

主 論 文 要 旨

論文題名 微生物由来生理活性物質の探索と作用メカニズム に関する研究

ふりがな なかがわ かずや
氏名 中川 和也

微生物代謝産物から2種類の生理活性物質の探索を行い、活性物質の化学的解明、活性についての検討を行うとともに、結合タンパク質の同定を行った。

第一は、テルペノイド生合成単位であるイソプレンの第2の生合成経路として、20世紀末に見出された非メバロン酸 (MEP) 経路の阻害剤であり、抗マラリア薬、除草剤などへの応用が期待できる。2段階からなるスクリーニング系を構築し、新たな MEP 経路阻害物質を *Bacillus* sp. KN07 株から単離し、既知物質 maculosin (MC) の cyclo(L-Tyr-L-Pro)と立体化学を含めて同定した。MC の活性発現に不可欠な Tyr の水酸基を残したビオチン標識体を合成し、MEP 経路の各酵素を過剰発現させた大腸菌の可溶性タンパク質画分とアビジンビーズを用いて結合タンパク質を求めた。その結果、結合タンパク質は MEP 経路 6 番目の酵素である IspG であり、MC は初の IspG 阻害剤と考えられる。また、IspG 発現量、MC 量に応じて大腸菌の細胞が、多核フィラメント化することを見出し、MEP 経路中間体が細胞分裂に関与している可能性を示した。

第二は、動植物への病原性を示すものが多い卵菌類の一つで、淡水養殖場で被害をもたらす *Saprolegnia parasitica* (ミズカビ) への選択的な活性物質である。抗ミズカビ剤には優れた市販薬が無く、環境負荷の少ないものが望まれている。探索の結果、*Streptomyces* sp. TK08046 株から活性物質を 5 種単離し、主として二次元 NMR 解析から新規アングサイクリン系化合物であることを明らかにして saprolmycin (SP) A~E と命名した。SP 類は植物プランクトンを含む他の生物へは殆ど活性を示さず、ミジンコ、HeLa 細胞への毒性は 5 μ g/mL 程度であった。一方、*S. parasitica* への活性は A と E が強く、それぞれ 0.004、0.008 μ g/mL と極めて選択的であった。SP 類は蛍光を有しており、HeLa 細胞、ミズカビ菌糸、胞子内での局在性を蛍光顕微鏡で観察するとともに、細胞への影響を種々検討した。また、構造中の不飽和糖 aculose とタンパク質との結合が示唆されていたことから、ミズカビ菌糸の可溶性タンパク質画分と SP-E を混合後、直接 SDS-PAGE に供して蛍光検出し、結合タンパク質 2 種を得た。ペプチドマスフィンガープリント法の結果を用いたデータベース検索から、いずれも nucleoside diphosphate kinase (NDPK) と考えられた。そこで、NDPK の組み換え酵素を用いて、SP-E の酵素阻害活性を測定したが低く、抗ミズカビ活性は近年報告されている NDPK の多機能性に関わるものと考察した。

Study on bioactive compounds from microorganisms and their mode of actions

ふりがな なかがわ かずや
氏名 Nakagawa Kazuya

Two kinds of bioactive substances were screened from microbial metabolites and structural elucidation of the active compounds, studies on the activity and identification of their binding proteins were performed.

First object is the inhibitor of MEP pathway that is a second biosynthetic pathway of C5 isoprene units of isoprenoids discovered in the end of the 20th century. Two steps screening system were made, and an active compound was isolated from *Bacillus* sp. KN07. It was identified as cyclo(L-Tyr-L-Pro) named maculosin. A biotinylated maculosin remaining the hydroxyl group of Tyr, essential for the activity, was synthesized. An avidin-biotin complex method using the lysates of seven *Escherichia coli* strains, each overexpressing one enzyme of the MEP pathway, was applied and it was unveiled that IspG, the sixth enzyme on the MEP pathway, was bound to maculosin. Quartz crystal microbalance (QCM) data confirmed the binding activity between maculosin and IspG. Inhibition of IspG was demonstrated microscopically: maculosin suppressed the unusual filamentous form of IspG-overexpressing *E. coli* cells. Maculosin is the first IspG inhibitor.

Second object is anti-*Saprolegnia* antibiotic, there was no effective drug for saprolegniasis and strong demand for new drug in aquaculture industry. Saprolymycins A–E, five new antibiotics were isolated from *Streptomyces* sp. strain TK08046. The structures of these compounds were elucidated as a new group of angucycline compounds. Saprolymycin A and E exhibited potent activities against *Saprolegnia parasitica* with MIC values of 3.9 and 7.8 ng/ml, respectively, but weak or no activity against fungi, gram-positive or -negative bacteria, and microalgae or zooplankton. Saprolymycins are fluorescent substances and thus the binding proteins were easily detected on SDS-PAGE of the lysate of *S. parasitica* treated with saprolymycin E. Two binding proteins were obtained and identified as nucleoside diphosphate kinases by mascot database search using peptide mass fingerprint data.