放線菌の気菌糸の分化誘導 —*Streptomyces alboniger* を中心として—†

夏目雅裕, 丸茂晋吾

(名古屋大学農学部)

はじめに

放線菌の生活環には、基生(底)菌糸から気菌糸の形成と、主として気菌糸上への胞子の形成という2つの重要な形態分化の過程がある。これらの分化現象が低分子の化学物質によって制御されていることは、1957年に Dondero と Scotti が、気菌糸欠損菌株 10 株と正常株 1 株を 2 株ずつ対峙培養すると、いくつかの組合せにおいて一方の菌株の気菌糸形成が他方の菌株によって誘導されることを見出したのが最初である⁽¹⁾。

われわれは多数の放線菌について気菌糸誘導物質の探索を行い、*Streptomyces alboniger* から pamamycin 群化合物を、また、*S. ambofaciens* からカルシウムイオンを活性物質として単離した。カルシウムイオンはその後、*S. alboniger* を含む多くの放線菌の気菌糸形成に関与していることを明らかにした。

放線菌の分化誘導物質としては、A-factor (*S. griseus* の胞子形成、streptomycin 生産および自己耐性)⁽²⁾, factor C (*S. griseus* の胞子形成)⁽³⁾, factor I (*S. griseus* の気菌糸形成および leukaemomycin 生産)⁽⁴⁾, sporulation pigment (*S. venezuelae* の胞子形成)⁽⁵⁾, stimulator (*S. cattleya* の気菌糸形成)⁽⁶⁾ などが報告されているが、化学構造の決定された物質は A-factor を含む butyrolactone type の化合物と pamamycin 群化合物の2種類だけである。

本稿ではわれわれが現在行っている *S. alboniger* を中心とする pamamycin 群化合物とカルシウムイオンの気菌糸誘導活性について述べる。

1. Pamamycin 群化合物

S. alboniger IFO 12738 を ISS 寒天培地上で生育させ

† Pamamycins and Calcium Ion as Aerial Mycelium-Inducing Substances in Actinomycetes. Masahiro NATSUME and Shingo MARUMO (Department of Agricultural Chemistry, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01)

ると豊富に気菌糸を形成する。この寒天培養物の酢酸エチル抽出物を本菌の気菌糸欠損菌株に与えると気菌糸形成が誘導された。この活性を有する抽出物を種々のクロマトグラフィを用いて精製することにより活性本体の単離に成功した⁽⁷⁾。精製の要点として、活性物質はシリカゲルや HPLC 充填剤に強く吸着されて溶出は困難であったが、アミンを溶出溶媒に添加することにより効果的に精製することができた。本菌からは 1979 年に McCann と Pogell によって気菌糸形成促進物質が分子量 621, 635, 649 および 663 の混合物として精製され、pamamycin と命名されたが、各成分の純粋単離および化学構造の解明には至らなかった⁽⁸⁾。われわれの単離した気菌糸誘導物質はこの pamamycin と関連した新化合物であったので、その分子量を付加して pamamycin-607 と命名した。

Pamamycin-607 の平面構造と相対立体配置は 500 MHz 2D ¹H-¹H および ¹H-¹³C COSY とデカップリング実験、NOE 差スペクトルにより構造式 1 のごとく決定した⁽⁹⁾。また、絶対立体配置は pamamycin-607 の LiAlH₄ 分解によって得られる小さいほうのジオールと、絶対立体配置既知の殺ダニ抗生物質 nonactin を分解して得られる類似のジオールとを同一構造を持つベンゾエートに導き、旋光度の比較により決定した⁽¹⁰⁾。Pamamycin-607 は 0.1 μg/disc で有為な気菌糸誘導活性を示した(図1)⁽⁷⁾。

Pamamycin 群化合物には分子量 593 から 663 まで 6

pamamycin-607 (1)

図 1 Pamamycin-607 の気菌糸誘導活性

表 1 Pamamycin 異性体の気菌糸誘導活性

投与量 (µg/disc)	気菌糸誘導円の直径 (mm)		
	3	10	30
Pamamycin-607	34	36	45
635 A	0	+	+
635 B	+	36	37
649	0	0	0

種類の同族体が存在する。これまでに分子量 635 の異性体 2 種類と分子量 649 の同族体 (2 種類の異性体の等量混合物) を Develosil ODS および NH_2 HPLC により分離し, それらの化学構造をほぼ決定している。

Pamamycin 群化合物の気菌糸誘導活性を比較した結果を表 1 に示す。Pamamycin-607 の気菌糸誘導活性が最も強く, 635 B は 607 の 1/3 の活性を示したが, 635 A と 649 は活性を示さなかった。気菌糸誘導活性を示す pamamycin-607 および 635 B と活性を示さない 635 A および 649 の構造上の差異は, 活性を示す異性体は 9 位の置換基がメチル基であるのに対し, 活性のない異性体はエチル基である点である。この構造上の差異と気菌糸誘導活性との関連については現段階では不明であるが, pamamycin の作用機作を解明する過程で明らかにできると考え, 研究を進めている。

2. カルシウムイオン⁽¹¹⁾

S. ambofaciens KCC S-0204 は ISS 培地上では豊富に気菌糸を形成するが, YMA 培地上では形成しない。ISS 培地の抽出物を YMA 培地に接種した本菌に与えたところ, 気菌糸形成が誘導された。そこでこの活性物

質の精製を進めたところ, 単離された活性物質は意外にも酢酸カルシウムであった。活性本体のカルシウムイオンは ISS 培地に添加された炭酸カルシウムが, 菌の生育に伴って可溶化したものである。従来, 培養液の pH を中性に保つ目的で炭酸カルシウムを添加することは一般的に行われていたが, カルシウムイオンが気菌糸形成に必要であることを指摘したのはこれが最初である。

カルシウムイオンは近年, 高等生物において, セカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っていることが明らかにされている。そこで, どの程度の放線菌の気菌糸形成にカルシウムイオンが関与しているのかを調べた。YMA 培地に放線菌を接種し, 塩化カルシウムを与えることにより気菌糸形成が誘導または促進されるかどうか, また, カルシウムイオンのキレート剤である EGTA によって気菌糸形成が阻害されるかどうかを調べた。その結果, 試験した放線菌 35 菌株は 4 種類のタイプに分類することができた (表 2)。これらのうち, タイプ A, B, C の 21 菌株の気菌糸形成にはカルシウムイオンが関与していると考えられ, これはテストしたうちの 58% にあたる。さらに, タイプ D のうちの 8 菌株は培地をどんなに替えても気菌糸形成がみられず, 本質的に気菌糸形成能を失っていると考ええると, 気菌糸形成にカルシウムイオンが関与している菌株の割合は 75% になる。

最も多くカルシウムイオンを必要とした菌株はタイプ A の *S. alboniger* であって, 塩化カルシウム 1.0 mM の添加によって気菌糸が形成された。培地中のカルシウム

表 2 放線菌の気菌糸形成におよぼすカルシウムイオンと EGTA の効果

タイプ A : カルシウムイオンによって気菌糸が誘導される菌株 (2 菌株) <i>S. alboniger</i> IFO 12738, <i>S. ambofaciens</i> KCC S-0204
タイプ B : カルシウムイオンによって気菌糸形成が促進される菌株 (5 菌株) <i>S. hygroscopicus</i> KCC S-0439, <i>S. kitasatoensis</i> KCC S-1001 etc.
タイプ C : EGTA によって気菌糸形成が阻害される菌株 (14 菌株) <i>S. lavendulae</i> IFO 12879, <i>S. lipmanii</i> IFO 12791 etc.
タイプ D : カルシウムイオンや EGTA によって気菌糸形成が影響を受けない菌株 (15 菌株) <i>S. fumifer</i> IFO 13342, <i>S. cattleya</i> KCC S-0925 etc.

イオン濃度は 0.5 mM であるので *S. alboniger* は気菌糸形成に 1.5 mM のカルシウムイオンを必要としたことになる。最も少量のカルシウムイオン濃度で気菌糸を形成した菌株はタイプ C の *S. lipmanii* と *S. lavendulae* で、培地に 0.4 mM の EGTA を添加しても気菌糸は正常に形成することから 0.1 mM のカルシウムイオンで気菌糸形成が起こることになる。したがって、気菌糸形成に必要な培地中のカルシウムイオン濃度は 0.1 から 1.5 mM の範囲にあると結論した。

3. Pamamycin 群化合物の気菌糸誘導活性とカルシウムイオン

当初、われわれは pamamycin の気菌糸誘導活性がその 16 員環マクロジオリド環の中にカルシウムイオンを取り込むイオノフォア作用によるのではないかと考えたが、pamamycin は Ca, Na, K などの陽イオンを水相から有機溶媒相に輸送する性質は示さず、pamamycin が直接カルシウムイオンの取込みなどに関与している可能性は否定された。

しかし、次のような現象から pamamycin の気菌糸誘導活性は、菌体内のカルシウムイオン濃度を間接的に制御することによって発現している可能性が高いと考えている。すなわち、1) pamamycin に敏感な気菌糸欠損菌株はカルシウムイオンを与えても気菌糸が誘導されたこと、2) pamamycin の気菌糸誘導活性は EGTA の存在下では発現しないこと、3) カルシウムチャンネル阻害剤の verapamil と diltiazem やカルモジュリン阻害剤の ophiobolin A が基生菌糸の生育には影響を与えず、気菌糸形成のみを阻害したこと、である。

おわりに、pamamycin は *S. alboniger* のほか数菌種の放線菌に気菌糸誘導ないしは促進活性を示したが、残念ながら普遍性はみられなかった。しかし、*S. alboniger* が最も多くのカルシウムイオンを必要とする菌種であること、pamamycin の気菌糸誘導機構にカルシウムイオンが関与している可能性が高いことは、pamamycin が

放線菌の気菌糸形成におけるカルシウムイオンの役割解明に有用であることを示している。

カルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとする情報伝達系が高等動物や植物で詳細に解明され、酵母の増殖、接合現象⁽¹²⁾やバクテリアの走化性⁽¹³⁾などにも関与していることが明らかになってきた。放線菌の気菌糸形成においても同様なメカニズムが存在するかどうかはたいへん興味深い問題である。

- (1) N. C. Dondero and T. Scotti : *J. Bacteriol.*, **73**, 584 (1957).
- (2) A. S. Khokhlov, L. N. Anisova, I. I. Tovarova, E. M. Kleiner, I. V. Kovalenko, O. I. Krasnikova, E. Ya. Kornitskaya and S. A. Pliner : *Z. Allgem. Mikrobiol.*, **13**, 647 (1973).
- (3) G. Szabo, T. Valyi-Nagy and S. Vitalis : *Acta Biol. Hung.*, **18**, 237 (1967).
- (4) U. Gräfe, W. Schade, I. Eritt and W. F. Fleck : *J. Antibiot.*, **35**, 1722 (1982).
- (5) H. E. Scribner, T. Tang and S. G. Bradley : *Appl. Microbiol.*, **25**, 873 (1973).
- (6) P. McCann-McCormic : "Microbiology-1981," ed. by D. Schlessinger, Am. Soc. Microbiol., 1982, p. 348.
- (7) S. Kondo, K. Yasui, M. Natsume, M. Katayama and S. Marumo : *J. Antibiot.*, **41**, 1196 (1988).
- (8) P. A. McCann and B. M. Pogell : *J. Antibiot.*, **32**, 673 (1979).
- (9) S. Kondo, K. Yasui, M. Katayama, S. Marumo, T. Kondo and H. Hattori : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5861 (1987).
- (10) M. Natsume, S. Kondo and S. Marumo : *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1911.
- (11) M. Natsume, K. Yasui and S. Marumo : *J. Antibiot.*, **42**, 440 (1989).
- (12) 宇野 功 : 「細胞分化、遺伝情報の逐次的発現、シグナル伝達モデルとしての微生物」, 農化, **62**, 1798 (1988); 宮川都吉, 福井作蔵 : 農化, **62**, 1802 (1988).
- (13) 日下 巖, 松下 琢 : 化学と生物, **26**, 5 (1988).