学会賞受賞論文

(業績賞・研究)

微生物の生長や分化に関わる生理活性天然物に関する研究

夏目 雅 裕*

東京農工大学大学院農学研究院

(2016年6月12日受理)

Study on bioactive natural products involved in the growth and morphological differentiation of microorganisms

Masahiro NATSUME

Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183–8509, Japan

Keywords: Streptomyces, aerial mycelium, structure-activity relationship, phytotoxin, germination inhibitor.

はじめに

生物の生長・分化や生物間の相互作用には、遺伝子やタンパク質などの高分子と共に、多種多様な構造と作用を有する低分子の生理活性物質が重要な役割を果たしている (Fig. 1). このような生命現象を司る生理活性物質を見つけ出し、その作用機構を明らかにすることは、生命現象の理解を深めるだけでなく、農業生産などの応用面への展開にも大変重要なことである。本稿では放線菌にまつわる生理活性物質に関する我々の研究について紹介する。

1. 放線菌の形態分化と代謝分化の制御物質に関する研究

1.1. *Streptomyces alboniger*の生産する気菌糸誘導物質 pamamycin

放線菌の菌糸は、培地表面や培地中に伸長する基生菌糸 (substrate mycelia) とそれから分化して空气中に伸長する気菌糸 (aerial mycelia) の2種類がある (Fig. 2). 基生菌糸は

褐色の湿った感じのコロニー表面であるのに対し、気菌糸は疎水性の表層構造を有し粉をふいたように見え菌種によってさまざまな色を呈するので、基生菌糸からの気菌糸の分化は肉眼でも容易にわかる劇的な形態変化である。また、気菌糸を形成しなくなると抗生物質などの代謝産物を生産しなくなることがあり、形態分化に伴って、菌糸の中の代謝系にも変化が起きていると考えられる。そこで、気菌糸を分化誘導す

Fig. 1. Physiologically active substances involved in the growth, differentiation and interaction of organisms.

* 〒183–8509 東京都府中市幸町3–5–8

E-mail: natsume@cc.tuat.ac.jp

© 日本農薬学会

Fig. 2. Life cycle of *Streptomyces* sp. Growth condition of substrate mycelia (A) and that formed aerial mycelia (B).

る物質が得られれば、物質生産も制御できるのではないかの考えで研究が開始された。

近藤と丸茂は多数の放線菌をスクリーニングして、*S. alboniger*が気菌糸誘導物質を生産しているのを見だし、主要な活性物質として pamamycin-607 (分子量 607) を単離構造決定した^{1,2)}。その後を受けて、私は以下の研究を行った。

1.2. Pamamycin 同族体・異性体の単離構造決定

*S. alboniger*が多くの同族体・異性体を生産すること、またそれらの気菌糸誘導活性が異なることは近藤によって示唆されていた。そこでそれらの精製法を検討した結果、まず ODS-HPLC で精製すると同族体を分離でき、各同族体を次にアミンを含む順相系溶媒で NH_2 -HPLC にかけると異性体を分離できるのを見いだした^{3,4)}。なぜかは不明だが、逆の順序では分離がうまくいかなかった。

得られる同族体・異性体が少量のため、構造決定は pamamycin 混合物を LiAlH_4 還元して得られるジオールを GC-MS で分析し、di-benzoate に導いて精製・単離して、NMR と MS で構造を決めておいて、単離した異性体・同族体の一部 (数十 μg) を LiAlH_4 還元、GC-MS 分析してどのジオールの組合せかを調べることで行った。その結果、Fig. 3A に示す 11 種類の同族体・異性体を得ることができた^{3,4)}。

1.3. Pamamycin の絶対立体配置の決定

Pamamycin-607 は大小 2 つのヒドロキシカルボン酸から構成されている。小さい方のヒドロキシカルボン酸は殺ダニ抗生物質として知られる nonactin の構成ヒドロキシカル

Fig. 3. Structures of isolated pamamycins (A) and conformation of pamamycin-607 (B). R₃ and R₄ are indicated by circles.

Fig. 4. Effect of alkyl substituents on biological activities of pamamycins. Numbers in the graphs show mean value of two pairs (except for R₄).

ボン酸と類似の構造で、絶対立体配置が決定されていたので、両者を同じテトラヒドロフラン誘導体へ導き旋光度を比較することにより、pamamycin-607 の絶対立体配置を決定した⁵⁾。また、pamamycin-635A から得られる小さい方のジオールの 2 級水酸基の絶対立体配置を改良 Moshier 法により決定し、pamamycin-607 と同じ結論を得た³⁾。

1.4. Pamamycin の構造活性相関とコンフォメーション

Pamamycin-607 を *S. alboniger* の気菌糸欠損変異株に与えると、0.1 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{disc}$ では気菌糸誘導活性を示すが、10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 以上では基生菌糸の生育阻害を引き起こす。単離した pamamycin 同族体・異性体の気菌糸誘導活性と生育阻害活性を調べたところ、気菌糸誘導活性は同族体・異性体によって大きく変化するが、生育阻害活性はあまり変わらないことがわかった。

同族体・異性体の構造を比較すると、5 カ所のアルキル置換基 R₁ ~ R₅ が 1 カ所だけ異なる組合せをみつけることができる。置換基の変化に伴う活性の変化を纏めたのが Fig. 4 である。このグラフから、気菌糸誘導活性は R₃ が R₄ がメチル基からエチル基に変化するだけでほとんど失われること、生育阻害活性は置換基の位置によらず同程度の低下を示すこと

Fig. 5. Structure-activity relationship of pamamycins.

が明らかになり、両者の作用機作は異なることがわかった。また、Pamamycin-607から化学的に誘導した化合物⁶⁾や*S. alboniger*および別のpamamycin生産菌から分離した側鎖の異なる同族体など⁷⁻⁹⁾の活性を調べることにより、pamamycinの気菌糸誘導活性に関する構造活性相関を明らかにした (Fig. 5)。側鎖の窒素原子が活性に必須であること、ジメチルアミノ基よりモノメチル体の方が活性が強いこと、側鎖が長くなると活性が大きく低下することなど、分子の右側部分が活性に重要であることが明らかになった。

Pamamycinのコンフォメーションを¹H NMRの結合定数とNOE実験により解析した^{1,3)} (Fig. 3B)。その結果、ジメチルアミノ基のメチル基と小さい方のヒドロキシ酸の水酸基の付け根のプロトンとの間にNOEが観察され、ジメチルアミノ基はマクロジオリド環の上側に覆い被さるような形になっていること、気菌糸誘導活性に大きく影響する置換基R₃とR₄は分子の外側 (Fig. 3Bでは紙面の奥側) に突き出るような配置になっていることが明らかになった。

1.5. Pamamycin-607の他の菌の気菌糸形成に及ぼす効果と作用機構

*S. alboniger*と同時期に行われていた*S. ambofaciens*の気菌糸誘導物質探索の過程で、Ca²⁺が多くの放線菌の気菌糸形成に重要であることが示された¹⁰⁾。そこで、Pamamycin-607とCa²⁺の他種菌株に対する効果を調べたところ、通常の培養条件では気菌糸を形成せずPamamycin-607あるいはCa²⁺の投与で気菌糸形成が誘導される菌種と少量の気菌糸形成が認められるが両者の投与で促進される菌種がテストした菌種の約7割にのぼり、Pamamycin-607とCa²⁺の有効な菌種がほぼ同じであることが明らかになった¹¹⁾。また、pamamycin-607やCa²⁺が作用を示さなかった菌種には元々気菌糸を豊富に形成する菌種が多く、これらの菌にCa²⁺のキレート剤であるEGTAを投与すると気菌糸を形成しなくなることで、pamamycin-607の気菌糸誘導活性がEGTAで失われること¹²⁾から、pamamycin-607の活性発現にCa²⁺が関与している可能性が高まった。

そこで、蛍光色素による放線菌菌体内の遊離Ca²⁺濃度

Fig. 6. Biosynthesis of pamamycin-607.

([Ca²⁺]_i)を測定したところ、pamamycin-607は[Ca²⁺]_iの一過的な上昇を引き起こすことを見いだした¹³⁾。Pamamycin-607にはCa²⁺を輸送するイオノフォア的作用はない²⁾ことから、pamamycin-607が何らかのCa²⁺調節系に作用していると考えられる。

1.6. Pamamycin-607の他の菌の物質生産に及ぼす効果

Pamamycin-607によって気菌糸形成が誘導されたり促進された菌の培養物をコルクボーラーで打ち抜いて寒天ディスクを作成し、*B. subtilis*に対する抗菌活性を調べたところ、4菌株で抗菌活性の変化が認められた¹¹⁾。この結果は、pamamycin-607が形態分化と共に代謝分化も誘起することを示している。これらの菌の抗生物質を単離同定し、生産量を定量

Fig. 7. Phytochemicals produced by phytopathogenic *Streptomyces* spp.

したところ、150～270%の生産増加が認められた¹⁴⁾。以上の結果から、pamamycinはその添加によりはじめて生産されるようになる新規物質の探索や、生産性の低い有用二次代謝産物の生産増強に応用できる可能性を示すことができた。

1.7. Pamamycinの生合成

標識化合物の取り込み実験¹⁵⁾、生合成変異株で蓄積する化合物の分析と、前駆体と推定される化合物の投与による代謝実験¹⁶⁾から、pamamycinはまず大小2種類のヒドロキシカルボン酸が生合成され、大きい方のヒドロキシ酸にジメチルアミノ基が導入されて、最後にマクロジオリド環が形成される生合成経路¹⁶⁾ (Fig. 6) を提唱することができた。

2. 植物病原放線菌の生産する植物毒素に関する研究

2.1. ジャガイモそうか病菌の生産する植物毒素としての concanamycins の同定

Pamamycinの研究を進めている過程で、「ジャガイモおよびペテンサイそうか病菌 (*Streptomyces* spp.) による毒素生産 I. 炭素源および窒素源の影響について」という酒井らの論文¹⁷⁾ が目にとまり、ジャガイモそうか病が放線菌による病害であることを知った。植物毒素の生産性が培地の炭素源や窒素源によって変わるなら、気菌糸形成と植物毒素生産が関連しているのではないかと、そうであれば気菌糸形成の制御物質でそうか病をコントロールできるのではないかと考えた。また、植物の病害のほとんどは、特定の種の病原菌によって引き起こされ、特定の病徴を示すが、調べてみるとジャガイモそうか病は変わった病害で、複数の菌種が関与しており、病徴も多様であることも興味を引いた。

培地の炭素源と窒素源を変えると気菌糸を形成する組合せ、形成しない組合せを見つけることができたが、残念ながら気菌糸形成の有無と粗抽出物の植物毒素生産性との関連は認められなかった。また、この研究を始めて間もなく、Kingらによってジャガイモそうか病菌の生産する植物

毒素として thaxtomins A, B が単離構造決定されてしまった (Fig. 7)。しかし、我々の粗抽出物は Dragendorff 試薬では呈色しなかったことから thaxtomin とは異なる植物毒素が生産されていることが明らかになり、精製を進めた結果、concanamycins A, B を同定した¹⁸⁾ (Fig. 7)。2種類の植物毒素の存在が明らかになったことで、そうか病が複数の菌種によって引き起こされることが多様な病斑が形成されることとの関係に興味を持った。

2.2. ジャガイモそうか病菌の分類と concanamycins 生産性との関係

当時はジャガイモの病原放線菌の分類は確立していなかったが、田代らが孢子鎖の形態やDNA相同性によって4種類に分類できることを報告していた¹⁹⁾ ので、菌株を分譲していただき、2種類の植物毒素生産性を調べた。その結果、thaxtomin は4種類の菌すべてが生産しているのに対し、concanamycin は *S. scabies* のみが生産していることを明らかにした²⁰⁾。

2.3. 病斑型と thaxtomin A および concanamycin 生産量との関係

代表的な2種類のそうか病菌、*S. scabies* と *S. acidiscabies* をジャガイモに接種して、生産される毒素と病徴との関係を調べた。その結果、*S. scabies* はジャガイモに接種した場合にも2種類の毒素を生産し、陥没型の病斑を形成させたのに対し、*S. acidiscabies* を摂取したジャガイモからは thaxtomin しか検出されず、かさぶた状の隆起型の病斑が形成された²¹⁾。

Thaxtomin を発見したグループはそうか病の病斑型の違いは、生産される thaxtomin の量やジャガイモの品種、病原菌株の活力、感染の時期や土壌環境条件などによるのであって、植物毒素は thaxtomin だけであると主張しているが、この実験から concanamycin が同時に生産されるか否かも病斑型の違いに重要であることが示唆された。

2.4. ジャガイモそうか病の類似症の病原放線菌が生産する植物毒素

ジャガイモそうか病の類似症に russet scab や netted scab と呼ばれる病害がある。そうか病の病斑型に2種類の毒素が関与しているならば、これら類似症には別の植物毒素が関与していると考えて、これらの菌の生産する植物毒素を探索した。その結果、russet scab の病原菌 "*S. cheloniumii*" からは16員環マクロライド化合物 FD-891²²⁾ を、またスウェーデンで採集された netted scab の病原菌 *S. turgidiscabies* #65 からはアントラキノン系化合物 fridamycin E^{23,24)} を単離同定した (Fig. 7)。

残念ながら、我々が見出した3種類の化合物は植物毒素活

性を示すこととしては初めての報告であったが、いずれもすでに製薬会社等が単離構造決定を報告していた化合物だったことで、放線菌については膨大な量の研究がなされていることを思い知らされた。

3. 放線菌の自己胞子発芽抑制物質

3.1. メロンがんしゅ病菌の自己胞子発芽抑制物質

Hypnosin

糸状菌の胞子に自らの発芽を抑制する物質が含まれていることは上野と宮川らによるまとまった研究がある²⁵⁾。放線菌の場合も、胞子を培地に蒔いてもすべてが同時に発芽するわけではないことは報告されていた。Ensignらは*S. viridochromogenes*の発芽中の胞子が他の胞子の発芽を阻害する物質を培地中に放出することを見だし、この物質germicidein (Fig. 8)はその後Petersenらによって単離構造決定された²⁶⁾。Germicideinは $IC_{50}=5\text{ ng/mL}$ という極低濃度で胞子発芽を阻害し、炭素が一つ少ない同族体は活性を示さないと書かれていた。一方、吉田らはメロンの根に瘤を形成させる病原放線菌、メロンがんしゅ病菌を発見し、その胞子の発芽率は80～90%で、40°C20分の加熱処理で発芽率が向上することを報告した²⁷⁾。

我々は吉田らから菌株を譲り受け、自己胞子発芽抑制物質を探索した。放線菌の胞子は約 $1\mu\text{m}$ と小さいが、疎水性の表面構造のためコロニー上にガラスビーズを転がすと、胞子のみを採集することができる。そこで、3500枚のシャーレ培養物から胞子を集め、酢酸エチル抽出、シリカゲル・ODSカラムクロマト、ODS-HPLCで精製することにより発芽抑制物質 0.25 mg を単離した²⁸⁾。胞子のみを集めることで不純物の少ない粗抽出物を得られたことが比較的簡単な精製工程で活性物質を単離できた理由であると考えている。構造決定にはNMRは全く役に立たなかったが、特徴的なUV吸収スペクトル (λ_{max} 328, 318, 263 nm)を示したので、高分解能質量分析で推定した分子式から可能性のある構造を考え、UVスペクトルを計算化学により求めて、実際のスペクトルと比較することにより可能性を絞り込んだ。さらに、誘導体のマススペクトル解析でカルボキシル基とアセチル基をそれぞれ1個ずつ含むことが明らかになったことから、Fig. 8の構造であることを明らかにした²⁹⁾。単離した化合物は天然物としては初めての報告であったので、ギリシャ神話の眠りの神hypnosに因んでhypnosinと命名した。

Hypnosinは胞子懸濁液に添加してインキュベートすると発芽による濁度の上昇を抑制するが、胞子の発芽が修了した36時間後に添加するとその後の菌糸伸長による濁度の上昇は阻害しないことから、胞子発芽を特異的に抑制することを示した ($IC_{50}=0.25\mu\text{g/mL}$)。また、胞子懸濁液に添加して3時間インキュベートした後、遠心分離により胞子を集め水で洗浄してからさらに45時間インキュベートすると、発芽し

Fig. 8. Spore germination self-inhibitors produced by *Streptomyces* spp.

て無処理の胞子の場合とほぼ同じ濁度を示すことから、可逆的に作用していることも示すことができた²⁸⁾。

3.2. *S. coelicolor*におけるgermicideinの意義と今後の課題

その後、放線菌のポリケタイド生合成を研究しているグループが*S. coelicolor*がgermicideinを生産することを発表した。彼らの興味はその生合成遺伝子や酵素にあり、生理的役割については論じられていなかった。そこで*S. coelicolor*におけるgermicideinの役割を調べた。その結果、*S. coelicolor*は4種類の同族体を生産しており (Fig. 8)、それらはほぼ同程度の活性を示し、発芽抑制活性は $IC_{50}=20\sim100\mu\text{g/mL}$ と*S. viridochromogenes*の場合より著しく弱いことが明らかとなった³⁰⁾。また、germicidein類は胞子発芽と菌糸伸長の両方を阻害した。

同じバイオアッセイで活性を比較していないが、*S. viridochromogenes*と*S. coelicolor*でgermicidein類の作用が大きく異なったことから、germicideinは*S. viridochromogenes*の真の発芽抑制物質なのか、また、hypnosinとgermicideinは*Streptomyces*属菌の普遍的な発芽抑制物質なのか、別の菌はまた別の発芽抑制物質を生産しているのか、ジャガイモそうか病などの病原放線菌の発芽抑制物質を解明できれば新しい薬剤になるのではないか、といったことを考えながら研究を継続している。

おわりに

大学に入って有機電子論を学び、細菌の細胞壁であるペプチドグリカンの生合成とそれを阻害するペニシリンの作用機構を反応式で描けることの美しさに魅せられて、生物現象を化学の言葉である生理活性物質で説明したいと思い続けながら研究を進めてきた。本稿で紹介した研究はすぐに応用に結びつくものではないかもしれないが、ユニークな視点を示すことができたのではないかと考えている。

大学の研究室名から農薬の文字が消えはじめて久しいが、世界人口は増え続けており、食糧供給・作物保護の必要性はますます高まっている。大学人としてこの課題にどのように取り組むかは大きく難しい問題で、農薬化学から名称変更した研究室の多様さがそのことを表しているように思う。私としては、新しい生理活性物質を見つけ、新しい作用を明らか

にし、生物の仕組みや生物間の相互作用の理解を深めることで、少しでも貢献できると信じて、研究を続けていきたい。

謝 辞

本研究は名古屋大学大学院農学研究科農薬化学研究室と東京農工大学大学院農学研究科生物制御化学研究室において、多くの学生とともにやってきたもので、本学会賞の栄誉を彼らと分かち合いたいと思います。名古屋大学名誉教授、丸茂晋吾先生には卒業研究から助手時代まで、公私にわたりご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。また、東京農工大学名誉教授、安部浩先生、安藤哲先生には常に温かく励まして頂きました。厚く御礼申し上げます。

植物病原放線菌の生産する毒素の研究では佐賀県農業試験場の田代暢哉博士に、自己孢子発芽抑制物質に関する研究では東海大学農学部吉田政博教授に大変お世話になりました。さらに、個々にお名前は挙げられませんが多くの方々にご協力、ご指導を頂きました。ありがとうございました。

引 用 文 献

- 1) S. Kondo, K. Yasui, M. Katayama, S. Marumo, T. Kondo and H. Hattori: *Tetrahedron Lett.* **28**, 5861–5864 (1987).
- 2) S. Kondo, K. Yasui, M. Natsume, M. Katayama and S. Marumo: *J. Antibiot.* **41**, 1196–1204 (1988).
- 3) M. Natsume, K. Yasui, S. Kondo and S. Marumo: *Tetrahedron Lett.* **32**, 3087–3090 (1991).
- 4) M. Natsume, J. Tazawa, K. Yagi, H. Abe, S. Kondo and S. Marumo: *J. Antibiot.* **48**, 1159–1164 (1995).
- 5) M. Natsume, S. Kondo and S. Marumo: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1911–1913 (1989).
- 6) M. Natsume, A. Honda, Y. Oshima, H. Abe, S. Kondo, F. Tanaka and S. Marumo: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1766–1768 (1995).
- 7) I. Kozzone, H. Abe and M. Natsume: *J. Antibiot.* **52**, 329–331 (1999).
- 8) I. Kozzone, H. Abe and M. Natsume: *J. Pestic. Sci.* **26**, 149–153 (2001).
- 9) I. Kozzone, M. Hashimoto, U. Gräfe, H. Kawaide, H. Abe and M. Natsume: *J. Antibiot.* **61**, 98–102 (2008).
- 10) M. Natsume, K. Yasui and S. Marumo: *J. Antibiot.* **42**, 440–447 (1989).
- 11) M. Hashimoto, T. Kondo, I. Kozzone, H. Kawaide, H. Abe and M. Natsume: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 803–808 (2003).
- 12) M. Natsume and S. Marumo: *J. Antibiot.* **45**, 1026–1028 (1992).
- 13) M. Natsume, J. Tazawa, H. Abe, Y. Kudo, S. Kondo and S. Marumo: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 152–154 (1995).
- 14) M. Hashimoto, H. Katsura, R. Kato, H. Kawaide and M. Natsume: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1722–1726 (2011).
- 15) M. Hashimoto, I. Kozzone, H. Kawaide, H. Abe and M. Natsume: *J. Antibiot.* **58**, 722–730 (2005).
- 16) M. Hashimoto, H. Komatsu, I. Kozzone, H. Kawaide, H. Abe and M. Natsume: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 315–320 (2005).
- 17) R. Sakai, H. Kawamura, Y. Mino, E. S. Reza and A. Tanii: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **50**, 646–648 (1984).
- 18) M. Natsume, R. Ryu and H. Abe: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **62**, 411–413 (1996).
- 19) N. Tashiro, K. Miyashita and T. Suzui: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **56**, 73–82 (1990).
- 20) M. Natsume, A. Yamada, N. Tashiro and H. Abe: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **64**, 202–204 (1998).
- 21) 夏目雅裕：馬鈴しょそうか病に関する国際シンポジウム，講演・ポスターセッション要旨集，pp. 42–55, 2004.
- 22) M. Natsume, M. Komiya, F. Koyanagi, N. Tashiro, H. Kawaide and H. Abe: *J. Gen. Plant Pathol.* **71**, 364–369 (2005).
- 23) 長瀧麻穂，M. Aittamaa, J. P. T. Valkonen, 川出 洋，夏目雅裕：日本農薬学会第34回大会講演要旨集，p. 104, 2009.
- 24) 岡庭奈保子，長瀧麻穂，J. P. T. Valkonen, 川出 洋，夏目雅裕：日本農薬学会第39回大会講演要旨集，p. 61, 2014.
- 25) 上野民夫，宮川 恒：植物病害の化学，市原耿民，上野民夫編，学会出版センター，pp. 203–214, 1997.
- 26) F. Petersen, H. Zährner, J. W. Metzger, S. Freund and R. P. Hummel: *J. Antibiot.* **46**, 1126–1138 (1993).
- 27) 吉田政博，西山隆行，山口武夫，小林研三：日植病報 **60**, 711–716 (1994).
- 28) Y. Aoki, M. Yoshida, H. Kawaide, H. Abe and M. Natsume: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 986–992 (2007).
- 29) Y. Aoki, M. Yoshida, H. Kawaide and M. Natsume: *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10622–10627 (2007).
- 30) Y. Aoki, D. Matsumoto, H. Kawaide, H. Abe and M. Natsume: *J. Antibiot.* **64**, 607–611 (2011).

略 歴

夏目雅裕（なつめ まさひろ）

生年月日：1956年10月12日

最終学歴：名古屋大学大学院農学研究科博士課程（単位取得退学），博士（農学）（名古屋大学）

研究テーマ：微生物の形態分化と代謝分化や微生物と植物の相互作用の化学的解明