



Title	ミコバクテリアにおけるバイオマイシン耐性のリボソーム・レベルでの研究
Author(s)	増田, 國次
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30736
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【4】

氏名・（本籍）	増田國次
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 2658 号
学位授与の日付	昭和 47 年 11 月 16 日
学位授与の要件	医学研究科病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ミコバクテリアにおけるバイオマイシン耐性の リボソーム・レベルでの研究
論文審査委員	(主査) 教授 堀 三津夫 (副査) 教授 米田 正彦 教授 山村 雄一

論文内容の要旨

〔目的〕

二次抗結核薬として利用されているバイオマイシン〔VM〕が大腸菌の無細胞実験系で蛋白合成を阻害することはすでに明らかにされているが、その詳細な研究は進んでいない。また、VMとストレプトマイシン〔SM〕との間の交叉耐性については作用機作論的にはほとんど明らかにされていない。そこでVMに感受性の高いミコバクテリアから耐性菌株を分離し、この菌の耐性の機構を解明し、ひいてはVMの作用機作ならびにミコバクテリアのリボソームの研究を発展させることを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

- 1) Mycobacterium smegmatis ATCC 14468株を37℃で振盪培養し、培地に加えるVMの濃度を逐次増量しながら継代培養を行って、VM低度耐性〔LR〕株（20—50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性）およびVM高度耐性〔HR〕株（1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上耐性）を分離した。親株は1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のVMで増殖を阻止される。
- 2) 親株およびこれらVM耐性株を37℃で振盪培養し、集めた菌塊を超音波によって破碎し、常法に従って可溶性画分とリボソームを遠心分離した。さらにこの70Sリボソームを低 Mg^{++} 濃度の条件下で、50Sと30Sのsubunitに分画した。Poly UをmRNAとし、 ^{14}C -phenylalanineを添加した無細胞実験系におけるpolyphenylalanine（p-pheと略す）の合成およびそれに及ぼすVMの影響はNirenberg法によって検索した。ただし、 Mg^{++} の濃度は70Sリボソームの場合は8mM、50Sと30Sの再構成リボソームの場合は15mMを必要とした。
- 3) 親株由来のリボソームにおけるp-phe合成は1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のVMにより著明な阻害をうけたが、VM—HR株由来のリボソームではほとんど阻害は認められなかった。また培養実験における耐性の程度に平行してVM—LR株の方がHR株よりやや強く阻害をうけた。

4) V M耐性が可溶性画分とリボソームとのどちらによっているのかを検討するために、親株と H R株との間でそれらを互いに交換し、p -phe 合成に及ぼす V Mの影響を観察した。耐性株由来のリボソームと親株由来の可溶性画分を含む系では V Mによる p -phe 合成阻害はみられず、逆の組合せでは強い合成阻害が認められたので、V M耐性はリボソームの変化にもとづいていることが明らかになった。

また可溶性画分を *Escherichia coli* A19 [RNase I⁻] 株から分画し、*M. smegmatis* の系に用いたところ、強い p -phe 合成能があり、これに対する V Mの阻害も顕著であった。*E. coli* 由来の可溶性画分は活性の強いものが容易に得られるので、以後の解析にはこれを用いた。

5) 耐性機構をリボソームの subunit のレベルで検索するために、50 S と 30 S の subunit で 70 S リボソームを再構成したものを対照とし、親株および耐性株の subunit を互いに交換した無細胞実験系において p -phe 合成に及ぼす V Mの影響を検討した。V M - H R株においては耐性株由来の 50 S を含む系では、V Mによる p -phe 合成阻害はみられず、一方、V M - L R株では耐性株由来の 50 S を含んでも合成は阻害されたが、30 S を含む系では合成阻害は軽減された。

また V M - H R株と L R株との間で subunit を交換した無細胞実験系において V Mの影響を検討した結果、耐性機構の局在しない subunit 同士の hybrid - H R株の 30 S と L R株の 50 S -では親株と同程度に p -phe 合成阻害をうけ、逆に耐性機構の局在する subunit 同士の hybrid - H R株の 50 S と L R株の 30 S-では高濃度の V Mによっても全く阻害をうけないことが明らかになった。

6) 培養実験で V M耐性株の S M感受性を検したところ、程度の差はあるが、いずれも S Mにも耐性を示しており、一方、S M含有培地で分離した S M耐性株は V Mには親株と同程度に感受性であり、V Mと S Mとの間には一方的な耐性の交叉がみられた。

7) V M耐性株の S M耐性の機構をリボソームのレベルで検索した。V M耐性の場合と同様な p -phe 合成の系と、initiation factor 依存性のある poly UG を mRNA とする valine のとりこみの系とにおいて、S Mの影響を検討した。その結果、V M耐性株の場合は S Mによる polypeptide 合成阻害は認められず、S M耐性もリボソームの変化にもとづいていることが明らかになった。

一方、S M含有培地で分離した S M耐性株では p -phe 合成は S Mによって阻害をうけないが、V Mによる合成阻害は著明であった。このようにリボソームレベルでも V Mと S Mとの間の一方的な耐性の交叉が存在することが明らかにされた。

[総括]

1) *Mycobacterium smegmatis* の V M耐性はリボソームの変化に起因し、V M - H R株では 50 S subunit に、L R株では 30 S subunit に耐性の機構が局在した。耐性度と耐性機構の局在の間に相関関係があるか否かは断定できないが、V Mが 50 S と 30 S 両方に作用しているものと考えられる。

2) ミコバクテリアの V M耐性株と S M耐性株との間に、培養実験で認められる耐性の一方的な交叉はこれら菌株から分離されたりボソームのレベルでもその存在が確認された。

論文の審査結果の要旨

結核に対する抗生物質viomycin (VM) の作用機作に関しては、大腸菌を用いた研究で蛋白合成を阻害することが知られていたが、その機作の詳細は明らかにされていなかった。

そこで著者はVMに感受性の高いミコバクテリアを用い、そのVM耐性株を分離し、感性親株および耐性株よりそれぞれリボソームを分画し、無細胞実験系でVMの作用機作ならびに耐性の機構を検討した。

その結果、VMはリボソームの機能を阻害することによって蛋白合成を抑制し、その作用は実験に供した菌株によってリボソームの50Sあるいは30Sサブユニットに及んでおり、VM耐性もまた50Sあるいは30Sサブユニットの変化にもとづいていることを証明し、さらに培養実験で認められていたVMと streptomycin (SM) との間の一方的な耐性の交叉がりボソーム・レベルでもみられることを始めて実証した。

抗結核剤とミコバクテリアの無細胞系を用いて行われたこれらの研究は、ミコバクテリアではVMがりボソームの50Sあるいは30Sのいずれかに作用してその機能を阻害し、VM耐性もまた50Sあるいは30Sのいずれかに局在しているという新しい事実を提供し、またミコバクテリアの抗結核剤に対する交叉耐性の機序をリボソーム・レベルで解析し、VMとSMとの間に培養実験で認められると同様な一方的な交叉耐性を実証しえたことは今後のこの方面の研究の進歩に大きく寄与するものである。