

3P-269 *Bacillus clausii*におけるセスタテルペン、Head-to-tail型トリテルペン、セスクアテルペンの生合成：多機能性酵素の同定とイソプレノイド代謝物の解析

○上田 大次郎¹, 山鹿 宏彰¹, 村上 瑞気¹, 遠塚 悠輔², 品田 哲郎², 佐藤 努¹

(¹新潟大・自然研, ²阪市大院・理)
satot@agr.niigata-u.ac.jp

我々は、*Bacillus* 属細菌の生合成研究を行っている。その中で、*B. clausii* における E 型のイソプレニル二リン酸合成酵素 (E-IDS) の解析を行った。その菌体には E-IDS ホモログは、ホモダイマー型 (E-IDS-1) とヘテロダイマー型 (E-IDS2S/L) しか存在しなかった。機能解析の結果、E-IDS1 は FPP/GGPP 合成酵素であり、E-IDS2 は GFPP/HexPP/HepPP を合成する初めての三機能性の酵素であった。また、その下流の生成物について解析した結果、鎖状テルペンとメナキノンでは主に利用するイソプレノイドの鎖長が異なることが判明した。このことから、本菌において、一つの多機能性 E-IDS のあいまいな生成物特異性がイソプレノイドの多様性を創出し、下流酵素の基質特異性もイソプレノイドの生成分布に影響を与えていることが示唆された。

Biosynthesis of rare terpenoids in *Bacillus clausii*

○Daijiro Ueda¹, Hiroaki Yamaga¹, Mizuki Murakami¹, Yusuke Totsuka², Tetsuro Shinada², Tsutomu Sato¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., ²Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ.)

Key words *Bacillus clausii*, terpenoid, biosynthesis

3P-270 乳酸菌 *Lactobacillus otakiensis* における D-分岐鎖アミノ酸の局在と機能

○前田 純平¹, 十時 繁幸¹, 大島 敏久², 土居 克実¹
(¹九大院・生資環, ²大工大・工)

doi@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】分析技術の向上により、生物環境中に多様な D₂アミノ酸が存在することが明らかとなった。乳酸菌 *Lactobacillus otakiensis* は、対数増殖期に D₂分岐鎖アミノ酸(D₂BCAA)を培地中に分泌し、本菌株からは新規アミノ酸代謝酵素である BCAA ラセマーゼ (BCAA-R)が見出された。そこで本研究は、BCAA-R の特性解析及び、生産物である D₂分岐鎖アミノ酸の局在と、生体内での役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】*L. otakiensis* における D₂BCAA の局在と機能を明らかにするために、(1)BCAA-R の機能解析、(2)qRT-PCR による BCAA-R 遺伝子の転写解析、(3)*L. otakiensis* の細胞外、細胞壁、細胞質画分における D₂BCAA の局在と含量を経時的に測定した。

【結果・考察】BCAA-R は BCAA に対して高い特異性を持ち、BCAA-R 遺伝子の転写レベルは、定常期では対数増殖期の約 2.5 倍上昇することが明らかとなった。培養経時的に D₂BCAA の局在を検討したところ、細胞外画分では対数増殖期において D₂allo-Ile, D₂Leu, D₂Val が増加したが、一方、細胞質画分においては定常期に D₂allo-Ile のみ増加した。細胞壁には D₂Leu, D₂Val が多量に含まれることが明らかとなった。これらの結果より、*Lactobacillus otakiensis* は細胞壁構造体として D₂Leu, D₂Val を利用していると推察した。現在、より詳細な細胞分画を行い、各画分の構成アミノ酸分析を行っている。さらに、BCAA-R ノックアウト株を作製し、表現型やゲノムワイドな転写プロファイルについて野生型株との比較を行い、D₂BCAA の機能や代謝経路について解析していく予定である。

Localization and function of D₂ branched chain amino acid in *Lactobacillus otakiensis*

○Junpei Maeda¹, Shigeyuki Totoki¹, Toshihisa Ohshima², Katsumi Doi¹
(¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Osaka Institute of Technology)

Key words lactic acid bacteria, D-amino acid, racemase

3P-271 ブロココリー由来成分によるパラベン類の抗菌作用の増幅効果

○荻田 亮^{1,2}, 藤田 憲一¹, 山口 良弘¹, 山内 賢³, 田中 俊雄¹
(¹阪市大院・理, ²阪市大・健康研, ³慶応大・体育研)

ogita@sports.osaka-cu.ac.jp

【目的】パラベンは食品や化粧品等の防腐・抗菌剤として広く使用されているにも関わらず、アレルギーや接触性皮膚炎等の危険性が指摘されており、添加量の低減が求められている。パラベンの抗菌活性を維持しつつ、その添加量を低減させ得る助因子を検索したところ、ブロココリー成分の sulforaphane (SFN) に目的となる活性を見いだした。本研究においては、抗菌活性の増幅因子である SFN を抗菌剤組成物として応用することを目的として、パラベン + SFN による抗菌効果について検討した。

【方法】パラベンの抗菌作用におけるブロココリー抽出液の影響については *Saccharomyces cerevisiae* を試験菌としてペーパーディスク法によって判定した。パラベン + SFN による生菌数への影響はコロニーカウント法によって評価し、相乗効果の判定にはチェッカーボード法を用いた。また、細胞膜障害の指標として細胞内 K⁺ および核酸の細胞外への漏出を測定した。

【結果】*S. cerevisiae* に対するメチルパラベン (MP) の生育阻害作用は、ブロココリー抽出液の添加により著しく増幅した。また、SFN の添加によっても同様の効果が認められた。SFN はエステル部分の異なる他種パラベンの組合せにおいても生育阻害作用の増幅効果を示した。SFN 存在下において致死濃度以下の MP で処理された細胞は、致死濃度の MP 単独での処理細胞と同様に K⁺ および核酸の細胞外への漏出が認められたことから、SFN は MP による細胞膜障害作用を増幅する可能性が示された。

Enhancement of antimicrobial activity of parabens by sulforaphane, an isothiocyanate from broccoli

○Akira Ogita^{1,2}, Ken-ichi Fujita¹, Yoshihiro Yamaguchi¹, Ken Yamauchi³, Toshio Tanaka¹

(¹Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., ²Res. Center, Urban Health & Sports, Osaka City Univ., ³Inst. Physical Educ., Keio Univ.)

Key words paraben, antimicrobial, sulforaphane

3P-272 シクロピアゾン酸生合成における CpaM の機能解析

○菊池 友希¹, 小山 哲史², 飯尾 晋一郎², 篠原 靖智³, 久保田 高明^{4,5}, 小林 淳一⁴, 小山 泰二³, 徳岡 昌文², 進藤 齊², 穂坂 賢²

(¹東農大院・農, ²東農大・応生科, ³野田産研, ⁴北大院・薬, ⁵昭和薬大)
m3tokuok@nodai.ac.jp

<目的>シクロピアゾン酸(CPA)は *Aspergillus oryzae* 一部菌株やその近縁種が生産する二次代謝物であり、小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害活性を有する。CPA 生合成遺伝子クラスターの *cpaH* と *cpaM* は *A. flavus* で欠失しているが *A. oryzae* では保持されている。*cpaH* は毒性がより低い 2-oxoCPA の生産に関わることが示されているが、*cpaM* はメチル基転移酵素をコードすると推定されているのみで機能解析はされていない。本研究では *A. tamarii* の二次代謝物として見いだされた speradine A が 2-oxoCPA のメチル化体であることに注目し *cpaM* の機能解析を行った。

<方法及び結果>speradine A 生産株の *A. tamarii* NBRC4099 の *cpaM* ホモログ (*AtcpaM*) をクローニングし、推定 ORF を含む 5'-及び 3'-flanking 領域を *A. oryzae* NBRC4177 に導入した。取得した *AtcpaM* 発現株は親株が生産する 2-oxoCPA に加えて speradine A に一致する化合物を生産した。MS/MS 解析で精製 speradine A とプロダクトイオンが一致したことから、*AtcpaM* は 2-oxoCPA の speradine A への変換に関わることが強く示唆された。一方、speradine A を生産しない *A. oryzae* においては *cpaM* が機能しないと推定され、*cpaM* 中の塩基欠失とそれに伴う終止コドンの生成が原因として考えられた。

Functional analysis of the *cpaM* in cyclopiazonic acid biosynthesis

○Tomoki Kikuchi¹, Akifumi Koyama², shinichiro Iio², Yasutomu Shinohara³, Takaaki Kubota^{4,5}, Junichi Kobayashi⁴, Yasuji Koyama³, Masafumi Tokuko², Hitoshi Shindo², Masaru Hosaka²
(¹Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., ²Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., ³Noda Inst. Sci. Res., ⁴Grad. Sch. Pharm., Hokkaido Univ., ⁵Showa Pharm. Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, secondary metabolism