

[総 説]

病原菌の薬剤耐性化と生命の進化

橋本 一¹⁾・村山琮明²⁾

¹⁾ 群馬大学医学部微生物学教室 (元)

²⁾ 日本大学薬学部分子細胞生物学研究室

(平成 25 年 1 月 31 日受付)

病原菌の薬剤耐性化は薬剤の血中濃度が感受性菌の MIC と耐性菌の MIC との間の領域 (MSW) 内にある時間が長いとき、耐性菌の選択増殖がおこる必然的な結果である。病原微生物の薬剤耐性機構としては、薬剤の不活化、作用点の変異、流入阻害、排出がある。耐性化機構としては、内在遺伝子の変異か外来性遺伝子の獲得がある。後者の機構には形質転換、形質導入、接合伝達がある。外来性遺伝子の起源を辿ると二億年以前の薬剤生産菌の自己防衛機構におよぶ。殆どの薬剤は他の低分子とともに、低濃度で種々の遺伝子発現調節能がある。薬剤を含む低分子の起源は情報伝達因子でもあり、生命の起源では RNA とともにタンパク質合成に関する重要因子とも推定されている。微生物進化はゲノムの進化であり、遺伝子の重複、変異、水平遺伝などによる。病原菌の進化も種々の環境変化に適応する姿であり、薬剤耐性化は生命進化解析の格好の題材と言えよう。

Key words: MSW, 薬剤耐性化機構, 水平遺伝, 耐性遺伝子の起源, parvome

感染症は病原微生物とその宿主であるヒトと抗菌薬剤との三者間における、所謂 Host-parasite-drug relationship によって進行する。本総説に於いては、上の諸関係のうち、薬剤に対する病原菌の耐性化機構とその由来を論じ、それが微生物進化の最終段階とも考えられることから、生命進化のひとつの段階として解説する。

耐性菌の出現

今日臨床では作用機序のちがう種々の抗菌薬が使われているが、これら薬剤投与中に難易の差はあるが決まって耐性菌が現れ、はてはどの薬剤も効かない多剤耐性菌の出現までに至っている。曾てカナマイシン (KM) を常用している結核患者を調べた経験では、全投与量 50 g 以上の患者からのみ KM 耐性菌が分離

され、それ以下の患者 300 人ほどの誰からも耐性菌の分離は無かった。新キノロンは 1984 年にはじめて市場にでたので、耐性菌発現の格好のモデルになるだろうと、群馬大学病院において緑膿菌の耐性化を見守ったところ、もう初年度から耐性菌が現れ、病院での使用量が増すにつれて耐性菌分離率も増加して 20% 以上になり、3 年後には高度耐性菌も現れる結果をえた。

そもそも抗菌剤の適正使用とは感受性菌を抑え耐性菌を出さないことにある。それには PK・PD、つまり薬剤濃度の体内推移や菌への作用動態を見ながら投薬量や投与間隔が決められ、薬剤によって投与方法が違ってくる。しかし、薬剤濃度が感受性菌の MIC を越えていても、耐性菌の MIC 以下である場合は、耐性菌を選択することとなり、やがて化学療法が無効になる。この耐性菌の MIC と感受性菌の MIC との間のことを MSW (Mutant Selection Window) と言い、薬剤の血中濃度が MSW 中にある期間が長いと必然的に耐性菌の出現が起るのである (図 1)。

著者連絡先：(〒371-0856) 群馬県前橋市総社町高井 528-6 (自宅)

橋本 一

TEL: 027-251-7326

FAX: 027-251-7326

E-mail: um3wv7@bma.biglobe.ne.jp

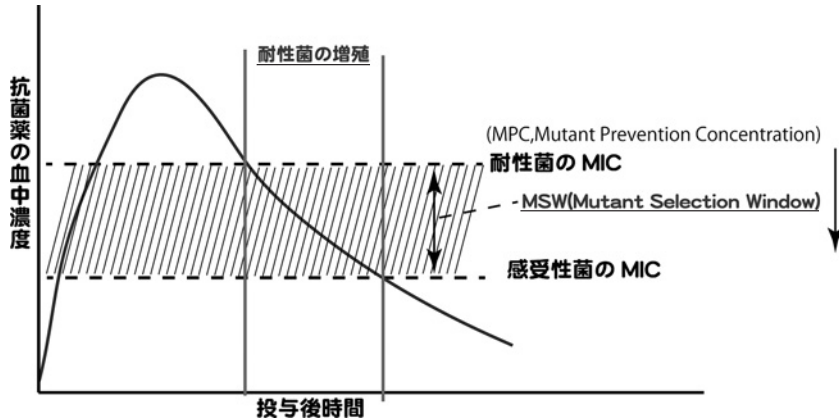


図1. 耐性菌の増殖を許す血中濃度。抗菌薬の血中濃度がMSW内にある時間に耐性菌の増殖がおこる。

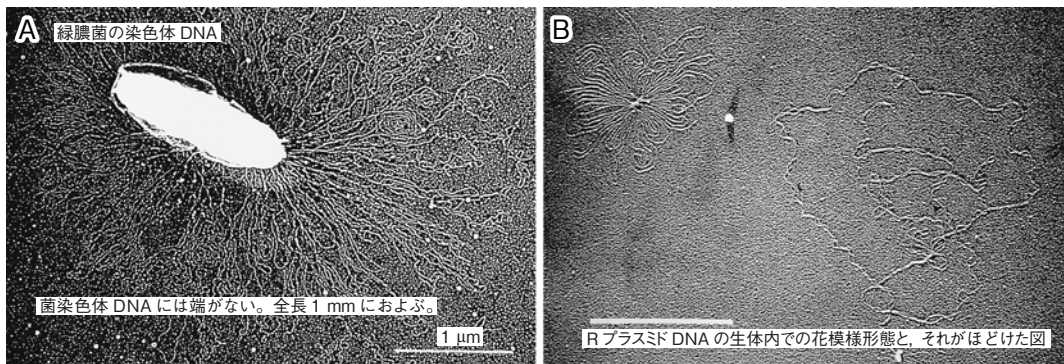


図2. 遺伝子DNAの電子顕微鏡写真。A) 緑膿菌PAO1を蒸留水でパンクさせたもの。一本の環状chromosome DNAが折り畳まれて細胞壁に付着している。DNA末端が見えないことに注意。B) plasmid DNA。大腸菌K-12株保有のR plasmidを分離したもの。酵素処理をしているので、花模様を示す環状DNAがくずれたものもみえる。

病原菌の耐性機構

菌の耐性機構は大別して3種あり、それぞれに2種類の機構がある：1) 薬剤は分解されたり低分子の付加なりでその構造が変化すると、当然その作用を失う。βラクタム剤はそのβラクタム環の開裂で、アミノグリコシドはその水酸基やアミノ基がリン酸化、アセチル化、またアデニル化で修飾されると活性を失う。2) 薬剤の作用点とはDNA合成など生存に必須な代謝にあずかる酵素、または必須構造物、例えば細胞壁をつくる酵素なのである。それらの作用点が質的に、又は量的に変化すると薬剤の作用が及ばなくなる。ブドウ球菌でDNA合成酵素ジャイレースやトポイソメラーゼの変異でキノロン耐性となり、プロテウスでは高頻度に耐性遺伝子の重複が起り薬剤耐性度が増す。3) 薬剤がその作用点に至る経路に障害がある場合、つまり流入障害や排出昂進があると、その作用

がおよぶには至らない。緑膿菌のカルバペネム耐性にはポーリンの狭窄による薬剤の流入障害が知られており、同菌のキノロン耐性では上記ジャイレースの変異の他に薬剤の排出による場合が多い。

病原菌の薬剤耐性化機構

菌が耐性化する機構としては1) 突然変異、2) 水平遺伝、3) 誘導の三つの機構がある。細菌細胞の遺伝体としては菌の生存に不可欠な遺伝子DNAよりなる染色体(chromosome)と、それより独立して細胞質内にあり、生存に不可欠ではないが病原性や薬剤耐性など種々な環境に適應する遺伝子よりなる遺伝体(plasmid)がある(図2)。突然変異による耐性化とは主にchromosomeの塩基配列が変異することで、1a) 構造遺伝子の変異と1b) 調節遺伝子の変異とある。1a) 構造遺伝子の変異の例として古典的な研究結

表1. 大腸菌 C600 のセファレキシシン耐性化

変異の回数	CEX MIC (μg/ml)	コロニーの大きさ	DNAの変化 (<i>pbpB</i>)	アミノ酸の変化 (<i>PBP3</i>)	変異誘発剤
(親株)	6	普通			
第1回	50	小	AAC → AGC	Asn → Ser (361)	EMS
第2回	60	普通	GTT → ATT	Val → Ile (530)	EMS
第3回	500	小	TAC → CTC	Tyr → Leu (541)	UV
第4回	500	普通	GAA → AAA	Glu → Lys (349)	EMS
伝達後	500	普通			

Hedge and Spratt, 1985¹¹⁾

耐性度上昇の途中で、増殖速度が遅いためコロニー形成が小さい段階がある。

表2. 黄色ブドウ球菌のキノロン耐性遺伝子

臨床株	MIC (μg/ml) CPF	コドンの変化	
		<i>gyrA</i> 変異	<i>griA</i> (<i>parC</i>) 変異
RN4220	1	No	No
SA42	0.5	No	No
SA1	2	No	80 Ser → Phe
SA3	4	No	80 Ser → Phe
SA2	16	No	80 Ser → Tyr
SA47	16	84 Ser → Leu	80 Ser → Tyr
SA4	32	88 Glu → Lys	80 Ser → Phe
SA5	32	84 Ser → Leu	80 Ser → Phe
SA6	32	84 Ser → Leu	80 Ser → Phe
SA35	64	85 Ser → Pro	80 Ser → Tyr
SA42R	128	84 Ser → Leu	80 Ser → Tyr

Ferrero, 1994¹²⁾

果を表1にあげる。細胞壁合成酵素の支配遺伝子が一塩基ずつ変わる事で酵素蛋白のアミノ酸がひとつずつ変わり、βラクタムへの耐性値が上昇して行き、ついには高度耐性菌となる例である。二種類の遺伝子が関与する場合には、ブドウ球菌のキノロン耐性の場合のように、MICの低い発現の遺伝子の変異で低度耐性が、二つの遺伝子の変異で高度耐性となる(表2)。1b) 調節遺伝子の変異の例としては、緑膿菌のキノロン耐性化がある。この菌をキノロンの4倍MIC濃度で選択すると、低頻度ながら高度耐性菌が分離される。それにはDNA合成にかかわるジャイレース構造遺伝子変異体も分離されるが、ほかに種々の調節系遺伝子の変異体を容易に分離することができる。この菌にはRNDと称する3種の構造蛋白よりなる12種の排出系があるが、それぞれは調節遺伝子が3個の構造遺伝子に隣接しており、それにより野生株では排出機能が抑えられている。この調節遺伝子の突然変異によって抑制が解かれると3種の構造蛋白が生成され薬剤排出がおこる。排出はキノロン剤だけでなく、種々の組み合

わせの他種薬剤にも及ぶので一挙に多剤耐性になりうる(表3, 図3)。

2) 水平遺伝とは他菌から耐性遺伝子の流入によって耐性化することで、それには2a) 形質転換, 2b) ファージによる導入, 2c) 接合伝達の三種がある。形質転換とは裸の遺伝子DNAの侵入で新しい形質発現が起る機構で、その例としては肺炎球菌のペニシリン(PC)耐性がある。肺炎球菌は病原性遺伝子の授受で形質転換が初めて発見された菌として知られている。ペニシリン耐性遺伝子を調べてみると口腔常在の自然耐性菌ミテイス菌と耐性遺伝子の部分が同一の例があり、この場合、口腔内での常在菌からの形質転換が起って病原菌が耐性化した例とされている。

2b) 導入による耐性化とは、耐性菌に感染したファージが誤って殻内に耐性遺伝子DNAをとりこみ、つぎに感受性菌に感染してその耐性遺伝子DNAを送り込み、それが宿主染色体(ゲノム)に組み込まれて耐性発現をさせる機構である。ブドウ球菌は種々のファージがすでにそのゲノム内に入り込んでおり

表3. キノロン耐性緑膿菌変異株の薬剤感受性

菌株	MIC										分離頻度	変異型
	NA	NFLX	PIPC	CBPC	CFS	IPM	GM	KM	TC	CP		
1 野生株	50	0.8	3.1	25	3.1	3.1	6.3	200	12.5	100	9.5×10^{-9}	<i>nfxA</i>
変異株	400	6.3	3.1	25	1.6	6.3	6.3	200	12.5	200		
2 野生株	50	0.8	3.1	50	1.6	1.6	3.1	100	12.5	100	4.3×10^{-8}	<i>nalB</i>
変異株	1600	25	12.5	100	12.5	3.1	3.1	100	25	400		
3 野生株	50	0.8	3.1	50	1.6	1.6	1.6	100	25	100	6.7×10^{-9}	<i>nfxB</i>
変異株	200	12.5	3.1	12.5	0.8	0.4	1.6	25	25	200		
4 野生株	50	0.8	6.3	25	3.1	1.6	12.5	400	12.5	100	3.3×10^{-8}	<i>nfxC</i>
変異株	800	12.5	3.1	25	1.6	6.3	3.1	25	12.5	800		

使用菌は種々のノルフロキサシン (NFLX) 感受性の臨床分離株、いずれからでも低頻度ながら種々の耐性型のものがえられ、4グループに分けられた。これらは後にジャイレース変異株 (No1) と3種の薬剤排出変異株であることが解った。それぞれの代表株を表に示した。薬剤排出により多剤耐性になるが、*nfxC*型ではKMに感受性化するのが特徴的であり、KMが直接排出に関係しているのではなく、複雑な機構によるが、まだ明解でない。

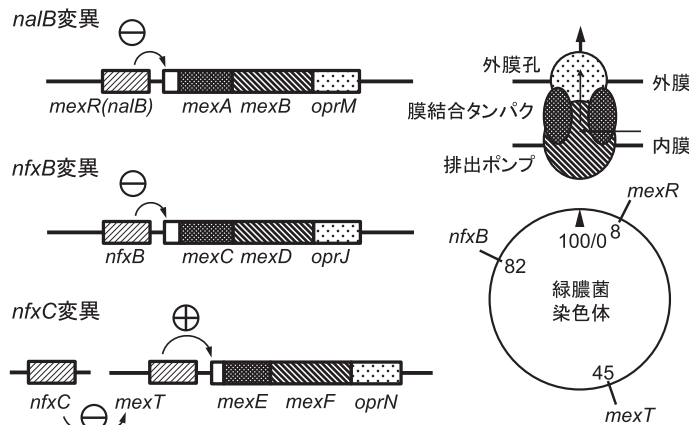


図3. 緑膿菌の多剤排出による耐性。排出は3種のタンパク質よりなり、それらをコードする遺伝子は隣接して1オペロンを示し、さらにその上流に1, 2の調節遺伝子がある。*nfxC*型の調節は2段階であり *nfxC* はnegative, *mexT* はpositiveに働く。

(溶原化)、紫外線などで容易に誘発しうる。どんな遺伝子も運びうる導入フェージも知られている。MRSAの出現もその耐性遺伝子が自然耐性のコアグラーゼ陰性菌から導入されたものと考えられている。

2c) 接合伝達による耐性遺伝子の伝播は耐性菌がオス菌にあたり、感受性菌がメス菌で、オスメスの接合で耐性遺伝子が伝達する。接合はグラム陰性菌に広く見られる現象であり、陽性菌では腸球菌で高頻度伝達系も知られている。接合伝達は多くの遺伝子が関与する複雑な機構であり、グラム陰性菌ではオス菌が性線毛でメス菌を捉え、遺伝子の注入複製がおこる (図4A)。その全過程には30近い数の遺伝子群の関与する例も知られている (図5)。腸球菌の場合はメス菌が8

個ばかりのアミノ酸よりなるペプチドである誘因物質、フェロモンを排出し、それをうけてオス菌が菌表面全体に凝集物質をだして接合にいたる (図4B)。いずれの接合伝達でも、耐性遺伝子はオスの性質を与えるRプラスミドと言う、薬剤耐性遺伝子(群)を含む細胞質性遺伝体にくみ込まれて細胞質から細胞質に移行し、受容菌を一挙に多剤耐性化したりする。プラスミド上の耐性遺伝子は単剤または多剤耐性遺伝子群が両端に同一反復構造をもつトランスポゾン (Tn) として、プラスミド間またはプラスミドと宿主ゲノム間を高頻度に移行したりする (図6)。この場合移行にかかわる酵素はTnの末端にある組み込み遺伝子の形質発現によるが、このような組み込み機構が移行をう

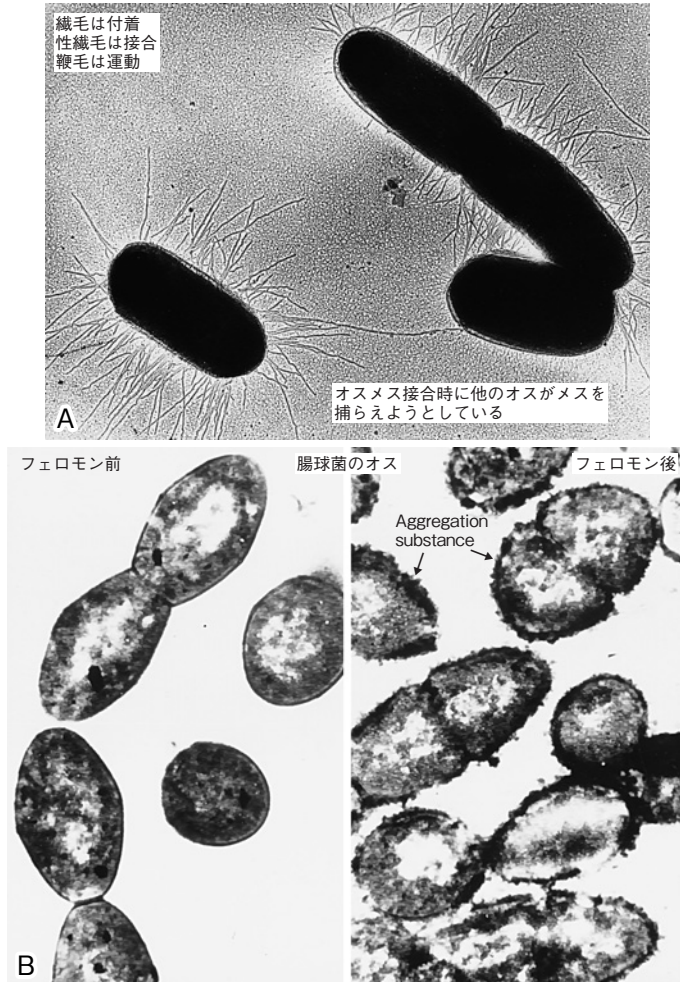


図4. Rプラスミドの接合。A) グラム陰性菌の接合。オスメス接合時に他のオスがメスを性纖毛で捉えようとしている。菌表面全体に生えているのは普通の纖毛である。B) グラム陽性腸球菌がメス菌の出すフェロモンで全表面に凝集物質を表出する。

けるゲノム上にある場合は、インテグロン(In)と言って挿入箇所特有のDNA塩基配列とその近くに組み込み用酵素(インテグラーゼ)遺伝子がある。

他の菌から新しい遺伝子を受け取る場合、必ずしも菌にとって有用のものばかりとは限らない。菌には自分に害を及ぼす遺伝子を受け付けられない機構も備わっている。一つは制限修飾系で、自分の特定の数個の特殊なDNA塩基配列をメチル化しておき、メチル化していない外来性DNAを分断してしまう機構である。もう一つはヒトの免疫系に似た機構でCRISPRといわれ、一度侵入されたDNAの部分をも自分のゲノム内にとりこみ、同じDNA部分を持つ再度の侵入体を分断する。CRISPR配列から読み取られたRNA(crRNA)

がCRISPR上流のCASタンパクと複合体を作り、外来のDNAの相補的な配列を認識して切断除去する¹⁾。

3) 誘導による耐性化というのは、既に耐性遺伝子をもちながら、その形質発現が調節遺伝子からの転写、または翻訳の段階で抑制されており、基質としての薬剤があると調節遺伝子の転写翻訳が始まる、という機構である。ブドウ球菌のペニシリン、またはメチシリン耐性遺伝子の形質発現では、薬剤が菌表面の受容体に結合すると、それが活性化して耐性遺伝子系のリプレッサーを壊し、転写がおこる。一方マクロライド耐性の場合には普段は耐性遺伝子の転写物であるmRNAが翻訳されず、薬剤があるとそのmRNAに結

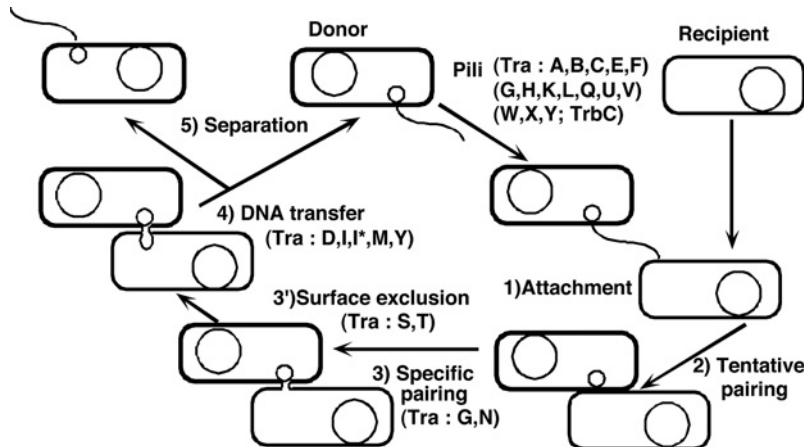


図5. プラスミド DNA の接合伝達。接合には、各段階で異なる Tra, Trb の 30 程の遺伝子が関与している。

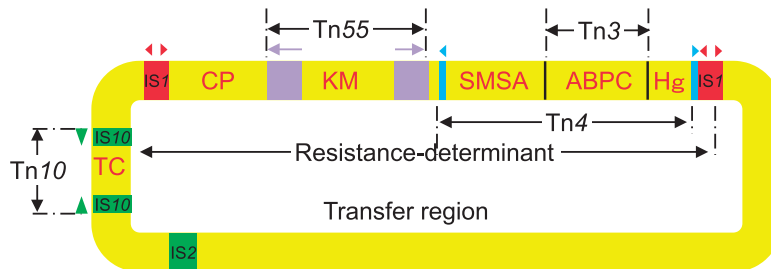


図6. 種々のトランスポゾン (Tn) を含む多剤耐性 R プラスミド。各 Tn の両端には同一塩基配列の反復が見られる。IS2 は耐性と関係なくどこにも転移可能な挿入因子 (Insertion sequence) である。

合して構造を替え、翻訳を可能にする。14 員環マクロライドには耐性であるが 16 員環マクロライドには感受性の菌があるのは、16 員環には誘導能が無いからである。エンテロバクターの β ラクタマーゼ産生誘導機構はさらに複雑で、ラクタム剤で分断された細胞壁断片が細胞質内に取り込まれてアクチベーターとなり、耐性遺伝子を発現させる²⁾。

耐性遺伝子の起源

病原菌の耐性遺伝子は水平遺伝によって病原菌間に広まるが、その遺伝子のそもその由来は非病原性の自然耐性菌である。またその耐性菌は必ずしもヒトが薬剤を使用した為に出現したわけでもない。現代でもまだ抗菌剤を使った事の無い、未開の人種の調査で抗菌剤耐性菌が分離されているし、さらに画期的発見はカナダにおける 3 万年前の永久凍土から β ラクタム、アミノグリコシド、テトラサイクリン、バンコマイシン等の耐性遺伝子 DNA が分離されたことであ

る³⁾。さらに耐性遺伝子の起源をたどると 8~2 億年前と推定される薬剤生産菌の自己防衛機構として既に耐性機構は進化していたと考えられている。現在、殆どの薬剤の生産菌は土壌菌である放線菌であり、その放線菌をしらべると、自己の出す薬剤に対してだけでなく、他菌の出す薬剤に対しても耐性である場合もあり、土壌内フローラの複雑性の中で薬剤耐性への進化が行われたのである (表 4)。

生物の耐性機構が代謝経路の必須酵素から進化したのであることはタンパク質の三次元構造の比較からも推定される。例えばリン酸化酵素 (kinase) は種々な二次代謝で必要な酵素であり、基質の異なる種々の kinase が知られている。Yeast casein kinase とアミノグリコシド kinase APH (3')-IIIa との 3 次元構造を比較してみると全体の構造はとても似ており、それら生存に必須の kinase から薬剤を基質にするような進化が起きたかもしれず、または共通の起源タンパク質から別々に進化してきたのかもしれない、と考えられて

表4. アミノグリコシド (AG) 生産放線菌の AG 耐性

生産菌	生産抗生物質	アミノグリコシド耐性*										
		SM	KM	DKB	GM	RSM	BTN	FRM	PRM	LVDM	NE	ISM
<i>Streptomyces tenebrarius</i> ISP 5477	TOB	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>S. spectabilis</i> ISP 5512	SPCM	●	○	●	◐	●	●	●	●	●	●	●
<i>S. kasugaensis</i> MB 273	KSM	◐	◐	●	◐	●	●	●	●	●	●	●
<i>S. tenjimariensis</i> SS-939	ISM		●	●		●	●				●	●
<i>S. kanamyceticus</i> ISP 5500	KM	●	●	●		●					●	
<i>S. fradiae</i> ISP 5063	FRM		○			●	○	●	●		●	
<i>Micromonospora</i> sp. SS-1853	GM		●	●	●							●
<i>S. catenulae</i> ISP 5258	PRM					●			●		●	
<i>S. griseus</i> ISP 5236	SM	●										

50 µg/ml の AGs に対する耐性 (ISP No.4 培地での生育: 27°C, 7日間培養), ●耐性, ◐弱耐性, ○微弱耐性, 空白: 感受性, BTN: プチロシン A, ISM: イスタマイシン A, KM: カナマイシン, NE: ネアミン, LVDM: リビドマイシン¹³⁾

いる。同じような三次元構造の比較では、細胞壁合成酵素 D-Ala-D-Ala ligase とバンコマイシン耐性酵素 D-Ala-D-lactate ligase との比較、また *Streptomyces* DDpeptidase と TEM 型 β ラクタマーゼとの比較でも類似性がみられている⁴⁾。

酵素の基質が遺伝子の変異によって大きく変わった実例としては、アミノグリコシドの修飾酵素がその遺伝子の変異でキノロン修飾酵素に変わった実験例がある⁵⁾。

薬剤, その他小分子の耐性と関連

臨床で用いられる薬剤濃度は結構高濃度であるが、薬剤生産菌が土壌内で排出する薬剤濃度はそれほど高くない筈である。薬剤生産の本来の役目は抗菌以外にもあったろうと推定される。Julian Davies はブドウ球菌で発光遺伝子 (ノーベル賞受賞者下村博士発見の発光蛋白生成遺伝子) を種々の必須遺伝子内に組み込み、種々の遺伝子発現への薬剤の作用を発光の程度でしらべると、種々の薬剤で抗菌濃度より遥に低い濃度で種々の遺伝子の形質発現を調節していることがわかった (図7, 8)。

種々の菌でストレプトマイシン (SM) が無いと生育しない SM 依存菌が知られており、このことから J. Davies は生命の歴史の初めには SM その他の小分子が RNA とともにタンパク合成にあずかっていたのではないか、という仮説をたてている。その後、タンパ

ク質のほうが RNA と協力してより効率よくタンパク質合成ができるように進化したのだが、まだ RNA と結合できる能力のある SM がかえってタンパク質合成を阻害するようになったのだ、というのである。生命進化の初期段階は依然として明らかではないが、後に抗菌剤として進化する種々の低分子化合物が初めは必須代謝や調節にたずさわっていたことは充分推定される。

種々の抗菌薬に対して感受性の菌が死滅する機構は必ずしも薬剤の直接作用によるのではなく、多くの場合代謝の乱れによるオキシダントの処理不能が関係する。この場合菌は SOS 機能が発現し、耐性ではないがトレラントの状態となる。この SOS 機能を昂進させる低分子として硫化水素が働くことが知られている⁶⁾。この他に、感受性菌がバイオフィルムを生成しても耐性化し、緑膿菌のトブラマイシン耐性度が100倍以上になった例もある⁷⁾。バイオフィルム生成には所謂クオラムセンシング機構と言って、菌の密度が高まると、特殊な低分子生成濃度が高まり、その受容体が活性化して、多糖体などの産生が昂進することが知られている。その他、cyclic-di-GMP などもバイオフィルム生成に関係している⁸⁾。

以上のように薬剤をふくみ、種々の低分子は種々の活性を示すので J. Davies はこれらを parvome と総括している⁹⁾。病原菌の薬剤耐性またその程度にはこれら parvome や環境因子の関与があるが、まだ充分に

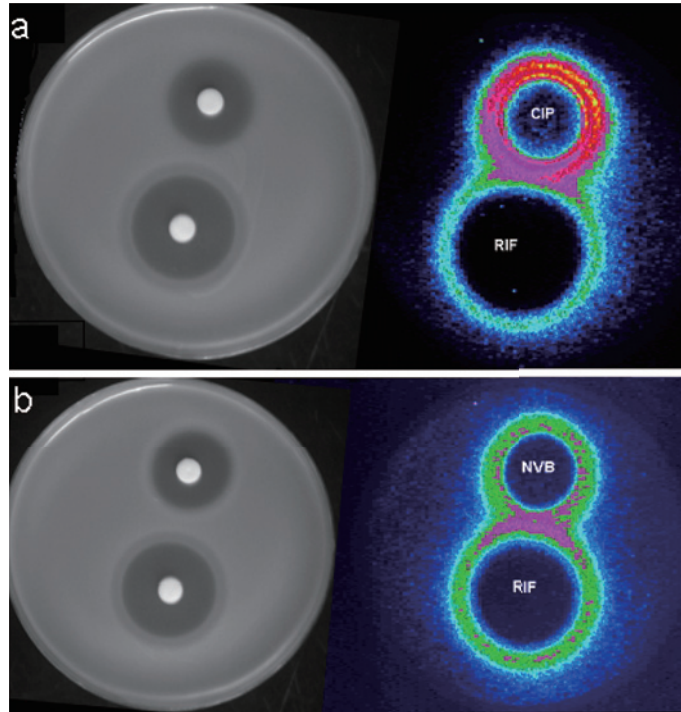


図7. 発光遺伝子を利用して薬剤の転写活性への影響を見る。Julian Davies：2011年9月，東京。左，黄色ブドウ球菌への抗菌活性。右，N-acetylglucosamidaseのプロモーター活性。

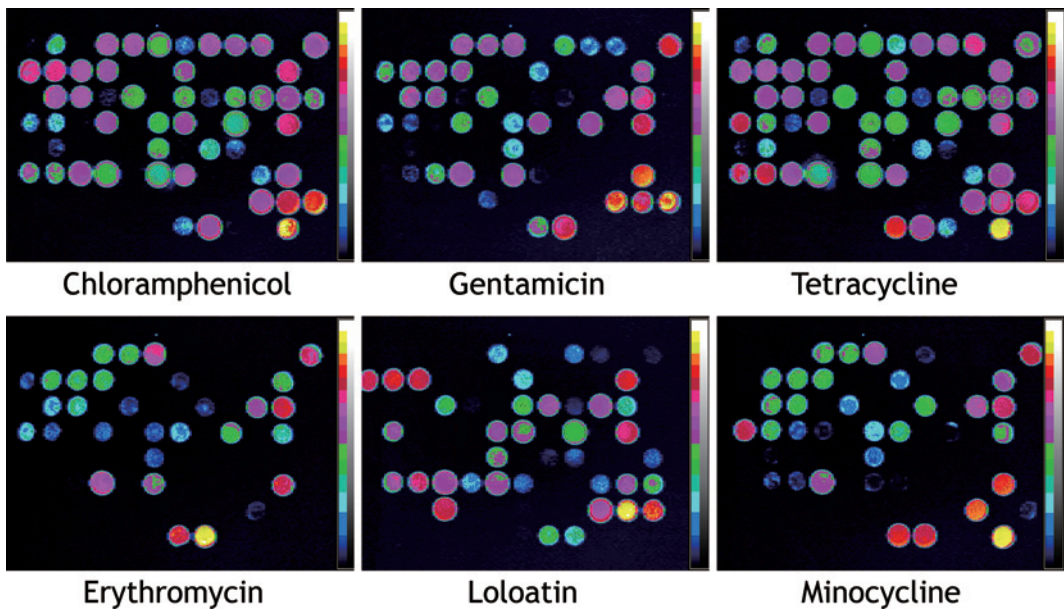


図8. 種々の抗菌薬の種々の転写昂進活性。J. Davies. IUMS 2011 Congress, 札幌

表5. 病原細菌の分類

古細菌界 (Domain Archaea)	第 XII 目, 腸内細菌	第 XIII 門, ファーミキューテス
真性細菌界 (Domain Bacteria)	第 I 科, 腸内細菌	第 I 綱, クロストリディア
第 X 門, シアノバクテリア	第 I 属大腸菌	第 III 綱, バチルス
第 XII 門, プロテオバクテリア	第 V 属ブフネラ	第 I 目, バチルス
第 I 綱, αプロテオバクテリア	第 X 属サイトロバクター	第 IV 科, リステリア
第 VI 目, リゾビア	第 XI 属エドワードシエラ	第 V 科, ブドウ球菌
第 III 科, プルセラ	第 XII 属エンテロバクター	第 II 目, 乳酸菌
第 II 綱 βプロテオバクテリア門	第 XVI 属クレブシエラ	第 IV 科, 腸球菌
第 IV 目, ナイセリア	第 XVIII 属プロテウス	第 VI 科, レンサ球菌
第 III 綱, γプロテオバクテリア門	第 XXXII 属サルモネラ	
第 V 目, レジオネラ	第 XXXIII 属セラチア	第 XIV 門, 第 I 綱アクチノバクテリア
第 VIII 目, シュードモナス	第 XXXIV 属シゲラ	第 I 目第 VII 亜目, コリネバクテリア
	第 XL 属エルシニア	第 I 科, コリネバクテリア
		第 IV 科, ミコバクテリア
第 I 科, シュードモナス	第 XIII 目, 第 I 科パストウレラ	第 XVI 門, クラミジア
第 I 属, シュードモナス	第 I 属パストウレラ	第 XVII 門, スピロヘータ
緑膿菌, プチダ菌	第 III 属ヘモフィルス	第 XX 門, バクテロイデス
第 II 科, モラキセラ		
第 II 属アチネトバクター	第 V 綱, εプロテオバクテリア	
第 X 目, 第 I 科, 第 I 属ビブリオコレラ菌	第 I 目, カンピロバクテリア	
	第 I 科, カンピロバクテリア	
	第 II 科, ヘリコバクター	

バージーのマニュアル第2版, 2001¹⁰⁾

表6. ゲノムの大きさ

生物種	塩基対数 (Mbp)	生物種	塩基対数 (Mbp)
ヒト	3,224.5	結核菌 H37Rv	4.4
マウス	2,726.0	枯草菌 168	4.2
イネ	382.8	癩菌 TN	3.3
ショウジョウバエ	139.7	ウエルシュ菌 13	3.1
線虫	100.3	黄色ブドウ球菌 Mu50	2.9
熱帯熱マラリア 3D7	23.3	肺炎レンサ球菌 TIGR4	2.2
酵母 S288c	12.2	化膿レンサ球菌 M1 GAS	1.9
放線菌 NBRC 13350	8.6	インフルエンザ菌 Rd KW20	1.8
緑膿菌 PAO1	6.3	メタノコッカス S2	1.7
大腸菌 O157 Sakai	5.6	ピロリ菌 26695	1.7
バクテロイデス YCH46	5.3	肺炎クラミジア CWL029	1.2
腸炎ビブリオ RIMD 2210633	5.1	梅毒トレポネーマ Nichols	1.1
ネズミチフス菌 LT2	5.0	リケッチア Madrid E	1.1
セラチア FG194	4.9	マイコプラズマ M129	0.8
大腸菌 K-12	4.6	ブフネラ APS	0.7

緑膿菌のゲノムはグラム陰性菌中最大である。

知られてはいない。

病原細菌の分類

病原菌の薬剤耐性の進化の問題は遺伝子 DNA の進化の立場から考察されて来たが, DNA 塩基配列の方法が発展するにつれ, 臨床における感染症での原因菌

の同定でも, 発見された形質よりはその大本の DNA, 菌のゲノム構成が問題となって来た。病原菌の分類にもっとも権威があるのは Bergey のマニュアルであるが, それは DNA 解析に基づき 2001 年に大改訂されて第 2 版がでた¹⁰⁾。病原性グラム陽性菌のほとんどは Firmicutes (堅い殻) 門に属し, グラム陰

性病原菌は Proteobacteria 門に属す。球菌のブドウ球菌と桿菌のバチルスが同じバチルス目に入り、昆虫寄生菌であったプフネラが大腸菌と同じ腸内細菌科に属するようになったのも画期的な事である (表5)。病原菌のゲノムの大きさを見ると緑膿菌が 6.3 Mbp で最も大きく、それは種々の環境に適応する調節遺伝子の進化の結果である。大腸菌 O157 が K12 株より 1 Mbp も大きいのは、それだけ多くの病原性遺伝子が入り込んだ為である。一方プフネラは K12 株より 4 Mbp も少なく最低のゲノムサイズであるが、これは細胞内寄生により多くの必須遺伝子までも失ったためである (表6)。同じミコバクテリアでも培養不能のライ菌は結核菌よりゲノムサイズが小さい。これも退化性進化の例であろう。

本稿では薬剤耐性の進化に限って述べたが、同様な過程で病原性遺伝子の進化があり、更に 20 億年に及ぶ単細胞微生物の時代よりヒトに至る膨大な進化の過程があるが、基本原理は遺伝子の重複、変異、伝達、組み替えであり、薬剤耐性遺伝子は実験対象としても、実験手段としても、生物進化の解明に最もよく用いられて来たのである。

謝辞: 本稿は著者の一人 (橋本) が 2012 年の第 23 回日本臨床微生物学会での特別講演で発表した内容に基づくもので、共著者村山はそのときの共同研究者です。講演を依頼して下さった総会長、稲松孝思博士 (東京都健康長寿医療センター) に感謝致します。またその前年、来日講演時、スライドコピーを分与して下さいました Julian Davies にも謝意を表します。

文 献

- Zhang, J., C. Rouillon, M. Kerou, et al. 2012. Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Mol. Cell.* 45: 303-313.
- Jacobs, C., L.J. Huang, E. Bartowsky, et al. 1994. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* 13: 4684-4994.
- D'Costa, V.M., C.E. King, L. Kalan, et al. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477: 457-461.
- Wright, G.D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 5: 175-186.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, et al. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 12: 83-88.
- Shatalin, K., E. Shatalina, A. Mironov, et al. 2011. H2S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* 334 (6058): 986-990.
- Kim, J., B. Pitts, P.S. Stewart, et al. 2008. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52: 1446-1453.
- Boyd, C.D., G.A. O'Toole. 2012. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 439-462.
- Davies, J. 2011. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15: 5-10.
- D.R. Boone, R.W. Castenholz, G.M. Garrity ed. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition*, Springer-Verlag, New York.
- Hedge, P.J., B.G. Spratt. 1985. Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modelling the active site of an E. coli penicillin-binding protein. *Nature* 318: 478-480.
- Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, et al. 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* 13: 641-653.
- 堀田国元, 岡本了一, 近藤信一. 1993. アミノグリコシド耐性. p. 81-103, 病原菌の薬剤耐性 (橋本一, 井上松久編), 学会出版センター, 東京.

Emergence and evolution of microbial drug-resistance

Hajime Hashimoto¹⁾, Somay Yamagata Murayama²⁾

¹⁾Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

²⁾Laboratory of Molecular Cell Biology, School of Pharmacy, Nihon University

Resistant-bacteria emerge when the concentration of drug in the blood is kept for a long time among the MSW (Mutant Selection Window, between MIC of sensitive and resistant bacteria). Antibiotic resistance can be a result of a point mutation in the endogenous pathogen genome, or of horizontal transfer of exogenous genes by transformation, transduction, or conjugation. It has been suggested that the origin of these exogenous genes are self-defense mechanism in antibiotic-producing organisms, such as actinomycetes. The low concentration of most antibiotics, like other small molecules, was found to regulate the expression of many genes. The original role of antibiotics might be not only intercellular communication but also an important factor for intracellular regulation. Acquisition of drug-resistance by pathogenic bacteria may reflect the general mode of genome evolution to adapt itself for various environmental changes.