薬剤耐性菌の遺伝生化学的研究 (1)リビドマイシンの抗菌作用

稲 福 全 昌

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋 進教授)

I 緒 言

アミノ配糖体抗生物質に対する耐性菌の生化学的機構について多くの研究が発表されてきた。耐性大腸菌 (1~7), 緑膿菌 (8~12), 耐性ブドウ球菌 (13), から抽出した酵素を用いた研究から, アミノ配糖体は磷酸化, アセチル化, アデニル化によって不活化されていることがこれ迄の研究によって明らかにされている。

これらの研究の先駆的な業績としては先づ岡本ら (2) の研究があげられる。ついで梅沢らはカナマイシン (KM) は, 6'-N-acetylkanamycin (5), 3'-phosphorylkanamycin (6,8,10,12) となって活性を失うことを明らかにした。

同様にストレプトマイシン (SM) は adenylylstreptomycin (4,7) または phosphorylstreptomycin (3,11) となって活性を失うことが知られている。

最近わが国において新らしい抗生物質リビドマイシンが開発された。その化学構造は第1図に示すように, 2-deoxystreptamine を含む pentasaccharide aminoglycoside である (13)。

図からも分るように lividamine の3' に OH を欠き, 6' に NH₂基を欠くため KM- 磷酸化酵素によって不活化されないことが既に小林ら (10) によって報告されている。

筆者は人の病巣由来の細菌を蒐集し, その薬剤耐性を疫学的に調査するかたはら, 菌の分類, 同定をすませたもので KM 耐性菌を無作為に選別し, リビドマイ

図1 Lividomycin の化学構造

シン (LV) 耐性と、その生化学的機構について研究し、その結果をここに発表する。

蛋白質の測定 蛋白質の測定は Lowry ら (15) の方法によった。

II 材 料 と 方 法

使用した細菌 多くの保存株の中から、KM 耐性菌をランダムに選別し *Staphylococcus aureus* 15 株, *Escherichia coli* 120 株, *Proteus vulgaris* 50 株, *Proteus rettgeri* 30 株, *Klebsiella pneumoniae* 25 株, *Pseudomonas aeruginosa* 30 株の計 270 株を用いた。

抗生物質 リビドマイシン A (LV), 硫酸塩は興和東京研究所において精製されたもので、三橋教授をとおして分与された。LV の磷酸塩はペーパークロマトグラフィーのスタンダードとして用いたもので、梅沢浜夫博士の好意によって分与されたものである。カナマイシン A (KM) は国立予防衛生研究所の抗生物質研究部の好意によって分与された Working standard である。

培地 菌の培養保存には Heart infusion (HI) 寒天を用いた。菌体を多量に集めるための液体培地としてはペプトン水を用いた。その組成は次のとおりである。ブドウ糖 1.0 g, ペプトン 10.0 g, NaCl 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.50 mg, KH_2PO_4 45mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15mg, 蒸留水 1,000 ml, pH は 7.2 に調整した。

(S-105) 分画の調製 夫々の菌を 1.0 L のペプトン水に培養し、37℃ で 5 時間振盪培養を行なった。log phase の菌を遠心で集め、TMK (0.06M KCl 0.01M $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0.06 M 2-メルカプトエタノールを 0.1 M トリス・塩酸バッファに溶解、pH 7.8) で 2 度洗った後 5.0 ml の TMK 溶液に浮べこれを低温の下で超音波で破碎した。破碎した菌浮遊液を 105,000xg で 60 分遠心して得られた上清液を (S-105) 分画として用いた。

抗生剤の不活化 反応液の組成は次のとおりである。0.5 の TMK 溶液, 0.1 ml の 40mM adenosine triphosphate (ATP), 0.1 ml の 10mM 抗生剤, 0.3 ml の (S-105) 分画, 反応は 30℃ の水槽で行い、60 分後に 80℃ 5 分加熱後反応液中の抗生物質の残存する活性を *Bacillus subtilis* PCI219 を被検菌としてカツプ法で行った。微生物検定は各反応液について 3 回の測定を行いその平均値を用いた。微生物検定の振れは 10%

以下におさえることができた。

不活化した LV の分離精製 LV の不活化には (S-105) 分画 45 ml, 2.0 g ATP, 1.0 g の LV, 55 ml TMK 溶液を用いた。37℃ で 20 時間反応せしめた後、80℃ 5 分加熱して反応を中止せしめた。加熱した反応液を急冷後、2,500xg 15 分遠心して沈渣を除き、その上清を CM-Sephadex C-25 (NH_4^+ form, 3×80 cm) にかけた。カラムの不純物を除くため 400 ml の蒸留水と 500 ml の 0.3 N HCOONH_4 で洗滌した後、不活化された LV を 0.05 N NH_4OH で溶出した。ninhydrin 反応, anthrone 反応, Hanes 反応陽性でしかも抗菌力のない分画を集め、減圧下で乾燥せしめ、550 mg の白色粉末が得られた。

Alkaline phosphatase 処理 4mcg の alkaline phosphatase (Sigma Co.) を 1.0 ml の 0.1mM 不活化 LV 溶液に加え、37℃ 3 時間反応せしめた。3 時間後その溶液の抗菌作用を bioassay で測定した。

アイソトープで標識した ATP の LV のとりこみ。

反応液は次のとおりである。

50 μ l TMK 溶液, 10 μ l の 1mM LV, 10 μ l の 40mM ATP (γ -3,2,9-ATP, 35 μ ci 1mg, または ^{14}C -ATP, 100 μ ci 1mg), 30 μ l の S-105) 分画, 37℃ で 60 分反応せしめた後 10 μ l の反応液を phosphocellulose 紙 (約 1 cm², Whatman P-81) に滴下し蒸留水で洗滌後乾燥せしめた。放射能は Packard のシンチレーションカウンターを用いて測定した。

III 実 験 結 果

KM 耐性と LV 不活化の関係 病巣分離の 270 株の KM 耐性菌を用いて、LM 耐性の模様を調査した。

表 1 KM 耐性をもつ各種細菌による LV 不活化の模様

菌 種	調査した菌株数	LV 耐性菌	LV を不活化した菌株数
<i>S. aureus</i>	15	10	10
<i>E. coli</i>	120	105	95
<i>P. vulgaris</i>	50	37	35
<i>P. rettgeri</i>	30	24	20
<i>K. pneumoniae</i>	25	21	18
<i>P. aeruginosa</i>	30	30	3
	270	227 (84%)	181 (67%)

LV の不活化の測定は実験と材料の項参照。() 内数字は % を示した。

第1表に示すように調査した270株の中227株(84%)がLV耐性を示した。227株を用いて、LV不活化の模様を調べた結果181株(67%)がLVを不活化していることを知った。つまりLV耐性菌の79%が酵素的にLVを不活化している。

すなわち、これ迄アミノ酸糖体の不活化において知られた、磷酸化、アセチル化、アデニル化によらないLV耐性のあることが判明した。

LV不活化に必要な反応系 LVを不活化していることが判明した緑膿菌、大腸菌の中から代表として、*P. aeruginosa* 54及び*E. coli* Rmk53⁺を選んだ。

Rmk53は伝達性ある耐性因子で、KM、LVの他にテトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CM)、ストプトマイシン(SM)、及びスルホンアミド(SA)耐性を与えることができる。

第2表に示すように、反応系からATPまたはMg⁺⁺を除くと不活化がおこらなくなる。従ってLVの不活化にはATPを補酵素としMg⁺⁺を必要とする酵素反応が関与していることが明らかにされた。

表2 LV不活化に必要な反応系

反 応 系	s-105 分 画	LVの不活化(%)
Complete system	<i>P.aeruginosa</i> 54	100
	<i>E.coli</i> mm Rmk53 ⁺	100
-ATP	<i>P.aeruginosa</i> 54	0
	<i>E.coli</i> Rmk53 ⁺	0
-(s-105) + ATP	<i>P.aeruginosa</i> 54	0
	<i>E.coli</i> Rmk53 ⁺	0
-(s-105) + ATP (s-105)	<i>P.aeruginosa</i> 54	0
	<i>E.coli</i> mk53	0
-Mg ⁺⁺ + ATP	<i>P.aeruginosa</i> 54	0
	<i>E.coli</i> Rmk53 ⁺	0

反応系は材料と方法の項参照。

(s-105)は100℃10分加熱した。

標識した³²PのLVへのとりこみ γ -³²Pまたは¹⁴Cで標識されたATPを用いて、先に示したようにLVを不活化する*P.aeruginosa* 54及び*E. coli* Rmk53⁺からの酵素によってLVの不活化を行い、LVへの³²Pまたは¹⁴Cのとりこみの模様を調べた。

表3に示すように、 γ -³²Pで標識したATPを用いたときにのみ不活化LVが標識されていることを知った。このことはLVの不活化にはATPの存在が必要で、不活化物はLVの磷酸化によることを強く示している。

更に不活化されたLVをalkaline phosphatase処理することによって不活化LVは再び抗菌作用を恢復した。従ってLVは磷酸化によって不活化されていることが明らかになった。

不活化酵素の性状 *P.aeruginosa* 54及び*E. coli* Rmk53⁺から調製した酵素を用い、その性状を調べた。

表3 ATPの γ -³²PのLVへのとりこみ

S-105	³² P a)	¹⁴ C b)	LV不活化
<i>P.aeruginosa</i> 54	1,200	0	100
<i>E.coli</i> Rmk53 ⁺	1,070	0	100
<i>E.coli</i> R ⁻	78	0	0

a) γ -³²PのLVへのとりこみ (counts/min/10 μ liters)

b) ¹⁴CのLVへのとりこみ (counts/min/ μ liters)

第2図に示すように、夫々の酵素の最適pHは略7にあつてpH5以下またはpH9以上では酵素活性が著しく低下する。酵素活性は40℃5分加熱でその活性の60%が、50℃5分加熱では殆んど95%以上の活性が消失することを知った。

磷酸LVの性状 *P. aeruginosa* 54及び*E. coli* Rmk53⁺から作製した(S-105)分画を用いてLVを不活化し、不活化LVを実験方法の項に記載した方法で精製

図2

図 3

し、その化学的性状を調べた。分与された磷酸化 LV (monophosphorylated LV) を対照として、クロロホルム、メタノール、17% NH_4OH (2:1:1) を溶媒として濾紙クロマトグラフィーを行った。その結果は表 4 に示した。すなわち LV の構造中に含まれているリボースの 5'-OH の部分の磷酸化されたサンプルと全く同じ Rf 値を示し、本実験において得られた二つの不活化 LV もまた monophosphorylated LV で恐らく、同じリボース部分が磷酸化されていることを強く示唆している。

不活化 LV を CM-sephadex を使って再精製したものの元素分析を試みた。

$\text{C}_{25}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_{18} \cdot \text{PO}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ としての計算値：

C, 38.12; H, 7.06; N, 7.66; P, 3.39

実測値：緑膿菌によって不活化されたもの

C, 38.14; H, 6.32; N, 7.72; P, 3.39

大腸菌によって不活化されたもの

C, 38.13 H, 6.82; N, 7.26; P, 3.38

表 4 磷酸化 LV の Rf 値の比較

サンプル	Rf
LV	0.78
磷酸化 LV	
a)	0.83
b)	0.82
c)	0.83

溶媒：クロロホルム、メタノール、17% NH_4OH 2:1:1

a) 梅沢博士より分与された monophosphorylated LV

b) *P.aeruginosa* 54 で不活化した LV

c) *E.coli* Rmk53⁺ で不活化した LV

以上の結果を用いた二つの耐性菌によって不活化された LV は磷酸化 LV で恐らく LV のリボースの 5'-OH が磷酸化されたものと推定される。これ迄の調査結果から考察し、次の推論が下されるであろう。KM 耐性菌のかなり多くに LV 耐性が認められる。

前に述べたように病巣由来菌の KM 耐性は D-aminoglucose 部分の 3'-OH または 6'-NH₂ の磷酸化またはアセチル化によって KM を不活化する。ところが LV にはこれに相当する部分に OH または NH₂ 基を欠いている。しからば当然 KM 耐性菌に対し LV も有効な筈である。また LV は実際臨床的に使用されていない。従って当然 LV 耐性菌は出現していない筈である。しかし疫学的なデータは、KM 耐性菌の約 70% は LV 耐性である。しかもその耐性菌は LV に含まれているリボースの 5'-OH が磷酸化されていることが明らかにされている。しかもこの酵素は LV-A, LV-B, ネオマイシン、パロモマイシン、マンノシールパロモマイシン、ヴィスタマイシンを不活化することができる。すなわちこれらの抗生物質は LV と同様 D-ribose をその構造の中に含んでいる。恐らく既に販売されている、ネオマイシン、パロモマイシンのためこれらの薬剤に対する耐性菌が出現し、今後市販されるであろう LV にも耐性を示していると予想される。

また疫学的調査の教えるところでは LV 耐性菌には二種ある。一つは LV の不活化で、ごく僅かの残りの LV 耐性菌は、この薬剤を不活化できない。恐らく薬剤の非透過性か、またはリボゾームの変化によることが予想される。特に自然耐性である緑膿菌の中に LV を不活化しないものがあることは注目すべき事実である。

討 議

カナマイシン、ストレプトマイシンなどのアミノ配糖体はすぐれた抗生剤としてグラム陽性、陰性の細菌感染症に広く使用されている。2-deoxystreptamine を含むアミノ配糖体としては、カナマイシン、ネオマイシン、パロモマイシン、マンノシールパロモマイシンが知られているが、これらの抗生剤は病原由来の耐性菌によってD-aminoglucoseのC-3位におけるOHが磷酸化を受けることによって不活化される。しかるにLVやゲンタマイシンC(16)はD-aminoglucoseのC-3位にOH基を欠くため磷酸化をうけず、従ってKMなどのアミノ配糖体耐性菌に有効であることが知られている。

既にこれ迄にアミノ配糖体である、KM, SM, ネオマイシン、パロモマイシン(1-3, 5-9, 12, 13)を磷酸化してその抗菌作用を失わしめる酵素は上記薬剤耐性菌から証明され、これらの酵素はATPを補酵素として作用することも知られている。従ってD-aminoglucoseのC-3位の化学構造上の差違は、生物活性上極めて重要な意義をもつものである。(4, 17.)

既に三橋研究室においては緑膿菌、大腸菌のKM, LV耐性菌からLVを磷酸化する酵素を報告している。(18, 19.)しかしKMを磷酸化する酵素(10)はLVを磷酸化できないことから両酵素は異なる酵素であることを強く示唆している。またSM磷酸化酵素(11)の示適pHは10であることが報告されているが、LV不活化酵素の示適pHが7であることから両者の酵素は異なることが示唆されている。また共同研究者の研究によって精製されたSM磷酸化酵素はLVを全く磷酸化できないことからLV磷酸化酵素はKM, SM磷酸化酵素と異なるものと考えられる。

三橋ら(20, 21)はKM, SM, LV耐性菌に有効なゲンタマイシンCが、この薬剤に耐性の緑膿菌によって2-deoxystreptamineの3位のNH₂基がacetyl CoA存在下でアセチル化され、その結果不活化されることを最近明らかにした。

更にまた不活化されるLVの位置は、LVの中に含まれるriboseの5'-OHであることが、三橋研究室と梅沢研究室の共同によって明らかにされた。(19, 22, 23)

このようにアミノ配糖体耐性菌の疫学と耐性菌の生化学構造上のわずかの差違が極めて大きい意義のあることを明らかにした。

結 論

LVを不活化できる二つの菌種を選んで調べた結果ではLVの不活化はATPを補酵素とする酵素反応で、LVが磷酸化されるためと結論された。しかも不活化物は磷酸一分子を含み対照としておかれたLVのD-riboseの5'-OHが磷酸化された物質と、同一物質と推定された。

以上の事実は、薬剤の耐性は極めて普遍的な姿で現れ、これ迄知られた事実から次のように要約される。

- (1) 2-deoxystreptamineに結合するD-aminoglucoseの3'-OHまたは6'-NH₂が磷酸化かアセチル化を受ける。
- (2) D-riboseを含む抗生物質は、その5'-OH部分の磷酸化をうけて不活化される。

貴重な試薬の分与をうけ研究の遂行に多くのアドバイスを頂いた梅沢浜夫博士に厚く感謝する。またLVの分与をうけた興和の東京研究所に謝意を表する。

文 献

- 1) Harwood, J.H., and Davis, H.S. Resistance factor-mediated streptomycin resistance., J.Bacteriol., 97: 1262-1271, 1969.
- 2) Okamoto, S., and Suzuki, Y. Chloramphenicol-, dihydrostreptomycin- and kanamycin-inactivating enzymes from multiple-drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome 'R'. Nature, 208: 1301-1309, 1965.
- 3) Ozanne, B., R. Benveniste, D. Tipper, and Davies, J. Aminoglycosidic antibiotics: inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factor. J.Bacteriol., 100: 1144-1146, 1969.
- 4) Umezawa, H., S. Takasawa, M. Okanishi, and Utagahara, R. Adenylyl streptomycin, a product of streptomycin inactivated by *Escherichia coli* carrying R factor. J.Antibiotics, 21: 81-82, 1968.
- 5) Umezawa, H., M. Okanishi, R. Utagahara, K. Maeda, and Kondo, S. Isolation and structure of kanamycin inactivated by a cell free system of kanamycin-resistant *Escherichia coli*. J.Antibiotics, 20: 136-141, 1967.

- 6) Umezawa,H., M.Okanishi, S.Kondo, K.Hamana, R.Utahara, K.Maeda, and Mitsuhashi,S. Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. Science, 157 : 1559-1561, 1967.
- 7) Yamada,T., D.Tipper, and Davies,J. Enzymatic inactivation of streptomycin by R factor-resistant *Escherichia coli*. Nature, 219 : 288-291, 1968.
- 8) Doi,O., M.Ogura, N.Tanaka, and Umezawa,H. Inactivation of kanamycin, neomycin and streptomycin by enzymes obtained in cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl.Microbiol., 16 : 1276-1281, 1968.
- 9) Doi,O., S.Kondo, N.Tanaka, and Umezawa,H. Phosphorylating enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*., J.Antibiotics 22 : 273-282, 1969.
- 10) Kobayashi,F., M.Yamaguchi, and Mitsuhashi,S. Phosphorylated inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Pseudomonas aeruginosa*. Japan. J.Microbiol., 15 : 265-272, 1971.
- 11) Kobayashi,F., M.Yamaguchi, and Mitsuhashi,S. Inactivation of dihydro-streptomycin by *Pseudomonas aeruginosa*. Japan.J.Microbiol., 15 : 265-272, 1971.
- 12) Umezawa,H., O.Doi, M.Ogura, S.Kondo, and Tanaka,N. Phosphorylation and inactivation of kanamycin by *Pseudomonas aeruginosa*. J.Antibiotics, 21 : 154-155, 1968.
- 13) Doi,O., M.Miyamoto, N.Tanaka, and Umezawa,H. Inactivation and phosphorylation of kanamycin by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. App. Microbiol., 16 : 1282-1284, 1968.
- 14) Oda,T., T.Mori, Y.Kyotani, and Masahito,N. Studies on new antibiotic lividomycins. VI. Structure of lividomycin A. J.Antibiotics, 24 : 511-518, 1971.
- 15) Lowry,O.H., J.N.Rosebrough, A.L.Ferr, and Randall,R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193 : 265-275, 1951.
- 16) Cooper,D.J., and H.M.Marigliano. Recent developments in the chemistry of gentamicin. J.Infect. Dis. 119 : 342-344.
- 17) Tanaka,N. Biochemical studies on gentamicin resistance. J.Antibiotics, 23 : 469-471, 1970.
- 18) Kobayashi,F., Yamaguchi,M., and Mitsuhashi,S. Phosphorylated inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Pseudomonas aeruginosa*. Japan.J.Microbiol., 15 : 265-272, 1971.
- 19) Yamaguchi,M., Koshi,T., Kobayashi,F., and Mitsuhashi,S. Phosphorylation of lividomycin by *Escherichia coli* carrying R factor. Antibact.Ag. Chemoth., 2 : 142-146, 1972.
- 20) Mitsuhashi,S., F.Kobayashi, and Yamaguchi,M. Enzymatic inactivation of gentamicin C components by cell-free extract from *Pseudomonas aeruginosa*. J.Antibiot., 24 : 400-401, 1971.
- 21) Kobayashi,F., Yamaguchi,M., Eda,J., Hiramatsu,M., and Mitsuhashi,S. Gentamicin C acetylating enzyme from resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the structure of the acetylated product. Gunma Rep.Med.Sci., 5 : 291-301, 1972.
- 22) Kondo,S., Yamamoto,H., Naganawa,H., Umezawa,H., and Mitsuhashi,S. Isolation and characterization of lividomycin A inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* carrying R factor. J.Antibiotics,
- 23) Yamamoto,H., Kondo,S., Maeda,K., and Umezawa,H. Synthesis of lividomycin A 5'-phosphate, an enzymatically inactivated lividomycin A. J.Antibiotics, 25 : 485-486, 1972.

GENETIC AND BIOCHEMICAL STUDIES OF BACTERIAL DRUG RESISTANCE

1) ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LIVIDOMYCIN

ZENSHO INAFUKU

Department of Microbiology, School of Medicine Gunma University

(Director : Prof. S. Mitsuhashi)

Many papers have been presented on the enzymatic inactivation of the aminoglycosidic antibiotics by cell-free extracts obtained from drug-resistant strains of bacteria isolated from clinical specimens. Kanamycin is inactivated by two mechanisms responsible for the formation of 6-N-acetyl-kanamycin and 3'-phosphorylkanamycin. Similarly, streptomycin is inactivated by the formation of adenylylstreptomycin and phosphorylstreptomycin. These facts indicate that three mechanisms, i.e., phosphorylation, acetylation and adenylylation, involve in the inactivation of aminoglycoside antibiotics. It was reported previously that lividomycin, a new aminoglycosidic pentasaccharide antibiotic containing 2-deoxystreptamine, lacks the hydroxyl group at the C-3 position of the D-aminoglucose moiety and is not inactivated by a kanamycin-phosphorylating enzyme. This paper deals with the studies of anti-bacterial activity of lividomycin(LV) toward many strains of bacteria isolated from clinical specimens. The results are summarized as follows :

- 1) There are two types of LV-resistant strains. One group is capable of inactivating LV by phosphorylation and another group can not inactivate the drug.
- 2) The inactivated product is a monophosphorylated LV.
- 3) Chemical studies disclosed that the hydroxyl group at the 5"- position of the ribose moiety is phosphorylated.