

3P-277 Hfq が関わる RNA 代謝を標的とした新規薬剤の探索

○高田 綾子¹, 和田 正明²
(¹東工大・技術部, ²東工大院・生命理工)
takada.a.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】細菌感染症の化学療法において、多剤耐性菌の出現は重大な問題となっている。この問題に対抗する有望な戦略の一つは、新規標的を有する薬剤の開発であろう。我々はこれまでに RNA シャベロンである Hfq タンパク質が細胞分裂遺伝子 *fisZ* の発現や、病原性に重要な酸耐性機構 Gad システムの発現に関与していることを見出している。そこで、Hfq の関わる RNA 代謝を標的とした新規スクリーニング系を構築し、細菌の細胞分裂や病原性を抑制する新規薬剤の発見を目的として探索を行った。

【方法】Hfq を過剰発現すると *fisZ* の発現が抑制されて細胞増殖が阻害される。そこで、Hfq の発現が IPTG 誘導可能な菌株を含んだ寒天プレートの中央にサンプル溶液を浸み込ませたペーパーディスクを置き、培養後にサンプルの周辺にコロニー形成が見られるようなサンプルを探索した。まず、既知の薬剤を用いて探索を行い、本スクリーニング系の有効性を確認した。続いて、これまでに収集した土壌分離菌のライブラリーを用いて探索を行った。

【結果と考察】構築したスクリーニング系において、RNA 合成阻害剤である Rifampicin が濃度依存的にコロニー形成を回復することを見出した。また、土壌分離菌のライブラリーから、サンプル周辺にコロニー形成がみられる 2 サンプルを見出した。これらの化合物を同定した結果、どちらも Rifampicin と同様に RNA 合成を阻害する物質であった。Rifampicin 耐性 *rpoB* 変異を有する株を宿主とすると Rifampicin による回復が見られないことから、Rifampicin は RNA polymerase を介して作用していると思われる。

Screening for novel antibiotics targeting Hfq-mediated RNA metabolism

○Ayako Takada¹, Masaaki Wachi²
(¹Technical Dept., Tokyo Tech, ²Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words RNA metabolism, antibiotics, Hfq

3P-278 *Amycolatopsis alba* の生産する新規シデロフォア albachelin の構造決定

○小谷 真也¹, 小牧 久幸², 鈴木 雅博¹, 逸見 光³, 亀山 眞由美³
(¹静大・農, ²NBRC, ³農研機構・食総研)
kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

【目的】シデロフォアとは微生物や植物が鉄欠乏条件下にさらされたときに分泌される鉄キレート低分子物質の総称である。これまで放線菌においてハイドロキサメト型ペプチド性シデロフォアが報告されてきた。これらのペプチドは非リボソーム依存ペプチド合成酵素 (NRPS) により生合成されることが知られている。そこで、ゲノム配列が公開されている放線菌のシデロフォア生産スクリーニングを行い、*Amycolatopsis alba* より新規シデロフォア albachelin を見出したので、その構造決定に関して報告する。

【方法】*Amycolatopsis alba* JCM 10030 を鉄欠乏液体培地 1L 用いて、30℃で7日間振とう培養した。培養液をろ過後、ろ液に FeCl₃ 溶液を加えて、シデロフォアを鉄とキレートさせた。ろ液を減圧濃縮後、疎水性樹脂 CHP-20P に吸着させ、溶媒分画したところ、60% MeOH 画分にシデロフォアの存在が確認された。そこで、HPLC を用いて、60% MeOH 画分から albachelin を分取した。

【結果および考察】ESI-FT-ICR MS の結果から albachelin の分子式を C₂₈H₄₀N₆O₁₄ と決定した。さらにガリウムキレート albachelin に関して各種 NMR スペクトルを測定し、構造を決定した。ヨウ化水素で還元的水分解後、マフィー法を用いて立体化学を検討したところ、L-Ser と D-Ser を 2 : 1 の比率で検出した。また、L-Orn と D-Orn を 1 : 1 で検出した。N-Me Orn は L 体のみが検出されたことから、L 体であると決定した。また、データベースから生合成遺伝子を検索したところ、NRPS をコードする AMYAL_RS0130210 が albachelin の生合成に関与すると考えられた。

Isolation and structure determination of new siderophore albachelin from *Amycolatopsis alba*

○Shinya Kodani¹, Hisayuki Komaki², masahiro Suzuki¹, Hikaru Hemmi³, Kameyama Mayumi³
(¹Fac. Agric., Shizuoka Univ., ²NBRC, ³NFRI)

Key words peptide, siderophore, *Amycolatopsis alba*

3P-279 中鎖ホモ PHA 合成に適した重合酵素改変体のスクリーニング

○渡邊 鈴蘭, 廣江 綾香, 柘植 丈治
(東工大院・総理工)
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物体内で合成される生分解性ポリエステルであり、資源循環型材料として注目されている。モノマー炭素数 6~14 の 3-ヒドロキシアルカン酸の単重合体である中鎖ホモ PHA は、従来の短鎖 PHA とは異なり透明で柔軟な性質をもつ。特に、モノマー炭素数 12 の中鎖ホモ PHA であるポリ (3-ヒドロキシデカン酸) (P(3HDD)) はバイオマス資源であるパーム核油などに多く含まれるドデカン酸から生産が可能である一方、生産効率の向上が求められている。PHA 生合成には種々の酵素が関連しているが、なかでも PHA 重合酵素は PHA 合成において最も重要な役割を果たす。そこで本研究では、中鎖の PHA 重合に適した *Pseudomonas putida* 由来の PHA 重合酵素 (PhaC1_{pp}) に着目し、これにランダムに変異を導入することで、P(3HDD)を高効率生産する重合酵素改変体を得ることを目的とした。

【方法】1 kb あたり約 5 個程度のランダム変異が導入された *phaC1_{pp}* (1.7 kb) の変異ライブラリーを作成した。これを PHA 合成宿主となる大腸菌株に導入し、一次スクリーニングとして PHA 染色蛍光色素である Nile Red を用いたプレートアッセイを行った。次に、二次スクリーニングとして選抜個体をフラスコ培養し、P(3HDD)の生合成を行った。なお、ポリマー蓄積量はガスクロマトグラフィー (GC) で確認を行った。

【結果と考察】選抜個体の P(3HDD)蓄積量を調べたところ、野生型 PhaC1_{pp} と比較し、PHA 蓄積量が 1.5~2 倍向上する 4 つの改変体を得ることができた。現在、改変型酵素 PhaC1_{pp} の PHA 蓄積能の向上が何に起因するか、検証を進めている。

Screening of *Pseudomonas putida* synthase for biosynthesis of medium-chain-length homo PHA

○Suzuran Watanabe, Ayaka Hiroe, Takeharu Tsuge
(Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Pseudomonas putida*, screening

3P-280 PHA 生合成における補酵素再生サイクルの導入効果

○宮原 佑宜, 太田 美乃, 柘植 丈治
(東工大院・総理工)
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、ある種の微生物が合成するバイオプラスチックである。PHA は生分解性や生体適合性を有するため、近年、環境・医療分野などで応用が期待されている。PHA の一種であるポリ (3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) の生合成では、補酵素 NADPH の供給が律速段階である可能性が指摘されている。もし、NADPH の供給により P(3HB)生産が制限されているのであれば、NADPH を十分に供給することで P(3HB)生産性の向上が期待できる。そこで、本研究では亜リン酸をリン酸に酸化する際に、NAD(P)⁺を NAD(P)H に還元する酵素である亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) に着目した。PtxD による NAD(P)H 再生サイクルを利用し、P(3HB)生合成を行うことで生産性に与える影響を評価した。

【方法】*Pseudomonas stutzeri* では *ptxABCD* オペロンを有しており、*ptxABC* は亜リン酸トランスポーター、*ptxD* は亜リン酸デヒドロゲナーゼをコードしている。本研究では NAD⁺および NADP⁺を基質として利用可能にするために *P. stutzeri* 由来の *ptxD* に二重変異を導入した *ptxD_{EAAAR}* を作成した。さらに、大腸菌 *Escherichia coli* XL1-Blue に *ptxD_{EAAAR}* または *ptxD_{EAAAR}ABC* を導入した 2 つの遺伝子組換え株を作製し、NAD(P)H 再生サイクルを強化させた。次に、P(3HB)を生合成させるべく P(3HB)合成遺伝子群 *phaC_RAB* を組換え大腸菌に導入した。本研究では、作製した菌株を用いて培養し、P(3HB)生合成を行った。

【結果・考察】培養上清中の亜リン酸・リン酸濃度を測定することで PtxD が機能していることを確認した。さらに、炭素源消費量、および P(3HB)合成量から対原料収率を算出し、PtxD が P(3HB)生産に与える影響を考察した。

Polyhydroxyalkanoate biosynthesis with enhanced NAD(P)H regeneration cycle

○Yuki MIYAHARA, Mino OHTA, Takeharu TSUGE
(Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech)

Key words PHA, Phosphite dehydrogenase, NADH, NADPH