとSMを除いて、化学構造式の似た薬剤は完全な交叉耐性を示すわけで、このことはこれらの薬剤のリボソーム上での作用点や作用機序が全く等しいか、あるいは非常に似ていることを意味しているものと考えてよいと思われる。

これらの群内における完全交叉耐性の他に、II群とIII群の間に、あるいはI群とII群、I群とIII群の間に様々な程度の交叉耐性がみられるのは多くの報告<sup>1)~4), 20) 21)</sup>

で周知の通りである。

#### 4. アミノグリコシド系およびペプチド系抗生物質の作用機序とリボソームにおける耐性

これまででもつとも詳細な研究がなされているのは SM についてである。SM は複雑な作用を示すが、蛋白合成時のコードの誤読 (misreading)<sup>22)</sup>、それとは矛盾するような蛋白合成開始の完全な阻害<sup>23)</sup>、ポリゾームの部分的な崩壊、等リボソームの機能にかかわるもの他に膜の障害も引き起こす<sup>24)</sup>ことが知られている。大腸菌では試験管内で分離される耐性菌は、リボソーム蛋白 (30S 亜粒子の S12 と呼ばれる蛋白) の変異によつて起こる<sup>16)</sup>が、この S12 蛋白の N 末端から 42 番目もしくは 87 番目のアミノ酸のリジンが他のアミノ酸に置換されることによつて SM 耐性が生じる<sup>25)26)</sup>。このようにわずかに 1 個のアミノ酸の変化によつて SM がリボソームに結合できなくなることが SM 耐性の機構である。

Shaila<sup>27)</sup>は結核菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株を用いて SM が同様にリボソームに働いて蛋白合成を阻害すること、耐性菌から得られたリボソームでは SM による阻害がみられないことを報告した。なおリボソームのレベルではエリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン等によつても蛋白合成の阻害が起こることから、これらの薬剤に結核菌が感受性を示さないのは薬剤が細胞内に浸透できないためであろうとしている。彼らはまたおそらく膜の透過性が変化したと思われる低度 SM 耐性菌 (10 $\mu$ g/ml) を分離している。

*M. smegmatis* から分離した SM 耐性菌は、リボソームの 30S 亜粒子のある構成分子が変化していることが見出された<sup>9)</sup>。これまでの研究からは 30S のどの部分に変化が生じたかは明らかにされていないが、おそらく core particle に含まれる蛋白分子であろうと考えられる結果が得られている。

KM の作用機序は大腸菌においても SM ほど詳しくは調べられていないが、SM と同様 misreading とペプチド結合の形成の阻害を起こすといわれている<sup>28)</sup>。今野<sup>29)</sup>は BCG 由来のリボソームを用いて *in vitro* のポリペプチド合成に対し、KM が明らかに阻害作用をもつこと、またポリゾームの崩壊、*m*-RNA の離脱が起こることを報告している。

大腸菌においては KM に対する耐性菌は 30S 亜粒子のおそらく S6 と呼ばれる蛋白に変化が生じているものと考えられている<sup>30)</sup>。*M. smegmatis* の KM 耐性菌のリボソームは KM に対して耐性 (KM による蛋白合成阻害がみられなくなる) であり、しかもその耐性の変異は 30S 亜粒子の方に生じていることがわかつた<sup>9)</sup>。

LVM の作用機序は Mitsuhashi<sup>31)</sup>によつて報告され KM とよく似ていることが知られている。

一方ペプチド系薬剤の VM はペプチドがリボソーム上を動く過程 (translocation) を阻害することが報告された<sup>32)</sup>。この問題は著者らにより継続的に研究が進められ、近い将来詳しく報告される予定である。VM 耐性の機構に関しては次の項で詳述する。

#### 5. リボソーム遺伝子の変異による交叉耐性

Apirion<sup>33)</sup>らは大腸菌の KM 耐性と NM 耐性は同一遺伝子に起こつた変異によつて表現されていることを見出した<sup>33)34)</sup>。すなわち KM 耐性菌は常に NM 耐性であり、NM 耐性菌は常に KM 耐性を示すこと、これらは結局同一遺伝子に起こつた変化であつて、その表現型として NM および KM に耐性を示すことなどである。この NM-KM 耐性遺伝子は前述のようにおそらく 30S リボソームの S6 蛋白の構造遺伝子であると考えられている。このようにある 1 つの蛋白に変化が起こつた結果、構造式のよく似た NM と KM に耐性が同時に表現される——すなわち完全な交叉耐性が生じる——わけで、このことは逆にこの 2 つの薬剤の作用機序が極めて近いものであることを示していると考えてよいであろう。なお、この耐性菌は SM やスペクチノマイシンに対し感受性の低下、すなわち軽度の交叉耐性がみられている。

*M. smegmatis* においては次のことが観察された<sup>35)36)</sup>。すなわち KM 高度耐性菌として分離された菌はすべて KM 1,000 $\mu$ g/ml に耐性、NM 500 $\mu$ g/ml に耐性であり、NM 耐性菌として分離された菌もすべて同じ耐性を示し、遺伝解析の結果はこれらは同一の遺伝子に起こつた変異であることを示していた。これらの交叉耐性は当然のことながら細胞全体としてみた場合だけでなく、*in vitro* のリボソームレベルでも成立し、NM-KM 耐性の菌株より抽出したリボソームは NM, KM 両者に対して耐性を示し、その耐性は 30S 亜粒子に存在している<sup>9)</sup>。

結核菌においても *H<sub>37</sub>Rv* 株と同様な交叉耐性が NM-KM 間に認められている<sup>37)</sup>。おそらく同一遺伝子による表現であろう。

このような NM-KM 間におけるものと同じ関係が VM と CPM の間にも認められた。*M. smegmatis* Rabinowitchi 株と PM5 株から得られた VM 耐性菌はすべて CPM に耐性で、CPM 耐性菌もすべて VM に完全な交叉耐性を示していた<sup>35)</sup>。ところが遺伝解析の結果はこの VM-CPM 耐性菌には 2 種類のものがあり、1 つは *vicA* 遺伝子に変異が生じており、他は *vicB* 遺伝子の変異株であつた<sup>36)</sup>。更にその後の研究によつて *vicA* 変異株はリボソームの 50S 亜粒子に耐性が存在していること (すなわち *vicA* 遺伝子の産物は 50S 亜粒子の蛋白もしくは RNA である)、*vicB* 変異株は 30S 亜粒子に耐性が存在することが明らかとなつた<sup>9)</sup>。なお興味あることに NM-KM 耐性菌はすべて VM および

CPM に低度の交叉耐性を示し、VM・CPM 耐性菌は *vicB* 変異株のみが NM, KM に対して感受性の低下がみられた。

KM と LVM 間にみられる交叉耐性、EVM と VM または CPM の間にみられる交叉耐性についてはこれまで遺伝学的な検討を行なっていないため、上述の KM・NM のような関係が成立するか否かは不明であるが、LVM と KM は構造的にも似た抗生物質であり、EVM も VM 同様ペプチド系の薬剤であることなどから考えて、これら薬剤間にみられる交叉耐性はこれまでに述べてきたような遺伝学的な背景をもっている可能性が高い。

## 6. リボソーム遺伝子の変異による表現型の多様性

よく知られている事実であるが、同じ菌株から得られた耐性菌でも、菌株によつて耐性度や交叉耐性のパターンが異なることがしばしば認められている。例えば KM においては低度耐性菌は他の薬剤と交叉耐性を示さないが高度耐性菌になると LVM や CPM に交叉耐性を示す<sup>39)</sup>という報告がある。このような場合、いくつかの異なつた機構が考えられる。

まず第1には VM・CPM 耐性のところで述べたように、別個の遺伝子によつて耐性が表現されている場合である。*vicA* 遺伝子は 50S 亜粒子の遺伝子であるが、この遺伝子に生じた変異は NM や KM に交叉耐性を示さない。それに反し、*vicB* 遺伝子に生じた変異は KM, NM に対して感受性の低下を示す。このようにある薬剤に対し耐性という表現型を示して分離された耐性菌の遺伝子型が異なるということはリボソーム遺伝子に関してはしばしば認められている。例えば枯草菌のクロラムフェニコール耐性菌には6種類の異なつた遺伝子型があり、そのうち5種類は50S 亜粒子の蛋白(50a, b, c, e, f)のどれか1つに変異を起こしていることが知られている<sup>39)</sup>、大腸菌のエリスロマイシン耐性菌にも2種類あつて *eryA* は 50S 亜粒子の L4 といわれる蛋白の、*eryB* は L22蛋白の遺伝子に変異が生じている<sup>40)</sup>。

ミコバクテリアにおける VM・CPM 耐性遺伝子は上述の *vicA*, *vicB* のみではないらしいことがその後の研究結果から予測されている。このように変異が異なつた遺伝子に生じた場合、耐性のレベルや交叉耐性のパターンが当然異なつてくるであろう。

第2の機構として可能性をもつものに同一遺伝子に起こつた変異ではあるが、変異の起こり方が異なるというものがあげられる。遺伝子 DNA に起こつた変異(ヌクレオチドの並びの変化)は当然 RNA のヌクレオチド配列の変化、蛋白におけるアミノ酸配列の変化として表現されるが、SM 耐性のところで述べたように、大腸菌の SM 耐性は S12蛋白の42もしくは87番目のアミノ酸が他のアミノ酸におき変わることによつて生じる。この場合

置換されたアミノ酸の場所と種類によつてその変異株のもつ suppression の能力に差が生じることが報告された<sup>25)26)</sup>。また 30S 亜粒子の S5 蛋白を支配する遺伝子に生じた変異によつて次のような性質が現れることが知られている。① SM 依存性(S12蛋白の変異によつて生じる)から非依存性への復帰<sup>41)</sup>、②スペクチノマイシン耐性の獲得<sup>42)</sup>、③リボソームの sedimentation profile の異常<sup>43)</sup>などである。このほか S5 蛋白は菌株によつて差がみられやすい蛋白の1つであることも知られている<sup>44)</sup>。

ミコバクテリアでもこのような変異株が存在する可能性がある。*M. smegmatis* Rabinowitchi 株から KM 耐性菌を分離すると、高度耐性菌(1,000 $\mu$ g/ml)、中等度耐性菌(100 $\mu$ g/ml)と低度耐性菌(10 $\mu$ g/ml)が得られるが、これらの変異は同一遺伝子上に起こっているらしいことがこれまでの遺伝解析の結果から推察されている(未発表データ)。

第3の機構として2つ以上の遺伝子の共同作用によるものがあげられる。試験管内分離株で1段階で得られた耐性菌ではこのような種類の耐性菌は少ないと思われるが、zero ではなく、患者由来の高度耐性菌の場合にはより可能性が高い。

2つ以上の遺伝子に変異が生じた場合、個々の変異の示す表現型の和として性質が現れる場合、いいかえるとお互いの変異の間に特別な協同作用が認められない場合と、協同作用の結果、思いもかけなかつたような性質が現れる場合とがある。前者に関しては例えば SM 耐性と KM 耐性の変異が生じれば当然この菌は SM と KM の両者に耐性を示すようになるということであつて詳しい説明は不要であるが、後者に関していくつかの例をあげてみたい。

大腸菌の SM 依存性変異は SM 耐性同様 30S 亜粒子の S12 蛋白の変異によつて生じるが<sup>45)</sup>、依存性から非依存性(dependence $\rightarrow$ independence)への変異をみると、S12蛋白が元にもどつた復帰変異の他に、全く異なる蛋白(S4 もしくは S5)における変化が同じ表現型を示す<sup>46)</sup>。このうち S5 の変化は単一アミノ酸の置換によるものであるが、S4 の変化はペプチド鎖の短縮もしくは延長による<sup>47)48)</sup>。

同じく大腸菌のエリスロマイシン耐性は 50S 亜粒子の L4 または L22 蛋白の変化によつて生じるが、そのうち L4 に生じた変化による耐性菌は 30S 亜粒子の2個の蛋白に生じた変化、すなわち SM 耐性(S12)とスペクチノマイシン耐性(S5)をこの菌に導入することによつて感受性の表現型を取るようになること<sup>49)</sup>、更にこの菌に 30S 亜粒子の 16S RNA の変化(カスガマイシン耐性)をつけ加えると、再びエリスロマイシン耐性が出現することが知られている。この場合、表現型がエリスロマイシン感受性になつたリボソームにはエリスロマイシンが

結合できるが、耐性の菌には結合できない<sup>50)</sup>。

*M. smegmatis* ATCC 14468 株から耐性菌を分離してみると、SM や KM 高度耐性菌は1段階の選択で分離されるが、VM 高度耐性菌を得るためには2段階以上のステップで耐性を上げることが必要であつた<sup>57)</sup>。このようにして得られた VM 高度耐性のある株 AC16 は SM・KM に完全交叉耐性を示していた。この菌についてどのような遺伝子に変異を起しているか調べてみたところ、SM 耐性遺伝子(この場合この遺伝子のみの変異では KM・VM に交叉耐性を示さない)、KM 耐性遺伝子(VM に低度の交叉耐性を示す)および VM 低度耐性(5 $\mu$ g/ml) の3つの遺伝子に変異が生じていることが明らかとなつた。このうち前2者の遺伝子は 30S 亜粒子の構造遺伝子である。この菌は VM のみに接触させて得られた菌であり、このように一見 VM とは関係のない SM および KM 耐性の遺伝子に変異を起しているが VM 高度耐性という性質を表現するためにはこれら遺伝子の協同作用が必要であることが明らかとなつた(投稿中)。

一方同じような VM 高度耐性菌 AC13 株は KM には感受性で SM 高度耐性を示すが、この菌は *vicA* 変異株同様に VM 耐性の変化は 50S 亜粒子のみに生じており、SM 耐性は 30S 亜粒子に存在している。この菌について遺伝解析を行なつてみると、50S に生じた VM 耐性変異のみでは VM 低度耐性(10 $\mu$ g/ml) を示すにすぎず、VM 高度耐性を示すには 30S の SM 耐性の変異が加わることがどうしても必要であつた(投稿中)。

このようなリボソームにおける遺伝子産物(蛋白や RNA) の相互間の interaction はなぜ生じるのであろうか。詳しいことは不明であるが、おそらくリボソームの立体的、三次元的構造が関与しているものと考えられている。大腸菌のリボソームは 50S 亜粒子と 30S 亜粒子よりなる分子量約 270 万の粒子で、前者には2種類の RNA と 34種の蛋白分子が、後者には1種類の RNA と 21種の蛋白分子が存在する。ミコバクテリアでもほぼこれと同じ構造をもつことが考えられるが、このように沢山の分子が集まつてある定まつた立体構造を取つて蛋白合成の場としての機能を果たしている。そこである遺伝子に変異が起こると、その結果 RNA のヌクレオチドもしくは蛋白のペプチド鎖に変化が生じる。この変化は当然その RNA もしくは蛋白の立体的な構造に変化をもたらすが、その影響は自己の分子のみに留まらず隣接している他の蛋白や RNA にも及ぶはずである。このようにしてリボソーム全体がある変化を受けた結果、これまで結合できた薬剤が結合できなくなる、ということで耐性が表現されるとすれば、例えば A という蛋白の変異でも B という蛋白の変異でもある薬剤に対して耐性を発現させることが可能であり、その形の微妙な違いが耐性のレ

ベルや交叉耐性のパターンを決定するのではなからうか。一方ある蛋白の変化によつて表現された耐性が他の遺伝子の変化によつて増強されたり、あるいは全体として元の形に近くなつて感受性へ復帰することもありうるであらう。

## 8. 菌株間にみられるリボソームの違い

以上のように1種類の菌においてもある薬剤に対し多様な変異株が得られることのほかに、交叉耐性の多様性のもう1つの原因に菌株によつてリボソームを構成する蛋白に差があることを考慮に入れる必要がある。

Osawa ら<sup>40)</sup>は大腸菌の多くの株についてリボソームの解析を行なつたところ、C タイプの菌と B 株では 30S 亜粒子のある1つの蛋白に差があること、C 株と K12 株の間にも別の蛋白であるが同様に1個の違いがみられること、もつとも離れた菌では 50S 蛋白に6個、30S 蛋白で4個のものが C 株と異なることを見出した。また大腸菌(K12株)とネズミチフス菌の間には 30S 亜粒子で4個、50S 亜粒子で6個の蛋白に違いがみられることをカルボキシメチルセルロースのカラムクロマトグラフィを用いて証明している<sup>51)</sup>。

このような菌株間にみられる差はミコバクテリアでは更に大きく、川口ら(投稿中)は *M. smegmatis* に属する菌株11株について、その 50S 亜粒子の蛋白を同じ方法でしらべたところ、ATCC 14468, *Lacticola*, *Rabinowitchi* の3株間には全く差が認められなかつたが、獣調株と ATCC 14468 の間には2個、ATCC 14468 と ATCC 607 の間には3個(そのうち2個は獣調株と共通)、ATCC 14468 と PM 5 株の間には5個、ATCC 14468 と西1株の間にも5個、ブチリクム株も同様に5個の蛋白に差がみられた。*M. smegmatis* と *M. phlei* の間ではほとんど共通の蛋白が認められず、*M. smegmatis* と *M. chelonae* の間にも全く共通の蛋白が認められなかつた。この結果は同じミコバクテリアに属していても、そのリボソームには非常な差があることを示しており、*M. smegmatis* と *M. phlei* の開きは 大腸菌とサルモネラのそれよりも大きいことになる。リボソームという生命維持に不可欠な器官は進化による変化を比較的受けにくいと想像されるので、ここでみられる差は非常に大きいといわねばならない。*M. smegmatis* に属する菌株間の方にさえ大腸菌とサルモネラの間にもみられるほどの差が存在するのは一つは分類学の精度の問題であるとも思われるが、それは別の問題として、リボソームにこのような遺伝的多様性をもつ菌から分離される耐性菌の耐性度や交叉耐性のパターンなどが異なることはある意味では当然のことと考えられる。

Table 1. Aminoglycoside Antibiotics-Inactivating Enzymes

Enzyme	Antibiotics affected	Antibiotics not affected
Aminoglycoside-3'-phosphotransferase I	KM(A, B, C), RM, NM, PM, LVM	DKB, TM, BUT, AMK
Aminoglycoside-3'-phosphotransferase II	KM(A, B, C), RM, NM, PM, BUT, AMK	LVM, DKB, TM
Aminoglycoside-3''-phosphotransferase	SM, DHSM	
Aminoglycoside-2''-nucleotidyltransferase	KM(A, B, C), DKB, TM, GM	AMK, BUT
Aminoglycoside-3''-adenyltransferase	SM, SPC	
Aminoglycoside-6'-acetyltransferase	KM(A, B), DKB, TM, GM, RM, NM	KM(C), PM
Aminoglycoside-3-acetyltransferase	GM	
Aminoglycoside-2'-acetyltransferase I	GM, TM, LVM	KM(A, B, C), DKB
Aminoglycoside-2'-acetyltransferase II	GM, DKB, TM, BUT, KM(B, C), LVM, NM	KM(A), AMK

KM : kanamycin, RM : ribostamycin, NM : neomycin, PM : paromomycin, LVM : lividomycin, BUT : butirosin, TM : tobramycin, GM : gentamycin, SM : streptomycin, DHSM : dihydro-streptomycin, SPC : spectinomycin, AMK : amikacin.

### 9. 不活化酵素による交叉耐性

薬剤耐性の生化学的機構の第1に不活化酵素によるものをあげた。論旨の展開上、第2の機構を先に取りあげたが、ここで第1の機構について説明したい。

結核菌あるいはその他のミコプラズマにおいてはこれまで多くの菌においてその存在が報告されてきたRプラスミドが見出されたという信頼するに足る報告はない。しかし結核菌とは分類学的に近縁の放線菌においては、いくつかの抗生物質の産生に関与する遺伝子がプラスミド上にあるのみならず<sup>52)53)</sup>、腸内細菌のRプラスミドにみられるような抗生物質不活化酵素を産生するものがあることが知られている<sup>54)55)</sup>。

最近 Mitsuhashi<sup>19)</sup>は臨床分離のKM高度耐性結核菌からKMアセチル化酵素を分離した。このことは結核菌におけるRプラスミドの存在の直接的な証明にはならないが、そのことをほぼ確実に示したものとして注目される。

アミノグリコシド系抗生物質不活化酵素は大まかにリン酸化、アセチル化、アデニル化の3通りの機構によつて薬剤を修飾するが、この酵素による交叉耐性のパターンはその酵素の基質特異性によつて決まる。例えばaminoglycoside 3'-phosphotransferase I という酵素はKM(A, B, C), NM, PM, リボスタマイシンの3'のOH基をリン酸化することによつて、またLVMの5'の位置をリン酸化することによつてこれらの薬剤を不活化することが知られている<sup>56)</sup>。この場合ブチロシンは不活化されない。すなわちこの酵素の産生遺伝子をもつプラスミドを保有する菌はKM, NM, PM, LVM, リボスタマイシン

に交叉耐性を示す。一方、aminoglycoside 3'-phosphotransferase II は、KM(A, B, C), リボスタマイシン, ブチロシン, NM, PM 等を不活化するが、LVMは不活化しない<sup>57)</sup>。

Aminoglycoside 6'-acetyltransferase は acetyl CoA の存在下で KM(A, B), DKB, Tobramycin, ゲンタマイシン, NM の6'の位置をアセチル化することが知られている<sup>58)</sup>。これらの酵素の基質特異性を表1に示した。

KM耐性結核菌MT-4から得られた酵素はKMアセチル化酵素で、KMはこの酵素により、6'-N-アセチルKMとなる。興味あることにこの酵素は*in vitro*ではKM(A, B), ジベカシン, トブラマイシンをアセチル化した。LVMとゲンタマイシンはアセチル化されなかつた<sup>19)</sup>。この菌のMICはKM, DKBに対し3,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であつたがLVMに対しては25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた<sup>59)</sup>。

以上のように不活化酵素にもいくつかの種類があり、交叉耐性のパターンはその酵素の基質特異性によつて決定されることが理解されよう。

一方VM, CPM, EVMのようなペプチド系の抗生物質に対し、アミノグリコシド系にみられるような不活化酵素が存在するか否かについては、これらの抗生物質の使用範囲が結核菌に限られているだけに、腸内細菌などでの報告は皆無で、全く類推不能である。

### 10. おわりに

以上、主として腸内細菌や*M. smegmatis*で得られた情報をもとに、結核菌における交叉耐性の機構について

考察した。耐性結核菌そのものを用いた研究が非常に少ないため、どうしても他の菌で得られたデータによる類推という作業が主になつた。今後徐々にではあるがしかし結核菌における交叉耐性の機構も明らかにされてくるものと思われる。おそらくこれまでに議論してきたことが大なり小なりからみ合つてこれまで報告されているような臨床データをもたらしているであろう。ともあれこのような基礎的研究成果をふまえて薬剤耐性を克服する努力が2つの分野で続けられていることを指摘したい。その1つは薬剤を部分的に修飾して不活化酵素の作用を受けなくする試みであり、他方は耐性菌を感受性菌に転換させてみようという試みである。遺伝子工学等、関連領域の学問の進歩と相まつて発展するものであるから、われわれはこれらの分野にも絶え間ない注意を払うことが必要であると考えられる。

### 文 献

- 1) 東村道雄：結核，52：17，1977.
- 2) 東村道雄：結核，52：47，1977.
- 3) 東村道雄：結核，52：171，1977.
- 4) 山田毅・増田国次：結核，51：399，1977.
- 5) Yamada, T., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: *J. Bacteriol.*, 112：1，1972.
- 6) Yamada, T., Kawaguchi, K., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 106：769，1972.
- 7) Yamada, T., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6：46，1974.
- 8) Yamada, T.: *Biken J.*, 19：129，1976.
- 9) Masuda, K. and Yamada, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 435：333，1976.
- 10) Yamada, T., Masuda, K., Mizuguchi, Y. and Suga, K.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 9：817，1976.
- 11) Yamada, T., Mizuguchi, Y. and Suga, K.: *J. Antibiot.*, 29：1124，1976.
- 12) Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtiss III, R., Datta, N. and Falkow, S.: *Bacteriol. Rev.*, 40：168，1976.
- 13) Yamada, T., Tipper, D. and Davies, J.: *Nature*, 219：288，1968.
- 14) Umezawa, H., Takasawa, S., Okanishi, M. and Uthara, R.: *J. Antibiot.*, 21：81，1968.
- 15) Yamada, T., Kvittek, and Davies, J.: *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, Vol. 2, Univ. Park Press, Batimore, p. 562, 1970.
- 16) Ozaki, M., Mizushima, S. and Nomura, M.: *Nature*, 222：333，1969.
- 17) Maness, M. J., Foster, G. C. and Sparling, P. F.: *J. Bacteriol.*, 120：1293，1974.
- 18) Elwell, L. P., Roberts, M., Mayer, L. W. and Falkow, S.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 11：528，1977.
- 19) Mitsuhashi, S., Tanaka, T., Kawabe, H. and Umezawa, H.: *Microbiol. Immunol.*, 21：325，1977.
- 20) 齊藤健利・福原徳光：結核，49：57，1974.
- 21) 齊藤健利・福原徳光：結核，49：91，1974.
- 22) Davies, J., Gilbert, W. and Gorini, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51：883，1964.
- 23) Turnock, G.: *Biochem. J.*, 118：659，1970.
- 24) Anand, N. and Davis, B. D.: *Nature*, 185：22，1960.
- 25) Funatsu, G. and Wittmann, H. G.: *J. Mol. Biol.*, 68：547，1972.
- 26) Funatsu, G., Nierhaus, K. H. and Wittmann, H. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 287：282，1972.
- 27) Shaila, M. S., Gopinathan, K. P. and Ramakrishnan, T.: *Antimicrob. Ag. Chemother.* 4：205，1973.
- 28) Davies, J. and Davis, B. D.: *J. Biol. Chem.*, 243：3312，1968.
- 29) 今野淳：結核，52：104，1977.
- 30) Brown, M. E. and Apirion, D.: *Mol. Gen. Genet.*, 133：317，1974.
- 31) Yamaguchi, M., Eda, J., Kobayashi, F. and Mitsuhashi, S.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4：380，1973.
- 32) Liou, Y. and Tanaka, N.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 71：477，1976.
- 33) Apirion, D. and Schlessinger, D.: *J. Bacteriol.*, 96：768，1968.
- 34) Apirion, D. and Schlessinger, D.: *J. Bacteriol.*, 96：1431，1968.
- 35) Suga, K. and Mizuguchi, Y.: *Jap. J. Microbiol.*, 18：139，1974.
- 36) Mizuguchi, Y., Suga, K., Masuda, K. and Yamada, T.: *Jap. J. Microbiol.*, 18：457，1974.
- 37) Steenken, W., Jr., Montalbino, V. and Thurston, J. R.: *Am. Rev. Tuberc.*, 79：66，1959.
- 38) Tsukamura, M.: *Chemotherapy*, 22：1115，1974.
- 39) Osawa, S., Takata, R., Tanaka, K. and Tamaki, M.: *Mol. Gen. Genet.*, 127：163，1973.
- 40) Wittmann, H. G., Stöffler, G., Apirion, D., Rosen, L., Tanaka, K., Tamaki, M., Takata, R., Dekio, S., Otaka, E. and Osawa, S.: *Mol. Gen. Genet.*, 127：175，1973.
- 41) Stöffler, G., Deusser, E., Wittmann, H. G. and Apirion, D.: *Mol. Gen. Genet.*, 111：334，1971.
- 42) Bollen, A. and Herzog, A.: *FEBS Letters*, 6：69，1970.
- 43) Nashimoto, H., Held, W., Kaltschmidt, E. and Nomura, M.: *J. Mol. Biol.*, 62：121，1971.
- 44) Osawa, S., Takata, R. and Dekio, S.: *Mol. Gen. Genet.*, 107：32，1970.
- 45) Birge, E. A. and Kurland, G. G.: *Science*, 166：1282，1969.
- 46) Hasenbank, R., Guthrie, C., Stöffler, G., Wittmann, H. G., Rosen, L. and Apirion, D.: *Mol. Gen. Genet.*, 127：1，1973.
- 47) Funatsu, G., Duls, W., Schiltz, E., Reinbolt, J. and Wittmann, H. G.: *Mol. Gen. Genet.*, 115：131，1972.
- 48) Itoh, T. and Wittmann, H. G.: *Mol. Gen. Genet.*, 127：19，1973.
- 49) Saltzman, L., Brown, M. and Apirion, D.: *Mol.*

- Gen.Genet., 133 : 201, 1974.
- 50) Saltzman, L. and Apirion, D.: Mol.Gen.Genet., 143 : 301, 1976.
- 51) Dekio, S., Takata, R. and Osawa, S.: Mol. Gen. Genet., 109 : 131, 1970.
- 52) Okanishi, M., Ohta, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 23 : 45, 1970.
- 53) Akagawa, H., Okanishi, M. and Umezawa, H.: J. Gen. Microbiol., 90 : 336, 1975.
- 54) Benveniste, R. and Davies, J.: Proc. Natl. Acad. Sci., 70 : 2276, 1973.
- 55) Shaw, W. V. and Hopwood, D. A.: J. Gen. Microbiol., 94 : 159, 1976.
- 56) Yamaguchi, M., Koshi, T., Kobayashi, F. and Mitsuhashi, S.: Antimicrob. Ag. Chemother., 2 : 142, 1972.
- 57) Yamaguchi, M., Kobayashi, F. and Mitsuhashi, S.: Antimicrob. Ag. Chemother., 1 : 139, 1972.
- 58) Benveniste, R. and Davies, J.: J. Biochem., 10 : 1787, 1971.
- 59) 田中徳光・角田光子: Chemotherapy, 24 : 1272, 1976.