

〔醸酵工学会誌 第69巻 第2号 89-105. 1991〕

総 合 論 文

放線菌信号伝達物質の構造と機能

(平成2年度日本醸酵工学会斎藤賞受賞)

仁 平 卓 也*

大阪大学工学部醸酵工学科
〒565 吹田市山田丘2-1Structure and function of autoregulators from *Streptomyces* species. —Monograph—

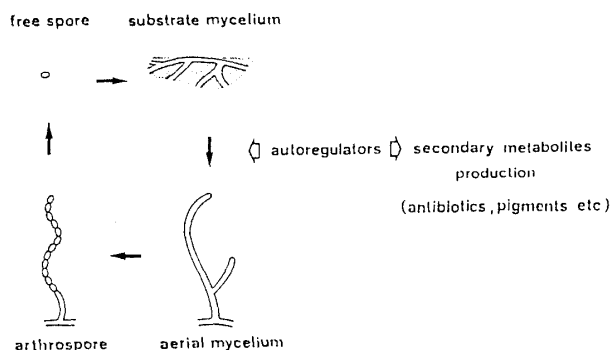
TAKUYA NIHIRA* (Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565) Hakkokogaku 69: 89-105, 1991.

Actinomycetes are Gram-positive bacteria characterized by their versatile ability to produce secondary metabolites. One of the most interesting features of these microorganisms is their ability to produce endogenous and exogenous signal molecules which control both the cytodifferentiation and secondary metabolism. These have sometimes been called “autoregulators”, and so far 10 autoregulators have been isolated from *Streptomyces* species and their structures elucidated. Among them, we have found 6 signal molecules, i.e., virginiae butanolide A, B, C, D, E which trigger virginiamycin production of *Streptomyces virginiae* and IM-2 which triggers blue pigment production by *Streptomyces* sp. FRI-5. To know the complex regulation mechanism on secondary metabolism in *Streptomyces* species, signal transmission mechanism involved in the autoregulators seems important. This paper summarizes our previous work, and the following findings are discussed. i) Isolation and structure elucidation of virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*. Virginiae butanolides are effective even at 1 ng/ml in initiating virginiamycin production. ii) Isolation and structure elucidation of IM-2 from *Streptomyces* sp. FRI-5. IM-2 is effective at 0.6 ng/ml in initiating blue pigment production, and shares the same butyrolactone moiety as virginiae butanolides, but is more hydrophilic due to its shorter substituent at position 2. iii) The distribution of virginiae butanolides and IM-2 among *Streptomyces* species. Virginiae butanolides and IM-2 are found to be distributed in about 14% and 11%, respectively, of antibiotic producing *Streptomyces* species. iv) The relationship between structure and activity of virginiae butanolide C using 41 synthetic analogs to clarify the essential moiety in its structure. v) Identification, purification and characterization of virginiae butanolide-binding protein which seems to mediate pleiotropic signal transmitted by virginiae butanolides in *Streptomyces virginiae*.

土壌微生物である放線菌は、抗生物質をはじめ酵素、酵素阻害剤や色素などきわめて多様な有用産物を生産する菌群であり、工業生産上重要な位置を占めている。また、放線菌は、原核生物であるにもかかわらず、形態分化を示し、固体培地上で孢子→基底菌糸→気中菌糸→孢子という複雑な生活環 (Fig. 1) を示すことか

ら、原核生物の中で進化の最先端にいる微生物群と考えられ、抗生物質などの工業生産という応用面のみならず、形態分化の機構、あるいは、制御という基礎的な面からも非常に興味深い菌群である。この放線菌によって生産される抗生物質などの有用産物の大多数は、菌の生育に直接には必要とされない、いわゆる二次代謝産物であり、これら二次代謝物質の生産は、通常培養後期に始まる。この二次代謝産物の生産期は、

* 連絡先, Corresponding author.

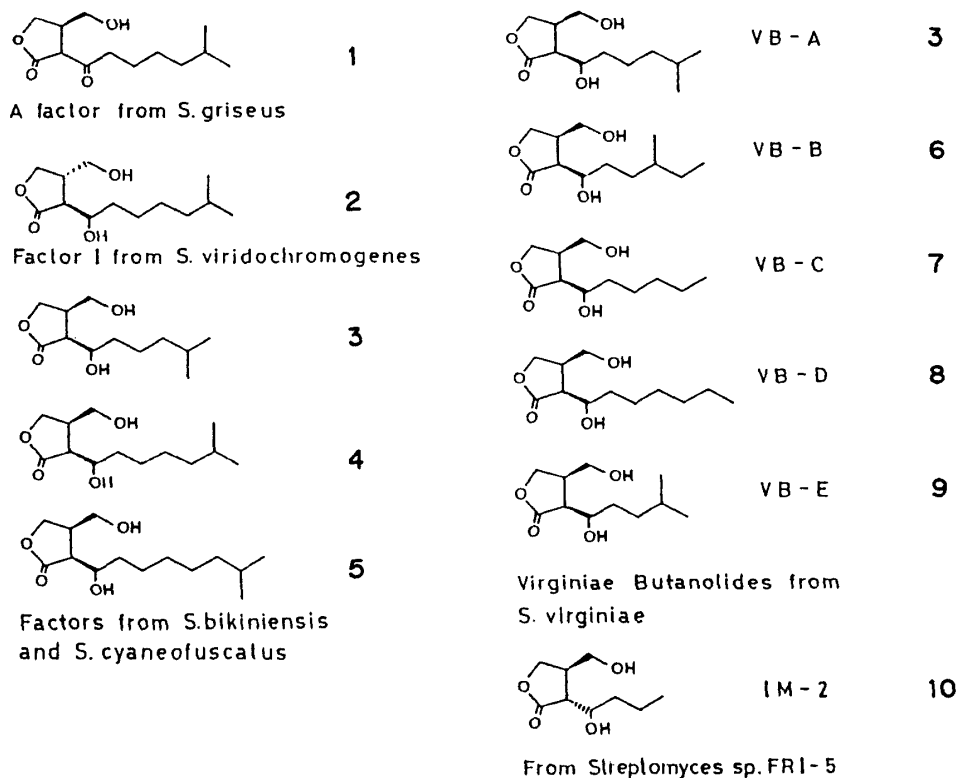
Fig. 1. Life cycle of *Streptomyces* sp.

同時に胞子形成の準備段階としての気中菌糸の形成開始の時期でもあり、二次代謝の開始と形態分化とが密接に関連していることが従来より推定されてきていた。実際に、これら形態分化と二次代謝という2種の非常に異なった表現形質をつなぐ化学物質として、これら2形質を同時に制御する低分子の信号伝達物質が、放線菌群のうち、*Streptomyces* 属に属する菌群より見いだされてきている。これら信号伝達物質（自己調節因子、または autoregulator と呼ばれる）(Fig. 2) は、きわめて微量生産されるにすぎないが、非常に強い活性を持ち、自己および他の細胞の形態分化や二次

代謝物質の生産を誘導する。これら放線菌の信号伝達物質は、極微量の生産量、強い生理活性、また後に述べるようにリセプタータンパク質の存在など、真核生物におけるホルモンと類縁の性質を有しており、原核生物におけるホルモンとみなすことができよう。現在までに、我々および他の研究グループによって見いだされた *Streptomyces* 属由来の信号伝達物質を、Fig. 2 に示した。

もっとも古くから知られ、また研究の進んでいるのは、A-factor (1) であろう。A-factor は、*Streptomyces griseus* より1970年代にソ連の Khokhlov らによって単離された化合物で、*S. griseus* の streptomycin 非生産、胞子着生欠損変異株を回復させる能力を持つ。¹⁾ 構造的には、2位に 1'-oxo-6'-methylheptyl 基、3位に hydroxymethyl 基が置換した2置換 butanolide 骨格を持つ、ユニークな構造の化合物である。3位の絶対構造は、森らにより合成法で(R)と決定されている。²⁾

A-factor 以外に、放線菌由来の分化または抗生物質誘導因子として、B-factor,³⁾ Factor C,⁴⁾ pamamycin^{5,6)} などが報告されるが、A-factor と同じ butanolide 骨格を持つものとしては、東独の Gräfe らによって単離された、*S. viridochromogenes* 由来の Factor I (2)⁷⁾ および、

Fig. 2. Structures of signal molecules isolated from *Streptomyces* sp.

S. bikiniensis と *S. cyaneofuscatus* 由来の3種の化合物(3, 4, 5)⁸⁾がある。Gräfe らは、アントラサイクリン系抗生物質を生産する *S. griseus* の抗生物質非生産、気菌糸欠損変異株を用い、両形質を回復させる因子を他種の放線菌からスクリーニングした結果、上記4種の化合物を分離し、構造決定した。いずれも数百 mg/ton の微量生産量であり、A-factor 同様～ng/ml の濃度で、形態分化と抗生物質生産を誘導する能力を持つ。

さて、Virginiae butanolide (VB) と我々が命名した VB-A (3), VB-B (6), VB-C (7),⁹⁾ VB-D (8), VB-E (9)¹⁰⁾ の5種の化合物は、抗生物質 virginiamycin の生産を誘導する因子として *S. virginiae* より単離、構造決定した化合物である。また、*Streptomyces* sp. FRI-5 株からは、本菌による青色色素の生産を誘導する因子として、IM-2 (10) を単離、構造決定している。¹¹⁾ *S. virginiae* については、1971年に当醸酵工学科の柳本、照井により virginiamycin 生産誘導因子の存在が報告されていたが、^{12,13)} 当時の分離分析技術では、単離構造決定にいたらなかったものを、後年当研究室で引継ぎ、単離、構造決定に成功したものであるし、また青色色素誘導因子についても、この FRI-5 株が内因性の誘導因子をもつことは、柳本、江夏によりすでに1983年¹⁴⁾に報告されていたものを、のちに我々が単離し、構造決定したものである。いずれも、先達により完成されたすぐれたアッセイ系があったればこそ、我々が単離に成功したわけであり、20数年昔に、何らかの低分子因子が抗生物質の生産を誘導するという現象に気づき、アッセイ系を組み上げた柳本ら

の研究に、我々が負うところは大きい。

上記10種類の化合物は、いずれも2置換 butanolide 骨格を持ち、2位に1'-oxoまたは1'-hydroxyalkyl基が、3位に hydroxymethyl 基が置換した共通の構造をしており、*Streptomyces* 属において、butanolide 型の信号伝達物質が普遍的に存在することを予想させる。本稿では、過去5年間に当研究室で、主にVBについて得られた知見を順次述べていきたい。

1. *Streptomyces virginiae* の生産する virginiamycin 生産誘導因子, virginiae butanolide A～E の単離と構造^{9,10)}

S. virginiae を液体培養すると、virginiamycin の生産は培養開始後14時間から始まり、24時間目には一定量に達する。抗生物質生産の約2時間前、すなわち培養12時間目に内因性の誘導因子の生産が始まり、14時間目には一定量に達する。柳本らの考案したアッセイ法は、培養8時間目の菌体を集菌後、新鮮な培地に再懸濁し、誘導因子を含むサンプルを加えてさらに2時間培養後、培養上清中に抗生物質が誘導生産されているか否かを検定する方法である。A-factor など他の因子の研究では、何らかの欠損変異株を用い、固体培地上最低1週間はアッセイに必要であるが、柳本の方法では、野生株を用い、液体培養を行うことにより、手間はかかるが、約1日でアッセイが終了し、結果が得られるという大きな利点がある。Table 1 に VB-A～C の、Fig. 3 に VB-D, E の精製工程を示すが、いずれも1トンスケールの培養液から出発して、最終的には逆

Table 1. The yield and activity of inducing factor at each purification step.

Step	Yield	Activity (U)	Specific activity (U/mg)
1. EtOAc extract	318 g	6×10^7	190
2. EtOAc extract after hydrolysis	167 g	4×10^7	240
3. Amberlyst A-21	35.9 g	3×10^7	840
4. Alumina column	21.9 g	$>3 \times 10^6$	—
5. <i>n</i> -Hexane-2-PrOH soluble part	16.6 g	$>1 \times 10^7$	—
6. 1st System 500	2.01 g	1×10^7	5,000
7. 2nd System 500	461 mg	2×10^7	43,000
8. Final HPLC (ODS)			
VB A	0.823 mg	1.3×10^6	1.6×10^6
VB B	1.271 mg	1.3×10^5	1.0×10^5
VB C	1.210 mg	5×10^5	4.1×10^5

One unit was defined as the minimum amount of VBs per ml of the assay medium to induce virginiamycin production under the assay conditions.

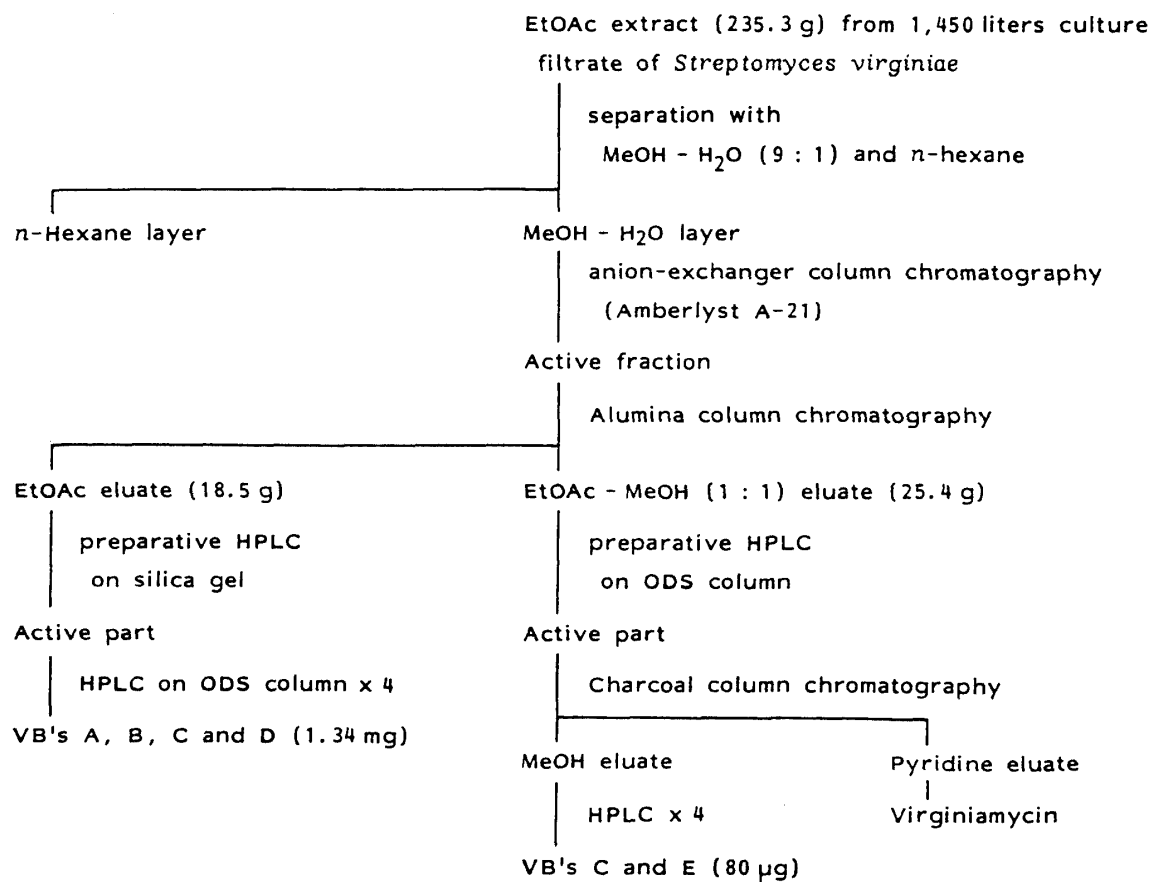


Fig. 3. Purification procedure of VB's A, B, C, D, and E.

相 HPLC での分離を 4 回繰り返す、各々単一ピークにまで精製した。最終収量は、VB-A, B, C, E で各々約 1 mg, VB-D では 0.08 mg という微量であった。これら単離した天然物の構造は $^1\text{H-NMR}$ をはじめ常用の各種スペクトロメトリーおよび化学合成により Fig. 2 に示したように決定した。現在 2, 3 位および 6 位の立体配置について同僚の作田博士が、詳細な検討を加えているところであり、近い将来最終的な立体構造を提出できるものと考えている。

現在までに分離した VB 5 種類のうち、もっとも活性が高い化合物は、VB-A であり、0.6 ng/ml で virginiamycin の生産を誘導する能力を持つ。次いで、VB-D > VB-C > VB-B ~ VB-E の順で活性が低下するが、もっとも弱い VB-B, E でも 10 ng/ml で有効であり、いずれもきわめて活性の強い誘導因子であると結論される。

2. *Streptomyces virginiae* butanolide C の構造—活性相関¹⁵⁾

Streptomyces virginiae からは VB-A ~ E の 5 種類の信号伝達物質を単離しているわけであるが、いずれも非常に類似しており、異なるのは、2 位側鎖の長さおよび

分岐鎖の位置のみである。構造的には、非常にコンパクトであり、どの構造単位が誘導活性発現に必要なかは興味深い点である。また、後のリセプタータンパク質の研究を行う際に、放射能ラベルのリガンドやアフィニティ担体の合成が必要となってくるわけであるが、その際 VB の構造にどの程度の変更を加えるのかという知見が必須となってくる。そこで、VB-C をモデル化合物として選び、Fig. 4 に示すような 41 種類の類縁体を合成し、これらの誘導活性を比較した。合成法や各種スペクトルデータは、割愛するが、興味のあるむきは現報を参照されたい。まず、2, 3 位の側鎖を持たない化合物 (butanolide, cyclopentane, cyclopentanone, tetrahydrofuran, 2-pyrrolidone) の活性を調べたところ、100 µg/ml の濃度でまったく活性を示さず、また VB-C (10 ng/ml) による誘導を阻害しなかった。したがって、5 員環の基本骨格のみでは、まったく誘導活性がなく、2, 3 位の側鎖が、誘導活性発現に必要なことは明白である。

Fig. 4 の各種類縁体は、3 グループに分類することができる。グループ 1 (11, 12, 13) は、3-hydroxy-

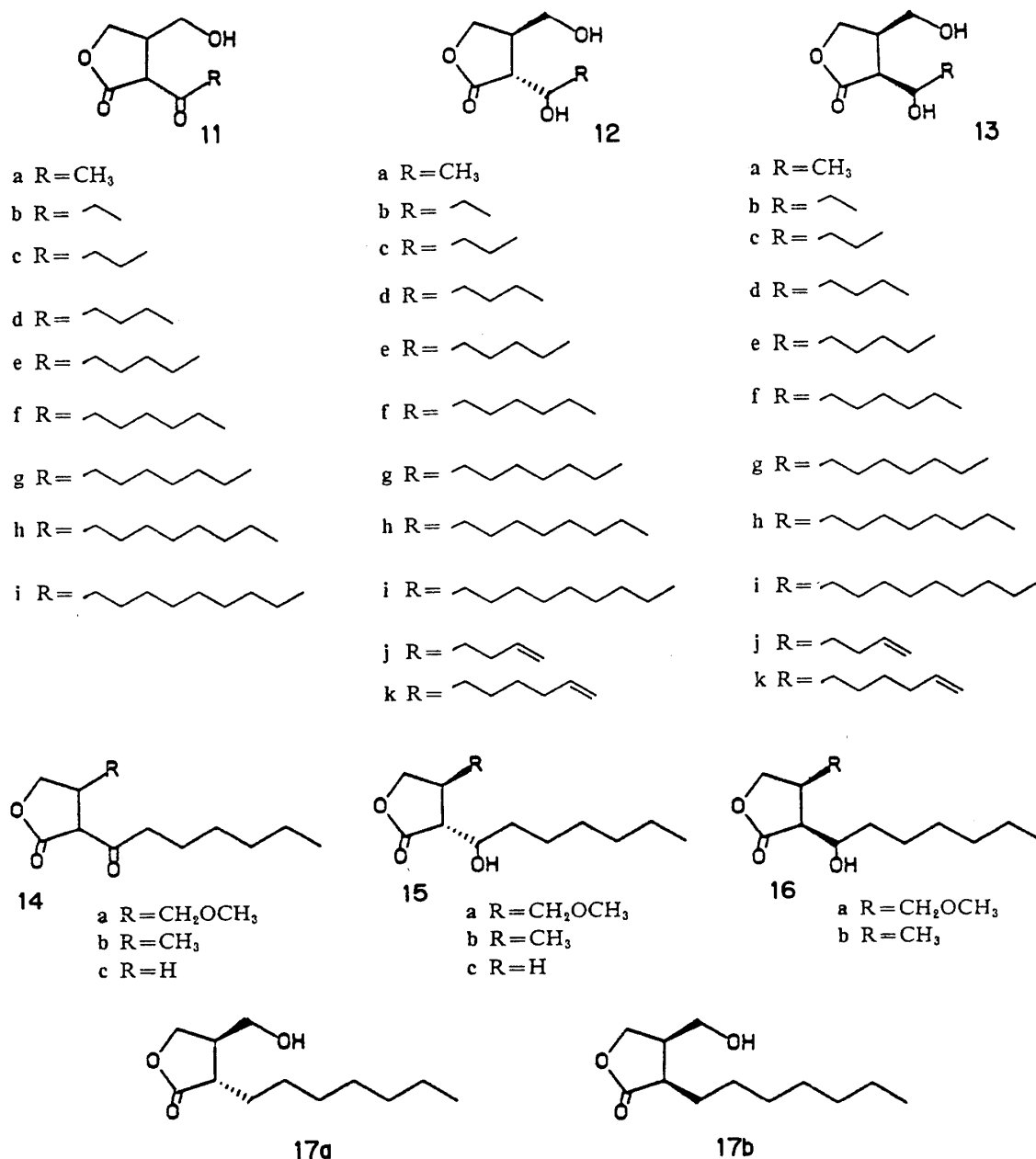


Fig. 4. Structures of various VB-C analogues.

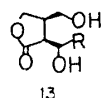
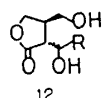
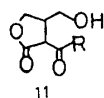
methylbutanolide 骨格を共通に持つが、2位につく側鎖の長さが異なる化合物群である。このうち 11a~11i は、6位に keto 基をもつ A-factor 型の類縁体であり、12a~12k は6位に hydroxyl 基をもち、2, 3位が trans の trans VB-C 型、13a~13k は2, 3位が cis の cis VB-C 型である。グループ2 (14, 15, 16) は2位側鎖の長さが C7 で3位の hydroxymethyl 基の部分に変化した化合物よりなる。このうち 14a, 15a, 16a は、水酸基をメトキシ化した類縁体であり、14b, 15b, 16b は、hydroxymethyl 基を methyl 基に変えた

類縁体、14c, 15c は、hydroxymethyl 基を除去した類縁体である。グループ3 (17a, b) は6位の水酸基を除去した類縁体である。

まず、グループ1の類縁体について、virginiamycin 生産誘導能の最少有効濃度を比較してみると (Table 2), 活性の強さが cis VB-C 型 > trans VB-C 型 > A-factor 型の順になっていることがはっきりわかる。各類縁体間で10倍から100倍、活性の強さに違いが見られる。さらに、2位の alkyl 側鎖の長さに依存して、各類縁体の有効性が変化し、明らかな最適長の存在が判

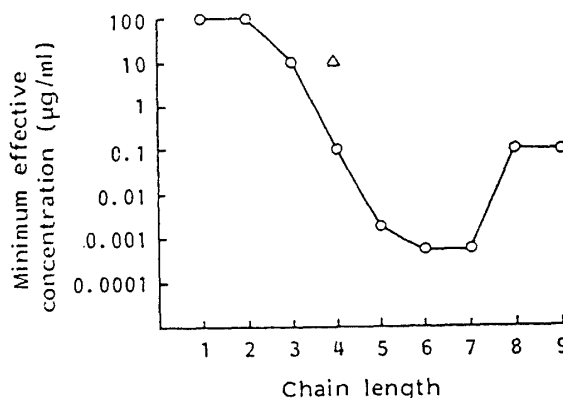
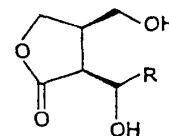
Table 2. Minimum effective concentration of several VB-C analogues.

R	A-factor type ($\mu\text{g/ml}$)	<i>trans</i> C type ($\mu\text{g/mg}$)	<i>cis</i> C type ($\mu\text{g/mg}$)
$-\text{CH}_3$	>100	>100	100
$-\text{C}_2\text{H}_5$	10	100	100
$-\text{C}_3\text{H}_7$	10	10	10
$-\text{C}_4\text{H}_9$	10	1	0.1
$-\text{C}_5\text{H}_{11}$	10	0.1	0.003
$-\text{C}_6\text{H}_{13}$	10	0.01	0.0008
$-\text{C}_7\text{H}_{15}$	10	0.01	0.0008
$-\text{C}_8\text{H}_{17}$	1	0.1	0.1
$-\text{C}_9\text{H}_{19}$	10	1	0.1



明した (Fig. 5). 最大活性を示す類縁体は、2位側鎖が 1'-hydroxyheptyl 基または 1'-hydroxyoctyl 基である *cis* VB-C 型の化合物であり、最適長から炭素2個分長くてもまた短くても、100倍以上の活性低下をもたらす。

グループ2, 3の類縁体についてみると (Table 3), 5位の遊離水酸基をメトキシ化するだけで、最少有効濃度が $0.0008 \mu\text{g/ml}$ から $1 \mu\text{g/ml}$ へと変化し、1000倍以上の活性低下がみられる。しかし、5位水酸基を除

Fig. 5. Effect of length of the side chain at C-2 on the inducing activity of *cis* VB-C analogues.

Chain length indicates the number of $n+1$ in $\text{R}=(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$. Value for an analogue having a terminal double bond in R is indicated by (Δ).

去し、メチル基のみにしても (16b), また3位の置換基をすべて除去しても (15c), これ以上の活性低下がみられないことから、本質的に5位の遊離の水酸基のみが活性発現に重要であると考えられる。

6位の水酸基も活性発現には重要であり、6位水酸基の除去 (17b) は、活性低下をもたらすが、その程度

Table 3. Minimum effective concentration of VB-C analogues.

Structure	A-factor type, $\text{R}=\text{O}$ ($\mu\text{g/ml}$)	<i>trans</i> VB-C type, $\text{R}=\text{OH}$ (2,3- <i>trans</i>) ($\mu\text{g/ml}$)	<i>cis</i> VB-C type, $\text{R}=\text{OH}$ (2,3- <i>cis</i>) ($\mu\text{g/ml}$)
	10	0.01	0.0008
	10	10	1
	1	1	1
	1	1	
		1	0.1

Table 4. Yield and activity of the inducing factor at each purification step.

Step	Yield	Activity (U)	Specific activity (U/mg)
Isobutyl alcohol extract	714.7 g	7.2×10^6	10
5% MeOH soluble	259.3 g	6.8×10^6	25
1st active charcoal column (MeOH)	98.8 g	6.7×10^6	68
2nd active charcoal column (10–20% CH ₃ CN)	24.7 g	4.6×10^6	190
Diaion HP-20 column (45% MeOH)	15.77 g	4.8×10^6	300
5% NaHCO ₃ -isobutyl alcohol partition	4.88 g	3.3×10^6	680
Middle pressure column chromatography (C ₁₈)	1.93 g	3.1×10^6	1.6×10^3
1st HPLC (Cosmosil C ₁₈ , 15% CH ₃ CN)	541.7 mg	3.3×10^6	6.0×10^3
2nd HPLC (Cosmosil C ₁₈ , 12.5% CH ₃ CN)	43.1 mg	3.2×10^6	7.6×10^4
3rd HPLC (Cosmosil C ₁₈ , 7.5% CH ₃ CN)	13.2 mg	3.5×10^6	2.7×10^5
4th HPLC (Capcell pak C ₁₈ , 0 to 20% MeOH/0.1% TFA)	5.45 mg	1.6×10^6	2.9×10^5
5th HPLC (Capcell pak C ₁₈ , H ₂ O)	0.58 mg	1.0×10^6	1.7×10^6

One unit is defined as the minimum amount of IM-2 per ml of assay medium required to induce blue pigment production under the assay conditions.

は、100倍であり、5位水酸基に比べて6位水酸基の重要性は劣ると推定される。ただし、6位水酸基がカルボニル基に酸化された A-factor 型類縁体 (11f) と比較すると、17b の方が100倍活性が高いわけであり、これは、6位カルボニル基の存在により2位側鎖の自由度が減少するためであろうと考えられる。

以上、VB-C の構造活性相関より、VB には、活性発現に関与する4つの構造単位があることが明らかとなった。すなわち、1) 2, 3位の相対立体配置が *cis* であること、2) 5位に遊離水酸基が存在すること、3) 6位に遊離水酸基が存在すること、および4) 最適な長さを持つ2位のアルキル側鎖をもつことである。このように、VB は、その構造がコンパクトであることから予想されたことであるが、その構造中はほぼすべての部分構造が活性発現に必要であり、部分構造のわずかな変化により、100倍、1000倍の活性低下が生じる。このため、のちに高い親和性をもつ放射性リガンドの合成に際して、大きな困難に直面することとなる。

3. *Streptomyces* sp. FRI-5 株の生産する青色色素生産誘導因子 IM-2 の単離と構造¹¹⁾

FRI-5 株は、抗生物質 cycloserine 生産菌として分離された株であるが、特定の培養条件下では、青色色素を生産し、抗生物質の生産パターンも変化する。すでに柳本らにより、青色色素の生産が VB アナログである γ -nonalactone により誘導されることが示されており、¹⁴⁾ したがって本菌は、VB 類縁の内因性因子をも

つのではないかと推定でき、本因子の精製に着手した。色素生産条件下での培養液 1150 l より出発し、isobutanol 抽出、活性炭カラム2回、分配抽出2回、逆相カラム2回、種々の条件下での逆相 HPLC を5回繰り返す、最終的に HPLC で単一ピークを与える誘導因子 IM-2 を 0.58 mg 単離した (Table 4)。活性収率は14%であり、比活性基準で17万倍、重量基準では

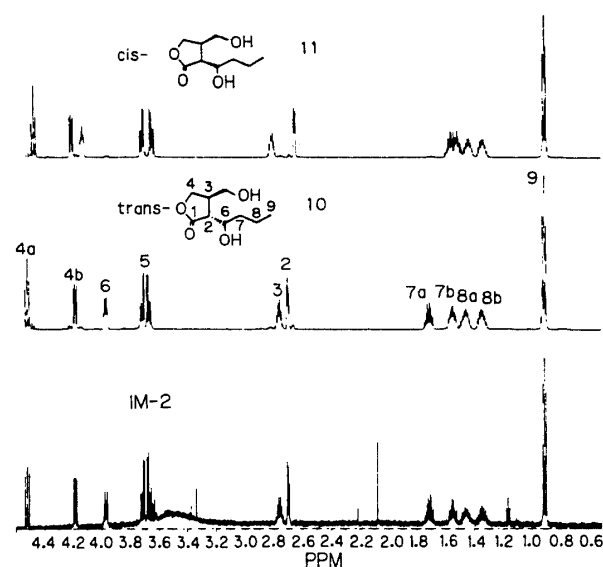


Fig. 6. Comparison of 600 MHz ¹H-NMR spectrum of IM-2 with those of synthetic *cis* and *trans*-2-(1'-hydroxybutyl)-3-(hydroxymethyl) butanolide. The *cis* and *trans* isomers were synthesized as described (15) via acylation of 3-(trimethylsilyloxymethyl) butanolide with suitable acyl chlorides.

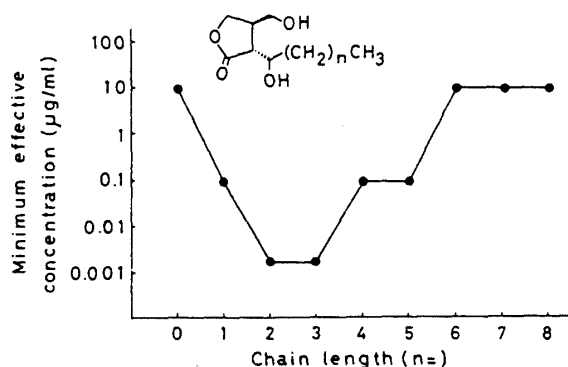


Fig. 7. Effect of side chain length at C-2 on the inducing activity of IM-2 analogues. The *trans* analogues having different side chains were synthesized as described previously.¹⁵⁾

123万倍精製したことになる。IM-2は、0.6 ng/mlで青色色素生産誘導能を示し、A-factor やVB-Aと同様、きわめて強力な活性を持つホルモン様物質であることが判明した。その600 MHz ¹H-NMRをFig. 6に示すが、その構造は、我々がすでにVB類縁体として合成していた、2位側鎖が1'-hydroxybutylの*trans*体と完全に一致し、単離天然物がきわめて微量であったにもかかわらず、比較的容易にその構造を決定できたことは、幸運であった。IM-2は、A-factor やVB-Aと同様、*Streptomyces*属信号伝達物質特有のbutanolide骨格を有しているが、既知の因子中そのアルキル側鎖がもっとも短く、もっとも親水性であるという特徴をもっている。このアルキル側鎖の長さに関しては、天然物が必ずしも最適である必然性はなく、VB程度のより長鎖の類縁体の方が、活性が高いのではないかという可能性がある。そこで、2位アルキル側鎖の長さを種々変えたIM-2類縁体を用いて、その最少有効濃度を求めたところ(Fig. 7)、側鎖の最適長はbutylまたはpentyl付近に存在することが判明し、もっとも活性の高い側鎖長は、天然物のそれと一致した。したがって、青色色素誘導には、VBによるvirginiamycin誘導とは明らかに異なった因子が必要であり、より短鎖の因子を結合するリセプタータンパク質が存在するものと考えられる。

4. *Virginiae* butanolide および IM-2 の放線菌における分布^{16,17)}

このようにVBとIM-2という2種の明らかに機能の異なった誘導因子を、我々は単離し、その構造を決定してきたわけであるが、次にこれらが *Streptomyces*

Table 5. Production of natural VB-like inducers by *Streptomyces* sp.

Strain		Activity (U/ml)	No. of active components
<i>S. longwoodensis</i>	IFO 14251	500	3
<i>S. tubercidicus</i>	IFO 13090	500	2
<i>S. antibioticus</i>	IFO 12838	100	4
<i>S. phaeofaciens</i>	IFO 13372	100	2
<i>S. toyokaensis</i>	IFO 12824	100	2
<i>S. celluloflavus</i>	IFO 13780	5	3
<i>S. sclerogranulatus</i>	IFO 14301	5	3
<i>S. lincolnensis</i>	IFO 13054	4	1
<i>S. clavurigerus</i>	IFO 13307	1	1
<i>S. griseus</i>	IFO 3430	0.5	4

属の中でどの程度普遍的な役割を担っているのかに関心を持った。幸い、VBの生産菌 *S. virginiae* は、VB-AとIM-2に対する最少有効濃度が各々 0.0006 μg/mlと10 μg/mlであることから判るように、VBに対してきわめて特異的にレスポンスする性質をもっており、またIM-2の生産菌 *Streptomyces* sp. FRI-5株もIM-2に対する特異性が高い。そこで、これら2種の菌株を検定菌として用い、一方についてはvirginiamycin生産誘導能を、他方については、青色色素生産誘導能を指標にスクリーニングすれば、多数の菌株から容易に生産菌を検出することができることになる。対象としては、抗生物質を生産する放線菌約70菌株をIFOより入手して用いた。その結果、VB生産能を持つ菌株が72菌株中10菌株、IM-2生産能を示す菌株が64菌株中7菌株得られた(Table 5, 6)。VB生産菌について、その活性成分を逆相HPLCで分離してみると(Fig. 8, 9)、*S. lincolnensis*と*S. clavurigerus*を除いて、他の菌株は

Table 6. Production of IM-2-like inducers by *Streptomyces* sp.

Strain		Activity (U/ml)
<i>S. tubercidicus</i>	IFO 13090	25 < < 40
<i>S. celluloflavus</i>	IFO 13780	15 < < 25
<i>S. sioyaensis</i>	IFO 12820	15 < < 25
<i>S. narbonensis</i>	IFO 12801	15 < < 25
<i>S. sclerogranulatus</i>	IFO 14301	2 < < 5
<i>S. lividus</i>	IFO 13787	2 < < 5
<i>S. canus</i>	IFO 12752	1 < < 2

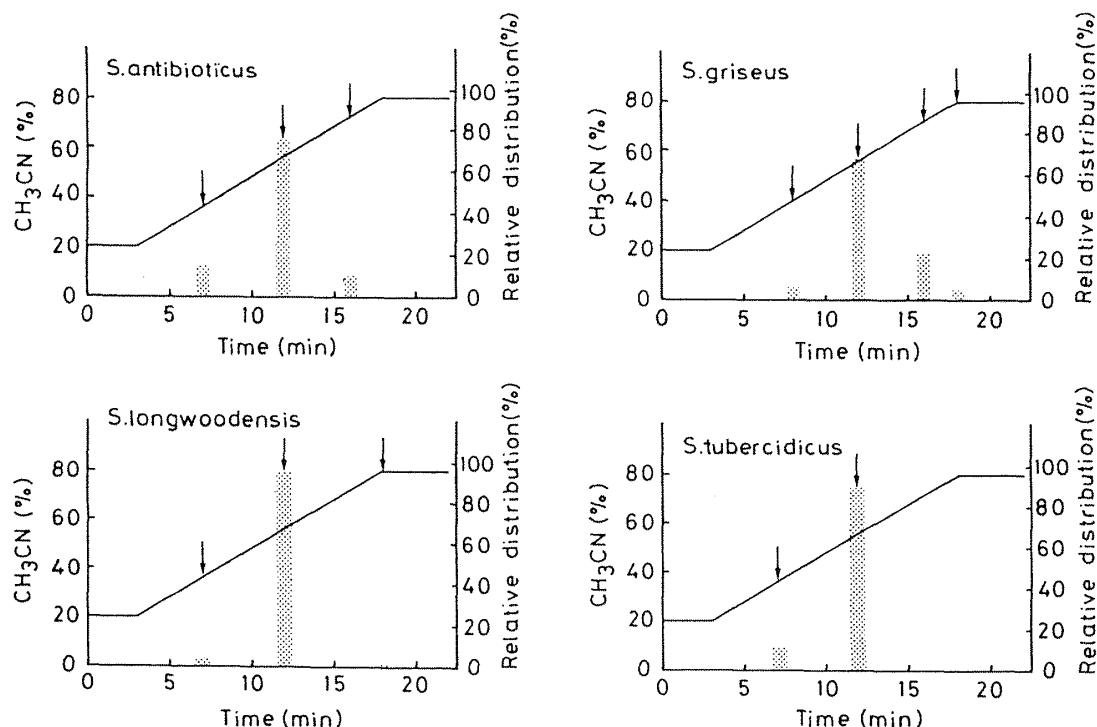


Fig. 8. HPLC patterns of inducing factors from several *Streptomyces* on reverse phase column.

2種類以上の活性成分を生産しており、*S. virginiae* がVB-AからEの5種類の成分を同時に生産しているという現象と一致した。これは、Gräfeらの因子の場合に、*S. bikiniensis* が2種類の、また *S. cyaneofuscatus* が3種類の誘導因子を同時に生産しているという報告ともよく符号する点であり、ホルモン様の誘導因子を生産する放線菌は、通常数種類の因子の混合物を生産しているものと考えられる。

Fig. 10に、同一の逆相HPLC系での、各種VB類縁体の溶出位置を示したが、VB生産菌は、VB-A（溶出時間12分）を主な成分として生産していることが推定される。この約12分に溶出される成分が、確かにVB-Aであることを確認するために、すでに高生産株を得ていた *S. antibioticus* の培養液より、VB活性成分を単離することにした。種々炭素源、窒素源を検討した結果 (Table 7, 8, 9), 5000 unit/ml という高生産条件を設定することができた。これは、VB-A換算で3.1 mg/l という生産量であり、*S. virginiae* によるVB生産量 (0.03 mg/l) と比べ100倍の高生産能である。高生産株 *S. antibioticus* NF-18をこの高生産条件下で培養し、培養液6 lより、2.3 mgのVB活性成分を単離した。この化合物のIR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ およびCDスペクトルは、*S. virginiae* 由来の天然VB-Aと

完全に一致し、*S. antibioticus* は、主な誘導因子としてVB-Aを生産していることが確認された。

ここで興味深いのは、A-factor生産菌である *S. griseus* も、総活性は低いものの数種のVB活性成分を生産することであり、主な成分の溶出位置が、やはりVB-Aと一致することであろう。

以上、VB生産株は、ランダムに選んだ放線菌72菌株中10菌株、すなわち分布率14%であり、またIM-2生産株は、64菌株中7菌株、分布率11%であった。原、別府¹⁸⁾は、A-factor生産菌の分布率が15%であることを報告しているし、またGräfe¹⁹⁾らは、かれらの因子を生産する放線菌の分布率が26.3%であると報告している。これら各種の誘導因子の生産菌の間で、*S. griseus* のようにA-factorとVBの両者を生産するという例外が若干あるものの、各誘導因子間の重複はほとんどなく、したがって、全放線菌中A-factor、Gräfeの因子類、VB類、あるいはIM-2のいずれかを生産する能力をもつものは、60%はあるものと推定できる。このように、放線菌においては、ホルモン様の信号伝達物質は広く存在していることが判明したわけで、形態分化や二次代謝制御の上で普遍的な役割を果たしているものと考えられる。

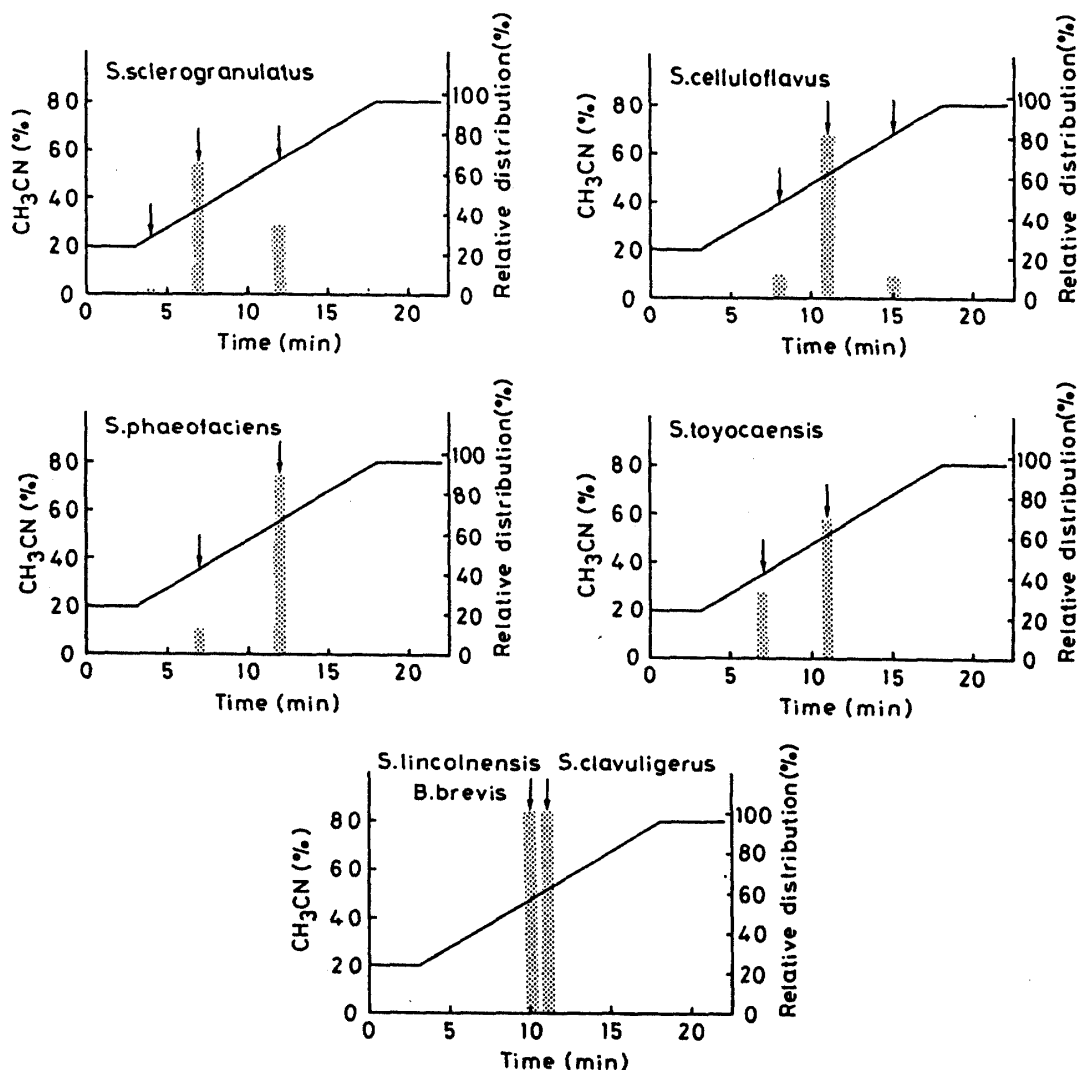


Fig. 9. HPLC patterns of Inducing factors from several Streptomyces on reverse phase column.

5. *Virginiae* butanolide 結合タンパク質の存在, 単離, および性質^{20,21)}

上述のように, 放線菌には, ホルモン様の信号伝達

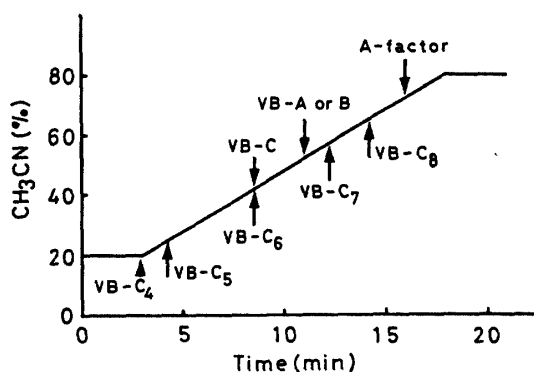


Fig. 10. Synthetic and natural VBs.

物質が広く存在し, 二次代謝などを制御していることが明確になったわけであるが, その信号伝達機構に関しては, まったく不明であった。我々は, 高等生物のホルモンとの類似に着目し, 何らかのリセプタータンパク質があるのではないかと考えて研究を進めた。対象としては, 当時その構造を明らかにし, 構造-活性相関をも調べ終えていた VB の生産菌である *S. virginiae* を選び, その粗タンパク質画分に VB 結合能をもつタンパク質が存在するかどうかについて調べることから着手した。まず最初に, タンパク質への VB の結合を測定することが必須となってくるわけで, 当初 *S. virginiae* によるバイオアッセイなどを試みたが, 感度, 労力などの点からまったく不十分なアッセイ法でしかなく, 放射能ラベルの VB 類縁体を合成し, 放射性リガンドを用いる binding assay を確立することが必要

Table 7. Effect of carbon sources on the production of inducing factors by *Streptomyces antibioticus* NF-18.

Carbon sources (30 g/l)	Final pH	Growth (ml-wet mycelia/l)	Inducing activity (U/ml-broth)
Glucose	7.0	9.3	375
Xylose	7.0	6.3	200
Arabinose	7.0	5.0	250
Fructose	7.0	5.8	250
Galactose	7.0	7.5	125
Lactose	7.0	3.8	300
Mannitol	7.0	8.4	125
Maltose	7.0	6.5	300
Sucrose	7.0	6.3	300
Dextrin	7.0	14.0	375
Starch	7.0	30.0	375
Soluble starch	7.0	20.0	375
Na-acetate	7.0	22.5	300
Malt extract	7.0	5.8	400
Glycerol	7.0	28.8	1,562
Corn steep liquor	7.0	10.0	1,562
Na-propionate	7.0	6.0	500
Na-succinate	7.0	9.0	1,250
Na-succinate	8.0	6.4	500
+hexanoic acid (0.5/l)			
Na-succinate+oleic acid (0.5 g/l)	6.5	2.5	250
+stearic acid (0.5 g/l)			
+linoleic acid (0.5 g/l)			
Na-succinate	8.0	6.4	500
+iso-valeric acid (0.5 g/l)			
Corn steep liquor+syobean	7.0	57.5	1,562

Cultivation was performed with 100-ml portion of medium containing (per l) carbon source 30 g, sodium nitrate 20 g, 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 30 ml, NaCl 5 g, yeast extract 0.1 g, CaCO₃ 2 g, CaCl₂·6H₂O 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 20 mg, ZnSO₄·7H₂O 10 mg, MnSO₄·H₂O 10 mg, CuSO₄·5H₂O 10 mg and Na₂MoO₄·2H₂O 10 mg in 500-ml Sakaguchi flasks, and incubated at 28°C on a reciprocating shaker for 96 hours.

となった。Fig. 11 に示すように、6 位 keto 体への NaB³H₄ 還元による ³H の導入、2 位側鎖の末端二重結合への ¹²⁵I の導入などを試みたが、前者は合成収率が悪く比放射能の高いリガンドを得ることは困難、後者は ¹²⁵I という非常にバルキーな置換基を導入したために、誘導活性が1000分の1以下に落ちるなど、いずれも不満足な結果に終わった。種々検討の結果、最終的には、2 位側鎖の末端二重結合に、³H₂ ガス存在下、接触還元により ³H を導入する方法を採用し、54.6 Ci/mmol という高比放射能の誘導体を高収率で合成することができた。この誘導体は天然誘導因子の一つである VB-D の ³H ラベル体（以下 [³H]VB-C₇ と略称）に相当するわけで、若干の同位体効果は予想されるものの、この側鎖長では1メチレン程度の余裕が

あり、きわめて高い親和性を有していることが期待できる。次に、binding assay の方法を確立するわけであるが、我々は、平衡透析法を採用することにした。動植物ホルモンのリセプターに関する文献検索などから、この他にも、ゲルろ過法、イオン交換樹脂またはヒドロキシアパタイトへの結合沈殿法、デキストラン存在下での活性炭結合法、硫酸沈殿法などが候補として可能であったが、まったく未知のリセプターを取り扱う必要上、もっとも基本的な平衡透析法を用いたわけである。

S. virginiae の粗タンパク質画分を用いた平衡透析の結果の1例を Fig. 12 に示す。ここに示した値は、[³H]VB-C₇ のみ存在する場合の結合量（全結合量）から、加えた [³H]VB-C₇ の3600倍の非放射性 VB-C 共

Table 8. Effect of nitrogen sources on the production of inducing factors by *Streptomyces antibioticus* NF-18.

Nitrogen source (20 g/l)	Final pH	Growth (ml-wet mycelia/l)	Inducing activity (U/ml-broth)
NaNO ₃	8.0	10.0	1,250
NH ₄ Cl	7.5	15.0	1,250
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5	8.0	1,250
L-Asparagine	9.0	8.0	1,250
L-Glutamic acid	5.0	10.0	1,250
Casamino acid	9.0	60.0	750
Peptone	9.0	50.0	1,562
Tryptone	9.0	80.0	1,250
Yeast extract	9.0	130.0	1,562
Meat extract	9.0	40.0	1,250
Soybean powder	8.5	80.0	2,087
Soybean powder + 0.5% choline-Cl	8.0	70.0	1,250
L-Leucine	8.0	12.0	1,562
Urea	8.0	8.0	1,787

Cultivation conditions are almost identical to those described in Table 7 except that sodium succinate (30 g/l) and the indicated nitrogen source (20 g/l) were used.

在下での結合量（非特異的結合量）を、差し引いた値であり、VB 特異的な結合量になる。この条件下、透析は3時間後には平衡状態になり6時間までは一定値を保っている。次に、この VB 特異的な結合が、高分子に由来することを確認するため、粗タンパク質と [³H]VB-C₇ を incubate した後、Sephadex G-75 を用いてゲルろ過にかけると (Fig. 13)、未結合の [³H]VB-C₇ のピーク以外に、高分子と結合したピークが現われた。

このピークは、incubate 時に非放射性の VB-C を大過剰共存させると消失し、VB 特異的な結合であることが確認された。このような VB 結合ピークおよび平衡透析法による VB 結合活性は、DNase および RNase によっては影響を受けないのに対して、pronase 処理により、完全に消失し (Fig. 14, Table 10)、透析膜非透過であることと合わせて、VB を特異的に結合するタンパク質が存在することが明らかとなった。

Table 9. Combined effect of carbon and nitrogen sources on the production of inducing factors by *Streptomyces antibioticus* NF-18.

Carbon source	Production of inducing factors (U/ml-broth)			
	Yeast extract	Soybean powder	L-Leucine	Urea
Sodium succinate	1,562 (9.0)	2,080 (8.5)	1,562 (8.0)	1,787 (8.0)
Glycerol	3,757 (7.2)	3,125 (7.0)	2,500 (6.0)	3,125 (7.5)
Corn steep liquor	3,125 (9.0)	2,500 (6.0)	2,500 (8.0)	2,500 (9.0)
Sodium succinate + glycerol	5,000 (8.5)	—	—	—
+ corn steep liquor ^a				

Cultivation was performed with a 100-ml portion of medium containing the indicated carbon (30 g/l) or nitrogen (20 g/l) source in a 500-ml Sakaguchi flask for 96 hours at 28°C. The pH at the end of cultivation is indicated in parentheses; the initial pH was adjusted to 7.0. Other experimental conditions are identical to those described in Table 7.

^a Sodium succinate (20 g/l) + glycerol (20 g/l) + corn steep liquor (10 g/l) was used as carbon source.

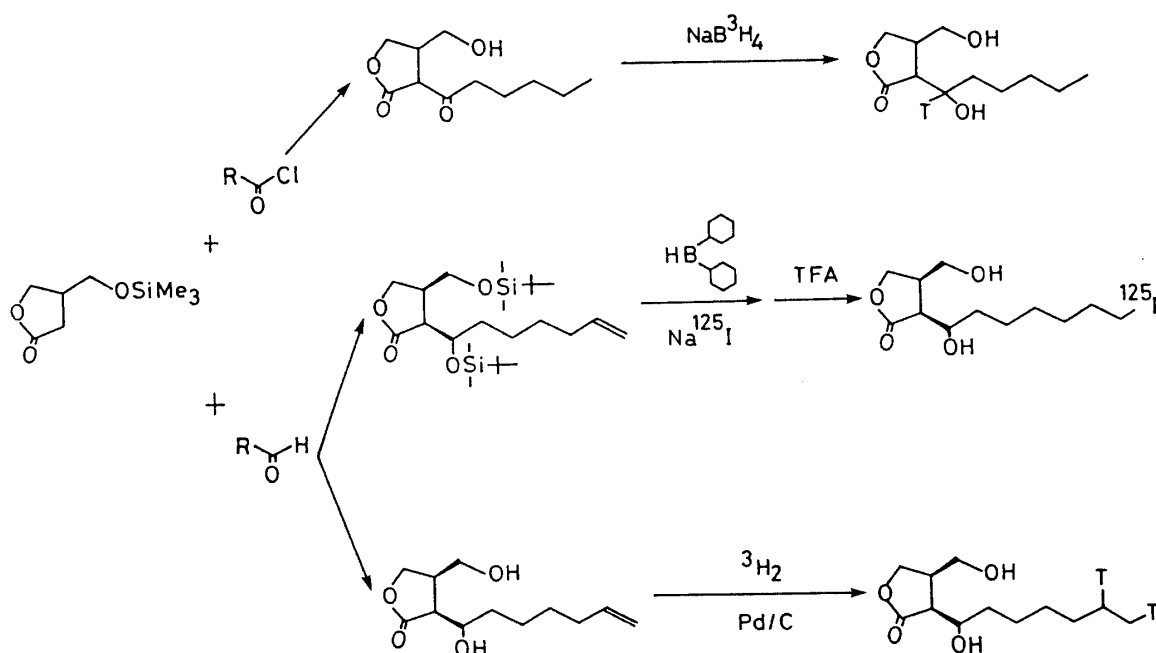
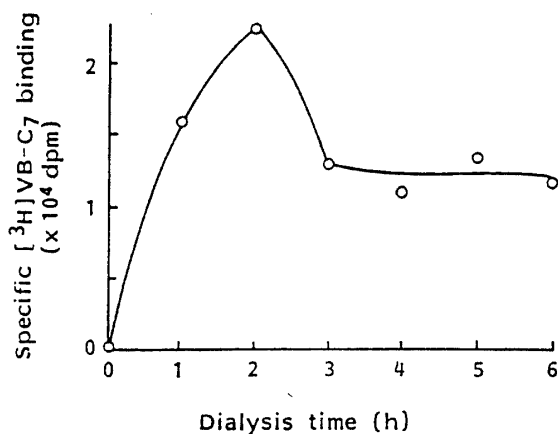


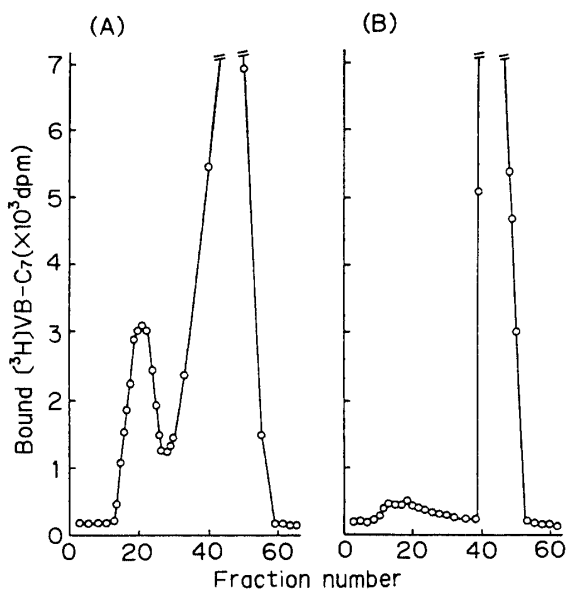
Fig. 11. Synthetic routes of radioactive VB analogues.

$[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ に対するきっこう阻害法により, リガンド特異性を調べた結果, A-factor や trans 型の VB 類縁体に対する親和性は低いに対して, VB-A, B, C, D

には, ほぼ同一の高い親和性を示すことが判明した (Table 11, 12). したがって, このタンパク質は, VB 類を共通に結合するリセプターであると結論される.

Fig. 12. Time course of specific $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ binding during equilibrium dialysis.

Cell-free extract (100 μl) was incubated with 34.8 nM of $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ (0.2 μCi) in the presence and absence of nonlabeled VB-C (125 μM) for 1 hour at 28°C, and dialyzed against 10 ml of buffer A. At the indicated time, each 50 μl of inner and outer solution of the dialysis tube was taken for radioactivity measurements to determine differences in the amount of $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$. The specific $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ binding represents the difference between the values obtained in the absence and presence of nonlabeled VB-C.

Fig. 13. Sephadex G-75 column chromatography of cell-free extracts preincubated with $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ alone (A) and $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ + nonlabeled VB-C (B).

Fractions of 0.5 ml were collected, and aliquots (50 μl) were taken for radioactivity measurements. Radioactivity per 50 μl of each fraction was indicated in the figure.

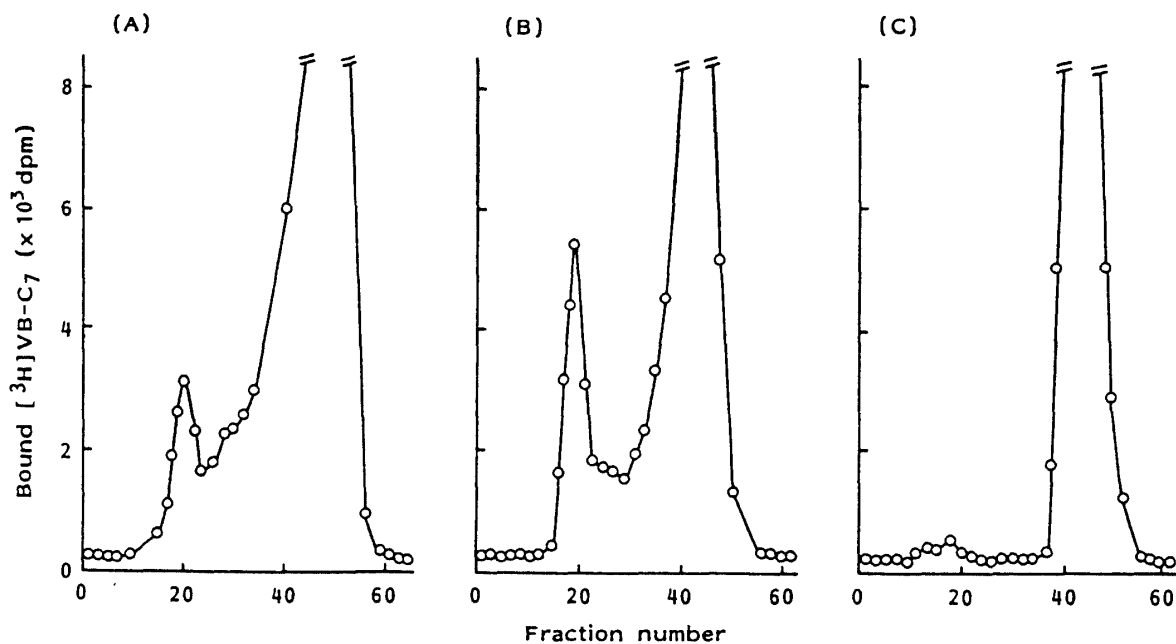


Fig. 14. Sephadex G-75 gel filtration of cell-free extracts treated with (A) DNase, (B) RNase, and (C) pronase. Cell-free extracts were digested either with DNase I (10 $\mu\text{g/ml}$, 37°C, 20 min), RNase A (40 $\mu\text{g/ml}$, 30°C, 30 min) or pronase (0.2 mg/ml, 30°C, 5 min), and 500- μl portions were applied.

平衡透析法により, Scatchard type のプロットを行うと (Fig. 15), 直線が得られ, 一種類の親和性をもつ結合部位のみが存在すること, すなわちリセプターは一種類しか存在しないことが判明した. この結合部位の親和性は, 直線の傾きから $K_d = 1.1 \text{ nM}$ と算出され, 高等生物のホルモンリセプターと同程度の, きわめて高い親和性を有していることも明らかとなっている. ここで, このリセプタータンパク質と VB とが 1:1

で結合すると仮定すると (この仮定は, のちに精製タンパク質の比活性より正しいことが実証されたわけであるが), 本リセプターは, ゲノム DNA あたり (動物細胞などという 1 細胞あたりに相当する) 30-40 分子しか存在しない極微量タンパク質であると推定できる. この 30-40 分子という数は, たとえば酵母の α -フェロモンリセプターは $9 \times 10^5/\text{cell}$ 存在するなど, 通常のホルモンリセプターの存在量と比較しても極端に

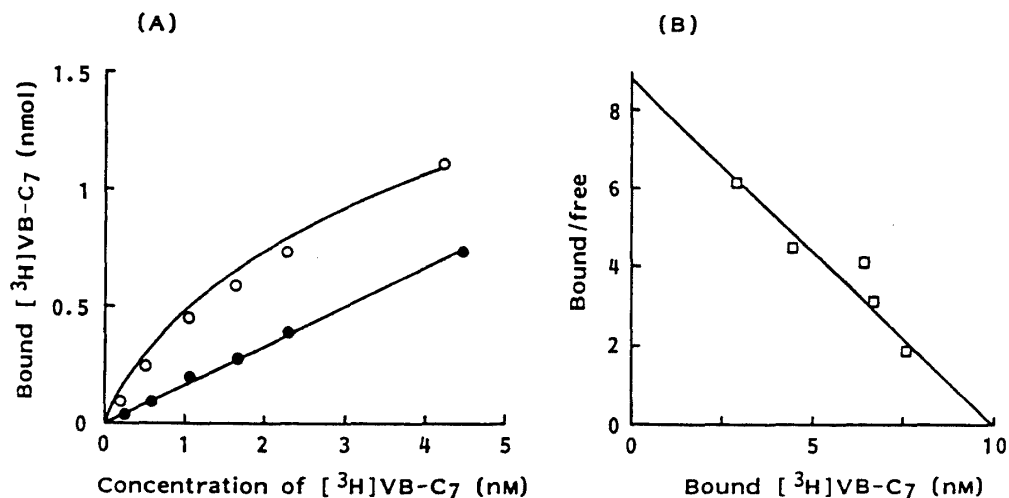


Fig. 15. (A) Concentration dependence of the $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ binding in the absence (○) and presence of nonlabeled VB-C (●), (B) Scatchard plots of specific $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$ binding.

The concentration of nonlabeled VB-C was 2,000-fold in excess of $[^3\text{H}]\text{VB-C}_7$.

Table 10. Effect of enzyme treatment on [^3H]VB-C₇ binding activity of the cell-free extract.

Enzyme used	[^3H]VB-C ₇ binding (10 ³ dpm/50 μl)			Relative activity (%)
	Total ^a	Nonspecific ^b	Specific ^c	
Total	23.20	9.15	14.05	(100)
DNase I	24.25	10.85	13.40	95
RNase A	18.85	7.55	11.30	80
Pronase	5.35	5.95	0	0

Cell-free extract was digested either with DNase I, RNase A or pronase as described in the legend of Fig. 14. [^3H]VB-C₇ binding was measured by equilibrium dialysis as described in Materials and Methods.

^a Cell-free extract was incubated with [^3H]VB-C₇ alone.

^b Cell-free extract was incubated with [^3H]VB-C₇ + non-radiolabeled VB-C.

^c Specific binding represents the difference between total and nonspecific binding.

少ない数で、VB レセプターによる信号伝達機構がきわめて高効率であることを物語るように見える。

次に、この VB レセプタータンパク質の機能をより詳しく知るために、精製を行うことにした。500 g の菌体 (レセプタータンパク質量として 1-1.5 mg 存在すると推定される) より出発して、6 段階で 0.18 mg の純粋なタンパク質を得ることに成功した (Table 13)。本タンパク質は、比活性基準で 1 万 4000 倍、重量基準では 16 万 3000 倍精製されたことになる。この純粋なタンパク質は、SDS-PAGE で分子量約 36,000 を示し (Fig. 16)、また最大 VB 結合能は 1.14 mol VB/36,000 dalton であることから、このレセプターと

Table 11. Effect of several VB-C analogues and competitive ligands on the binding of [^3H]VB-C₇ to the VB binding protein.

Nonlabeled compound	Bound [^3H]VB-C ₇			
	500-fold molar excess		1,000-fold molar excess	
	10 ³ dpm	%	10 ³ dpm	%
A-Factor type	2.55	17.4	5.40	35.0
<i>trans</i> VB-C	10.48	71.7	10.81	70.1
<i>cis</i> VB-C	14.60	100	15.40	100

Cell-free extract (100 μl) was incubated with 34.8 nM of [^3H]VB-C₇ (0.2 μCi) in the absence and presence of nonlabeled VB-C analogues; the values shown represent the difference in amounts of radioactivity bound. The concentrations of VB-C analogue used were 17.4 μM (500-fold excess) and 34.8 μM (1,000-fold excess). The A-factor type analogue, *trans* VB-C and *cis* VB-C were 2-(1'-hexanoyl)-3-(hydroxymethyl) butanolide, 2,3-*trans* VB-C and 2,3-*cis* VB-C, respectively. They were synthesized as described previously.

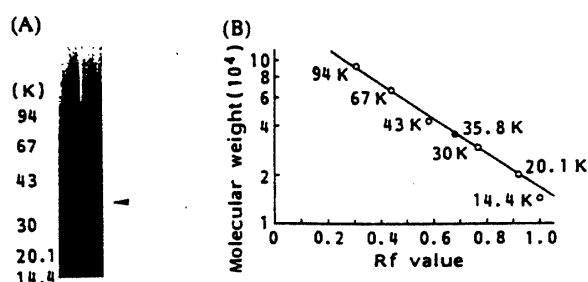


Fig. 16. MW determination of the purified VB-C binding protein on SDS-PAGE under reduced conditions.

(A) The protein was run on a 4~20%-gradient gel (right lane) together with maker proteins (left lane), and stained with Coomassie brilliant blue G-250. The position of the VB-C binding protein was indicated by an arrow. (B) A plot of $\log M_r$ against the migration of marker proteins (○) and VB-C binding protein (●).

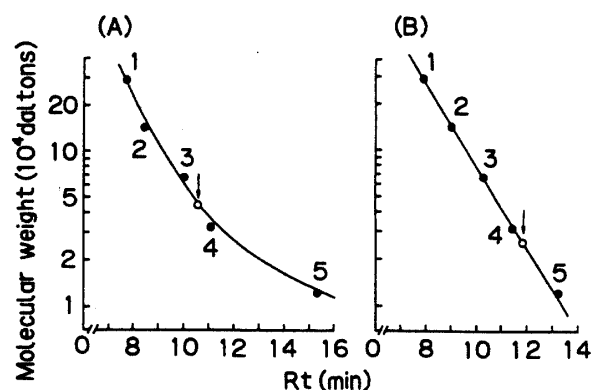
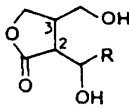
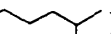


Fig. 17. Estimation of MW of the VB-C binding protein by molecular sieve HPLC eluted with Buffer B containing 0.1 M KCl and Buffer B containing 0.5 M KCl.

(A) 0.1 M KCl, (B) 0.5 M KCl.

Table 12. Ligand specificity of the VB-C binding protein toward several VBs.

	Bound [³ H]VB-C ₇									
	100-fold molar excess		250-fold molar excess		500-fold molar excess		750-fold molar excess		1,000-fold molar excess	
Non-labeled VBs	10 ⁴ dpm	%	10 ⁴ dpm	%	10 ⁴ dpm	%	10 ⁴ dpm	%	10 ⁴ dpm	%
VB-A (R = )	0.61	30.3	0.62	30.5	0.60	29.8	0.63	31.1	0.56	27.9
VB-B' (R = )	0.89	44.2	0.72	35.6	0.59	29.2	0.63	31.1	0.59	29.2
VB-B (R = )	0.68	33.5	0.64	31.8	0.64	31.8	0.53	26.5	0.61	30.2
2,3- <i>cis</i> VB-C (R = )	0.64	31.8	0.64	31.8	0.57	28.4	0.58	28.7	0.57	28.4
2,3- <i>trans</i> VB-C	1.19	58.6	0.94	46.5	0.82	40.8	0.78	38.5	0.69	34.2
VB-D (R = )	0.63	31.3	0.56	27.9	0.52	25.8	0.52	25.8	0.46	22.6

Control (-VBs)	Bound [³]VB-C ₇	
	10 ⁴ dpm	%
	2.02	100

Concentrated Sephadex G-100 fraction was assayed in the presence and absence of non-labeled synthetic VBs. 1,000-fold molar excess equals 69.6 μ M of cold VBs.

VBは1:1で結合すると考えている。本リセプターの native 状態での分子量に関しては、ゲルろ過 HPLC での推定を試みた (Fig. 17)。本リセプターの疎水的な性質のためと考えられるが、ゲルろ過 HPLC での溶出位置が、使用 buffer のイオン強度により異なってくる。そのため、native 状態での分子量については、26,000–44,000 とやや広い推定値しか得られなかったが、変性状態での分子量36,000とほぼ一致することから、モノマーとして存在するものと考えられる。

次に、本リセプターの機能が問題となってくるが、VBを結合するという機能以外に、我々は、DNAと相互作用するのではないかと考え、*S. virginiae* のゲノム DNA 存在下での VB 結合活性の変化を検討した (Table 14)。その結果、ゲノム DNA 共存下では、VBの結合量が40%も低下することが判明した。最初に VB と incubate した後に、ゲノム DNA を加えた場合には、VB 結合量は低下しないことから、VB 未結合のリセプターのみが、選択的に DNA と結合するもの

Table 13. Purification of VB binding protein from *Streptomyces virginiae*.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (dpm)	Specific activity (dpm/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Crude protein	30,927.6	1.31×10^9	4.2×10^4	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	12,735.5	6.66×10^8	5.2×10^4	1.2	50.6
1st DEAE-Sepacel	6,476.2	3.60×10^8	5.5×10^4	1.3	27.4
2nd DEAE-Sepacel	531.7	2.10×10^8	3.9×10^5	9.2	15.9
Sephadex G-100	212.1	1.70×10^8	8.0×10^5	18.8	12.9
Phenyl 5PW HPLC	1.5	1.29×10^8	8.2×10^7	1,952.3	9.8
DEAE 5PW HPLC	0.189	1.13×10^8	6.0×10^8	14,286.0	8.6
C8 HPLC	0.134	—	—	—	—

Table 14. Effect of genomic DNA from *Streptomyces virginiae* on the VB-C binding activity.

Procedure for binding activity measurement	Specific [³ H]VB-C ₇ bound (10 ³ dpm)	Relative activity (%)
1) BP+DNA $\xrightarrow{\pm \text{VB-C}_6} \xrightarrow{+^* \text{VB-C}_7}$	14.32	61
2) BP-DNA $\xrightarrow{\pm \text{VB-C}_6} \xrightarrow{+^* \text{VB-C}_7}$	23.49	100
3) BP $\xrightarrow{\pm \text{VB-C}_6} \xrightarrow{+^* \text{VB-C}_7} \xrightarrow{+ \text{DNA}}$	20.91	89
4) +DNA $\xrightarrow{\pm \text{VB-C}_6} \xrightarrow{+^* \text{VB-C}_7} \xrightarrow{+ \text{BP}}$	23.38	99.5
5) -DNA $\xrightarrow{\pm \text{VB-C}_6} \xrightarrow{+^* \text{VB-C}_7} \xrightarrow{+ \text{BP}}$	23.42	99.7

The μl of the DNA solution (+DNA) or TE buffer alone (-DNA) was added. Incubation indicated by each arrow was done for 20 minutes at 25°C.

BP: Binding protein, $\pm \text{VB-C}_6$: plus or minus 0.125 mM non-labeled VB-C, $^* \text{VB-C}_7$: 69.6 nM [³H]VB-C₇.

と考えられる。当初、この現象とリセプターによる信号伝達機構との関連が明確ではなかったが、最近別府らにより A-factor 結合タンパク質が、*S. griseus* に存在することが見いだされ、²²⁾ リガンド不在下では DNA と結合し、下流遺伝子の発現を抑えているリプレッサーであろう²³⁾ との報告がなされ、矛盾なく説明できるようになった。

本研究は、大阪大学山田靖宙教授のご指導のもとに行ったものであり、研究遂行中のご指導、御鞭撻と温かい励ましに深く感謝いたします。*S. virginiae* などの大量培養に際して、大変お世話になりました武田薬品工業株式会社発酵生産物研究所の小野英男博士、原田節夫博士にこころから御礼申し上げます。また、VB の光学活性体を御供与下さいました東京大学農学部森 謙二教授ならびに共同研究者である多数の大阪大学工学部醸造工学科山田研究室卒業生、在校生の方々に深く感謝いたします。

文 献

- Kleiner, E. M., Pliner, S. A., Soifer, V. S., Onoprienko, V. V., Balashova, T. A., Rosynov, B. V., Khokhlov, A. S.: *Bioorg. Kim.*, **2**, 1142-1147 (1976).
- Mori, K.: *Tetrahedron*, **39**, 3107-3109 (1983).
- Kawaguchi, T., Asahi, T., Satoh, T., Uozumi, T., Beppu, T.: *J. Antibiotics*, **37**, 1587-1595 (1984).
- Biró, S., Békéi, I., Vitális, S., Szabó, G.: *Eur. J. Biochem.*, **103**, 359-363 (1980).
- Kondo, S., Yasui, K., Katayama, M., Marumo, S., Kondo, T., Hattori, H.: *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5861-5864 (1987).
- Kondo, S., Yasui, K., Natsume, M., Katayama, M., Marumo, S.: *J. Antibiotics*, **41**, 1196-1204 (1988).
- Gräfe, U., Schade, W., Eritt, I., Fleck, W. F., Radics, L.: *J. Antibiotics*, **35**, 1722-1723 (1982).
- Gräfe, U., Reinhardt, G., Schade, W., Eritt, I., Fleck, W. F., Radics, L.: *Biotechnol. Lett.*, **5**, 591-596 (1983).
- Yamada, Y., Sugamura, K., Kondo, K., Yanagimoto, M., Okada, H.: *J. Antibiotics*, **40**, 496-504 (1987).
- Kondo, M., Higuchi, Y., Sakuda, S., Nihira, T., Yamada, Y.: *J. Antibiotics*, **42**, 1873-1876 (1986).
- Sato, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M., Yamada, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 170-173 (1989).
- Yanagimoto, M., Terui, G.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 604-610 (1971).
- Yanagimoto, M., Terui, G.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 611-618 (1971).
- Yanagimoto, M., Enatsu, T.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 545-550 (1983).
- Nihira, T., Shimizu, Y., Kim, H.-S., Yamada, Y.: *J. Antibiotics*, **41**, 1828-1837 (1988).
- Ohashi, H., Zheng, Y.-H., Nihira, T., Yamada, Y.: *J. Antibiotics*, **42**, 1191-1195 (1989).
- 橋本幸治, 大橋 裕, 仁平卓也, 山田靖宙: 1989 年度日本農芸化学会大会要旨集, p. 346 (1989).
- Hara, O., Beppu, T.: *J. Antibiotics*, **35**, 349-358 (1982).
- Eritt, I., Gräfe, U., Fleck, W. F.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, **24**, 3-12 (1984).
- Kim, H. S., Nihira, T., Tada, H., Yanagimoto, M., Yamada, Y.: *J. Antibiotics*, **42**, 769-778 (1989).
- Kim, H. S., Tada, H., Nihira, T., Yamada, Y.: *J. Antibiotics*, **43**, 692-706 (1990).
- Miyake, K., Horinouchi, S., Yoshida, M., Chiba, N., Mori, K., Nogawa, N., Morikawa, N., Beppu, T.: *J. Bacteriol.*, **171**, 4298-4302 (1989).
- Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S., Beppu, T.: *J. Bacteriol.*, **172**, 3003-3008 (1990).