

**2P-218 トランス・アネトールが示す相乗的抗真菌作用発現におけるカルシウムイオンの関与**城野 由衣<sup>1</sup>, ○玉置 裕之<sup>1</sup>, 猪井 崇弘<sup>1</sup>, 荻田 亮<sup>1,2</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>, 藤田 憲一<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大院・理, <sup>2</sup>阪市大・健康・研セ)  
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

フェニルプロパノイドの一種であるトランス・アネトール（アネトール）は、セリ科植物から抽出される独特の芳香を放つ油状成分であり、香料として食品に添加されている。本物質は他の薬剤と併用することで相乗的な抗真菌作用を発揮することがすでに報告されている。

【目的】本研究では、アネトールとモデル薬剤であるドデカノールを併用した際に見られる相乗的な抗真菌作用発現メカニズムを、出芽酵母の薬剤耐性に関わる多剤耐性薬剤排出ポンプ、ABC トランスポーター群と、細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度調節遺伝子群に絞って解析した。

【結果】ドデカノールは薬剤排出ポンプの一つである PDR5 の発現が増大させたが、アネトールとの併用によりその過剰発現は強く抑制された。また、PDR5 の転写因子とされる PDR3 においてもアネトールとの併用によりその発現が抑制された。ドデカノールは細胞質における Ca<sup>2+</sup>濃度を一過的に上昇させたが、アネトールを共存させた場合、その上昇が維持されることが判った。遺伝子欠損株を用いた実験から、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇には細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させるゴルジ体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の抑制が関わっている可能性が示唆された。以上の結果より、相乗的な抗真菌作用には少なくとも薬剤排出ポンプの遺伝子発現抑制および Ca<sup>2+</sup>濃度の調節不全が関与している可能性が示唆された。

**Involvement of calcium ions in expression of synergistic antifungal activity of trans-anethole**Yui Jono<sup>1</sup>, ○Hiroyuki Tamaki<sup>1</sup>, Takahiro Inoi<sup>1</sup>, Akira Ogita<sup>1,2</sup>, Toshio Tanaka<sup>1</sup>, Ken-ichi Fujita<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)**Key words** Anethole, multidrug efflux pumps, *Saccharomyces cerevisiae***2P-220  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 (PGA) の生合成における PGA 合成関連遺伝子 *pgsE* の役割**○猪井 崇弘<sup>1</sup>, 信田 晃佑<sup>1</sup>, 荻田 亮<sup>1,2</sup>, 藤田 憲一<sup>1</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・理, <sup>2</sup>阪市大・健康・研セ)

kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

$\gamma$ -ポリグルタミン酸 (PGA) は納豆のネバネバの主成分でグルタミン酸が  $\gamma$  位のカルボキシル基でアミド結合した生分解性ポリマーである。本研究室で単離された *Bacillus* sp. F-2-01 は一般的な PGA 生産菌である納豆菌 *B. subtilis* に比べて PGA を 10 倍以上高生産することがわかっているがその理由は不明である。PGA 合成オペロンは 4 つの関連遺伝子 *pgsB*, *C*, *A* および *E* を含んでいる。そのうち、機能不明の *PgsE* におけるアミノ酸配列は、F-2-01 と納豆菌との間で大きく異なっていた。

【目的】まず、F-2-01 株における PGA 高生産は本株の *pgsE* に依存しているかどうかを調べ、さらに *pgsE* が PGA の分子量に与える影響についても検討を加えた。

【方法及び結果】F-2-01 由来の *pgsBCA*, *pgsBCAE* を用いた強制発現系を大腸菌へ構築し、PGA 生産試験を行った。HPLC 解析の結果、*pgsBCAE* 発現系を有する形質転換株は *pgsBCA* のそれに比べて PGA の生産量は増大していた。また、PGA 生産培地中に 2 価金属イオンを添加した場合、いずれの場合も生産性が向上したが、*pgsBCAE* 発現株は、*pgsBCA* のそれに比べて、より生産効率が上がった。また、*pgsBCAE* 発現株によって生産された PGA の分子量は *pgsBCA* よりも数十倍増大していることがわかった。以上の結果より、F-2-01 由来の *pgsE* は PGA の高生産および高分子量化に寄与している可能性、さらに 2 価金属イオンによる PGA 高生産化をより促進している可能性が示唆された。

**Role of *pgsE* gene in biosynthesis of  $\gamma$ -polyglutamic acid**○Takahiro Inoi<sup>1</sup>, Kousuke Shinoda<sup>1</sup>, Akira Ogita<sup>1,2</sup>, Ken-ichi Fujita<sup>1</sup>, Toshio Tanaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., <sup>2</sup>Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)**Key words** gamma-polyglutamic acid, *Bacillus* sp., natto**2P-219 出芽酵母の偽菌糸形成における微小管の配向およびアクチンの凝集異常の関与**○村田 和加恵<sup>1,2</sup>, 金原 聡子<sup>1</sup>, 北原 望<sup>1</sup>, 荻田 亮<sup>1,3</sup>, 藤田 憲一<sup>1</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大院・理, <sup>2</sup>米子高専, <sup>3</sup>阪市大・健康・研セ)  
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、イソamilアルコール (IAA) の共存下で偽菌糸を形成する。酵母体から偽菌糸への形態変化にはダイナミックな細胞骨格の変動が関与している可能性が高い。IAA 誘導偽菌糸において、アクチンの細胞内レベルには変化が見られず、微小管の構成分子である  $\alpha$ -および  $\beta$ -tubulin においてその相対レベルが低下することがすでに明らかにされている。今回、IAA 処理による偽菌糸形成誘導の際におこる細胞骨格の局在変化について検討を行った。IAA で 4 時間処理した偽菌糸細胞においては、無処理細胞と比較して細胞の先端におけるアクチンパッチの凝集が減少しているのに対し、処理時間が長くなると無処理細胞と差がほとんどなくなるという結果が得られた。次いで、微小管の挙動を調べるため、*tub1*-GFP 株を用いてタイムラプス観察を行った。正常な個体では、細胞の伸長方向に微小管が伸長していくのに対して、偽菌糸形成個体では、微小管は出芽方向と直角方向への配向に対し、処理時間が長くなると無処理細胞と差がほとんどなくなるという結果が得られた。これらの結果から、IAA 誘導偽菌糸において、アクチンの凝集および局在に異常がおこり、アクチンパッチを認識して伸長する細胞質微小管の正常な伸長が阻害されることによって、偽菌糸が形成されるのではないかと仮説が打ち立てられた。

**Disturbance of microtubule-orientation and actin patch-formation in pseudohyphal growth of budding yeast**○Wakae Murata<sup>1,2</sup>, Satoko Kinpara<sup>1</sup>, Nozomi Kitahara<sup>1</sup>, Akira Ogita<sup>1,3</sup>, Ken-ichi Fujita<sup>1</sup>, Toshio Tanaka<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., <sup>2</sup>Yonago Natl. Coll. Technol., <sup>3</sup>Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, pseudohyphal form, tubulin, actin**2P-221 ストレプトスリシン (ST) 生合成酵素群を利用した新規 ST 類縁化合物の創製**○丸山 千登勢, 片野 肇, 濱野 吉十  
(福井県大・生物資源)  
c-maruyama@fpu.ac.jp

【目的】放線菌が生産する強毒性抗生物質 ST は、その構造に beta-リジンオリゴペプチドを有し、そのペプチド鎖長が長くなるほど生理活性が増強される。これまでに、その生合成を担う 3 つの NRPS (ORF5, 18, 19) を同定しており、beta-リジンは、単独型の NRPS (A-ドメイン) である ORF5 によってアデニル化され、ORF18 (T, C-ドメイン) の T-ドメインにローディング後、ORF18 C-ドメインの触媒により ST 生合成中間体ストレプトスリサミンに縮合される。これまでに、beta-リジンアナログである beta-ホモリジンについても ORF5 の基質となることを見出し、構造に beta-ホモリジンを有する新規 ST 類縁化合物の創製に成功している。このように ORF5 が他のアミノ酸を基質として認識できれば、さらなる新規類縁化合物の創製が可能になると考えた。そこで本研究では、ORF5 遺伝子へのランダム変異導入による本酵素の基質特異性の変更を試みた。【方法と結果】A-ドメインの活性測定は、その逆反応を利用した ATP-[<sup>32</sup>P]PPI 交換アッセイ法が一般的である。しかし、ランダム変異を導入した酵素のスクリーニングには非効率なアッセイ法と言える。そこで、酵素反応液にヒドロキシアミン (NH<sub>2</sub>OH) を加え、酵素反応産物である aminoacyl-O-AMP をヒドロキサム酸へと変換させたところ、逆反応が進行せず、PPI が放出されることが判明した。さらに PPI を特異的に単離・比色できるモリブドピロリン酸法を応用することで、放出される PPI を比色定量できる変異型 ORF5 のスクリーニング系を確立することができた。本発表では、スクリーニングによって得られた変異型酵素の結果について報告する。

**Chemoenzymatic synthesis of a novel streptothricin (ST) analog**○Chitose Maruyama, Hajime Katano, Yoshimitsu Hamano  
(Dept. Biosci., Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)**Key words** NRPS, ATP-PPI exchange assay