

抗真菌化合物の生合成に関する研究

坂井 康平（筑波大学 生物学類） 指導教員：小林 達彦（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

私は *Kitasatospora* 属の放線菌が生産するピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドという抗真菌化合物の生合成に関する研究を行っている。ピエリシジン類は殺虫作用をもつ化合物として発見された。その構造は、窒素を含む複素環に炭素鎖がついたような形をしている。また、*N*オキシドという窒素に酸素が付加されている構造も有している。ピエリシジン類で *N*オキシドの構造をもつものはピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドの2種のみが確認されているが、ピエリシジンの *N*オキシド化酵素は未同定でその発見には新規性があると考えた。

よって、本研究室でスクリーニングされ単離・同定されたピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドを合成する *Kitasatospora* 属放線菌の1株に注目し、本株が持っていると考えているピエリシジン B1 とピエリシジン B5 を *N*オキシド化する酵素の同定を目的とした。

【方法・結果】

まず、研究対象としている *Kitasatospora* 属の放線菌株がピエリシジン B1 を基質にピエリシジン B1 *N*オキシドを合成していることを休止菌体を用いて検証した。標品として購入したピエリシジン B1 に本株の休止菌体を添加し *N*オキシド化が進行するかを検討した。反応溶液を LC/MS を用いた質量分析法にかけることで、反応前には見られなかったピエリシジン B1 *N*オキシドが反応後に見られるようになった。この結果から、本株によって、ピエリシジン B1 を基質としてピエリシジン B1 *N*オキシドが生産されている可能性が示唆された。

また、基質であるピエリシジン B1 とピエリシジン B5 の大量精製および反応生成物であるピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドの定量のための検量線を作成しようと考えた。そのため、液体クロマトグラフィーを用いて基質と反応生成物を分取する方法について検討した。分取を試みるサンプルとしては菌体培養上清を選択した。液体クロマトグラフィーの条件検討も併せて行った結果、80%メタノール 20%0.05%ギ酸のアイソクラティックメソッドが充分分取したい化合物のピークを分離できており、このメソッドが適切であると判断した。結果的には、No.42 株培養上清を酢酸エチルで化合物抽出し、そこから反応生成物であるピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドの分取に成功した。一方で、同サンプルから基質であるピエリシジン B1 およびピエリシジン B5 は分取することができなかった。液体クロマトグラフィーでは基質を高い強度で検出することができず、単一のピークになっていなかったためである。

続いて、基質であるピエリシジン B1 とピエリシジン B5 は分取と並行して、ピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドから還元し獲得することができないかを検討した。結果として、(pinB)₂ と呼ばれる還元剤を用いることで比較的温和な条件でピエリシジン B1 *N*オキシドとピエリシジン B5 *N*オキシドをピエリシジン B1 とピエリシジン B5 へと還元することに成功した。

今後は調製した基質を用いて目的酵素の精製を行いたいと考えている。