サガミシンの生合成と発酵

加瀬 広*

抗生物質で代表される二次代謝産物は、その種類の多彩さが生産菌株のわずかな違いによって強調されるのみであった。放線菌は生化学、遺伝学の面からは決して使いやすい材料ではなく、組換え DNA などの新しい育種手法の開発にも、宿主、ベクターの選択からして難問は山積している。そして、何にも増してターゲットの選定が頭を悩ませる。抗生物質生合成経路、代謝制御機構、自己耐性機構、分泌機構などの解明が望まれる理由がここにある。

サガミシン® (SGM, 一般名: ミクロノマイシン) は、奈良, 川本, 岡地らによって 1975 年に発見されたアミノグリコシド抗生物質である。生産菌は相模原市の土壌から分離された新菌種で、*Micromonospora sagamiensis* と命名されている。その化学構造 (図 1) からジェンタミシン (GM) グループに属する抗生物質に分類されるが、緑膿菌, セラチア菌, 変形菌属などを含む広範囲のグラム陽性・陰性菌に強い抗菌力を示すとともに、アミノグリコシド抗生物質を使用する際の難点とされている聴器・腎毒性が、GM や DKB などに比べて弱いことが認められている。また、SGM は 6' 位のアミノ基が保護された構造であるため、近年日本で増加しているある種のアミカシン (AMK) 耐性菌 (6'-アミノ基をアセチル化することによって耐性なセラチア菌, 緑膿菌) にも有効であるなど、従

来の抗生物質に比べて優れた特徴があり、本年度から広く細菌感染症の治療薬として臨床に用いられるようになった。

SGM は 2-デオキシストレプタミン (DOS, 図 1 のリング II) の C-4, C-6 位に置換体を持ち、3つの糖サブユニットからなる抗生物質である。DOS をその構造中に含むアミノグリコシド抗生物質としては、GM, KM, TBM, SDM, SSM (SGM 同様 4,6-置換 DOS 抗生物質) や NM, PM, LVM, RM, BTN (4,5-置換 DOS 抗生物

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
パロマミン		H	OH	OH	—	—	—
ジェンタミシン	A ₂	H	OH	OH	H	OH	OH
	A	H	OH	OH	H	OH	NHCH ₃
	X ₂	H	OH	OH	OH	CH ₃	NHCH ₃
	G-418	CH ₃	OH	OH	OH	CH ₃	NHCH ₃
	JI-20A	H	NH ₂	OH	OH	CH ₃	NHCH ₃
	JI-20B	CH ₃	NH ₂	OH	OH	CH ₃	NHCH ₃
	C _{1a}	H	NH ₂	H	OH	CH ₃	NHCH ₃
	C ₂	CH ₃	NH ₂	H	OH	CH ₃	NHCH ₃
	C ₁	CH ₃	NHCH ₃	H	OH	CH ₃	NHCH ₃
サガミシン		H	NHCH ₃	H	OH	CH ₃	NHCH ₃

図 1 サガミシン, ジェンタミシン C および関連成分の構造

* Hiroshi KASE, 協和発酵工業株式会社東京研究所
略号 AMK: amikacin, BTN: butirosin, DKB: dibekacin, DOS: 2-deoxystreptamine, FTM: fortimicin, GM: gentamicin, KM: kanamycin, LVM: lividomycin, NM: neomycin, PM: paromomycin, RM: ribotamycin, SDM: seldomycin factor 5, SGM: sagamicin, SM: streptomycin, SSM: sisomicin, TBM: tobramycin, VDM: verdamycin

質) など多数あるが, SGM, GM はメチル置換基が多いこと, リング I の C-3', C-4' に OH 基がないこと, さらに DOS の C-6 置換体がガロサミンという珍しい糖である点が特徴的で, この特徴はその優れた抗菌スペクトルにも反映されている。市販の GM-C には 3 つの成分 (C_{1a} , C_2 , C_1) が含まれているが, それら各成分と SGM は, 6' 位のメチル置換基の位置と数によって区別される (図 1)。

M. sagamiensis の培養液中には, 主成分 SGM の他に GM-C や多数の GM 類縁化合物がマイナー成分として蓄積されている。GM 類縁化合物のうち, GM- A_2 , -A, - X_2 , Antibiotic G-418, JI-20 A, JI-20 B などと呼ばれる抗生物質の構造は図 1 に示した。このように, 主生産物の他に数多くの関連構造のマイナー成分が副生されるのは, 二次代謝の一般的な特徴である。

ところで, 抗生物質で代表される二次代謝産物は, 限られた菌株によって作られ, その化学構造と生合成は個々の産物や菌株に特異的であり, しがって全体としては複雑多様である。このために, 一般に有用な二次代謝産物が発見されてその開発を図る場合は, 生合成の知識も遺伝学的知識もない時点で早く力価を上げ, 評価のための大量の試料を提供しなければならない。一次代謝産物であるアミノ酸や核酸関連物質の発酵生産のように, 代謝制御の理論を応用し, 合理的な菌株改良, 培養管理を行なえるところまで, 二次代謝の研究は進んでいないのが現状である。

SGM の場合も, 当初は生合成や代謝制御の知識がほとんどない状態から研究をスタートしたが, ランダムスクリーニングを中心とする菌株の改良を進める一方で, 生合成や代謝制御の研究も進め, これを合理的な菌株改良や培養管理へ応用することを試みてきた。また, 生合成の研究と相補いながら, *M. sagamiensis* の持つ多様な代謝系を活用して, より改良されたアミノグリコシド抗生物質を探索する方向にも研究を進めていった。ここでは, それらの研究をまとめ, 抗生物質研究の進め方の一例という意味で, 他の抗生物質 (特にアミノグリコシド系) とも比較対照しながら,

紹介してみたい。

1. SGM の生合成経路

アミノグリコシド抗生物質の生合成経路で酵素レベルまで詳細に研究されたのは SM だけであり, 他は NM, RM, BTN, KM, GM について, 主に 1) ラベル化合物のとり込み実験, 2) idiotroph (二次代謝のブロックされた変異株。生育は prototrophic であるが, 二次代謝産物の生産に特定の生合成前駆物質を必要とする。一次代謝の auxotroph に対応する) を用いた微生物転換反応, の 2 つの手法により, 仮の生合成経路が提唱されている⁽¹⁾。

SGM の生合成経路については, Testa と Tilley⁽²⁾ が GM 生産菌である *M. purpurea* より変異誘導したパロマミン生産性変異株 (図 3 の経路で E がブロックされていると推定される株) を使って, GM マイナー成分からの転換実験の結果を基にした推定経路を提案している。この経路はパロマミンから始まり, GM-A, X_2 の共通中間体を経て, 一方は C-6' にメチル分枝を持った G-418→JI-20 B→GM- C_2 →GM- C_1 に至る経路, 他方は C-6' にメチル分枝を持たない JI-20 A→GM- C_{1a} →SGM (=GM- C_{2b} ; SGM 発見後 *M. purpurea* の変異株で GM- C_{2b} として見だされている) の経路, の 2 つに分枝するというものである (図 3 参照)。この研究は, 微生物転換による生成物の同定をペーパークロマトグラフィー (PPC) のみで行なっている点で限界があり, 正確を期するためには転換生成物を単離同定する必要があるし, また他の中間体が関与している可能性も大いにあった。そこで筆者らは, 1) *M. sagamiensis* より生合成がブロックされた変異株 (blocked mutant) を多数誘導分離し, その生産物を単離同定する, 2) 変異株および親株の培養液から単離された物質を blocked mutant の静止菌体を用いた転換反応系に加えて転換生成物を同定する, 3) blocked mutant どうしを組み合わせた SGM の co-synthesis (後述), などを検討して SGM 生合成経路をさらに解明しようと試みた。

表 1 *M. sagamiensis* 変異株の生産物と生合成ブロック位置

クラス	株 No.	生合成ブロック位置*	生 成 物
親 株	(KY11510)	—	サガミシン, ジェンタミシン C ₁
1	G-733	D-キシロースの添加(E)	パロマミン
2	KY11533	C-3' の N メチル化(G)	3''-N-Demethylgentamicins, UAA-41
3	KY11538	C-6' の C メチル化(I)	サガミシン
	KY11523		
	KY11539		
	KY11561		
	KY11562		
	KY11563		
4	KY11565	C-6' の アミノ基置換(J)	ジェンタミシン X ₂ , G-418
5	KY11535	4', 5' 水素化(L)	Sisomicin, antibiotic G-52, verdamicin
6	KY11564	C-6' のエピメリ化(M)	ジェンタミシン C _{2a} , C _{1a} , サガミシン
7	KY11566	C-6' の N メチル化(N)	ジェンタミシン C _{1a} , C ₂ , C _{2a}
		2-デオキシストレプタミンの生成	
A	KY11508	2-deoxy-scyllo-inosose の生成(A)	—
B	G-726	C-1 と C-3 の アミノ基転移(BとD)	—
C	KY11509	C-1 の脱水素化(C)	SU-2 複合体, K14-1
	G-762		

* 生合成ブロック位置のうち, A~Cは図7に, E~Nは図3に示した。

M. sagamiensis をニトロソグアニジンなどの変異剤で処理し, 親株が生産する SGM や GM-C₁ を生産しえなくなった変異株を選ぶと, その中に blocked mutant が得られる。得られた株を, 可溶性でんぷん, soy bean meal などを含む栄養地で培養し, 培養液中に蓄積してくるアミノグリコシドをイオン交換樹脂やシリカゲルなどのカラムクロマトグラフィーを使って精製単離し, マススペクトルや NMR で同定した。次に, これらの化合物を変異株の洗浄菌体とともに緩衝液中で振盪し, 生成物をペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィー (TLC) で同定する。クロマトグラフィーだけでは同定が難しいものは, 反応液から生成物を精製単離した後同定した。表1には, 分離された blocked mutants の生産物と, 生合成の欠損部位をまとめた。10 の異なった欠損部位 (そのうち3株は DOS 生合成が欠損) を持った変異株が得られ, それらを用いて, 上に述べたような検討を一つ一つ行なった結果, SGM 生合成経路は図3のように決められた。この経路は先の Testa と Tilley の推定経路を大筋において支持しているが, 新規に見つかった化合物も含めて, いくつかの新しい中間体 (SSM, VDM, GM-C_{2a}, UAA-41, TPJ-B) を加えるなど, 新たな知見を含めた結果をまとめたものであ

る。以下, それらの研究過程を中心に, SGM 生合成について述べてみたい。なお, DOS 生合成については3章で述べる。

1) SGM 生合成中間体としての SSM 系抗生物質

SSM 系抗生物質は, 図2に示すように SGM, GM の C-4' と C-5' の間に二重結合が入った構造をしており, 抗菌スペクトルも GM に類似する。SSM, VDM および G-52 が知られており, それらは 6' 位の構造に関してそれぞれ GM-

	R ₁	R ₂
Sisomicin	NH ₂	H
Verdamicin	NH ₂	CH ₃
G-52	NHCH ₃	H
6'-NMV	NHCH ₃	CH ₃

図2 シソミシン系抗生物質の構造

C_{1a}, -C₂ および SGM に対応する。生産菌はいずれも *Micromonospora* 属に属し, *M. inyoensis* (SSM 生産), *M. grisea* (VDM 生産), *M. zionensis* (G-52 生産) が報告されている。GM 生産菌や *M. sagamiensis* では, 通常これらの抗生物質の蓄積は検出されない。筆者らは, *M. sagamiensis* の DOS idiotroph* KY 11525 を使い, 各種化合物からの転換反応を検討した際に, SSM 系抗生物質からの転換反応についても調べてみた。これは, 一つには, 未発見の 6'-NMV (図 2 参照) の生成を期待して行なったものであるが, 結果は予想に反していた。SSM は GM-C_{1a} を経て SGM へ, VDM は GM-C_{2a} (GM-C₂ の C-6' のエピマー)→GM-C₂ を経て GM-C₁ へ転換されたのである (図 3 のステップ L, M, N 参照)。この転換系の分析は, 似たような化合物を分離しなければならないので, 従来普通に用いられた PPC や TLC による方法ではかなり困難である。実際に, SSM が *M. rhodorangea* により SGM へ転換されたという報告⁽³⁾はあるが, 中間体 (GM-C_{1a}) の分離同定には失敗している。筆者らは, SSM 系と GM 系の抗生物質の分離が良いカーボン TLC⁽⁴⁾ を使うと, さらに GM-C_{2a} と C₂ も分離できることを見つけ, 上の経路を決めることができた。反応生成物は反応液より単離し同定したが, G-52 や 6'-NMV の生成はどちらの転換系でも認められなかった。一方, *M. inyoensis* や *M. zionensis* では, この二重結合を還元する活性 (4', 5'-水素化) が検出されなかった。その代りに, G-52 生産菌の *M. zionensis* では SSM が G-52 へ転換した。

転換反応の結果から, *M. sagamiensis* でも, 4', 5'-水素化 (図 3 の L) 活性が欠失した変異株を誘導すれば SSM 系抗生物質が蓄積可能ではないかと考え, SGM 生産菌 KY 11523 を変異処理後, 液体培養して SSM 系抗生物質に着目したスクリーニングを行なった。その結果, G-52 を蓄積する KY 11535 を選択できた。KY 11535 は

副産物として SSM, VDM を生産したが, SGM や GM-C 群は蓄積しない。転換実験から, KY 11535 は 4', 5'-水素化活性が欠損していることが確認された。本菌は, SSM から G-52 が, VDM から未知抗生物質 (6'-NMV と同定されるが, このことは後述する) を生成する。また, DOS をはじめ各種 SGM 生合成前駆体から SSM 系抗生物質を生成した。これらの結果から, SSM, VDM は, 図 3 に示すように SGM, GM 生合成の中間体であることが示された。親株では水素化の活性が強いため, SSM 系抗生物質が蓄積しにくく, この活性の欠損で SSM, VDM と, その直接の 6'-N-メチル化化合物 G-52 が蓄積されたと考えられる。

KY 11535 は, スクリーニングではよほど注意しないと, 親株との区別が難しく見落としやすい変異株であるが, 転換反応の結果からの想定が加わった結果, 比較的たやすく選択されてきたといえる。また, 初めにも述べたように, 抗生物質生産は, 一般に菌株特異的であるといわれ, SSM, VDM, G-52 も各々別個の菌株で発見され, GM 系抗生物質とは生産菌も生合成系も別であるように考えられたが, 実際は 1 つの酵素によって, 何が生産されるかが支配されていたと考えられる点で興味深い。

2) GM-C_{2a}

GM-C_{2a} は, その構造から GM-C₂ 生合成の中間体であることが推定されていたが, 他の成分 (特に GM-C₂) との区別が難しいために実験的には示されていなかった。先の実験で, VDM→GM-C_{2a}→GM-C₂→GM-C₁ の転換経路を証明したが, このことは, GM-C_{2a} が GM-C₁ 生合成の中間体であることを示している。さらに, 6'-C のエピメリ化 (図 3, M) が欠損し GM-C_{2a} を生産する変異株 KY 11566 が得られ, この株を使った転換実験でも確認された。GM-C_{2a} から C₂ への異性化反応は可逆的であった。

3) TPJ-B

KY 11525 (DOS⁻) による G-418 または JI-

* 抗生物質の生産に DOS を要求する変異株。アミノグリコシド抗生物質の生合成研究や Mutational biosynthesis に広く用いられている。

20 B の転換実験の際、主生成物である GM-C₂, -C_{2a}, -C₁ の他に、JI-20 B の 6'-エピマーと同定された TPJ-B が生成してくるのを見つけた。この転換は、反応初期に TPJ-B が生成し、次いで消失にともなう GM-C₂, -C₁ がこの順に生成するという経時変化を示した。TPJ-B は、GM-C₁ 生合成経路上、G-418 から JI-20 B へ転換する際の中間体である可能性があるが、別の可能性として、生合成経路からの分枝生成物であることも考えられよう。G-418 から GM-C_{2a} へ至る経路の C-6' 位に関する立体化学をも含めた転換については、まだ検討が十分とはいえないので、今後それらについて詳細な解明が待たれる。

4) 分枝後の経路の共通反応

GM-X₂ より分枝後、各々 GM-C₁ および SGM へ至る経路は、ステップ J, K, L, N において共通した反応で進行する (図 3)。各ステップの欠損変異株は、いずれも両経路の転換能が同時に欠け、SGM と GM-C₁ の両方の生産能がなくなるとともに、両経路の欠損部位の直前の中間体 (J の欠損株では G-418 と GM-X₂, L は SSM と VDM, N は GM-C_{1a} と -C_{2a}, -C₂) を著量生産していた (K の欠損株は得ていない)。このことは、各ステップには、6'-C-メチル基に特異性を持たない酵素が関与していることを示唆している。

5) UAA-41

SGM 生産菌 KY 11523 より変異誘導した SGM 非生産株、KY 11533 は、一連の 3''-N-デメチル化合物 (図 1 の R₆ の N-メチル基がない化合物) を生産した。単離同定した 10 物質のうち、新規物質としては、UAA-23, -26, -30, -41, -49 (それぞれ JI-20 A, SSM, G-52, GM-A, garamine の 3''-N-デメチル誘導体)、UAA-22, -35 (それぞれ GM-C_{1a}, SSM の 3''-N-デメチル-3''-N-アセチル誘導体) が見いだされた。その他、天然からは初めて見つかった UAA-25 (3''-N-デメチル-GM-C_{1a})、既知物質 UAA-38, (GM-A₂)、UAA-24 (3''-N-デメチル SGM) が

あった。抗菌活性はそれぞれの 3''-N-メチル体と比べ、1/2 かそれ以下であった。KY 11533 と、その単離された生産物とを使った転換反応の結果から、1) UAA-41 (3''-N-デメチル GM-A) が GM, SGM 生合成の中間体であること (図 3)、2) KY 11533 は、UAA-41 から GM-A の転換活性 (3''-N-メチル化、ステップ G) を欠損していることがわかった。3''-N-メチル化活性の正常な DOS idiotroph KY 11525 は、生合成経路上 JI-20 A 以後の中間体の 3''-N-デメチル誘導体を容易に 3''-N-デメチル SGM へ転換する。一方、KY 11533 はステップ G 以外の生合成は正常であった。したがって、KY 11533 はステップ G の欠損により蓄積した UAA-41 が、直接次のステップ (H) を経て SGM 生合成系にとり込まれ、一連の 3''-N-デメチル体を生成したと考えられる。

以上、筆者らの得た新しい知見を中心に SGM 生合成をやや詳しく紹介したが、ここで他のアミノグリコシド抗生物質の生合成と比較し、SGM 生合成の特徴と問題点について若干考察を加えておきたい。

SGM 生合成の各構成糖の結合順序は、DOS + D-グルコサミン = パロマミンが先で、次に D-キシロース相当の糖が結合することを示した。この順序が逆である可能性は低いと考えられる。他のアミノグリコシドでも、糖の結合順序を確定するのは難しい問題であったが、最近、各抗生物質で明らかになりつつある。それによると、RM, BTN, NM, PM の場合も、まずパロマミン相当の二糖類が生成するようである。この最初の系は、菌株により多少の違いはあるかもしれないが、放線菌、細菌を含めて DOS 含有抗生物質に、かなり共通したものと推測される。一方、SGM 生合成で D-キシロースが直接パロマミンに結合する糖であるか否かについては明らかでない。他の糖が結合後 D-キシロースへ変換する可能性もあろう。

DOS を含む抗生物質では、いずれも DOS がそのまま抗生物質にとり込まれるが、他の構成ア

ミノ糖のとり込まれ方は、各抗生物質で異なっている。SGM では D-グルコサミン、DOS, D-キノースで構成される GM-A₂ が完成後、各アミノ糖のメチル化、アミノ化、異性化などの修飾が進行する経路が示された。Grisbach⁽⁵⁾ は、SGM の L-garosamine (図1のリングⅢ) 部分の生合成として、ペントース-4-ウロースヌクレオチドのメチル化で Nuc DP-L-garosamine 生成後、これが他の糖と結合すると考えるほうが妥当であると提案している。その可能性を完全に否定はできないが、変異株を使ったこれまでの結果からは、図3の経路のほうがより妥当と考える。SM の場合は、磷酸またはヌクレオチドと結合した形で各構成糖の変換が進み、その後に互いが結合して SM が完成する。一方、SGM と同じような例は、BTN (アミノ化, 1-N-amino-2-hydroxybutylation, イソメリ化), NM, PM (アミノ化, イソメリ化) などでもみられる。しかしながら、これらの場合も、各構成糖間の結合の際には、ヌクレオチドや磷酸と結合した形を考えたほうがよいであろう。その後の反応にも、遊離型でなく、磷酸化、アセチル化、ヌクレオチド化された誘導体が実際の生合成に関与している可能性が考えられる。これは、自己耐性機構にもかかわる問題で、SM や NM, KM の生合成では、磷酸化やアセチル化の関与が報告されている。また、いくつかの生産菌で、自己抗生物質の不活化酵素が見つかった。しかし、*M. sagamiensis* では、不活化物や不活化酵素はまだ見つかっていない。

SGM 生合成経路は、一応、図3のように描くことができたが、上に述べた問題点を含めてまだ確定されない部分や不明な点も多く、今後さらに多くの変異株の分離や、遺伝も含めた解析、酵素レベルでの検討が必要とされよう。

2. SGM 生合成の調節機構と生産菌の改良

抗生物質を含む二次代謝産物は、生育に関与しない物質群に対してあてられた言葉であり、普通は生育の急速な時期 (trophophase) には作られず、続いての生産期 (idiophase) に作られる。したがって、二次代謝の調節機構は大きく分けて、

生合成の開始がどのような因子でいかに制御されているかと、開始後の生合成の調節がどのように行なわれるか、の2つになるかと思われる。前者は、栄養条件や生育速度に関わるもので、ある条件で特定の栄養素の欠乏から生育がアンバランスになり、これが何らかの引き金となって二次代謝酵素の脱調節 (生合成の抑制、阻害の解除や誘導、活性化) につながり、二次代謝が開始されると考えられる。carbon catabolite regulation, 窒素代謝 (アンモニア) による制御、磷酸塩による制御や、特定の誘導物質による制御などがこれに関連した機構として挙げられる。一方、後者としては、二次代謝産物自身による feed back 制御 (抑制、阻害) や、生合成酵素の不可逆的分解などが挙げられよう。また、二次代謝は、鍵前駆物質を介して一次代謝と生合成的にも調節的にもつながっている*。SGM 生合成の調節機構についても、上記の観点から種々の検討がなされたが、ここでは自己抗生物質耐性あるいは生合成制御と、金属イオン (Co²⁺) による SGM 生合成の調節について触れてみたい。

SGM の生産は、培養の生産期 (培養開始後 7 ~ 9 日目) に生産培地に GM-C 2~3 mg/ml を添加すると阻害される。このとき菌の生育は阻害されない。一方、培養開始時に GM-C を添加した場合には、約 100 µg/ml の濃度で菌の生育、SGM 生産ともに完全に阻害されてしまう。この結果は、培養が進み SGM が生産されるのと併行して、GM-C に対する耐性を生産菌が獲得する機構が働いていることを示唆するとともに、生産期での結果は SGM 生合成が GM-C によって阻害を受けていることを予想させる。培養各 phase での ³H-GM の細胞内とり込みをみたところ、培養2日に比べて7日目のとり込みは 1/4~1/5 に減少していたことから、生育にともなう耐性の獲得の一つの機構として、GM 透過性の減少が考

* アミノグリコシド抗生物質では細胞壁合成 (一次代謝) との関連が論ぜられている。SGM の生成においても、細胞壁合成阻害剤 (バシラシンなど) の添加が SGM 生産を増加させ、グルコサミンの細胞壁へのとり込みを抑制し、SGM へのとり込みを増加させたという結果が得られている。

えられた。耐性獲得の同様の現象は他の抗生物質でも一般的に観察されており、また抗生物質生成量は生産菌の自己抗生物質による生産阻害濃度とほぼ一致することもよくみられるので、逆に生産菌の生産能を上げるための育種法として、自己耐性株を選択することが一つの有効な方法とされている。SGM 生産菌の場合は、SGM 低生産菌から変異誘導した GM 耐性株の中には、SGM 生産が増大した株が得られたが、SGM 高生産株から誘導した GM 耐性株は SGM 生産が著しく低下し、GM 耐性と SGM 生産性はむしろ逆相関の関係になり、自己耐性による菌株改良は必ずしもうまくいかなかった。しかし、この低生産変異株の中には、GM-C (200 $\mu\text{g/ml}$) を培養開始時に添加すると、SGM 生産が著しく (6~15 倍) 促進される (autostimulation) 株が得られた。その詳しい機構は不明であるが、似たような現象は、エリスロマイシン発酵でエリスロマイシン自身による生産の促進が報告されている。この他にも、蛋白質合成阻害剤による抗生物質生産性促進の例はいくつかあり、それらの現象を実際の抗生物質生産収量の増加に応用することも面白いと思われる。

さて、SGM は、その分子中に 3 個のメチル置換基を持つ (図 1) が、これらのメチル基は $\text{L-}[\text{メチル-}^{14}\text{C}]$ -メチオニンの SGM へのとり込み

実験の結果から、いずれもメチオニンに由来していることが証明された⁽¹¹⁾。このメチオニンによる C-および N-メチル化のうち、C-メチル化反応のコバルトイオンによる調節と、その調節を利用した菌株改良について次に述べてみたい。

前述のように、*M. sagamiensis* は、主生産物 SGM の他に、多くの成分を副生するが、中でも GM-C₁ の副生量は多い。特に、培地に塩化コバルトを添加すると、GM-C₁ 生産は著しく増大する一方、SGM 生産量は、 Co^{2+} 低濃度で若干促進されるものの、それ以上では著しく抑制され、GM-C₁ が主生産物に代ってしまう (図 4 の KY 11510)。この GM-C₁ の副生を抑える目的で、KY 11510 より GM-C₁ 非生産株の変異誘導を試みた。塩化コバルト 1 mg/l でも GM-C₁ を生産しない株を選んだところ、表 1 に示したクラス 3, 4, 6, 7 の菌株が選ばれてきたが、このうちクラス 3 の 6 株のみが SGM を著量生産し、GM-C₁ は生産しなくなっていた。転換反応の解析の結果、クラス 3 の変異株は 6'-C-メチル化 (図 3 のステップ I) が欠損していることがわかった。図 4 に代表 2 株、KY 11523 と KY 11562 の培養の結果を示す。興味あることに、これらの変異株は Co^{2+} により SGM 生産が促進された。KY 11562 は、 Co^{2+} 無添加で培養した時の SGM 生産が親株より若干上まわったが、塩化コバルトの添加により濃度に依存して、SGM 生産はさらに増大した。一方、KY 11523 は少量の GM-C₁ を副生する leaky 型の変異株であるが、 Co^{2+} 無添加時の SGM 生産は親株の約 1.5 倍になり、塩化コバルト 100 $\mu\text{g/ml}$ までは添加量に依存して SGM 生産量が増大した。 Co^{2+} に依存するステップとして C-6' (ステップ I) および C-4'' (ステップ H) のメチル化が *M. purpurea* で報告されている⁽²⁾ (図 3)。一方、N-メチル化は Co^{2+} の影響を受けない。*M. sagamiensis* でも、転換反応系に Co^{2+} を添加する実験で同様の結果が得られた。KY 11510 では 2 つの C-メチル化反応が Co^{2+} で促進されて、GM-C₁ 生産が増大すると考えられる。SGM 生産の Co^{2+} による阻害の原因が、SGM 生合成のどこかのステップの Co^{2+} による阻害で

図 4 塩化コバルトのサガミシンおよびジェンタミシン C₁ 生産に及ぼす影響

ないことは、クラス3の変異株のSGM生産が Co^{2+} で阻害されないことから推測できる。 Co^{2+} によるSGM生産阻害の原因としては、6'-C-メチル化の Co^{2+} による促進によって、共通の前駆体GM-X₂がGM-C₁合成のほうへより多く流れた結果SGM生産が減少したと考えるのが妥当であろう。6'-C-メチル化の欠損した株では、GM-C₁合成への分枝がなくなるので、その分SGM生産は増大し、また Co^{2+} を添加すると4''-C-メチル化が促進されるため、SGM生産がさらに上昇したと考えられる。この変異株ではGM-C₁、-C₂を生産しないので、先に述べたGM-CによるSGM生産阻害が軽減されていることも考えられ、これがSGM生産性増強に関与している可能性もあろう。

このように、生合成の分枝点のblocked mutantを用いることで、副生物GM-C₁の生成が抑えられたばかりでなく、 Co^{2+} などによる代謝制御が、SGM生合成のほうへ都合よく働くようになり、SGM生産が著しく改良された。

3. 新規アミノグリコシド抗生物質の検索

各種の細菌感染症の治療に新抗生物質が導入されると、しばらくしてその耐性菌が出現し、治療上の障害となる。アミノグリコシド抗生物質の場合、耳や腎臓に対する毒性も問題とされている。この耐性菌と毒性の問題を克服する新薬を開発するために様々な努力が払われている。従来の土壌スクリーニングや既存物質の化学修飾に加え、抗生物質生産菌の微量成分を探索したり、idiotrophにその要求成分のアナログを与えるmutational biosynthesisといった方法が使われている。

筆者らは、*M. sagamiensis*の代謝活性を利用して新規抗生物質を探すという考えで、1) 変異株の生産物の探索、2) 転換反応およびmutational biosynthesis、3) 変異株相互の混合培養、などについて検討し、いくつか興味ある新規物質を得た。

1) SU-2 関連物質と DOS 生合成

生合成の研究でDOS idiotrophをよく使って

図5 SU-2 および関連抗生物質の構造

きたが、この変異株は、DOSを添加しない培地で培養した時は抗生物質を作らないものとされていた。ところが、*M. sagamiensis*から何株か得られたDOS idiotrophの中に微量の抗菌活性物質を蓄積する株があることを、この変異株を使っての転換反応生成物の分析中に偶然に見いだした。DOS idiotroph KY 11509の培養液上清を弱酸性陽イオン交換樹脂Amberlite IRC-50で処理後、約1,000倍に濃縮し、生産物をTLCで分析すると、4~5個の未知抗菌物質が認められた。主成分をSU-2と命名し、大量培養液から精製を試みて、SU-2の他にSU-1、-3、-4、(SU-3、-4は以前はSUM-3、SUM-4と報告)を単離した。SU-2、-1、-3はいずれも新規*で、それぞれGM-C_{1a}、-C₂、SGMの1-deamino-1-hydroxy誘導体というユニークな構造と同定された(図5)。SU-4の推定構造は、3'-hydroxy SU-2が考えられている。

SU-1、-2、-3は、いずれも抗菌力はSGM、GMより若干劣るものの、なお相当の抗菌力を保持しており、ある種のGM、SGM耐性菌に対しても有効であった。DOSの1位のアミノ基の修飾は、天然から発見されたBTN [RMの1-N-(4-amino-2-hydroxybutyryl)誘導体]、KM-Aの化学修飾による同誘導体AMKや、SSMの1-N-エチル誘導体netilmicinなど、耐性菌に対する活性や毒性の改良の面で実証的な成果が得られ、今後も注目されると考えられるが、その意味でSU-2各成分の強い抗菌力とスペクトラムは

* SU-2各成分発見後間もなく、MallamsによりGM、SSMの1-deamino-1-hydroxy誘導体合成の発表があった。

示唆に富んでいる。

さて、筆者らは、SU-2 成分のアミノサイクリトールが 2-deoxy-scylo-inosamine (DOI) であることに特に興味を持った。DOI は天然からは発見されていなかったし、SU-2 成分がどんな機構で生成したかという疑問があった。

まず、DOS 要求性と SU-2 生産の関係を見るため、*M. sagamiensis* の他の DO Sidiotroph 3 株について SU-2 生産性を調べたところ、G-762 は SU-2 を生産し、KY 11508, G-726 は生産しないことがわかった(表 1)。DOI は、Rinehart ら⁽¹⁾によって DOS 生合成の一つの可能な中間体として想定されており、SU-2 生産性の菌株による違いは、DOS 生合成上のブロック位置の違いによるのではないかと考え、その点を検討することにした。ところが、DOS は SM を除く実用上重要なアミノグリコシド抗生物質の大半に含まれているにもかかわらず、当時その生合成については不明な部分が多かった。Rinehart ら⁽¹⁾は、NM 生産菌 *Streptomyces fradiae* を用い、ラベルしたグルコースやグルコサミンの DOS へのとり込み実験の結果に基づいて、グルコースからサイクリトールに転換後図 6 の (1), (2), (3) (またはその対掌体) を経て DOS が生成する経路を推定した。この経路のどの段階でデオキシ化が起こるかは不明であったが、Daum ら⁽⁶⁾は *M. purpurea* の DOS idiotroph を用いた各種サイクリトールからの mutational biosynthesis の結果から、上の推定経路がほぼ正しいこと、また (1) のラセミ体やある種の deoxycyclitol が GM へ転換されるので、デオキシ化は生合成のかなり初期で起こると推定した。

これらの知見を参考にし、*M. sagamiensis* の各 DOS idiotroph を使って、co-synthesis (異なった blocked mutant どうしの組み合わせで抗生物質の生成の有無をみて、ブロックの相対位置を知

図 6 DOS 生合成経路

ることができる), 各種サイクリトールの転換実験, および idiotroph の蓄積中間体の同定を検討した。こうして、1) KY 11509 と G-762 は、アミノサイクリトール、K 14-1 を大量蓄積する。K 14-1 は精製単離後 DOI (図 6 の (2) またはその対掌体) と同定された; 2) K 14-1 と 2-deoxyinosose [(1) のラセミ体] は、KY 11509, G-762 によっては SGM へ転換されないが、別の DOS idiotroph KY 11508 により SGM へ転換される。また inosose, inosamine, ストレプタミンは KY 11508 により新規物質 2-hydroxy SGM へ転換された (mutational biosynthesis); などの結果から、DOS 生合成経路と各 idiotroph の欠損部位を図 6 のように考えた (ただし 3 は推定化合物)。KY 11509 と G-762 は DOI の直後のステップ C が、KY 11508 はグルコースから (1) へ至る経路のどこかでブロックされていると考えられる。G-762 は、co-synthesis と転換実験で KY 11509 と区別されないが、K 14-1 や SU-2 は生産しない。ステップ B と D はアミノ基の転移反応で、この aminotransferase を無細胞抽出物を用いて検討した Walker ら⁽⁷⁾が推定しているように、両ステップを同一酵素が触媒していると考え、G-726 がこの aminotransferase 欠損株と考えると結果がうまく説明される。以上は、*M. sagamiensis* で得られた結果であるが、最近 2 つのグル

図7 *M. sagamiensis* のサガミシンおよび関連アミノグリコシド生合成系

1. 2-deoxy-scyllo-inosamine, 2. デオキシストレブタミン, 3. UAA-41, 4. ジェンタミシン A₁, 5. ジェンタミシン X₂, 6. サガミシン, 7. 6'-deamino-6'-hydroxygentamicin C_{1a} (UAA-3)

ープ^(8,9)で報告されている, BTN 生産菌 *Bacillus circulans* の DOS idiotroph を用いた DOS 生合成の研究結果も, これらと矛盾する点はない. 特に, 藤原ら⁽⁹⁾は, DOS idiotroph より DOI を単離し, 絶対構造も含めて (2) を同定した. また (2) の対掌体は BTN に変換されないことから, 図7の経路を立体化学も含めて確認している. 筆者らは, *M. purpurea*, *M. inyoensis* で得られている DOS idiotroph についても, 同様にブロック位置を図6に示すように推定した. このように, DOS 生合成の (1) 以降の後半部分は *Streptomyces* 属, *Micromonospora* 属, *Bacillus* 属に共通であると推定される. グルコースから (1) へ至る部分の生合成についてはよくわかっていない.

KY 11509 から K 14-1 を精製する過程で, (2) を含むアミノグリコシドがいくつか単離同定された. いずれも SGM 生合成中間体 (GM-A₂, -A, -X₂, G-418) の 1-deamino-1-hydroxy 誘導体であった. 以上の結果から, SU-2 成分は, DOS 生合成上ステップCがブロックされたため DOI が蓄積し, DOI がDOSに代って SGM 生合成経路

に直接とり込まれて生成したと考えられる. アミノサイクリトール部分を DOS idiotroph を使った mutational biosynthesis により変換し, 新しい抗生物質を探す試みは数多いが⁽⁶⁾, このように DOS idiotroph の代謝物から新しいアミノサイクリトールを含有する抗生物質を探した例はそれまでになく, 他の生産菌にも広く応用可能と考えられた. そこで, GM 生産菌 *M. purpurea* や SSM 生産菌 *M. inyoensis*, NM 生産菌 *S. fradiae* で手に入る DOS idiotroph の抗生物質生産の有無を若干検討したが, 残念ながら抗生物質は検出されなかった. これらの変異株のブロック位置はステップA, BあるいはDで, Cの欠損

変異株はなかった (図6). 一方, 最近藤原ら⁽¹⁰⁾は上述の *B. circulans* の DOI 蓄積 DOS idiotroph が 1-deamino-1-hydroxy-xylostasin (S-11-A) を蓄積したことを報告しており, *M. sagamiensis* と共通した現象として興味深い.

2) 転換反応による新規アミノグリコシドの生成

生合成研究のために確立した静止菌体を使っての転換反応系を用い, 種々の生合成中間体や抗生物質を添加すると, 生成物の中に新規物質が効率よく見つかることがわかった. 生合成の項で述べた TPJ-B はその1つの例だが, ここではもう1つの例として 6'-NMV について述べたい. この化合物については最初から存在を想定し, 色々な手法で作り出すことを試みたが, その過程で SGM 生合成の新知見が得られたことは前にも述べた. 結局, G-52 生産菌 *M. zionensis* か *M. sagamiensis* KY 11535 を用いた VDM の転換反応または *M. sagamiensis* の DOS idiotroph KY 11525 による JI-20 B の転換反応 (この場合は微

量生成)により目的物質が得られた。転換反応系では菌株濃度、基質の種類や濃度、反応時間を自由に調節できるし、生成物の分析や精製も培養プロセスに比べて容易なので、発酵では蓄積しない物質や分析・精製が難しい物質が見つかる効率が高く、新規物質を見つける有効な手段といえよう。最近、ジェンタミシン生産菌により KM から新規抗生物質 combimicins 生成が報告⁽¹⁰⁾されたが、このように転換基質を他の抗生物質に求めるのも面白い方向であろう。

*

SGM の生合成、代謝調節の研究とそれを応用した菌株改良、新規アミノグリコシド抗生物質の検索について述べてきた。ここに示した例でもわかるように、一般的に二次代謝の酵素は一次代謝のように基質特異性が高くなく、1系列中の1つの酵素に対する基質とその生産物が別の酵素の基質となりうる。したがって、いわゆる“metabolic network”といわれる網目状の経路が考えられ、培養条件や菌株の違いによって主たる経路が決まると考えられている。これまで述べたいくつかの観点からの研究結果を総合してみると、SGM 生産菌として発見された *M. sagamiensis* が、実は図7に示すような、SGM を含む関連アミノグリコシドの複雑多岐に分かれた生合成経路を有していたことがわかる。親株では図3に示した SGM 生合成が主経路であるが、変異株では、経路上のあるステップがブロックあるいは強化された結果、ある場合には SGM 力価向上へつながり、ある場合には通常ではほとんど機能していない副経路が拡大され、新規物質が蓄積してくると考えられる。このような特性に抗生物質の生合成や菌株改良の研究の難しさがあり、同時に面白さがあるのではないだろうか。SGM 生合成については、輪郭をようやく捕えられたという段階であり、本文中に述べたように残された問題点は多い。生合成の調節についても、他の二次代謝産物同様、いくつかの断片がわかってはきたが、まだ本質的なところに至れないのが現状であろう。抗生物質の合理的な研究方向を可能にするのは、こういった

問題を一つ一つ解明していく努力の蓄積ではないかと考える。微生物遺伝学を含めて、分子生物学の著しい進歩に対比して、抗生物質生合成の遺伝生化学的面の進歩はなお遅いが、遺伝的手法や、抗生物質生産に関与するプラスミドの操作も含めた遺伝子工学的手法によっても、抗生物質生産菌の改良や、新抗生物質の創成が期待される現在、個々の抗生物質についての生合成および遺伝の基礎的研究の蓄積がより要求されるであろう。

本研究は、筆者を含めた共同研究グループの研究成果の一部をまとめたものであり、終始御指導いただいた中山清協和醸酵工業(株)理事をはじめ、共同研究者(山口健、小田倉義博、伊藤青菫、高沢令匡、本多春雄、北村重人、白幡公勝、飯田孝男)各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) K. L. Rinehart Jr. & R. M. Stroschane : *J. Antibiot.*, 29 319 (1976).
- 2) R. T. Testa & B. C. Tilley : *Jpn. J. Antibiot.*, 32, S-47 (1979).
- 3) B. K. Lee, J. V. Bailey, R. G. Condon, J. A. Marquez, G. H. Wagman & M. J. Weinstein : *Antimicrob. Agents Chemother.*, 12, 335 (1977).
- 4) R. Okachi, S. Takasawa, T. Sato, S. Sato, M. Yamamoto, I. Kawamoto & T. Nara : *J. Antibiot.*, 30, 541 (1977).
- 5) H. Grisbach : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35, 81 (1978).
- 6) S. J. Daum & J. R. Lemke : *Ann. Rev. Microbiol.*, 33, 241 (1979).
- 7) J. B. Walker : *Dev. Ind. Microbiol.*, 21, 105 (1980).
- 8) T. Furumai, K. Takeda, A. Kinumaki, Y. Ito & T. Okuda : *J. Antibiot.*, 32, 891 (1979).
- 9) 藤原民雄 : 化学と生物, 19, 229 (1981).
- 10) Y. Oka, H. Ishida, M. Morioka, Y. Numasaki, Y. Yamafuji & T. Osono : *J. Antibiot.*, 34, 777 (1981).
- 11) T. Deguchi, S. Okumura, A. Ishii & M. Tanaka : *J. Antibiot.*, 30, 993 (1977).

上記の文献は 1), 2), 5), 6), 7), 9) など総説を選んで掲げたが、他に参考になると思われる総説も以下に記しておく。

- S. W. Queener, D. K. Sebek & C. Vézina : *Ann. Rev. Microbiol.*, 32, 593 (1978).
- K. L. Rinehart Jr. : *Jpn. J. Antibiot.*, 32, S-32 (1979).
- J. F. Martin & A. L. Demain : *Microbiol. Rev.*, 44, 230 (1980).
- 能美良作 : 醸酵工学, 56, 479 (1978).
- 中山 清 : *Amino Acid Nucleic Acid*, 36, 1 (1978).
- 奈良 高 : 発酵と工業, 37, 735 (1979).
- 堀田国元, 岡見吉郎 : 醸酵工学, 56, 494 (1978).