

綜 説

微生物の Isoprenoid

田 中 正 三*

Isoprenoids of Microorganisms

Shozo Tanaka

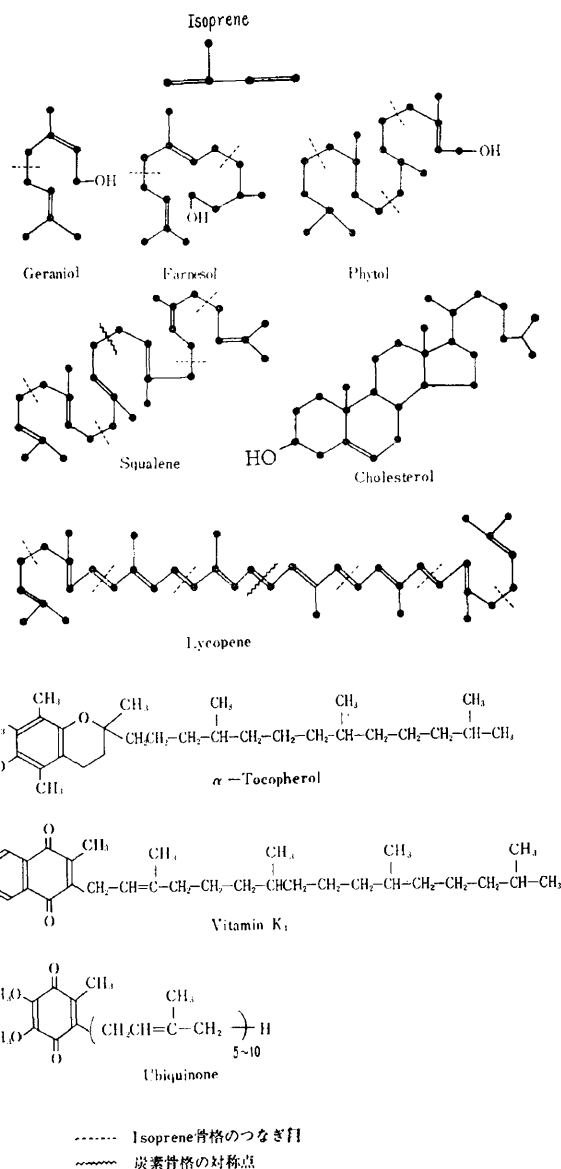
Isoprenoid とは生物界に広く分布している Isoprene (C_5H_8) の重合した形の炭素骨格をもった化合物の総称であり、第1表のように炭素数からいくつかのグループに群別されている。

第1表 Isoprenoidの分類

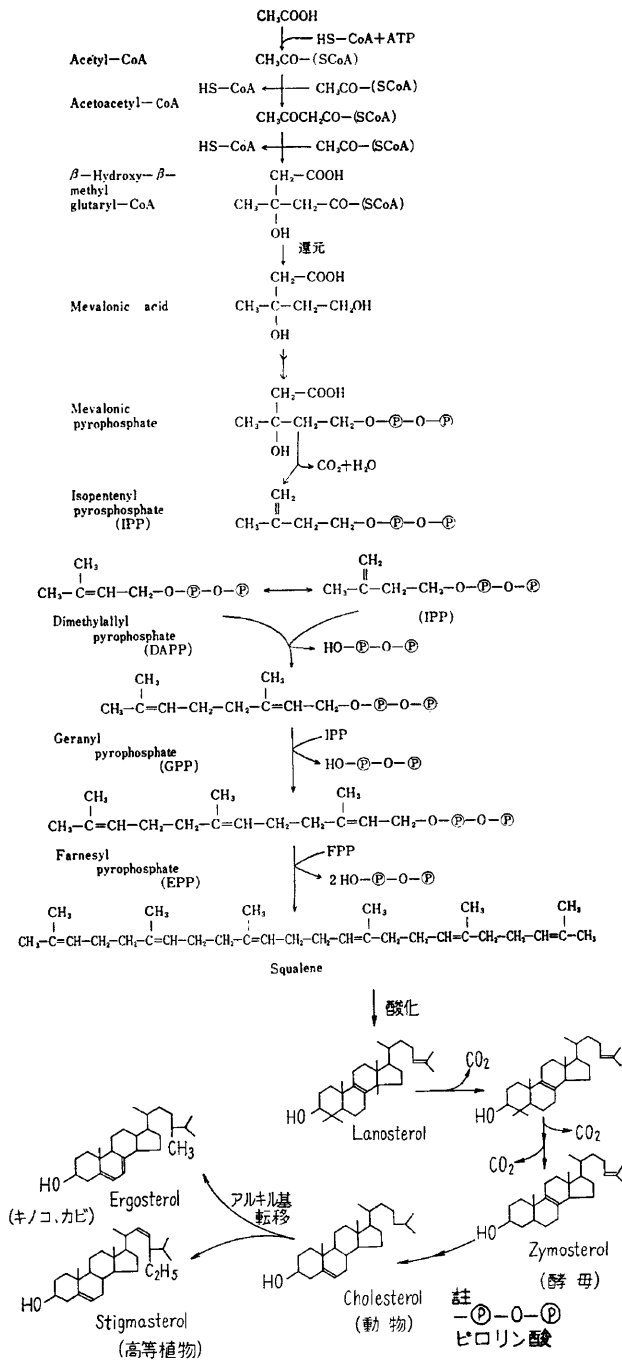
群名	Cの数	例	分布
Monoterpene	C_{10}	Geraniol, Menthol	高等植物
Sesquiterpene	C_{15}	Farnesol, Santonin	主として高等植物 広く生物界に分布
Diterpene	C_{20}	Phytol, Gibberelline	
Triterpene	C_{30}	Squalene, Sapogenin	
(Sterol)	$C_{27} \sim C_{30}$	Cholesterol など	
Tetraterpene (Carotenoid)	C_{40}	Lycopene, Carotenes	広く生物界に分布
Polyterpene	$(C_5)_n$	Natural rubber	高等植物

このうち $C_{10} \sim C_{20}$ のものは高等植物の香気成分として、また、樹脂や駆虫剤に利用されている Santonin, 植物ホルモンの Gibberelline などの形で産出し、 C_{30} のものはサメ肝油の Squalene やサポニンの Aglycon としてみつかるとして、Squalene からは Cholesterol (C_{27}), Ergosterol (C_{28}), Stigmasterol (C_{29}) などの Sterol 類ができ、さらに、Sterol が副腎皮質ホルモンや性ホルモン、ビタミンDなどに变化することは衆知の事実である。 C_{40} の Isoprenoid は Carotenoid と呼ばれ、脂溶性の生体色素の代表的なもので、その中の β -Carotene や Cryptoxanthine などはビタミンAのプロビタミンであることもよく知られている。また、天然ゴムやグッタペルカはその分子量が数千に及ぶ高分子の Isoprenoid である。これら

*本学生物化学研究室



第1図 Isoprenoid のいろいろ



第2図 Sterols の生合成過程

の化合物のほかに、Chlorophyllには C₂₀の Phytol がエステル結合しているし、ビタミンE, ビタミンK, Ubiquinone などの微量作用物質にはいずれも (C₅)₄₋₁₀ のポリイソプレン側鎖があるから、Isoprenoid に準ずる物質とみることができよう。

第1図に示すように、これらの物質には化学構造に共通性があるから、生体内では同様の過程を通して合成されていると推測される。現在すべての Isoprenoid の生合成機構が判明したわけではないが、Cholesterol¹⁾ については肝や酵母の酵素を用いてその全合成機構が

明らかにされており、その研究成果に対して K. Bloch および F. Lynen の両氏に1964年度のノーベル賞が授賞されている。

第2図は Cholesterol 生合成の全過程を示したもので、出発物質となる酢酸は Acetyl-CoA の形に活性化されてから3分子が縮合して Mevalonic acid と呼ぶ C₆ の有機酸になり、これが活性化されてから脱炭酸されて、はじめて C₅ のイソプレン骨格をもった Isopentenyl pyrophosphate になる。以下この化合物とこれの異性化で生じる Dimethylallyl pyrophosphate との縮合で C₁₀ の Geranyl pyrophosphate ができ、つづいて類似反応の繰返して C₁₅ の Farnesyl pyrophosphate, C₃₀ の Squalene と変化は進行する。そして、Squalene が特異の環化酵素によって酸化されて Steroid 特有の多環式炭素環をもつ Lanosterol になってからメチル基の離脱や導入が行なわれて、それぞれの生物に特有の Sterol ができる。

他の Isoprenoid については、Steroid ほど詳細な報告はないが Mevalonic acid を中間体として活性酢酸からできることが判明している。

このように単量体ともみられる Isopentenyl pyrophosphate の重縮合で高分子の Isoprenoid が生成する際には2種の形式の脱ピロリン酸縮合が認められる。すなわち、1分子のピロリン酸離脱で単量体が Tail-to-head の縮合をおこす場合と、2分子のピロリン酸が同時にはずれて Tail-to-tail の縮合がおこるケースとである。前者では同じ反応の繰返して炭素鎖は C₅ ずつ伸びるが、後者では反応停止がおこる。

Ubiquinone の側鎖や天然ゴムができる時はおもに前者の反応の反復により、Carotenoid や Triterpene ができる時は後者で重合がストップして C₄₀ や C₃₀ の化合物になる。どの生物でも、それがもっている Isoprenoid の構造から推測して、Tail-to-head の縮合を行なう酵素も反応停止の縮合を触媒する酵素も存在していると思われるのに、第1表に示したように Isoprenoid のパターンには生物の種類によって著しいちがいがある。もう少し問題をしばって微生物や藻類に限ってみると、第2表、第3表、第4表および第5表に示すように Sterol は糸状菌や酵母まで分布しているが細菌のような分裂菌類には含まれていないが、これより分子量の大きい Carotenoid は広く細菌植物門にまで分布している。

形態分類学で Procarvate と呼ばれるものは、膜構造のある細胞顆粒をもたないものを指すが、Sterol を含まぬ微生物はみなこの分類に入るものであることは

第2表 微生物藻類と Sterol

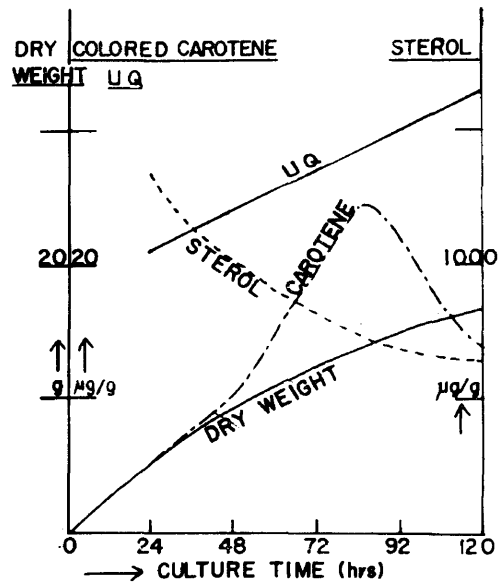
Procarvayotes	Sterol	
	分布	要求
Esherichia coli	-	-
Azotobacter chroococcum	-	-
Rhodospirillum rubrum	-	-
Actinomycetes	-	-
Pseudomonas testosteroni	-	-
Anacystis nidulans	-	-
Anabena variabilis	-	-
Nostoc muscorum	-	-
Eucaryotes		
紅藻	+	+
酵母	+	+
糸状菌	+	+
Trichomonas	+	+
Tetrahymena	+	+

第3表 微生物の Ubiquinone と Vitamin K

微生物	Ubiquinone (μ moles/g.dry wt.)	Vitamin K ₂
Bacillus subtilis	<0.001	0.7
Lactobacillus casei	〃	<0.001
Staphylococcus albus (好)	〃	1.4
〃 (嫌)	〃	<0.01
Clostridium sporogenes	〃	<0.001
Escherichia coli (好)	0.41	0.32
〃 (嫌)	0.40	0.28
Proteus vulgaris (好)	0.67	0.62
〃 (嫌)	0.61	0.51
Pseudomonas aeruginosa (好)	1.59	<0.03
〃 (嫌)	1.57	<0.03

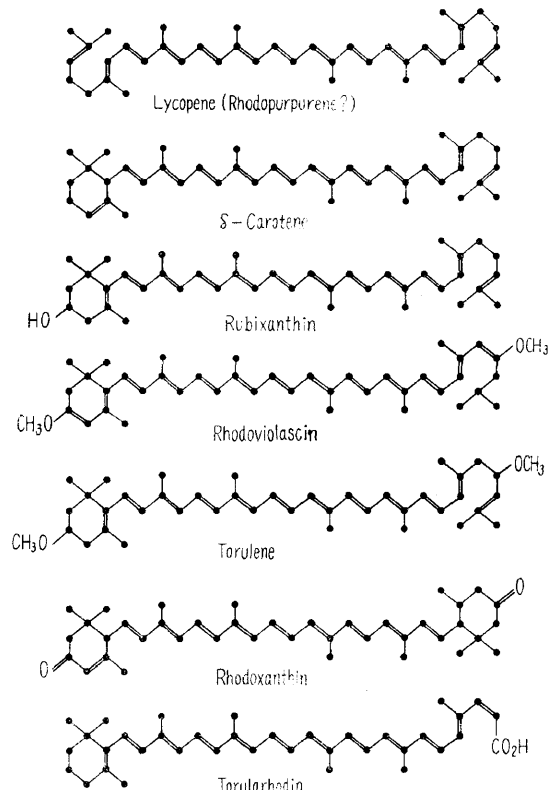
注 (好) は好気培養
(嫌) は嫌気培養

注目に値する。膜構造のある細胞核、ミトコンドリア、小胞体、葉緑体などが認められる Eucaryote に属する生物では、Sterol がおもに膜の構成成分として発見され、また、これらの細胞顆粒が細胞呼吸や光合成のような多酵素系で営まれている機能の特徴として、Sterol 類の演じている役割やその分布におぼろげながらの理由づけができるようである。明らかに細胞呼吸の酵素系に入っていることが判明している Ubiquinone やビタミン K₂ の含量が、グラム陰性菌と陽性菌とで著しく異ったり、同一細菌でも好気培養と嫌気培養のちがいで変動すること



第3図 Sporobolomyces shibatanus の生育にともなう Isoprenoid の消長

を認めた報告(第3表)や、酵母の Sporobolomyces が生育中に生理作用の変化にともなう Isoprenoid の質と量とに激しい変動をおこすことを認めた筆者らの研究(第3図)は、前記の Sterol と Carotenoid の分布などと共に、生物の発生や進化などの重要な生物



第4図 微生物の Carotenoid

学の問題に生化学的立場からの知見を加える糸口になるように思われる。

Isoprenoid のうちもっとも広く微生物界に分布している Carotenoid は第4表と第5表に示すように菌種によってそのパターンが著しく相異なる。概して真菌に属する藻菌, 子囊菌, 担子菌の類は多種の Carotenoid を含むが, 細菌は数が少ない。また, 微生物には高等生物のもつ Carotenoid のほかに Torulene や

Rhodoviolascin の様にメトキシ基をもつ Xanthophyll や不飽和度の低い微生物特有の Carotenoid が発見されている。(第4図)

Carotenoid の生成に際しても, 第2図における Squalene の生成と同様に, 2分子の Geranylgeranyl pyrophosphate の Tail-to-tail の縮合が行なわれて C₄₀ の炭素骨格ができるとすると, Squalene に対応する化学構造の炭化水素は Lycopersene であるが,

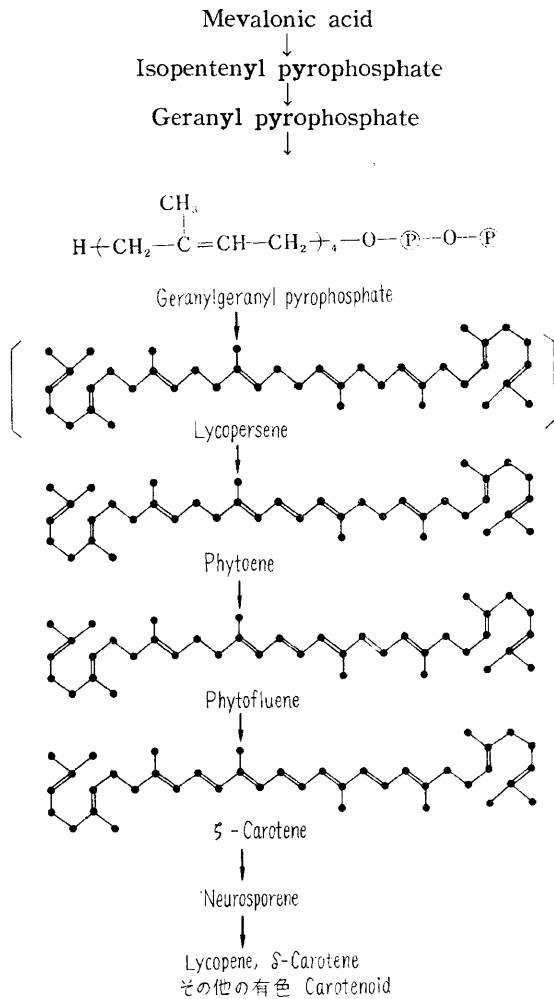
第4表 糸状菌における Carotenoid 分布

	α -Carotene	β -	γ -	δ -	ζ -	Lycopene	Neurosporene	Phytofluene*	Phytoene*	Torulene	Rubixanthin	Rhodoviolascin	Rhodoplins	Rhodopurpurene	Torularhodin
<i>Aleuria aurantia</i>	+	+													
<i>Allomyces arbuscula</i>				+											
<i>Allomyces javanicus</i>			+	+											
<i>Allomyces macrogyna</i>				+											
<i>Allomyces moniliformis</i>				+											
<i>Cantharellus cibarices</i>	+	+	+	+		+									
<i>Cantharellus cinnabarinus</i>		+							+						
<i>Cantharellus infunclibiliformis</i>							+	?							
<i>Cantharellus lutescens</i>						+									
<i>Coleosporium senecionis</i>	+		+								+	+			
<i>Dacromyces stillantus</i>		+	+						+	+	+				
<i>Gymnosporangium juniperivirgariana</i>	+	+	+												
<i>Lycogola epidendron</i>											+	+			
<i>Neurospora crassa</i>	+	+	+			+	+	+				+	+	+	
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	+	+	+			+	+	+	+	+					
<i>Pilobolus kleinii</i>		+													
<i>Polystigma rubrum</i>														+	
<i>Puccinia coronifera</i>	+	+	+												+
<i>Rhodotolura rubra</i>	+	+				?	?	+		+					+
<i>Rhodotolura sanniei</i>		+								+					+
<i>Sporobolomyces roseus</i>		+								+					
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>		+								+					
<i>Tremella mesenterica</i>		+													

注 *印は無色の Carotenoid

第5表 細菌における Carotenoid 分布

	α -Carotene	β -	γ -	δ -	Lycopene	Corralin	Leptotene	Rhodopin	Capsanthin	Astaxanthin	Cryptoxanthin	Lutein	Rhodoviolascin	Rhodopurpurene	Rhodovibrin	Flavorhodene	Zeaxanthin	Sarcinene	Sarcinoxanthin	Rubixanthin	Rhodoxanthin	α -Bacteropurpurene	β -
<i>Bacillus grasberger</i>	+	+	+	+					?														
<i>B. lombardopellegrimi</i>	+	+																					
<i>Bacterium halobium</i>																							+(+)
<i>B. mycoides</i>								+															
<i>B. rubescens</i>																							+ +
<i>Chromatium okenii</i>																							+
<i>Corynebacterium</i> spp.	+																						
<i>C. carotenii</i>	+																						
<i>Flavobacterium arborescens</i>																			+				
<i>Micrococcus erythromyxa</i>											?												
<i>M. rhodochrous</i>											+												
<i>M. tetragenus</i>			+	+								+									+	+	
<i>Mycobacterium bruynoghe</i>							+																
<i>My. lacticola</i>	+									+													
<i>My. leprae</i>							+																
<i>My. phlei</i>	+	+	+				+					+	+										
<i>My. tuberculosis</i>	?						?																
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	+														?	+	+						
<i>Rhodovibrio</i> spp.	?								+						+	+	+	+					
<i>Rhodospirillum rubrum</i>															+								
<i>Sarcina aurantica</i>	+				?														+				
<i>S. lutena</i>																					+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>				+															+				+
<i>Streptothrix corallinus</i>						+																	
<i>Thiocystis</i> spp.	+	+			+		+								+	+	+	+					



第5図 Carotenoid 生合成の推定経路

これには賛否両論⁸⁾があり、これより2重結合の1つ多い Phytoene 説が強い。Phytoene は第4表にもみられるように多くの微生物にも、また、トマトその他の高等植物にも発見されている無色の炭化水素である。そして *in vivo* の実験で Phytoene が酸化されて次第に共役二重結合の多い有色 Carotenoid に変化することが、トマトや *Rhodospirillum rubrum* やアカパンカビについて証明されていて、Carotenoid の生合成は第5図のような過程を通して行なわれることが推定されているが、まだ十分の確証がえられていない。かつての筆者の研究室で *Staphylococcus aureus* や *Sporobolomyces* からの酵素標品を用いて、Mevalonic acid から Phytoene の生成および Phytoene の δ -Carotene や Rubixanthin への転換に成功したが、これは第5図の過程の確証を1歩前進させたものといえよう。¹⁰⁾

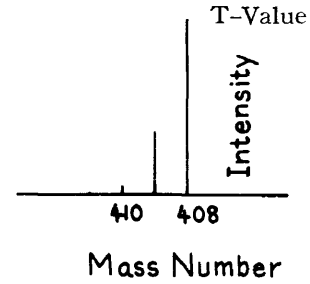
さきに Procaryotic な細菌には Sterol が含まれて

いないことを述べたが、それでは細菌は C₄₀ の化合物はつくるが C₃₀ の Isoprenoid は全然合成しないのであろうか。これはかなり以前から筆者が抱いていた

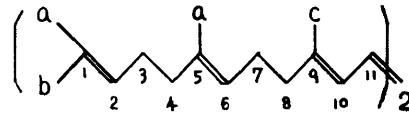
第6表 Bacterial Phytoene の分子量

(1) Rast Method	(3) Mass Spectrography
402	
Kf 39.4	
Sample 0.20 mg	
Camphor 1.69 mg	
Depression 11.4°C	

(2) Vapor Pressure	
Osmometer method	
402	



NMR

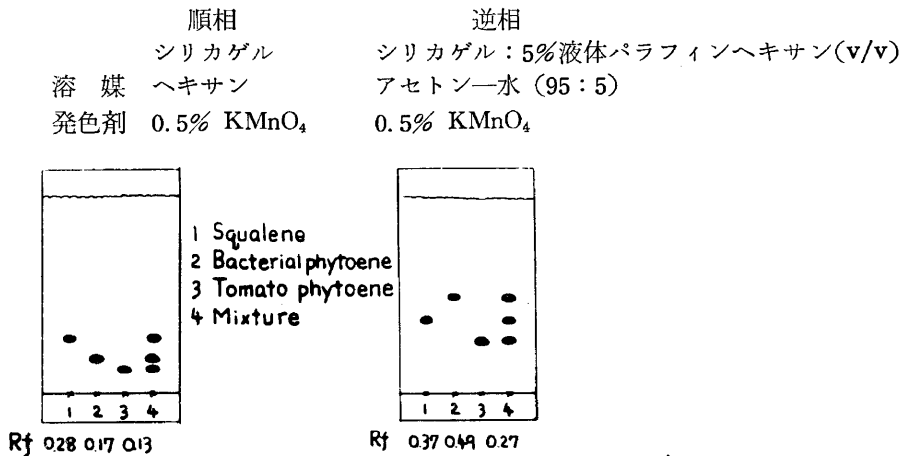


T-Value	水素の性質	水素数		
		Tomato phytoene	Bacterial phytoene	Dehydro squalene
3.91	(b)	2	2.0	2
4.00	(b)	2	2.0	2
4.97	(b)	6	4.0	4
7.90-8.07	(m)	24	16.5	16
8.28	(s)	6	6.0	6
8.34	(s)	6	6.0	6
8.41	(s)	18	12.2	12
		64		48

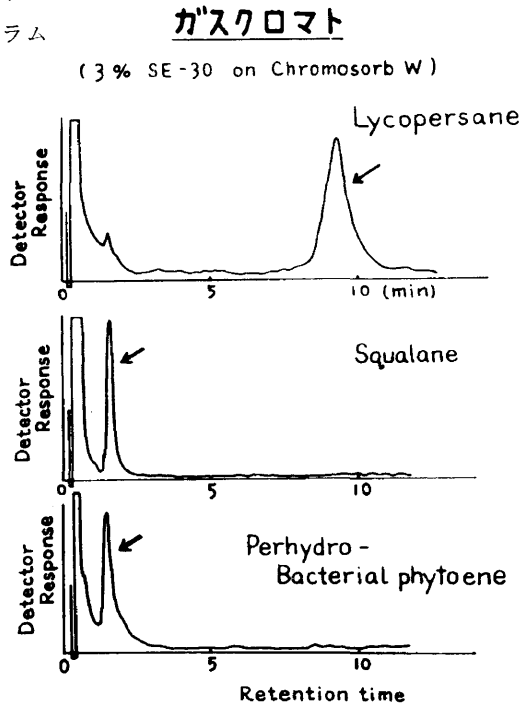
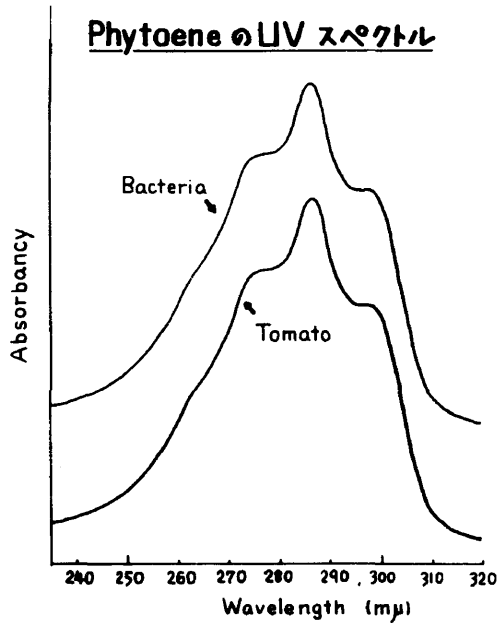
第7表 Bacterial phytoene の有色 Carotenoid への変化

pH	気相	有色 Carotenoid (456m μ)
6.0	空気	216 cpm
	N ₂	48
6.5	空気	231
	N ₂	53
7.0	空気	57
	N ₂	41

System : Buffer 100 μ moles
Tween 20 5 mg
Enzyme solution 0.8ml (protein 39mg/ml)
C¹⁴ Bacterial phytoene 2070 cpm
(Absorbancy 0.880 at 286 m μ)
total volume 1.0 ml
shaking for 3 hrs at 37°



第6図 Phytoene の薄層クロマトグラム



第8表 *Sporobolomyces shibatanus* の Isoprenoid 生成に及ぼす DPA⁹ の影響

DPA 添加量	培養時間	成長量 (dry wt.)	Isoprenoid 含量(μg/g)			
			有色 Carotenoid	UQ	Sterol	Phytoene* (C ₃₀ +C ₄₀)
0	73hr	4.5 g	32.0	46.0	1262	6.2
2mg/250ml	73	5.4	0.5	26.2	698	43.0

(*DPA 1 mg/250 ml) ⁹ Diphenylamine

疑問であった。

Staphylococcus aureus は黄色ブドウ菌と呼ばれ美しい黄金色を呈しているが、この色は主に δ -Carotene と Rubixanthin によるものである。数年前筆者のいた研究室で鈴江は¹¹⁾この球菌の薬剤に対する耐性獲得機構の研究中に、Tetracycline に耐性を示す変異株の作

出に成功した。この耐性菌は原株と異なり真白い菌叢をつくり、みかけは Carotenoid を含んでいないようであったが、その脂質には新鮮菌体 100g 当り 12~15 mg に及ぶ多量の炭化水素が存在することがわかった。そこで、この炭化水素の追究が行なわれ紫外線スペクトルや赤外線スペクトルなどの測定結果などから一

応 Phytoene として報告されたが、その後トマトの Phytoene とは薄層クロマトで明瞭に区別されることや (第6図)¹²⁾、また完全に水素添加を行なった炭化水素のガスクロマトグラムが Perhydro-squalene と一致することがわかった。そして、質量分析機による分子¹³⁾量測定や NMR の測定の結果 (第6表) から、この炭化水素は C₃₀ のものであると判断し、Bacterial Phytoene として普通の Phytoene と区別することになった。このほかに、耐性菌には極めて微量であるが有色 Carotenoid が含まれていて、その吸収スペクトルは Neurosporene に酷似しているが、ガスクロその他では矢張り C₃₀ の化合物であるとの結果がえられ、また、この変異株によって C¹⁴-Mevalonic acid から生合成させた C¹⁴-Bacterial Phytoene を基質として、原株の酵素抽出液を使用して酸化を行なわせると、Phytoene と同様に Bacterial Phytoene も δ -Carotene に酷似した吸収スペクトルを示す色素に¹³⁾転換がおこることが確かめられた (第7表)。この Bacterial Phytoene から生成する色素は C₃₀ の Isoprenoid であることは、ほぼ確実であるが、これが変異株に特有のもので、いわば病的生産物であるのか、健全な原株にも微量でも含有されている正規の成分であるかの判定は今後の研究にまたなければならぬ。

Isoprenoid 生成への阻害物質である Diphenylamine を Sporobolomyces に作用させると Sterol や Carotenoid の生成が抑制されるとともに大量の Phytoene の蓄積がおこるが (第8表)、この Phytoene を精査するとこの中にも C₃₀ のものが混在しているから、条件によっては C₃₀ の Isoprenoid は Sterol へ転換しないで Triterpene 型の色素になる可能性があるようである。

これだけの事実をもって、Carotenoid に C₃₀ のものもあるとするのは危険であるが、少くとも液体クロマトグラフィーと吸収スペクトル測定だけを武器として行なわれてきている従来の Carotenoid の研究法に、ガスクロマトグラフィーと質量分析とは最少限加える必要があることを提唱したい。

文 献

- 1) Bloch, K., Proc. 4th Intern. Congress Biochem., (Vienna) vol. 4., 50, (1959)
Popják, G., Cornforth, J. W., Adv. Enzymol., **22**, 281 (1960)
Popják, G., Ann. Rev. Biochem., **27**, 533 (1958)
Lynen, F., Eggerer, H., Henning, H., Kessel, H., Angew. Chem., **70**, 739 (1958) Ibid., **71**, 657 (1959) など
- 2) Birch, A. J., "Biosynthesis of Terpenes and Sterols" in Ciba Foundation Symposium. 245 (1959)
Sandermann, W., "Comperative Biochemistry" Vol. 3, 591 (1962)
Nicholas, H. J., J.B.C., **247**, 1485 (1962) Richards, J.H., Hendrickson, J.B., "Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins" 205 (Benjamin, New York, 1964)
- 3) Bloch, K., "Lipid Patterns in the Evolution of Organism" in Rutgers Univ. Symposium. 53 (1963)
- 4) Bishop, D.H.L., Pandya, K. P., King, H.K., Biochem. J., **83**, 606 (1962)
- 5) Goodwin, T., "The Comperative Biochemistry of Carotenoids" 108 (Chapmann, Hill, London, 1952)
- 6) Goodwin, T., Ibid.
- 7) Kakutani, Y., Tanaka, S., unpublished
- 8) Cornforth, J. W., Tetrahedron Letters, **19**, 29 (1959)
Rilling, H., B.B.A., **65**, 156 (1962)
Grob, E. C., Boschetti, A., Chimia, **16**, 15 (1962)
Goodwin, T., "The Biosynthesis of Vitamins and Related Compounds" 294 (Academic Press, London, 1963)
- 9) Grob, E. C., Batler, R., Helv. Chim. Acta, **39**, 1975 (1956)
Haxo, F., Arch. Biochem. Biophys. **70**, 400 (1957)
- 10) Suzue, G., Tanaka, S., Science, **129**, 1359 (1959)
Suzue, G., Arch. Biochem. Biophys., **88**, 180 (1960)
- 11) Suzue, G., B.B.A., **45**, 616 (1960)
Suzue, G., J. Biochem. (Japan), **51**, 246 (1962)
Ohnoki, S., Suzue, G., Tanaka, S., Ibid., **52**, 423 (1963)
Kakutani, Y., Suzue, G., Tanaka, S., Ibid., **56**, 195 (1964)
- 12) Suzue, G., Tsukada, Y., Tanaka, S., unpublished
- 13) Suzue, G., B.B.A., **50**, 593 (1961)
- 14) Kakutani, Y., J. Biochem. (Japan), **59**, 135 (1966)