

## 放線菌の二次代謝を支配する $\gamma$ -butyrolactone autoregulators



研究ノート

仁平 卓也\*

$\gamma$ -Butyrolactone autoregulators controlling  
the secondary metabolism of streptomycetes

**Key Words** : *Streptomyces*, secondary metabolism, antibiotics, autoregulator

### 1. はじめに

土壌原核微生物である放線菌(Actinomycetes)は、抗生物質をはじめ免疫抑制剤、高脂血症治療剤や抗寄生虫薬など多種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拘わらず、形態分化能を持ち、固体培地上で孢子→基底菌糸→気中菌糸→孢子というカビに類似した複雑な生活環を示す事から、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、有用生理活性物質の工業生産という応用面のみならず、形態分化の機構・制御という基礎的な面からも近年注目を浴びている菌群である。

Actinomycetesのうち*Streptomyces*属放線菌は、生理活性物質の生産能に特に優れ、過去60年に亘って新規物質スクリーニングの対象とされてきた。同時に、*Streptomyces coelicolor* A3(2)を対象とする遺伝学的研究が英国John Innesセンターを中心として長年にわたって展開され、基礎的知見や遺伝学的手法が集積されてきた結果、「ポリケタイド系抗生物質生合成遺伝子の人為的操作による新規生理活性物質の創出」という近年の生合成工学の興隆を迎えるに至っている。とはいえ、広大無辺な二次代謝の世界では、まだまだ不明な点の方が多く、特に、なにが特定の二次代謝経路の引き金を引き、いかなる信号伝達経路・機構によって、最終的な化合物生

産に至るのかが解明されている例は極めて少ない。

*Streptomyces*属放線菌には、自己及び他の細胞の形態分化、若しくは二次代謝を誘導する低分子信号伝達物質が存在する。これら信号伝達物質(autoregulator, 又は自己調節因子と呼ばれる)は、 $\gamma$ -ブチロラクトン環を共有する特有の化合物で、極めて微量生産されるにすぎないが、非常に強い生理活性を持つ事、及び後述する特異的リセプタータンパク質の存在とこのリセプターを介した信号伝達など、高等動物におけるホルモンと極似た性質を有しており、放線菌のホルモンと見なすことが出来よう。

本稿では、放線菌autoregulatorに関して、1970年代における*Streptomyces griseus*からのA-factorの単離に始まり、近年の放線菌の遺伝学的基準菌である*Streptomyces coelicolor* A3(2)よりのautoregulator SCB1の取得・構造決定に至る経緯をまとめ、現時点で判明している放線菌autoregulatorの生合成経路について述べる。

### 2. 放線菌由来 butyrolactone autoregulator の単離と構造決定

現在までに、*Streptomyces*属放線菌7種より、一部構造が同一と見なすべき化合物があるものの、計12種類のautoregulatorが報告されている(Fig.1)<sup>1)</sup>。

歴史的に見て最も古くから知られているのは、*S. griseus*のA-factor(1)で、本化合物は、1970年代に旧ソビエトのKhokhlovらによって単離され、後のautoregulator研究の嚆矢となった化合物である。しかし、旧共産圏での研究ということもあってか、当時の学会にはなかなか受け入れられず、世界的に認知されるには至らなかったが、後に東京大学の別府(現、日本大学)らによって再発見され、autoregulator研究の一大潮流となっている。A-factorはストレプトマイシン非生産、且つ孢子着生欠損の*S. griseus*



\* Takuya NIHIRA  
1953年1月生  
1980年京都大学大学院工学研究科工業化学専攻博士課程修了  
現在、大阪大学大学院・工学研究科・応用生物工学専攻、助教授、工学博士  
TEL 06-6879-7433  
FAX 06-6879-7432  
E-Mail nihira@bio.eng.osaka-u.ac.jp

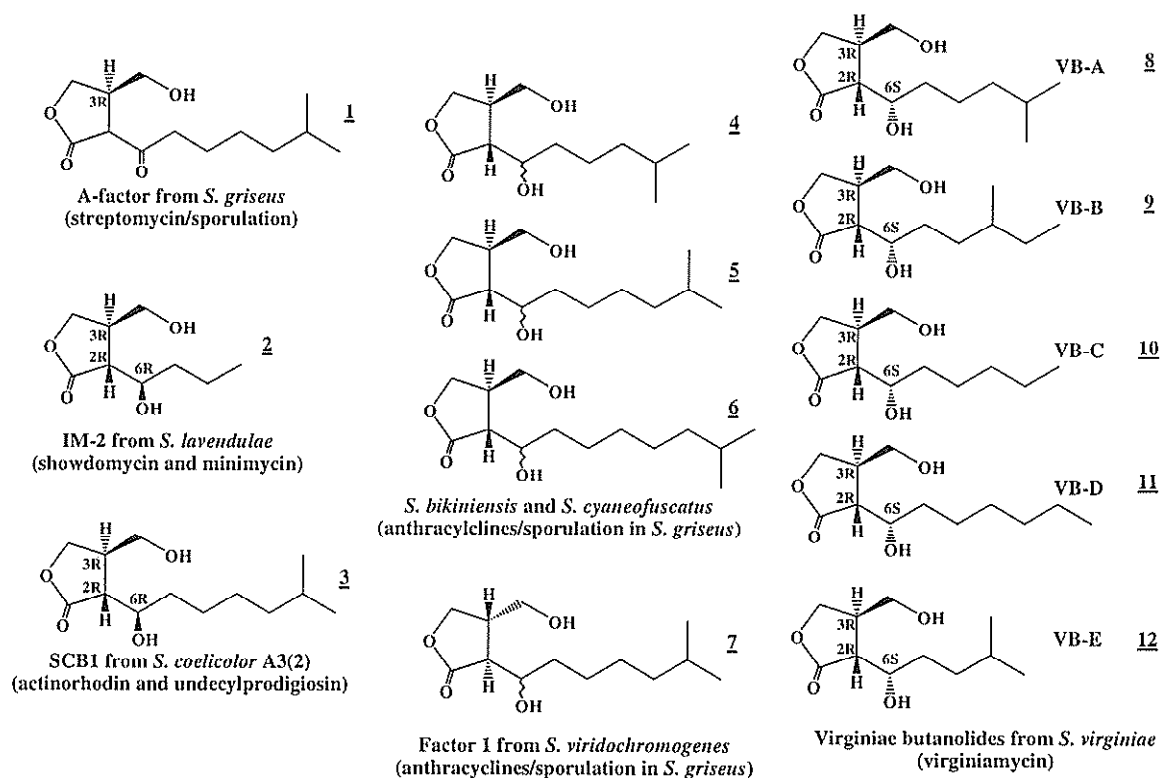


Fig. 1

変異株に対して、2 ngで、両形質を回復させる能力を持つ。当初は、(3S)の絶対立体構造が提唱されていたが、森らの合成研究を経て、(3R)の立体構造を持つことが確定している。

我々は、*S. virginiae*野生株から、自身に対する抗生物質生産誘導能を指標にして、virginiae butanolide (VB) A~E (8~12)と命名した5種の化合物を単離し、その構造を絶対立体構造をも含めて決定した。又、*S. lavendulae* FRI-5からは青色色素生産誘導能を指標にIM-2(2)<sup>2)</sup>を、更に放線菌の遺伝学的基準菌である*S. coelicolor* A3(2)からは、色素性抗生物質(actinorhodinとundecylprodigiosin)の生産誘導能を指標としてSCB1(3)<sup>3)</sup>を単離し、その構造を決定した。これらA-factor, VB類, IM-2, SCB1は、いずれも(3R)若しくは(2R, 3R)の絶対立体構造を持ち、3-hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolactone骨格を共有する化合物群で、ブチロラクトンオートレギュレーターと総称される。構造的には、2位側鎖に微妙な相違があり、6位にカルボニル基を持つA-factor型、6位に水酸基を持ち6Sの絶対立体構造を持つVB型、更に6位に水酸基を持ち6Rの絶対立体構造を持つIM-2型の3群に分類される。SCB1は

長鎖IM-2型のautoregulatorで、A-factorのカルボニル基が還元された構造を持つ。

これら以外に、旧東ドイツのGräfeらにより、*S. viridochromogenes*よりFactor 1(7)が、又*S. bikiniensis*から2種類の化合物の混合物(4, 5)、並びに*S. cyaneofuscatus*から3種の化合物の混合物(4~6)が精製され、質量分析による構造推定がなされている。いずれも抗生物質非生産、形態分化欠損の*S. griseus*変異株に対する形質回復能を指標として検出、精製されており、生産菌自身に対する効果の有無は不明である。従って、生産菌自身の表現型質を制御するというautoregulatorの定義からすると、厳密な意味ではautoregulatorの範疇からは外さざるを得ないが、放線菌の形質を支配する低分子ホルモン様因子としては重要である。

残念ながら、*S. viridochromogenes*のFactor 1及び*S. cyaneofuscatus*等の3種類の化合物の立体構造に関しては、若干の曖昧さが残っているのが現状である。当初、Factor 1には2,3-transの、又*S. cyaneofuscatus*等よりの3種の化合物には2,3-cisの構造が提唱されていたが、2,3-trans及び2,3-cisの相対立体配置の相違によるとされたNMRデータが、実は

いずれも2,3-trans型化合物の6位立体の相違に由来する事が判明し、我々はFactor 1はIM-2型の、又*S. cyaneofuscatus*等の3種類の化合物はVB型の化合物であると推定している。しかし、旋光度やCD値などのデータが記載されていないため、各々可能な2種類の鏡像体〔VB型では(2R,3R,6S)-体と(2S,3S,6R)-体、IM-2型では(2R,3R,6R)-体と(2S,3S,6S)-体〕のいずれであるかを確定することができないのが現状である。VB類、IM-2、SCB1など、今までに単離されてきた化合物すべてが、(2R,3R)の立体を持っていることから敷衍すれば、Factor 1は(2R,3R,6R)-体であり、*S. cyaneofuscatus*等の3種類の化合物は(2R,3R,6S)-体であろうと考えられるが、その決着は今後の問題である。

上記12種類の化合物は、いずれも極めて微量にしか生産されず、その単離は困難を極める。例としてIM-2の精製(Table 1)を挙げるが、1150 L培養液よりのイソブタノール抽出物を出発原料として、12段階の精製工程の後、0.58 mgを単離し得たのみである。比活性基準で17万倍、重量基準では123万倍精製したことになる。同様の微量生産はVB-A(1150 L培養液より0.82 mg単離)、SCB1(300 L培養液より0.34 mg単離)でも見られる現象であり、放線菌のautoregulatorを単離するには数百リッタースケールの培養液から出発することが必須であることを示している、と同時にこの程度の微量生産であっても生産菌にとっては充分量であり、各々のautoregulatorが極めて高い生理活性を持つ事をも示している。

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、最も弱いVB-B, Eでも10 ng/mlで有効であり、いずれも極めて活性の強い誘導因子である。IM-2も極めて高い活性を持つ因子で、0.6 ng/mlで生産菌*S. lavendulae* FRI-5株に対して、青色色素の生産を誘導する能力を持つ。

ここで注目されるのは、VB, IM-2, SCB1のいずれもが生産菌に対して抗生物質生産のみを誘導し、形態分化には全く影響を及ぼさない事である。これは、後の該当リセプター遺伝子破壊株の表現形質からも確認された現象であるが、VB, IM-2, SCB1とそのリセプターは、形態分化には全く関与せず<sup>4,5,6</sup>、A-factorが*S. griseus*に対して抗生物質生産と形態分化の両者を誘導する現象と強い対比を示している。このことから、A-factor型autoregulatorは両形質を誘導し、VB型/IM-2型autoregulatorは二次代謝のみを支配するとも考えられるが、Factor 1やGräfeの3因子というそれぞれIM-2型及びVB型因子が*S. griseus*に対しては、両形質を誘導し得る事実と矛盾する。以上の事実を総合すると、A-factor型autoregulatorではなく、*S. griseus*ではautoregulatorは両形質を誘導するが、その他の放線菌ではautoregulatorは二次代謝のみを誘導する事を指し示していると推定でき、この意味で*S. griseus*は例外的に単純な制御系を有する菌であると推定される。

Table 1. *Streptomyces lavendulae* FRI-5株よりのIM-2の精製

精製工程	収量 (g)	IM-2活性 (10 <sup>6</sup> unit)	比活性 (units/mg)	精製率 (-fold)
isoブタノール抽出	714.7	7.2	10	1.0
5%メタノール可溶	259.3	6.8	25	2.5
1st 活性炭カラム	98.8	6.7	68	6.8
2nd 活性炭カラム	24.7	4.6	190	19
Diaion HP-20	15.8	4.8	300	30
NaHCO <sub>3</sub> -isoブタノール分配	4.88	3.3	680	68
分取用C <sub>18</sub> HPLC	1.93	3.1	1,600	160
1st 分析用HPLC	0.541	3.3	6,000	600
2nd 分析用HPLC	0.043	3.2	76,000	7,600
3rd 分析用HPLC	0.013	3.5	270,000	27,000
4th 分析用HPLC	0.0054	1.6	290,000	29,000
5th 分析用HPLC	0.00058	1.0	1,700,000	170,000

出発原料は、培養液1150L

今後, *S. griseus*以外に, 1種類のautoregulatorが形態分化と二次代謝の両者を誘導する放線菌を見出し得るかどうかを詳細に検討する必要があるが, 現時点では, 一般放線菌においては, 形態分化と二次代謝とは, 別々のautoregulator制御下にあると想定すべきであろう.

### 3. オートレギュレーターの生合成経路

これらブチロラクトンオートレギュレーターは, 極めてユニークな構造の化合物群で, どのような経路で生合成されるのかに非常に興味を持たれる. しかし, 上述したように, *S. virginiae*などの従来の生産菌では, 数 $\mu\text{g/L}$ という生産量しかなく, 生合成研究で多用される安定同位体取り込み実験が極めて困難であったが, 幸運にも, 放線菌におけるVB類の分布を調べている過程で, *S. antibioticus* IFO 12838株よりVB類を数百倍高生産する能力を持つ自然突然変異株*S. antibioticus* NF-18株を見出すことが出来, 本菌を用いて各種安定同位体の取り込み実験が可能となった<sup>7,8)</sup>. その結果をFig. 2に示すが, VB-Aには, 2分子の酢酸, 各1分子のイソ吉草酸とグリセリンが取り込まれる. 種々の予想中間体を合

成し, 取り込み実験やin vitroの変換実験を行った結果, 脂肪酸合成と類似した経路でまずisovaleryl-CoAをスターターとして2分子の酢酸が取り込まれた $\beta$ -ケト酸CoA(13)が生成し, これとグリセリン由来のジヒドロキシアセトンとがエステル(化合物14)を形成した後, 分子内アルドール型の反応(化合物15), 脱水還元を経て, A-factor型化合物(6-dehydroVB-A, 17)が生じ, 更に6位カルボニル基が還元されてVB-Aとなる経路を推定している. Fig.1に示したようなautoregulatorの多様性は, スターター分子がisobutyryl-CoAかisovaleryl-CoAか, 及びmalonyl-CoAを介した伸長反応が2回か3回かなどの, 生合成経路上のわずかな相違によって決定されていると考えられる. すなわち, VB-Aの場合には, isovaleryl-CoAがスターターであるのに対して, A-factorではisobutyryl-CoAがスターターであり, 3分子の酢酸が3回の伸長反応で取り込まれた $\beta$ -ケト酸CoAが生じる. その後, ジヒドロキシアセトンとエステルを形成し, 6位が還元されずに残った化合物がA-factorであり, 更に6位が立体特異的に還元され6Rの立体となったものがSCB1である. IM-2の場合には, スターターはacetyl-CoA

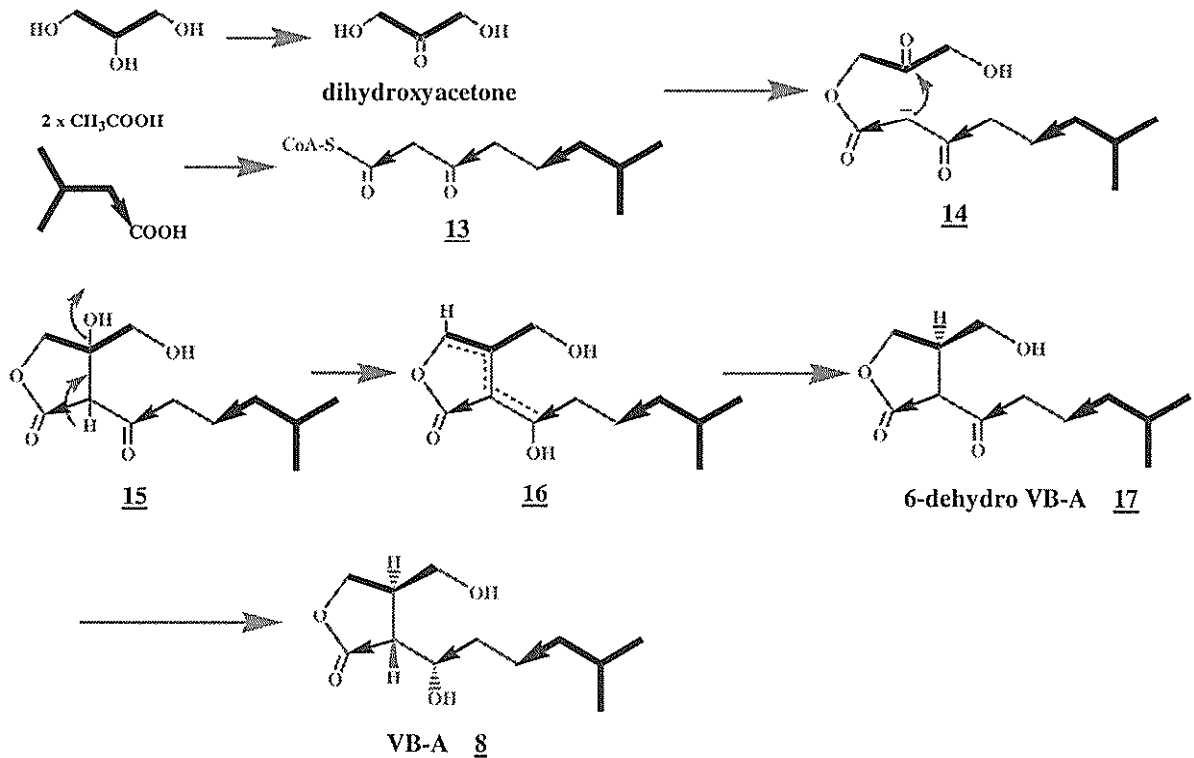


Fig. 2

であり、2分子の酢酸が取り込まれた後、同様の生合成反応・6位の立体特異的還元を経て生成すると予想される。通常の1次代謝系以外に、autoregulator生合成系に特異的な反応として、 $\beta$ -ケト酸とジヒドロキシアセトンとのエステル合成を触媒するエステル合成酵素、還元的脱水を伴う環化反応を触媒する酵素、及び最終段階であるA-factor型化合物の立体特異的カルボニル還元酵素の最低3種類の特異的生合成酵素が必要であろうと考えているが、このうち、A-factor型化合物(6-dehydro VB-A)還元酵素は、上記*S. antibioticus*<sup>5)</sup>並びに*S. virginiae*でその存在を見出しており、又該当する遺伝子の取得・解析も終了している。

#### 4. オートレギュレーター放線菌における分布

このようなオートレギュレーターによる制御が放線菌でどの程度普遍的であるかを知る目的で、別府ら<sup>9)</sup>、Gräfeら<sup>10)</sup>及び我々<sup>11)</sup>により、放線菌におけるオートレギュレーター生産能が多数の放線菌を用いて検討されている (Table 2)。A-factor欠損(従って気菌糸形成欠損及びストレプトマイシン生産欠損)の*S. griseus*に対して、対象とした放線菌の約15%が両形質を回復させる化合物を生産することから、これらはA-factor活性化化合物を生産すると判断される。一方、Gräfeらの因子は、対象放線菌の約26%が生産する。又同様に、VB生産菌である*S. virginiae*に対してvirginiamycin生産を誘導する化合物は全放線菌の約20%が、IM-2生産菌である*S. lavendulae* FRI-5に対して青色色素生産誘導をもたらす化合物は、全放線菌の約15%が生産する。ここで注意すべきは、Gräfeらが用いた検定菌(気菌糸形成欠損

及び抗生物質生産欠損の*S. griseus*変異株)は、IM-2型化合物であるFactor 1によっても、又VB型化合物である化合物4~6によっても、形態分化/二次代謝能が回復する点であり、リガンド特異性の大変甘い検定菌であることから、上記26%のうちVB型/IM-2型活性化化合物の比率は不明である。我々が用いた*S. virginiae*では、VB-AとIM-2の最小有効濃度が0.0006  $\mu\text{g}/\text{ml}$ と10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるように、VBに対して極めて特異的にレスポンスする性質を有しており、又IM-2の生産菌である*S. lavendulae* FRI-5もIM-2に対する特異性が高い。逆相HPLCで粗活性成分を分離すると、多くの場合複数の活性成分に分離し、*S. virginiae*がVB-A~Eの5種類の成分を同時に生産している現象と一致した。これは、Gräfeらの因子の場合に、*S. bikiniensis*が2種類の、又*S. cyaneofuscatus*が3種類の誘導因子を同時に生産しているという現象や、A-factor生産菌の*S. griseus*がA-factor以外に少なくとも4種類のVB活性化化合物を生産している現象ともよく符合する点であり、ブチロラクトンオートレギュレーター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。

*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、各誘導因子生産菌間での重複は少なく、従って、A-factor、Gräfeらの因子類、VB類、或いはIM-2のいずれかを生産する能力を持つものは、全放線菌中少なくとも60%<sup>12)</sup>はあるものと推定している。このように*Streptomyces*属放線菌においては、ブチロラクトンオートレギュレーターが広く存在していることが判明したわけで、二次代謝制御の上で普遍的な役割を果たしているも

Table 2. 放線菌におけるブチロラクトンオートレギュレーター生産能の分布

	培養液を検定した 放線菌(株数)	分布率 (%)	文 献
A-factor 活性化化合物 <sup>1)</sup>	175	14.9	Hara & Beppu (1982)
Gräfe 因子活性化化合物 <sup>2)</sup>	304	26.3	Eritt et al. (1984)
VB 活性化化合物 <sup>3)</sup>	81	19.8	Ohashi et al. (1989), Hashimoto et al. (1992)
IM-2 活性化化合物 <sup>4)</sup>	81	14.8	Hashimoto et al. (1992)

Bioassay 用検定菌

1) A-factor 欠損、従って気菌糸形成欠損、且つストレプトマイシン生産欠損の*S. griseus*変異株

2) 気菌糸形成欠損、且つ抗生物質生産欠損の*S. griseus* ZIMET 43682

3) VB 生産菌、*S. virginiae* 野生株

4) IM-2 生産菌*S. lavendulae* FRI-5 野生株

のと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Yamada, Y. & Nihira, T. (1998) **Comprehensive Natural Products Chemistry**, Vol.8, p377-413. D.H.R.Barton and K.Nakanishi, eds. Elsevier Science.
- 2) Sato, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M. & Yamada, Y. (1989) **J.Ferment. Biotechnol.** **68**, 170-173.
- 3) Takano, E., Nihira, T., Hara, Y., Jones, J. J., Gershater, C.J.L., Yamada, Y. & Bibb, M. (2000) **J. Biol. Chem.** **275**, 11010-11016.
- 4) Takano, E., Chakraburttty, R., Yamada, Y., Nihira, T. & Bibb, M. J. (2001) **Mol. Microbiol.** **41**, 1015-1028.
- 5) Kitani, S., Yamada, Y. & Nihira, T. (2001) **J.Bacteriol.** **183**, 4357-4363.
- 6) Nakano, H., Takehara, E., Nihira, T. & Yamada, Y. (1998) **J.Bacteriol.** **180**, 3317-3322.
- 7) Sakuda, S., Tanaka, S., Mizuno, Y., Sukcharoen, O., Nihira, T. & Yamada, Y. (1993) **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, 2309-2315.
- 8) Sakuda, S., Higashi, A., Tanaka, S., Nihira, T. & Yamada, Y. (1992) **J. Am. Chem. Soc.** **114**, 663-668.
- 9) Hara, O. & Beppu, T. (1982) **J. Antibiotics**, **35**, 349-358.
- 10) Eritt, I., Gräfe, U. & Fleck, W. F. (1984) **Z. Allg. Mikrobiol.** **24**, 3-12.
- 11) Ohashi, H., Zheng, Y-H., Nihira, T. & Yamada, Y. (1989) **J. Antibiotics**, **42**, 1191-1195.
- 12) Hashimoto, K., Nihira, T. & Yamada, Y. (1992) **J. Ferment. Bioeng.** **73**, 61-65.

