昆虫共生微生物が生産する抗菌性物質†

小 村 啓

(財団法人サントリー生物有機科学研究所, 現在, サントリー株式会社洋酒研究所)

はじめに

昆虫には特定な器官に共生微生物と考えられている特殊な微生物群を持つものがある。たとえば一般に養菌穿孔虫(アンブロシアビートル)と呼ばれるキクイムシでは、種類によってその器官の存在場所は異なるが、体表に開いた孢子貯蔵器官にアンブロシア菌と総称される菌類の孢子を貯蔵しており、孔洞内にこれらの菌を繁殖させ食糧としている。また、シロアリなど主に繊維を食べる昆虫は、繊維の消化のために腸内に特別な腸内細菌を持つ。しかし、これらの微生物はいずれも宿主の細胞外で宿主の昆虫と共生関係にある。これとは別に、ウンカ、ヨコバイ、カメムシ等に代表される吸汁性昆虫のなかには細胞内に微生物群を持つものがある。では、このような細胞内共生微生物は一体何をしているのであろうか。はたして宿主と微生物の関係は本当に共生関係なのか、等々不明な部分が多い。近年石川らによって、この本質に関係しているとも推測される事実が見出されている。(詳しくは他章で石川により述べられているので参照されたい。)

ここで観点を变えて、これらの共生微生物を新しい微生物資源として考え、これらの微生物が有用な生物活性物質を生産する新しい資源となりうるかは興味を持たれる。そこで筆者らは科学技術庁の研究費による調査委員会のメンバーを中心として、これらの共生微生物がはたして新規な有用化合物の供給者となりうるかを検討したところ、きわめて有望であることを明らかにできた。以下、その経緯についてまとめた。

1. 菌の単離とスクリーニング

細胞外共生微生物に比べて細胞内共生微生物についての物質レベルでの研究はあまり多くない。その原因として、細胞内共生微生物を物質生産・代謝の状況が把握できるほどの長期間培養できないことがまず挙げられる。ところで、筆者らのグループが主にターゲットとしたウンカ・ヨコバイ類では、細胞内共生微生物はマイセトーム(菌塊)と脂肪体に局在しており、次世代へは卵を通じて伝えられる⁽¹⁾。この経卵伝播の特徴に着目した久住ら^(2,3)の分離方法は、今回の目的に十分叶うものであった。筆者らのグループではこの方法をさらに改良し、日本をはじめ中国、東南アジア諸国で採集したウンカ、ヨコバイ類の卵から共生微生物を単離することに成功した。しかし、この方法で単離された共生微生物は、細胞内共生微生物にとっては特殊ともいえる単離条件下でも十分に増殖できる微生物のみで、共生微生物として本当に重要な微生物は当然取り逃がしている可能性が高い。カメムシについても同様に卵から共生微生物を単離し、先のウンカ、ヨコバイの共生微生物とともに、一次スクリーニングに供した。今回対象とした共生微生物の宿主は農産物の害虫である場合が多く、抗菌活性のスクリーニングには植物病原菌を用いることにした。

ウンカ、ヨコバイから単離した共生微生物の培養液についてのスクリーニングには51種類の指標菌(表1)を用いたが、228サンプル中約18%にあたる42サンプルについて活性が認められた⁽⁴⁾。なかでも抗菌活性のスペクトルが広く半数以上の菌に対して活性を示したものが4サンプル、中程度のものが5サンプルあった。これに対し、1~5指標菌にしか活性を示さないものが33サンプルと大部分を占めた。

カメムシ由来の共生微生物の培養液については、ウンカ、ヨコバイのアッセイの結果を検討し、指標菌を20種(表1)に絞ってスクリーニングを行った。全789サンプル中、152サンプルが活性を示し、そのうち49サ

† Antimicrobial Substances Produced by Symbionts of Insects.

Hajime KOMURA (Suntory Institute for Bio-organic Research, Wakayama-dai, Shimamotocho, Mishima-gun, Osaka 618, Present Address: Suntory Ltd., Research Laboratories of Distilled Spirits and Liqueurs, Technological Development Center, Yamazaki)

表 1 スクリーニングに使用した指標菌

属 名	ウンカ, ヨコバイ	カメムシ
<i>Agrobacterium</i> 属	1 種	2 種
<i>Corynebacterium</i> 属	4 種	2 種
<i>Erwinia</i> 属	4 種	2 種
<i>Pseudomonas</i> 属	26 種	9 種
<i>Xanthomonas</i> 属	16 種	5 種
合 計	51 種	20 種

ンプルは半数以上（9 指標菌以上）に活性を示す抗菌スペクトルの広いサンプルであったが、やはり大部分（82 サンプル）は狭いスペクトル（1～3 指標菌に対してのみ活性）のサンプルであった⁽⁶⁾。

さらに各種のウイルスに対する活性についても一次スクリーニングで検討された。抗植物ウイルス活性については、タバコモザイクウイルス（TMV）が用いられた⁽⁶⁾。171 サンプル中 26 サンプルについてウイルスの増殖阻害活性が見出されたが、面白いことにほぼ同率でウイルスの増殖を 20% 以上促進するサンプルも見出された。これに対して、抗動物ウイルス活性については、単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）および 2 型（HSV-2）でみるかぎり、86 サンプル中 24 サンプルが HSV-1, -2 のいずれかに対して活性を示した。なかでも 10 サンプルは HSV-1, -2 の双方に抗ウイルス活性を有することが明らかになった⁽⁷⁾。これに対して、コクサッキーウイルス B4（CB4）を用いてスクリーニングを行った場合、778 サンプル中 20 サンプルにのみ活性が見出された⁽⁸⁾。

2. 共生微生物が生産する抗菌性物質

一次スクリーニングの結果を基に分離・精製を行い、

いくつかの異なったタイプに属する抗菌性化合物を得ることができた。現在までに筆者らのグループおよび関連グループにより昆虫の細胞外および細胞内共生微生物の培養液から得られ、最終構造に至った抗菌性物質を表 2 にまとめた⁽⁹⁾。個々の化合物についての詳細は紙面の都合で省略する（それぞれの参考文献を参照されたい）。

これらの抗菌性物質のなかでただ 1 つの新規化合物であるアンドリミド（4）⁽¹²⁾ はイネ白葉枯病菌（*Xanthomonas campestris* pv *oryzae*）に対してきわめて高い特異性と強い抗菌性（MIC 値 0.1～0.2 $\mu\text{g/ml}$ ）を示す。構造的にみると、2 つのカルボニル基に挟まれたイミド環上の炭素原子を窒素原子で置き換えると、環自体はヒダントインとなり、全体はペプチド化合物とみなせる。したがってアンドリミド自体は天然のペプチド疑似体といえる点興味深い。このような、ペプチド中の窒素原子を炭素原子に変換して活性の発現を期待する操作が、自然界で行われていたこと自体驚きに値する。現在のところこの化合物の作用機序は明らかではないが、疑似ペプチド構造から考えてある種のプロテアーゼまたは類似的酵素に対して阻害活性を持つものと推定している。しかし、疑似ペプチドと考えたとき、イミド環上のメチル基は L-アラニンではなく D-アラニンのキラリティーに相当する点はこの化合物の作用機序を知るうえで重要な手掛かりを与えるものと期待される。ちなみに、アンドリミドの異性体のうちこのメチル基が L-アラニンに相当するエピ体はその活性がアンドリミド自体の百分の一以下で、事実上活性がないのに等しい⁽¹⁴⁾。また同様に、このメチル基を除いたノルメチル体（D-アラニンをグリシンに換えた誘導体に相当）でも活性がほとんど失われ

表 2 昆虫の共生微生物の培養によって得られた抗菌性物質⁽⁹⁾

宿主昆虫	宿主捕獲地	微生物番号	同定結果	化合物	文献
セジロウンカ	タ イ	Sf-T-TSB-Y3	未同定	Pyoluteorin (1)	
細胞内共生微生物	インドネシア	Nl-I-BPH-C2	<i>Bacillus</i> 属	Diacetylphloroglucinol (2 a)	9
				Polymyxin M ₁ (3 a)	10
		Nl-INS-C833-5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R-type pyocin	11
	タイ	Nl-T-C1-1W	<i>Enterobacter</i> 属	Andrimid (4)	12
		Ps-HB-71412	<i>Bacillus polymyxa</i>	Polymyxin E ₁ (3 b)	9
チャバネアオカメムシ	日本	Ps-C7141	<i>Bacillus polymyxa</i>	Polymyxin E ₁ (3 b)	11
細胞外共生微生物	日本	Sm-S003	未同定（菌類）	Diacetylphloroglucinol (2 a)	
				Acetylphloroglucinol (2 b)	9
	日本	Pc-B22	未同定（菌類）	Tricodermin (5)	13
カナクギノキイムシ	日本	Ip-96	未同定（菌類）	Citrinin (6)	13

てしまう⁽¹⁴⁾。これに対して、N-末端部分のアシル基についての多少の変化は活性には大きな影響を与えないようである⁽¹⁵⁾。

以上、抗菌性化合物でみるかぎり、細胞内共生微生物ではアミノ酸由来およびポリケチド由来また細胞外共生微生物ではポリケチド由来およびメバロン酸由来と、比較的多様な化合物が生合成されていることが判明し、今後さらに興味ある物質が見出される可能性を示唆している。しかし、共生微生物が安易に新規化合物を与える資源ともいえないことを示唆する事実もある。これは必ずしも共生微生物に限ったことではないが、抗菌性物質の単離精製を行っている過程で、培養ごとに抗菌活性の生産力価が極端に低下する現象も多く体験した。なかには1～2回の培養の後、まったく目的の物質を生産しなくなってしまう場合もあった。たとえば、表2中のチャパネアオカメムシの共生微生物 Ps-HB-71412 株は、当初ポリミキシン E₁ (3b) のほかにも1種類の塩基性抗菌ペプチドを生産していたが、培養ごとにこの第二の成分の生産力価が低下し、3回目以後の培養ではポリミキシンしか生産しなくなった。これにはいくつかの原因が考えられるが、本来細胞内に棲んでいた微生物が突然細胞外に取り出され今までとはまったく異なった環境下におかれ、ストレスから有用な化合物(あくまで人間にとって)を作っていたと仮定すると、そのような場合には菌自体も変異しやすいと推測される。とくにそのなかの生命力は強いが生産性の低い個体が分裂を続け、最後には大部分が非生産菌になってしまう可能性もある。また逆に本来細胞から供給されていた栄養などの特別な要素が与えられなくなり、ついには重要な酵素系も発現しなくなって、本来生産していた化合物すら生産できなく

なったためとも考えられる。この点も今後の重要な課題の1つであろう。

はたしてこれらの抗菌性化合物が宿主の細胞中でも合成されているかもまったく不明である。アンドリミドを例にとると、生産菌の宿主はタイ産のトビイロウンカで、タイに限らず広く東南アジアでイネに対する大害虫の1つとされている。このイネの害虫の細胞内共生微生物の1つが、宿主昆虫の食草であるイネにつく病原菌の1つ白葉枯病菌に対して、特異的かつ強い抗菌性物質を生産することは、いかにも共生微生物の役割との関連を期待させる。

このようにただ1つではあったが新しい抗菌性物質は見つかったものの、そのことがさらに多くの疑問を投げかけてくるのが科学の常である。とくに細胞内共生微生物のように、本来きわめて特殊な環境下に育成している微生物などでは、その単離培地を工夫することにより今までとはまったく異なった菌を単離できるだろう。ちょっとした工夫が案外本質的な疑問を解く鍵を与えてくれることも多々ある。このように考えると、観点さえ変えれば資源という意味でもまだまだ無限の可能性が残されているのは間違いないだろう。

おわりに

この昆虫の共生微生物が生産する生物活性物質の研究は、科学技術庁研究費の研究グループメンバー間での共同研究によって得られた成果であり、メンバーの誰一人を欠いてもこれらの成果は得られなかった。これこそまさに共生関係といえる。この場を借りて共同研究者の皆様に感謝したい。最後にこのプロジェクトに参加する機会を与えてくれた、(財)サントリー生物有機科学研究所 中西香爾所長、納谷洋子副所長に感謝したい。

- (1) S. Nasu : *Bull. Kyushu Expt. Sta.*, 8, 153 (1965).
- (2) T. Kusumi, Y. Suwa, H. Kita and S. Nasu : *Appl. Entomol. Zool.*, 14, 459 (1979).
- (3) T. Kusumi, Y. Suwa, H. Kita and S. Nasu : *Appl. Entomol. Zool.*, 16, 88 (1981).
- (4) 西山幸司 : 昭和 58 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1984, p. 74.
- (5) 西山幸司 : 昭和 59~61 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1987, p. 83.
- (6) 杉浦巳代治 : 昭和 58 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1984, p. 92.
- (7) 南嶋洋一, 柴鶴義人, 岡田政信, 三原真里 : 昭和 58 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1984, p. 99.
- (8) 栗村 敬 : 昭和 59~61 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1987, p. 94 ; M. Asanaka, T. Kurimura, H. Kita and M. Sugiura : *Yonago Acta Med.*, 30, 31 (1987).
- (9) P. T. M. Kenny, S. Y. Tamura, A. Fredenhagen, Y. Naya, K. Nakanishi, K. Nishiyama, M. Sugiura, H. Kita and H. Komura : *Pestic. Sci.*, 27, 117 (1989).
- (10) Y. Jigami, N. Harada, H. Uemura, H. Tanaka, K. Ishikawa, S. Nakasato, H. Kita and M. Sugiura : *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1637 (1986).
- (11) 地神芳文, 植村 浩, 田中秀明 : 昭和 59~61 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1987, p. 98.
- (12) A. Fredenhagen, S. Y. Tamura, P. T. M. Kenny, H. Komura, Y. Naya, K. Nakanishi, K. Nishiyama, M. Sugiura and H. Kita : *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 4409 (1987).
- (13) 中川 端, 松田敏生, 喜多 寛 : 昭和 59~61 年度科学技術振興調整費「新共生微生物の生産する生理活性物質の検索・利用技術の研究に関する調査報告書」, 科学技術庁研究調整局, 1987, p. 64.
- (14) W. McWhorter, A. Fredenhagen, K. Nakanishi and H. Komura : *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 299 (1989).
- (15) 小村ら : 未発表データ.