

---

 総合論文
 

---

## 放線菌の抗生物質耐性機構に関する研究

(平成2年度日本醸酵工学会斎藤賞受賞)

杉 山 政 則\*

 広島大学医学部総合薬学科  
 〒734 広島市南区霞1-2-3

Mechanisms of resistance to antibiotics in actinomycetes. —Monograph— MASANORI SUGIYAMA\* (*Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734*) *Hakkokogaku* 69: 253-270, 1991.

Microorganisms which produce antibiotics must be protected from the lethal effects of their own products. The present paper reviews several of our studies concerning self-resistance mechanisms in actinomycetes which produce antibiotic inhibitors of protein synthesis: i) Establishment of an *in vitro* protein-synthesizing system in *Streptomyces*. ii) Investigation of the inhibitory effect of their own antibiotics on *in vitro* protein synthesis. As a result, it was shown that though the producers of streptomycin, neomycin, streptothricin, puromycin and blasticidin S all possessed drug-sensitive ribosomes, the protein syntheses could be protected from the action of the drugs by phosphorylation or acetylation of their own antibiotics. iii) In streptomycin (SM)-producing *Streptomyces griseus* HUT6037, the proposal of another SM-resistant mechanism in addition to the mechanism of inactivation of SM with SM 6-phosphotransferase. Our study strongly suggested that a decrease in cell permeability to SM which develops with cell growth plays a role in the self-protection. iv) Purification and properties of the antibiotic inactivating enzymes (streptomycin 6-phosphotransferase, puromycin 2"-N-acetyltransferase and blasticidin S acetyltransferase) which play an important role in self-protection of the producers. v) Cloning of two genes coding for the streptomycin-phosphorylating enzymes from *S. griseus* HUT6037. vi) Analysis of the finding that when protoplasts of streptomycin-sensitive *S. griseus* KSN were regenerated to the mycelium form, SM-resistant colonies appeared at a high frequency. The resistance mechanism of these regenerated cultures was different from that of ancestral SM-producing *S. griseus* HUT6037, from which the parent *S. griseus* KSN was derived. While the resistance to SM of the HUT6037 strain was due mainly to the SM-phosphorylating activity of SM 6-phosphotransferase produced in the cells, the SM-resistant cultures regenerated from protoplasts produced no SM 6-phosphotransferase but the ribosomes changed and became resistant to SM.

一般的に、抗生物質とは、微生物によって生産され、微生物や癌細胞を始めとする細胞の増殖を阻害する物質と定義される。これまで見いだされた抗生物質は5000とも6000とも言われているが、それらの大多数は土壌微生物の一群である放線菌によってつくられる。

放線菌は、栄養菌糸のほか、気生菌糸や胞子を形成するなど、形態的にはカビに類似しているが、細胞壁やリボソームの特徴などから細菌群に位置づけられている。また、この微生物は、抗生物質以外にも、免疫抑制剤などの生理活性物質や有用酵素の生産菌として工業的にも重要な地位を占めている。

一方、分子生物学の発展は抗生物質の作用機序の解

---

\* 連絡先, Corresponding author.

明に大きなインパクトを与えた。その成果として、抗生物質にはDNA, RNA, タンパク質, 細胞壁などの合成阻害や細胞膜透過障害, エネルギー代謝阻害といった多様多様な作用のあることが分かってきた。

ところで, 感染症や癌などの臨床治療に使われる, より有効な新規抗生物質の探索や既存抗生物質の改良, ならびに生産性の向上を目的とした菌株育種は, 企業レベルで精力的に行われてきた。が, 「微生物がいかにか自己生産抗生物質の致死的作用を受けることなく生きながらえるのか」といった純生物学的で素朴な疑問を解決するための研究は, 積極的には行われていなかった。

本研究は, 放線菌の自己生産抗生物質に対する生体防御の機構(これを自己耐性機構と呼ぶ)を体系的に明らかにする目的で行ったものである。

### I. *In vitro* タンパク質合成系の開発

著者の所属していた研究室では, 当時, ストレプトマイシンの生合成の研究を進めていた関係から, まず, 本抗生物質生産菌の自己耐性機構の解明を目的とした研究から着手した。

ストレプトマイシン(Fig. 1)は, 細菌型(70S type)リボソームの30Sサブユニットに結合し, タンパク

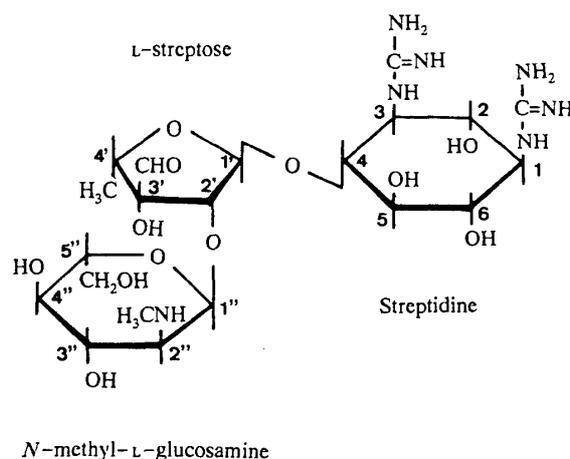


Fig. 1. Structure of streptomycin.

質合成を阻害する。本抗生物質を生産する微生物の自己耐性機構を明らかにする第一段階として, ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* HUT6037 の *in vitro* タンパク質合成系の確立をめざした。一般的な *in vitro* タンパク質合成系の調製法としては, まず菌体を破壊して無細胞抽出液を調製後, 150,000×g, 3hの遠心かけ, リボソームをベレットとして取得する。遠心上清については, 遠心管の上から3分の1の上清を採取してS-150画分とする。リボソームは, 1M塩化

Table 1. Composition of reaction mixture used in *in vitro* polyphenylalanine synthesis.

2.0	M	Tris/HCl (pH 7.8)	3.75 $\mu$ l
0.4	M	Mg-acetate	2.5
4.0	M	NH <sub>4</sub> Cl	2.5
0.6	M	2-mercaptoethanol	1.25
20.0	mM	Spermidine	2.5
56.9	mM	Adenosine 5'-triphosphate (ATP)	2
25.0	mM	Guanosine 5'-triphosphate (GTP)	1
0.5	M	Phosphoenolpyruvate (PEP)	1
2	mg/ml	Pyruvate kinase	1
5	mg/ml	t-RNA from <i>E. coli</i> MRE600	5
5	mg/ml	Polyuridylylate	5
each 0.1	mM	19 L-amino acids mixture*	5
0.1	mM	<sup>14</sup> C-L-phenylalanine (100 $\mu$ Ci/ $\mu$ mol)	5
170	A <sub>260</sub> /ml	70S ribosomes	5
4	mg/ml	S-150 fraction	60
		H <sub>2</sub> O	22.5
		Total	125.0 $\mu$ l

\* 19 L-amino acid mixture; L-alanine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-proline, L-tryptophan, glycine, L-methionine, L-serine, L-threonine, L-cysteine, L-tyrosine, L-asparagine, L-glutamine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-lysine, L-arginine, L-histidine.

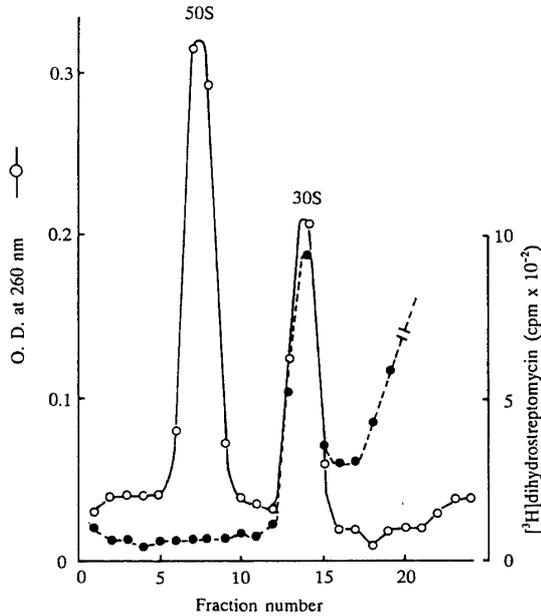


Fig. 2. Binding of [ $^3\text{H}$ ]dihydrostreptomycin to ribosomal subunits from *S. griseus*. The dissociated ribosomal preparation incubated with [ $^3\text{H}$ ]dihydrostreptomycin was layered onto density gradients of 10–30% sucrose in a buffer [10 mM Tris/HCl (pH 7.65), 30 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.3 mM magnesium acetate and 6 mM 2-mercaptoethanol], centrifuged at  $70,000 \times g$  for 17 h, followed by fractionation.

アンモニウムでの洗浄によって精製し、S-150画分と組み合わせて用いる。in vitro タンパク質合成系に加える基本的な試薬を Table 1 に示した。

まず、従来真正細菌で行われてきた方法で、*S. griseus* の in vitro タンパク質合成系を調製した。メッセンジャー RNA としてポリウリジル酸を用いたところ、コントロールとして用いた大腸菌 (*Escherichia coli* Q13) では、確かに、ポリフェニルアラニン合成が認められたが、放線菌では、そのポリペプチドはほとんど合成されなかった。このことは、放線菌の場合、大腸菌と同じ方法では活性を持つ in vitro タンパク質合成系は得られないことを示している。事実、それまでは、ストレプトマイシン生産菌の無細胞抽出液中にはタンパク質合成を阻害する因子が存在するとして、in vitro タンパク質合成系の確立は困難であるとされてきた。<sup>2)</sup> 著者は、放線菌が一般的にプロテアーゼ活性の高いことから、彼らの指摘したタンパク質合成の阻害因子はプロテアーゼであろうと考え、*S. griseus* HUT6037 の無細胞抽出液を調製するにあたって、プロテアーゼ阻害剤の添加を検討した。<sup>3)</sup> 表在性のプロテアーゼの存在を考慮に入れて、*S. griseus* の菌体を

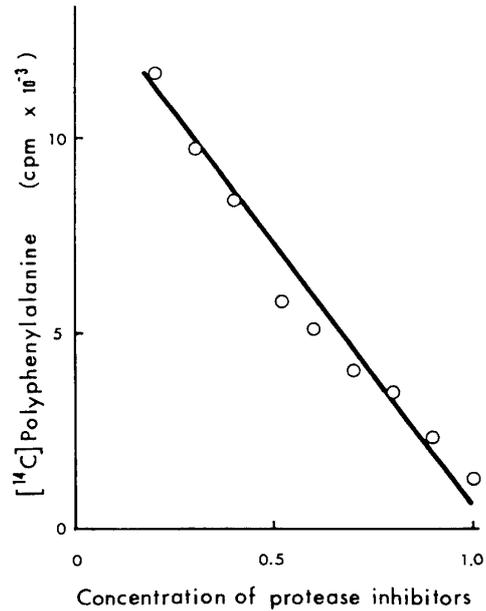


Fig. 3. Effect of concentration of protease inhibitors on in vitro polyphenylalanine synthesis. The concentration of protease inhibitors [PMSF (3.45 mM), Mg-Titriplex (5 mM) and DFP (0.2 mM)] contained in a buffer [10 mM Tris/HCl (pH 7.65), 30 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM magnesium acetate, 6 mM 2-mercaptoethanol, 3.45 mM PMSF, 5 mM Mg-Titriplex and 0.2 mM DFP] was defined as 1.0.

1 M KCl で洗浄後、石英砂を加えてその菌体を破碎した。5 mM EDTA  $\text{K}_2\text{Mg}$  salt (Mg-Titriplex), 3.45 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) および 0.2 mM diisopropylfluorophosphate (DEP) といった 3 種のプロテアーゼ阻害剤を含む緩衝液 [10 mM Tris/HCl (pH 7.65), 10 mM magnesium acetate, 30 mM ammonium chloride and 6 mM 2-mercaptoethanol] を用いて無細胞抽出液を得たのち、リボソーム及び S-150 画分を調製した。マグネシウムイオンの濃度を 10 mM から 0.3 mM に下げると、リボソームは 30S と 50S の両サブユニットに解離する。こうして解離させたリボソームと [ $^3\text{H}$ ]dihydrostreptomycin ( $^3\text{HDSM}$ ) の結合親和性を調べた結果、Fig. 2 に示すように、 $^3\text{HDSM}$  は本菌のリボソームの 30S サブユニットに結合することが解った。<sup>3)</sup> この結果は、ストレプトマイシン生産菌のリボソームが自己生産抗生物質に対して感受性を示すことを意味している。

一方、プロテアーゼ活性を阻害するために用いたその阻害剤が、in vitro タンパク質合成の阻害剤として作用することを見だし<sup>4)</sup> (Fig. 3), 阻害剤を用いて調製したリボソームおよび S-150 画分から、8 時間の透析

操作により、プロテアーゼ阻害剤を除いた。このようにして、大腸菌の系に匹敵するほどの高活性を持つ *in vitro* タンパク質合成系を放線菌において確立することに成功した。

## II. ストレプトマイシン生産菌の自己耐性機構

このようにして開発された *in vitro* タンパク質合成系を用いて、ストレプトマイシン生産菌 *S. griseus* HUT6037 におけるストレプトマイシンの影響を調べた。その結果、100  $\mu\text{g/ml}$  の抗生物質存在下では、確かにタンパク質合成が阻害されたが、阻害の程度は、対数増殖期の細胞から調製された *in vitro* タンパク質合成系において高く、定常期のそれにおいて低くなる傾向を示した。

ストレプトマイシンは、Fig. 1 に示すように、ストレプトチジン、ストレプトースおよび *N*-メチル-L-グルコサミンという3つの糖より構成される抗生物質であり、すべての糖部分はD-グルコースを出発物質として生合成される。<sup>5)</sup> その生合成においては、<sup>6-12)</sup> 燐酸化

されたストレプトチジン (streptidine 6-phosphate) にジヒドロストレプトースが結合した後、*N*-メチル-L-グルコサミンがカップリングしてジヒドロストレプトマイシン 6-燐酸が生成される (Fig. 4)。この物質はその後細胞膜付近で酸化されて<sup>13)</sup> 燐酸化ストレプトマイシン (Streptomycin 6-phosphate) となり、それが細胞膜を通過する際、Osmotic 処理によって容易に細胞外に放出されるペリプラズミックな Streptomycin 6-phosphatase<sup>14)</sup> (アルカリ性フォスファターゼの一種) の作用を受けて脱燐酸化され、活性型ストレプトマイシンとして細胞外に分泌される。

ところで、*S. griseus* HUT6037 の無細胞抽出液中には、ATP 共存下でストレプトマイシンを燐酸化する酵素の存在することが、当研究室の研究成果として、すでに明らかにされていた。この酵素は、ストレプトマイシン分子のストレプトチジン部 C-6 位の OH 基の燐酸化を触媒することから、ストレプトマイシン 6-燐酸化酵素 (Streptomycin 6-phosphotransferase) と命名された。著者は、本菌の S-150 画分中の Streptomycin

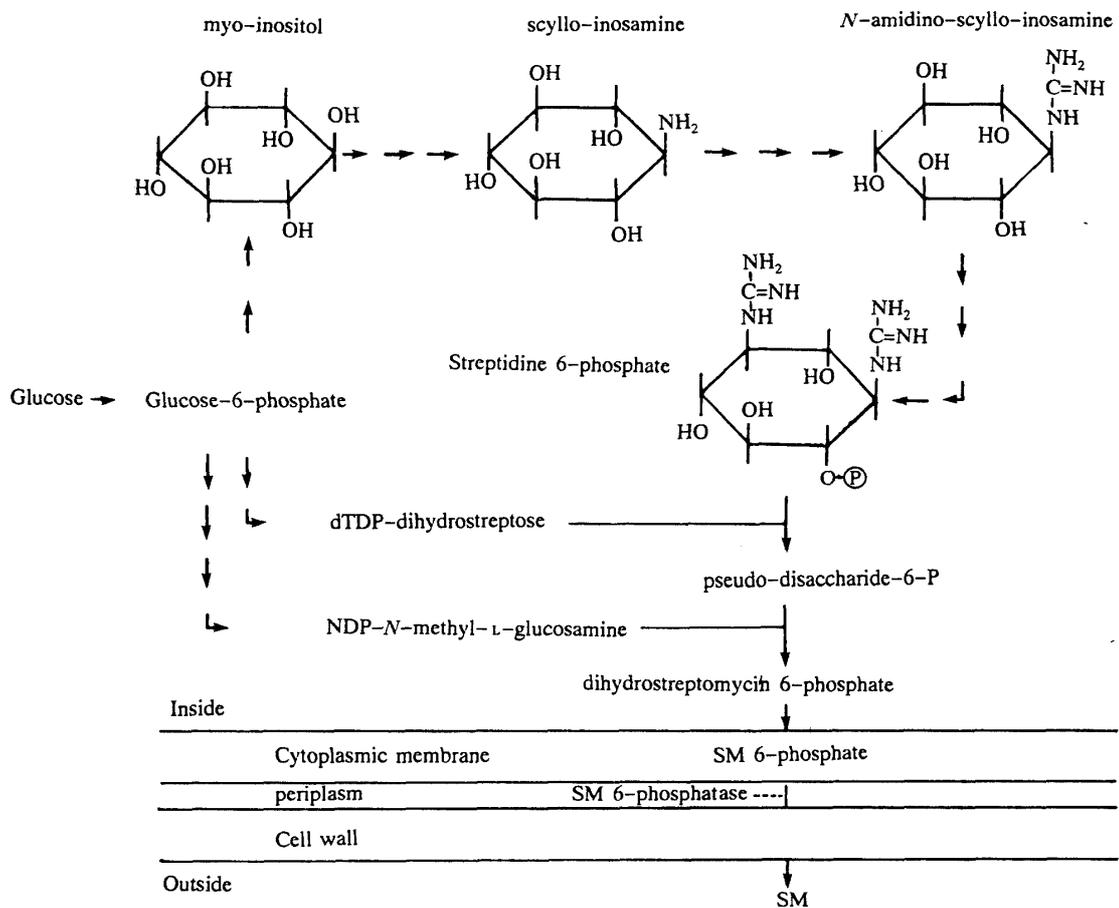


Fig. 4. Biosynthetic pathway of streptomycin.

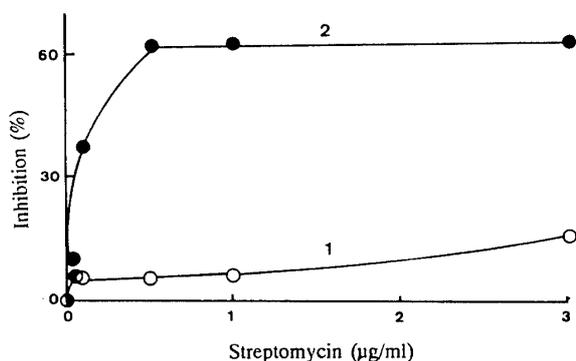


Fig. 5. Inhibition of polyphenylalanine synthesis by streptomycin in *in vitro* systems prepared from a streptomycin producer and non-producing mutant. 1, *S. griseus* HUT6037; 2, *S. griseus* KSN.

6-phosphotransferase 活性を測定し、この比活性が発育の対数増殖期より定常期において高いことを確認した。<sup>4)</sup>この結果は、ストレプトマイシン生産菌の定常期の細胞から調製された *in vitro* タンパク質合成系のストレプトマイシンによる阻害の程度が対数期のそれに比べ低いのは、菌の発育と共に高まる本酵素活性と関係があるのではないかと考察した。そうならば、本酵素活性を有しない変異株を育種すれば、この株はストレプトマイシンに対して高い感受性を示すに違いない。そこで、*S. griseus* HUT6037 を親株として、スト

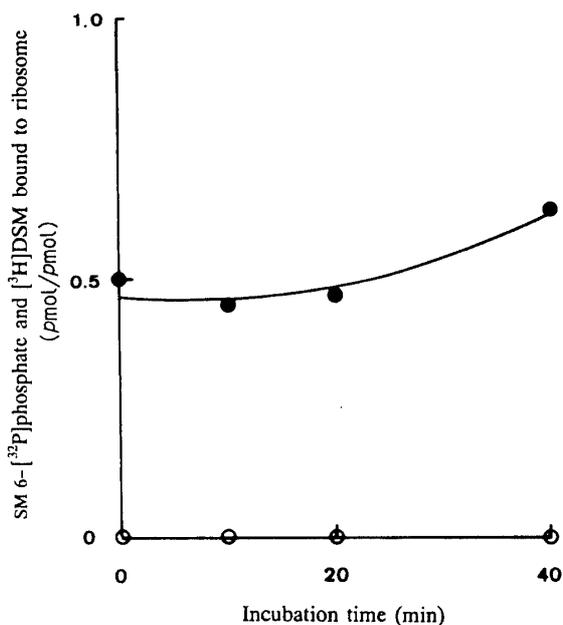


Fig. 6. Affinity of binding of streptomycin 6-phosphate to ribosomes. Symbols: ○, streptomycin 6-[<sup>32</sup>P]phosphate; ●, [<sup>3</sup>H]dihydrostreptomycin.

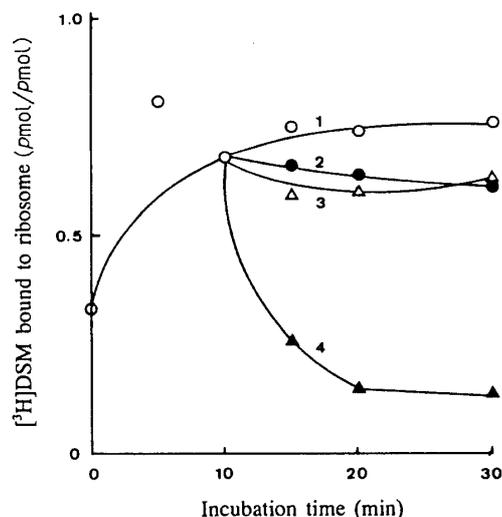


Fig. 7. Release of ribosome-bound [<sup>3</sup>H]dihydrostreptomycin by phosphorylation. 1, control; 2, ATP; 3, S-150; 4, ATP plus S-150.

レプトマイシンリン酸化酵素活性を有しない変異株の取得を試みた。その成果として、紫外線照射により、*S. griseus* KSN と命名した変異株の取得に成功した。本変異株はリン酸化酵素活性を有しないばかりか、ストレプトマイシンもまったく産生しなかった。また、*S. griseus* HUT6037 が 200 µg/ml のストレプトマイシンを含む寒天培地で発育できるのに対し、*S. griseus* KSN は 20 µg/ml のストレプトマイシン存在下で完全に生育が阻害され、明らかに本抗生物質に対して非常に高い感受性を示した。そこで、本変異株の *in vitro* タンパク質合成に及ぼすストレプトマイシンの影響を親株のそれと比較した。Fig. 5 に示すように、親株では、3 µg/ml の濃度のストレプトマイシンに対して耐性を示したが、*S. griseus* KSN ではわずか 0.5 µg/ml の低濃度で完全に阻害された。この *in vitro* タンパク質合成の反応液中には、Table 1 に示すごとく、エネルギー源として加えた ATP が存在するので、S-150 画分中のリン酸化酵素と ATP の共存下でストレプトマイシンがリン酸化されると考えられた。もしそうならば、リン酸化ストレプトマイシンはタンパク質合成を阻害しないに違いない。この仮説を証明するために、ストレプトマイシン 6-リン酸の *in vitro* タンパク質合成への影響を測定した。期待したように、酵素的に合成したリン酸化ストレプトマイシンはタンパク質合成を阻害せず、<sup>15)</sup>リボソームへの結合も認められなかった<sup>4)</sup>(Fig. 6)。さらに、著者は、*S. griseus* HUT6037 のリボソームに結合させた <sup>3</sup>HDSM が ATP 存在下で S-150 画分を添加

すると、リボソームから効率よく遊離されることを見いだし (Fig. 7), ストレプトマイシン 6-リン酸化酵素が、生産菌の自己耐性の因子のひとつであることを明らかにした。<sup>4)</sup>

### III. ストレプトマイシンの細胞膜透過と自己耐性

所定時間液体培養した *S. griseus* HUT6037 の菌体を 0.5% NaCl で洗浄後、この菌体を 0.5% NaCl に再懸濁し、300  $\mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシンを添加したところ、添加した抗生物質の減少量に見合うだけ、ストレプトマイシン 6-リン酸が培地中に蓄積する現象を見いだした。<sup>16)</sup> その際、蓄積量は定常期の菌体より対数増殖期の菌体においてかなり高かった (Fig. 8)。このことは、外から添加されたストレプトマイシンは、細胞内に取り込まれる可能性のあることを示すとともに、細胞内に取り込まれた抗生物質はリン酸化され、ストレプトマイシンのリン酸エステルとして細胞外に排出されることを示唆している。そこで、<sup>3</sup>HDSM を用い

Table 2. Characteristics of strains used.

	HUT6037	E1-1
SM resistance ( $\mu\text{g/ml}$ )	85	45
SM production ( $\mu\text{g/ml}$ )	120-150	20
Specific activity of SM 6-phosphotransferase	0.61 (18 h)	0.24 (18 h)
	0.91 (48 h)	1.09 (48 h)

Streptomycin (SM) production is expressed as the concentration accumulated in the culture grown for 120 h. Specific activity of the enzyme is expressed as  $\mu\text{mol}$  of SM 6-phosphate produced from SM in 1 h by 1 mg protein. The cell-free extracts prepared from cells grown at given times (18 and 48 h) were centrifuged at  $30,000 \times g$  for 30 min and the resulting supernatant fluids were used as enzyme fractions.

て細胞内へのストレプトマイシンの透過量を測定してみた。その結果、対数期の菌体は定常期のそれに比べて高く、菌が発育するにしたがって減少していった。このような、抗生物質生産期にかけて起こる抗生物質

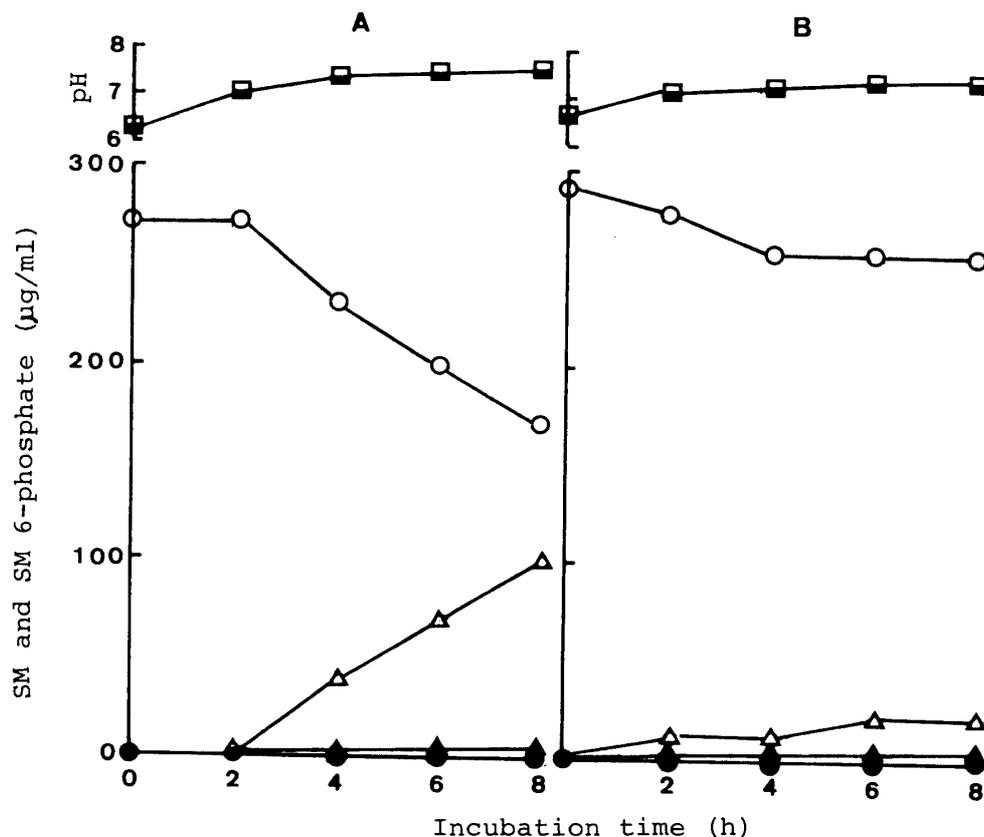


Fig. 8. Conversion of Streptomycin (SM) to SM 6-phosphate by mycelia harvested at the exponential (A) and stationary (B) phase of growth. SM 6-phosphate, SM and pH are indicated by  $\Delta$ ,  $\circ$  and  $\square$ , respectively, in the presence of externally added SM (300  $\mu\text{g/ml}$ ) and by  $\blacktriangle$ ,  $\bullet$  and  $\blacksquare$ , respectively, in the absence of external SM.

の細胞内取り込みの減少も、ストレプトマイシン生産菌の自己耐性に関与しているのかも知れないと考えた。著者は、*S. griseus* HUT6037を親株として、ストレプトマイシンに対する耐性が親株よりは低いが、*S. griseus* KSNよりは高い変異株 *S. griseus* E1-1を取得した。<sup>17)</sup> KSN株はストレプトマイシン非生産性で、かつ、ストレプトマイシンリン酸化酵素活性を有しなかったが、E1-1株は、親株に比べ自己耐性が低いにもかかわらず、ほぼ親株と同程度のリン酸化酵素活性を示した (Table 2)。この変異株の取得により、*S. griseus* HUT6037の自己耐性はストレプトマイシンリン酸化酵素以外に、別の因子も存在する可能性を示した。そこで、親株とE1-1株における耐性度の差を明らかにするため、両株で<sup>3</sup>HDSMの細胞内透過性を調査してみた。Fig. 9に示すように、親株 *S. griseus* HUT6037では、菌の発育と共に抗生物質の細胞内透過性が減少していくのに対し、E1-1株では定常期に至っても<sup>3</sup>HDSMの透過性の減少はあまり認められなかった。

次に、抗生物質の細胞内透過における  $K_m$  と  $V_{max}$  値を両株で測定した。その結果、HUT6037とE1-1株によるストレプトマイシン透過の  $K_m$  値は発育の対数期と定常期で、それぞれ、平均0.47 mMと0.70 mMであった。これらの値は両株でほぼ同じで、発育ともなう  $K_m$  の変化も認められなかった。一方、親株における  $V_{max}$  値は菌の発育と共に減少したが、E1-1株では、増殖中ずっと親株の  $V_{max}$  値より高い値を示した (Table 3)。結局、親株では、ストレプトマイシンの生産が増加する定常期には細胞内への抗生物質の流入を抑制する機構が働くが、E1-1では、その抑制が起こらず、高濃度のストレプトマイシンが細胞内に流入してしまう。このような、菌の生育とともに発達するストレプトマイシン取り込みの減少(あるいは抑制)もストレプトマイシン生産菌の自己耐性に一つの役割を演じていると考えている。

著者は、ストレプトマイシン生産菌が、発育の盛んな時期に多量のストレプトマイシンを細胞内に取り込

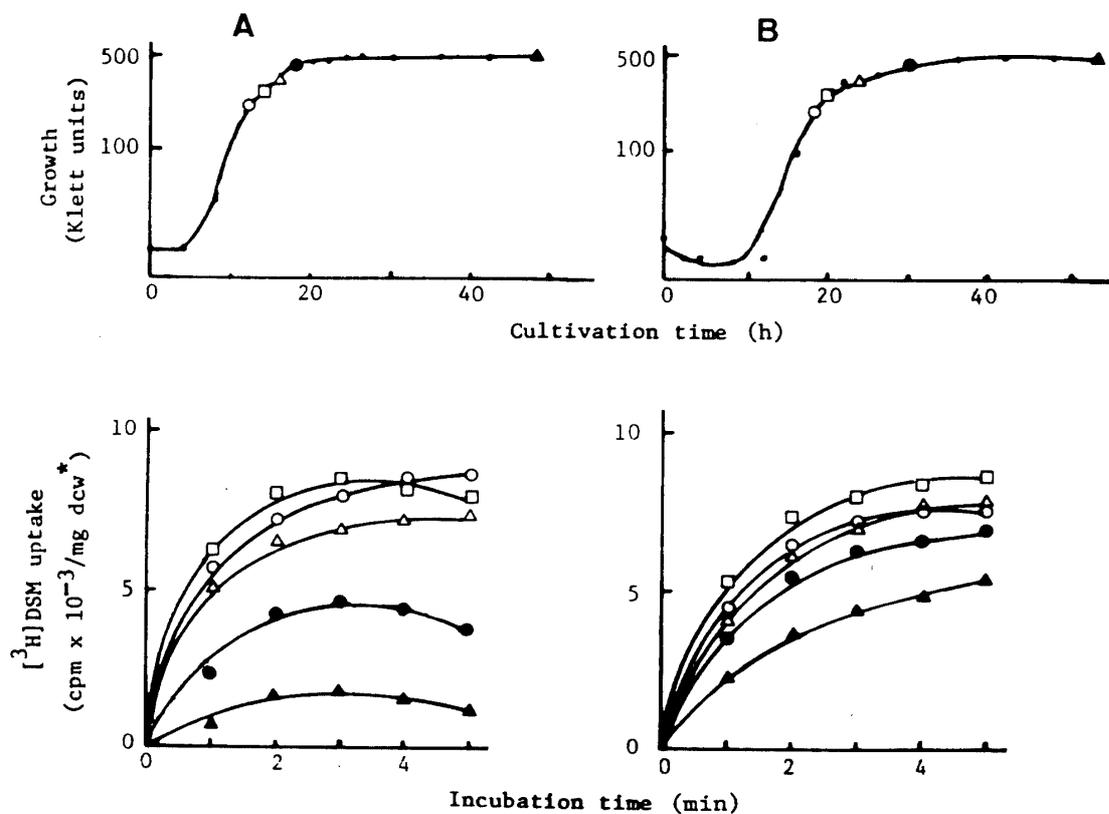


Fig. 9. Time courses of growth of *S. griseus* HUT6037 (A) and *S. griseus* E1-1 (B), and uptake of [<sup>3</sup>H]dihydrostreptomycin ([<sup>3</sup>H]DSM) by these cells. The symbols (○, □, and △=exponential phase; ● and ▲=stationary phase (in the curves for antibiotic uptake correspond with the symbols shown in the growth curves).

\* Dry cell weight.

Table 3. Uptake of [ $^3\text{H}$ ]DSM.

Strain	Growth (Klett units)	$K_m$ (mM)	$V_{max}^*$
HUT6037	250	0.45	15.0
	350	0.54	10.0
	480	0.42	6.3
E1-1	335	0.73	33.0
	375	0.71	25.0
	470	0.67	12.0

\*  $V_{max}$  value is expressed as  $\text{cpm} \times 10^{-3}$  [ $^3\text{H}$ ]DSM taken up by each strain in 1 min in 1 mg dry cell weight.

むことに興味を抱いた。そこで、輸送のメカニズムを知るために、抗生物質の膜透過性が、電子伝達系の阻害剤や酸化的磷酸化の阻害剤さらにSH基阻害剤などを加えることによっていかなる影響を受けるか調べてみた。その結果、ストレプトマイシン生産菌による $^3\text{HDSM}$ の細胞内透過はKCN,  $\text{NaN}_3$ , 2,4-dinitrophenol

によって強く阻害された。また、モノヨード酢酸やクロラムフェニコールによっても明らかに阻害を受けたが、後者による阻害は50%程度であった。これらの結果は、ストレプトマイシンの細胞膜透過がActive transportによるものであることを示唆している。この仮説を明らかにするため、まず、*S. griseus* HUT6037の対数増殖期の菌体に $^3\text{HDSM}$ を加え、 $28^\circ\text{C}$ で5 min incubateして抗生物質を取り込ませたのち、プロトプラストを調製した。抗生物質を取り込んだプロトプラストのOsmotic lysis後に得られた細胞質のトリチウム放射能は細胞外のそれと比べて2.6倍高かったことから、ストレプトマイシンは一時期細胞内に濃縮された形で存在することがわかる。著者は、さらに、ストレプトマイシン生産菌による本抗生物質の細胞内透過がポリアミンの一種スペルミジンによって阻害されることを確認した。対数増殖期と定常期の細胞を用いた際のスペルミジンによるストレプトマイシン取り込みの阻害は拮抗的であり (Fig. 10), その

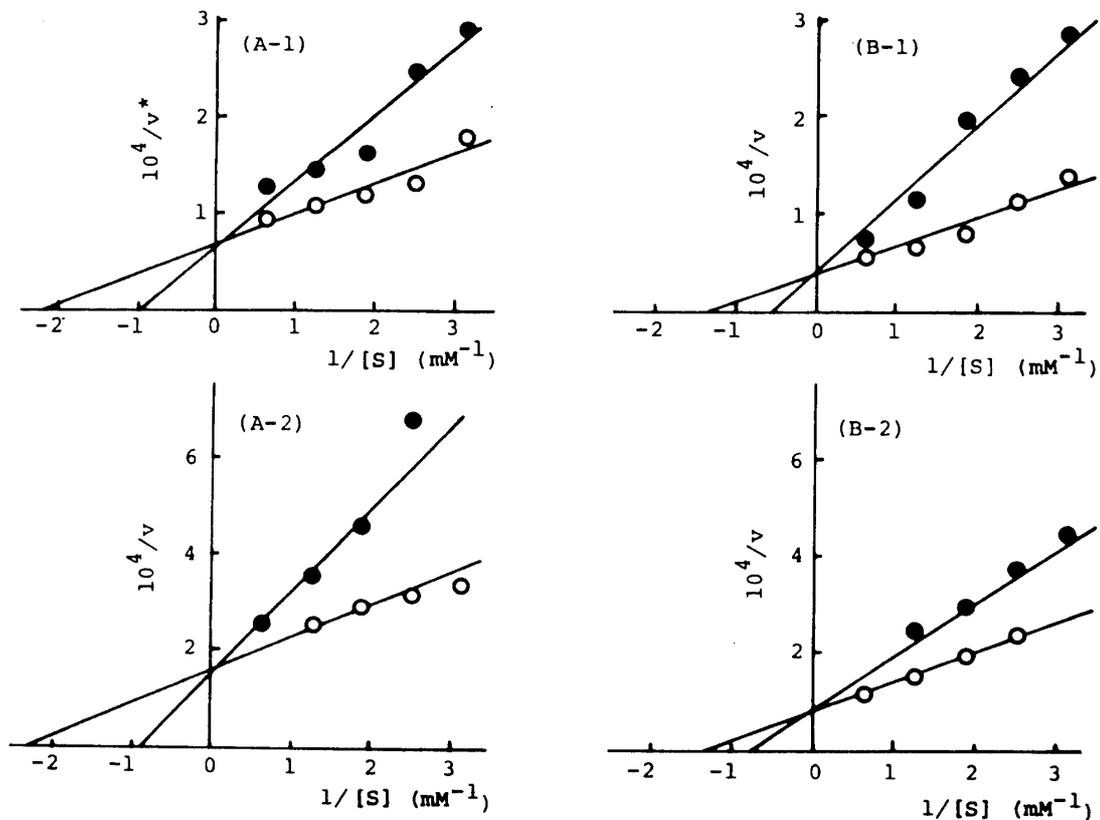


Fig. 10. Lineweaver-Burk reciprocal plots of the initial velocity of the uptake of [ $^3\text{H}$ ]DSM in the presence (●) or absence (○) of spermidine trihydrochloride (0.45 mM). A-1, exponential-phase cells of HUT6037 strain; A-2, stationary-phase cells of HUT6037 strain; B-1, exponential-phase cells of E1-1 strain; B-2, stationary-phase cells of E1-1 strain.

\*  $v$  is expressed in  $\text{cpm} \times (\text{min})^{-1} \times (\text{mg dry cell weight})^{-1}$ .

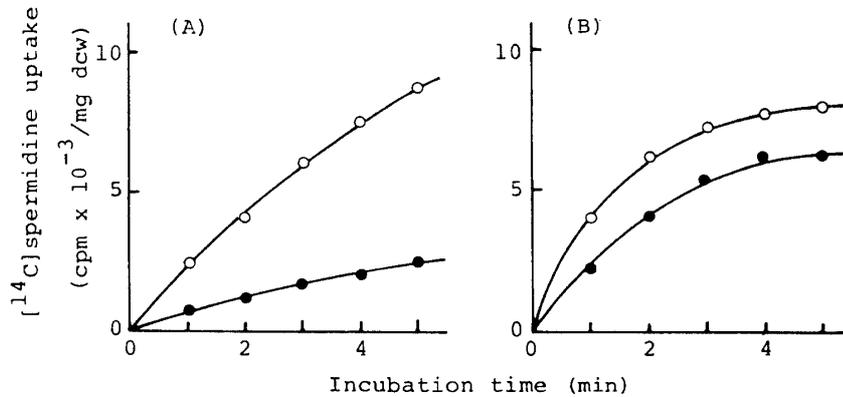


Fig. 11. Uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]spermidine by *S. griseus* HUT6037 (A) and *S. griseus* E1-1 (B) at different stages of growth. ○, exponential-phase; ●, stationary-phase.

$K_i$  値は対数期で 0.45 mM, 定常期で 0.39 mM であった。また, 親株 (*S. griseus* HUT6037) におけるスペルミジンの細胞内取り込みは菌の発育とともに減少するが, E1-1 株では, 発育の定常期に至ってもその取り込みの低下はほとんど認められなかった (Fig. 11)。この細胞 age とスペルミジンの取り込みとの関係は, 両株とも, ストレプトマイシンの取り込みの場合と一致する。したがって, ストレプトマイシンはスペルミジンの輸送系に載って細胞内に透過するものと考えられる。

以上の結果をもとにして, ストレプトマイシン生産菌の自己耐性メカニズムを考えてみる (Fig. 12)。ストレプトマイシンのリン酸化物として細胞内で生合成され

た抗生物質は, 細胞外に分泌される際, streptomycin 6-phosphatase の作用で脱リン酸化され活性型ストレプトマイシンとして培地中に蓄積される。蓄積されたストレプトマイシンは, ポリアミンの輸送系に載って細胞内に取り込まれてしまうが, 細胞内に存在する Streptomycin 6-phosphotransferase によりリン酸化され, 再び, 細胞外へ排出されるという運命をたどる。たとえば, ストレプトマイシンがリボソームに結合したとしても, リン酸化酵素の働きにより, 抗生物質は, そのリン酸化エステルとしてリボソームから遊離される。さらに, 抗生物質生産の盛んな定常期の細胞では, ポリアミンの輸送系の活性も低下するため, それに連動するかのようにはストレプトマイシンの細胞内透過も減少する結

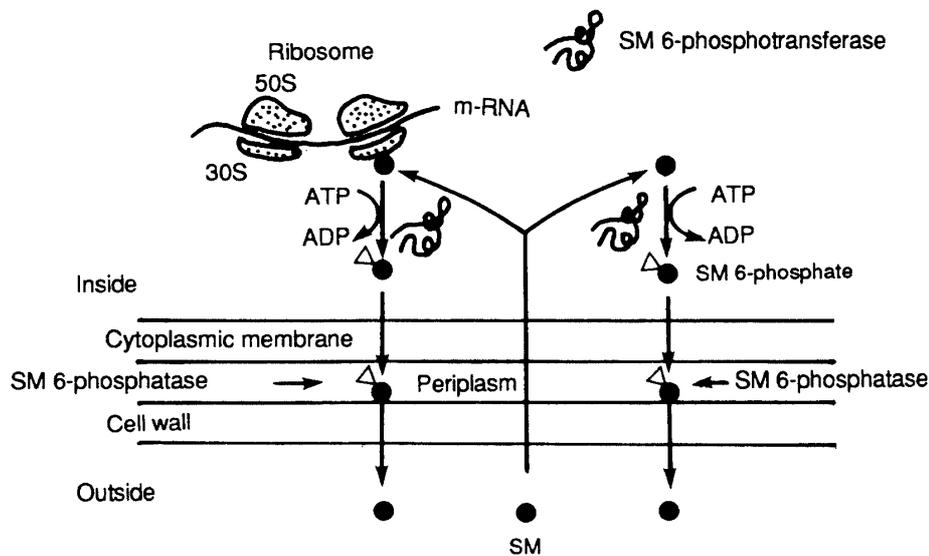


Fig. 12. Model of self-protection by streptomycin 6-phosphotransferase. ●, streptomycin (SM); ▽, SM 6-phosphate.

果, 細胞内のストレプトマイシン濃度を低下させるのに役立っている.<sup>18)</sup>

#### IV. 各種タンパク質合成阻害剤生産菌の自己耐性因子

*S. griseus* において確立した *in vitro* タンパク質合成系を用いて, ストレプトマイシン以外のタンパク質合成阻害剤生産菌の自己耐性機構を明らかにすることを試みた. その際, 生産する抗生物質の化学構造上の差異により, 自己耐性機構が異なるか否か調査したかった. 以下にその成果を示す.

##### 1. リボソームの感受性

ネオマイシンは, ストレプトマイシンと同様, 水溶性基性抗生物質に分類される. 本抗生物質は別名フラジオマイシンとも呼ばれ, *Streptomyces fradiae* によって作られることが知られている. 著者は, *S. fradiae* HUT6096 の *in vitro* タンパク質合成系を調製しネオマイシンの影響を調べた.<sup>19)</sup> この結果, 100  $\mu\text{g/ml}$  のネオマイシンを添加することによって, タンパク質合成が阻害されたことから, 本菌のリボソームはストレプトマイシン生産菌と同様感受性を示すことを明らかにし

た. ネオマイシン生産菌は, 自己生産抗生物質をリン酸化およびアセチル化する酵素を保有しており, これらの酵素が自己耐性に寄与していることはその後の他のグループの研究で明らかにされた.<sup>20)</sup>

次に, 同じ水溶性塩基性抗生物質であるストレプトスライシン生産菌 (*Streptomyces flavotricini* subsp. *pseudochromogenes* V-13-1)<sup>21)</sup> の *in vitro* タンパク質合成系を調製し, 本抗生物質による影響を調査した.<sup>22)</sup> その結果, 本菌の *in vitro* タンパク質合成は, ストレプトスライシンによって阻害されたが, この系にアセチルコエンザイム A を加えたところ, その阻害が完全に解除された (Fig. 13). したがって, 本菌のリボソームはストレプトスライシンに対して感受性を示すが, 細胞内に存在するストレプトスライシンアセチル化酵素が本菌の自己耐性に重要な役割を演じていると思われる.

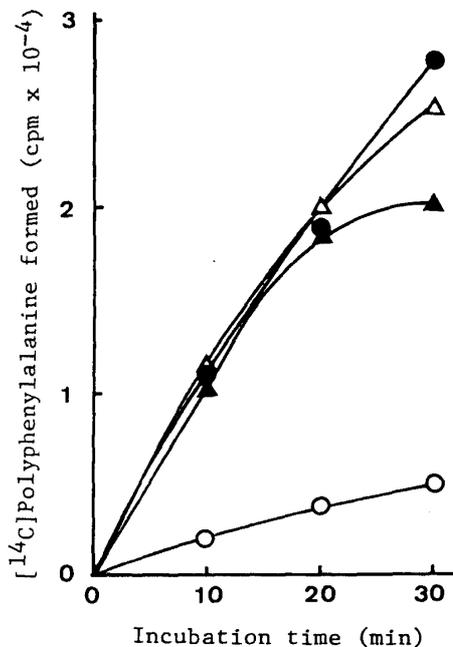


Fig. 13. Inhibitory effect of streptomycin on polyphenylalanine synthesis by the *in vitro* protein-synthesizing system. Symbols: ●, control; ○, streptomycin E (0.8 mM); ▲, acetyl CoA; △, streptomycin E plus acetyl CoA.

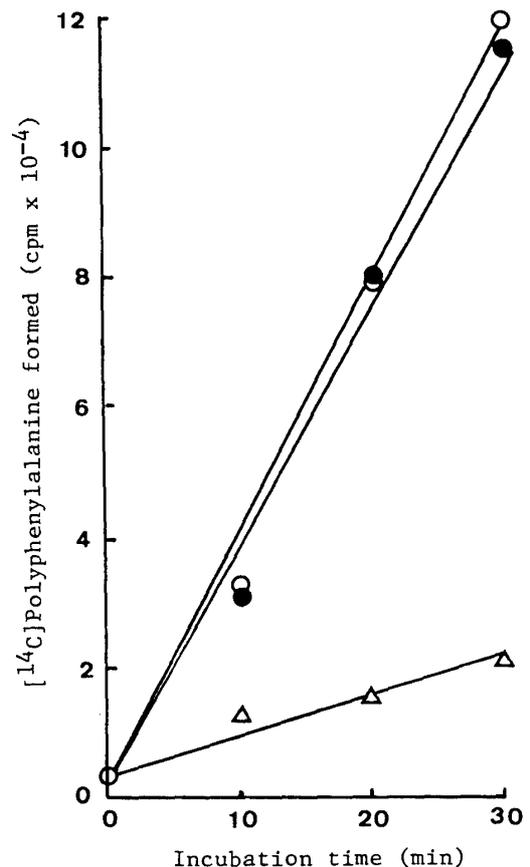


Fig. 14. Inhibitory effect of puromycin on the polyphenylalanine-synthesizing system derived from *S. alboniger* and elimination of the inhibition by acetyl coenzyme A. Symbols: ○, control; △, puromycin (0.18 mM); ●, puromycin plus acetyl CoA (2 mM).

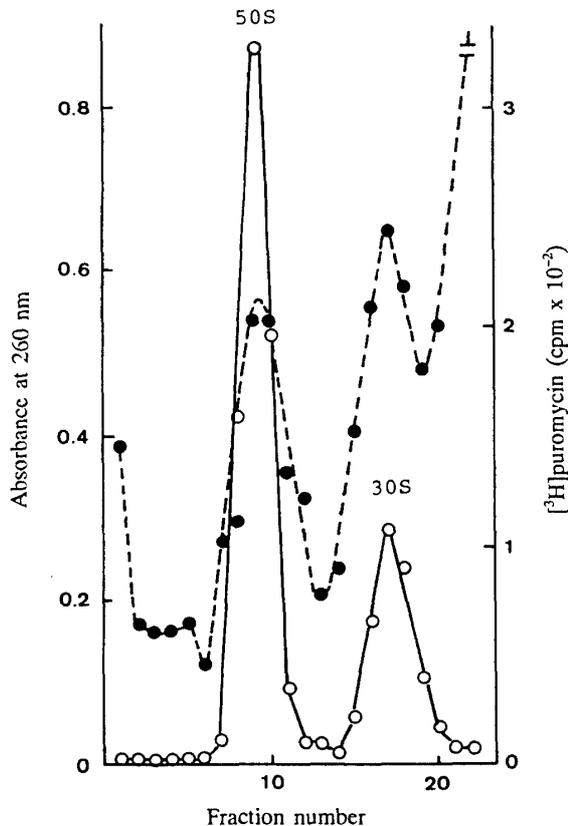
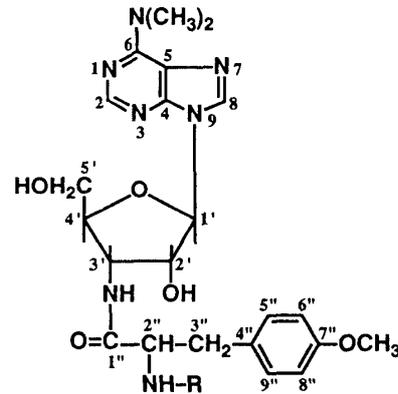


Fig. 15. Binding of  $[^3\text{H}]$ puromycin to ribosomal subunits from a puromycin-producing strain, *S. alboniger*. The dissociated ribosomal preparation incubated with  $[^3\text{H}]$ puromycin was layered onto density gradients of 10 to 30% sucrose in the buffer [10 mM Tris/HCl (pH 7.65), 30 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.3 mM magnesium acetate and 6 mM 2-mercaptoethanol], centrifuged at  $70,000 \times g$  for 17 h, followed by fractionation.

ところで、タンパク質合成阻害剤としては、上記水溶性塩基性抗生物質のほかに、これらとは化学構造の異なる、クロラムフェニコール系、テトラサイクリン系、ヌクレオシド系のものが存在する。

そこで、これら抗生物質生産菌のうち、ピューロマイシンおよびブラスティンジン S といったヌクレオシド系抗生物質生産菌の自己耐性機構の解明を次の目的とした。

Fig. 14 に示すように、ピューロマイシン生産菌 *Streptomyces alboniger* KCC S-0309 の *in vitro* タンパク質合成系はピューロマイシンにより強い阻害を受けた。<sup>23)</sup> また、 $^3\text{H}$  で標識したピューロマイシンと本菌のリボソームとの結合親和性を測定したところ、30S および 50S の両リボソームサブユニットと結合することがわかった (Fig. 15)。



R: -H : puromycin  
-COCH<sub>3</sub> : acetylpuromycin

Fig. 16. Structure of puromycin and acetylpuromycin.

このように、ピューロマイシン生産菌のリボソームは自己生産抗生物質に対して明らかに感受性を示した。ところが、本菌の *in vitro* タンパク質合成系にアセチルコエンザイム A を添加したところ、ピューロマイシンによる阻害が完全に解除されたことから、本菌の自己耐性は細胞内に存在するピューロマイシンアセチル化酵素であることを示唆した (Fig. 14)。次の実験として、本酵素によるピューロマイシンのアセチル化の部位を調査した。酵素的にアセチル化されたピューロマイシンを精製し、機器分析にかけたところ、Fig. 16 に示すようにピューロマイシン分子の *O*-メチルチロシン部分のアミノ基がアセチル化されていた。アセチル化の部位が明らかとなったことから本酵素を Puromycin 2''-*N*-acetyltransferase と命名した。<sup>23)</sup>

次に、ブラスティンジン S 生産菌 *Streptoverticillium* sp. JCM4673 の *in vitro* タンパク質合成系を調製し、ブラスティンジン S (Fig. 17) による阻害の有無を調べた。その結果、ピューロマイシン生産菌の場合と同様、タンパク質合成が阻害されたことから、本菌のリボソームもまた、自己生産抗生物質に対して感受性であることがわかった。<sup>24)</sup> また、アセチルコエンザイム A の添加によりその *in vitro* タンパク質合成のブラスティンジン S による阻害は解除された。このように、

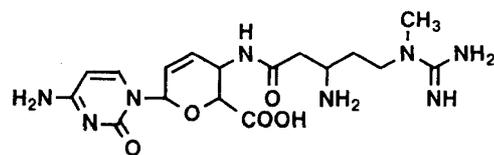


Fig. 17. Structure of blasticidin S.

Table 4. Substrate kinetics of streptomycin 6-phosphotransferase.

Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg protein) $^{-1}$ ]	$V_{max}/K_m$ ratio
SM	3.5	28.6	8.17
Dihydrostreptomycin	11	22.2	2.02
Streptidine	28	11.1	0.40

ストレプトスライシン, ピューロマイシンおよびブラスティンジン S 生産菌の自己耐性にかかわる因子のひとつは, ともに, 抗生物質をアセチル化することにより不活性化する酵素であった。

## 2. 抗生物質不活化酵素の物理化学的諸性質

抗生物質生産菌の自己耐性因子として明らかにした, *Streptomycin 6-phosphotransferase*, *Puromycin 2''-N-acetyltransferase* およびブラスティンジン S アセチル化酵素について精製を行い, その物理化学的性質を調べた。

*Streptomycin 6-phosphotransferase* は, 約37000の単量体酵素であり, その等電点は6.6であった。<sup>25)</sup> ATP, GTP, CTP, TTP といった5'-モノヌクレオチドのうち, ATP がストレプトマイシンリン酸化のための供与体として最適であった。本酵素のストレプトマイシンおよび ATP に対する  $K_m$  値は, それぞれ, 3.5 mM と 0.4 mM であった。酵素活性は, マグネシウムイオン (10 mM) により活性化されたが, EDTA や  $\text{AgNO}_3$  に

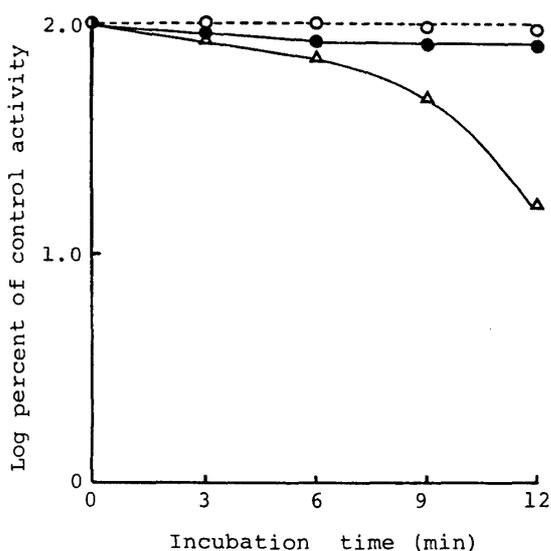


Fig. 18. Heat stability of puromycin 2''-N-acetyltransferase. The enzyme activities were determined at 60°C (○), 70°C (●) and 80°C (△).

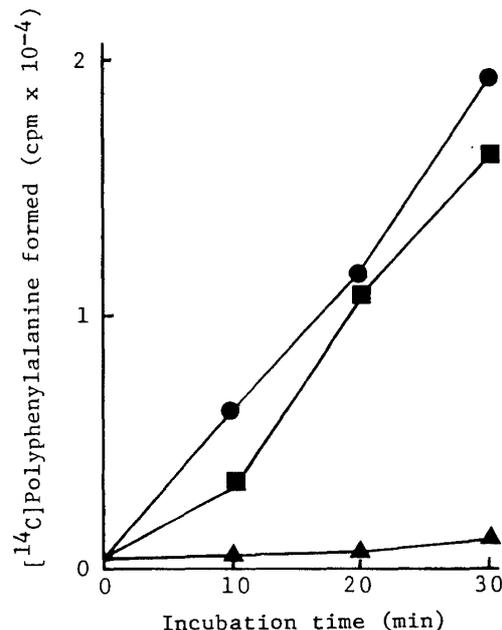


Fig. 19. Protection of polyphenylalanine synthesis from blasticidin S (BS) inhibition by the acetylating enzyme. Ten  $\mu\text{l}$  of 500  $\mu\text{g/ml}$  BS hydrochloride was incubated overnight at 28°C with purified enzyme solution, in the presence or absence of 10  $\mu\text{l}$  of 20 mM acetyl CoA. The reaction mixture was added to the polyphenylalanine-synthesizing system containing ribosomes and a S150 fraction from *S. griseus* PSR-2. Symbols: ●, control; ▲, enzyme fraction incubated with BS and acetyl CoA; △, enzyme fraction incubated with BS but without addition of acetyl CoA.

よって強く阻害を受けた。*Streptomycin 6-phosphotransferase* は, ストレプトマイシンの C-6 位の OH 基をリン酸化するほかジヒドロストレプトマイシンやストレプトチジンをリン酸化する。ただし, ストレプトチジンやジヒドロストレプトマイシンのリン酸化のための親和性はストレプトマイシンに比べ, それぞれ約20倍および4倍低かった (Table 4)。

次に, *Puromycin 2''-N-acetyltransferase* を精製し, その性質を調べた。<sup>26)</sup> 本酵素の分子量は, SDS 電気泳動により 21000, Sephadex G-150 を用いたゲルろ過により 85000 であり, 4つのサブユニットからなるオリゴマー酵素であることが示唆された。また, 等電点および反応の至適 pH はそれぞれ, 6.2 および 7.7 であった。本酵素のピューロマイシンとアセチルコエンザイム A に対する  $K_m$  値はそれぞれ 40  $\mu\text{M}$  および 67  $\mu\text{M}$  であった。また, この酵素は 70°C, 12 min の熱処理に対して, 安定であった (Fig. 18)。実際, 単一タンパクバンドまで生成された *Puromycin 2''-N-acetyl-*

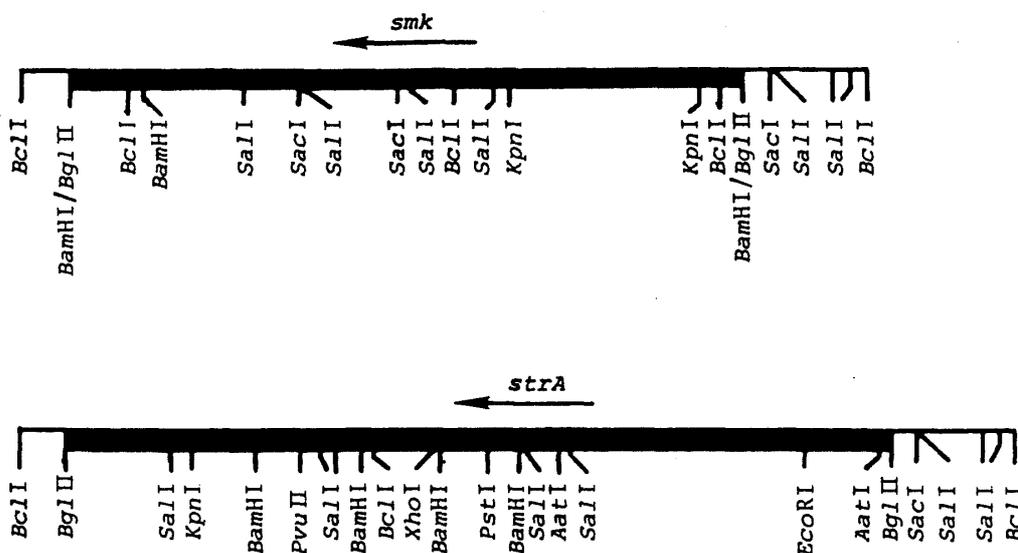


Fig. 20. Comparison of the restriction maps of two streptomycin-resistant genes. The thick line represents a DNA fragment from *S. griseus* HUT6037 and the thin line represents the mel gene of vector pIJ702.

transferase は、ビューロマイシンに対して感受性を示す放線菌の *in vitro* タンパク質合成のビューロマイシンによる阻害を完全に解除した。

同様に、*Streptoverticillium* sp. JCM4673 の産生するプラスチックン S アセチル化酵素の精製を行った。<sup>27)</sup> 本酵素の SDS 電気泳動による分子量は15000であり、Toyopearl HW-55S カラムクロマトグラフィーでは13000と見積られた。本酵素の等電点は7.2であった。プラスチックン S に対する  $K_m$  値は2 mM であり、アセチルコエンザイム A に対するそれは3 mM であった。また、酵素反応はコエンザイム A により拮抗的に阻害され、その  $K_i$  値は99 mM であった。*S. griseus* PSR-2 から調製した *in vitro* タンパク質合成系は、プラスチックン S に対して感受性を示すが (Fig. 19), 精製した酵素標品をアセチルコエンザイム A とともに加えることによって、プラスチックン S による阻害が解除されたことから (Fig. 19), 自己耐性へのアセチル化酵素の寄与が証明された。

### 3. 抗生物質不活性化酵素遺伝子のクローニング

1970年代初期から始まった遺伝子組換え技術は、大腸菌を宿主として精力的に行われていった。1980年代になると、放線菌を宿主とした遺伝子操作も盛んになり、著者の所属した研究室でも自己耐性遺伝子の取得に取り組んだ。

まず、ストレプトマイシン生産菌 *S. griseus*

HUT6037 の全 DNA を *Bam*HI で切断後、*Bcl*II で切断した pIJ703 に連結して *S. lividans* 1326 のプロトプラストに導入した。HUT6037 株は200  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを含む寒天培地で生育できるが、宿主として用いた *S. lividans* 1326 は5  $\mu$ g/ml の濃度で生育できない。そこで、20  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン存在下でも生育できる形質転換株を選択した。その結果、2.5 kb の挿入断片を持つプラスミド pSP6 を保有する *S. lividans* は、200  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン存在下でも生育可能だった。<sup>28)</sup>そして、この形質転換株は、ストレプトマイシンリン酸化酵素活性を有していた。著

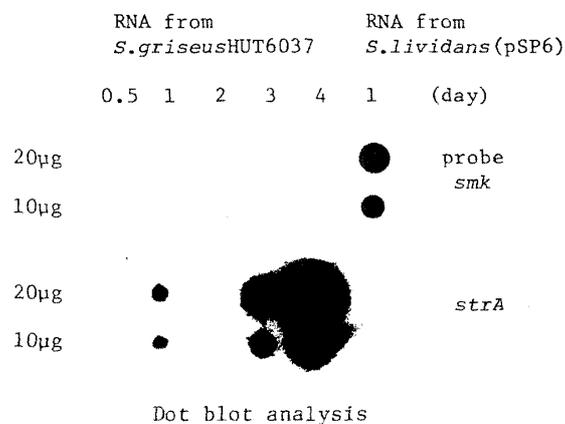


Fig. 21. RNA dot blot analysis. RNAs were extracted from the cells of *S. lividans* harboring plasmid pSP6 and *S. griseus* HUT6037 harvested at the times given. *Smk* and *strA* genes were used as the probes.

者らの研究とはほぼ同じ頃、別のストレプトマイシン生産菌におけるストレプトマイシンリン酸化酵素遺伝子のクローニングの報告がなされたが、<sup>29-31)</sup> 著者らによって報告されたリン酸化酵素遺伝子の制限酵素切断マップ (Fig. 20) および決定された塩基配列<sup>32)</sup> は、彼らの報告とまったく異なっていた。その後の研究で、著者らのクローニングした遺伝子は、Heinzel ら<sup>33)</sup> が報告した Streptomycin 3'-phosphotransferase 遺伝子と同じであり、自己耐性に係わる酵素 Streptomycin 6-phosphotransferase をコードする遺伝子とは異なっていた。著者らはクローニングしたリン酸化酵素遺伝子を *smk* と命名し、Streptomycin 6-phosphotransferase 遺伝子は *strA*<sup>29)</sup> あるいは *aphD* 遺伝子<sup>31)</sup> と命名された。その後、著者らも、*S. griseus* HUT6037 から *strA* に相当する遺伝子を取得することに成功した。<sup>34)</sup> このことは、ストレプトマイシン生産菌には少なくとも2つのストレプトマイシンリン酸化酵素遺伝子が存在することを示すものであるが、これまで、ストレプトマイシン生産菌には、Streptomycin 3'-phosphotransferase の存在することは知られていなかった。そこで、*S. griseus* HUT6037 の菌体から Total RNA を抽出し、*smk* および *strA* 遺伝子をプローブとして、ノーザンブロットハイブリダイゼーション分析を行った。その結果、Fig. 21 に示すように、*strA* の転写産物は検出されたが、*smk* の転写産物は認められなかった。この結果は、*strA* 遺伝子は、*S. griseus* HUT6037 の細胞内で発現するが、*smk* 遺伝子は発現しないか、あるいは発現してもごくわずかであることを示している。したがって、*S. lividans* 1326 を宿主としてクローニングした *smk* 遺伝子は、ストレプトマイシン生産菌の細胞内では休眠状態にあると言える。このような放線菌における休眠遺伝子は、最近、いくつか報告されており、<sup>35-37)</sup> それを追求することは、放線菌研究に新たな展開をもたらすものと思われる。

#### V. プロトプラスト再生により誘導される 抗生物質耐性

放線菌を宿主とした遺伝子操作は、大腸菌のそれと比べて煩雑である。なぜなら、大腸菌では細胞をカルシウム処理することで容易に DNA を導入できるが、放線菌への DNA への導入には、宿主のプロトプラスト化と、それに続く、プロトプラストの菌糸への再生が必要とされるからである。

前述したごとく、*S. griseus* KSN は、ストレプトマ

Table 5. SM resistance in strains obtained by regeneration of protoplasts from *S. griseus* KSN.

Strains	Level of SM resistance ( $\mu\text{g/ml}$ )
HUT6037	200
KSN	< 20
PSR-1	230
PSR-2	350
PSR-3	180
PSR-4	180
PSR-5	300
PSR-6	75
PSR-7	120
PSR-8	100
PSR-9	100
PSR-10	120

イシン生産菌 *S. griseus* HUT6037 を親株として、紫外線照射により分離されたストレプトマイシン6-リン酸化酵素欠損変異株である。本変異株は、ストレプトマイシンを産生せず、ストレプトマイシンに対して非常に高い感受性を示す。事実、これらの性質は継代培養によって変化することはないが、本菌からプロトプラストを調製し、それを菌糸に再生させるだけで、約1%の高頻度でストレプトマイシン耐性が復帰することを見いだした。このことは、放線菌の遺伝子組換え実験に不可欠なプロトプラスト再生操作が、人工的遺伝子変異をもたらす可能性のあることを暗示している。

著者は、Streptomycin 6-phosphotransferase 活性を

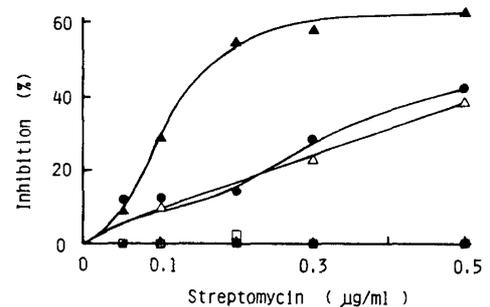


Fig. 22. Inhibition of polyphenylalanine synthesis by streptomycin in *in vitro* protein-synthesizing systems prepared from HUT6037, KSN and PSR strains. The inhibition (%) with a given concentration of streptomycin is expressed as the ratio of the reduced amount of polyphenylalanine synthesis to that synthesized in the respective streptomycin-free reaction mixture. Symbols: ▲, KSN; ○, HUT6037; ●, PSR-1; □, PSR-2; △, PSR-4; ■, PSR-5.

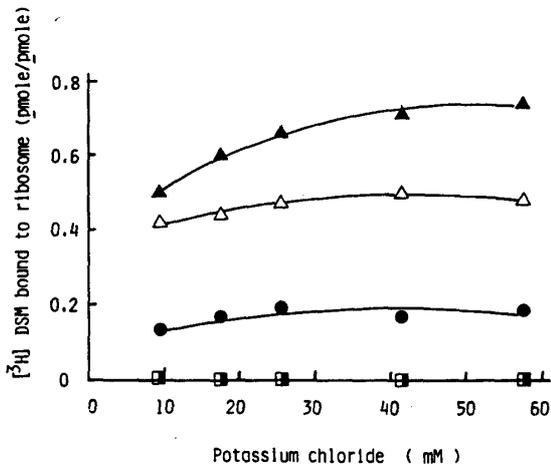


Fig. 23. Binding of  $[^3\text{H}]$ dihydrostreptomycin to ribosomes isolated from KSN and PSR strains. Since the binding affinity of ribosomes for the antibiotic is affected by monovalent cations such as  $\text{K}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ , the binding was examined with various concentrations of potassium chloride. Symbols are the same as in Fig. 22.

有しないにもかかわらずストレプトマイシン耐性を示すこの耐性復帰変異に興味を抱いた。そこで、この耐性機構を明らかにすべく研究を進めた。<sup>38)</sup> *S. griseus* KSNのプロトプラストを再生し、出現したコロニーからランダムに1325個を選び調べたところ、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンに対して耐性を示すコロニーが12個あった。Table 5には、そのうちの10個のストレプトマイシン耐性変異株について、耐性度を詳しく調べた結果を示してある。この表に示すように、これら復帰変異株のストレプトマイシン耐性は *S. griseus* KSNより高いばかりか、KSN株の親株である *S. griseus* HUT6037よりも高い株も認められた。また、これらストレプトマイシン耐性復帰変異株はすべて Streptomycin 6-phosphotransferase 活性を有しなかった。著者は、耐性度の高い4つの変異株 (*S. griseus* PSR-1, PSR-2, PSR-4, PSR-5)の *in vitro* タンパク質合成系を調製し、ストレプトマイシンによるタンパク質合成の影響を調査した。その結果、*S. griseus* PSR-2およびPSR-5では、ポリウリジル酸をm-RNAとした *in vitro* ポリフェニルアラニン合成がまったく阻害されなかった (Fig. 22)。次に、これら変異株のリボソームと<sup>3</sup>HDSMとの結合親和性を測定した。その結果、ストレプトマイシンに対し高い感受性を示す *S. griseus* KSNでは、リボソーム1  $\mu\text{mol}$ あたり0.7  $\mu\text{mol}$ の<sup>3</sup>HDSMを結合したが、PSR-2およびPSR-5両株の

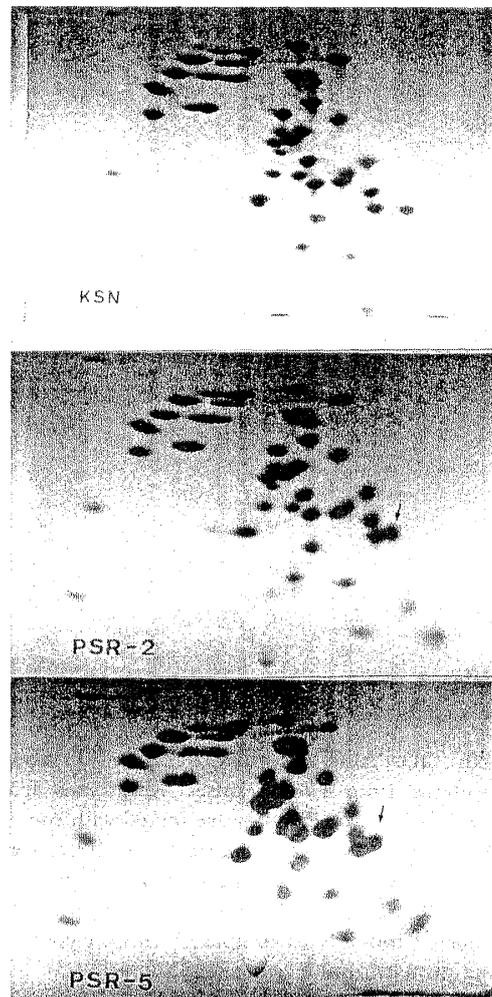


Fig. 24. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) of the 70S ribosomal proteins from KSN and PSR strains. The arrow indicates the protein shifted to the left as compared to the corresponding protein from *S. griseus* KSN.

リボソームはまったく結合しなかった (Fig. 23)。したがって、これら耐性復帰変異株の耐性の原因は、リボソームにあることを示している。そこで、*S. griseus* KSNと *S. griseus* PSR-2およびPSR-5のリボソームタンパク質を二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動で比較した。Fig. 24に示すように、*S. griseus* PSR-2およびPSR-5の70Sリボソームタンパク質の一つが *S. griseus* KSNのそれと電気泳動の移動度において異なっていることがわかった。この変化を確認すべく、*S. griseus* KSNと *S. griseus* PSR-2、あるいは、*S. griseus* KSNと *S. griseus* PSR-5の70Sリボソームタンパク質をそれぞれ混合し、二次元電気泳動にかけた。その結果、*S. griseus* PSR-2の70Sリボソームタンパク質のひ

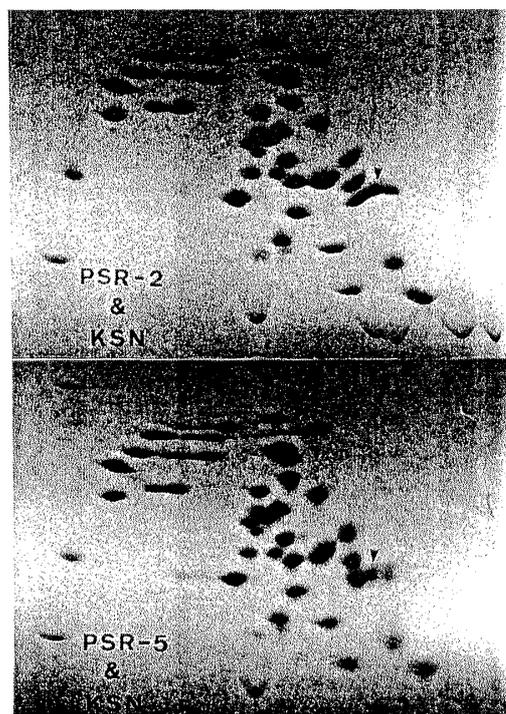


Fig. 25. 2D-PAGE of a mixture of the 70S ribosomal proteins from two strains. Ribosomes from *S. griseus* PSR-2 or PSR-5 were mixed with some from *S. griseus* KSN and subjected to co-electrophoresis. The arrow indicates the protein from *S. griseus* PSR-2 or PSR-5 which was shifted to the left in electrophoretic mobility as compared with the corresponding protein from *S. griseus* KSN.

とつは、それに相当する *S. griseus* KSN のタンパク質に比べ、明らかに、移動度がゲルの左側にシフトしていた (Fig. 25)。この結果は、*S. griseus* PSR-5 の場合で

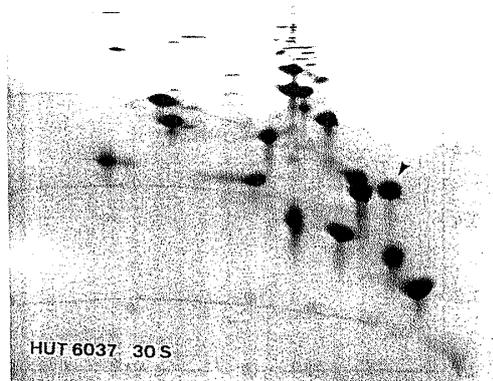


Fig. 26. 2D-PAGE of the 30S ribosomal proteins from *S. griseus* HUT6037. The protein indicated by the arrow corresponds to that in figures 24 and 25.

も同様であった (Fig. 25)。 *S. griseus* HUT6037 の 30S リボソームタンパク質の電気泳動による分析の結果、 *S. griseus* PSR-2 および PSR-5 において変化したタンパク質は、30S リボソームタンパク質であった (Fig. 26)。大腸菌におけるストレプトマイシン耐性変異株のリボソームが調べられた結果、これら変異株では、30S リボソームタンパク質のひとつ S12 タンパクが変異していることが報告された。<sup>39)</sup> このことから、 *S. griseus* のストレプトマイシン耐性獲得に関与する上記リボソームタンパク質は、大腸菌の S12 タンパク質に相当するのかもしれない。いずれにせよ、 *Streptomyces* 属におけるリボソーム変異の例としては、本報告が初めてである。また、放線菌のリボソームタンパク質に関しては、大腸菌リボソームタンパク質 L7/L12 に相当する *S. griseus* HUT6037 に由来するタン

Table 6. Extent of amino acid sequence similarity in amino-terminal region of prokaryotic ribosomal acidic proteins.

	NRCC	<i>E. coli</i>	<i>V. cost.</i>	<i>C. past.</i>	<i>B. stea.</i>	<i>M. lyso.</i>	<i>B. sub.</i>	<i>A. glac.</i>	<i>S. grise.</i>
NRCC	100	74	68	53	58	47	55	38	49
<i>E. coli</i>	74	100	79	50	55	50	39	28	36
<i>V. cost.</i>	68	79	100	50	50	50	37	31	36
<i>C. past.</i>	53	50	50	100	84	78	63	51	41
<i>B. stea.</i>	58	55	50	84	100	82	74	49	44
<i>M. lyso.</i>	47	50	50	78	82	100	74	49	44
<i>B. sub.</i>	55	39	37	63	74	74	100	46	46
<i>A. glac.</i>	38	28	31	51	49	49	46	100	74
<i>S. grise.</i>	49	36	36	41	44	44	46	74	100

NRCC., NRCC 11227; *E. coli*, *Escherichia coli*; *V. cost.*, *Vibrio costicola*; *C. past.*, *Clostridium pasteurianum*; *B. stea.*, *Bacillus stearothermophilus*; *M. lyso.*, *Micrococcus lysodeikticus* MA1/2; *B. sub.*, *Bacillus subtilis*; *A. glac.*, *Arthrobacter glacialis*; *S. grise.*, *Streptomyces griseus*.

タンパク質を取り上げその構造決定に関する研究を広島大学原爆放射能医学研究所伊藤卓爾博士（現広島県立大学教授）と行った。<sup>40)</sup>このL7/L12はリボソームの50Sサブユニットに含まれる著しく酸性度の高いタンパク質であり、ファクター依存性のGTPase活性に関与する。*S. griseus* HUT6037の70Sリボソームから抽出したタンパク質混合物をDEAE-Celluloseカラムクロマトグラフィーにかけてこの酸性タンパク質を単離した。アミノ酸の配列は、ベックマンシークエネーターを用いたエドマン分解法と各種タンパク質消化酵素を用いて決定した。この酸性リボソームタンパク質(SA1と命名)はAsp 7, Thr 5, Ser 5, Glu 18, Gln 4, Pro 4, Gly 8, Ala 24, Val 13, Met 1, Ile 4, Leu 12, Phe 5, Lys 14 および Arg 1の計125アミノ酸残基から構成され、その分子量は13069であった。このSA1タンパク質のアミノ酸配列を各種細菌のL7/L12タイプのリボソームタンパク質と比較した。*N*-末端領域のアミノ酸配列(最初の39残基の比較)の類似性を%で表した結果をTable 6に示したが、*S. griseus*のSA1タンパク質は、*Arthro bacter glacialis*のそれと最も高い類似性を示し(74%)、ほかの細菌との間の類似性は36-46%と低かった。最近、英国のグループにより、*Arthro bacter*における宿主-ベクター系が研究され、*Streptomyces*の代表的クローニングベクター-pIJ702を使用できることがわかってきた。<sup>41)</sup>また、*Arthro bacter*のエリスロマイシン耐性遺伝子が*Streptomyces*において発現できることも明らかとなっている。このことは、*Arthro bacter*ゲノムのGC含量が*Streptomyces*のそれと類似していることと、著者らの研究により明らかとなった、兩種間でのリボソームタンパク質の相同性が高いこと<sup>40)</sup>から判断すると当然の結果と言える。

## VI. おわりに

ストレプトマイシン生産菌*S. griseus*は生産量に匹敵する濃度のストレプトマイシンをあらかじめ培地中に添加して培養すると、その発育が著しく抑制される。このことは、自己耐性機構が生育初期から構成的なものではなく、菌が発育して抗生物質生産期に至る間に形成されることを示唆している。このような、発育進行にともなう自己耐性機構の獲得は、エリスロマイシンやチオストレプトン生産菌で示されたような、単なる、抗生物質の一次作用点であるリボソームの耐性化による機構では説明できない。事実、著者の研究結果は、菌の発育と共に増加するストレプトマイシン不活

化酵素と抗生物質生産期にかけて起こる細胞膜透過性の変化がストレプトマイシン生産菌の自己耐性に重要な役割を演じていることを示した。

一方、抗生物質生産量の高い株は、当然、自己耐性も高いことから、生産菌の自己耐性を高め、抗生物質生産量の増産を図ろうとする研究は、工業的にも有益であろう。それについて、現在、パリ・パストゥール研究所教授であるJulian E. Davies博士は、クローニングしたaminoglycoside phosphotransferase 遺伝子をpIJ702に連結して生産菌に導入し、カナマイシンおよびネオマイシンの生産量のアップを実現させた。<sup>42)</sup>

著者は、パストゥール研究所生物学部門のDavies教授の研究室において、抗癌抗生物質のひとつであるブレオマイシンについて、その生産菌*Streptomyces verticillus*から二種類の自己耐性遺伝子をクローニングすることに成功した。<sup>43)</sup>しかも、この遺伝子は隣接して存在することを見いだした。これら遺伝子の塩基配列の決定も、帰国後、Julian E. Davies教授との共同研究として開始され、すでに終了した。その成果は、学術論文として、近く公表する予定である。ブレオマイシン遺伝子のひとつによってコードされるタンパク質はブレオマイシンをアセチル化する酵素であった。本抗生物質は、これまで述べてきたタンパク質合成阻害抗生物質とは異なり、DNA合成阻害剤である。作用点異なる抗生物質にもかかわらず、自己耐性因子のひとつがアセチル化酵素であったことに、「またしてもか」という感がある。

本研究のほとんどは、広島大学工学部醸酵工学教室在職中に行ったものであり、ご指導、ご鞭撻を賜った能美良作広島大学教授(現在名誉教授)に深く感謝申し上げます。また、研究遂行中、温かい励ましとご指導を賜りました広島大学新見 治教授、室岡義勝教授に心からお礼申し上げます。また、共同研究者でありました新川英典博士(現広島大学工学部助手)、白 舜英博士ならびに醸酵工学生合成化学研究室の卒業生に感謝致します。さらに、現在私が所属しております広島大学医学部総合薬学科のスタッフの皆様の日頃の温かい励ましに心よりお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Fahnestock, S., Erdmann, V., Nomura, M.: *Methods in Enzymology*, **30**, 554-562 (1974).
- 2) Cella, R., Vining, L. C.: *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1591-1597 (1974).
- 3) Sugiyama, M., Kobayashi, H., Nimi, O., Nomi, R.: *FEBS Lett.*, **110**, 250-252 (1980).
- 4) Sugiyama, M., Mochizuki, H., Nimi, O., Nomi, R.: *J. Antibiot.*, **34**, 1183-1188 (1981).
- 5) Hunter, G. D., Hockenull, D. J. D.: *Biochem. J.*,

- 59, 268-272 (1955).
- 6) Walker, J. B., Walker, M. S.: *Biochem.*, **8**, 763-770 (1969).
  - 7) Walker, J. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **165**, 646-654 (1969).
  - 8) Knip, B., Grisebach, H.: *FEBS Lett.*, **65**, 44-46 (1976).
  - 9) Blumson, N. L., Baddiley, J.: *Biochem. J.*, **81**, 114-124 (1961).
  - 10) Ortmann, R., Martn, U., Grisebach, H.: *Eur. J. Biochem.*, **43**, 265-271 (1974).
  - 11) Bruton, J., Horner, W. H., Russ, G. A.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 813-818, (1967).
  - 12) Kniep, B., Grisebach, H.: *J. Antibiot.*, **33**, 416-419 (1980).
  - 13) Maier, S., Grisebach, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 231-241 (1979).
  - 14) Nimi, O., Kiyohara, H., Mizoguchi, T., Ohata, Y., Nomi, R.: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1150-1156 (1970).
  - 15) Sugiyama, M., Mochizuki, H., Nimi, O., Nomi, R.: *FEBS Lett.*, **139**, 331-333 (1982).
  - 16) Nimi, O., Sugiyama, M., Kameoka, H., Tomoeda, H., Ono, K., Nomi, R.: *Biotechnol. Lett.*, **3**, 239-244 (1981).
  - 17) Sugiyama, M., Mizuno, S., Ohta, Y., Mochizuki, H., Nimi, O.: *Biotechnol. Lett.*, **12**, 1-6 (1990).
  - 18) Sugiyama, M., Nimi, O.: *Actinomycetol.*, **4**, 15-22 (1990).
  - 19) Sugiyama, M., Nimi, O., Nomi, R.: *J. Gen. Microbiol.*, **121**, 477-478 (1980).
  - 20) Thompson, C. J., Skinner, R. H., Thompson, J., Ward, J. M., Hopwood, D. A., Cundliffe, E.: *J. Bacteriol.*, **151**, 678-685 (1982).
  - 21) Keeratipibul, S., Sugiyama, M., Nimi, O., Nomi, R.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 19-28 (1984).
  - 22) Keeratipibul, S., Sugiyama, M., Nomi, R.: *Biotechnol. Lett.*, **5**, 441-446 (1983).
  - 23) Sugiyama, M., Paik, S.-Y., Nomi, R.: *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1999-2005 (1985).
  - 24) Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S.-Y., Nimi, O., Nomi, R.: *J. Antibiot.*, **39**, 827-832 (1986).
  - 25) Sugiyama, M., Sakamoto, M., Mochizuki, H., Nimi, O., Nomi, R.: *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1683-1687 (1983).
  - 26) Paik, S.-Y., Sugiyama, M., Nomi, R.: *J. Antibiot.*, **38**, 1761-1766 (1985).
  - 27) Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S.-Y., Nimi, O.: *J. Antibiot.*, **42**, 135-137 (1989).
  - 28) Shinkawa, H., Sugiyama, M., Nimi, O., Nomi, R.: *FEBS Lett.*, **181**, 385-389 (1985).
  - 29) Ohnuki, T., Imanaka, T., Aiba, S.: *J. Bacteriol.*, **164**, 85-94 (1985).
  - 30) Toyama, H., Okami, Y., Umezawa, H.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1819-1833 (1987).
  - 31) Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowatzki, K., Stockmann, M., Piepersberg, W.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 8041-8056 (1987).
  - 32) Shinkawa, H., Sugiyama, M., Nimi, O.: *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1391-1394 (1988).
  - 33) Heinzl, P., Werbitzky, O., Distler, J., Piepersberg, W.: *Arch. Microbiol.*, **150**, 184-192 (1988).
  - 34) Shinkawa, H., Sugiyama, M., Nimi, O.: *Biology of Actinomycetes '88*, pp. 353-358, Japan Scientific Societies Press (1988).
  - 35) Jones, G. H., Hopwood, D. A.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 14151-14157 (1984).
  - 36) Jones, G. H., Hopwood, D. A.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 14158-14164 (1984).
  - 37) Murakami, T., Holt, T. G., Thompson, C. J.: *J. Bacteriol.*, **171**, 1459-1466 (1989).
  - 38) Sugiyama, M., Katoh, T., Mochizuki, H., Nimi, O., Nomi, R.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 347-351, (1983).
  - 39) Ozaki, M., Mizushima, S., Nomura, M.: *Nature (London)*, **222**, 333-339 (1969).
  - 40) Itoh, T., Sugiyama, M., Higo, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **701**, 164-172 (1982).
  - 41) Roberts, A. N., Barnett, L., Brenner, S.: *Biochem. J.*, **243**, 431-436 (1987).
  - 42) Cramer, R., Davies, J. E.: *J. Antibiot.*, **39**, 128-135 (1986).
  - 43) 杉山政則: *実験医学*, **7**, 96-99 (1989).