

〔生物工学会誌 第75巻 第5号 347-358. 1997〕

---

 総合論文
 

---

## 微生物二次代謝物質に関する生物有機化学的研究

(平成8年度 日本生物工学会生物学賞受賞)

山田 靖 宙

大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻  
〒565 大阪府吹田市山田丘2-1

## Bioorganic Chemistry of Microbial Secondary Metabolites —Monograph—

YASUHIRO YAMADA (*Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565*) *Seibutsu-kogaku* 75: 347-358, 1997.

1. The structures of polyketides isolated from *Penicillium urticae* patulin-minus mutants were determined and their versatility is discussed. 2. The structures, biosynthesis, and activities of chitinase inhibitors, allosamidin congeners, are described and their physiological role is discussed. 3. The structures, biosynthesis, and modes of action of butyrolactone autoregulators of *Streptomyces* are described. Finally, the role of microbial secondary metabolites is discussed.

[Key words: *Penicillium urticae*, polyketide, chitinase inhibitor, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces virginiae*, butyrolactone-type autoregulator, microbial hormone-like compounds, butyrolactone autoregulator receptor]

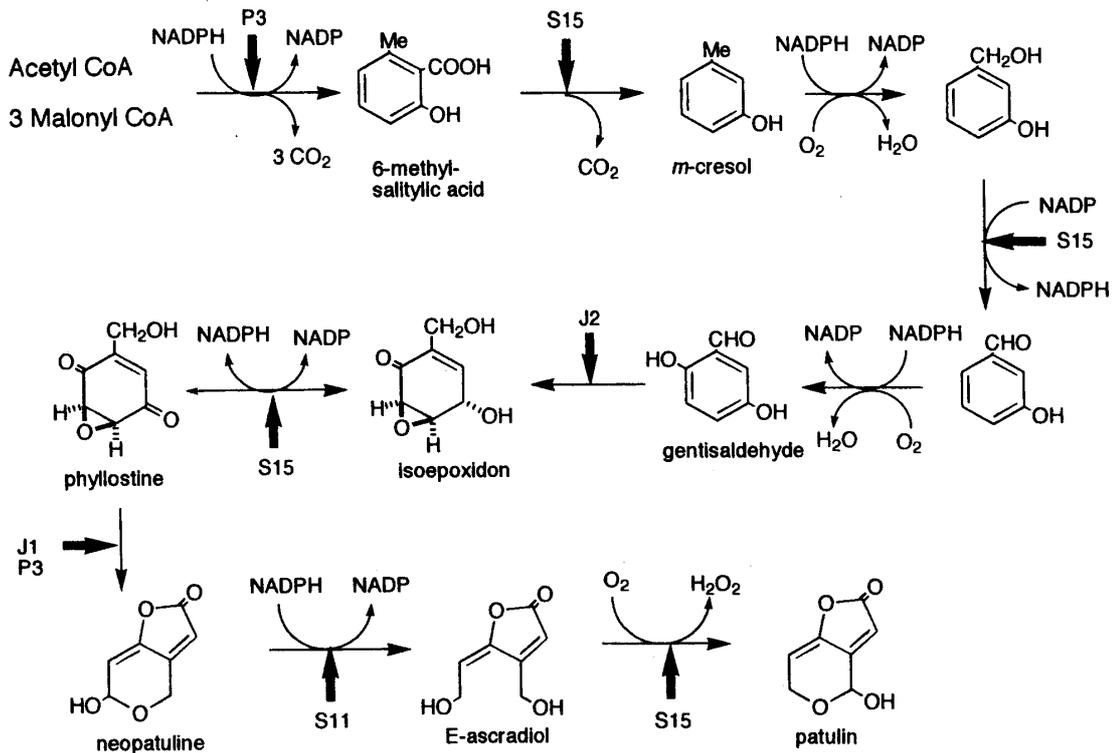
## はじめに

生物界には生理活性、構造の両面から考えて実に多様な二次代謝物質が満ちあふれている。その生産者は深海の生物から陸生の動植物、微生物など、あらゆる分類上の生物を含み、化石化合物に関してはその生産者はもはや地球上には棲息していない場合もある。その構造の多様性、ユニークさ、それと関連した特殊な生理活性については自然が我々のいかに偉大な師であるかを示すものである。たとえば、penicillinの構造中に初めて4員環の $\beta$ -lactam構造を考えたAbrahamらは当時の化学者にそのような不安定な構造は自然界にあり得ないと否定的な意見を述べられている。<sup>1)</sup>今では、非常に不安定な3員環イミン構造のaziridine ring, 3重結合, 2重結合のつらなったeneyne化合物やC-P結合を含むphosphonic acid基の存在は常識になっている。もう一つ二次代謝物質に関して興味ある点はその多岐な生物群にわたる広い分布と、それぞれの化合物の進化上の位置である。ポピュラーな化合物

で一例をあげると、penicillin, cephalosporin, cephamycinはこの順番で構造が複雑化し、同一生合成経路の延長線上にならんでいる類縁体である。penicillin, cephalosporinの生産者は真核生物に属する糸状菌であり、構造上では複雑化して、一番進化の進んだcephamycinの生産者は糸状菌より原始的と考えられる原核生物に属する放線菌である。すなわち、二次代謝物質の構造上の進化はその生物独自のものであるといえる。なおマクロライド類などを考慮すると、一般に糸状菌産生マクロライドよりも放線菌産生のものの方が構造が複雑で進化したものと言える。

さて、なぜ二次代謝物質は存在するのか、場合によっては遺伝子の大きさや、エネルギーの経済効果的には割に合わない二次代謝物質生産がなぜ保存されているかは大きな問題であり、よく話題になる点である。

本総説では、1. *Penicillium urticae*を一例とした、同一種中の二次代謝物質の多様性、2. *Streptomyces*属放線菌のchitinase阻害剤生産における同族二次代謝物質生産性、3. *Streptomyces*属放線菌における自己調節

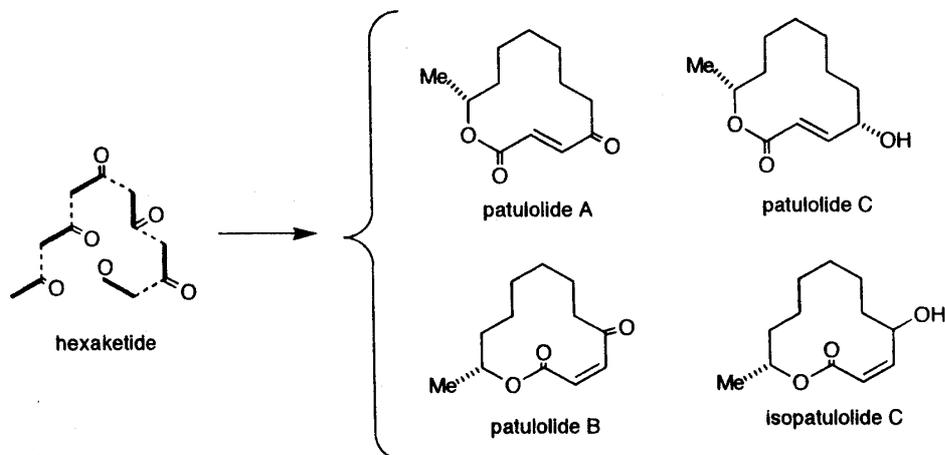
Fig. 1. Biosynthesis of patulin in *Penicillium urticae*.

因子研究を通じて示唆された微生物二次代謝物質生産の意味について述べたい。

### 1. *Penicillium urticae* の生産するポリケタイド

*P. urticae* は50年以上前から知られている代表的 mycotoxin である patulin を生産する。<sup>2)</sup> patulin は動植物、微生物に対して毒性を持ち、分布が広く、*P. urticae* 以外に *Penicillium* 属2種、*Aspergillus* 属3種、*Byssochlamys nivea* などの糸状菌が生産する疫学上重要な二

次代謝物質である。<sup>3)</sup> その生合成経路を Fig. 1 に示した。acetylCoA をスターターとして3分子の malonyl-CoA からなる tetraketide が環化し、*m*-cresol, gentisaldehyde, isoeoxydon, phyllostine, E-ascradiol を経て patulin に到達する低分子化合物の割には複雑な経路といえる。isoeoxydon 以降の経路は関口、Gauscher ら<sup>4)</sup> によって1970年後半から1980年前半にかけて明らかにされた。Fig. 1 中の太い矢印で示した反応をブロックされた変異株は関口らが分離したものである。

Fig. 2. Biosynthesis of patulolides in *Penicillium urticae*.

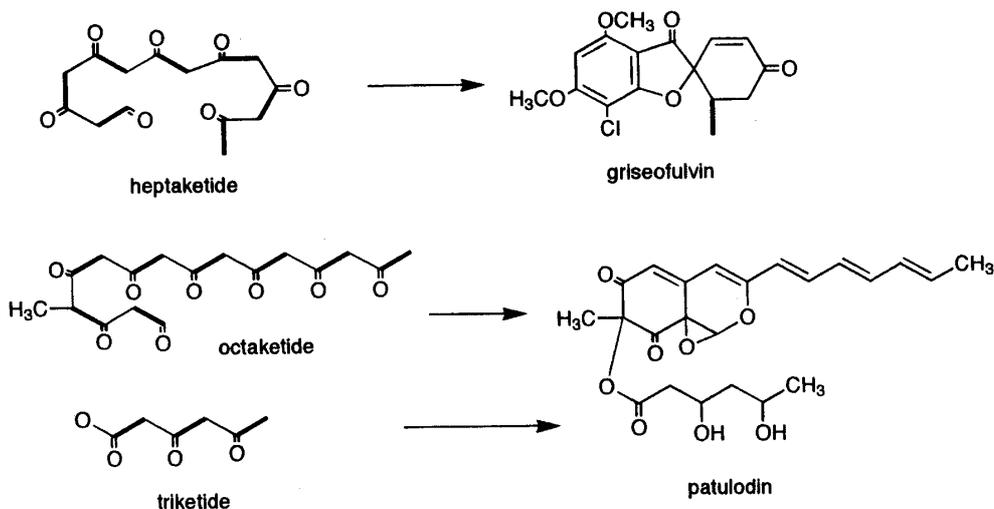


Fig. 3. Biosynthesis of griseofulvin and patulodin in *Penicillium urticae*.

patulin 生合成重要中間体として分離された isoeopoxidon, phyllostine, E-ascradiol はいずれも他属の糸状菌の生産物として単離された mycotoxin である。

なお, neopatulin は phyllostine と patulin を結ぶ中間体としてポリアクリルアミド処理菌体と phyllostine の反応で生成した非常に不安定な物質である.<sup>5)</sup> さて, 変異株 S11 は Fig. 2 に示す 4 種類の 12 員環新規マクロライド patulolide A-C を生産することを見いだした.<sup>6-8)</sup> Patulolide A, B は抗真菌性の物質である. その生合成経路は hexaketide を経るものであることを明らかにした.<sup>9,10)</sup> 野生株では検出されない patulolide の生産がなんらかの内因性因子により引き金が引かれるものと期待してその検索を行ったが, そのような因子は発見することができなかった. しかし変異株 P3 が patulolide を生産し, その自然変異株 P3Y が黄色の色素を生産することが判明した.

黄色色素を patdulodin と命名し, Fig. 3 に示す azaphilone 骨格をもつその構造を決定した.<sup>11)</sup> patdulodin は octaketide である azaphilone 骨格に triketide の 3,5-dihydroxy-hexanoic acid がエステル結合した構造である. なお, P3 株に patdulodin を誘導する外因性因子を放線菌培地より検索したところ, 既知の protein phosphatase 阻害剤である toutomycetin がその活性を示すことを発見した.<sup>12)</sup> *P. urticae* は Fig. 3 に示した hexaketide, griseofulvin も生産することが知られている. 以上, *P. urticae* の生産する既知の poliketide は tri, tetra, hexa, hepta, octaketide と 5 種あり, その構造はさらに多岐にわたっている. また, その生産は変異や外的因子, toutomycetin でも誘導されることから, 微生物の

二次代謝物質生産潜在能力の大きさとその制御機構の解明が今後の重要な課題である.

## 2. 放線菌の生産する chitinase 阻害剤

作田らは昆虫の変態にかかわる chitinase の阻害剤を土壌放線菌から探索し, *Streptomyces* 属の疑似三糖類である allosamidin を分離, 構造決定した.<sup>13-15)</sup> allosamidin は, *N*-acetyl-D-glucosamine の 3 位のエピマーである天然には希な *N*-acetyl-D-allosamine を 2 分子と dimethylaminooxazoline 環と pentacyclitol が融合した特異な構造の allosamizolline が  $\beta$ -glycoside 結合した三糖類である (Fig. 4). allosamidin はカイコ幼虫に注射するとその脱皮, 蛹化を阻害し, 死に至らしめる. chitin は昆虫を含む節足動物以外にも真菌類にも含まれることから, 抗真菌性物質を開発する目的で *Saccharomyces cerevisiae* の chitinase 阻害剤を放線菌培地中に検索した. 活性物質として既知の微量成分である demethylallosamidin が強い阻害活性を示すことを見いだした.<sup>16)</sup> ちなみに, allosamidin の酵母 chitinase に対する阻害作用は低く, demethylallosamidin の約 1/100 の活性である. demethylallosamidin は *S. cerevisiae* に対する生育阻害作用はないが, 出芽した娘細胞の分離を阻害し, 生育期に添加すると, 房状につらなった細胞が観察される. この結果は酵母の分裂に際しての chitinase の重要な役割を示した最初の実験例である. 糸状菌 *Geotrichum candidum* においても, demethylallosamidin 添加は菌糸の伸長と分岐の増加, 分生胞子の分離阻害などの形態変化をもたらす.<sup>17)</sup> 残念ながら allosamidin 類に抗真菌活性は見いだされていないが,

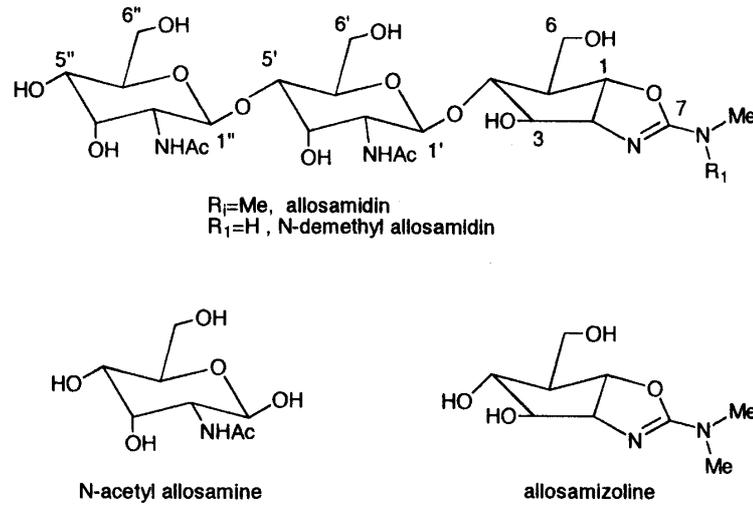
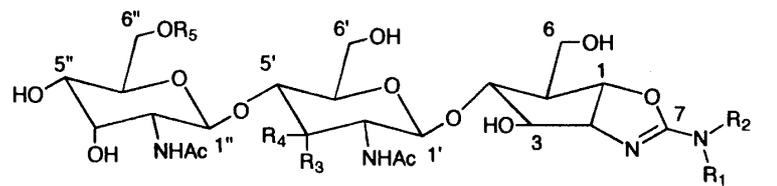


Fig. 4. Structures of allosamidin, demethyl allosamidin and their components.

リード化合物としての今後を期待している。さらに、*Candida albicans* の chitinase 阻害剤を探索すると、Fig. 5 に示した 3-7 の新規 allosamidin 類縁体が分離された。<sup>18)</sup> これら類縁体を用いて昆虫と酵母の chitinase に対する阻害活性と構造の相関を調べると、6'' 位の methyl 化と中央のアミノ糖の allosamine から glucosamine への変換は活性の傾向に大きな変化をもたらさないことが分かった。oxazoline 環上の dimethylamino 基を他の amino 基、monoalkylamino 基に置換する方法、位置選択的アシル化法を開発し、<sup>19)</sup> 10種以上の誘導体を合成した結果、アミノ基に置換するアルキル鎖の延長は顕著な活性の低下を招くが、6 位、または

6'' 位のアシル化物はある程度活性を維持していることが判明した。また、aminooxazoline 環の存在は活性に必須であり、demethyl 型が酵母、糸状菌の chitinase に有効であるという傾向は不変である。なお、allosamidin の非還元末端にある N-acetylallosamine を N-acetylglucosamine に置換した誘導体が合成され、<sup>20)</sup> その活性は大幅に低下することから、この位置の allosamine 骨格は必須である。

次に、allosamidin の生合成について述べる。<sup>14</sup>C 標識の D-glucose と D-glucosamine、D-[1-<sup>13</sup>C, 2-<sup>15</sup>N]glucosamine、L-[Guanidino-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-arginine、L-[MeS, <sup>13</sup>C] methionine の取り込み実験より、Fig. 6 に示したよう



## Natural allosamidins

	R1	R2	R3	R4	R5
1 allosamidin	Me	Me	OH	H	H
2 demethylallosamidin	Me	H	OH	H	H
3 didemethylallosamidin	H	H	OH	H	H
4 methylallosamidin	Me	Me	OH	H	Me
5 methyl-N-demethylallosamidin	Me	H	OH	H	Me
6 glucoallosamidin A	Me	Me	H	OH	Me
7 glucoallosamidin B	Me	H	H	OH	Me

Fig. 5. Congeners of allosamidin isolated from *Streptomyces*.

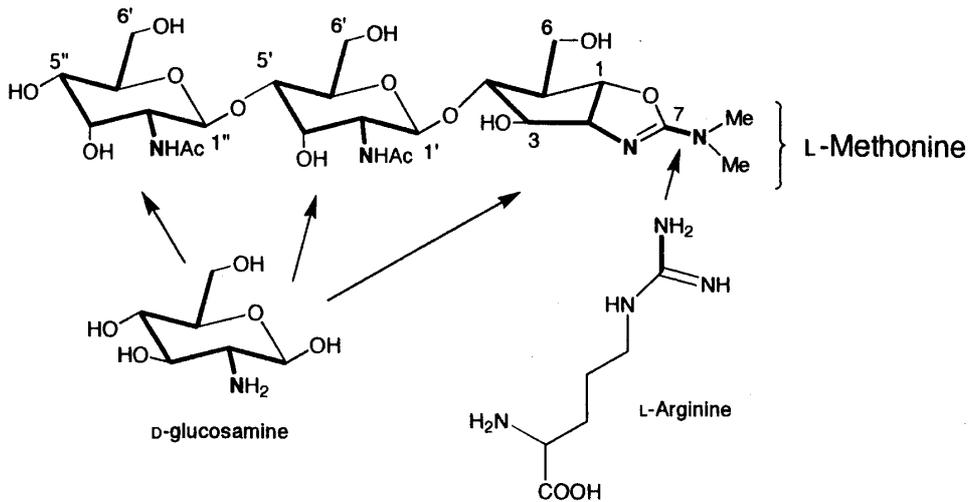


Fig. 6. Building blocks of allosamidin molecule.

に allosamine, allosamizoline の骨格には glucosamine がそのまま取り込まれていること, oxazoline 環 C7 位とそれに結合するアミノ基は arginine の guanidino 基から来ること, methyl 基は methionine 由来であることが明らかになった。<sup>21)</sup> demethylallosamidin は allosamidin に効率よく変換されることより, 生合成中間体であることが明らかになったが, didemethylallosamidin は取り込まれない。したがって, allosamidin の生合成の最終段階は Fig. 7 に示した経路であると考えている。<sup>22)</sup> 次に, D-glucosamine が allosamizolline のユニークな pentacyclitol にかに環化

するかは興味ある問題である。cyclitol の典型である *myo*-inositol の生合成においては, glucose-6-phosphate の 5 位がケトンに酸化され, それに伴い活性化された 6 位のメチレンと 1 位のアルデヒド基がアルドール縮合して C-C 結合が生成し, cyclohexane 骨格が生成する。pentacyclitol の生成機構を Fig. 8 に示した A, B, C の 3 経路の 1 つと想定し, 3, 4, 5, 6 位の水素をそれぞれ <sup>2</sup>H に置換した 4 種の D-glucosamine を合成し, 取り込み実験を行ったところ, 3 位と 4 位の <sup>2</sup>H は保持され, 5 位の <sup>2</sup>H は失われる。また, 6 位の <sup>2</sup>H の 1 つが失われることから, 6 位がアルデヒド基に酸化さ

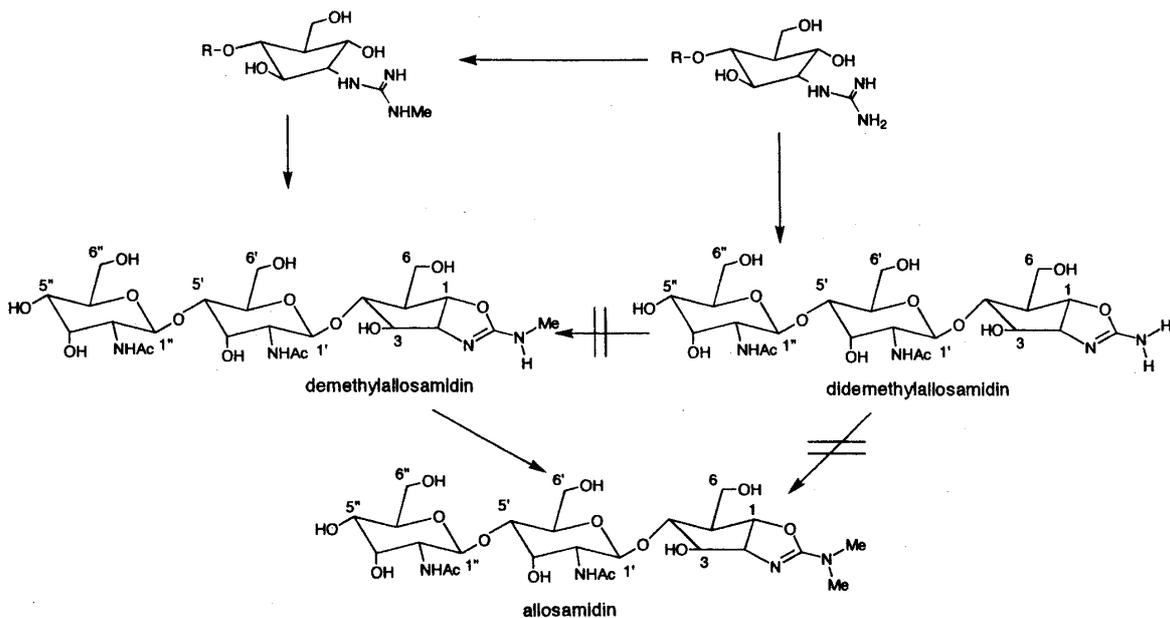


Fig. 7. Final steps of allosamidin biosynthesis.

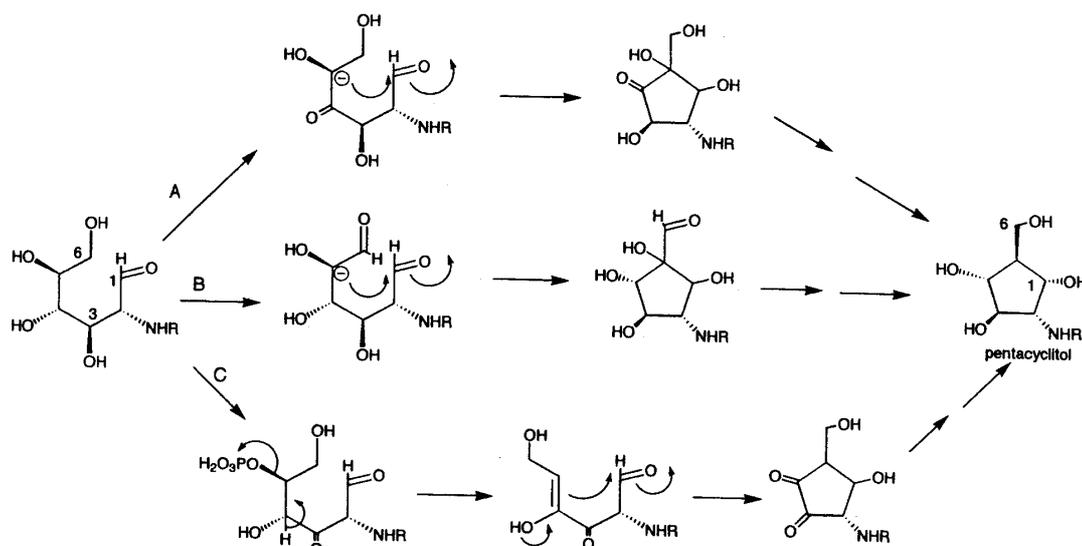


Fig. 8. Possible biosynthetic pathways of pentacyclitol leading to allosamizoline skeleton.

れ、5位が活性化される経路Bがもっとも可能性が高いものと考えられる。<sup>23)</sup>さて、放線菌より chitinase 阻害剤を探索すると高頻度で得られ(5/300)、活性物質は allosamidin 類縁体ばかりである。しかもその生産菌株はすべて(5株) chitinase を生産していた。allosamidin 生産性の高い1株でその chitinase 生産パターンを調べると、allosamidin 生産がない対数増殖初期に生産される allosamidin 感受性の chitinase (CS) と allosamidin 生産の始まった対数増殖後期から定常期にかけて生産される allosamidin 耐性 chitinase (CIS) の2種類が存在することが分かった。<sup>24)</sup>CS, CIS いずれも分子量は約44 kDaである。想像をたくましくすると、CS と CIS の細胞密度による使い分けは放線菌の chemical ecology における allosamidin など酵素阻害剤の役割を示唆しており、二次代謝物質の存在理由を考えるうえで興味を引く。

### 3. *Streptomyces* 属放線菌の自己調節因子

放線菌は原核生物に属するが、真核生物の糸状菌に類似した形態分化を行い、基底菌糸、気菌糸、分生孢子形成、発芽というライフサイクルを持っている。また本文はじめに述べたように、多くの生理活性二次代謝物質を生産するユニークな微生物である。1960年代末、ロシアの Khokhlov らは streptomycin 生産菌である *Streptomyces griseus* の streptomycin 非生産性変異株の2株が混合培養すると互いに相補し合って抗生物質生産を回復することを発見した。Khokhlov らは変異株の1つが低分子性で、抗生物質生産と形態分化を誘導

する信号伝達物質を極微量生産しており、この物質がもう一つの変異株の抗生物質生産を回復させることを見だし、A-factor (Autoregulating factor) と命名した。<sup>25)</sup>このような内因性因子で、数 nM の低濃度で生理的、形態的分化を誘導する物質は微生物ホルモンとも呼ばれてしかるべき物質であるが、本稿では一般名として Khokhlov の自己調節因子 (autoregulator) を採用した。以下 *Streptomyces* 属自己調節因子の構造、合成、作用機構に関わるレセプタータンパク質について簡単に解説する。

**3.1 *Streptomyces* 属自己調節因子の構造** ホルモン、フェロモン類は一般に比活性がきわめて大きく生産量が極微量であるが、放線菌自己調節因子もその例外でなく、その培養液中の濃度はせいぜい数十  $\mu\text{g/l}$  である。したがってその精製、構造決定は容易ではない。我々の経験でも、約1トンの培養液からの酢酸エチル抽出物数百gから、一回、数日を要する活性測定を行いつつ、2年の歳月をかけて精製した純粋な自己調節因子の量は1mgそこそこであった。Fig. 9に既知の *Streptomyces* 属放線菌自己調節因子の構造を示した。すべてブチロラクトン環をもつ比較的簡単な構造であるが、天然物が微量であるうえに新規骨格であるため、正しい絶対構造が出そろうまでに最初の A-factor で約10年かかっている。A-factor は形態分化、streptomycin 生産誘導以外にもその耐性をも誘導する因子である。<sup>26)</sup>Factor I (*Streptomyces viridochromogenes*) と、*Streptomyces bikiniensis*, *Streptomyces cyaneofuscatus* の因子は *S. griseus* において anthracycline 系抗生物質生産と形態

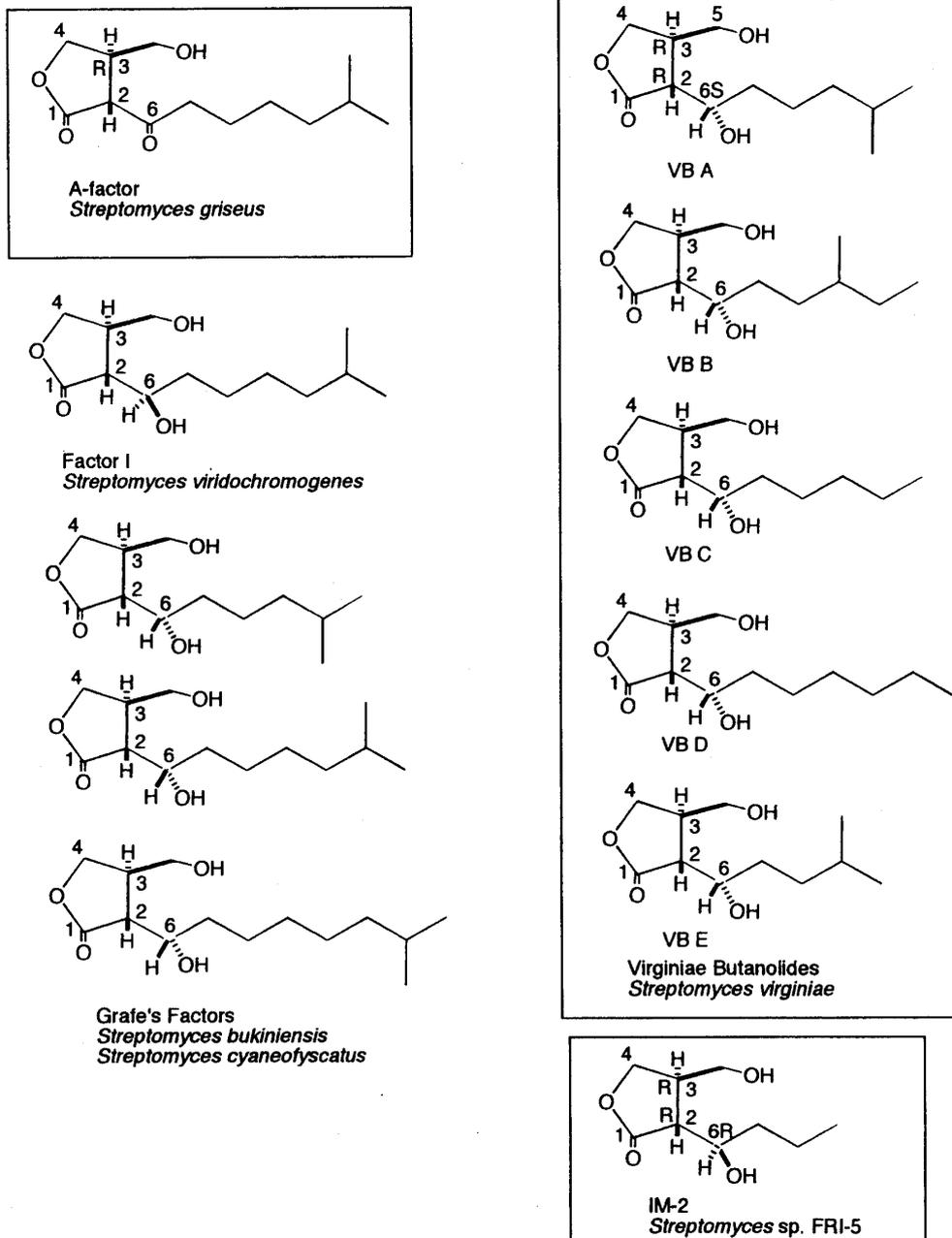


Fig. 9. Structures of butyrolactone autoregulators from *Streptomyces*.

分化を誘導する活性を持ち、ドイツのGräfeらによって分離、構造決定された。<sup>27,28)</sup> 他種の放線菌から分離されたものであるから内因性のものではないが、Gräfeらの*S. griseus*に類縁の自己調節因子が存在する可能性が大である。virginiae butanolide A-E (VB A-E)は柳本ら<sup>29,30)</sup>により発見され、筆者らにより分離、構造決定された*Streptomyces virginiae*の自己調節因子である。<sup>31,32)</sup> 当初IM (inducing material)とよばれており、抗生物質virginiamycinを誘導する因子である。IM-2

は、柳本らにより最初にその存在が指摘され、<sup>33)</sup> 筆者らにより分離、構造決定された因子である。<sup>34)</sup> D-cycloserine生産株、*Streptomyces sp. FRI-5*において青色色素生産誘導と抗生物質生産パターンをD-cycloserine型からnucleocidine型のshowdomycin, minimycinに変換する機能を持つ因子である。<sup>35)</sup> A-factor, VB, IM-2はいずれも数nMの低濃度で活性を示し、生産量も数十 $\mu\text{g/l}$ である。構造上の共通点は、3位にhydroxymethyl基が置換したブチロラク톤の基本骨格であ

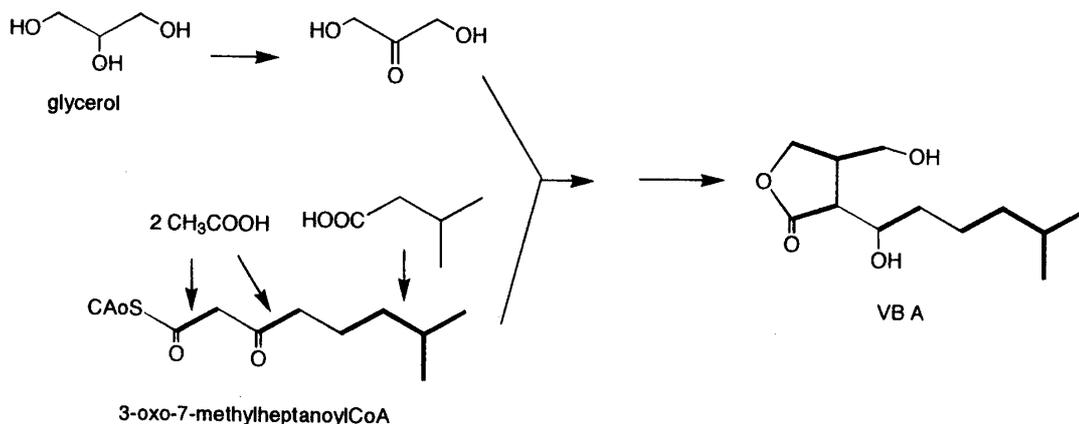


Fig. 10. Building blocks of VB A molecule.

り、2位には1'-oxoまたは1'-hydroxyalkyl基がtransの配位で置換している点である。<sup>36)</sup>絶対構造はFig. 9に示したとおり、A-factorは2R, 3R,<sup>37,38)</sup>VBは2R, 3R, 6S,<sup>36,39)</sup>IM-2は2R, 3R, 6S<sup>40)</sup>と決定された。相違点は、(1)6位の酸化還元状態で、カルボニル基か水酸基の違い、(2)水酸基の配向がVB型かIM-2型か、(3)2位アルキル側鎖の鎖長と分岐状態の3点である。なおGräfeのfactorについての絶対構造は不明である。ブチロラクトン型自己調節因子の*Streptomyces*属における分布は広く、筆者ら、別府ら、Gräfeらの結果から推定すると、約60%の種がこれらの因子を生産している。

**3.2 Virginiae butanolide (VB A)の生合成** さて、このようなユニークな構造を持つ物質の生合成経路はどうなっているのであろうか。大いに興味ある点である。*S. virginiae*のVB生産量は既述のようにきわめて低く、同位元素標識中間体の取り込み実験は難しいが、幸運にも*Streptomyces antibioticus*の一菌株が比較的多量のVB A(数mg/l)を生産していることを発見したため、この菌株を用いて生合成の実験を行った。<sup>41)</sup><sup>13</sup>C,<sup>2</sup>Hで標識したグリセロール、酢酸、イソ酪酸の取り込み実験より、VB A分子を構成している前駆体はFig. 10で示したように取り込まれ、特に3-oxo-7-methyl-octanoyl CoA(3)が鍵中間体であることが明らかになった。<sup>42,43)</sup>これらの結果に基づきFig. 11に示したA, B二つの経路を推定し、考えられる中間体、3, 4, 5, 6を合成し、*S. antibioticus*細胞抽出粗酵素液と反応させ、生成したVB Aの収率からBの経路がもっとも可能なものであると結論した。<sup>44)</sup>5から6の反応は還元を伴い、NADHを要求する。また、6-dehydro VB AからVB Aへの還元反応は脂肪酸合成系と同様

NADPH要求性である。*Streptomyces*の主な3種類のブチロラクトン型自己調節因子は基本的にはVB Aと同様の生合成経路を経て生成するが、鍵中間体のβ-ケト酸の生合成スターターの差異、6-デヒドロ型からの脱水素酵素の性質によりA-factor型、VB型、IM-2型に分かれると考えられる。*Streptomyces*属放線菌はVal, Leu, Ile由来のスターターから生合成される分岐した脂肪酸を膜成分として含有していることを考慮すると、<sup>45)</sup>鍵中間体β-ketoacylCoAが一次代謝物質生合成経路からの直接の前駆体であり、ブチロラクトン型自己調節因子の2位側鎖の多様性も納得できるものである。

**3.3 自己調節因子のレセプタータンパク質とその作用機構** ブチロラクトン型自己調節因子は極低濃度細胞外に分泌され、他の細胞に形態分化、生理的分化を誘導する機能があること、基本構造が*Streptomyces*属で同じである点を考慮すると、一種の微生物ホルモンともいえる。したがって、このような低分子による信号伝達上流の中継者として、分化を制御するレセプタータンパク質の存在が考えられる。この仮説に基づき、*S. virginiae*の細胞中よりVBレセプターを検索した。検索用放射能標識リガンド設計にあたり、VBの構造と活性を調べた結果、<sup>46)</sup>このコンパクトな分子中のすべての官能基が必須であることが判明したのでFig. 12に示した<sup>3</sup>H標識VBC<sub>7</sub>を合成し、レセプター検索性リガンドとした。<sup>47)</sup>その結果、*S. virginiae*細胞抽出液中にVB結合活性のあるタンパク質を確認した。VBレセプター(butyrolactone autoregulator receptor A: BarA)は1ゲノムあたり30-40分子の低濃度で存在し、VBとのK<sub>d</sub>値は数nMという強い結合活性を示した。<sup>48)</sup>BarA精製中つねにこれと挙動を共にし、当

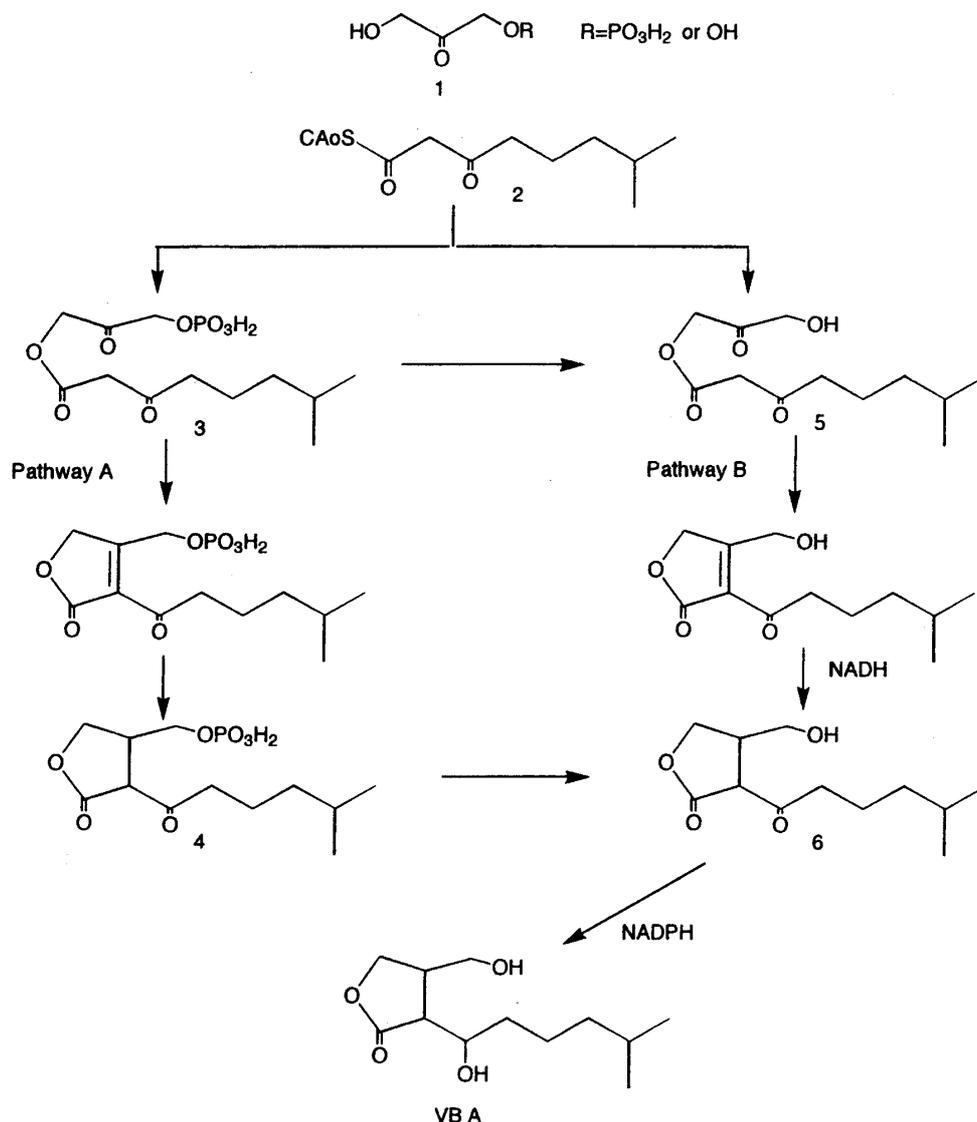


Fig. 11. Possible biosynthetic pathways of VB A.

初レセプターと誤認したタンパク質 VbrA<sup>49)</sup>を苦労を重ねたすえ取り除き、精製に成功した。<sup>50)</sup>ちなみに、VbrA は *Escherichia coli* の antiterminator NusG に相当し、BarA の保護作用も示した。BarA の分子量は SDS-PAGE で 26 kDa、未変性状態のゲルろ過では 52 kDa であり、ホモダイマー構造をとっていることが分かった。BarA の部分アミノ酸配列を基に、定法によりその遺伝子 *barA* を大腸菌にクローニングし、その塩基配列より全体のアミノ酸配列を決定した。*barA* は 232 残基のアミノ酸をコードし、これに基づく分子量は 25001 である。各種データベースによるホモロジー検索では既知の類似タンパク質は見つからなかった。C-末端に Ala 残基と酸性アミノ酸残基の多いことが特徴である。<sup>50)</sup> N-末端に DNA 結合モチーフであ

る helix-turn-helix 構造をとるアミノ酸配列があり、ダイマー構造をとることも考慮すると VB の結合でプロモーターサイトから離れるリプレッサータイプのタンパク質であることが予想された。この機能は現在、実験的に確認されている。*barA* を *Streptomyces lividans* に導入すると効率よく発現され、その細胞抽出液は強い VB 結合活性を示す。*barA* は大腸菌で活性体 rBarA の大量発現が可能であり、その性質の詳細な研究が進行中である。しかしながら、純粋な状態では失活しやすく、二次、三次構造の究明には時間がかかりそうである。筆者らは最近 <sup>3</sup>H で標識した IM-2 型のリガンドを合成し、これを用いて IM-2 レセプタータンパク質を *Streptomyces* sp. FRI-5 株細胞中に確認し、その精製に成功した。IM-2 レセプタータンパク質 (FarA と命

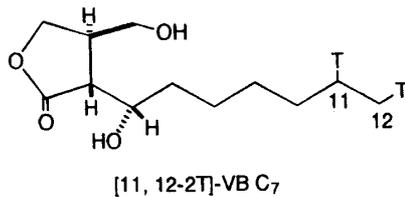


Fig. 12. Tritium labeled VB C<sub>7</sub> prepared for receptor protein assay.

名)は分子量 27 kDa で、ホモダイマー構造をとり、 $K_d$  値は 1.3 nM, その性質は BarA に類似している。<sup>51)</sup> 遺伝子 *farA* のクローニング, 塩基配列決定も終了しており, BarA との詳細な構造の比較が可能である。FarA は 221 アミノ酸残基からなり, N-末端に BarA 同様, helix-turn-helix DNA 結合モチーフが存在する。また, その他にアミノ酸レベルで類似性の高い領域を持っていることが分かった。<sup>52)</sup>

*S. griseus* の A-factor レセプタータンパク質に関しては東大グループの研究が進行しており, 分子量 29 kDa のタンパク質が明らかにされた。<sup>53)</sup> 最近, その精製, 遺伝子のクローニングが終了し, *arpA* と命名された。ArpA は 276 アミノ酸残基よりなり, ダイマー構造をとる点, N-末端に helix-turn-helix DNA 結合モチーフをとることなど, BarA 類似のタンパク質である。<sup>54)</sup> BarA, FarA, ArpA は総合的な構造, 機能は類似しているが, 塩基配列のホモロジーは低く, たとえば *barA* をプローブとした *Streptomyces* sp. FRI-5 と *S. griseus* の染色体 DNA のサザン解析結果は陰性である。各レセプターはそれぞれの自己調節因子に特異的に結合する。いずれも対応する自己調節因子と結合し, プロモーターサイトから遊離して, 次の遺伝子の転写を正に制御し, 生理的分化, 形態分化の引き金を引くものと考えられ, その機構の解明が現在進行中である。

微生物といえどもその分化の仕組みは簡単であるはずはない。特に形態分化に関しては 2 重, 3 重の制御システムが存在し, それに関わる遺伝子が数多く存在することは, 枯草菌の例をみれば明らかである。*Streptomyces* 属の自己調節因子の分化制御機構に関する我々の知見もまだすこぶる乏しいものであり, 一般の認識も低いと思われる。しかし, 放線菌の土壌中やその他の生物圏での豊富さ, 多様な二次代謝物質生産能力を考慮すると, このような微生物ホルモン様因子に関する今後の研究は, 基礎, 応用の両面できわめて重要である。ブチロラクトン型自己調節因子は簡単で特異な構造であり, 極微量で有効であり, 化学合成も比較的

容易である。今後, 有用二次代謝物質の探索, 増産,<sup>55)</sup> 微生物生態学的基礎研究, その成果を踏まえた微生物農薬としての開発など夢の多い物質群である。自己調節因子の生態学上の役割を考えてみると, 微生物の二次代謝物質生産の意味など, 本稿はじめに掲げた疑問へ解答の一部が見えてくる。微生物の抗生物質などの生産は, 土壌中などの貧栄養環境では確認されていない。<sup>56)</sup> 二次代謝物質生産は共生, 寄生, 人工培養など, 主に富栄養下に見られる現象である。富栄養条件下では, これに適応した微生物が急速に増殖し, その機会を利用して一気に自己遺伝子の増加を図る。この際, 栄養源の枯渇, 細胞密度の増加限界を感知すると, 一部の微生物は自己調節因子などの信号伝達物質を合成, 分泌し, 子孫をのこすための胞子形成, あるいは他種生物を排除する抗生物質の合成を同調的に誘導し, 生き残りの効率化をもたらす。ちなみに, 有力二次代謝物質生産微生物は植物病原性, 共生性のものが多い。この 20 年来グラム陰性菌の信号伝達物質の研究が盛んになってきている。1970 年代初期からの海産共生性発光菌である *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* の luciferase 発現制御機構の研究から, 自己誘導因子 (autoinducer) と一般に呼ばれる *N*-acylhomoserine lactone 構造を共有する一群の信号伝達物質が発見された。これらの自己誘導因子はブチロラクトン環をもつ低分子化合物であり, 極微量細胞外に分泌され, 細胞密度に依存してその濃度が上昇して生物発光, 分泌酵素の増産, 抗生物質生産, プラミドの接合伝達などそのコロニー全体の生理的分化を誘導する機能がある。<sup>57)</sup> 最近では, *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium leguminosarum* などこれら因子が発見され, その生化学, 分子生物学, 生態学に多くの欧米の研究グループが取り組んでいる。対象はいずれも植物病原菌, 日和見感染菌, 共生菌である。富栄養状態でのその種のコロニーとしての生き残り戦略に関わる因子であり, 放線菌同様, 二次代謝物質生産を誘導する場合もある。このような信号伝達物質による制御機構が明らかになってくると, 二次代謝物質は決して無駄に生産されているのではないことが分かる。二次代謝物質の化石はほとんどないので地質学的根拠はないが, 数十億年の歴史を持つ微生物の生産物はその生産者同様に長い歴史を持ち, その機能も重要なものであろう。

本総合論文記載の研究の大部分は、私の主宰する研究室が発足した前後からその端を発したものの一部であり、この12-15年来の成果である。これらの研究は又、先達の苦勞を重ねて得た成果を受け継いだものでもある。Penicillium urticae 代謝産物の関口順一信州大学教授、chitinase 阻害剤の鈴木昭憲東大名誉教授、磯貝彰奈良先端科学技術大学教授、放線菌自己調節因子の故照井堯造阪大名誉教授、柳本正勝博士（農水省食品総合研究所）に厚く感謝する。また、協同研究者の仁平卓也助教授、作田庄平助手（現在東大助教授）をはじめ、多くの大学院、学部学生に厚く感謝する。

### 文 献

- 1) Abraham, E. P.: *Chemistry and Biology of  $\beta$ -Lactam Antibiotics, Penicillins and Cephalosporins* (Ed. Morin, R. B., Gorman, M.), Vol. 1, p. 22-38, Academic Press (1982).
- 2) Birkinshaw, J. H., Bareken, A., Michael, S. E., and Raistrich, H.: *Lancet*, **245**, 625-630 (1943).
- 3) *Handbook of Microbiology*, Vol. 3, *Microbial Products* (Ed. Laskin, A. I., Lechevalier, H. A.), p. 567, CRC Press, Cleveland (1973).
- 4) 関口順一: *醸酵工学*, **61**, 129-137 (1983).
- 5) Sekiguchi, J., Gaucher, G. M., and Yamada, Y.: *Tet. Lett.*, **41**, 41-42 (1979).
- 6) Sekiguchi, J., Kuroda, H., and Yamada, Y.: *Tet. Lett.*, **26**, 2341-2342 (1985).
- 7) Rodphaya, D., Sekiguchi, J., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **39**, 629-635 (1986).
- 8) Makita, M., Yamada, Y., and Okada, H.: *J. Antibiot.*, **39**, 1257-1262 (1986).
- 9) Rodphaya, D., Nihira, T., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **41**, 1649-1658 (1988).
- 10) Rodphaya, D., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **42**, 752-760 (1989).
- 11) Sakuda, S., Otsubo, Y., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **48**, 85-86 (1995).
- 12) Sakuda, S., Miki, K., Kitaoka, S., Reugjichachawaly, M., and Yamada, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 133-134 (1995).
- 13) Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S., and Suzuki, A.: *J. Antibiot.*, **40**, 296-300 (1987).
- 14) Sakuda, S., Isogai, A., Makita, T., Mastumoto, S., Koseki, K., Kodama, H., and Suzuki, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3251-3259 (1987).
- 15) Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S., Suzuki, A., Koseki, K., Kodama, H., and Yamada, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1615-1617 (1988).
- 16) Sakuda, S., Nishimoto, Y., Ohi, M., Watanabe, M., Takayama, S., Isogai, A., and Yamada, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1333-1335 (1990).
- 17) Yamanaka, S., Nako, T., Kikuchi, R., Takayama, S., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **40**, 171-174 (1994).
- 18) Nishimoto, Y., Sakuda, S., Takayama, S., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **44**, 716-722 (1991).
- 19) Kinoshita, M., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1699-1703 (1993).
- 20) Terayama, H., Kuzuhara, H., Takahashi, S., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2067-2069 (1993).
- 21) Zhou, Z., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1992**, 1649-1652 (1992).
- 22) Zhou, Z., Sakuda, S., Kinoshita, M., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **46**, 1582-1588 (1993).
- 23) Sakuda, S., Zhou, Z., Takao, H., and Yamada, Y.: *Tet. Lett.*, **37**, 5711-5714 (1996).
- 24) Wang, Q., Zhou, Z., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 467-470 (1993).
- 25) Khokhlov, A. S.: (IUPAC), *Frontier of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology*, Pergamon Press, Oxford and New York, p. 201-210 (1980).
- 26) Hara, O. and Beppu, T.: *J. Antibiot.*, **35**, 1208-1215 (1982).
- 27) Gräfe, U., Schade, W., Eritt, I., Fleck, W. F., and Radic, L.: *J. Antibiot.*, **35**, 1722-1723 (1982).
- 28) Gräfe, U., Reinhardt, G., Schade, W., Eritt, I., Fleck, W. F., and Radics, L.: *Biotechnol. Lett.*, **5**, 591-596 (1983).
- 29) Yanagimoto, M. and Terui, G.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 611-618 (1971).
- 30) 柳本正勝, 山田靖宙, 照井堯造: *醸酵工学*, **57**, 6-14 (1979).
- 31) Yamada, Y., Sugamura, K., Kondo, K., Yanagimoto, M., and Okada, H.: *J. Antibiot.*, **40**, 496-504 (1987).
- 32) Kondo, K., Higuchi, Y., Sakuda, S., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **42**, 1873-1876 (1989).
- 33) Yanagimoto, M. and Enatsu, T.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 545-550 (1983).
- 34) Sato, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M., and Yamada, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 170-173 (1989).
- 35) Hashimoto, K., Nihira, T., Sakuda, S., and Yamada, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 449-455 (1992).
- 36) Sakuda, S. and Yamada, Y.: *Tet. Lett.*, **32**, 1817-1820 (1991).
- 37) Mori, K. and Yamane, K.: *Tetrahedron*, **38**, 2919-2921 (1982).
- 38) Mori, K.: *Tetrahedron*, **39**, 3107-3109 (1983).
- 39) Mori, K. and Chiba, N.: *Liebigs Ann. Chem.*, **31**-37 (1990).
- 40) Mizuno, K., Sakuda, S., Nihira, T., and Yamada, Y.: *Tetrahedron*, **50**, 10849-10858 (1994).
- 41) Ohashi, H., Zheng, Y. H., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **42**, 1191-1195 (1989).
- 42) Sakuda, S., Higashi, A., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 898-899 (1990).
- 43) Sakuda, S., Higashi, A., Tanaka, S., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 663-668 (1992).
- 44) Sakuda, S., Tanaka, S., Mizuno, K., Sukcharoen, O., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Chem. Soc.*,

- Perkin Trans. I*, **1993**, 2309-2315 (1993).
- 45) Suutari, M. and Laakso, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2338-2340 (1992).
- 46) Nihira, T., Shimizu, Y., Kim, H. S., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **41**, 1828-1837 (1988).
- 47) Kim, H. S., Nihira, T., Tada, H., Yanagimoto, M., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **42**, 769-778 (1989).
- 48) Kim, H. S., Tada, H., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Antibiot.*, **43**, 692-706 (1990).
- 49) Okamoto, S., Nihira, T., Kataoka, H., Suzuki, A., and Yamada, Y.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 1093-1098 (1992).
- 50) Okamoto, S., Nakamura, T., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 12319-12326 (1995).
- 51) Ruengtchatchawalya, M., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Bacteriol.*, **177**, 551-557 (1995).
- 52) Waki, M., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Bacteriol.*, **179**, in press (1997).
- 53) Miyake, K., Horinouchi, S., Yoshida, H., Chiba, H., Mori, K., Nogawa, N., Morikawa, N., and Beppu, T.: *J. Bacteriol.*, **171**, 4298-4302 (1989).
- 54) Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T., and Horinouchi, S.: *J. Bacteriol.*, **177**, 6083-6092 (1995).
- 55) Yang, K. Y., Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., Nihira, T., and Yamada, Y.: *Biotechnol., Bioeng.*, **46**, 437-444 (1995).
- 56) Yanagida, T.: *Microbial Science & Ecology*, Gakkai Shuppan Center, p. 63 (1984).
- 57) Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P.: *J. Bacteriol.*, **16**, 269-275 (1994).