

## &lt;資料&gt;

## カナマイシン耐性機構の解明とケミカルバイオロジー

梅澤一夫

愛知医科大学

(2017年12月5日受付)

化学を多用して新しい生物学の発見をするケミカルバイオロジーの手法は現在、広く用いられている。一方、カナマイシン(Kanamycin;KM)耐性機構は約50年前に解明された。それからまもなく、ジベカシン(Dibekacin;DKB)が耐性機構に基づいてデザイン・化学合成され、有用な抗生物質になった。この展開は、有用な化合物の開発をひとつの目標にする現代のケミカルバイオロジーの考え方に合致する。これらのことについて、カナマイシン発見60年を機に所感を述べたい。

## 1. ケミカルバイオロジーの発展

1987年に筆者は微生物化学研究所に入り、その後まもなく米国に出張する機会があり、当時、米国ピッツバーグ大学におられたスターツル(T.E. Starzl)先生と藤堂省先生にお会いした。どちらも臓器移植の開拓者である。目的のひとつは梅澤濱夫(筆者の父)の発見したデオキシスパーガリン<sup>1)</sup>(Deoxyspergualin)の免疫抑制剤としての臨床応用について打ち合わせをすることであった。当時、ピッツバーグ大学では平行して、藤沢薬品工業(現アステラス製薬)が発見したFK506の臨床応用も手がけていた。そして、その後、FK506の方が早く開発され、タクロリムス<sup>2)</sup>(Tacrolimus)と呼ばれるようになって臓器移植に使われる代表的な免疫抑制剤になった。

一方、化学を出発点として生命現象や疾病を理解し、生物学や医学の新しい発見を導く分野をケミカルバイオロジーと呼ぶようになった<sup>3)</sup>。ケミカルバイオロジーはハーバード大学のスチュアート・シュライバー(Stuart Schreiber)らが提唱した、分子生物学的な手法に加えて有機化学的な手法も駆使し、核酸や蛋白質など、生体内分子の機能や反応を分子レベルから扱おうとする学問領域のことを指す。シュライバーらは、FK506の化学合成を達成し、合成した化合物を、生体標的分子を釣り上げるプローブとして利用できると考え、リンカーによってFK506が結合したアフィニティカラムクロマトグラフィを作成、これを用いてFK506結合タンパク質の単離に成功した。FK506結合タンパク質はプロリルイソメラーゼ活性を持ち、プロリン残基を含むタンパク質のためのタンパク質フォールディングシャペロンとして機能している。さらに、その下流でカルシニューリンにシグナルを伝え、T細胞を活性化する<sup>4)</sup>。このT細胞活性化機構は生物界に新しくもたらされた発見であり、一連のケミカルバイオロジー研究により、新しい免疫活性化の機構が見出された。

最近では、ケミカルバイオロジーは多くの研究分野を含むようになり、天然からの生理活性物質の探索、低分子化合物の生体内標的タンパク質の同定、核酸やペプチドの改変、ケミカルライブラリーの作成などが盛んに行われている。なかでも有用な低分子化合物の分子デザインは重要な位置を占めている。

## 2. 抗生物質発見の意義

1920年代後半、英国の Fleming(A. Fleming)はブドウ球菌の培養をしているときに青カビがシャーレに飛び込んだことがきっかけで、この青カビに抗菌物質が含まれているにちがいないと考え、カビの胞子を培養して培養生産物を含むかわら色の液体を得た。この液体は肉のスープ10 mlに0.01 ml入れただけで、ブドウ球菌のスープ内生育を抑えた。

一方、この液体はマウスの微静脈に投与して毒性は全くみられなかった。さらにウサギの目にたらしても青カビ培養液は炎症を起こさなかった。このようにフレミングはおそらく青カビ培養液に含まれる抗菌物質をペニシリン (Penicillin; PC) と命名し、動物における安全性を見出し、1929年に報告<sup>6)</sup>した。その後、菌株は保存所で維持された。そして1940年ごろ、オックスフォード大学のフローリー (H. Florey)、アブラハム (E. Abraham; 後にセファロスポリン Cephalosporin を発見)、チェーン (E. Chain) の3人はフレミングの研究を引き継ぎ、活性物質の抽出と精製、さらに構造決定を開始した。生産性の低さなど困難の末に、粗精製ペニシリンが得られた。この化合物は1 mgを10リットルの肉のスープに入れることでブドウ球菌の生育を阻止した。そして動物には少しも毒性を示さなかった。PCは敗血症患者に用いられ、みごとに治療活性を示した<sup>7,8)</sup>。その後、第二次世界大戦で使われ、連合国側においては兵士の足を切断することがとても少なかったという話をオックスフォード大学の授業で聞いた。筆者は1975年ごろ、オックスフォード大学医学課程留学中に微生物学の実習で、ノーマン・ヒートリー (N. Heatley) 博士に直接、菌の取り扱いを教わった。ヒートリー博士は卓越した実験技術の研究者であり、オックスフォードにおけるPC発見における第4の科学者である。敗血症モデルマウスが夜中に一匹一匹と死んでいくのに、PC投与群は全部が元気だったのを実際に観察された。彼の名前はオックスフォード市内の通り名、Heatley Wayに残されている。

その後、世界中で抗生物質 (微生物のつくる低分子抗菌物質) の探索が始まり、PCの効かない細菌性疾患に有効なストレプトマイシン<sup>9)</sup> (Streptomycin: SM)、クロラムフェニコール<sup>10)</sup> (Chloramphenicol: CP)、クロルテトラサイクリン<sup>11)</sup> (Chlortetracycline: CTC) などが発見された。梅澤濱夫はSM耐性の結核菌に有効なカナマイシン<sup>12)</sup> (Kanamycin: KM) を発見した。

このように、一般的に毒性の低い抗生物質の発見は新しい抗菌療法として人々の平均寿命を何十年のスケールで延長した。抗生物質にあたるような抗がん物質が使われるようになったとして、平均寿命は2、3年しか伸びないと聞いたことがある。

### 3. カナマイシン耐性の機構と克服

筆者は総合大学の医学部や医科大学で時々、抗生物質の講義をすることがある。20世紀、以上のような輝かしい登場をして大きな功績があるのに、抗生物質は今では半ば悪者にされている観がある。多用することによって耐性菌が増えるから、なるべく使わない方がよいということになっている。もちろん、菌が耐性になるのであるが、ヒトそのものが耐性になるとしてしまう場合もある。筆者は抗生物質の顕著な活性と低い毒性をもっと強調すべきであると話をしている。

1940年代にワクスマン (S.A. Waksman) によりSMが発見<sup>9)</sup>され、PCの効かない結核に効果があって広く使われるようになった。1950年代には耐性菌が現れ、耐性菌に有効な抗生物質が待たれるようになった。そして1957年に日本でKMが発見<sup>12)</sup>された。KMにも耐性菌が現れ、その耐性機構も明らかになされた<sup>13,14)</sup>。KMにはいくつもの水酸基とアミノ基があり、耐性菌の酵素により、アミノ基にはアセチル化、水酸基にはリン酸化、アデニル化されることで、抗菌活性が低下する (図1)。官能基に、ある程度大きな構造が結合すると、官能基の活性が失われたり、全体の立体構造に変化が出たりする。それによって活性が低下する。梅澤濱夫の研究グループはこれらの官能基を水素に置換した。この分子デザインはとてもユニークな考えだった。問題の官能基を、より大きくしたら全体の立体構造がかわってしまう確率が高い。逆に取り払ってしまえば、その確率は低い。このようにして耐性菌に有効なDKB<sup>15)</sup> (3',4'-Dideoxykanamycin B; 図2) が理論的にデザインされ、合成された。

有用物質の分子デザインは現在のケミカルバイオロジーの中心的課題である。理論的にデザインして、そのとおり活性が出ることはそれほど多くはない。それでもまず、理論的な改変にチャレンジする。KMの耐性克服するための分子デザインは、50年前(1967年)にKM耐性菌の不活性化機構が解明されて間もなく構想・実行されたことであるが、現在

でも通用し、お手本になる成果だと思ふ。

以上、KM 発見 60 年を機に所感の一端を述べた。

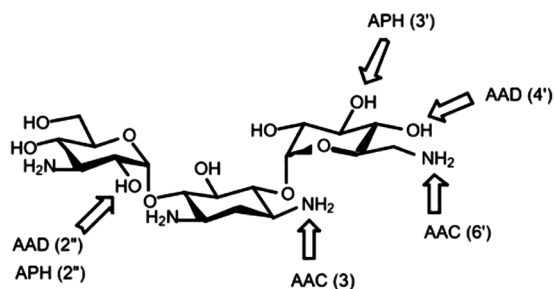


図 1. KM の官能基と耐性菌酵素による修飾

AAC: アセチル化, AAD: アデニル化, APH: リン酸化

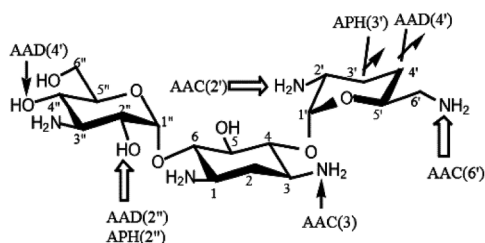


図 2. DKB の官能基と耐性菌酵素による修飾

APH(3')と AAD(4')の修飾を受けない

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

#### 参考文献

- 1) Iwasawa H, Kondo S, Ikeda D, Takeuchi T, Umezawa H: Synthesis of (-)-15-deoxyspergualin and (-)-spergualin-15-phosphate. *J Antibiot.* 1982; 35: 1665-9.
- 2) 山下道雄: タクロリムス(FK506)開発物語。生物工学会誌 2013; 91: 141-54.
- 3) 上村大輔: ケミカルバイオロジーの研究動向。学術の動向 2009.3, 11-14.
- 4) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66: 807-15.
- 5) 梅沢浜夫著(梅沢一夫編): 「よい菌わるい菌」、癌と化学療法社, 1993.
- 6) Fleming A: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. INFLUENZAE*. *Brit J Exp Pathol.* 1929; 10: 226-36.
- 7) Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG: Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 1940; 236: 226-8.
- 8) Raper KB: The penicillin saga remembered. *ASM News* 1978; 645-53.
- 9) Schatz, A, Waksman SA: Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1944; 57: 244-8.
- 10) Ehrlich J, Bartz QR, Smith RM, Joslyn DA, Burkholder PR: Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* 1947; 106: 417.
- 11) Duggar BM: Aureomycin: A product of the continuing search for new antibiotics. *Ann NY Acad Sci.* 1948; 1241: 163-9.
- 12) Umezawa H, Ueda M, Maeda K, *et al.*: Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *J Antibiot.* 1957; Ser. A 10: 181-8.
- 13) Umezawa H, Okanishi M, Utahara R, Maeda K, Kondo S: Isolation and structure of kanamycin

- inactivated by a cell free system of kanamycin-resistant *E. coli*. *J Antibiot.* 1967; Ser. A 20: 136-41.
- 14) Umezawa H, Okanishi M, Kondo S, *et al.*: Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science* 1967; 157: 1559-61
- 15) Umezawa H, Umezawa S, Tsuchiya T, *et al.*: 3',4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot.* 1971; 24: 485-7.