

**2P-085 麴に含まれる5-アミノレブリン酸に着目した黒酢の高機能化の試み**○中畑 絵里子<sup>1</sup>, 木村 祐太<sup>1</sup>, 寺沢 洋平<sup>1</sup>, 穴井 豊昭<sup>1</sup>, 竹下 義隆<sup>2</sup>, 北垣 浩志<sup>1</sup><sup>1</sup>佐賀大・農, <sup>2</sup>福山黒酢

14555003@edu.cc.saga-u.ac.jp

【背景と目的】5-アミノレブリン酸(5-ALA)はヘムの生合成前駆体であり、貧血予防、皮膚ガン予防、糖尿病予防効果等が期待されている。一方黒酢には5-ALAが多く含まれる事が報告されているがその生成機構に関する知見はない。そこで本研究では、黒酢の5-ALA含量を解析する事で、黒酢の高機能化のための情報を得る事にした。【方法】試料に内部標準として ribitol 水溶液を60μl 加え、Bligh&Dyer法を用いて抽出し凍結乾燥させた。メトキシアミン塩酸塩100μl(20mg/ml in pyridine)を加え incubate し(30℃、90min)オキシム化を行い、N-メチル-N'-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド50μl(MSTFA)を加え incubate し(37℃、30min)トリメチルシリル化を行った。その後FID及びMSに接続したGCを用いて試料の5-ALA含量について解析した。【結果と考察】5-ALA標準品のGCMSスペクトルパターンとの比較から、黒酢に5-ALAが含まれている事を確認した。黒酢の5-ALA含量は、黒酢に様々な濃度の5-ALAを加え ribitol の測定値で標準化した値により作成した検量線を用いて定量化した。黒酢のどの製造過程で5-ALAが生成するかを調べるため、麴、麴を発酵・貯蔵させたものの5-ALA含量を比較したところ、麴段階で最も高く、その後の発酵工程で減少する事が明らかになった。そこで酵母数を変えて麴を発酵させた際の5-ALA含量を調べたところ、酵母数を変える事で5-ALA含量が大きく変わる事がわかった。以上の結果から、麴に含まれる5-ALAに着目した黒酢の高機能化のための手がかりが得られた。

**A trial to functionalize kurozu by targeting 5-aminolevulinic acid contained in koji**○Eriko Nakahata<sup>1</sup>, Yuta Kimura<sup>1</sup>, Youhei Terasawa<sup>1</sup>, Toyooki Anai<sup>1</sup>,Yoshitaka Takeshita<sup>2</sup>, Hiroshi Kitagaki<sup>1</sup><sup>1</sup>Fac. Agric., Saga Univ., <sup>2</sup>Fukuyama Vinegar Corp.)**Key words** Kurozu, 5-ALA, Koji making, Aspergillus**2P-087 糸状菌に由来する新規環状アミノ酸水酸化酵素群の機能解析**日比 慎<sup>1</sup>, 森 亮輔<sup>2</sup>, ○福田 大<sup>2</sup>, 三宅 良磨<sup>3,4</sup>, 川端 潤<sup>3,4</sup>, 高橋 里美<sup>1</sup>, 小川 順<sup>2</sup><sup>1</sup>京大院・農・産業微生物, <sup>2</sup>京大院・農・応用生命, <sup>3</sup>三菱化学科学技術研究セ, <sup>4</sup>エービーアイコーポレーション) mhibi@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】光学活性なヒドロキシプロリン(HyPro)やヒドロキシピペコリン酸(HyPip)などの水酸化環状アミノ酸は医薬中間体として重要な化合物である。これらの生産法としては、酵素を触媒とするプロリン(Pro)やピペコリン酸(Pip)の直接水酸化により光学活性なHyProやHyPipを得る手法が有効である。これまでに我々は糸状菌 *Fusarium oxysporum* c8D株が生産するα-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属する新規酵素Pip4H1が、L-ProやL-Pipに作用して、それぞれL-trans-4-HyProとL-trans-4-HyPipを生成する活性を有していることを見出している。本研究では、Pip4H1やその相同酵素群に関して機能解析を行った。

【方法・結果】Pip4H1のアミノ酸配列に基づいたゲノムデータベース検索の結果、糸状菌類にPip4H1と高い相同性を持つ酵素が多数見出された。この内7種類の酵素に関して組換え酵素を作成し、L-Pip水酸化活性を評価したところ、5種の酵素(Pip4H2, 3, 6, 7, 8)でL-trans-4-HyPipの生成が確認できた。また、Pip4H群の基質特異性を評価したところ、Pip4H1, 2, 3, 6, 7は共通してL-Pip, L-Pro, L-Leuを基質とする4位水酸化活性を示した。Pip4H8は幅広い基質特異性を示し、様々な新規水酸化活性を有していた。さらにPip4H群の酵素学的諸性質の解析結果も併せて発表する。

**Characterization of novel cyclic amino acid hydroxylases from fungi**Makoto Hibi<sup>1</sup>, Ryosuke Mori<sup>2</sup>, ○Dai Fukuda<sup>2</sup>, Ryoma Miyake<sup>3,4</sup>, Hiroshi Kawabata<sup>3,4</sup>,Satomi Takahashi<sup>1</sup>, Jun Ogawa<sup>2</sup><sup>1</sup>Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>3</sup>MCR, <sup>4</sup>API Corp.)**Key words** L-pipecolic acid hydroxylase, Fe(II)/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, L-trans-4-hydroxypipecolic acid, L-trans-4-hydroxyproline**2P-086 赤色海洋酵母が産生する希少カロテノイドの構造および生理活性**○佐藤 光<sup>1</sup>, 津藤 翔二郎<sup>2</sup>, 能木 裕一<sup>3</sup>, 高市 真一<sup>4</sup>, 浜本 牧子<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>明治大院・農, <sup>2</sup>明治大・農, <sup>3</sup>JAMSTEC, <sup>4</sup>日医大)

hamamoto@isc.meiji.ac.jp

【背景と目的】我々は赤色海洋酵母が産生する新規カロテノイドの探索を行う過程で、医薬品をはじめ化粧品や機能性食品などに利用することが期待されている希少カロテノイドをいくつか発見した。本研究では *Sporobolomyces symmetricus* と同定された赤色海洋酵母が産生する2種類の希少カロテノイドの構造および生理活性について明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】カロテノイドの抽出・精製は、酵母湿菌体を機械的に破砕し、アセトン抽出、ケン化、HPLCによる分画により行った。

[1] 構造解析: 先行研究1)においてPlectanixanthinまたはDeoxymyxolと推定されたカロテノイドについて、1H-および13C-NMR解析より1'位および2'位に位置するヒドロキシ基と考えられるピークが検出されたので、Plectanixanthinであると結論した。一方、HydroxyplectanixanthinまたはMyxolと推定されたカロテノイドについて、CD分光法解析よりβ末端環の2位にヒドロキシ基が付加していると考えられるピークが検出されたので、2-Hydroxyplectanixanthinであると結論した。[2] 生理活性: リノール酸のメチレンブルー光増感酸化測定法を用いて測定した一重項酸素消去活性について報告を行う。一方、WST-1アッセイ法によりヒト肺癌基底上皮腺がん細胞A549細胞の増殖を調べた結果、Plectanixanthinが増殖抑制作用を有することが示唆された。

1) 齋藤ら, 第63回日本生物工学会大会(2011)要旨集

**Structure and bioactivity of rare carotenoids derived from a red marine yeast**○Sato Hikaru<sup>1</sup>, Tsubata Shoujiro<sup>2</sup>, Nogi Yuichi<sup>3</sup>, Takaichi Shin-ichi<sup>4</sup>,Hamamoto Makiko<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., <sup>2</sup>Sch. Agric., Meiji Univ., <sup>3</sup>JAMSTEC, <sup>4</sup>Sch. Nippon Med.)**Key words** carotenoid, red marine yeast, *Sporobolomyces symmetricus***2P-088 Elucidation of action and immunity mechanisms of a circular bacteriocin, leucocyclin Q**○Yen Yi Lim<sup>1</sup>, Fuqin Mu<sup>1</sup>, Naoki Ishibashi<sup>1</sup>, Takeshi Zendo<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.) zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

Circular bacteriocins, produced by lactic acid bacteria, possess antimicrobial activity against a broad range of Gram-positive bacteria. They are exceptionally stable to heat and degradation by proteases as compared to linear bacteriocins. It is vital to have a detailed understanding on their action and immunity mechanisms, to explore their potential applications as biopreservatives and therapeutic agents.

Leucocyclin Q (LcyQ) is a post-translationally modified, circular bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401<sup>1</sup>. The results of heterologous expressions proved that *lcyC* and *lcyD* are immunity genes for LcyQ<sup>2</sup>. When cultured in M17 medium containing maltose as a sole carbon source, *Lactococcus lactis* NZ9000 (NZ9000) expressing *lcyC* and *lcyD* could not grow well. It indicated that maltose ABC transporter consisting of MalEFG is inhibited by LcyC and LcyD. To elucidate the immunity mechanism by LcyC and LcyD, a *malFG* knock-out mutant of NZ9000 ( $\Delta malFG$ ) was constructed and the minimum inhibitory concentration (MIC) against LcyQ was analyzed. As a result, the MIC of  $\Delta malFG$  strain against LcyQ increased 13-fold as compared to the wild type, indicating that maltose ABC transporters are docking molecules for the action of LcyQ.

1) Masuda et al. 2011, Appl. Environ. Microbiol., 2) Mu et al. 2014, J. Biosci. Bioeng.

**Elucidation of action and immunity mechanisms of a circular bacteriocin, leucocyclin Q**○Yen Yi Lim<sup>1</sup>, Fuqin Mu<sup>1</sup>, Naoki Ishibashi<sup>1</sup>, Takeshi Zendo<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.)**Key words** circular bacteriocin, lactic acid bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, maltose ABC transporter