

要約：抗生物質耐性は、人間の健康に多大な脅威をもたらします。この問題を克服するには、抗生物質生産菌および病原菌における抗生物質耐性のメカニズムを知ることが不可欠です。この論文では、この問題を4つの観点から扱います。まず、抗生物質生産菌の耐性遺伝子を、その生合成に関連して議論する。ほとんどの耐性遺伝子は生合成遺伝子クラスター内にあるが、パロモマイシンアセチルトランスフェラーゼなどのいくつかの遺伝子は遺伝子クラスターのはるか外側に位置している。第二に、病原菌の抗生物質耐性遺伝子を生産菌のものと比較すると、耐性メカニズムは抗生物質のクラスに依存しており、さらに、Eis アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ、エンジン抗生物質中の自己犠牲タンパク質など新しいタイプの耐性メカニズムが病原菌に出現している。第三に、生産菌と病原菌との間の耐性遺伝子の関係は、それらのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列レベルで再評価される。病原菌は、抗生物質生産菌とは異なる耐性メカニズムを持っている。更に、耐性メカニズムは、抗生物質使用の初期段階と現在との間でほとんど異なりません、例えば、*Staphylococcus aureus* のβ-ラクタム耐性。最後に、病原菌への遺伝子伝達におけるグアニン+シトシン (GC) バリアを考察する。現在、耐性遺伝子は、多様な環境からの複雑な混合物で構成されるレジストーム (resistome) を構成しています。

キーワード：抗生物質耐性；自己耐性；細菌；抗生物質生産菌；病原菌

## 目次

1. はじめに	1
2. タンパク質合成阻害剤	2
2.1. アミノグリコシド	2
2.2. マクロライドおよび関連抗生物質	10
2.3. テトラサイクリンとクロラムフェニコール	14
2.4. その他のタンパク質合成阻害剤	16
3. 細胞壁-細胞膜合成阻害剤	17
3.1. β-ラクタム	17
3.2. グリコペプチド、リポペプチドおよび関連抗生物質	21
3.3. ポリエンマクロライド	23
3.4. ランチビオティックおよび環状ペプチド	24
3.5. その他の細胞壁-細胞膜合成阻害剤	26
4. DNA 合成阻害剤および関連抗生物質	27
4.1. ブレオマイシンおよび関連抗腫瘍抗生物質	27
4.2. キノンおよび関連抗腫瘍および抗細菌抗生物質	28
4.3. エンジン系抗腫瘍抗生物質	32
5. その他の抗生物質	34
6. 結論	36

## 1. はじめに

抗生物質の導入により、ひとたび感染症による人の病気の罹患率と死亡率が劇的に減少した。たとえば、結核による人の罹患率と死亡率は、ストレプトマイシンとカナマイシンの導入後に大きく減少した。しかし、多剤耐性病原菌の出現は再び状況を劇的に戻しました。更に、多剤耐性状況は

ますます悪化している。WHO は特に *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, および *Neisseria gonorrhoeae*, 血液中毒と食中毒の感染症の治療がますます困難になり、時には治療が不可能になると感染者に注意を呼びかけています[1]。抗生物質耐性は、主にトランスポーターによる抗生物質の排出、抗生物質と標的の突然変異、修飾および保護による標的との相互作用の防止、および抗生物質の修飾によるものである。これらのメカニズムは、固有の構造的または機能的耐性特性、変異変化または水平遺伝子伝達によって獲得された耐性、および適応抗生物質耐性に起因する[2-4]。ペニシリンの再発見の前でさえ耐性細菌が報告されたという事実は、少なくともいくつかの耐性形質がゲノムに内因性に存在していたことを強く示唆している[5, 6]。抗生物質生産菌はその自殺予防のために、自己耐性を持つべきであるという自然な概念とともに、抗生物質修飾酵素の遺伝子は抗生物質生産菌で進化し、形質転換、形質導入または接合により病原菌に移行したと仮定された[7-9]。この仮説は最近まで受け入れられてきた[10]。しかし、抗生物質の長期にわたる誤用と過剰使用は、下水および廃水処理プラント、病院排水、養殖、農業および食肉処理場の廃棄物だけでなく、地表水、土壌なども含む環境すべてに、抗生物質および抗生物質耐性遺伝子の普及が広がった。その結果、多剤耐性形質は、これらに存在するさまざまな細菌間で相互に移動している[11-14]。この総説では、まず、抗生物質生合成の観点から抗生物質生産菌の抗生物質耐性遺伝子を要約します。次に、病原菌の耐性遺伝子を抗生物質生産菌のものと比較します。最後に、生産菌と病原菌の間の耐性遺伝子の関係をアミノ酸配列、ヌクレオチド配列レベルから再評価します。

## 2. タンパク質合成阻害剤

### 2.1. アミノグリコシド

作用機序に基づいて、抗生物質はタンパク質合成阻害剤、細胞壁合成阻害剤、DNA 合成阻害剤、DNA インターカレーター、RNA 合成阻害剤、その他など6つのカテゴリーに分類できる。タンパク質合成は細胞内の抗生物質の主要な標的の1つであり、開始、伸長、終止およびリサイクルに分類される[15-17]。アミノグリコシド系抗生物質はタンパク質合成阻害剤に属し、4,6-二置換 2-デオキシストレプトタミン (DOS) 含有 (カナマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシンなど)、4,5-二置換 DOS 含有 (ネオマイシン、パロモマイシン、リビドマイシンなど)、4-置換 DOS 含有 (アブラマイシン) アミノグリコシド、その他 (ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、ハイグロマイシン B、カスガマイシンなど) にグループ分けができます。これらのアミノグリコシドは、デコード領域 (A サイト) の細菌リボソームの小サブユニットの 16S rRNA のヘリックス 44 に主に結合し、大サブユニットの 23S rRNA のヘリックス 69 に二次的に結合して抗菌作用を発揮し、翻訳の誤読の誘導および転座反応の抑制に導く[18-20]。更に、非定型アミノグリコシドの1つであるストレプトマイシンは、骨格のリン酸およびリボースのヒドロキシル基と相互作用する。アミノグリコシド系抗生物質の特徴の1つは、マクロライド、テトラサイクリン、クロラムフェニコールなどのリボソームを標的とするほとんどの抗生物質が静菌性であるという事実とは対照的に、殺菌クラスの抗生物質と見なされることです[18, 21]。アミノグリコシドの詳細な作用メカニズムは、その洗練された化学構造に依存している[25-28]。

これらのアミノグリコシド系抗生物質は、放線菌によって生合成されます。放線菌は原核生物なので、彼らは彼ら自身の生合成産物による攻撃から身を守らなければなりません。表 S1 は、抗生物質名、それらの化学構造 (Kegg 数)、生産菌/生産真菌の耐性関連戦略、解析された

生産菌/生産真菌名、および文献と GenBank アクセション番号 (GB 番号) を示します。カナマイシンは、*Streptomyces kanamyceticus* から単離され[29]、トブラマイシン、ゲンタマイシン、シソマイシンとともに、4,6-二置換 DOS 含有アミノグリコシド系抗生物質です。ジベカシン、アミカシン、ネチルミシン、およびイセパミシンは、それらの半合成類似体です。カナマイシン生合成遺伝子クラスターはクローン化され、配列決定された[30, 31] (GB No. AJ582817, AB164642 および AB254080)。これにはアミノグリコシド 6' -N-アセチルトランスフェラーゼ (*kanM*)、16S rRNA メチルトランスフェラーゼ (*kmr*) の遺伝子が含まれ、自己耐性に関与していることを示す。加えて、いくつかの排出 (*kanO* および *kanM*) および ABC トランスポータータンパク質遺伝子 (*kanS*, *kanR* および *kanQ*) がある。トブラマイシンは 3' -デオキシカナマイシン B です。その生合成遺伝子クラスターは *Streptoalloteichus tenebrarius* および *Streptoalloteichus hindustanus* からクローニングされた[30, 32, 33] (GB 番号 AJ579650 および AJ810851)。2 個のトランスポーター遺伝子 (*tobT* および *tobU*) は存在するが、アセチルトランスフェラーゼおよびホスホトランスフェラーゼ遺伝子はクラスター内に存在しない[34]。トブラマイシン生産菌、*S. tenebrarius* は、rRNA メチルトランスフェラーゼ (KgmB) を生産すると報告された[35]。これらの遺伝子は自己耐性に関与している可能性がある。ゲンタマイシン生合成遺伝子クラスターは、*Micromonospora inyoensis* よりクローン化された[36, 37] (GB No. AJ575934, AJ628149, AY524043)。興味深いことに、自己耐性に関与することが提案されている 4 つの遺伝子はクラスター内に存在する。つまり、2 つの rRNA メチルトランスフェラーゼ (*gtmF* と *gtmL*) をコードする遺伝子、1 つのアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (*gtmJ*) および 1 つのトランスポーター (*gtmK*)。シソマイシンは構造的にゲンタマイシンに関連しているが、ユニークな不飽和ジアミノ糖を持っている。G-52 は 6-メチルシソマイシンであり、G-418 (ジェネティシン) は、ゲンタマイシンと構造的に類似している。シソマイシン生合成遺伝子クラスターは *M. inyoensis* からクローン化された[38] (GB No. FJ160413)。ゲンタマイシン遺伝子クラスターと同様に、シソマイシン生合成遺伝子クラスターには、2 つの rRNA メチルトランスフェラーゼ (*sis4* および *sis9*)、1 つのアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (*sis17*) および 1 つではなく 2 つのトランスポーターをコードする遺伝子 (*sis26* および *sis27*) が含まれている。更に、その遺伝子の配置は互いに非常によく似ている。G-52 および G-418 生産菌の無細胞抽出物の解析は、これらがアミノグリコシドに特有の修飾酵素を欠いていることを示した。代わりに、それらはアミノグリコシドに耐性の高いリボソームを含んでいた[39-41]。4,5-二置換 DOS 含有、*Micromonospora* 種生産アミノグリコシドであるベルダマイシンおよびサガミシンについては、生合成遺伝子に関する報告はまだ発表されていない。メチル化およびリン酸化代謝産物のみが発酵液で検出された[42]。

ネオマイシン (フラジオマイシン)、パロモマイシンおよびリビドマイシンは、4,5-二置換 DOS 含有アミノグリコシド系抗生物質に属す。それらの臨床使用は、毒性により制限されている。ネオマイシン生合成遺伝子クラスターは、*S. fradiae* から 21 個の推定オープンリーディングフレーム (ORF) を含む 37kb DNA フラグメントとしてクローン化された[43-45] (GB No. AJ843080)。これには自己耐性に関与することが提案されている AphA の遺伝子 (GB No. CAF33306) および AacC8 の遺伝子 (GB No. CAF33325) が含まれています。それらは、それぞれアミノグリコシド 3' -ホスホトランスフェラーゼとアミノグリコシド 3-アセチルトランスフェラーゼである。更に、2 つの推定 ABC トランスポーター (GB No. CAF33314 および CAF33315) の遺伝子がクラスター内で検出された。*M. echinospora* の GrmA (GB No. AAR98546)、*S. kanamyceticus* の Kmr (GB No. CAE46946)

および *S. tenebrarius* からの KamB (GB No. WP\_063964000) をプローブタンパク質として用い、自己耐性に関与する rRNA メチルトランスフェラーゼの検索の結果、全ゲノムのヌクレオチド配列が決定されている *S. fradiae* DSM40063 のゲノムにはアミノグリコシド生合成遺伝子の少なくとも一部が存在するが、類似のタンパク質は存在せず、rRNA メチルトランスフェラーゼが存在しないことが示唆される。パロモマイシン生合成遺伝子クラスターは、*Streptomyces rimosus* から 48kb DNA フラグメントとしてクローン化された (GB No. AJ628955)。自己耐性アミノグリコシド 3' -ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (*parR/aphA*) および ABC トランスポーター遺伝子 (*parT* および *parU*) はクラスター内にあり、そのアミノ酸配列は、ネオマイシン生合成遺伝子クラスターの配列と相関性が高い。興味深いことに、自己耐性に関与する 2 個のアセチルトランスフェラーゼ (AAC (3) -VII および AAC (6') -II、GB No. CAG44462 および CAG44463) は遺伝子クラスターのはるか外側に存在する [46] (GB No. AJ749845)。これらの酵素がどのように自己耐性に関与しているのかを知ることは興味深いことである。リビドマイシン生合成遺伝子クラスターは、*Streptomyces lividus* から 40kb DNA フラグメントとしてクローニングされた (GB No. AJ748832)。2 つの ABC トランスポーター遺伝子 (GB No. CAG38699 および CAG38700) を除き、生産菌には自己耐性遺伝子は報告されていない。これは、この株における自己耐性遺伝子の詳細な検討がないためかもしれません。リボスタマイシン生合成遺伝子クラスターが報告された [47] (GB No. AJ744850)。ネオマイシンのような他の 4,5-二置換アミノグリコシドと同様に、自己耐性関連遺伝子、*rph*、*rbmI*、*rgmE* と *rbmF* は生合成遺伝子クラスター内で検出された。ブチロシンは *Bacillus circulans* によって生産される 4,5-二置換 DOS 含有アミノグリコシドである。ブチロシンの化学構造は、DOS の一部が  $\alpha$ -ヒドロキシ-アミノ酪酸で置換されていることを除きリボスタマイシンと同様ですが、生合成遺伝子クラスターの構成はそれらの間で完全に異なる [47-49] (GB No. AB097196)。更に、アミノグリコシド 3' -ホスホトランスフェラーゼ活性はブチロシン生産菌で検出されるが [50]、そのような遺伝子はこの生合成遺伝子クラスターでは検出できません。アプラマイシンは一置換 DOS 含有アミノグリコシドです。生合成遺伝子クラスターが *S. tenebrarius* からクローン化された (GB No. AJ629123)。それには自己耐性に関与している可能性がある 16S rRNA メチルトランスフェラーゼ (*kamB*) および 2 つのエクスポート遺伝子 (*aprV* および *aprW*) が含まれている。これらの 4,6- および 4,5-二置換および一置換 DOS 含有アミノグリコシドの抗菌活性は、16S rRNA のヘリックス 44 の G1405 または A1408 のメチル化によって損なわれる [51]。

ストレプトマイシンは、放線菌から分離された最初の抗生物質であり、最初のアミノグリコシド抗生物質である [52]。上記のアミノグリコシドと異なり、ストレプトマイシンは 4 つの 16S rRNA のヌクレオチド (No. 13、526、915 および 1490) およびタンパク質 S12 のリジン 45 に結合し、したがって、その抗菌活性は、G1405 および A1408 のメチル化によって影響を受けません [53]。その生合成遺伝子クラスターは 90kb DNA フラグメントとしてクローン化された [54, 55] (GB No. AJ862840)。それにはクラスターに隣接して 3 つの推定ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (*strA/aphD*/SGR\_5932、*strK*/SGR\_5938、および *aphE*/SGR\_249) と 2 つの ABC 型トランスポーター遺伝子 (*strV*/SGR\_5915 および *strW*/SGR\_5916) が含まれている。更に、1 つの推定アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ (SGR\_292) と 4 つの RNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (SGR\_1654、SGR\_1886、SGR\_4020、および SGR\_6774) が検出されます。これらのタンパク質のすべてではなく、少なくともいくつかは、生産菌の自己耐性に関係している [56] (GB No. NC\_010572)。アミノシクリトールアミノグリコシド系抗生物質スペクチノマイシンの生合成遺伝子クラスターは、

*S. spectabilis* およびその他の *Streptomyces* 種からクローン化された [57, 58] (GB No. EU255259)。アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、SpcN、および RNA メチルトランスフェラーゼ、SpcM は、自己耐性に関与することが提唱されている [57, 58]。ハイグロマイシン B は、30S リボソームサブユニット上で別の部位に結合するアミノシクリトール系抗生物質で、タンパク質合成を阻害する [59]。その生合成遺伝子クラスターは、*S. hygrosopicus* からクローン化された [60, 61] (GB No. AJ628642)。クラスター内で自己耐性関連タンパク質である HygA (ホスホトランスフェラーゼ) およびトランスポーター (HygV および HygW) の遺伝子が検出される。ハイグロマイシン B とは構造的に異なるハイグロマイシン A は、*S. hygrosopicus* から単離された抗生物質であり、タンパク質合成のペプチジルトランスフェラーゼ反応を阻害する。31.5kb の DNA フラグメントの生合成遺伝子クラスターがクローン化された [62]。ホスホトランスフェラーゼである Hyg21 およびトランスポーターである Hyg19 および Hyg28 は、自己耐性に関与することが提案された [62, 63]。*S. tenjimariensis* が生産するイスタマイシンは、2 つのユニットで構成されるアミノグリコシド系抗生物質である。211 アミノ酸残基からなる FmrT は、自己耐性に関与すると提案された rRNA メチルトランスフェラーゼである [64]。3 つのトランスポーター遺伝子 (*steF24.1*, *steF24.27c* および *ste022.6*) がクラスター内で推測されました。イスタマイシンは、カスガマイシンを生産する *S. kasugaensis* によってもアセチル化される [65]。しかし、イスタマイシン生産菌のアセチル化と自己耐性の関係は明らかにされていない。カスガマイシンは、主にイネいもち病を引き起こす真菌の増殖防止に使用されるアミノグリコシド系抗生物質であり、翻訳開始を特異的に阻害する [66]。アセチルトランスフェラーゼ活性は、カスガマイシンを生産する *S. kasugaensis* の自己耐性に関与していることが報告された [65]。更に、ABC トランスポーター遺伝子である *kaskLM* は、自己耐性の原因となっている [67]。フォルティミシン (アストロマイシン) は、*Micromonospora olivasterospora* によって生産されるアミノグリコシド系抗生物質である。その生合成遺伝子クラスターはクローン化され (GB No. AJ628421)、16S rRNA メチルトランスフェラーゼをコードする *fmr0* (GB No. CAF31555) は自己耐性で作用すると推定されている [68]。バリダマイシンは、*S. hygrosopicus* var. *limoneus* が生産する殺真菌性アミノグリコシド系抗生物質で、トレハラーゼの阻害剤として使用される。その生合成遺伝子クラスターがクローン化された [69] (GB No. DQ223652)。推定トランスポーター (VldJ) がクラスター内に存在する。アミノグリコシドの誘導体であるアカルボースは、アミラーゼ阻害剤として *Streptomyces diastaticus* から単離された [70]。現在、2 型糖尿病患者の治療に広く使用されている [71]。しかし、その抗菌活性については何も報告されていません。その生合成遺伝子クラスターがクローン化された [72] (GB No. AM409314)。アカルボースキナーゼ、GacK、および 3 つのトランスポーター、GacX、GacY、および Gac W がクラスター内に存在する。GacK は、アカルボースの細胞内不活性化に関係していると報告された [72]。アカルボースは生産菌で二重の役割があると考えられている。つまり、それは競合菌の  $\alpha$ -グリコシド酵素を阻害し、生産菌におけるグルコースまたは澱粉分子の取り込みのためのカルボフォルとして機能する。ストレプトスリシンクラスの抗生物質であるストレプトスリシンとノルセオスリシンは幅広い抗菌活性を示すが、それらの特徴的な遅延毒性は臨床応用を妨げます。クローン化された生合成遺伝子クラスターは、アセチルトランスフェラーゼ (*orfE*) および 2 つのトランスポーターの遺伝子 (*orfW* および *orfX*) を含む。これらのタンパク質は、自己耐性に関与していると考えられている [73-75] (GB No. AB684619 および AB684620)。自己耐性に関与しているノルセオスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*natI*) がクローン化された [76, 77]。

抗生物質を生産する細菌の薬剤耐性は、いわば自分の領域に限られています。対照的に、病原性細菌では、それはそれら自身の存在に影響を与えるだけでなく、人と家畜に脅威を与える。アミノグリコシド系抗生物質に対する病原菌の耐性メカニズムには、アミノグリコシド修飾酵素、リボソーム標的の突然変異と修飾および排出ポンプが含まれる[78, 79]。しかし、アミノグリコシド系抗生物質に対する耐性の最も広く普及した手段は、それらの修飾酵素による不活性化である。アミノグリコシド修飾酵素の中で、アセチルトランスフェラーゼ、ホスホトランスフェラーゼおよびヌクレオチジルトランスフェラーゼ、特にアデニルトランスフェラーゼは臨床的に重要な耐性関連酵素である。アミノグリコシドN-アセチルトランスフェラーゼ (AAC) は、アセチル化の位置に基づき4つの主要なグループに分けられる: AAC (1)、AAC (2'), AAC (3) およびAAC (6') [26, 80]。別の新しいタイプのアミノグリコシド修飾酵素である強化された細胞内生存 (Eis) タンパク質は、*Mycobacterium tuberculosis*で同定された[81]。他のAACとは異なり、Eisとそのホモログはアミノグリコシドの複数のアミノ基をアセチル化し、*Mycobacterium*と他の放線菌に分布している[82]。更に、Eisタンパク質は400を超えるアミノ酸残基で構成されており、そのアミノ酸配列と結晶構造は他のAACとは完全に異なる[83]。病原菌の抗生物質修飾酵素は、抗生物質生産菌のものから進化したと仮定されています[7-9]。ここで、この仮説をAACのアミノ酸配列の類似性の点から再評価し、必ずしも真実ではないことが明らかになった (表S2および図S1)。AAC (3) -IIa (GB番号は括弧内にある; CAA31895)、AAC (3) -IIIb (AAA25682)、AAC (3) -IVa (CAA25642)、AAC (3) -IIb (AAA26548)、AAC (3) -IIc (CAA38525)、AAC (3) -IIIa (CAA39184)、AAC (3) -IIIc (AAA25683)、およびAAC (3) -VIa (AAA16194) など病原菌のAAC(3)のアミノ酸配列は、アミノグリコシド生産菌 (AAA88552、AAA26685、AAA25334およびBAA78619) のものと非常に類似している。たとえば、AAA88552 (*S. rimosus* subsp. *paromomycinus*、パロモマイシン生産菌からのタイプVII AAC (3)) とCAA31895、AAA25682、CAA25642、AAA26548、CAA38525、CAA39184、AAA25683、およびAAA16194のE値は、それぞれ $2.9 \times 10^{-31}$ 、 $1.4 \times 10^{-31}$ 、 $1.8 \times 10^{-9}$ 、 $1.2 \times 10^{-26}$ 、 $1.1 \times 10^{-34}$ 、 $1.3 \times 10^{-36}$ 、 $6.8 \times 10^{-32}$ 、および $3.8 \times 10^{-24}$ である (表S2および図S1A)。ただし、アミノグリコシド生産菌 (AAA88552) と病原菌 (CAA31895 およびAAA25682) のヌクレオチド配列の類似性 (E値) は、それぞれこれら細菌の異なるグアニン (G) +シトシン (C) 含量を反映して、11および0.42 (同一性は56.0%および57.4%、類似性は66.1%および66.9%) です。一方、生産菌とAAC (3) -Ia (AA049599)、AAC (3) -Ib (AAA88422)、AAC (3) -Ic (CAD53575) およびAAC (3) -Id (AAR21614) の配列類似性は異なる (表S2と図S1C)。代わりに、AAC (3) -Ia (AA049599) は、*Aspergillus fumigatus*のグルコサミン-6-リン酸アセチルトランスフェラーゼ (2VEZ-A、E =  $5.4 \times 10^{-2}$ )、および*Trypanosoma brucei* (3I3G-B、E =  $2.0 \times 10^{-2}$ ) とわずかな類似性を示し (表S2)；AAC (3) -Ib (AAA88422) は、大腸菌のリボソームタンパク質S18-アラニンN-アセチルトランスフェラーゼ (NP\_418790、E値= 0.039)、および*H. sapiens*のN-アセチルトランスフェラーゼ20アイソフォームa (NP\_057184、E値= 0.098) と；AAC (3) -Ic (CAD53575) は、シロイヌナズナのアシルCoA N-アシルトランスフェラーゼ (NAT) スーパーファミリータンパク質 (NP\_001190321、E値=  $2 \times 10^{-5}$ )、および*Mus musculus*のN-アセチルトランスフェラーゼ8 (NP\_075944、E値= 0.010) とわずかに類似しており、病原性細菌のAAC (3) がアミノグリコシド生産菌のアセチルトランスフェラーゼだけでなく、細菌、真菌、植物、および動物の他のタイプのアセチルトランスフェラーゼとも進化的に関連していることを示唆している。AAA88552 (パロモマイシン生産菌のAAC (3)) とCAA31895 (プラスミドpWP113aのAAC (3)) でも、類似値Eはアミノ酸配列レベルで $2.9 \times 10^{-31}$ であり、ヌクレオチド配列レベルで7.1である。上記のように、パロモマイシ

ン生産菌 *S. rimosus* は、生合成遺伝子クラスターのはるか外側に位置する2つのアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を保有している。それらの1つである AAA88552/CAG44462 は AAC (3) であり、アミノ酸配列はアミノグリコシド生産菌の他の AAC 酵素と非常によく似ており、アミノ酸配列が DNA 上の場所の影響を受けないことを示している (図 S1A)。

病原菌の AAC (6) は、アミノ酸配列の相同性に基づいて構築された系統樹で3つのクラスター (図 S1の B、D、E) を形成する。この結果は、Salipante and Hallの結果と一致している [84]。同じクラスターの各メンバーは高い配列相同性を示すが、異なるクラスターのメンバーは相同性をまったく示しません。さらに、クラスター B のアミノ酸配列は、*Enterococcus* のさまざまな種からのアミノグリコシド N-アセチルトランスフェラーゼ AAC (6') -Ii と比較的高い相同性を示し; クラスター D のそれらは、シロイヌナズナのアシル CoA N-アセチルトランスフェラーゼ (NP\_201544、E 値 = 0.003)、*H. sapiens* のジアミンアセチルトランスフェラーゼ 2 アイソフォーム 3 (NP\_597998、E 値 = 3e-04) および *Microcystis aeruginosa* からの GNAT ファミリー N-アセチルトランスフェラーゼ (WP\_012265151、E 値 = 2e-04) と比較的高い相同性を示し; クラスター E のそれらは、*Clostridioides difficile* のアシル CoA N-アセチルトランスフェラーゼ (YP\_001087683、E 値 = 0.018)、*B. subtilis* のスペルミジン/スペルミンアセチルトランスフェラーゼ (NP\_390537、E 値 = 0.006)、*M. tuberculosis* 由来のリジン N-アセチルトランスフェラーゼ (YP\_009358719、E 値 = 1e-06) と比較的高い相同性を示し; 病原菌のアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ AAC (6) は、アミノグリコシド生産菌のアセチルトランスフェラーゼだけでなく、細菌、植物、哺乳類のその他のタイプのアセチルトランスフェラーゼにも進化的に関連していることを示唆している。言い換えると、病原性細菌は、水平方向の遺伝子伝達によって獲得された多様な元のプロト耐性遺伝子および/または耐性関連および耐性非関連遺伝子から耐性遺伝子を進化させたと考えられる [84, 85]。 *Pseudomonas aeruginosa* PA34 の AAC (3) -II d (WP\_000557454) 近くの遺伝子の配置は、ネオマイシン生産菌である *S. fradiae* の配列 (CAH58703) とはまったく異なる (図 S2A、B)。しかし WP\_000557454 と CAH58703 間のアミノ酸配列の同一性 (E 値) は 3.1e-31 で、これら 2 つはアミノ酸配列レベルで非常に類似していることを示唆している (図 S1 と表 S2)。ただし、これら 2 つの種は分類学的分類が完全に異なる。一方、放線菌種由来のアセチルトランスフェラーゼは、アミノグリコシド 3-アセチルトランスフェラーゼ、ストレプトスリシンアセチルトランスフェラーゼ、アミノグリコシド 6-アセチルトランスフェラーゼおよび Eis タンパク質の 4 つのグループに分類される。ただし、各グループのメンバー間でアミノ酸配列の相同性は観察されない (たとえば、それぞれ表 S2 の AAA88552、CAA51674、CAF60525 および NP\_628362)。

アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) は、アミノグリコシドのヒドロキシル基の 1 つへ ATP のホスホリル基の位置特異的転移を触媒する。それらはいくつかのグループに分けられる: APH (4)、APH (6)、APH (9)、APH (3')、APH (2'')、APH (3'')、APH (7'') [80]。それらはアミノ酸配列に基づいて構築された系統樹でいくつかのクラスターを形成する (図 S3)。ストレプトマイシンホスホトランスフェラーゼ (BAG22761)、スペクチノマイシンホスホトランスフェラーゼ (ABW87797、AAB66655、および U70376\_3) はクラスター A に属す。2 つのスペクチノマイシンホスホトランスフェラーゼ (ABW87797 および AAB66655) は互いに高い類似性を示すが、これら 2 つは他のホスホトランスフェラーゼ (U70376\_3) およびストレプトマイシンホスホトランスフェラーゼ (BAG22761) とほとんど類似していない (表 S3)。さらに、これら 2 つは病原菌由来のホスホトランスフェラーゼ (AAA26443、AE004612\_1、および CAA25854) とほとんど類似性を示さない。

SmartBlast 解析で、*S. spectabilis* の SpcN (ABW87797) が *S. hygroscopicus* のホスホトランスフェラーゼ (WP\_06628960, E = 1e-172)、*S. aureocirculans* (WP\_030559002, E = 3e-170)、*S. silvensis* (WP\_107450217, E = 1e-155) および *Thermobifida halotolerans* (WP\_068692512, E = 5e-127) と高い類似性を示すことが示唆され、これらのホスホトランスフェラーゼが放線菌の 1 つのグループを形成することを示している。対照的に、*S. netropsis* (U70376\_3) のホスホトランスフェラーゼは、*S. pharetrae* からのヒドロキシ尿素ホスホトランスフェラーゼ (WP\_086170844, E = 2-174)、*P. aeruginosa* PA01 ストレプトマイシン 3”-ホスホトランスフェラーゼ (NP\_250549, E = 4.0e-15) および *Deinococcus radiodurans* R1 からのストレプトマイシン 3-キナーゼ (NP\_294178, E = 2.0e-08) と類似性を示し、これらのホスホトランスフェラーゼが別のグループを形成することを示している。一方、CAA23892、AE004828\_7 および CAA24789 などのクラスター B の病原菌のホスホトランスフェラーゼは、AAA2641、CAA23656 および AAA26442 などの他の病原菌とのスコアだけでなく、WP\_063841674 (ブチロシン)、CAN38351 (シソマイシン)、CAF34039 (ゲンタマイシン)、CAG44623 (パロモマイシン)、CAG34043 (リボスタマイシン)、CAH58684 (ネオマイシン)、およびその他などのアミノグリコシド生産菌とも高い類似性スコアを示す (表 S3)。それらはアミノグリコシド 3’ または 3”-ホスホトランスフェラーゼであり、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方に由来する。クラスター C のホスホトランスフェラーゼは、クラスター内のメンバーとの類似性は高いが、他のクラスターのメンバーとの類似性は高くなく (表 S3)、病原菌の少なくとも一部の耐性に関与するホスホトランスフェラーゼはアミノグリコシド生産菌のそれらとは遠い関係にあることを示唆する。クラスター C のメンバーはアミノグリコシド 2”-ホスホトランスフェラーゼであり、グラム陽性菌に由来する。*Streptomyces* の自己耐性におけるヌクレオチジルトランスフェラーゼの関与に関する報告は発表されていないが [80, 86]、リンコサミニドおよびムライマイシンのヌクレオチジルトランスフェラーゼが報告されている [87, 88]。

リボソーム標的の修飾は耐性の別のメカニズム、すなわち、メチルトランスフェラーゼによる 16S rRNA のメチル化です。16S rRNA の A 部位の修飾ヌクレオチド位置に応じて、アミノグリコシド耐性に関与するメチルトランスフェラーゼは 2 つのグループに分類される：N7-G1405 (グアニン-1405 の N7 位置のメチル化) 16S rRNA メチルトランスフェラーゼおよび N1-A1408 (アデニン-1408 の N1 位置のメチル化) 16S rRNA メチルトランスフェラーゼ [89]。それらのアミノ酸配列に基づいて構築された系統樹を図 S4 に示す。クラスター A、B および C の 3 つのクラスターで構成されている。クラスター A のメンバーは N1-A1408 メチルトランスフェラーゼに属し、クラスター B および C のメンバーは N7-G1405 メチルトランスフェラーゼで構成されている。アミノグリコシド生産菌のクラスター B のメンバーと病原菌のプラスミドのクラスター C のメンバーは系統発生的に密接に関連しているが、クラスター A のメンバーは類似していないことを指摘する必要がある (表 S4)。クラスター C の rRNA メチルトランスフェラーゼの遺伝子は、グラム陰性菌から分離されたプラスミドに存在する。クラスター A には、放線菌とグラム陰性菌のプラスミドの両方に由来する rRNA メチルトランスフェラーゼが含まれている (図 S4)。*S. spectabilis* (スペクチノマイシン生産菌、ABW87807) の SpcM は、rRNA メチルトランスフェラーゼであることが提案された [57]。しかし、アミノ酸配列は他の rRNA メチルトランスフェラーゼとは完全に異なる (表 S4)。代わりに、*Streptoalloteichus hindustanus* (WP\_073483148, E = 1e-103)、*Phototrhabdus laumondii* (WP\_113024414, E = 3e-97) および *Erwinia toletana* (WP\_017800138, 2e-95) の N6-シトシン\_N4-アデニン部位特異的 DNA メチルトランスフェラーゼと高い類似性スコアを示す。*S.*



*hygroscopicus* subsp. *limoneus* (ABC67279、バリダマイシン生産菌) の Vld0 は、O-メチルトランスフェラーゼであると推定された[69]。アミノ酸配列は、他の rRNA メチルトランスフェラーゼとは完全に異なる (表 S4)。または、*S. corchorusii* (WP\_079082699)、*S. leeuwenhoekii* (CQR66120) および *Amycolatopsis sulfurea* (WP\_098513546) からの推定 O-メチルトランスフェラーゼ YrrMs に類似している。したがって、自己防衛機能として機能するかどうかは疑わしいです。これらのデータを要約すると、薬剤耐性に関与する 16S rRNA メチルトランスフェラーゼの不均一性は、アセチルトランスフェラーゼおよびホスホトランスフェラーゼの不均一性よりも低いと結論付けられる。これらは、アミノ酸配列レベルでの解析結果です。ただし、抗生物質生産菌の耐性遺伝子とヌクレオチド配列レベルでの病原菌の進化的関係を再評価する必要がある。たとえば、CAE46946 (カナマイシン生産菌の Kmr) と AAN87711 (*Citrobacter freundii* のメチルトランスフェラーゼ NbrB) の間でも、類似性値 E はアミノ酸配列レベルで  $9.0e-21$  で、ヌクレオチド配列レベルで 0.79 です。

高レベルの耐性を達成するために、病原菌は順次突然変異により環境適応の小さいが、明確な増加を蓄積する必要がある。このような耐性レベルを達成する前に、細菌細胞は抗生物質に対する防御の第一線として排出ポンプまたは排出トランスポーターを使用する。抗生物質トランスポーターは、小多剤耐性 (SMR) ファミリー、多剤および毒性化合物押出 (MATE) ファミリー、主要ファシリテータースーパーファミリー (MFS)、ATP 結合カセット (ABC) ファミリー、および耐性結節細胞分裂 (RND) ファミリーの 5 つのファミリーに分けられる [90, 91]。これらのトランスポーターは、ネットワークとして機能し、すなわち、複数のトランスポーターが抗生物質および汚染物質のような 1 つの生体異物の排除に関与している [92, 93]。したがって、抗生物質排出トランスポーターは、広い範囲からなる協調膜タンパク質の全体的な解毒システムの一部に過ぎません。これは、アミノグリコシド自己耐性に関与するトランスポーターの多様性に反映される。図 S5 には、アミノグリコシド自己耐性に関与するトランスポーターのアミノ酸配列に基づいて構築された系統樹を示す (表 S1)。系統樹は、クラスター A、クラスター B、クラスター C、クラスター D の 4 つのクラスターに分かれています。クラスター C はさらに、C1、C2、C3、および C4 の 4 つのサブクラスターに分割される。サブクラスター C4 は、16 のメンバーからなるアミノグリコシド関連トランスポーターのほとんどを含む。*S. aureus* の SAV1866 とサブクラスター C4 の 1 つとの類似値 E は、 $4.6e-06$  (*S. hygroscopicus* Hyg28, ABC42565) から  $4.5e-70$  (*S. tenebrarius* AprW, CAF33030) の間である。他のサブクラスターには、*S. glaucescens* GacX、*S. kasugaensis* KasL、*S. kasugaensis* KasM、*S. tenebrarius* TobU などの EamA 様 MFS タンパク質 ABC ペルメアーゼが含まれている。クラスター B は、*S. aureus* の SAV1866 (WP\_124781844) と類似度が低い ABC トランスポーター コンポーネントです (図 S5)。クラスター D には、9 つの MFS メンバーが含まれる。クラスター D 内の 9 つのメンバーとクラスター A 内の 2 つのメンバー (*M. olivasterospora* ForV, CAF31538 と *M. inyonensis* Sis26, ACN38360) は、明確に 2 つのグループに分けられる (図 S6)。グループ A のメンバーは薬物:H<sup>+</sup>アンチポーター14 スパナー (DHA14) または薬物:H<sup>+</sup>アンチポーター12 スパナー (DHA12) 薬物排出ファミリーに属し、グループ B のものはシアネートペルメアーゼ (CP) ファミリーに属する [94]。クラスター A が FHA ドメインを含むタンパク質 (*S. tenjimariensis* SteF24.27c, CAH60152 および *M. inyonensis* Sis27, ACN38361) を含むという事実と共に、生産菌および病原菌におけるアミノグリコシド関連トランスポーターが途方もなく様々なタンパク質で構成されていることを示唆する。アミノグリコシド生産菌と病原菌とのトランスポーター配列類似性は上述した ABC トランスポーターにおいて非常に高いのに対し、MFS メンバー間では非常に低い (図 S5 およ

び図 S6)。したがって、大腸菌 CynX(AAB18065)と図 S6 のグループ B の 1 つのメンバーとの類似値 Es は、アミノ酸配列レベルで 1.5 (*S. tenebrarius* TobT, CAH18551)から 1e+03 以上に及びます。

最近、16S rRNA メチルトランスフェラーゼによるリボソーム標的の変化は、病原菌においてほとんどのアミノグリコシドに対する耐性を付与することが報告された。このタイプの耐性は、以前は臨床的に関連する耐性メカニズムであるとは考えられていなかった[95, 96]。

## 2.2. マクロライドおよび関連抗生物質

マクロライド系抗生物質はまたタンパク質合成阻害剤に属し、マクロ環状ラクトン環の原子数の化学構造に基づいて、12-、14-、15-、16-、および 18 員環メンバー群に分けられる[97, 98]。しかし、14 員環(エリスロマイシン、オレアンドマイシン、ナルボマイシン、その他)および 16 員環(タイロシン、カルボマイシン、スピラマイシン、およびその他)マクロライド系抗生物質は主要な抗菌薬である。マクロライド系抗生物質は、ペプチジルトランスフェラーゼセンター(PTC)に隣接するリボソーム新生ペプチド出口トンネル(PNET)に結合し、タンパク質生合成を防止する。しかしながら、その結合様式は、分子種特異的な方法で個別に制御される[19, 22]。マクロライド系抗生物質は、グラム陽性といくつかのグラム陰性菌の両方に抗菌活性を示す。さらに、*Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella*, および *Coxiella*. に対して活性を示す。また、いくつかのマクロライド系抗生物質はモチリン受容体アゴニストとして機能する[99]。

メチマイシンは、*S. venezuelae* によって生産される 12 員環マクロライド系抗生物質です。メチマイシン生合成遺伝子クラスターはクローニングされ、配列決定された[100, 101]。これは、自己耐性に関与する 2 つの rRNA メチルトランスフェラーゼ (*pikR1* および *pikR2*) と  $\beta$ -グリコシルトランスフェラーゼ (*desR*) の遺伝子を含む。これらの遺伝子はまた、14 員環マクロライド系抗生物質であるピクロマイシンおよびナルボマイシンに対する自己耐性にも関与する。生合成の一部は、これら 3 つの抗生物質で生合成経路を共有しています。興味深いことに、マクロライドグリコシルトランスフェラーゼの存在は、*S. vendargensis* および *S. lividans* のような多数のマクロライド非生産菌においても報告されている[102, 103]。しかしながら、これらのグリコシルトランスフェラーゼの詳細な機能は定義されていない。エリスロマイシンは、14 員環マクロライド群の中で最もよく知られているメンバーであり、*Saccharopolyspora erythraea* から単離された。生合成遺伝子クラスターは *S. erythraea* からクローニングされた[104-106]。23S rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*ermE*, SACE\_0733) は、クラスター内に存在する。加えて、さらに 11 個の rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子がゲノム中に存在する。さらに、2 つの推定マクロライドグリコシルトランスフェラーゼ (SACE\_1884 および SACE\_3599) および数多くの抗生物質の排出タンパク質がクラスターの外に存在する(表 S1)[105]。これらの遺伝子は、自己耐性に関与している。オレアンドマイシンは、*S. antibioticus* から単離された 14 員環マクロライド抗生物質である。グリコシルトランスフェラーゼ (OleD, OleG1, OleG2, および OleI) および ABC トランスポーター (OleB および OleC) は、自己耐性に関与することが提案された[107-110]。上述したように、ピクロマイシンおよびナルボマイシンは、*S. venezuelae* によって生産される 14 員環マクロライド系抗生物質であり、生合成経路および耐性遺伝子の一部はメチマイシンのものと共有する[111]。ランカマイシンは 14 員環マクロライド系抗生物質です。興味深いことに、生合成遺伝子は *S. rochei* の巨大な線形プラスミド pSLA2-L に位置し、ランカシジンの遺伝子と共に、17 員環のカルボ環状ポリケチド化合物

である[112]。2つのABCトランスポーター遺伝子(*lkcI*および*lkcJ*)が生合成遺伝子クラスター内に存在し、別のABCトランスポーター遺伝子(*lkmN*)がクラスター外に存在する。さらに、2つの排出トランスポーター遺伝子(ST1928\_p012 および ST1928\_p024)がクラスターの外部に存在する。これらのトランスポーター(GB No. NC\_004808)は自己耐性に関与している。タイロシンは、獣医用に開発された16員環マクロライド抗生物質である[98]。4つの自己耐性決定因子が定義されている。その中で、3つ(*tlrB*, *tlrD*, および *tlrC*)は生合成遺伝子クラスター内にあり、1つ(*tylA*)はクラスター外に存在する。*tlrA*, *tlrB*, および *tlrD*はrRNAメチルトランスフェラーゼをコードし、*tlrC*は排出タンパク質をコードする[113-116]。スピラマイシン生合成遺伝子クラスターはクローニングされ、配列決定された[117](GB No. CP012382)。2つのABCトランスポーター(*SrmB* および *DrrA*)、2つのrRNAメチルトランスフェラーゼ(*SrmD* および *SrmA*)、および1つのマクロライドグリコシルトランスフェラーゼ(*MgtA/GimA*)が自己耐性に関与している。*mgtA/gimA* 遺伝子は、生合成遺伝子クラスター外の*srmA*(GB No. SAM23877\_5808)の直下流に存在する[118]。カルボマイシンは、もともと*S. halstedii*から単離された16員環マクロライド系抗生物質であり、生合成遺伝子クラスターは*S. thermotolerans*(GB No. KR8. KR88745)からクローニングされた。2つのトランスポーター遺伝子(*carA/cbm25* および *cbm26*)およびrRNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子(*carB/cbm7*)が耐性決定因子として同定された[119, 120]。興味深いことに、*S. thermotolerans*からのCarAのアミノ酸配列は、*S. fradiae*由来のTlrCおよび*S. ambofaciens*からのSrmBと密接に類似している(類似値  $E_s=3.4e-85\sim 1.1e-115$ )。ミシナミシンは、*Micromonospora griseorubida*によって生産されるミシナミシンサブグループを構成する16員環マクロライドである。生合成遺伝子クラスターはクローニングされた[121](GB No. AB089954)。MyrBはrRNAメチルトランスフェラーゼで、自己耐性に関与することが報告された[122]。ティアクミシンBは、*Dactylosporangium aurantiacum*によって生産される18員環マクロライドです。遺伝子クラスターはクローニングされ、4つのトランスポーター遺伝子がクラスター内に報告された[123](GB No. HQ011923)。

リンコマイシンは、アミノ酸と糖からなるリンコサミド群の抗生物質メンバーで、タンパク質合成阻害剤である[124, 125]。3つの耐性関連遺伝子、*lmrA*および*lmrC*コード排出ポンプおよび*lmrB*コードrRNAメチルトランスフェラーゼは、生合成遺伝子クラスター内で同定された[126-128]。リンコサミド耐性決定因子*clr*、23S rRNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子は、セレスティセチン生産菌である*S. caelestis*からも単離された[129]。ホルマオマイシンは、*S. griseoflavus*により生産される狭スペクトル抗生物質活性を有する細菌シグナル伝達代謝産物である。ピロロベンゾジアゼピン誘導体トマイマイシン、アンスラマイシンおよびシベロマイシンは、配列選択的DNAアルキル化剤である。リンコマイシン、ホルマオマイシン、トマイマイシン、アントラマイシンおよびシベロマイシンは、共通中間体(3-ビニル-2, 3-ピロリン-5-カルボン酸)に由来することが知られており、類似の生合成遺伝子クラスターを構成する[130]。*S. griseoflavus*のホルマオマイシンの生合成遺伝子クラスターには、*hrmU*および*hrmV*の2つのトランスポーター遺伝子が含まれている[131]。トマイマイシン生合成遺伝子クラスターは26kb DNAフラグメントとしてクローニングされ、1つのトランスポーター遺伝子*tomM*がクラスター内で同定された[132](GB No. FJ768957)。アンスラマイシンの生合成遺伝子クラスターはクローニングされ、配列決定された。隣接する遺伝子*orf9*および*orf10*は、トランスポーターをコードすると提案された。Orf8のUvrAおよびDrrCとのアミノ酸配列の類似性から、耐性におけるトランスポーターまたは切除ヌクレオチド修復システムとしての役割が示唆される[133](GB 番号 EU195114)。シベロマイシン生合

成遺伝子クラスターは 32.7kb DNA フラグメントとしてクローニングされた。1つのトランスポーター遺伝子 *sibF* がクラスター内で同定された[134] (GB No. FJ768674)。

ストレプトグラミン/プリスティナマイシンは、2つの化学的に異なる化合物の混合物で構成される抗生物質ファミリーである: グループ A ストレプトグラミン/プリスティナマイシン II は、多飽和マクロラクトンからなり、グループ B ストレプトグラミン/プリスティナマイシン I は環状ヘキサデブシペプチドからなる。グループ A およびグループ B ストレプトグラミンはいずれもタンパク質生合成阻害剤であり、相乗的に機能して抗菌活性を大幅に高める。プリスティナマイシン I およびプリスティナマイシン II 生合成遺伝子クラスターは、90kb の潜在的二次代謝産物クラスターの挿入により 2つのセグメントに分散した 210kb DNA フラグメントとしてクローニングされた[135]。2つのトランスポーター耐性遺伝子、*snbR* および *ptr* が同定され、1つはクラスター内、他はクラスター外に存在した[136]。バージニアマイシン M およびバージニアマイシン S は、それぞれグループ A およびグループ B ストレプトグラミンファミリーに属する。生合成遺伝子クラスターの一部をクローニングした[137]。クラスター内には3つのトランスポーター遺伝子が存在する。また、バージニアマイシン M は、*S. virginiae* において非活性誘導体に立体化学特異的に還元されることが報告された[138]。グリセオビリジンおよびビリドグリゼイン/エタマイシンは、それぞれ *S. griseoviridis* によって生産されるグループ A およびグループ B ストレプトグラミン系抗生物質に属する。生合成遺伝子クラスター内に3つのトランスポーター遺伝子 (*sgvT1*, *sgvT2*, および *sgvT3*) が見つかります[139] (JX508597)。エバーニマイシンおよびアビラマイシンは、タンパク質生合成を阻害するオルソソマイシン群抗生物質である。しかし、オルソソマイシンと大腸菌リボソーム複合体のクライオ電子顕微鏡解析は、大きなサブユニット上の結合部位がマクロライドやチオストレプトンなどの他の抗生物質とは異なっていることを明らかにした[140]。エバーニマイシンの生合成遺伝子クラスターをクローニングした。2つの 23S rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*evrH* および *orf6*) と 2つの排出ポンプ遺伝子 (*evrE* および *evbB*) がクラスター内で同定された[141]。これらは、自己耐性に関与している可能性がある。アビラマイシン生合成遺伝子クラスターは、*S. viridochromogenes* から 60kb フラグメントとしてクローニングされた。2つの rRNA メチルトランスフェラーゼ (*AviRa* および *AviRb*) と 2つの抗生物質トランスポーター (*AviABC1* および *AviABC2*) が明らかにされた[142] (GB No. AF333038)。バイオマイシンおよびカプレオマイシンは、多剤耐性結核の治療に使用されるツベラクチノマイシン系抗生物質である。それらは mRNA-tRNA 複合体の転位を遮断することによって細菌タンパク質生合成を阻害する。バイオマイシンの生合成遺伝子クラスターをクローニングした。バイオマイシンホスホトランスフェラーゼ (*Vph*) およびパルメアーゼ (*VioE*) は、自己耐性に関与することが推定される[143] (GB No. AY263398)。カプレオマイシン生合成遺伝子クラスターをクローニングした。クラスター内で、rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*cmnU*) およびカプレオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (*cph*) が検出された[144] (EF472579)。また、カプレオマイシンアセチルトランスフェラーゼ (*Cac*) は、自己耐性に関与することが提案された[145]。

要約すると、アミノグリコシドの場合とは対照的に生産菌におけるマクロライドおよび関連する抗生物質に対する主要な耐性メカニズムは、薬物の排出および rRNA のメチル化である。上述したように、トランスポーター/排出ポンプの使用は、細胞が様々な防御の他のツールを活性化する前に抗生物質の細胞内レベルを減少させることによる抗生物質に対する第一線の防御である[146]。これは病原菌だけでなく抗生物質生産菌にも当てはまるので、薬物トランスポーター/排出

ポンプの遺伝子は、マクロライド系抗生物質メチマイシンおよびミシナミシンの生合成遺伝子クラスター内で検出されないが、ゲノムにはトランスポーター/排出ポンプをコードする遺伝子が多い。これらのトランスポーター/排出ポンプは、生産菌の第一線の防御に関与している。一方、いくつかの問題がある。メチマイシン生産菌におけるグリコシルトランスフェラーゼ (DesR) [101]、オレアンドマイシン生産菌におけるグリコシルトランスフェラーゼ (OleG1, OleG2) [109, 110]、バイオマイシン生産菌におけるホスホトランスフェラーゼ (Vph) [143]、カプレオマイシン生産菌におけるホスホトランスフェラーゼ (Cph) とアセチルトランスフェラーゼ (Cac) [144, 145] などの耐性関連タンパク質の実際の役割は何か? Cac はアミノ酸配列が放線菌由来の多くのアミノトランスフェラーゼと非常に類似しているため、アミノトランスフェラーゼであると考えられている。rRNA メチルトランスフェラーゼはどのようにして抗生物質生産菌の耐性ツールとなったのか? これらの耐性関連タンパク質はどのように進化したのか? Blast 解析は DesR のアミノ酸配列は、様々な *Streptomyces* 種からのグリコシルトランスフェラーゼだけでなく、*Schizosaccharomyces pombe* (NP\_595060, E 値=6e-78) からのグリコシルヒドロラーゼ、シロイロナズナの  $\beta$ -キシロシダーゼ (NP\_196535, E 値 = 1e-38) にも類似していること; Vph のアミノ酸配列は、様々な種からのバイオマイシンホスホトランスフェラーゼだけでなく、*Seinonella peptonophila* および他の Firmicutes 細菌からのアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (WP\_073150348, E 値=8e-24) にも類似していること; Cac のアミノ酸配列は、様々な放線菌のアミノトランスフェラーゼだけでなく、*Microcystis aeruginosa* (WP\_002796790, E 値=2e-19) および他の細菌および植物からの SufS ファミリーシステインデスルフラゼにも類似していることを明らかにした。類似の機能性タンパク質がゲノムの GC 含量の大きな違いに関係なく、広範囲の門/生物圏に分布するという事実と共に、(例えば、Erm 様タンパク質は *Yuhushiella deserti* (GB No. SF087742, E 値=3e-130) ならびに *Homo sapiens* (GB No. NP\_001335005, E 値=4e-19) に存在する)、これらの結果は抗生物質生産菌が生合成遺伝子内にたまたま獲得した関連遺伝子から耐性系を進化させたことを示唆している。これは、ゲノムにおける GC 含量の高い障壁を克服することによって、生命の長い進化の歴史の中で起こってきたことである [147]。

一方、病原菌におけるマクロライドおよび関連抗生物質に対する耐性メカニズムは、23S rRNA の変異および修飾、マクロライド排出系、ホスホトランスフェラーゼおよびエステラーゼによるマクロライド不活性化などに分けられる。マクロライドは主に 23S rRNA の A2058 および A2059 と相互作用し、これらのヌクレオチドの変異は *Mycobacterium* および *Helicobacter* など多くのマクロライド耐性病原菌に見出されている。G2057 および C2611 の突然変異、時には A2058 または A2059 と組み合わせて、*Streptococcus* および *Staphylococcus* で検出された。また、リボソーム-マクロライド複合体 [148] においてマクロライドに接触するリボソームタンパク質 L4 および L22 をコードする遺伝子における変異は、様々な病原菌にマクロライド耐性を付与する [149]。このタイプの変異は、アミノ酸交換だけでなく、欠失および挿入も含まれる。これらのタイプの耐性メカニズムは、マクロライド関連の抗生物質生産菌では観察されていない。第二のタイプの耐性メカニズムは、*erm* 遺伝子によってコードされる rRNA メチルトランスフェラーゼによる rRNA 修飾である。*erm* 遺伝子は、rRNA のペプチド出口トンネルに位置する A2058 をメチル化するメチルトランスフェラーゼをコードする。このタイプの耐性メカニズムは、14-, 15-, および 16 員環マクロライドおよびケトライド、ならびにリンコサミドおよびストレプトグラミン B に対する耐性を付与する。現在、40 以上の *erm* 遺伝子が報告されている [149]。興味深いことに、*Streptococcus pneumoniae*

における Erm のアミノ酸配列(GB No. BBG37057)は、*S. thermotolerans* の CarB(GB No. AAC32026、E 値=1.8e-14)および *S. venezuelae* の PikR2(GB No. AAC69327、E 値= 1.1e-19)および他のマクロライド生産菌におけるメチルトランスフェラーゼと非常によく似ている。第三のタイプの耐性メカニズムは、*mef*、*msr/mel* および *lsa* 遺伝子によりコードされるマクロライド排出システムに関連している。ヌクレオチド配列レベルの E 値はそれぞれ 0.05(*erm/carB*)、および 3.8e-3(*erm/pikR2*)である。高レベルのマクロライド排出には *mef* と *msr* の共発現が必要であり、これらのタンパク質は相乗的に相互作用してマクロライド耐性を高める。これらのタンパク質が複合排出ポンプを形成することが報告されたが[150]、詳細なメカニズムは明らかにされていない。*S. aureus* の Msr(GB No. WP\_053875754)のアミノ酸配列は *S. hygroscopicus* の Hyg28(E 値=8.9e-30)のアミノ酸配列と類似しているが、*S. pneumoniae* における MefS のアミノ酸配列は解析したマクロライドの生産菌のどの配列にも類似していない。生産菌の生合成遺伝子クラスター外のいくつかの他のトランスポーターは、病原菌のものと類似している可能性がある。第四の耐性メカニズムは、それぞれ *mph* 遺伝子と *ere* 遺伝子によってコードされるホスホエステラーゼとエステラーゼによるマクロライド不活性化である。マクロライドホスホトランスフェラーゼは、グラム陽性およびグラム陰性菌に広く普及しているマクロライド不活性化酵素であり、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼおよびタンパク質キナーゼと同じファミリーに属する[151]。マクロライドホスホトランスフェラーゼは、多種多様なマクロライド系抗生物質に対する耐性を付与する。しかし、詳細は明らかにされていない[152]。マクロライドの抗菌活性を阻害するマクロライドエステラーゼについては、5つのファミリーが報告されている[152]。これらの酵素はもともと多様であると考えられているが、病原菌に対するマクロライド耐性を提供する[153]。このタイプの耐性は、マクロライド生産菌では報告されていない。要約すると、病原菌における rRNA メチルトランスフェラーゼおよびホスホトランスフェラーゼはマクロライド生産菌のそれらに密接に関連しているのに対し、rRNA 変異と排出ポンプは互いにほとんど関連していない。これらの耐性特性は、他の起源から転移された可能性がある。

### 2.3. テトラサイクリンとクロラムフェニコール

テトラサイクリンは、1940年代以来、グラム陽性およびグラム陰性菌感染症の多種多様な治療や動物飼料および養殖に使用されてきた。現在、第三および第四世代の化合物により、この薬物クラスの臨床見通しを若返らせている。テトラサイクリンは、16S rRNA に結合することにより細菌タンパク質生合成を阻害し、tRNA の A 部位への輸送を防止する[19, 23]。テトラサイクリンがマトリックスメタロプロテイナーゼを阻害するとして、心血管疾患の治療の可能性も報告された[154]。オキシテトラサイクリン生合成遺伝子クラスターをクローニングした[155, 156]。合計 21 個の ORF が、それぞれリボソーム保護タンパク質(RPP)[157]とトランスポーター [158] をコードする 2 つの耐性遺伝子 *otrA* と *otrB* の間にクラスターを形成する。クロラムフェニコール生合成遺伝子クラスターは *Kitasatospora aureofaciens* からクローニングされた[159, 160](HM627755)。クラスター内では、1つのリボソーム保護タンパク質遺伝子(*ctcC*)と3つのトランスポーター遺伝子(*ctcR*、*ctcY*および *ctc2*)が検出される。最近、Forsberg らは土壌の機能的メタゲノム選択により新規のテトラサイクリン不活性化酵素ファミリーを報告したが、病原菌の薬剤耐性における正確な機能は明らかではない[161]。

クロラムフェニコールは、*S. venezuelae* および他の *Streptomyces* 種によって生産される抗生物質である。細菌のリボソームの 50S サブユニットと相互作用し、A 部位でアミノアシル tRNA の結合を遮断することによりタンパク質合成を阻害し、グラム陽性およびグラム陰性菌感染の治療に使用される。しかし、骨髄抑制、吐き気や下痢などの副作用は、その一般的な使用を妨げる。クロラムフェニコール生合成遺伝子クラスターをクローニングし、配列決定した [162, 163] (NC\_018750)。MFS 排出ポンプ (*cmIF*, SVEN\_RS04435) の 1 つの遺伝子がクラスター内に存在し、MFS トランスポーターの別の遺伝子 (*cmIV*, SVEN\_RS20160) がクラスター外に存在する。興味深いことに、クロラムフェニコールホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (*cpt*, SVEN\_RS20155) は、*cmIV* に隣接して存在する。アセチルクロラムフェニコールは、クロラムフェニコール生合成において中間体であることが提案されたが [164]、自己耐性におけるクロラムフェニコールのアセチル化の正確な役割は解明されていない。クロラムフェニコールヒドロラーゼはまた、自己耐性に関与することが提案された [165]。

病原菌におけるテトラサイクリンに対する耐性については、少なくとも 4 つのメカニズム、すなわち、結合部位の変異、リボソーム保護タンパク質、排出ポンプ、および酵素的不活性化が報告されている [166, 167]。ほとんどの細菌は複数の rRNA コピーを有するため、テトラサイクリン耐性を与える rRNA の変異は、通常、*Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma bovis*, および *S. pneumoniae* などの rRNA コピー数の低い細菌に見られる。例えば、16S RNA の C1054T および T1062G/A における変異を有する *S. pneumoniae* は、16S rRNA の 4 つのゲノムコピーが変異した場合にチゲサイクリンに対して耐性である。30S リボソームサブユニットタンパク質 S10 をコードする *rpsJ* の変異は、*S. pneumoniae* におけるテトラサイクリンに対する耐性を付与することも報告されている [168]。*rpsJ* における変異は、グラム陰性菌の様々な臨床分離株で記載されている。さらに、同じ著者は、*S. pneumoniae* におけるテトラサイクリン耐性をもたらす 16S rRNA メチルトランスフェラーゼをコードする *spr1784* におけるナンセンス変異について記述した [168]。テトラサイクリンリボソーム保護タンパク質 (RPP) は、EF-G および EF-Tu の伸長因子に有意な配列および構造的類似性を持つ GTP アーゼである。これらはグラム陽性とグラム陰性菌の両方で見つかる。最も一般的な RPP は TetO と TetM です。テトラサイクリン生産菌 *S. rimosus* からの OtrA (GB No. ALS03934) と *E. faecalis* の TetM (GB No. CAA63530)、*Campylobacter jejuni* の TetO (AAA23033) は、アミノ酸配列レベルでの類似性はそれぞれ  $5e-79$  および  $2.2e-80$  であり、ヌクレオチド配列レベルで  $2.1e-38$  と  $3.7e-47$  であり、これらのタンパク質が互いに密接に関連していることを示す。TetM や TetO のような RPP はテトラサイクリンの生産菌に由来すると考えられている。最も一般的なテトラサイクリン特異的排出ポンプは、主要なファシリテータースーパーファミリー (MFS) トランスポーターのメンバーです。それらは 7 つのグループに分類される。TetA および TetB のようなグループ 1 ポンプは 12 個の膜間区分を有し、主にグラム陰性菌に分布する。TetK および TetL のようなグループ 2 ポンプは 14 個の膜間区分を含み、グラム陽性菌に主に存在する [91]。グラム陽性菌由来の TetK および TetL のアミノ酸配列は、テトラサイクリン生産菌からの OtrB、CtcR、および Ctc2 のアミノ酸配列と何らかの配列類似性を持ち、類似値 Es は  $1e-05 \sim 1e-09$  の範囲内であることを示す。テトラサイクリンを不活性化することができる酵素は、他の抗生物質を不活性化する酵素と比較されるのは希です。3 種の酵素がテトラサイクリン不活性化に関与することが知られている: *tetX* ファミリー遺伝子によってコードされるフラビン依存性モノオキシゲナーゼ、NADP を必要とするテトラサイクリン修飾酵素、およびキサンチン-グアニ

ンホスホリボシルトランスフェラーゼです[161]。これらの酵素は、テトラサイクリン生産菌では記載されていないが、近い将来臨床分野で普及の可能性を持つ。

病原菌におけるクロラムフェニコールに対する耐性メカニズムは、クロラムフェニコールの酵素修飾、排出ポンプ、および標的修飾によるものである。*Streptomyces acrimycini*からのアセチルトランスフェラーゼ(GB No. CAT\_STRAC)のアミノ酸配列は、*Haemophilus influenzae* (GB No. CAA37806, E=9.5e-40)、*Shigella flexneri* プラスミド(GB No. CAA30695, E=3e-40)、および *S. aureus* プラスミド(GB No. CAA26367, E = 2.3e-35) のアミノ酸配列と非常によく似ている。しかし、アセチルクロラムフェニコールはクロラムフェニコール生産菌 *S. venezuelae* で検出されたが、この種のアセチルトランスフェラーゼの遺伝子がクロラムフェニコールを生産する *Streptomyces* 種に存在するかどうかは明らかではない[164]。クロラムフェニコールホスホトランスフェラーゼは、クロラムフェニコールを生産する *S. venezuelae* で検出されるのに対し、このタイプのホスホトランスフェラーゼは病原性細菌では報告されていない。同様に、クロラムフェニコールヒドロラーゼ遺伝子は、クロラムフェニコール生産菌 *S. venezuelae* に見出されるが、病原性細菌には見出されない[169]。クロラムフェニコール耐性に関連して、多数の排出ポンプが報告されている[24]。クロラムフェニコール生産菌 *S. venezuelae* からの Cm1V(GB No. AAB36568)のアミノ酸配列は、*Corynebacterium striatum* プラスミド由来の CmxB (GB No. AAG03380, E=1.4e-23)、および *Staphylococcus lentus* プラスミドからの FexA(GB No. CAD70268, E = 9.6e-02) に類似しているが、*Salmonella typhimurium* プラスミドからの Cm1A (GB No. CAD31707, E= 2.2) および大腸菌プラスミドからの Cm1(GB No. AAA26079, E = 4.3e+02)には類似していない。一方、23S RNA のドメイン V 中の A2503 を標的とする rRNA メチルトランスフェラーゼをコードする *cfr* 遺伝子は、*S. aureus* および他のグラム陽性菌中の多数のプラスミド上で同定されている。さらに、*cfr* 遺伝子は染色体 DNA またはいくつかのグラム陰性菌のプラスミドにも見出された[170]。このタイプの rRNA メチルトランスフェラーゼ仲介クロラムフェニコール耐性は、クロラムフェニコール生産菌 *S. venezuelae* では記載されていない。

## 2.4. その他のタンパク質合成阻害剤

キロマイシンは、*S. collinus*, *S. ramocissimus*, *S. cinnamoneus*, および *Nocardia lactamdurans* によって生産される複雑な直鎖状ポリケチドペプチド結合した糖状構成分子である。キロマイシン生産菌の中で、*S. collinus* Tue365 と *S. ramocissimus* は、キロマイシン生産期間中でもキロマイシン感受性伸長因子を発現し、一方、*S. cinnamoneus* および *N. lactamdurans* は、キロマイシン耐性伸長因子をコードする[171, 172]。キロマイシン非生産菌、*S. coelicolor* A3(2)からの EF-Tu3 もまた、キロマイシンに耐性である[172]。キロマイシン生合成遺伝子クラスターを57個のORFを含む130kb DNA フラグメントとして単離した。2つのMFSタイプトランスポーターがクラスター内で検出される[173, 174] (GB No. AM. AM746336)。キロマイシンは、*Streptococci*, いくつかの *Enterococci*, *Neisseria*, および *Haemophilus* に対して強い抗菌活性を示すが、*S. aureus* には抗菌活性を示さない。キロマイシンの狭い抗生物質スペクトルは、細菌におけるEF-Tusの高度な構造差によって説明される[175, 176]。キロマイシンの役割は病原菌では明らかにされていない。

ビシクロマイシンは2,5-ジケトピペラジン誘導体であり、転写終了因子 Rho の選択的阻害剤である。これは、*S. cinnamoneus* から単離され、グラム陰性菌に対し広いスペクトルの抗生物質活性



を示す。生合成遺伝子クラスターは *S. cinnamomeus* からクローニングされたが、推定ビシクロマイシン遺伝子クラスターは、少なくとも7つの放線菌とプロテオバクテリアに結合している。MFS型トランスポーター遺伝子 *bcmT* は、クラスター内に存在する [177, 178]。世界的流行の *P. aeruginosa* クローンにおいて、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子およびビシクロマイシン耐性遺伝子 *bcrI* を保持する統合および接合要素が報告された [179]。 *bcrI* は、ビシクロマイシンの排出ポンプをコードする [180]。

チオストレプトンは、50年以上前に *S. azureus* から単離されたチオペプチド群抗生物質である。このタイプの抗生物質は、リボソームまたはリボソーム関連因子を標的とすることによってタンパク質合成を阻害する。それらは臨床的に関連するメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA)、*E. faecium* (MREF)、ペニシリン耐性 *S. pneumoniae* (PRSP) およびバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に対して活性を示す。しかし、溶解性と毒性が悪いため、臨床的に限定的にしか適用されていない。チオストレプトンおよび関連抗生物質 GE2270 およびチオムラシンの生合成遺伝子クラスターは、それぞれ *S. laurentii* および *Nonomuraea* からクローニングされた [181, 182] (GB Nos. FJ652572; FJ461359; FJ461360)。 *S. laurentii* のチオストレプトンに自己耐性を付与する rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子は生合成遺伝子クラスターに存在せず、代わりにリボソームタンパク質オペロンのクラスター内に位置する [183]。自然チオストレプトン耐性変異体は、*Thermus thermophilus* から単離された。突然変異は、23S rRNA の L11 結合部位で見出された [184]。マイクロシン P1 は、チオストレプトンのような 26 員環マクロサイクルを有するチオペプチド群抗生物質である。マイクロシン P1 生合成遺伝子クラスターを *S. epidermidis* から単離し、*B. cereus* からのチオシリンと比較した [185-187]。マイクロシン P1 のクラスターには、L11 の代わりにリボソームに組み込まれ、マイクロシン P1 に対する自己耐性を付与する Tc1Q タンパク質をコードする *tclQ* 遺伝子が含まれている [185]。チオシリンのクラスターには、自己耐性に関与する可能性のある2つの L11 様タンパク質 Tc1Q および Tc1T が含まれている [187]。この種の抗生物質の耐性メカニズムは、一般的に生産菌と病原菌の間で類似しているが、詳細はまだ解明されていない。

### 3. 細胞壁-細胞膜合成阻害剤

#### 3.1. β-ラクタム

半合成ペニシリンおよびセファロスポリンを含むβ-ラクタム系抗生物質はほぼ一世紀にわたり使用されてきたが、グラム陽性およびグラム陰性菌感染症の治療のために現在でも臨床で最も一般的に使用される抗生物質である。β-ラクタム系抗生物質は、その化学構造に応じて5つのグループに分類される: ペニシリン, セファロスポリン/セファマイシン, クラブラン酸, チエナマイシン, ノカルディシン A とスルファゼシン。ペニシリンはフレミングによって1929年に単離された最初の抗生物質で [188]、1940年にChainら [189]により、1941年にアブラハムら [190]によって再発見された。ペニシリンおよびセファロスポリン/セファマイシンは真菌と細菌によって生産されるのに対し、他のβ-ラクタム系抗生物質は細菌によって生産される [191-193]。ペニシリン/セファロスポリン/セファマイシンの生合成遺伝子クラスターは、*Streptomyces clavuligerus* [194, 195] (GB No. CM000913, SCLAV\_4179 ~ SCLAV\_4214), *S. cattleya* [196] (GB No. NC\_016111, SCAT\_5676~SCAT\_5692), *Nocardia lactamdurans* [197, 198], *Lysobacter lactamgenus* [199] (GB No. X56660), *Penicillium chrysogenum* [200] (GB No. CM002799, EN45\_082610~EN45\_082630)、お

よび *Aspergillus (Emericella) nidulans* [201] からクローニングされた。興味深いことに、細菌の自己耐性に関与するペニシリン結合タンパク質および $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子は、これらのクラスター内に存在するのに対し、真菌の遺伝子には存在せず、ペニシリン結合タンパク質および $\beta$ -ラクタマーゼ特に前者は自己耐性に関与していることが強く示唆される[5]。クラブラン酸は、抗菌活性を有する病原菌由来の各種 $\beta$ -ラクタマーゼの強力な阻害剤であり、*S. clavuligerus* から単離された[204, 205]。 $\beta$ -ラクタム系抗生物質と組み合わせて使用されている[206]。クラブラン酸生合成遺伝子クラスターは、セファマイシン遺伝子クラスターとペニシリン結合タンパク質と $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の間に位置する[195, 207, 208]。*S. clavuligerus* およびクラブラン酸非生産菌である *S. cattleya* におけるセファマイシンの生合成遺伝子クラスターの比較は、ペニシリン結合タンパク質および $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の存在に影響を与えることなく、クラブラン酸遺伝子クラスターがセファマイシン遺伝子クラスターとペニシリン結合タンパク質/ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の間に挿入されていることを示しており、ペニシリン結合タンパク質/ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子は、ペニシリン結合タンパク質および $\beta$ -ラクタマーゼが生産菌においてクラブラン酸ではなくセファマイシンからの保護において重要な役割を果たすことを示唆する[209]。しかしながら、クラブラン酸生合成におけるペニシリン結合タンパク質および $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の正確な役割は、解明されていない[210]。

チエナマイシンは、グラム陰性、グラム陽性、および嫌気性細菌に対し抗菌活性を示す。しかし、残念ながら、水溶液が極めて不安定である[211]。その結果、チエナマイシンを前駆体天然物として用い、広範囲の抗菌活性を有するイミペネム、メロペネム等の様々なカルバペネム化合物が化合合成され、臨床に導入された[212]。チエナマイシンの生合成遺伝子クラスターは、*S. cattleya* のプラスミド上に位置している[213, 214] (GB No. AJ421798)。N-アセチルトランスフェラーゼ、トランスポータータンパク質および $\beta$ -ラクタマーゼをそれぞれコードする3つの遺伝子 *thnF*, *thnJ*, および *thnS* は、自己耐性に関与している[213]。また、*thnC* がコードする排出ポンプは、耐性に関与している。他の $\beta$ -ラクタム系抗生物質と同様に、チエナマイシンは大腸菌のペニシリン結合タンパク質(PBP)、特にPBP2に結合するが[215]、PBPの遺伝子はチエナマイシン生合成遺伝子クラスター内では検出できない。あるいは、上述したように、2つのPBP遺伝子がセファマイシン生合成遺伝子クラスター内に存在する。ノカルディンAは、単環系 $\beta$ -ラクタム抗生物質モノバクタムであり、*Nocardia uniformis* および他の放線菌から単離された[216]。グラム陰性菌に対して適度な抗菌活性を示し、 $\beta$ -ラクタマーゼ耐性を示す[217]。モノバクタム系抗生物質は、後に臨床的に重要なアズトレオナムに開発された。ノカルディンAの生合成遺伝子クラスターをクローニングした[218] (GB No. AY541063)。アセチルトランスフェラーゼ(NocD)およびトランスポータータンパク質(NocH)が自己耐性に関与することが提案された。別のモノバクタム系抗生物質スルファゼシンを *Pseudomonas acidophila* から単離した。グラム陰性菌に対して活性であり[219]、細菌を拡張スペクトル $\beta$ -ラクタム系抗生物質に耐性化するメタロ $\beta$ -ラクタマーゼによって不活性化されない。遺伝子クラスターには、いくつかのトランスポーター遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、および自己耐性に関与する多剤トランスポーター遺伝子 *mdtB* が含まれている[220] (GB No. KX757706)。しかし、 $\beta$ -ラクタマーゼの正確な役割は明らかになっていない。

病原性細菌において、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対するグラム陽性菌の主要な耐性メカニズムは、グラム陰性菌のそれとは異なる。グラム陽性菌の主なメカニズムは、標的であるペニシリン結合タンパク質(PBP)の突然変異に起因するのに対し、グラム陰性菌では $\beta$ -ラクタマーゼの発現によっ

て引き起こされる[221, 222]。グラム陽性菌のメカニズムは、グラム陽性菌であるβ-ラクタム生産菌に類似している[223]。グラム陽性菌の中でも、*S. pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, および *S. aureus* は臨床的に重要であり、β-ラクタム標的病原性細菌である。*S. pneumoniae* は、そのペプチドグリカン構築のため6つのPBPを含む。3つのPBP(PBP1a, PBP1b および PBP2a)は、二機能性クラス A PBP であり、トランスグリコシダーゼおよびトランスペプチダーゼ活性の両方を有し、2つのPBP(PBP2b および PBP2x)はクラス B トランスペプチダーゼであり、第6のPBP(PBP3)はクラス C の DD-カルボキシペプチダーゼである。*S. pneumoniae* によるβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性は、2つの主要なβ-ラクタム標的酵素、PBP2b および/または PBP2x、および相補 PBP1a の広範かつ相補的なモザイク変異の結果である[224, 225]。さらに、単一ヌクレオチド多型は、ペプチドグリカン合成経路を含む一連の経路に関連した肺炎球菌遺伝子内のβ-ラクタム耐性にも関連している[226]。興味深いことに、多くの細菌病原菌と異なり、*S. pneumoniae* においてメタロβ-ラクタマーゼスーパーファミリーに属する4つの酵素(GB Nos. NP\_357719, NP\_358132, NP\_359083, および NP\_358185) 遺伝子とそのゲノムで検出されるが、β-ラクタマーゼの発現は報告されていない。NP\_358185 は RNase Z/アシルスルファターゼであり、NP\_359083 はグリオキシラーゼ II に関連し、NP\_358132 と NP\_357719 は *B. cereus* (GB No. AA22276 および AAA22562) と *Bacteroides fragilis*(GB. No. A222262) のメタロβ-ラクタマーゼと遠く離れた関係にある。

腸球菌は、回腸、口腔および外陰部および通常無症候性部位から単離された常駐細菌叢である。しかし、最近、多剤耐性 *E. faecium* が人の健康に対する大きな脅威として浮上した。β-ラクタムに対する多剤耐性 *E. faecium* の主なメカニズムは、*S. pneumoniae* PBP2b および PBP2x および *S. aureus* PBP2a のようなクラス B PBP に属する PBP5 の変異および過剰発現である。変異 I499T、E629V、および PBP5 遺伝子への追加の Ser466 の導入、およびこれらの変異の組み合わせは、異なるβ-ラクタムに対するβ-ラクタムの最小阻害濃度(MIC)を増加させる[221]。さらに、D, L-ペプチドグリカントランスペプチダーゼが耐性に関与する。それらは第2のタイプの架橋、3→3 架橋の形成に関与し、古典的な PBP 経路をバイパスする。これらの酵素は、*in vitro* で選択された *E. faecium*、野生型 *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, および *C. difficile* 中で検出される。それらは、活性部位として PBP 内のセリン残基の代わりにシステイン残基を有し、カルバペネム群βラクタムに敏感であるが、アンピシリンおよびセフェム系βラクタムに対して耐性である[228]。

*S. aureus* は、人と共生する、グラム陽性細菌です。2つのメカニズムは *S. aureus* に耐性を与える。第1は、*blaZ* によってコードされる PC1 β-ラクタマーゼの生産であり、β-ラクタム環の加水分解によりβ-ラクタムを不活性化する[229]。*blaZ* は、その血清型および基質特異性に基づいて、A, B, C および D の4つのグループに分類される。*blaZ* は、主にプラスミドに位置している。しかし、β-ラクタマーゼは *S. aureus* の初期耐性メカニズムとして出現したが、現時点では耐性の主役は PBP に置き換えられている。事実上すべてのβ-ラクタム系抗生物質に対して耐性であるメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) も PBP2a をコードする *mecA* 遺伝子を獲得した。*fem* や *aux* などの追加遺伝子がメチシリン耐性に必要であることが同定されている[230]。メチシリン耐性および高レベルのセフトロリン耐性表現型を持つ *S. aureus* の臨床分離株は、トランスペプチダーゼドメインのセファロsporin結合ポケットの Y446N および E447K の2つの連続した置換を持つ PBP2a を持っている[231]。

グラム陽性菌とは対照的に、グラム陰性菌は、内膜と外膜の間に挟まれた薄いペプチドグリカン細胞壁を有する。グラム陰性菌において、β-ラクタムに対する一次耐性メカニズムは、β-ラクタ

マーゼ特にカルバペネムを加水分解するカルバペネマーゼと呼ばれる $\beta$ -ラクタマーゼによる $\beta$ -ラクタム環の分解である。これらの酵素は、様々な特性を有する Ambler クラス A、B、および D に属する。クラス A カルバペネマーゼは、主に *Klebsiella pneumoniae* カルバペネマーゼ (KPC)、*Serratia marcescens* 酵素 (SME)、およびイミペネムカルバペネマーゼ (IMP) で構成されている。クラス B カルバペネマーゼは、メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれ、Verona インテグロンコードメタロ $\beta$ -ラクタマーゼ (VIM)、および New Delhi メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ (NDM) を含む。クラス D 酵素は、カルバペネムを加水分解することができる OXA23、OXA24、OXA48 および OXA58 などの OXA $\beta$ -ラクタマーゼからなる [232]。さらに、これらのカルバペネマーゼは、少なくとも 1 つの他の $\beta$ -ラクタマーゼと一緒に存在し、実質的にすべての $\beta$ -ラクタム系抗生物質を加水分解することができる。さらに、ほとんどのカルバペネマーゼの遺伝子は、転移可能要素に隣接する転移可能なプラスミド上に位置し、異なる環境における異なる種の細菌間の無限の移動と普及を可能にし、時にはグラム陽性とグラム陰性菌の間で交差して伝達する [233]。耐熱性グラム陽性放線菌種である *Thermomonospora curvata* 由来の Tcur2040  $\beta$ -ラクタマーゼのアミノ酸配列 (GB No. WP\_012852391) は、グラム陰性菌の OXA5 (GB No. X58272) および OXA7 (GB No. AAC15074、部分配列) などクラス D  $\beta$ -ラクタマーゼのアミノ酸配列とも密接に関連している [234]。類似性値 E は、アミノ酸配列レベルで  $1.1e-46$  と  $1.8e-43$ 、ヌクレオチド配列レベルで  $1.1e-14$  および  $2.8e-15$  である。その結果、腸内細菌科、*Acinetobacter baumannii*、*P. aeruginosa*、および *K. pneumoniae* などの通常カルバペネムの影響を受けやすい細菌種は、 $\beta$ -ラクタムを加水分解し、ほとんどの $\beta$ -ラクタムに対して高い耐性を有する能力を獲得した。また、大腸菌の AcrB や *P. aeruginosa* の MexB などの RND スーパーファミリーの排出ポンプは、グラム陰性菌で内因性の $\beta$ -ラクタム系抗生物質を含む多剤耐性を生ずる上で重要な役割を果たしていると報告されている [235]。

要約すると、 $\beta$ -ラクタム生産菌における耐性メカニズムは、主に内因性の耐性 PBP によるものである。対照的に、グラム陽性病原性細菌の耐性メカニズムは主に PBP の変異に起因し、グラム陰性菌は $\beta$ -ラクタマーゼの獲得に由来する。興味深いことに、*S. pneumoniae* の PBP2x のアミノ酸配列 (GB No. AFC91889) は、*S. pneumoniae* の PBP1a (GB No. AFC991821) および PBP2b (GB No. AAC95433)、*E. faecium* の PBP5 (GB No. AIG13035)、および *S. aureus* の PBP2a (GB No. AVI00630) より、SC02090、SCATT\_12070、SCLAV\_1301、SSHG\_01149 [223] などのグループ VIII-5 *Streptomyces* PBP により密接に関連している。前者の E 値は  $1e-10$  の位数であるが、後者の場合は  $1e-20$  の位数であり、グループ VIII-5 PBP がグループ VIII-6 PBP 以外に *Streptomyces* における自己耐性に何らかの形で関連していることを示唆している [223]。一方、SME3、IMI3、NMC-A、KPC1、GES2 などのグラム陰性菌におけるクラス A カルバペネマーゼのアミノ酸配列は、SCAB\_38731、SAV\_4452、SACE\_1374、Amir (SMI\_1374) などの放線菌 $\beta$ -ラクタマーゼと密接に関連している (図 S7)。例えば、KPC1 (GB No. AF297554\_1) とこれらの配列との間の E 値は、アミノ酸配列レベルでそれぞれ  $5.9e-35$ 、 $6.1e-34$ 、 $2.8e-40$  および  $4.0e-33$  であり、ヌクレオチドレベルで  $2.0e-28$ 、 $7.6e-31$ 、 $8.3e-43$  である。しかしながら、クラス B カルバペネマーゼと放線菌 $\beta$ -ラクタマーゼとの配列類似性はそれほど高くない。たとえば、IMP1 (GB No. AXQ85786) と Tcur\_2765 と Ppa\_0914 の間の E 値はそれぞれ  $2.2e-08$  と  $3e-07$  である。いずれにせよ、グラム陽性菌 PBP の配列が放線菌 PBP の配列とかなり相同であり、さらに、グラム陰性菌 $\beta$ -ラクタマーゼが放線菌 $\beta$ -ラクタマーゼと類似しているのは非常に驚くべきことである [234]。

### 3.2. グリコペプチド、リポペプチドおよび関連抗生物質

バンコマイシンやテイコプラニンなどのグリコペプチドおよびリポグリコペプチド抗生物質は、リピド II 細菌細胞壁前駆体の D-アラニル-D-アラニン末端に結合し、リピド II 基質を隔離することによりグラム陽性菌に対する抗菌活性を示し、ペプチドグリカン生合成の阻害をもたらす。これら抗生物質は、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) および *Enterococcus* 種によって引き起こされる感染症治療のための最後の手段であると考えられている。しかし、最近、これら抗生物質に対する耐性が出現し、人の健康に対し恐ろしい脅威を与えている [236]。対照的に、グラム陰性菌は、外膜の存在がこれらの分子が標的に到達するのを防ぐため、これらの抗生物質に内因性に耐性である。これらの抗生物質は非リボソーム性ペプチド合成酵素によって生合成される [237, 238]。バンコマイシンの生合成遺伝子クラスターを *Amycolatopsis orientalis* からクローニングした [239] (GB Nos. HE589771 および HQ679900)。ABC トランスポーター (GB No. CCD33134) および VanHAX 耐性カセット遺伝子は、クラスター内およびクラスターの末端に存在する。VanH はピルビン酸を D-乳酸に変換するデヒドロゲナーゼで、VanA は D-Ala-D-Lac リガーゼであり、VanX は残留 D-Ala-D-Ala ジペプチドを切断する D-Ala-D-Ala ジペプチダーゼである。さらに、*vanHAX* 遺伝子は、バンコマイシン関連のグリコペプチド生産菌である *Actinoplanes teichomyceticus* [240] および *Streptomyces toyokaensis* [241] だけでなく、非生産 *Streptomyces coelicolor* (GB No. AL939117, SC03594~SC03596) でも検出可能である。バルヒマイシン、クロロエレモマイシン、テイコプラニン、A47934、コンプレスタチン、A40926、およびペキスコマイシンなどのバンコマイシン関連グリコペプチドまたはリポグリコペプチド抗生物質の生合成遺伝子クラスターもクローニングされた [240-250]。ABC トランスポーターは、これらすべてのクラスターに存在する。しかし、興味深いことに、グリコペプチド系抗生物質 A40926 生産菌 *Nonomuraea* 種は正規の *vanHAX* 遺伝子を持っていないが、代わりに自己耐性およびペプチドグリカン成熟に関与する新規の D、D-ペプチダーゼ/D、D-カルボキシペプチダーゼをコードする *vanY* 遺伝子を有する [248, 249]。VanHAX 酵素と 2 成分調節システム VanSR は、ペプチドグリカン生合成経路の一部をリダイレクトすることにより VRE の耐性および調節メカニズムに関与しているのに対し、*vanSR* 遺伝子はバルヒマイシン生産菌の *vanHAX* クラスターの側面に位置する DNA が欠けており、*vanHAX* 遺伝子は構成的に発現される [251, 252]。したがって、*vanHAX* とその調節系はグリコペプチド抗生物質生産菌および関連する土壌居住性放線菌を取り巻く多様な環境に応じて高度に進化したと推測される [237, 253]。

一方、病原性細菌では 1988 年に最初の VRE が報告され [254]、現在では世界中の病院や環境に広がっている。主な耐性メカニズムは 2 つの原因によるもので、第一は低親和性末端 (D-Ala-D-Lac または D-Ala-D-Ser) によるペプチドグリカン中の標的 D-Ala-D-Ala 残基の置換であり、第二は D-Ala-D-Ala 前駆体の除去である [255]。10 種類のグリコペプチド耐性決定因子が報告されている。その中でも、*VanA* と *VanB* の遺伝子型が世界的に優勢です。*VanA* 型耐性要素はもともと *E. faecium* 臨床分離株のプラスミドで検出され、その流行は腸球菌だけでなく MRSA でも起こっており、現在はこれらの病原性細菌を治療する治療法はほとんどありません。第二のタイプの耐性は、*vanHAX* 遺伝子クラスターに隣接する *VanX* と *VanY* の協調機能によって仲介される。しかし、このタイプの耐性は *VanA* と *VanB* タイプと比較してまれです。腸球菌の耐性遺伝子構成がグリコペプチド生産菌の遺伝子構成と非常によく似ており [256]、さらに、腸球菌におけるこれらのタンパク質のアミノ酸配列は、グリコペプチド生産菌および関連放線菌のものと非常によく似ていることは興味

深い。たとえば、*E. faecium* の VanA (GB No. APC57471) と *A. orientalis* (GB No. CCD33129)、*A. mediterranei* (GB No. WP\_013230018)、*A. balhimycina* (GB No. RSM46375)、*A. teichomyceticus* (GB No. CAE53344)、*S. toyocaensis* (GB No. AAC23582)、*Streptomyces* sp. WAC1420 (GB No. AGF91737)、*S. coelicolor* A3(2) (GB No. NP\_627790)、および *E. faecalis* の VanB (GB No. AKJ75209) と *E. casseliflavus* の VanC (GB No. WP\_12847813) の E 値はそれぞれアミノ酸配列レベルで、 $1.3e-105$ 、 $6.7e-92$ 、 $3.6e-103$ 、 $2.8e-90$ 、 $7.8e-99$ 、 $6.4e-102$ 、 $2.6e-101$ 、 $5.4e-117$ 、および  $1.6e-45$  である。さらに驚くべきことに、腸球菌と放線菌間の GC 含量はかなり異なっているにもかかわらず、ヌクレオチド配列レベルでの配列類似性は非常に高い: 上記のペアの E 値はそれぞれ  $1.9e-107$ 、 $4e-115$ 、 $2.5e-102$ 、 $4.9e-127$ 、 $5.4e-96$ 、 $3.3e-98$ 、 $1.2e-116$ 、 $9e-200$ 、および  $1.8e-24$  である。大腸菌および他のグラム陰性菌は、上述したように外膜による透過性障壁から生じるバンコマイシンに対する内因性の耐性を示す[257]。

モエノマイシン系抗生物質は、*S. ghanaensis* によって生産されるホスホグリコリピドに属し、細菌細胞壁生合成の最後から 2 番目の段階に関与するペプチドグリカングリコシルトランスフェラーゼを阻害する。この抗生物質は数 10 年動物の成長促進剤として使用されているが、モエノマイシンに対する有意な耐性に関する報告はありません。モエノマイシン A 生合成遺伝子クラスターは 2 つの別々のクラスターとしてクローニングされた: 1 つのクラスターは A 環組立てに関与する 3 つの遺伝子を含み、もう 1 つのクラスターはホスホグリコリピドペンタサッカリド骨格の組立てに関与する遺伝子が含まれている [258] (GB No. DQ988994)。4 つのトランスポーター遺伝子がクラスター内に存在します。更に、モエノマイシン非生産菌を含むほとんどの放線菌は、内因性にモエノマイシン A に対して耐性であると報告されている [259]。更に、ゲノムマイニングは、推定モエノマイシン遺伝子クラスターが *S. clavuligerus*、および  $\gamma$ -プロテオバクテリアである *Photorhabdus luminescens* および *P. asymbiotica* に存在することを明らかにした。テイコマイシン A1 は、モエノマイシンに関連するホスホグリコリピド系抗生物質であり、その正確な化学構造はまだ決定されていないが、テイコプラニン生産菌 *A. teichomyceticus* から単離された。生合成遺伝子クラスターを *A. teichomyceticus* からクローニングした [260] (GB No. KU726098)。テイコマイシンおよびモエノマイシン遺伝子クラスターの全体的な構成は全く異なるが、同定された 18 個のテイコマイシン遺伝子のうち 16 個のテイコマイシン遺伝子はモエノマイシン遺伝子クラスターとオルソログである。クラスター内には、自己耐性に関与する 4 つのトランスポーター遺伝子が存在する。

ダプトマイシンは、グラム陽性菌による重篤な感染症の治療に臨床的に使用される *S. roseosporus* によって生産される環状リポデプシペプチドである。ダプトマイシンの効果は、細胞膜の  $Ca^{2+}$  イオンおよびホスファチジルグリセロールと相互作用することによる細菌細胞膜の透過性の変化および脱分極によるものであると報告された [261]。しかし、作用の詳細なメカニズムは理解されていない。生合成遺伝子クラスターを *S. roseosporus* and *Saccharomonospora viridis* からクローニングした [262, 263]。コア生合成領域に隣接して、自己耐性に関与する 2 つのトランスポーターと膜タンパク質遺伝子 (*dptM*, *dptN* および *dptP*; *dptN-sv*, *dptM-sv* および *dptP-sv*) が、それぞれ *S. roseosporus* および *S. viridis* ゲノムに存在する。ダプトマイシン非感受性 *S. aureus* 臨床分離株は、現時点では非常にまれにしか単離されていない。それは、リシルホスファチジルグリセロール合成酵素をコードする *mprF*; ヒスチジンキナーゼセンサーとレギュレータの合成をコードする *yycG/walK*; RNA ポリメラーゼ  $\beta$  および  $\beta'$  サブユニットをコードする *rpoB* および *rpoC*

などの細胞膜恒常性に関与する遺伝子の変異に起因する[264, 265]。宿主防御カチオン性ペプチドに関連するダプトマイシン耐性、カルジオリピン合成酵素変異に関連した耐性、LiaFSR 調節系および YycFGHIJ をコードする遺伝子内の変異に関連した耐性が *S. aureus* および腸球菌の臨床分離株で報告された[266-268]。

フリウリマイシンおよびラスパルトマイシンは、*Actinoplanes friuliensis* および *S. viridochromogenes* から単離された環状リポペプチド系抗生物質であり、MRSA および VRE を含む広いスペクトルのグラム陽性病原性細菌に対して抗菌活性を示す。フリウリマイシン B は細胞壁前駆体サイクルを阻害するが、ラスパルトマイシンの作用の正確なメカニズムは明らかにされていない[269]。フリウリマイシンの生合成遺伝子クラスターを *Actinoplanes friuliensis* からクローニングした[270]。クラスター内には3つのトランスポーター遺伝子が存在する。ラスパルトマイシンの生合成遺伝子クラスターをクローニングし、フリウリマイシンのそれと比較した[271]。クラスター内には3つのトランスポーター遺伝子が存在する。サーファクチンは、*Bacillus* 種により非リボソーム性ペプチド合成酵素(NRPS)によって生合成される環状リポペプチドである。*B. amyloliquefaciens* FZB42 および *B. subtilis* 916 の全ゲノム配列は、そのゲノムがサーファクチン、バシロマイシン D、フェンギシンをコードする3つの NRPS 遺伝子クラスター、およびサーファクチン、バシロマイシン L、フェンギシン、ロシロマイシンをコードする4つの NRPS 遺伝子クラスターを含むことを明らかにした[272-274]。ゲノムには多くのトランスポーター遺伝子が存在する。少なくともそれらのいくつかは、自己耐性に関与する。Tsuge らは、YerP タンパク質が *B. subtilis* におけるサーファクチンに対する自己耐性に関与していることを報告した[275]。アミノ酸配列解析は、YerP が *B. subtilis* 916 における群発運動性タンパク質 SwrC または多剤排出ポンプサブユニット AcrB と推定される K064\_03555 タンパク質に対応していることを示唆する[274]。

### 3.3. ポリエンマクロライド

アンホテリシン B は、ポリエンマクロライド系抗生物質のグループに属し、数10年にわたって医学的に重要な抗真菌抗生物質として使用されている。これは、ステロール主に真菌細胞壁におけるエルゴステロールへの結合を介する真菌細胞壁合成の破壊によって抗生物質活性を発揮し、膜間チャンネルの形成および膜のバリア機能を乱す。しかし、程度は低い哺乳動物細胞膜のコレステロールに結合し、多くの副作用、特に腎毒性を示す[276]。また、細胞内で酸化損傷を誘発し、免疫系に影響を与える[276, 277]。生合成遺伝子クラスターを *S. nodosus* からクローニングした[278]。2つの ABC トランスポーター遺伝子 (*amphG* および *amphH*) がクラスターの末端に検出される。*AmphG* と *AmphH* はヘテロダイマーを形成することによって薬物を排出すると推測される。アンホテリシン B はまた、*Penicillium nalgiovense* Laxa によって生産された[279]。ナイスタチンは *S. noursei* によって生産されるポリエンマクロライド系抗生物質で、表面性真菌症の治療に使用される重要な抗真菌剤である。Dos Santos らは、ナイスタチンの作用メカニズムが、膜ステロールに対する作用に加えて、膜の生物物理特性および脂質組成に依存することを明らかにした[280]。ナイスタチンの生合成遺伝子クラスターを *S. noursei* ATCC11455 からクローニングした[281]。これには、ATP 依存性ナイスタチン排出に関与する可能性のあるクラスター内の2つのトランスポーター遺伝子 *nysG* と *nysH* を含む6つの遺伝子が含まれている。カンディシジンは、いくつかの放線菌から単離された芳香族ポリエンマクロライド系抗生物質である。生合成遺伝子クラスターをクロー

ニングした[282, 283]。それらはクラスターの末端に2つのABCトランスポーター遺伝子を含んでいる。ナタマイシンはピマリシン、テネセチン、ナタシンとも呼ばれ、ポリエンマクロライド系抗生物質であり、局所治療のための薬物療法や食品業界で天然食品防腐剤として広く使用されている。しかし、他のポリエンマクロライド系抗生物質のように、細孔を形成し、形質膜を透過することによって、その抗真菌活性を発揮しません。その代わりに、エルゴステロール依存的な方法で必須な広い範囲の膜トランスポーターを阻害する[284]。生合成遺伝子クラスターを *S. natalensis* および *S. chattanoogensis* からクローニングした[285, 286]。前者では、ABCトランスポーターの2つの遺伝子(*pimA* および *pimB*)と、さらに、クラスター内に排出ポンプの1つの遺伝子(*pimH*)が存在するのに対し、*pimH*は *S. chattanoogensis* のクラスターおよび他のポリエンマクロライド遺伝子クラスターに存在しない[287]。ナタマイシンは抗菌活性を持っていないが、薬物の過剰生産は、生産菌に有害であると考えられている。排出ポンプは、このような状況で機能する。

*Candida glabrata* のいくつかの臨床分離株は、アンホテリシンBおよびナイスタチンに対する感受性の低下を示すが、ポリエンマクロライドは一般的に著しく低い率の抗真菌耐性を示す。耐性分離株は、エルゴステロールの生合成に関与する遺伝子のナンセンスまたはミスセンス変異により、野生型よりも膜内のエルゴステロールの含量が低い。しかし、*Aspergillus terreus* の臨床分離株のエルゴステロールレベルはほぼ同一である。一方、エルゴステロール含量が類似した耐性変異体が細胞壁組成、特に $\beta$ -1,3-グルカン含量を有意に変換することを示すいくつかの報告がある。酸化ストレスへの適応やミトコンドリア活性の低下などの他のメカニズムは、病原性真菌の耐性にも関与する[288, 289]。

#### 3.4. ランチビオティックおよび環状ペプチド

ランチビオティックはバクテリオシンのメンバーであり、ランチオニンなどのチオエーテルアミノ酸を含む異常なアミノ酸を含む、リボソームで合成され、翻訳後修飾ペプチドのグループに属する。それらはある種のグラム陽性菌によって生産され、一般に抗菌濃度で細菌耐性を促進する可能性が低く、低細胞傷害性という望ましい特徴を有する[290-292]。最初のランチビオティックであるニシンは1920年代に発見され、数10年にわたって食品防腐剤として使用されてきた。ランチビオティックは、その化学構造および機能特性に基づいてA型およびB型ペプチドに分類される。A型のランチビオティックは長さが34残基までの細長く、カチオン性ペプチドで、B型ランチビオティックは長さが19残基までの球状ペプチドである。A型ランチビオティックであるニシンは、細胞壁ペプチドブリカンの前駆体であるリポドIIに結合し、複合体を形成し、ペプチドグリカン合成の阻害をもたらす。また、ニシンは、標的細菌から細孔形成およびイオンおよび小分子の放出につながる膜透過性を増加させる[293]。ニシンは、グラム陽性といくつかのグラム陰性菌の両方に抗菌活性を有することが示されている。また、ニシンはマルチセットの宿主免疫細胞に影響を与える[294]。ニシン、サブチリン、スブランシンなどのA型ランチビオティックも、*Bacillus* 種および *Clostridium* 種の胞子の発芽を阻害する。B型ランチビオティックであるメルサシジンは、リポドIIと複合体を形成することによって細胞壁生合成を阻害するが、細胞質膜に細孔を形成しない[295]。ニシンの生合成遺伝子クラスターをクローニングした[296] (GB No. HM219853)。ニシン生合成に必要な11個の遺伝子は、Tn7276の遺伝子クラスター内に位置している。クラスター末端に位置する *nisFEG* は推定トランスポータータンパク質をコードし、クラスター内の *nisI*



は免疫に関与するニシン結合リポタンパク質をコードする。AI 型ランチビオティックであるサブチリンの遺伝子クラスターを、*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 からクローニングした[297]。ニシンと比較して、サブチリン遺伝子クラスターは前駆体プロセッシングに関与する細胞外サブチリン様プロテアーゼをコードする *nisP* に対応する遺伝子を欠いている。クラスター内に位置する 4 つの遺伝子 *spaIFEG* は、免疫に関与する。トランスポーターをコードする *spaT* もクラスター内にある。放線菌 *Microbispora corallina* によって生産されるタイプ AI ランチビオティックであるマイクロビスポリシンは、塩素化トリプトファンおよびジヒドロプロリン残基を含む。広範囲のグラム陽性病原性細菌に対し抗菌活性を示し、リピド II に結合してペプチドグリカン合成を阻害し、正確なメカニズムは明らかにされていないが、大腸菌、*Moraxella catarrhalis*, および *H. influenza* などのグラム陰性菌に対する活性を示す。その生合成遺伝子クラスターをクローニングし、特徴付けた[298] (GB No. HM536998)。4 つのトランスポーター/免疫遺伝子 (*mibT*, *mibU*, *mibE*, *mibF*) がクラスター内で同定される。タイプ AII ランチビオティックであるラクチン 481 はリピド II と複合体を形成し、PBP1b 触媒ペプチドグリカン合成を阻害する[299]。ラクチン 481 に対する生合成遺伝子クラスターをクローニングし、特徴付けた[300]。クラスター内の 4 つの遺伝子 *lctTFEG* は、薬物トランスポーターまたは免疫に関与している。そのうち、少なくとも 3 つの遺伝子 *lctFEG* は、ラクチン 481 に免疫を提供するために必要である。*nisI* に対応する遺伝子がクラスター内で欠落している。タイプ AII バクテリオシンであるサブランシン 168 は、2 つのジスルフィド結合の存在によりこのグループの他のランチビオティックとは異なる[301]。サブランシンの作用機序は、他のランチビオティックと異なる、すなわち、サブランシンは細胞壁合成に影響を与えることなく DNA 複製、転写および翻訳に負の影響を及ぼす[302]。遺伝子クラスターを *B. subtilis* 168 からクローニングした[301]。ABC トランスポーター遺伝子 (*sunT*) および免疫タンパク質遺伝子 (*sunI*) は、クラスター内に位置する。ホスホエノールピルビン酸:糖ホスホトランスフェラーゼ系は、グルコシル化サブランシンに対する感受性に関与する[303]。*S. cinnamoneus* から単離されたシンナマイシンは B 型ランチビオティックに属し、形質膜の内層のホスファチジルエタノールアミンに結合し、膜融合や膜の形態の変化などの膜再編を誘導する[304]。その遺伝子クラスターをクローニングし、特徴付けた[305]。2 成分トランスポーター遺伝子 *cinT* と *cinH* は、クラスターの中央に位置する。もう一つの放線菌アクタガルジンは、4 員環、B 型ランチビオティックである。アクタガルジンはペプチドグリカントランスグリコシラーゼを阻害すると報告されたが、詳細は解明されていない[306]。アクタガルジンの生合成遺伝子クラスターをクローニングし、特徴付けた[307]。2 つのトランスポーター遺伝子 *garH* および *garT* はクラスター内に存在し、3 つの遺伝子 *orf16*, *orf17* および *orf18* はクラスターに隣接して存在する。バクテリオシンであるエンテロシン F4-9 は、ランチビオティックではなく、*Enterococcus faecalis* から単離された O-結合グリコペプチドである[308]。しかし、遺伝子クラスターの構成はサブランシンの構成に類似している[301]。

ニシンは食品業界で自然防腐剤として数 10 年も使用されてきたが、天然のランチビオティック耐性のケースはほとんどありません。しかし、*S. aureus* や *Streptococcus agalactiae* などのヒト病原性細菌は、ニシンなどのランチビオティックに対する固有の耐性を有している。内因性耐性のためのいくつかのメカニズムがある:まず、膜結合プロテアーゼであるニシン耐性タンパク質 (NSR) は、*S. lactis*, *S. aureus*, *S. agalactiae* および他の病原性細菌で検出される[309, 310]。これらのタンパク質の遺伝子は、特定の 2 成分系によって調節される。第二に、ABC トランスポータ

一は、細胞内からの薬物排出に関与している。ABC トランスポーターの発現も、2成分系によっても調節されている[291, 311]。第三は、細胞壁および細胞膜の改変である。テイコイン酸のD-アラニル化は細胞壁の正味電荷分布を変化させ、*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Clostridium difficile* および *B. cereus* などの標的細菌の細胞エンベロープからカチオン系ランチビオティックを撃退させる[312]。ペニシリン結合タンパク質の過剰発現は、*Listeria monocytogenes* および *S. aureus* をニシンおよび細胞壁標的化合物に対して耐性にする[313]。細胞膜中の脂質成分およびホスファチジルグリセロールのヒドロキシル基のリジンエステル化の変化は、ランチビオティックに対する病原菌の耐性に関与することも報告された[314]。これらの結果を要約すると、病原性細菌におけるランチビオティックの作用機序は、生産菌のものとやや異なる。生産菌では主なプレーヤーはABC トランスポーターと免疫タンパク質であり、病原性細菌ではニシン耐性タンパク質と細胞壁の修飾が追加のプレーヤーである。

ポリミキシンは環状リポペプチド系抗生物質ファミリーであり、1947年に大多数の腸内細菌科および *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* のようなグラム陰性細菌に対して特異的に活性な抗生物質として、*Bacillus polymyxa* (*Paenibacillus polymyxa*) から最初に単離された。その臨床使用は一時腎毒性と神経学的影響によって徐々に減少したが、これらの細菌の世界的な普及のために、非常に耐性なグラム陰性菌に対する最終ライン薬として復活した。正に帯電したポリミキシンは、グラム陰性菌に排他的に存在し、外膜に位置するリポ多糖(LPS)の陰性帯電リポドA部分に結合する[315]。ポリミキシン生合成遺伝子クラスターを *P. polymyxa* からクローニングし、特徴付けた[316]。2つのトランスポーター遺伝子 *pmxC* と *pmxD* がクラスターの中央に存在する。*Brucella* 属, *Edwardsiella* 属, および *Serratia* 属などの多くのグラム陰性細菌は、ポリミキシンに対して自然耐性である。このメカニズムは、LPSへのカチオン性分子の添加に起因すると仮定される。近年、ポリミキシンに対する獲得耐性株が臨床分離株において増加している。耐性メカニズムは、LPSの様々な修飾と排出ポンプであり、そのうちのいくつかはプラスミド上に位置する遺伝子によってコードされる[317, 318]。バシトラシンは、いくつかの *B. licheniformis* によって生産される環状ペプチド系抗生物質である。大きな多酵素複合体 BacABC により非リボソーム的に合成される。これは、単一軟膏として、またはネオマイシンとポリミキシンBとの三剤軟膏として組み合わせて使用され、*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* および *Clostridium* 種を含むグラム陽性細菌に対して活性である。バシトラシンは、細胞壁生合成において重要な中間体として機能する脂質担体であるウンデカプレニルピロリン酸を結合することにより、細菌細胞壁合成を妨害する[319]。バシトラシンの生合成遺伝子クラスターをクローニングし、特徴付けた[320, 321]。トランスポーターをコードする遺伝子 *bcrABC* は、バシトラシン生合成オペロン *bacABC* の下流約 3kb に位置する。2成分調節システム BacRS はこれらのクラスター間に存在し、*B. licheniformis* の自己耐性の調節に関与している。

### 3.5. その他の細胞壁-細胞膜合成阻害剤

A-500359s および A-102395 のようなカプラマイシン系ヌクレオシド抗生物質は、グラム陽性およびグラム陰性菌、さらに、*M. tuberculosis* に対する抗菌活性を示す。最近、多剤耐性 *M. tuberculosis* 株はヒトの健康に重大な脅威をもたらすので、このタイプの抗生物質は強力な抗結核薬として大きな注目を集める[322]。これらの抗生物質は、ペプチドグリカン細胞壁生合成に作

用する偏在する必須酵素である細菌トランスロカーゼ I を阻害する。A-500359s および A-102395 の生合成遺伝子クラスターは、それぞれ *S. griseus* および *Amycolatopsis* sp. からクローニングされた [323, 324]。前者はアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (*orf21*) と 4 つのトランスポーター (*orf19*, *orf20*, *orf30* および *orf35*) をコードする遺伝子を含み、後者はホスホトランスフェラーゼ (*cpr17*) の遺伝子を含むが、3 つのトランスポーター遺伝子は 3 つのトランスポサーゼ遺伝子に置き換えられている。代わりに、4 つのトランスポーター遺伝子 (*orf58*, *orf59*, *orf60* および *orf61*) がクラスターの末端近くに存在する [324]。ホスホトランスフェラーゼ (ORF21) は、A-500359s の成分である不飽和ヘキサロン酸をリン酸化する。これらの遺伝子は自己耐性に関与していると考えられている。A-503083s の生合成遺伝子クラスターも、*Streptomyces* sp. SANK 62799 からクローニングされた [325]。

D-サイクロセリンは、*S. lavendulae* および *S. garyphalus* の天然代謝産物であり、D-アラニンの構造アナログです。細胞壁ペプチドグリカン生合成経路における 2 つの順次酵素、アラニンラセマーゼおよび D-Ala-D-Ala リガーゼを阻害する [326]。これは、第二の薬剤として結核の治療に臨床的に使用される。D-サイクロセリンの生合成遺伝子クラスターをクローニングした [327]。D-Ala-D-Ala リガーゼおよび推定膜タンパク質 (トランスポーター) は、自己耐性に関与することが提案されている [327]。ホスホマイシンは復活抗生物質であり、*Streptomyces* 種によって生産されるホスホエノールピルビン酸アナログである。グラム陽性およびグラム陰性薬剤耐性病原菌の両方に対して活性である。ホスホマイシンは、細菌ペプチドグリカン生合成の第 1 段階酵素、UDP-N-アセチルグルコサミンエノールピルビルトランスフェラーゼ (MurA) を妨害し、阻害する [328]。ホスホマイシンの生合成遺伝子クラスターを *S. fradiae* からクローニングし、特徴付けた [329, 330]。クラスター内の *fomA* および *fomB* は、*S. wedmorensis* における自己耐性に関与することが提案されている [329]。*murA* の突然変異、ペプチドグリカン生合成のサルベージ経路、取込み系における変異、およびホスホマイシン修飾酵素は、病原性細菌におけるホスホマイシン耐性において機能することが記載されている [331]。*M. tuberculosis* では、アラニンラセマーゼの変異、L-アラニンデヒドロゲナーゼが耐性に関与することが報告されている [332, 333]。一方、病原菌ではホスホマイシン耐性は非常にまれである [334]。

#### 4. DNA 合成阻害剤および関連抗生物質

##### 4.1. ブレオマイシンおよび関連抗腫瘍抗生物質

ブレオマイシンは、*S. verticillus* によって非リボソーム的に生産されるグリコペプチド由来の抗生物質であり、いくつかのタイプの腫瘍の治療に使用される臨床的に貴重な天然物である [335]。ブレオマイシンは、DNA と RNA の金属依存性酸化切断によりその生物学的活性を発揮し、バンコマイシンやテイコプラニンなどの細胞壁阻害剤ではない。ブレオマイシンの生合成遺伝子クラスターを、*S. verticillus* ATCC15003 から 77kb DNA フラグメントとしてクローニングした [336] (GB No. AF210249)。それぞれ、ブレオマイシン結合タンパク質、ブレオマイシンアセチルトランスフェラーゼ、および ABC トランスポーターをコードする *blmA*, *blmB* および *orf7* の 3 つの自己耐性遺伝子がクラスターの末端に存在する [337-339] (GB No. L26955)。クラスターの別の端に位置する *orf29* は、薬物を輸送することによって自己耐性に関与している [336]。タリソマイシンとゾルバマイシンは、ブレオマイシンファミリー抗腫瘍抗生物質のメンバーである。その生合成遺伝子クラ

スターは、*Streptoalloteichus hindustanus* および *S. flavoviridis* からそれぞれクローニングされた[340, 341]。タリソマイシンの遺伝子クラスターには、ABC トランスポーター(*t1mT*)、タリソマイシン結合タンパク質(*t1mA*)および N-アセチルトランスフェラーゼ(*t1mB*)の各遺伝子が含まれており、ゾルバマイシンには ABC トランスポーターの 3 つの遺伝子(*orf36*, *orf37* および *orf38*) およびゾルバマイシン結合タンパク質(*zbaA*)が含まれているが、ゾルバマイシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている。興味深いことに、B1mB および T1mB は、4 つのブレオマイシンファミリーメンバー、すなわち、ブレオマイシン、フレオマイシン、タリソマイシンおよびゾルバマイシンの金属フリー形態をアセチル化し、B1mB はゾルバマイシン生産菌である *S. flavoviridis* においてゾルバマイシンに対する耐性を提供することができる[342]。ブレオマイシンは、ブレオマイシンヒドラーゼによって正常および腫瘍細胞において代謝不活性化される。これらのヒドラーゼは、哺乳類、酵母、および細菌に広く分布している[343]。酸化損傷によって引き起こされる DNA 鎖切断は、ポリヌクレオチドキナーゼ 3'-ホスファターゼ、*pnkp* 遺伝子産物によって修復することができる[344]。PNKP とそのホモログは、哺乳類細胞、酵母、ならびに細菌で検出可能である。さらに、ブレオマイシン結合タンパク質は MRSA およびいくつかの病原性細菌に見出される[345]。これらの 3 つのメカニズムは、臨床分野におけるブレオマイシン耐性の主要な役割として機能する。

#### 4.2. キノンおよび関連抗腫瘍および抗細菌抗生物質

アングサイクリン系の抗生物質は、テトラサイクリン系抗生物質およびアントラサイクリン系抗生物質を含むアグリコン部分の特徴的な 4 員環フレームと呼ばれる[346, 347]。ダウノルビシン、アクラシノマイシンおよびノガラマイシンは、アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質に属する。その化学療法はこれらが世界保健機関(WHO)必須薬のモデルリストに記載されているように、腫瘍の多くの形態の治療において顕著な役割を維持する[348]。しかし、その臨床使用は心毒性の副作用のために制限されている。心毒性の基本的なメカニズムは、活性酸素種生成およびトポイソメラーゼ 2B の阻害のための直接的な経路を含む[349]。一方、アントラサイクリンが多様な分子効果を仲介するように、細胞毒性のメカニズムには、DNA へのインターカレーション、フリーラジカルの生成、DNA 結合およびアルキル化、ヘリカーゼの阻害、トポイソメラーゼ阻害など複数の経路が含まれる[350]。ドキシソルビシン(14-ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン)およびダウノルビシン生合成遺伝子クラスターを *S. peucetius* からクローニングし、特徴付けた[351, 352]。興味深いことに、*S. peucetius* ATCC 29050 はダウノルビシンを生産するが、ドキシソルビシンを生産せず、*S. peucetius* ATCC 29052 はダウノルビシンとドキシソルビシンの両方を生産する。DrrA および DrrB はその抗生物質のトランスポーターを形成し[353]、DrrC は UvrS 様 DNA 修復タンパク質である[354]。これらは自己耐性に関与している。ダウノルビシンは、分泌セリンプロテアーゼと特異的複合体を形成し、そのプロテアーゼはダウノルビシンを隔離し、細胞への侵入を防ぐ[355]。DrrD は耐性に関与すると報告された。しかし、これまでのところ詳細なメカニズムは解析されていない。三糖類アントラサイクリンであるアクラシノマイシン A(アクラルビシン)は、急性骨髄芽球性白血病の患者において活性であることが示されているが、遅延性心臓毒性を誘発する。アクラシノマイシン A はトポイソメラーゼ I およびトポイソメラーゼ II を阻害する。アクラシノマイシンの生合成遺伝子クラスターを *S. galilaeus* からクローニングした[356, 357]。AcrV(ABC トランス

ポーターATP 結合成分)および AcrW(ABC トランスポーター膜タンパク質)がクラスターの末端に存在する。ノガラマイシンは、*S. nogalater*によって生産されるアントラサイクリン系抗生物質である。化学構造は、分子の炭水化物単位の1つであるノガラミンが、アグリコンと炭素-炭素結合と古典的な O-グリコシド結合との両方を介して結合している点でユニークである。これは、抗腫瘍抗生物質であり、非スレッド型インターカレーターに属するダウノルビシンとは対照的に、スレッド型インターカレーターに属している。ノガラマイシンの生合成遺伝子クラスターを、20kb DNA フラグメントとして *S. nogalater* からクローニングした[358]。Sno0(核輸送因子 2 スーパーファミリーメンバー、ポリケチドシクラーゼ?)および Snor0(UvrA 様エキシヌクレアーゼ)をコードする遺伝子がクラスター内で同定される。これらは、自己耐性に関与している可能性がある。

ランドマイシン、ウルダマイシンおよびジャドマイシンは、アングサイクリン系抗生物質に属する。ランドマイシン E は *S. globisporus* によって生産され、多剤耐性仲介薬排出によって軽度に影響される抗腫瘍活性を示す。ランドマイシン E は腫瘍細胞周期進行を停止し、イニシエータープロカスパーゼ-16 の活性化によってアポトーシスを誘導すると報告されている[359]。ランドマイシン E の生合成遺伝子クラスターを *S. globisporus* からクローニングし[360]、ランドマイシン A については *S. cyanogenus* からクローニングした[361]。トランスポーター、ABC トランスポーター、および ABC トランスポーターの ATPase をコードする 3 つの遺伝子 *IndJ*、*IndW*、および *IndW2* が、それぞれクラスター内および末端で検出された。ウルダマイシンはアングサイクリン系抗生物質であり、グラム陽性菌およびマウス L1210 白血病の幹細胞に対して生物学的な活性を示す。生合成遺伝子クラスターを *S. fradiae* からクローニングした[362]。クラスター内で *urdJ* および *urdJ2* の 2 つのトランスポーター遺伝子が検出される。アクアヤママイシンとラベロマイシンは、ウルダマイシンと同様の化学骨格を有する。ジャドマイシンは、アングサイクリン系抗生物質であり、トポイソメラーゼを阻害し、アポトーシスを促進する[363]。ジャドマイシンの生合成遺伝子クラスターを *S. venezuelae* からクローニングした[364]。MFS 型トランスポーター遺伝子 *jadL* が、クラスター内に位置する。

アクチノロジン、グラナチシン、メデルマイシンはベンゾイソクロマンキノン系抗生物質である。アクチノロジンは、青色色素、pH 応答性の抗生物質です。グラム陽性菌に対する弱い抗菌活性を示し、DNA、タンパク質および細胞エンベロップを含む複数の細胞標的の酸化的損傷を引き起こす[365]。アクチノロジンの生合成遺伝子クラスターを *S. coelicolor* からクローニングし、特徴付けた[366, 367]。それぞれ SC05083、SC05084 および SC05076 に対応する 3 つのトランスポーター遺伝子 *actII-orf2*、*actII-orf3* および *actVA-orf1* が、クラスター内で検出される。グラナチシンは *Streptomyces* 種によって生産される抗生物質であり、グラム陽性菌に対する抗菌活性およびマウス P-388 リンパ球性白血病、ヒト経口表皮癌細胞に対する抗腫瘍活性を示す[368]。これは、rRNA の成熟および細胞周期特異性を阻害する。生合成遺伝子クラスターを *S. violaceoruber* からクローニングした[369, 370]。*S. coelicolor* における *actII-orf2* に対応する 1 つのトランスポーター遺伝子 *orf15* は、クラスター内で検出可能である。メデルマイシンはグラム陽性菌に活性な抗生物質である。血小板凝集を阻害する。生合成遺伝子クラスターを *Streptomyces* sp. AM-7161 からクローニングした[371]。1 つのトランスポーター遺伝子 *orf25* がクラスター内で検出される。マイトマイシンは 60 年以上前に抗腫瘍系抗生物質として *S. lavendulae* から単離された。それらは密集したピロロインドール構造で整列したアジリジン、キノン、およびカルバメート部分から成っている。マイトマイシンは配列 CG に対し高効率および特異的に DNA を架橋し、高反応性

キノンメチドへの還元的変換後にのみアルキル化剤として機能する[372]。マイトマイシンCの生合成遺伝子クラスターを *S. lavendulae* からクローニングした[373]。それぞれフラボタンパク質オキシドレダクターゼ、マイトマイシン結合タンパク質、およびトランスロカーゼ/トランスポートターをコードする3つの遺伝子 *mcrA*、*mrd*、および *mct* は、自己耐性に関与することが報告された[374-376]。そのうちの2つはクラスター内にあるが、*mcrA* はクラスター外にある。興味深いことに、*mcrA* に対する2つの相同遺伝子、*mitR* および *mmcM* がクラスター内に存在する。ヤタケマイシンは、強力な抗菌および抗腫瘍活性を有する非常に有毒なDNAアルキル化剤である。CC-1065 およびデュオカルマイシンと共に、シクロプロパピロロインドール抗生物質群を形成する。ヤタケマイシンの生合成遺伝子クラスターを *Streptomyces* sp. TP-A2060 からクローニングした[377, 378]。2つのトランスポートターと1つのDNA修復酵素(YtkR6、DNAグリコシラーゼ)が自己耐性に関与することが報告された。

レベッカマイシンとスタウロスポリンは、放線菌によって生産されるインドロカルバゾール系抗生物質である。ハロゲン含有天然物であるレベッカマイシンは、抗菌および抗腫瘍活性を示す。これはDNAトポイソメラーゼIを阻害し、ミオシン軽鎖キナーゼ生産を抑制し、クローディン-5の発現を誘導する[379]。生合成遺伝子クラスターを *Saccharothrix (Lechevalieria) aerocolonigenes* からクローニングした[380, 381]。RebT および RebU は自己耐性/分泌に関与すると報告された。インドロカルバゾールであるスタウロスポリンは、タンパク質キナーゼCおよびサイクリン依存性タンパク質キナーゼなどの様々なタンパク質キナーゼの強力な阻害剤である。これは、細胞周期停止、アポトーシス、およびカスパーゼ-3の活性化を誘導する。その生合成遺伝子クラスターを、*Streptomyces* sp. TP-A0274 [382] および *S. clavuligerus* ATCC27064 からクローニングした。耐性/トランスポートターに関連する遺伝子は、*Streptomyces* sp. TP-A0274 および *S. clavuligerus* ATCC27064 の両方の遺伝子クラスター内および隣接して検出されない。また、耐性/トランスポートターに関連する遺伝子は、スタウロスポリンを生産する *S. spongiicola* HNM0071 の遺伝子クラスター(GB No. で DDQ41\_30725~DDQ41\_30725)内および隣接して存在しない。これらの種で自己耐性に関連する遺伝子が検出できないという事実は、抗菌活性の欠如ゆえにその存在に必要でないことでゲノムから最初に削除または欠落したことを示唆している。しかし、詳細は明らかにされていない。インドールマイシンは、*S. griseus* および海洋γ-プロテオバクテリア *Pseudoalteromonas luteoviolacea* によって生産される抗生物質であり[383, 384]、MRSA および *H. pylori* を含むヒト病原菌に抗菌活性を示す。インドールマイシンは天然トリプトファンアナログとしてトリプトファン tRNA 合成酵素に結合するためトリプトファンと競合する。インドールマイシンの生合成遺伝子クラスターを *S. griseus* ATCC12648 からクローニングした[385]。しかし、耐性関連遺伝子は検出できない。興味深いことに、*S. griseus* NBR513350 はトリプトファン tRNA 合成酵素をコードする2つの遺伝子を有する(SGR\_2702 および SGR\_3809)。そのうち、SGR\_3809 遺伝子はインドールマイシン耐性酵素をコードする。更に、SGR\_3809 と cDNA 配列が93%同一な遺伝子がインドールマイシン生産菌 *S. griseus* ATCC12648 で検出され、補助トリプトファン tRNA 合成酵素が自己耐性で役割を有することを示唆する[386]。

クロモマイシン A3 およびミスラマイシンは、アウレオリン酸型抗腫瘍抗生物質である。クロモマイシン A3 は、二価陽イオンと二量体複合体を形成し、DNAのGC豊富な配列に結合してDNA複製および転写を阻害する[387]。グラム陽性菌に対し抗菌活性を示し、数系列の腫瘍細胞の増殖を阻害する。その生合成遺伝子クラスターを *S. griseus* からクローニングした[388]。これは、自己耐

性に関与する3つの遺伝子をクラスターの末端に含む。*cmrA* および *cmrB* 遺伝子は ABC トランスポーターをコードし、*cmrX* は UvrA 様 UV 修復ヌクレアーゼをコードする。CmrAB ABC トランスポーターは、生合成中間体に対し高レベルの耐性を付与する[389]。アウレオリン酸型化合物ミスラマイシンは、*S. argillaceus* によって生産される抗腫瘍抗生物質である。ミスラマイシンの生合成遺伝子を *S. argillaceus* からクローニングした[390, 391]。自己耐性に関与するとされる3つの遺伝子 *mtrA*、*mtrB*、および *mtrX* は、クラスターの末端に位置する。*mtrA* および *mtrB* はトランスポーターをコードし、*mtrX* は UV 修復システムをコードする。

チオコラリン、エキノマイシンおよびトリオスチンは、いくつかの放線菌種によって生産されるチオデプシペプチド系抗生物質である。このグループの化合物は、非リボソーム的に生合成されたペプチドコアに基づく大規模なビスインターカレーターファミリーに属する[392]。これらの化合物は、DNA のマイナー溝に高い親和性でインターカレートし、様々な腫瘍、ウイルスおよび細菌に対し強力な活性を示す。チオコラリンは、2つの海洋 *Micromonospora* 種によって生産された二回対称二環性ビスインターカレターのメンバーである。この化合物は、グラム陽性菌に抗菌活性を、様々なヒト癌細胞株に対し抗腫瘍活性を示す。チオコラリンは DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を阻害し、細胞周期停止を促進する。生合成遺伝子クラスターを 65kb DNA フラグメントとして *Micromonospora* sp. ML1 からクローニングした[393]。クラスター内には、2つのトランスポーター遺伝子(*tioC* および *tioD*)、uvrA 様遺伝子(*tioI*) およびチオコラリンの隔離に関与する可能性のあるタンパク質をコードする *tioX* が存在する[393, 394]。エキノマイシン/キノマイシン A は、いくつかの *Streptomyces* 種によって生産される疑似対称性二環性ビスインターカレーターである。この化合物は、血管内因性増殖因子(VEGF)プロモーターに含まれる低酸素反応性要素(HRE)配列への低酸素誘導因子-1(HIF-1)の結合を特異的に阻害することが報告された。その生合成遺伝子クラスターは、*S. lasaliensis* [395]、および *S. griseovariabilis*[396]からクローニングされた。*S. lasaliensis* のクラスターには uvrA 様遺伝子(*ecm16*)が含まれているが、2つのトランスポーター遺伝子は含まれておらず、*S. griseovariabilis* では uvrA 様遺伝子(*qui10*)と2つのトランスポーター遺伝子(*qui1* および *qui2*)が含まれている。*S. spongiicola* HNM0071 (GB No. CP029254)の最近の全ゲノムシーケンシング(GB No. CP029254)は、クラスター内の6つのABCトランスポーターがエキノマイシン生合成を調節する可能性があることを示す[397]。トリオスチン A はエキノマイシンの直接の前駆体であり、*ecm18* 遺伝子産物 S-アデノシル-L-メチオニン(SAM)依存性メチルトランスフェラーゼは、この転換を触媒すると考えられている[395]。この化合物は、GC リッチな DNA 配列よりも AT リッチな DNA 配列に結合することを好む。トリオスチン A の生合成遺伝子クラスターを *S. triostinicus* からクローニングした[398]。2つのトランスポーター遺伝子(*trsD* および *trsE*)と1つのDNA修復遺伝子(*trsm*)がクラスター内に存在する。

アジノマイシンとフィセロマイシンは、アザビシクロヘキサン環系を有するハイブリッドポリケチド/非リボソームペプチド天然物であり、主要な溝の二重 DNA と共有結合的に相互作用し、ストランド間架橋を誘導することによって抗腫瘍活性を示す。アジノマイシン B の生合成遺伝子クラスターを *S. sahachiroi* からクローニングした[399]。1つのトランスポーター遺伝子(*aziE*)がクラスター内で検出される。アジノマイシン B 誘導 DNA 損傷の減少および修復で機能する DNA グリコシラーゼ(AIkZ)とアジノマイシン結合タンパク質(AziR)は、*S. sahachiroi* の自己耐性に関与している[400, 401]。フィセロマイシンは、MRSA を含む *S. aureus* に対して *in vitro* で強力な活性を示す。フィセロマイシンは、DNA ポリメラーゼ I 欠損大腸菌において半保存性 DNA 複製を選択的

に損なう[402]。フィセロマイシンの生合成遺伝子クラスターを *S. ficellus* からクローニングした[403]。ABC トランスポーターとして Fic11、Fic12、Fic42 が機能し、Fic14 と Fic45 が MFS トランスポーターであることを提案した。

ノボビオシン、クメルマイシン A1 およびクロロビオシンは、アミノクマリン系抗生物質を構成する。これらの化合物は、ジャイレースの強力な阻害剤であり、細菌 DNA ジャイレースの B サブユニットに結合し、ジャイレースによって触媒される ATP 依存性 DNA スーパーコイル化を阻害する。DNA ジャイレースは II 型トポイソメラーゼである。フルオロキノロンは、抗生物質ではないが、非常に成功したジャイレース標的薬の良い例である。アミノクマリン系抗生物質の臨床的使用は、その貧弱な薬理学的特性、水への限られた溶解性、およびヒトに適度な毒性を示すため制限される。ノボビオシンの生合成遺伝子クラスターを、*S. sphaeroides* NCIB11891 から 25.6kb DNA フラグメントとしてクローニングした[404]。クラスターにはトランスポーター遺伝子(*novA*)とノボビオシン耐性ジャイレース遺伝子(*gyrB<sup>r</sup>*)が含まれている。ノボビオシン生産 *S. sphaeroides* は、2つの *gyrB* 遺伝子、*gyrB<sup>r</sup>* および *gyrB<sup>w</sup>* を有し[405]、それぞれ酵素はノボビオシン感受性とノボビオシン耐性形態をコードする。クメルマイシン A1 は、上述した3つのアミノクマリンの中で最も複雑な化学構造を有する。クメルマイシン A1 生合成遺伝子クラスターを *S. rishiriensis* DSM40489 からクローニングした[406]。クラスターには、2つのアミノクマリン耐性トポイソメラーゼ遺伝子、*gyrB<sup>r</sup>* および *parI<sup>r</sup>* が含まれている。*gyrB<sup>r</sup>* 遺伝子の直下に位置する *parI<sup>r</sup>* 遺伝子は、アミノクマリン耐性トポイソメラーゼ IV サブユニットをコードする。ジャイレースとトポイソメラーゼ IV は II 型トポイソメラーゼに属する。クロロビオシンは、様々な *Streptomyces* 種によって生産されるハロゲン含有アミノクマリン系抗生物質である。クロロビオシン生合成遺伝子クラスターを、*S. roseochromogenes* DS 12, 976 からクローニングした[407]。クローン化クラスターではトランスポーター遺伝子は検出されませんでした。興味深いことに、クロロビオシン遺伝子クラスターは、クメルマイシン A1 と同様に 2つのアミノクマリン耐性トポイソメラーゼ遺伝子、*gyrB<sup>r</sup>* および *parI<sup>r</sup>* を有する。しかし、*parI<sup>r</sup>* はノボビオシンのクラスターで欠落している[408]。

#### 4.3. エンジン系抗腫瘍抗生物質

エンジン系抗腫瘍抗生物質は、三重結合とユニークな生物学的活性を有する新しい分子構造の天然物成長ファミリーです。このファミリーの天然化合物の臨床使用は、主にその毒性のために制限されている。しかし、送達システムおよび抗体薬物コンジュゲートの改善は、抗腫瘍化学療法に大きな臨床的成功への道を開いた[409]。これらの化合物は、大まかに2つのカテゴリーに分類される。第一のカテゴリーは、安定化のため特異結合タンパク質を有する新規9員環エンジン発色団コアを有する色素タンパク質エンジンで構成される。第二のカテゴリーは、10員環系で構成され、追加の安定化因子を欠いている。9員環と10員環のエンジン化合物は、高親和性でDNAに結合し、酸化的DNA鎖切断を誘導する。ネオカルチノスタチン、C-1027、マクロモマイシン、ケダルシジン、マジュロペプチン、およびアクチノキササンチンは第一のカテゴリーに属し、カリケアマイシンおよびダイネミシンは第二のカテゴリーに属する。シアノスポラシドは、エンジン化合物の分解産物であると考えられる[410]。ネオカルチノスタチンは、*S. carzinostaticus* によって生産され、1:1のモル比でタンパク質部分とエンジン発色団で構成される。タンパク質部分のアミノ酸配列を決定した[411]。エンジン発色団の生合成遺伝子クラスターを、92kb DNA フラグ



メントとして *S. carzinostaticus* からクローニングした[412]。エンジン発色団の隔離のためのアポタンパク質をコードする *ncsA* と、クラスター内の排出ポンプトランスポーターをコードする *ncsA1* の2つの自己耐性関連遺伝子がある[412]。さらに、ミコチオール依存性解毒は、自己耐性に関与している[413]。C-1027は、*S. globisporus* によって生産される色素タンパク質性抗腫瘍抗生物質であり、アポタンパク質とエンジン発色団からなる。アポタンパク質のアミノ酸配列を決定した[414]。生合成遺伝子クラスターを *S. globisporus* からクローニングした[415]。4つの遺伝子は自己耐性に関与している。*cagA*、*sgcB*、*sgcB4*、および *sgcB2/orf(-1)* は、それぞれアポタンパク質、トランスポーター、トランスポーター、および UvrA 様タンパク質をコードする。*S. macromyceticus* から単離されたマクロモマイシン/アウロモマイシンは、エンジン発色団を含むと推定されるが、発色団の完全な構造はまだ解明されていない。アポタンパク質(McmA)のアミノ酸配列を決定し、これは発色団の安定性の維持に不可欠である[416, 417]。抗腫瘍活性を有するケダルシジンは、*Streptoalloteichus* 種由来のアポタンパク質と反応性エンジン発色団からなる非共有結合複合体として単離された。アポタンパク質のアミノ酸配列を決定した[418]。ケダルシジン発色団に対する生合成遺伝子クラスターをクローニングした[419]。アポタンパク質(*kedA*)と2つのトランスポーター(*kedX2*および*kedX*)の遺伝子は、クラスター内に存在する。マジュロペプチンは、高酸性タンパク質に埋め込まれたエンジン発色団からなる化合物で、*Actinomadura madurea* ATCC39144 から単離された。クローン化生合成遺伝子クラスターには、アポタンパク質(*mdpA*)、トランスポーター(*mdpR3*)、および DNA 修復タンパク質(*mdpR4*)の遺伝子が含まれている[420]。抗腫瘍タンパク質アクチノキササンチンは、*Actinomyces globisporus* から単離された。アポタンパク質(AxnA)のアミノ酸配列を決定した[421, 422]。アクチノキササンチンアポタンパク質(DIJ69\_34170)、トランスポーター、および UvrA 様タンパク質の遺伝子は、*S. globisporus* TFH56 プラスミド pTFSG1(GB No. CP029362) 上に位置する。

カリケアマイシンとダイネミシンは、10員環エンジン化合物である。抗原 CD33 に特異的なヒト化モノクローナル抗体に共有結合したカリケアマイシンの半合成誘導体は、臨床用の最初の抗体標的細胞傷害性抗腫瘍薬(MyloTarg)としてFDAによって承認された[409]。その生合成遺伝子クラスターを *Micromonospora echinospora* からクローニングした[423]。このクラスターには、推定トランスポーター(*calT1*~*calT7*)および自己犠牲タンパク質(*calC*、*calU16*、および *calU19*)の遺伝子が含まれている[424]。自己犠牲タンパク質はカリケアマイシンと複合体を形成し、複合体のタンパク質分解を誘発し、高反応性カリケアマイシンと自己犠牲タンパク質の両方を不活性化させる。ダイネミシンは、アントラキノンとエンジンコアから構成されるハイブリッド化合物であり、それぞれ DNA への結合および切断に寄与する。ダイネミシン生合成遺伝子クラスターを *Micromonospora chersina* からクローニングした[425]。このクラスターには、トランスポーター(DynU6、DynT8、および DynT10)、ブレオマイシン耐性タンパク質に類似したジオキシゲナーゼ(DynE11)、自己犠牲タンパク質(DynU16)の遺伝子が含まれている。ティアンシマイシンは、アントラキノンとエンジンコアを含むハイブリッド化合物です。ティアンシマイシン生合成遺伝子クラスターをクローニングした[426]。2つのトランスポーター(TnmT1、TnmT2)、1つの自己犠牲タンパク質(TnmB)、および3つのジオキシゲナーゼ/ブレオマイシン耐性タンパク質(TnmS1、TnmS2、および TnmS3)がクラスター内で検出可能です。ジオキシゲナーゼ/ブレオマイシン耐性様タンパク質は、生産菌におけるティアンシマイシンの隔離で機能する[427]。シアノスポラシドは、海洋性放線菌属 *Salinispora* から単離された。これらの化合物は、自発的なエンジン分解産物であると

推測される[428]。シアノスポラシド生合成遺伝子クラスターを、*Salinispora pacifica* CNS-143 および *Streptomyces* sp. CNT-179 からクローニングした[429]。*S. pacifica*には3つのトランスポーター遺伝子(*orf(-6)*、*orf(-5)*、および *cyaR2(cyaR2)*)、および *Streptomyces* sp. CNT-179 には4つのトランスポーター遺伝子(*orf(-5)*、*orf(-3)*、*cynR4* および *orfR5*)が、それぞれ、クラスター内または隣接して存在している。

## 5. その他の抗生物質

ポリケチドテトロナート化合物は、構造内にテトロナート部分を持つ。これらの化合物は、テトロナートとスピロテトロナートの2つのクラスに分けられ、広大な構造的および機能的多様性を示す。一部の化合物はグラム陽性菌に対して抗菌活性を示し、一方、一部の化合物は抗腫瘍および抗レトロウイルス活性を示す[430, 431]。テトロノマイシンは、グラム陽性菌の増殖を阻害する直鎖状ポリエーテル型テトロナートである。テトロノマイシン生合成遺伝子クラスターを、*Streptomyces* sp. NRRL 11266 からクローニングした[432]。自己耐性関連遺伝子はクラスター内で検出できない。マクラミシンは、グラム陽性菌およびいくつかのヒト腫瘍細胞株に対し中等度の細胞毒性を有する小型スピロテトロナートクラスの抗生物質である。マクラミシン生合成遺伝子クラスターを *Micromonospora* sp. NBRC 110955 からクローニングした[433]。クラスター内で3つのトランスポーター遺伝子が検出される。アビソミシンは、抗生物質の小型スピロテトロナートクラスに属し、コリスミン酸経路および葉酸生合成を阻害する[434]。アビソミシンアナログ A88696C、D、および F は、胃 ATPase 阻害剤である。アビソミシン生合成遺伝子クラスターを深海由来 *S. koyangensis* SCSIO 5802 からクローニングした[435]。5つのトランスポーター遺伝子(*abmF1*、*abmF2*、*abmF3*、*abmF4*、*abmD*)がクラスター内に存在する。*abmF1*、*abmF2*、*abmF3*、および *abmF4* は、4成分ABCトランスポーターベースのインポートシステムを構成する。クロロスリシンは中型スピロテトロナートクラス抗生物質であり、ラット肝臓および *Azotobacter vinelandii* のピルビン酸カルボキシラーゼおよびコレステロール生合成を阻害する。クロロスリシン生合成遺伝子クラスターを *S. antibioticus* DSM 40725 からクローニングした[436]。1つのトランスポーター遺伝子(*chlG*)は、クラスター内に位置している。しかし、著者は、Ch1Gが細胞で合成された産物を輸送するのに十分でないかもしれないことを示唆している。ロボフォリンは中型スピロテトロナート抗生物質であり、抗菌および抗腫瘍活性を示す。ロボフォリンの生合成遺伝子クラスターを深海由来の *Streptomyces* sp. からクローニングした[437]。トランスポーター(*lobT1*)および耐性(*lobT2*)に関連する遺伝子は、クラスター内に存在する。

プラテンシマイシンおよびプラテンシンは、古い微生物スクリーニングライブラリーから単離された新規クラスの抗生物質である[438, 439]。これらの化合物は、細胞脂質生合成を選択的に阻害することにより、強いグラム陽性抗菌活性を示す[440]。前者は $\beta$ -ケトアシルキャリアタンパク質シンターゼ(KAS) I/II (FabB/F)を阻害し、後者はアシルキャリアタンパク質 II/III (FabF/H)を阻害する。プラテンシマイシン (PTM) およびプラテンシン (PTN) の生合成遺伝子クラスターを、*S. platensis* MA 7327、および *S. platensis* MA7339 からそれぞれクローニングした[441]。4つの遺伝子(*ptmP1/ptnP1*、*ptmP2/ptnP2*、*ptmP3/ptnP3*、*ptnP4/ptnP4*)が自己耐性に関与することが提案された。*ptmP4/ptnP4*は排出ポンプをコードする。PtmP3はFabB/F酵素と相同性であり、*Streptomyces* 種のハウスキーピングタイプ II 細菌脂肪酸シンターゼ (FAS II) の FabF および FabH 酵素の両方を

機能的に置き換えることができる。さらに、FabF はプラテンシマイシンに対し耐性である。カリマンタシンは直鎖状ポリケチドで、*Alcaligenes* sp. YL-02632S から単離され、FabI、エノイルアシルキャリアタンパク質レダクターゼを標的として、多耐性株を含む *S. aureus* および *S. epidemidis* に対して強い抗菌活性を示した[442]。カリマンタシン生合成遺伝子クラスターを *Pseudomonas fluorescens* からクローニングした[443]。カリマンタシン生産菌株は、生産菌に完全な耐性を付与し、機能的に大腸菌 *fabI* 変異を補完する FabI のアイソフォーム BatG の遺伝子を生合成遺伝子クラスター内に有する[444]。さらに、著者は、自己耐性へのアルコールデヒドロゲナーゼである BatM の関与および、非活性な 17-ヒドロキシカリマンタシンが細胞から排出され、その後、不活性な中間体が分泌された BatM によってカリマンタシンに活性化されることを提案した。

リファマイシンは、*Amycolatopsis mediterranei* によって生産されるアンサマイシン系抗生物質に属する。リファンピシンは、リファマイシンの半合成誘導体であり、数 10 年にわたって抗結核薬として使用されてきた。これらの化合物は、原核生物の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼに結合することにより、DNA 依存性 RNA 合成を阻害する。リファマイシン生合成遺伝子クラスターを、*Amycolatopsis mediterrane* からクローニングした[445]。3 つのトランスポーター遺伝子 (*orf21*、*orf22* および *orf23*) はクラスターの一方の端に位置し、一方、排出トランスポーターをコードする *rifP* はクラスターの中央に存在する。しかしながら、自己耐性の主な原因は、クラスターのもう一方の端に位置する *rpoB* によってコードされる内因性耐性 RNA ポリメラーゼによるものである。RpoB 中の 3 つのアミノ酸残基は、生産菌にリファピシン耐性を付与するのに十分であると報告された (GB No. AF040570)。多剤トランスポーターは臨床耐性分離株のマイナー部分における耐性機構として機能するが、リファマイシン耐性 *M. tuberculosis* および *S. aureus* の臨床分離株はまた変異型 RNA ポリメラーゼを有する[446]。リファマイシンホストランスフェラーゼはまた、臨床分離株における耐性に関与している[447]。ホロマイシンは、いくつかの *Streptomyces* 種だけでなく、*Yersinia ruckeri* などのグラム陰性菌によって生産されるジチオピロロンクラス抗生物質のメンバーである。グラム陽性およびグラム陰性菌に対し広いスペクトルの抗菌活性を有し、RNA ポリメラーゼを阻害する[448]。ホロマイシン生合成遺伝子クラスターを *S. clavuligerus*、*Yersinia ruckeri* および海洋細菌 *Pseudoalteromonas* sp. からクローニングした[449-451]。*S. clavuligerus* では、2 つの MFS トランスポーター (SSCG\_03491/h1mH および SSCG\_03542)、フラビン依存性ジヒドロホロマイシンオキシダーゼ/ジスルフィドレダクターゼ (SSCG\_03492/h1mI)、および S-メチル化が自己耐性に関与することを提案された[449, 452]。これに対し、rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*hom12*) は、MFS トランスポーター遺伝子 (*hom8*) 以外に *Y. ruckeri* の遺伝子クラスター内に存在する[450]。

サリノスポラミド A は、海洋性放線菌 *Salinispora tropica* から単離された天然プロテアソーム阻害剤であり、多発性骨髄腫の治療に有望な臨床剤である。サリノスポラミド A 生合成遺伝子クラスターを *S. tropica* CNB-440 からクローニングした[453]。*S. tropica* の 20S プロテアソーム機構は、サリノスポラミド A 生合成遺伝子クラスター内の重複プロテアソーム  $\beta$  サブユニット (Sa1I) を有し、生産菌種でサリノスポラミド A に対して 30 倍の耐性を付与する[454]。プロテアソームサブユニットのアップレギュレーションおよび  $\beta 5$  サブユニットコード遺伝子 *PSMB5* の変異は、獲得耐性を有する腫瘍細胞株において観察されている。エデインは、土壌細菌 *Brevibacillus brevis* によって生産される密接に関連する直鎖状ペプチドグループであり、グラム陽性およびグ

ラム陰性菌に対し抗菌活性を示す。エディンの作用様式は、低濃度で DNA 合成を阻害し、高濃度での翻訳の阻害、および細胞分裂も阻害することが報告された[455]。エディン生合成遺伝子クラスターを *B. brevis* Vm4 からクローニングした[456]。トランスポーター遺伝子(*edeA*)は一方の端に存在し、N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(*edeQ*)はクラスターの別の端に位置し、これはエディンの 2,3-ジアミノプロピオン酸残基の  $\alpha$ -アミノ基をアセチル化する。ツヴィッテルマイシン A は、グラム陽性およびグラム陰性細菌に対する植物疾患および適度な活性を抑制する能力を有する *Bacillus* 種によって生産される直鎖状アミノポリオール抗生物質である。ツヴィッテルマイシン A の生合成遺伝子クラスターを *B. cereus* および *B. thuringiensis* からクローニングした[457, 458]。N-アセチルトランスフェラーゼをコードする *zmaR* は、*B. cereus* および *B. thuringiensis* における自己耐性に関与すると報告され、3 つのトランスポーターをコードする *zmaWXY* は *B. thuringiensis* のクラスターの末端に位置する。

グリセオフルビンは、*Tinea capitis* および他の皮膚科感染症の経口治療のために長年使用されてきた[459]。最近の研究は、その抗ウイルスおよび抗腫瘍効果に注意を払っている。この化合物は、紡錘体微小管機能に影響を与えることによって、有糸分裂を阻害する。グリセオフルビン生合成遺伝子クラスターを *Penicillium aethiopicum* からクローニングした[460]。クラスターには、グリセオフルビンの生合成に関与するクロリナーゼ遺伝子(*gsfI*)とトランスポーター遺伝子(*gsfJ*)が含まれている。ミコフェノール酸は、早くも 1893 年に単離された真菌代謝産物である。抗ウイルス、抗真菌、抗菌、抗腫瘍、および免疫抑制活性を有することが報告された[461]。ミコフェノール酸の標的は、グアニンヌクレオチド生合成における律速段階を触媒するイノシン-5'-モノリン酸 (IMP) デヒドロゲナーゼである。ミコフェノール酸の生合成遺伝子クラスターを *Penicillium brevicompactum* からクローニングした[462]。遺伝子クラスターには、ミコフェノール酸に耐性のある IMP デヒドロゲナーゼ遺伝子(*mpaF*)の余分なコピーが含まれている。興味深いことに、ミコフェノール酸生産菌と非生産菌の両方の亜属 *Penicillium* 種は、2 つのコピーの IMP 脱水素酵素を有している[463]。

## 6. 結論

多剤耐性病原性細菌を取り巻く環境はますます悪化している。抗生物質耐性遺伝子は、内因性抗生物質耐性[464, 465]、獲得耐性[466]、および適応耐性[4]の遺伝子の複雑な混合物である。これらの遺伝子はレジストームを構成する[467-469]。本論文では、抗生物質生産菌における耐性機構と病原性細菌の耐性メカニズムを比較した。その結果、以下のようにいくつかの点を強調する必要がある。まず、病原性細菌におけるアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼおよびホスホトランスフェラーゼのアミノ酸配列の一部は高い類似性 E 値を示す一方で、他のものは全く類似性を示さない(表 S2、図 S1、図 S3 および表 S3)。同様の現象は、そのヌクレオチド配列レベルでも観察される。他の放線菌、*Anabaena variabilis*, *B. anthracis*, and *E. faecalis* にも存在するが、*M. tuberculosis* の広範囲な薬剤耐性株で発現されるアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ Eis は例外である[81, 82, 470]。しかし、生産菌の自己耐性におけるこれらの酵素の関与に関する報告はまだない。 $\beta$ -ラクタマーゼについては、アミノ酸とヌクレオチドレベルでのグラム陰性菌と放線菌との間に配列類似性が認められる(図 S7)[5, 209, 234]。

第二に、いくつかの耐性メカニズムは病原性細菌で観察されるが、抗生物質生産菌では観察され

ない。例えば、病原性細菌では、次のメカニズムが認められている：マクロライド系抗生物質における 23S rRNA およびリボソームタンパク質のヌクレオチドの変異[471-473]、およびマクロライドエステラーゼ[152, 153]；テトラサイクリンにおけるキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびフラビン依存性モノオキシゲナーゼ[161, 474, 475]；およびニシン耐性タンパク質/膜結合プロテアーゼ、ランチビオティックにおける細胞壁/細胞膜成分の修飾[310-314]。

第三に、抗生物質のクラスにより、細菌はその特徴的な耐性メカニズムを発揮する：アミノグリコシド抗生物質におけるアセチル化およびリン酸化などの抗生物質修飾；マクロライド系抗生物質におけるグリコシル化による抗生物質修飾および rRNA メチル化による標的修飾； $\beta$ -ラクタム系抗生物質における  $\beta$ -ラクタマーゼによる抗生物質の破壊およびペニシリン結合タンパク質の標的修飾；プレオマイシン群抗生物質[338, 340, 341]、マイトマイシン[375]、チオコラリン[393]、およびエンジイン系抗生物質[476]などの DNA 相互作用抗腫瘍抗生物質における特異タンパク質への結合による隔離；ノガラマイシン、ヤタケマイシン、クロモマイシン A3、ミスラマイシン、エキノマイシン、エンジイン系などの DNA 相互作用抗腫瘍抗生物質における DNA 修復。

第四に、一部の抗生物質生産菌は 2 つの標的酵素を有し、そのうちの少なくとも 1 つはそれ自身の抗生物質に耐性である。例えば、インドールマイシン生産菌株は 2 つのトリプトファン tRNA シンテターゼ遺伝子を有し、そのうちの 1 つはインドールマイシンに耐性である[386]；ノボビオシン生産菌株はトポイソメラーゼ (DNA ジャイレース) 感受性および耐性遺伝子、*gyrB<sup>R</sup>* および *gyrB<sup>S</sup>* を有する[405]；クメルマイシン A1-生産菌株は、2 つのクメルマイシンおよびクロロビオシン耐性トポイソメラーゼ遺伝子、*gyrB<sup>R</sup>* および *parY<sup>R</sup>* を有する[408]；サリノスポラミド A-生産菌株は、生合成遺伝子クラスター内にサリノスポラミド耐性重複プロテアソーム  $\beta$  サブユニット *salI* 遺伝子を保持する[454]；そしてミコフェノール酸生産菌株は、生合成遺伝子クラスター内に IMP デヒドロゲナーゼ遺伝子 *mpaF* のミコフェノール酸耐性余分コピーを有する[462]。

第五に、多剤耐性病原菌の普及に伴い、日和見病原菌および/または常駐病原菌における多剤耐性決定因子の獲得、およびエンジイン化合物など新しいタイプの抗生物質の発見および導入、自己犠牲タンパク質などの新しいタイプの耐性機構[424, 427, 477]、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ ‘Eis’ [81, 82]、そして適応型抗生物質耐性[4]が出現し、さらには 16S rRNA メチルトランスフェラーゼなどの病原性細菌の新しい分野への生産菌のメカニズムの導入が報告された[95, 96]。このような仕組みが近い将来、環境全体に広がるのが心配である。

抗生物質耐性は、3 つの異なるメカニズムを介して展開される：内因性耐性、獲得耐性および適応耐性[2-4]。適応耐性は、濃度勾配およびサブ阻害濃度の抗生物質との接触の結果として出現する[4]。3 つのメカニズムの中で、水平遺伝子伝達によって得られた抗生物質耐性は、ヒトおよび家畜に大きな脅威をもたらす[478, 479]。様々な環境に存在するドナー菌からレシピエント菌への形質転換、形質導入または接合[7-9]によって正常な伝達を確立するために、細菌種間の GC 含量の障壁を克服する必要がある[480-484]。これらの著者は、系統的に多様な種の広い範囲にわたって、同義語 GC $\rightarrow$ AT 変異より AT $\rightarrow$ GC 変異が大きな割合で生ずること；多種多様な細菌種において、組換えによる GC 含量の進化が AT $\rightarrow$ GC 突然変異の固定化の確率を高めること；GC バイアス遺伝子変換 (gBGC) を介した相同組換えは遺伝子やゲノムのヌクレオチド含量に普遍的に影響を与える重要な因子であること；特に選択が存在しない場合、抗生物質を付与することができる遺伝子はヒト病原菌に容易に伝達されないことなどを報告した。すなわち、ゲノムの GC 含量は、突然変異、組み換えおよび選択による様々な DNA 断片の複雑なシャッフルの結果である。これらの現象の結果

として、ゲノム中の GC 含量は細菌種において *Carsonella ruddii* の 16.5% から *Anaeromyxobacter dehalogenans* の 74.9% の広範に分布する [485, 486]。しかし、最近の耐性メカニズム、標的抗生物質クラス、系統的散在など広く異なるヒト病原菌の 200 個の遺伝子を用いた大腸への遺伝子導入解析により、コドン適応指数 (CAI), GC 含量, N 末端 mRNA 折りたたみエネルギー, 遺伝子長などの配列組成は伝達での主要な機能障壁ではなく、耐性メカニズムと系統起源がレシピエント細菌における抗生物質耐性遺伝子の機能的適合性と適合性を決定するのにより重要な決定要因であることを明らかにした [147]。さらに、ドナーとレシピエント種の系統的関連性は、新たに獲得した遺伝子の機能的適合性および適合性コストに影響を及ぼす。これらの結果は、17 種の重要なヒト病原菌における抗生物質耐性遺伝子分布の解析によって支持される [484]。これらの結果を考えると、ヒトおよび家畜の抗生物質耐性を取り巻く環境が、初期の抗生物質段階から新しい抗生物質段階に変化したと結論付けることができる。初期の抗生物質段階では、抗生物質耐性遺伝子の転移が抗生物質生産土壌細菌、非生産環境細菌および臨床病原菌間で起こったにもかかわらず、移動性遺伝要素を含む伝達頻度および技術がより制限され、規制されていた。更に、抗生物質耐性を含む将来の環境をしばしば予測することができた。しかし、抗生物質の使用と抗生物質クラスが拡大され、新しい世代に入るにつれて、レジストームはますます複雑で洗練化され、また、新しい世代に入ってきた [468, 469]。更に、抗生物質耐性の将来を予測することはますます難しくなっている [487, 488]。従って、抗生物質を使用する場合は、少なくとも WHO の勧告に従うべきである [1]。

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/19/3430/s1>

Figure S1: Phylogenetic tree of aminoglycoside acetyltransferases on the basis of amino acid sequences of those from antibiotic producers and pathogens;

Figure S2: The gene arrangements around the aminoglycoside N-acetyltransferases in *Pseudomonas aeruginosa* PA34 (A) and *Streptomyces fradiae* (B);

Figure S3: Phylogenetic tree of aminoglycoside phosphotransferases on the basis of amino acid sequences of those from antibiotic producers and pathogens;

Figure S4: Phylogenetic tree of aminoglycoside rRNA methyltransferases on the basis of amino acid sequences of those from antibiotic producers and pathogens;

Figure S5: Phylogenetic tree of aminoglycoside transporters on the basis of amino acid sequences of those from antibiotic producers and pathogens;

Figure S6. Phylogenetic tree of aminoglycoside transporters on the basis of amino acid sequences of those from antibiotic producers and pathogens;

Figure S7. Phylogenetic tree of carbapenemases from pathogens and some  $\beta$ -lactamases from *Streptomyces* species on the basis of their amino acid sequences;

Table S1. Antibiotic resistance-related strategies in bacteria and fungi;

Table S2. Amino acid sequence similarities of aminoglycoside acetyltransferases from antibiotic producers and pathogens;

Table S3. Amino acid sequence similarities of aminoglycoside phosphotransferases from antibiotic producers and pathogens;

Table S4. Amino acid sequence similarities of aminoglycoside N-acetyltransferases from antibiotic producers and pathogens.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** I should like to devote this review paper to the late Prof. Hamao Umezawa, the Former director, Department of Antibiotics, National Institute of Health of Japan (now, reorganized to National Institute of Infectious Diseases) for introducing me to the antibiotic field.