

ポリエン抗生物質 Enacyloxin に関する研究

渡 邊 敏 彦

Studies on the New Antibiotics Enacyloxins and Enacyloxin Oxidase Produced by *Frateuria* sp. W-315

Toshihiko WATANABE

(1994年8月18日受理)

We found a family of novel antibiotics, named enacyloxin (ENX), produced by pseudo-acetic acid bacterium, *Frateuria* sp. W-315. In this paper, I describe the summarized results of chemical structures and fermentation properties of them, and also the mode of action of ENX IIa and enzymatic properties of ENX oxidase.

はじめに

本研究は、十数年前から筆者およびその共同研究者により主として東北大学農学部農芸化学科に於て行われたものであるが、1994年7月、筆者の秋田高専への転任に伴い、その研究も本校に引き継がれ、卒業研究のテーマとしても現在進行中である。多くの方々のご理解をいただきながら今後の研究を進めたいと考え、その概略をまとめてみた。なお本文は、化学と生物、第30巻、第5号(1992年)に記載された文章を基本に改訂、加筆したものである。

抗真菌(抗かび)抗生物質として従来報告されているポリエン抗生物質はすべてラクトン環構造をもつとされていた。筆者が発見したポリエン抗生物質 Enacyloxin (ENX) はラクトン環のない鎖状構造をもつ新規な一群の抗生物質である。ENX はラクトン環構造をもつポリエン抗生物質とは大きく異なり、抗真菌活性はほとんど無いが、強い抗細菌活性を示した。ENX 生産菌は酢酸菌の一種である *Frateuria* 属に属す細菌であり、酢酸菌が抗生物質を生産するというは大変珍しいことである。その培養方法は赤パンかび (*Neurospora crassa*) を培養した後、その培養液を用いて、ENX 生産菌を培養するという2段階培養が用いられた。ENX 生産菌はまた、培地中に新規な酸化酵素 (ENX oxidase) を分泌し、さらにその補酵素もまた新規物質である可能性が示された。*Frateuria* 属細菌が赤パンかびの培養濾液で生産するという珍しい抗生物質である Enacyloxin は、その他にもいくつかの興味ある問

題を提供している。

1. Enacyloxin の構造¹⁻³⁾

現在までにその構造が決定、あるいは推定されている Enacyloxin (ENX) を Fig. 1 に示した。ジヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸と酸化の進んだペンタエンカルボン酸がエステル結合したものである。従来報告されているポリエン抗生物質は、大環状ラクトンと共役二重結合をもち、あるものは、糖をその構造にもつとされている。これに対し、現在までに発見された、13個の ENX 同族体はいずれもラクトン環をつくらないペンタエンクロモフォアをもち、その構造に1個または2個の塩素原子をもつことが特徴である。後述するように、生産菌の培養方法を変えると生産物の内容にも変化が見られ、主として塩素原子を1個もつ ENX (ENX Ia 及び ENX IIIa) が得られる。この場合、18'位が無置換となっている。この ENX 中の塩素原子は培地中の必須成分である塩素イオンに由来するが、これを臭素イオンで代替することは可能であり、培地に KCl の代りに KBr を添加した場合、臭素原子をもつ ENX が得られる。しかしハロゲンを全く含有しない ENX はまだ発見されていない。シクロヘキサン環の3,4位のジオールは cis 配置であり、1位のカルボン酸がそれらとは trans の関係にあるため、3位の水酸基は axial, 4位の水酸基は equatorial となるが、クロモフォア部分はこの3位の axial 水酸基とエステル結合している。酸性条件下ではこのアシ

ポリエン抗生物質 Enacyloxin に関する研究

偶数番号： 2 塩素同族体

奇数番号： 1 塩素同族体

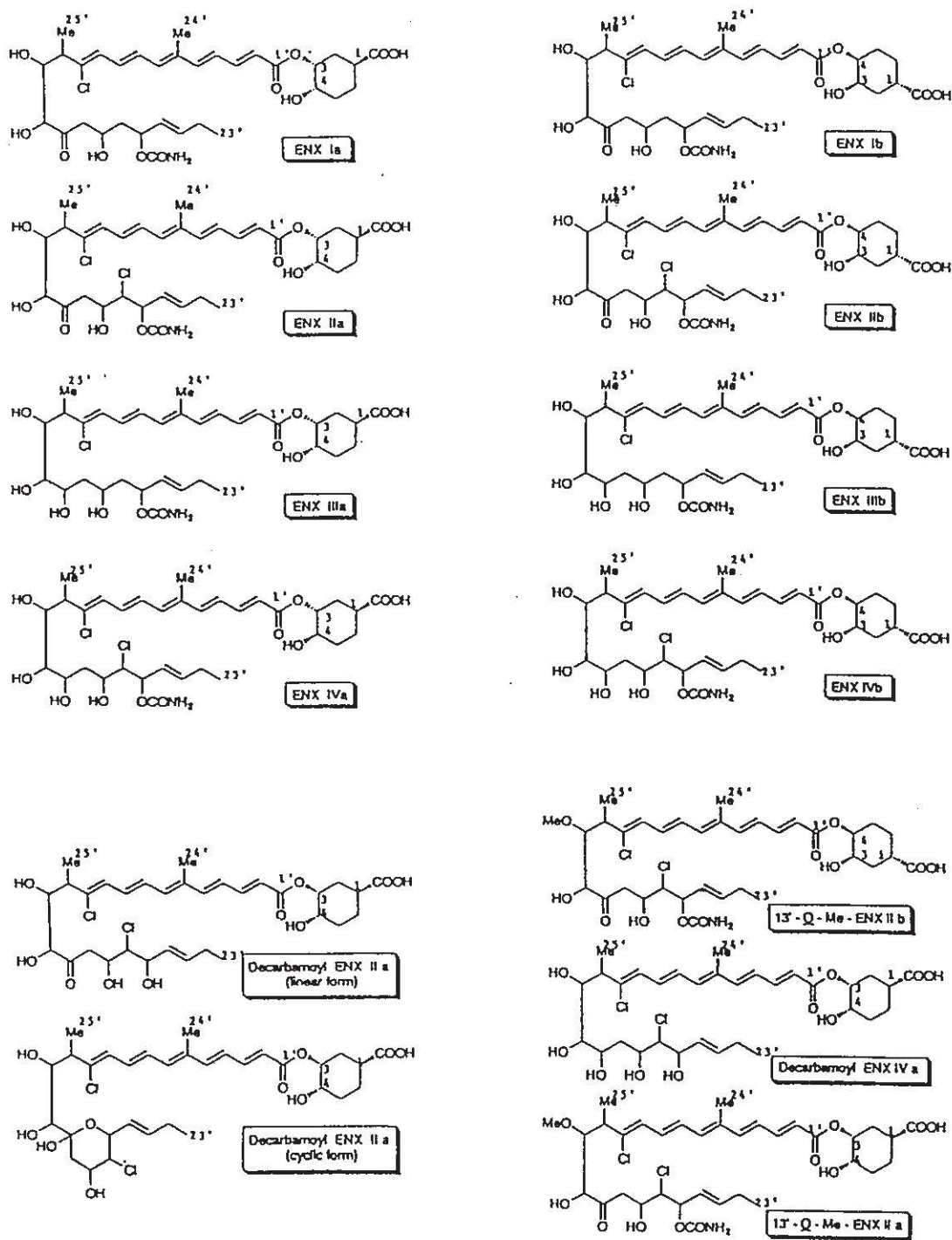


Fig. 1 エナシロキシン類

ル基が、次第に安定な4位に転移するようである。

2. ENX IIa の抗細菌活性^{4,5)}

ENX の抗菌活性はいずれの同族体も同様の作用を示すものと考えられるが、最も抗菌活性の強い ENX IIa について主として検討した。Table 1 に示すように、ENX IIa は広くグラム陽性・陰性細菌に活性を示す。しかし、赤パンかびには非常に弱い活性を示すが、酵母には活性を示さなかった。このように、かび及び酵母に殆ど活性を示さずに抗細菌活性のみを持つポリエン抗生物質は、ENX が最初の報告例と考えられる。その作用は静菌作用（殺菌作用と対比される言葉、菌の生育を止める働き）であり、大腸菌を用いた菌体内高分子物質合成にたいする作用は蛋白質合成に対する阻害のみが観察された。蛋白質合成の場であるリボソームにおけるペプチド鎖延長反応に対しては、phe-tRNA のリボソームへの結合を 30 µg/ml で約50%阻害したが、ペプチド転移反応には阻害は見られなかった。またフランスの Parmeggiani 教授との共同研究によると、ENX IIa は細菌のペプチド鎖延長反応において、リボソームおよび elongation factor Tu (EF-Tu) に直接作用する最初の抗生物質であることが示された

Table 1 エナシロキシンの最小生育阻止濃度 (µg/ml)

細菌名	IIa	IVa	IIIa
<i>Escherichia coli</i> K-12	5	5.5	5.5
<i>Escherichia coli</i> B IID	0.5	ND	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> 7 M-1	10	ND	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO 3081	7	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1007	40	ND	ND
<i>Erwinia carotovora</i> IAM 1024	1	ND	ND
<i>Serratia marcescens</i> FK 5	25	ND	ND
<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 7256	1	ND	ND
<i>Proteus mirabilis</i> AHU 1468	5	ND	ND
<i>Bacillus megaterium</i>	1	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> Marburg	10	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	20	ND	ND
<i>Micrococcus luteus</i> IAM 1097	10	ND	ND
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 3232	10	ND	ND
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	1	ND	ND
<i>Streptomyces</i> sp.	0.8	ND	ND
<i>Neurospora crassa</i> IFO 6068	200	ND	ND
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	500	ND	ND

ND: 実験をしていない

(投稿準備中)。なお細胞壁を欠く L 型大腸菌はラクトン環をもつポリエン抗生物質に対し感受性であることが示されており⁶⁾、細菌に対する効果の有無は細胞壁に対する薬剤の透過性もその原因の一つと考えられる。マウス腹腔内注射による LD₅₀ は 150 mg/kg であり、ポリエン抗生物質としては毒性は低い方であろう。

3. Enacyloxin の発酵生産^{7,8,9)}

ENX の発見の経緯はおおよそ次のようなものであり、スクリーニングにおける被験菌の代謝産物に依存して生産菌が抗生物質を生産するという経過をたどったものである。これは筆者の恩師である故植村定治郎教授の示された“微生物生態論”¹⁰⁾の考え方を抗生物質生産の場に応用したものである。抗真菌抗生物質の検索のために、蔗糖を単一炭素源とした Czapek-Dox 寒天培地に被験菌としての赤パンかびを接種し、その周辺に土壌試料を塗布したところ、赤パンかびの生育に依存するかたちで、ある細菌が生育した。その際、培地中に黄色物質が分泌され、それが赤パンかびの菌糸の伸長を僅かに阻害するという現象が観察された。この単離菌は当初 *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* 属間の中間型菌株 (intermediate strain) とされたが、その後、新たに *Frateuria* 属が提唱された¹¹⁾のに伴い、*Frateuria* sp. W-315株と命名された。W-315株にとって、赤パンかびの培養濾液以外には抗生物質生産のための良好な培地が容易に見つからないため、赤パンかびをまず Czapek-Dox 培地で液体培養し、つぎにその培養濾液に W-315株を培養するという2段階培養により抗生物質の生産を行った。この濾液中には抗生物質の生産を促進する代謝産物の存在が推定された。そこで本濾液を系統的に分析し、次のことが明らかとなった。即ち、赤パンかびは培地中の蔗糖をそのインベルターゼでぶどう糖と果糖に分解し、果糖をより優先的に利用する。そのため培地中の糖組成はほぼぶどう糖80%、果糖20%となり、W-315株はこのぶどう糖を主に利用して ENX を生産していた。さらに微量産物としてのりんご酸等の有機酸も ENX 生産に関与していることも示された。以上の結果を参考に新たな組成の培地を作り、1段階培養での ENX 生産に成功した。但し、新しい培地中では、先述の塩素原子が1個のみの同族体も生産されたことにより、まだ解明されるべき要因があるのかもしれない。

4. ENX 生合成に関する酸化酵素¹²⁾

ENX 生産培養において、菌体外に生産される ENX は、培養の前半は ENX IVa が、後半は ENX IIa が量的に主たる成分である。両者の構造上の相違は15'位の酸化状態が異なるだけであり、脱水素反応の関与が考えられた。そこで Fig.2 に示すように、ENX 生産培養中期の培養液から、遠心分離により菌体を除いた上清を、冷所(5°C)に保存し、HPLC を用いて経時的に3時間 ENX の変化を追跡定量したところ、ENX IVa は速やかに減少し、ENX IIa は急激に増加したが、両者の和は完全に一定に保たれていた。上清を90°C、2分加温するとこの反応は完全に停止した。これは培養上清中に存在する脱水素活性を示す酵素(脱水素酵素あるいは酸化酵素)による反応であり、ENX IVa が ENX IIa に化学量論的に変化したことを意味する(30°Cではいくつかの副反応が見られ、化学量論的には進行しない。ただし、精製された酵素では、これらの副反応は見られない)。この反応には分子状酸素が電子受容体として利用され、カルボニル試薬で阻害されることより、PQQ (Pyrroloquinoline quinone) またはその類似の活性をもつ物質を補酵素とする quinoprotein¹³⁾ に属す酵素であることが示された。本酵素は73 kDa の蛋白質であるが、精製するに従い高分子状態へと会合する性質を示した。本酵素は上記の性質より酸化酵素とされ、ENX oxidase と命名された。培養の

各時期を通じて、その菌体を破碎しても、ENX oxidase 活性は破碎液中には検出されないことより、菌体外に分泌される際にプロセッシングされて活性化する分泌酵素であると考えられた。

quinoprotein に属する酵素は多数報告されているが、いずれも膜結合性、あるいはごく僅かに細胞質中に存在するが、分泌酵素は1例もなく、ENX oxidase が最初の菌体外 quinoprotein である。菌体外で最も活性の強い抗生物質 (ENX IIa) を生合成する新しいタイプの quinoprotein と思われるが、何らかの理由により ENX を生産しなかった培養では、本酵素活性も検出されないことより、ENX の生産に必須の働きをしているものと考えられる。

おわりに

抗生物質の生産については報告例のない *Frateuria* 属細菌が生産した新しいタイプのポリエン抗生物質 Enacyloxin は、構造、作用機作のみならず、生合成(その最終段階が菌体外酵素の酸化作用による)の面でも、大変興味ある課題を提供してくれた。更に、新しい補酵素の存在も推定されており、これらの諸問題に対して取り組みを進めながら Enacyloxin とは何かという疑問に迫りたいと考えている。

参考文献

- 1) T. Watanabe, K. Izaki & H. Takahashi: *J. Antibiotics*, **35**, 1141 (1982).
- 2) T. Watanabe, T. Sugiyama, M. Takahashi, J. Shima, K. Yamashita, K. Izaki, K. Furihata & H. Seto: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 259 (1990).
- 3) T. Watanabe, T. Sugiyama, M. Takahashi, J. Shima, K. Yamashita, K. Izaki, K. Furihata & H. Seto: *J. Antibiotics*, **45**, 470 (1990).
- 4) T. Watanabe, T. Suzuki & K. Izaki: *J. Antibiotics*, **44**, 1457 (1991).
- 5) T. Watanabe, N. Okubo, T. Suzuki & K. Izaki: *J. Antibiotics*, **45**, 572 (1992).
- 6) I. Haupt, E. Schuhmann, R. Geuther & H. Thrum: *J. Antibiotics*, **29**, 44 (1976).
- 7) T. Watanabe, K. Izaki & H. Takahashi: *J. Antibiotics*, **35**, 1148 (1982).
- 8) T. Watanabe, T. Sugiyama, K. Chino, T. Suzuki, S. Wakabayashi, H. Hayashi, R.

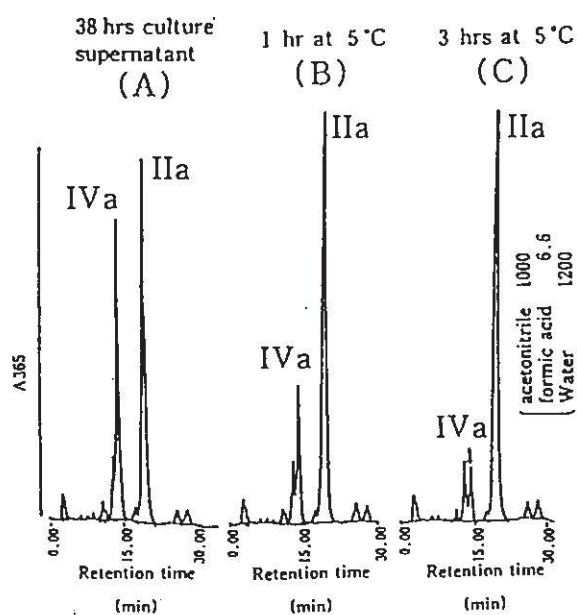


Fig.2 エナシロキシンIVaのIIaへの変化

- Itami, J. Shima & K. Izaki : *J. Antibiotics*, **45**, 476 (1992).
- 9) T.Watanabe, T. Sugiyama & K. Izaki : *J. Antibiotics*, **47**, 496 (1994).
- 10) 植村定治郎, “酵素と微生物の代謝”, 酵素研究法, 第1巻, 朝倉書店, 東京, p. V (1955)
- 11) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) Vol. 1 p. 219.
- 12) R. Oyama, T. Watanabe, H. Hanzawa, T. Sugiyama & K. Izaki : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1914 (1994).
- 13) J.A. Duine, J. Jr. Frank and J.K. Van Zeeland : *FEBS Lett.*, 1979, 443.