説 総

脂肪酸生合成阻害抗生物質セルレニンと
脂 質 代 謝

大村 智*・栗谷寿一**

* 北里大学薬学部微生物薬品製造学教室

** 北里研究所抗生物質部門

(東京都港区白金 5-9-1)

Lipid Metabolisms and Antibiotic Cerulenin, Inhibitor of Fatty Acid Synthesis

Satoshi ŌMURA and Juichi AWAYA

Kitasato University and The Kitasato Institute
(Shirokane, Minato-ku, Tokyo)

1 はじめに

抗生物質は医薬品、農薬あるいは飼料添加剤として広く利用され、各種病原微生物による感染症、ウイルス病、がんなどの克服、農産物の増産に多大な貢献をしている。一方、抗生物質に関する研究は天然有機化学をはじめ、細菌学、生化学などの関連する分野の研究と密接に結びつき、発展してきた。¹³C-NMR 利用による生合成研究、耐性機構の解明、作用機構の解明など多くの例を挙げることができる。その中で、作用機序の研究は単にメカニズムを明らかにするにとどまらず、さらにその作用を利用して、生命現象の発現にかかわる生体内諸反応の解明へと進展した。細胞壁合成阻害剤としてのペニシリン、タンパク合成阻害剤としてのピュロマイシン、RNA 合成阻害剤としてのアクチノマイシンなどがその好例である。

著者は抗生物質研究の一環として進めてきた作用機序解明の研究の中で、真菌類の生育を強く阻止する抗生物質セルレニン (cerulenin) (図-1) が脂肪酸合成の特異的な阻害作用を有することを明らかにした^{1), 2)}。これ

図-1 セルレニンの化学構造

まで、このような性質を有する抗生物質は見いだされていなかったことから、本物質は抗菌作用のみではなく、脂肪酸生合成の阻害剤としても注目されるようになった。

た。その結果、脂質代謝の関与する生化学研究あるいは脂肪酸合成系と類似した縮合反応によって生成する“ポリケチド”を経て合成される物質の生合成研究に利用されるようになった。その一部についてはすでに著者らの総説^{1,2)}があるので、それを参照していただくとして、本稿ではセルレニンの作用機序の概略とセルレニンを利用した最近の脂質代謝と抗生物質の生合成に関する研究について述べたい。

2 セルレニンの作用機序

生体にとってパルミチン酸、オレイン酸などの長鎖脂肪酸はリン脂質、中性脂質などの前駆物質として、細胞膜の構造と機能の発現に重要な役割を演じている³⁾。長鎖脂肪酸は図-2 に示した経路によって生合成される⁴⁾。

図-2 飽和脂肪酸の生合成(大腸菌)とセルレニンの作用点

すなわち、アセチル・CoAが出発物質となり、この物質

がアセチル・CoAカルボキシラーゼによって炭酸化されて、マロニル・CoA が生成する。アセチル・CoA とマロニル・CoA にアシル・キャリアー・プロテイン (ACP) が結合したアセチル・CoA-ACP とマロニル・CoA-ACP が縮合酵素とよばれる β -ケトアシル-ACP 合成酵素の働きで縮合され、 β -ケトブチル-ACP となり、図に示したそれぞれの酵素 (β -ケトアシル-ACP 還元酵素, β -ヒドロキシアシル-ACP 脱水酵素, エノール-ACP 還元酵素) によって、還元-脱水-還元がおり、炭素数が2個増加したブチル-ACP が生成される。このブチル-ACP とマロニル-ACP との間に再び縮合反応がおり、以下還元-脱水-還元のサイクルが繰り返されて、炭素数が2個ずつ増加し、炭素数 16 個のパルミチン酸が生成される。これは更に別の酵素系によって長鎖化が行われ、炭素数 18 個のステアリン酸をはじめとする、より炭素数の多い脂肪酸が生成されるとともに、不飽和化も行われ菌体脂肪酸を構成する。細菌、植物などでは図-2 に示した酵素が活性を有する状態で分離可能であるが、酵母や動物などではこれらの反応がすべて複合酵素系で行われる。生物の種類によってこれら2種類のタイプの酵素系が存在することが知られている⁵⁾。セルレニンは縮合酵素である β -ケトアシル-ACP 合成酵素の反応を阻害することにより、脂肪酸合成を阻害し、その結果として微生物の生育を阻止する。

また、セルレニンはステロール生合成系における β -ヒドロキシ・メルグルタル・CoA (HMG-CoA) が生合成される段階、すなわち HMG-CoA 合成酵素を阻害するが、脂肪酸合成系に対する阻害系に比べて弱い^{6), 7)}。

3 脂質生化学研究における利用

以上述べてきたように、セルレニンは脂肪酸生合成を強く阻害し、一般の抗生物質にみられるような DNA, RNA 合成、タンパク合成、細胞壁合成に対する阻害作用は認められず、特異的な脂肪酸生合成阻害物質であることが明らかになった。そのことから、これまでに主に以下のような脂質代謝の関与する生化学研究において利用されてきた。すなわち、(1) 菌体脂肪酸の変換^{8)~10)}, (2) 微生物の胞子形成時における脂肪酸生合成の意義¹¹⁾, (3) ポリケタイドを経て生合成される代謝産物 (マクロライド系抗生物質など) の生合成研究^{12), 13)}, (4) 微生物膜のリン脂質の代謝と役割^{14), 15)} などである。ここでは

最近の研究成果について述べる。

3.1 胞子発芽時における脂質生合成の意義

著者らはセルレニンによって酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の胞子形成が阻止され、長鎖脂肪酸 (パルミチン酸とオレイン酸) の添加で形成が回復されることから、胞子形成時における脂肪酸生合成の重要性を推測したが¹¹⁾, 最近、糸状菌の胞子発芽における脂肪酸生合成の意義がセルレニンを用いることによって明らかにされつつある。

Brambl¹⁾らは *Botryodiplodia theobromae* の胞子発芽におけるセルレニンの影響を調べ、図-3 に示したよう

図-3 *B. theobromae* の胞子発芽速度に対するセルレニンの影響

図-4 *B. theobromae* の胞子発芽時におけるシトクロム c オキシダーゼ活性に対するセルレニンの影響

に 50 µg/ml の濃度で 95%, 100 µg/ml でほぼ完全に発芽の阻止がおこることを明らかにしている^{16), 17)}。これは胞子をセルレニン処理することによって、ミトコンドリア中のシトクロム c オキシダーゼ活性が無処理の対照に比べて 1/7 以上に抑制されたためであるとし(図-4)、さらに 8 h、セルレニン処理した胞子シトクロムパターンはシトクロム a (604 nm) が正常の胞子に比べて3倍に増加したことを明らかにした(図-5)¹⁷⁾。これらの事実はセルレニンの胞子発芽阻害が脂肪酸生合成阻害を介してミトコンドリアの呼吸系を妨害することに起因するものと推測している。また、この時、セルレニン処理した胞子のタンパク、RNA 合成も阻害されるが、この現象はセルレニンによる脂肪酸生合成阻害の二次的な影響によるものであろうとのべている。

一方、Nickerson と Leastman も *Rhizopus stolonifer* の胞子のう(囊)胞子の発芽について調べ、胞子の発芽はセルレニン濃度 4 µg/ml で完全に阻止されることを明らかにしている。しかしながら、彼らの実験結果によれば、発芽の少なくとも 2 h 以内ではタンパク合成、RNA 合

A: セルレニン無処理のシトクロムパターン
B: セルレニン処理(8h)のシトクロムパターン

図-5 *B. theobramae* 胞子のミトコンドリアシトクロムに対するセルレニンの影響

成, O_2 の uptake にもセルレニンの影響はみられないと報告している¹⁸⁾。セルレニンの脂肪酸合成阻害によって引き起こされる二次的な影響については Brambl らの結果と Nickerson らのそれには相反するものがあり, その真疑の究明は今後に待たねばならないが, いずれにしても, 微生物の胞子形成時のみではなく, 発芽時においても, 脂質代謝が重要な役割を演じていることがセルレニンを用いることによって証明されたわけである。

3.2 脂肪酸活性化酵素欠損変異株の分離と脂質代謝

先に述べた脂肪酸合成 (図-2) における律速段階はアセチル・CoA カルボキシラーゼの関与するアセチル・CoA のカルボキシ化にあるといわれており, この酵素の調節機構については沼らの一連の研究^{19), 20), 21)} で明らかになりつつある。それによれば, 動物あるいは微生物細胞における長鎖脂肪酸の生成はアセチル・CoA カルボキシラーゼの活性を低下させる, いわゆるアロステリックな作用を示す。事実, 培地中に長鎖脂肪酸を添加して酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を培養すると, アセチル・CoA カルボキシラーゼの活性は低下する。長鎖脂肪酸によるこのような酵素の抑制作用は酵素活性の抑制ではなく, 酵素生成の抑制であるといわれている。

沼らはさらに脂肪酸合成の調節機構を解明するには, 長鎖脂肪酸による抑制作用が脂肪酸そのものでおこるのか, あるいは脂肪酸の何らかの代謝産物によるものかを追求する必要があるとした。そのためには脂肪酸活性化酵素であるアシル・CoA 合成酵素を特異的に阻害する物質を利用するか, あるいはこの酵素の欠損した変異株を分離して調べるかの 2 通りの方法がある。ところが, 今のところアシル・CoA 合成酵素の特異的な阻害剤は見いだされておらず, 変異株を分離する必要があった。そこで, 彼らは脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンを使ってアシル・CoA 合成酵素欠損変異株を分離した^{22), 23)}。*S. cerevisiae* では *de novo* の脂肪酸合成が行われている条件下ではアシル・CoA 合成酵素は働かないため,

あらかじめセルレニンで *de novo* の脂肪酸合成を阻害し, 培地中に長鎖脂肪酸 (パルミチン酸) を添加し, アシル・CoA 合成酵素によって活性化された長鎖脂肪酸によって酵母を生育させることを利用した。従って, セルレニンとパルミチン酸の存在下ではアシル・CoA 合成酵素の欠損した微生物の集落は出現しないはずである。

この原理によって, 分離された変異株, B-53, B-201 のアシル・CoA 合成酵素活性は表-1 に示したとおりで

表-1 親株と変異株のアシル・CoA合成酵素活性

菌 株	比活性 (nmol/min/mg protein)	
	実 験 1	実 験 2
X 2180-1 B	50.8	45.8
B-201	1.2	1.0
B-53	2.5	1.4

ある²³⁾。明らかに親株 X2180-1 B に比べて酵素活性は著しく低下している。この変異株を脂肪酸添加と無添加の条件下で, 培養した時のアセチル・CoA カルボキシラーゼ活性は表-2 に示した²³⁾。親株では脂肪酸を添加し

表-2 親株と変異株のアセチル・CoA カルボキシラーゼ活性

実験	菌 株	比活性 (nmol/min/mg protein)	
		脂肪酸無添加	添 加*
1	X 2180-1 B	11.3	6.0 (53)**
	B-201	6.6	5.8 (88)
	B-53	11.0	9.6 (87)
2	X 2180-1 B	11.5	5.9 (51)
	B-201***	8.6	7.7 (90)
	B-53	11.2	10.0 (89)

* 添加した脂肪酸 (パルミチン酸, オレイン酸, リノレン酸, おおの 1 mM)

** () 無添加の比活性に対する比率 (%)

*** 33°C で培養

て培養した菌体の酵素活性は無添加のそれに比べて約50%の値を示したのに対して, 変異株では 87~90% の酵素活性を示した。このことは *S. cerevisiae* における長鎖脂肪酸のアセチル・CoA カルボキシラーゼに対する抑制作用は脂肪酸そのものによってではなく, アシル・CoA 合成酵素によってアシル化を受け, 何らかの代謝産物として作用発現がおこっていることを示すものである。

一方, 炭化水素資化性酵母である *Candida lipolytica* は *n*-アルカンや長鎖脂肪酸を唯一の炭素源として生育する。この時のアセチル・CoA カルボキシラーゼ活性はグルコースで生育させた条件下の時よりも著しく低く, これは酵素の生成が抑制されていると解釈される²⁴⁾。従って, 脂肪酸の調節機構の分子レベルでの解明にはこのような酵母を利用することがより望ましいと考えられ

る。そこで、先の *S. cerevisiae* の変異株分離の場合と同様の原理で *C. lipolytica* のアシル・CoA 合成酵素欠損変異株 L-5, L-7 が分離され、その性質が調べられた²⁵⁾。*S. cerevisiae* の変異株の場合と同様、L-5, L-7 株のアシル・CoA 合成酵素活性はグルコース生育菌においても、オレイン酸生育菌においても低い(表-3)。ところが、これらの変異株は不思議なことに、長鎖脂肪酸や *n*-アルカンを唯一の炭素源として培養した時においても、親株と同様に生育した。また長鎖脂肪酸、*n*-アルカンで生育した菌体脂肪酸の組成を調べてみると、親株に比べて奇数脂肪酸の割合が著しく低下していた(表-4)。このことはこの変異株が基質とした脂肪酸や *n*-ア

表-3 グルコースあるいはオレイン酸で生育した菌体のアシル・CoA 合成酵素活性

菌 株	比活性 (nmol/min/mg protein)	
	グルコース生育菌体	オレイン酸生育菌体
Y-6795 (親株)	60.7	41.6
L-5	0.7	2.8
L-7	0.7	2.7
RL 7-1	74.6	50.4
RL 7-2	63.8	46.3
RL 7-8	60.0	45.2

RL 株は L-7 株のリバタント。

表-4 脂肪酸あるいは *n*-アルカンで生育した菌体の奇数脂肪酸の割合

菌 株	奇 数 脂 肪 酸 の 割 合 (%)			
	ペンタデカン酸	テトラデカン酸	<i>n</i> -ヘプタデカン	<i>n</i> -オクタデカン
Y-6795	94.7	2.3	98.5	3.0
L-5	6.1	0.6	14.3	2.6
L-7	5.8	0.4	28.3	2.6
RL 7-1	91.7	2.5	—	—
RL 7-8	93.2	1.4	—	—

ルカンの酸化で得られる脂肪酸をそのまま活性化して取り込む酵素(従来のアシル・CoA 合成酵素)は確かに欠いているけれども、 β -酸化するために活性化する酵素(新しいアシル・CoA 合成酵素)は保持していることを示すものである。従って、これらの現象から長鎖脂肪酸を活性化する酵素は2種類存在するのではないかと推定されたわけである。

変異株の保有している新しいアシル・CoA 合成酵素(以下合成酵素Ⅱとし、従来の酵素を合成酵素Ⅰとする)は通常反応系では測定できず、反応液にホスファチジルコリンを加えることによって測定可能となった²⁶⁾。変異株 L-7 のグルコース、オレイン酸それぞれの炭素源で生育した菌体中のアシル・CoA 合成酵素Ⅰ、Ⅱを測定してみると、表-5 のようになり、ホスファチジルコリンを加えない従来の測定法で検出される合成酵素Ⅰの活

表-5 変異株 L-7 株のアシル・CoA 合成酵素Ⅰの欠損

炭 素 源 分 画		活 性 (nmol/min)			b/a
		ホスファチジルコリン		b-a	
		(a)無添加	(b)添加		
オレイン酸	ホモジネート	60	1390	1330	23.2
	上澄み液	22	48	26	2.2
	沈殿物	37	1037	1000	28.0
グルコース	ホモジネート	8	222	214	27.8
	上澄み液	3	9	6	3.0
	沈殿物	2	153	151	76.5

図-6 *C. lipolytica* の脂肪酸生成経路²⁷⁾

性はグルコース、オレイン酸培地ともに微少であり、本変異株が合成酵素Ⅱのみを保有していることが明らかにされたわけである。

C. lipolytica でのアシル・CoA 合成酵素Ⅰ、Ⅱと脂肪酸生成系との関係を図示すると図-6 のようになり、それぞれの酵素の役割が理解できる。前述のように変異株が奇数脂肪酸をほとんど蓄積しないことは *n*-アルカン生育酵母菌体であっても、通常の炭素源で生育した菌体とほぼ同じ菌体脂肪酸組成を有するものであり、タンパク資源としての利用という観点から興味深いものであり、今後の研究の成果が期待されている²⁸⁾。

4 抗生物質合成研究への利用

抗生物質をはじめとする天然有機化合物の中には、先に述べた脂肪酸生成系と類似したアセタート、マロナートあるいはこれらに似かよった低級脂肪酸が縮合して、その基本骨格を形成する生合成機構をもったものが多くみられる。最も簡単な例として1個のアセタートと3個のマロナートの縮合から生合成される6-メチルサリチル酸(6-MSA)の場合を図-7に示す¹²⁾。

スピラマイシンの場合は図-8に示すように、アセタート、マロナート、2-メチルマロナート、2-エチルマロナートなどが縮合して、この抗生物質の特徴であるラク톤を形成する。セルレニンはいこれらの物質の生合成を

図-7 6-MSA の生成

図-8 スピラマイシンの生成の最終段階

も阻害する^{12), 13)}。その阻害部位は脂肪酸の生成の場合と同じ縮合の段階であることはペプチド抗生物質とかアミノグリコシド抗生物質などアミノ酸や糖から生成される抗生物質の生成はセルレニンによって作用を受けないことから容易に推定される。スピラマイシンの生成の後半である糖が結合していく過程とラクトン3位の水酸基がアシル化を受けるステップとの関連を知るために、生産培地にセルレニンを加え、ラクトン部の生成を阻害した条件下で、必要な各化合物を培地に加えて、生産菌によってどのように変換されるかを調べた。

ラクトン部、3位のヒドロキシル基のアシル化は3つの糖の結合が完了した最後の段階で行われることが判明した²⁹⁾。このようにしてセルレニンは脂肪酸の生成とその他の天然物の生成によって行われるアセタート、マロナート（あるいはメチルマロナート）などの縮合反応が近似することを示すのみならず、これを用いてこれより後半の生合成経路の解明に優れた試薬となっている。

5 おわりに

これまでの脂質代謝研究におけるセルレニンの利用は次のように大別することができる。(1) 脂肪酸生成の阻害を *in vitro*, *in vivo* の系で直接に観察するもの、(2) 生命現象における脂質代謝の関与を証明するもの、(3) 人為的に脂質代謝をコントロールして、生命現象を解明するもの。数年前までに利用された例としては大部分が (1), (2) に類するものであり、本稿で述べた胞子

発芽に関する研究もそれにあたるであろう。しかしながら、3・2項でとりあげた変異株の分離に応用するという利用法は(3)に相当するものであり、抗生物質の特異的作用を有効に活用した好例である。セルレニンの作用機作が脂肪酸の生成阻害にあることが明らかにされてから、すでに5年以上を経過した今日、極めて多くの人々により、これが用いられて研究が行われているが、今後の研究の発展を興味深くみつめていきたい。また、抗生物質の利用が医薬品としての利用だけではなく、広く生化学的研究に活用され、その進歩に寄与することを期待したい。

(昭和 53 年 11 月 27 日受理)

文 献

- 1) 大村 智, 栗谷寿一, 化学と生物, **12**, 787 (1974)
- 2) S. Ōmura, *Bacterial. Rev.*, **40**, 681 (1976)
- 3) 日本生化学会編, “生化学実験講座 14, 生体膜”, 東京化学同人 (1977) p. 141
- 4) 舟橋三郎, 原 一郎, 山川民夫, “脂質 2”, 共立出版 (1972) p. 1
- 5) D.N. Brindley, S. Matsumura, K. Block, *Nature*, **224**, 666 (1969)
- 6) T. Ohno, J. Awaya, T. Kesado, S. Ōmura, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **57**, 1119 (1974)
- 7) M.D. Greenspan, R.C. Mackow, S. Ōmura, *Lipids*, **12**, 729 (1977)
- 8) J. Awaya, T. Ohno, H. Ohno, S. Ōmura, *Biochem. Biophys. Acta*, **409**, 267 (1975)
- 9) S. Rottem, M.F. Barile, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **9**, 301 (1976)
- 10) A. Tanaka, T. Hagihara, Y. Nishikawa, M. Mishina, S. Fukui, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 115 (1976)
- 11) T. Ohno, J. Awaya, S. Ōmura, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**, 42 (1976)
- 12) H. Ohno, T. Ohno, J. Awaya, S. Ōmura, *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 1149 (1975)
- 13) H. Takeshima, C. Kitao, S. Ōmura, *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 1127 (1977)
- 14) J.E. Cronan, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3758 (1974)
- 15) J.E. Cronan, Jr., E.P. Gelmann, *Bacteriol. Rev.*, **39**, 232 (1975)
- 16) R. Brambl, *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 273 (1977)
- 17) R. Brambl, H. Wenzler, M. Josephson, *J. Bacteriol.*, **135**, 311 (1978)
- 18) K.W. Nickerson, E. Leastman, *Exp. Mycol.*, **2**, 26 (1978)
- 19) T. Kamiryo, S. Numa, *FEBS Lett.*, **38**, 29 (1973)
- 20) S. Numa, S. Yamashita, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **8**, 197 (1974)
- 21) K. Kitajima, S. Tashiro, S. Numa, *Eur. J. Biochem.*, **54**, 373 (1975)

- 22) T. Kamiryo, S. Parthasarathy, M. Mishina, Y. Iida, S. Numa, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1295 (1977)
- 23) T. Kamiryo, S. Parthasarathy, S. Numa, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 386 (1976)
- 24) M. Mishina, T. Kamiryo, A. Tanaka, S. Fukui, S. Numa, *Eur. J. Biochem.*, **71**, 301 (1976)
- 25) T. Kamiryo, M. Mishina, S. Tashiro, S. Numa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4947 (1977)
- 26) M. Mishina, T. Kamiryo, S. Tashiro, S. Numa, *Eur. J. Biochem.*, **82**, 347 (1978)
- 27) A. Tanaka, T. Hagihara, T. Kamiryo, M. Mishina, S. Tashiro, S. Numa, S. Fukui, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 78 (1978)
- 28) 福井三郎, 川本進, 田中渥夫, 醸酵工学, **56**, 436 (1978)
- 29) S. Ōmura, C. Kitao, H. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 176 (1979)
-