

2P-222 ロイシルプラストサイジン S を脱アミノアシル化する酵素の同定

○桑田 祥¹, 的場 康幸², 小田 康祐², 野田 正文², 熊谷 孝則², 杉山 政則²
(¹広島大・薬学部, ²広島大院・医歯薬保健学)
b085381@hiroshima-u.ac.jp

【目的】プラストサイジン S (BS) はヌクレオシド系抗生物質の一種であり, 稲のいもち病に有効な農薬として使用されてきた。BS 生産菌 *Streptomyces griseochromogenes* の細胞内では, 抗菌活性のない最終前駆体としてロイシル BS (leucyl-BS) が生成され, 菌体外に放出される際に, アミノペプチダーゼで脱ロイシル化され, 抗菌活性のある BS となる。

当研究室においてロイシル BS の抗菌スペクトルを測定した結果, 枯草菌や黄色ブドウ球菌に対してロイシル BS は無効であったが, 大腸菌や乳酸桿菌には BS と同程度の抗菌活性を示した。この現象を特定の細菌のみがロイシル BS を BS に変換するアミノペプチダーゼを有しているものと捉え, 大腸菌におけるロイシル BS を活性化するアミノペプチダーゼの同定を本研究の目的とした。

【方法および結果】大腸菌の無細胞抽出液を出発物質として, 各種液体クロマトグラフィーを行い, ロイシル BS を BS に変換する酵素を粗精製した。SDS-PAGE ゲルから, 候補タンパク質のバンドを切り取り, ペプチドマスフィンガープリンティング法によって, アミノ酸配列の一部を決定した。その結果, 候補タンパク質は, アミノペプチダーゼ N (EC:3.4.11.2: PepN) であると同定された。実際, 大腸菌が大量発現後, 精製した PepN は, ロイシル BS を BS に変換する酵素活性を有していた。また, PepN をコードする遺伝子を欠失させた大腸菌は, ロイシル BS に対する感受性が低下していた。

Identification of an enzyme catalyzing the deamino-acylation of leucyl-blasticidin S

○Sho Kuwada¹, Yasuyuki Matoba², Kousuke Oda², Masahumi Noda²,
Takanori Kumagai², Masanori Sugiyama²
(¹Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Univ., ²Grad. Sch. Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.)

Key words aminopeptidase N, blasticidin S, antibiotics, *Escherichia coli*

2P-224 脂肪酸合成阻害剤を用いた気生微細藻類のカロテノイド生成の活性化

○油井 信弘, 阿部 克也
(工学院大・工・応化)
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】陸上の厳しい環境に適応するため, 気生微細藻類は休眠細胞を形成してカロテノイドやオイルなどの有用な機能性物質を高濃度に蓄積することが明らかにされつつある。本報告では, 山岳地帯の岩場表面から単離した気生微細藻類を用いたカロテノイド生産を目指すため, 脂肪酸合成阻害剤によるカロテノイド生成の活性化について検討した結果について述べる。

【方法】気生微細藻類 *Vischeria helvetica* KGU-Y001 を Bold[®] s Basal 培地, 光強度 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ で 3 週間前培養した後, 0.1% 大豆サポニンとモリネート (100 μM in MeOH) を添加してさらに 1 週間振とう培養した。各藻体を回収した後, 常法により有機溶媒で脂質を抽出した。逆相 HPLC, LC-MS, 分光光度計によってカロテノイドの組成を, GC によって脂肪酸組成を分析した。

【結果と考察】コントロール培養した KGU-Y001 は, 3.3 mg/g dwt (dry weight cells) のカロテノイドを含んでいた。特に β -カロテンが 60% 占めており, その他はアスタキサンチン, ビオラキサンチン, およびゼアキサンチンであった。総脂肪酸含有量については 114.5 mg/g dwt であり, パルミチン酸やパルミトレイン酸など炭素数 16 の脂肪酸が 80% を占めた。一方, モリネート添加培養の結果, 総脂肪酸含有量はコントロールと比べ 15% 減少するとともに, 総カロテノイド含有量は 2 倍増加することが分かった。今後は, 界面活性剤を用いた薬剤添加方法を検討することで阻害剤の効果をより高め, 気生微細藻類を用いた効率的なカロテノイドの大量生産系の構築を目指す。

Enhancement of Carotenoid Biosynthesis in the Aerial Microalga by Fatty acid inhibitor

○Nobuhiro Aburai, Katsuya Abe
(Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, carotenoid, fatty acid, biosynthesis

2P-223 新規マクロライド makinolide B の単離と構造の決定

○小谷 真也¹, 肥田木 道生¹, 吉田 充², 小川 直人¹
(¹静大院・農, ²日獣大・応生)
askodan@ipc.shizuoka.ac.jp

抗生物質の探索源として放線菌は非常に重要な微生物であり, 二次代謝産物の多様性から現在でも抗生物質探索の研究が世界中で行われている。本研究において新たに茶園土壌から放線菌の単離を行い, アセトン抽出物を用いた抗微生物活性のスクリーニングを行った。その結果, *Streptomyces* sp.MK-19 株において抽出物から抗酵母活性が見られたので, 抗酵母物質の単離と構造決定を行った。牧の原市の茶園土壌由来の *Streptomyces* sp.MK-30 株から新規マクロライド makinolide A を得ている。さらに詳細な活性試験を行ったところ, 同時に得られた MK-19 株に酵母に対する生育抑制活性が見られた。そこで, MK-19 株の 16S rDNA の配列の解析を行ったところ, MK-30 株と相同性が 99% であることを明らかにした。寒天培養菌体をアセトン抽出し, 抽出液を減圧濃縮後, 逆相オープンカラムを用いた含水メタノールによって溶媒分画した。活性の見られた 100% メタノール溶出画分から ODS カラムを用いた HPLC 分取によって新規抗酵母物質を単離した。本物質はポジティブイオンモードの HR-ESI-MS 測定で m/z 611.39 にイオンピークを与えた。組成式は $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{NaO}_7$ と推定され, Na イオン付加のイオンピークであることが示唆された。よって分子式 $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_7$ で分子量 588 Da であることが示唆された。さらに化学構造を決定するために, 重アセトン中で各種 NMR スペクトラムの測定を行い, 構造決定を試みた。COSY, TOCSY, HMBC, HMQC の二次元 NMR スペクトラムの測定の結果, 新規 bafilomycin 類縁体であることが明らかとなり makinolide B と命名した。

Isolation and structure determination of a new macrolide makinolide B

○Shinya Kodani¹, Michitaka Hidaki¹, Mitsuru Yoshida², Naoto Ogawa¹
(¹Grad. Sch. Agric., Shizuoka Univ., ²Fac. Appl. Bio. Nippon Vet. Life Sci. Univ.)

Key words antibacterial, *Streptomyces*, macrolide

2P-225 気生微細藻類 *Scenedesmus* sp. のカロテノイド生産に及ぼす培養条件の影響

○隅田 大地, 油井 信弘, 阿部 克也
(工学院大・工・応化)
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】気生微細藻類は, 乾燥した岩場表面など光合成生物にとって過酷な環境で生活するために特異な生物機能を有している。例えば, 藻体の赤色細胞の形成は抗酸化物質 (カロテノイド) の蓄積によるものである。本報告では, 気生微細藻類による種々のカロテノイド生産を目的とした培養条件について検討した結果を述べる。

【方法】気生微細藻類は栃木県の山中の壁面から単離した。藻株は BB 培地で通気培養し, 白色蛍光灯を用いた連続光照射における光強度および培地中の硝酸イオン濃度を変化させることで培養した。得られた細胞懸濁液を 100 mL 三角フラスコに分注し, 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ にて振とう培養を行うことでカロテノイドを蓄積させた。

【結果と考察】藻株は, 18S rDNA 解析により緑藻類 *Scenedesmus* sp. KGU-Y002 と同定された。増殖速度は光強度が 80~120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ のときに向上した。また, 増殖速度は培地中の硝酸イオン濃度が 720 mg/L の時に最大となり, 培養 23 日目まで通常培養 (NO_3^- :180 mg/L) と比べ約 3 倍のバイオマスが得られた。HPLC 分析により, 細胞内にアスタキサンチン, アドニキサンチン, ゼアキサンチン, カンタキサンチンなどのキサントフィルや β -カロテンを含んでいることが分かった。カロテノイド蓄積培養では, 経時的にキサントフィルを蓄積し, 特にエステル型カロテノイドを多く占めていることが分かった。カロテノイドの含有量はカロテノイド蓄積培養 21 日後には 2 倍以上に蓄積し, クロロフィルは 1/2 以下に減少した。

Effect of Culture Conditions on Carotenoid Production of Aerial Microalga *Scenedesmus* sp.

○Daichi Sumida, Nobuhiro Aburai, Katsuya Abe
(Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalga, *Scenedesmus* sp., carotenoid production