

日本における応用微生物学の展開 ——代謝生産物を中心に

京都大学農学部 山田 秀明

周知のように、微生物学が生まれたのは欧州においてであり、17世紀から19世紀にかけてのレーベンフックによる最初の微生物の顕微鏡観察、パスツールによる微生物の生命現象としての“発酵”の発見、さらにブレフェルド、リスター、コッホらによる微生物の純粋培養技術の確立、等々の偉大なる研究業績の積み重ねのなかから、応用微生物学は体系づけられてきた。この応用微生物学が日本で導入されたのは明治の後半であって、ドイツから来日したケルネル、ロイブの両博士が駒場農学校で、微生物化学の講義を開始し、また日本酒の醸造に化学的メスを入れたのが始まりである。その後、日本各地の大学に応用微生物学の研究室が設置され、今日見られる発酵に関する研究と教育の基盤が作られた。わが国における応用微生物学の誕生は、それほど遠い昔のことではない。

このように、日本の応用微生物学は欧米に比べてはるかに遅れて開始された。にもかかわらず、その後の発展は誠に目覚ましいものがあり、今日では科学、技術、産業のいずれの面においても世界各国をリードし、ある意味では他国の追従を許さぬようになっている。

このような急速な発展の要因はどのようなところにあるのであろうか、よく言われることであるが「日本の風土が微生物の利用に適しており、古くからその取扱いに習熟していた」、あるいは「微生物資源の高度利用、すなわち資源のない日本の不利な状況を克服しようとした多くの研究者の努力があった」、などである。このような要因のほかに、日本の応用微生物学には、日本人独特の“芸術”ともいえる感覚が生きているように思えるのである。中国に古くから“芸に遊ぶ”という言葉があるが、日本で伝統的にはぐくまれた味噌、醤油、清酒、味りん、納豆などには、西欧にはない味、香り、色、姿、さらに栄養など、総合的に“芸術”を感じるものがある。しかもこれらの主役となっている主成分は、いずれも微

生物代謝生産物であって、それらはさらに戦後の日本の応用微生物学の展開における代表的な産物となっている。このように長い歴史を経て今日に至るまでの日本の微生物利用技術には、一貫して他に見られない独特な感覚が伝わっており、この感覚こそが、今日の日本の応用微生物学の発展の、もう一つの要因となっているのである。

前述のように、日本の伝統的な発酵醸造技術の上に欧州の応用微生物学が導入され、日本酒などを中心に科学的なメスが入られ、さらに微生物の純粋培養や増殖管理が可能となった。そしてアルコール発酵、ビール醸造、アセトン・ブタノール発酵などの研究が進んだ。これが第二次世界大戦以前の状況であって、技術的特徴としては、発酵タンクに空気を送入することなく静置状態での培養が行われたことである。

第二次世界大戦以降、日本の応用微生物学は大きく躍進したが、そのきっかけとなったのが、当時のGHQがもたらしたペニシリンの製造開発研究である。当時大学および多くの企業がこの製造研究に取り組み、製造技術を確認した。このペニシリン製造の研究と技術は、その後の微生物による物質生産研究に、大きな広がりとなり、はかり知れないポテンシャルを与えたのである。たとえば微生物のスクリーニングと変異改良の重要性が認識され、また従来の静置培養に加えて通気攪拌培養という新しい技術が導入された。また従来化学的合成法のみであった医薬品の開発生産に、微生物の機能を利用する契機を与えたことなどである。

表1には、第二次世界大戦前後から現在に至るまでを大別して、戦前、戦後、高度成長期、そして現在とし、それぞれの時期における技術開発の動向と、代表的な微生物代謝生産物の例をまとめてみた。いうまでもなく技術は単発的なものでなく、連続的かつ総合的に生まれ、

表 1

年代(年)	時代	科学技術動向	主な代謝生産物
昭 20	[戦 前] (微生物学)	表面培養 静置培養	有機酸, ジペレリン アセトン・ブタノール
	[戦 後] (代謝生化学) (微生物遺伝学)	通気攪拌培養	(ペニシリン)
30	[高度成長期] (酵素学)	スクリーニング 生化学的変異株 アナログ耐性株	抗生物質 アミノ酸, 核酸関連物質 補酵素
40		酵素探索	酵素阻害剤
50	(微生物生態学)	微生物合成 微生物変換 原料探索	天然型および非天然型 アミノ酸
60		石油微生物 C ₁ -微生物	長鎖脂肪酸ジカルボン酸 アクリルアミド, コーエンチーム Q ₁₀
	[現 在] (分子生物学)	組換え DNA 細胞融合 バイオマス バイオリアクター	インターフェロン インターロイキン II, ワクチン バイオマスアルコール

展開するものであって、この表からも理解できるように、過去から今日に至る技術的蓄積の上に、さらに将来の新しい技術が発展、展開し、そこに新しい代謝生産物の発見が期待されるのである。

地球上に棲息する微生物の種類と数は無限といつてよく、たとえば1グラムの土壌中には約 10⁸ の細菌、約 10⁷ の放線菌、約 10⁶ のカビが存在するといわれている。また 1,000 m² の地表には 500 kg の微生物がいるといわれている。これらの微生物のなかで、人間によって分類されているものは、わずかに約 10⁵ 種以下である。高山から深海まで、また 100°C 近い温泉から極寒の地域まで、実にさまざまな環境のなかで、さまざまに適応しつつ、微生物はさまざまな物質を分解、代謝して増殖を続けている。よってわれわれ人間にとって未知の、無限の微生物が存在し、それらが産生する代謝生産物のなかには、人類に有用な、多くの新しい物質が残されているであろう。前述したような日本人のもつ独特の感覚で、今後も他に先んじてこれらを見出し、生産応用されることを期待したい。

以下に、主たる微生物代謝産物で、日本で研究開発されたもの、およびその周辺のものをご概観してみた。これらのほかにも多数の有用物質が報告され、また利用されているが、紙面の都合もあって、省いたものも多いこと

をお許し願いたい。

I. 有機酸

食酢、漬物、ヨーグルトなどの醸造食品の主役は酢酸、乳酸などであり、これらは歴史的に食用に供されてきた。それゆえ、有機酸は、アルコールとともに古くからなじみ深い微生物代謝産物であったといえよう。日本で伝統的に醸造に用いられてきたかびや細菌のなかに、今日優れた有機酸の生産菌であることが示されているものも少なくない。

戦前には、藪田らによりこうじ菌によるコウジ酸の生産とその構造決定が行われた。その後、クエン酸、イタコン酸、コハク酸、シュウ酸、ピルビン酸などの生産菌の採取や生産研究が盛んに行われ、さらに片桐、北原らによる乳酸発酵の研究が展開されている。戦前の研究は、前述のように、静置培養で行われたのに対して、戦後は好氣的な通気培養のものが多く、代謝生産物の種類も多く、また発酵収量も向上している。それらには、 α -ケトグルタール酸、2-または 5-ケトグルコン酸、アロイソクエン酸、リンゴ酸、などがある。さらに最近では、*n*-パラフィンの微生物利用の研究が盛んに行われ、酵母によるクエン酸の生産、また後述するように酵母の ω -酸化能を利用する長鎖ジカルボン酸(とくにブラシル酸)

の生産などの著名な成果がある。現在、有機酸の多くのものは化学的合成法でも製造されており、発酵法によるものは全体の約 1/3 くらいとされている。

II. 抗生物質

前述のように、肺炎の特効薬となったペニシリンの生産技術の導入は、日本の応用微生物学に測り知れないインパクトを与えた。その後、結核の特効薬としてのストレプトマイシン、さらにクロラムフェニコール、テトラサイクリンなどが相次いで発見され、抗生物質研究の全盛期を迎えた。新しい抗生物質の探索には日本人研究者も大きな役割を果たしている。

現在までに報告されている抗生物質の数は 2,000 以上といわれているが、そのなかで日本人の発見による代表的なものとして、梅沢らのカナマイシン、秦らのロイコマイシンがあり、さらにバリオマイシン、ジヨサマイシンなどがある。また日本において大きな成果をあげたものとして農薬用抗生物質の発見がある。すなわち水稻の病害、いもち病抗生物質として、カスガマイシン、ブラストサイジン S、紋枯病にきくポリオキシン、バリダマイシンなどが発見され、実用に供されている。

関連した重要な研究として、有馬らのペニシリン生産菌の変異改良研究、さらに坂口、村尾らによるペニシリンアジラーゼの発見と生成物 6-アミノペニシラン酸の研究があり、その後のペニシリンや半合成ペニシリンの工業的生産に顕著な貢献をなしている。

一方、上記の抗菌剤とは別に制ガン抗生物質についても広くスクリーニングが行われ、マイトマイシン C、ブレオマイシン、アクラシノマイシン、クロモマイシン、ネオカルチノスタチンなどの特徴的な機能を持つ物質が発見され、臨床的に活用されている。

さらに特徴的なものとして、大村らによる家畜の抗寄生虫抗生物質としてのアバメクチンの発見、あるいは田村(学造)らによる、糖脂質合成系を特異的に阻害するツカマイシンの発見がある。

最近においても多くの新しい構造と機能を持つ抗生物質が次々と発見されており、これらの探索研究は、無限の可能性を秘めた重要な分野であろう。

なお抗生物質の生産と関連して別府らは、先に Khokhlov が発見した A-ファクター、(2 S-isocapryloyl-3 S-hydroxymethyl- γ -butyrolactone)、が *Streptomyces griseus* によるストレプトマイシン生産、耐性、さらに形態分化を調節することを再確認するとともに、あらたに B-ファクター、(3'-(1-butylphosphoryl) adenosine)、を酵母抽出液中に発見し、この物質が *Nocardia* のリファ

マイシン生産をポジティブに調節することを明らかにしている。

III. アミノ酸

従来、アミノ酸は、大豆や小麦のタンパク質の酸加水分解法によって製造されていた。戦後間もなく、微生物でアミノ酸を生産しようという、日本人独特の発想と着眼によって研究が開始され、現在ではグリシンとメチオニンを除くすべての天然アミノ酸が微生物で生産されるに至っている。これらのアミノ酸発酵の端緒を開いたものは、いうまでもなく木下らのグルタミン酸発酵であって、昭和 32 年、糖よりグルタミン酸を直接生産する *Micrococcus glutamicus* を自然界より分離し、その後ただちに工業化することに成功した。

アミノ酸発酵に用いる細菌は、野生株を直接用いる方法と、突然変異処理によって得られる変異株を用いる方法に大別されるが、グルタミン酸生産株は前者であって、同様のものとしてアラニン、グルタミンなどの生産株が知られている。昭和 33~40 年、変異株、とくに生化学的変異株を利用するアミノ酸発酵が盛んに研究され、その成果として、リジン、オルニチン、プロリン、シトルリンなどの生産法が確立された。これらの変異株においてはアミノ酸代謝経路が遺伝的に閉鎖されており、したがって最終生産物であるアミノ酸によって受ける代謝調節機構が解除されているものである。続いて昭和 40 年ごろからアミノ酸アナログに対する耐性変異株を活用するアミノ酸発酵の研究が進展した。これらの変異株においては、代謝調節を受ける酵素、あるいは酵素系が增强されているか、あるいは脱感作されており、これらの株によってスレオニン、リジン、イソロイシン、バリン、ヒスチジン、アルギニン、プロリンなどの直接発酵が確立されている。

一方、上記の直接発酵法と前後して、アミノ酸の生合成前駆体を微生物酵素または酵素系によって変換し、目的とするアミノ酸を得る酵素法(微生物変換法)が開始され、フマル酸からアスパラギン酸、アスパラギン酸からアラニン、グリシンからセリンの生産法などが工業化されている。最近、この酵素法は化学的合成法とドッキングすることによって、多様な基質と多彩な微生物酵素を用いて幅広く展開されている。これらのなかには筆者らのフェノールとセリン(ピルビン酸)からのチロシン、ピロカテコールとセリン(ピルビン酸)からのドーパ、インドールとピルビン酸からのトリプトファン、さらに β -クロロアラニンを基質とする D-, または L-システインなどの生産研究がある。また DL-アミノカプロ

ラクタムからリジン，DL-アミノチアゾリンカルボン酸からのシステインの生産研究はすでに工業化されている。

非天然型のD型アミノ酸は，前述の半合成抗生物質の側鎖としてきわめて重要であるが，筆者らは微生物酵素ヒダントイナーゼ(ジヒドロピリミジナーゼ)がDL-5-置換ヒダントインに作用すると，D-N-カルバモイルアミノ酸を生成するという興味ある現象を見出し，この知見に基づいて新しいD-アミノ酸の酵素的製法を開発した。この酵素法は，協同研究者らによって昭和54年に工業化され製造プラントはシンガポールのジュロン工業地区に建設された。D-*α*-ヒドロキシフェニルグリシンは世界最大の規模で，さらにD-フェニルグリシン，D-バリンが製造されている。

さらに微生物酵素，あるいは酵素を含む微生物菌体の固定化技術が千畑らによって確立され，それらを用いるDL-アシルアミノ酸からのアミノ酸，アスパラギン酸，アラニンなどの製法が，世界で最初に工業化されている。

また微生物酵素によって，セレンを含むメチオニンやシステインの誘導体が合成され，その生物活性について関心が払われている。最近になって，組換えDNA技術，細胞融合などDNA関連技術がこの分野に取り入れられ，スレオニン，プロリン，トリプトファンなどのアミノ酸やグルタチオンの生産菌の改良に有効であることを示す研究報告が相次いでいる。これらの手法は，今後アミノ酸生産菌のみならず種々の生産菌の改良，造成に広く試みられ，有効な手段として発展することが期待されている。

IV. 核酸関連物質

核酸とその関連物質は，アミノ酸とともに日本の応用微生物学の代表的な生産物であって，この生産に関しては，いわば日本の独壇場となっている。核酸発酵が生まれる契機となった研究は，いうまでもなく，鰹節の呈味成分がイノシン酸であることを発見した小玉らの研究，さらに椎茸のそれがグアニル酸であり，これらの呈味力がグルタミン酸のそれと相乗的に強められることを見出した国中らの研究である。坂口，国中らおよび大村，緒方らは，それぞれ独立して，酵母のRNAを微生物酵素によって加水分解し，イノシン酸とグアニル酸を得る核酸分解法を確立し，いわゆる複合調味料という新商品の開発の基盤を作り上げた。

その後，この酵素分解法に代る方法として，細菌の突然変異株を用いる直接発酵法の研究が進展し，現在，

Bacillus subtilis の変異株を用いるイノシン，グアニンの発酵と，さらにこれを化学的方法によってリン酸化する方法，*Brevibacterium ammoniagenes* の変異株を用いるイノシン酸，グアニル酸の発酵法が確立され，実用化されている。

上記のヌクレオチド類の生産法が確立されるに伴って，多くの関連化合物の生産法に関する研究が進展し，またそれらの用途開発が種々の分野で検討されている。アデノシン，イノシン，ウリジン，シチジンなどのヌクレオチド，ATP，NAD，NADP，FAD，CoAなどの補酵素類の生産法が研究され，医薬やその原料として，生化学試薬として，あるいは最近の臨床診断などに利用されている。栃倉らは，酵母の発酵エネルギーを利用してUDPG，GDPMなどの糖ヌクレオチドや，CDP-コリンなど脂質合成の補酵素を生産する方法を開発している。また生体の活性メチルサイクルで重要な役割を演じているS-アデノシルメチオニンおよびS-アデノシルホモシステインの製法が確立され，医薬としての用途が検討されている。さらに細菌のヌクレオチドホスホリラーゼ反応を用いて，抗ウイルス剤であるアデニンアラビノシドを製造する方法も確立されている。

これらの生産研究は，いずれも酵素学，代謝および合成化学，分子生物学などの基礎研究を基盤にして，さらに培養や単離精製の技術を駆使して行われたものであり，ここにも今日の日本の応用微生物学の独特の領域と成果を知ることができる。

V. 生理活性物質

1. ステロイド

ステロイドは，副腎皮質ホルモン(コルチコイド)，利尿降圧剤，性ホルモンなど医薬として大きな市場があり，従来は植物，動物のステロールを原料として，化学的方法で製造されてきた。昭和20年代に，主として米国を中心に微生物による変換法の研究が進み，大きな成果を収めた。すなわち，微生物はステロイドに作用して水酸化，脱水素を含む多種多様な反応を触媒し，これらのうちいくつかは工業的意味で利用されている。日本においても有馬らは，性ホルモンの合成原料となる中間体ADD(アンドロスタ-1,4-ジエン-3,17-ジオン)および4AD(アンドロスタ-4-エン-3,17-ジオン)を，*Arthrobacter simplex*を用いるコレステロールの側鎖切断反応によって生産する方法を開発し，本菌を鉄のキレート剤の存在下で作用せしめる反応条件を確立した。その後，放線菌などの変異株を用いるADD，4ADの製法が開発され，工業化されている。

2. ビタミン

ビタミン類も重要な微生物生産物であり、日本においては戦前に高田らによって生産菌 *Eremothecium ashbii* が発見され、ビタミン B₂ が生産された。戦後から今日に至るまで、細菌の変異株や酵母を用いるビタミン B₂ およびその前駆体、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、ビオチン、パントテン酸、ビタミン K、CoQ、エルゴステロールなどの生産が検討されてきた。それらのなかで、放線菌によるビタミン B₁₂ あるいはメタノール資化性菌による CoQ などはすでに実用化されている。最近、微生物のある種の脱水素酵素や、動・植・微生物のアミノ酸化酵素などの補欠分子族がピロロキノリンキノン (PQQ) であることが明らかにされ、この化合物の発酵生産についても検討が進められている。

また γ -リノレン酸(ビタミン F)、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)などの高度不飽和脂肪酸は、プロスタグランジンの中間体として、医薬品としての用途開発が進められている。これらを微生物で生産する研究が盛んであり、*Mortierella*、*Conidiobolus* などが著量の γ -リノレン酸、あるいはアラキドン酸や EPA を菌体内に蓄積することが報告されている。

3. ヒト関連のペプチド生理活性物質

近年、大腸菌を対象とする分子生物学的研究の成果として、組換え DNA 技術が確立され、微生物生産研究にも新しいインパクトを及ぼすに至っている。この手法の詳細は別項(微生物学、遺伝・育種)にゆずるが、米国で開発され、ヒトの遺伝子を大腸菌などで発現させるものであって、代表的な例としてソマトスタチン、ヒトインシュリン、ヒト成長ホルモンなどがあり、後二者はすでに医薬として商品化されている。日本においてもこの手法は活発に研究され、ヒトの β -および γ -インターフェロン、インターロイキン 2、セクレチンなどの大腸菌による生産、肝炎ウイルスワクチンの酵母による生産など世界が注目する成果が発表されている。この手法は生理活性物質のみならず酵素についても有効であり、仔ウシの凝乳酵素の大腸菌による生産などが著名である。

4. 酵素阻害剤

酵素阻害剤は、酵素の作用機作や生体内の働きの解明に有効であり、生理機能や病気の診断にも役立ち、さらに将来の治療薬としても期待されている。微生物の生産する酵素阻害剤としては、プロテアーゼ阻害剤としての SP-I、ペプスタチン、S-SI、プラスミノストレプチン、ペプチダーゼ阻害剤としてのベスタチン、アミラーゼ阻害剤としての S-AI、さらにトランスアミナーゼ(GOT)の阻害剤としてのゴースタチンなどがよく知られ作用機

作や医療への応用についての知見が蓄積しつつある。

5. 植物生長調整物質

稲の馬鹿苗病菌 *Gibberella fujikuroi* の生産するジベレリンは、植物生長調整物質として見出され、藪田、住木、田村(三郎)らによって単離され、構造が決定された。現在、分離技術の進歩により高等植物などからも数多くのジベレリン類縁物質が単離されており、種なしブドウの育成など園芸の面で広く使用されている。そのほかカビを中心とする植物病原菌が高等植物に対して興味ある生理活性を示す種々の代謝産物を生産することが報告されているが、これらに関しては別項(生理活性物質)にゆずることとする。

VI. 微生物多糖類

グルカン、レバン、デキストラン、キサンタンなどの多糖が微生物によって生産され、これらは医薬、食品添加用、工業用への用途開発が盛んである。原田らは *Alcaligenes faecalis* がサクシノグルカンやカードラン(β -1,3-グルカン)を著量に生産することを見出し、それらの構造を明らかにするとともに、とくに後者について抗腫瘍性の面から医薬としての応用を検討している。

一方、シイタケやエノキタケなどの食用担子菌の抽出液中の多糖に抗腫瘍性が認められており、活性成分として前者からレンチナン(β -1,6- と β -1,3-分岐を有する β -1,3-グルカン)、後者からチゾフィランが単離されている。

また、*Bacillus marcerans* や好アルカリ細菌の生成する 1 種のアミラーゼ(サイクロデキストリン-グルコース転位酵素)の作用によって、デンプンからサイクロデキストリンが生産される。この物は構成するグルコースの数により α 、 β 、 γ (構成数; 6, 7, 8)サイクロデキストリンと呼ばれているが、いずれも包接化合物を形成する特性を有しており、医薬品や農薬、あるいは油脂; 香料、香料などの包接剤として広い用途が期待されている。

VII. 基礎化学品

アセトン、ブタノール、メタンなどは以前から発酵法によって生産されてきた。最近の研究ではエタン、プロパン、エチレンなどの微生物による生産が示されている。この方面の研究は、種々の化学品を微生物の酵素、あるいは酵素系を用いて変換する酵素法(微生物変換法)の展開によって急速に進歩し、多種類の基礎化学品が微生物によって生産されるようになってきた。n-アルカン資化性菌による n-アルカンの両端酸化によって、鎖長

に応じたジカルボン酸が生産され、それらのなかで C_{13} のブタン酸は合成樹脂や香料の合成原料として用いられている。また酸素添加酵素によるオレフィンの不斉エポキシ化もすでに実用化され、医薬、農業、さらに強誘電性液晶材料の原料としてのキラル（不斉）エポキシドが生産されている。さらに微生物の D-および L-特異的 β -水酸化反応を利用する D-および L- β -オキシン酸の生産法が開発され、とくに D- β -ヒドロキシイソ酪酸はカプトプリルなどの医薬原料として用いられている。

アクリルアミド、メタアクリルアミドなどは、石油化学の基幹物質として、ニトリルの化学的水和反応によって大量に合成されてきた。ニトリルは微生物のニトリラーゼによってアミドを経てアンモニアとカルボン酸に分解することが報告されていたが、渡辺らは、本酵素反応を用いるアミドの生産について研究し、新しいアクリルアミドの工業的生産法を開発した。さらに著者らは、微生物のニトリル代謝について追究し、ニトリルを特異的に水和する新酵素“ニトリルヒドラターゼ”を発見し、本酵素を結晶状に単離して、ニトリラーゼとの違いなど諸性質を明確にするとともに、本酵素を著量に生産する生産菌として *Pseudomonas chlororaphis* B-23 を分離することに成功した。現在、協同研究者らとともに本菌を直接接触的に用いる新しいアクリルアミドの工業的製法を完成しつつある。

また最近谷らは、メタノール資化性酵母のアルコール酸化酵素を用いるメタノールからのホルムアルデヒドの生産研究を進めている。

以上、第2次大戦後のわが国における応用微生物学の

めざましい発展を回顧しつつ、その過程で発見され、生産されてきた多数の有用代謝産物について述べてきた。紙面の都合もあって省いたものも多く、また文中にお名前を引用しなかった方々にお許しを賜りたい。

最近、生物を生産手段とするバイオテクノロジーは、米国、ヨーロッパ諸国を中心に世界各国において、国家的計画として基礎ならびに応用の両面から推進されており、そのなかで微生物の重要性があらためて認識されている。前述のようにわが国においては、抗生物質、アミノ酸、核酸関連物質、生理活性物質など多様な有用物質が開発、生産され、その成果は世界各国の注目を集めてきた。これらの研究は、日本人独特の感覚と、さらに研究者の創意工夫に依拠し、多大な労力と時間を背景とする“スクリーニング研究”として繰り広げられたものが多く、一方、最近の分子生物学の進歩の成果として、組換え DNA 技術が発展しつつあり、この技術は微生物を生産手段とする応用分野にも、まったく新しいインパクトを及ぼすに至っている。したがってわが国が今後ともこの分野において国際的に優位を保つためには、これまでのスクリーニング研究によって見出されてきた微生物の機能、そして今後見出されてくる微生物の機能を適確に把握すると同時に、これらの機能を細胞および分子のレベルで基礎的に究明する基盤研究の展開が是非必要と考えるのである。

本稿をまとめるにあたって種々ご助言を賜った味の素（株）中央研究所中森茂博士に深く感謝の意を表する次第である。