

【目的】種々の微生物のゲノムデータベースを用い詳細な比較解析を行うと、既知の生合成経路の遺伝子群を見出せない場合がある。それらが生育に必須な経路の遺伝子であれば、当該微生物は新規の生合成経路を利用している可能性が高い。実際、筆者はゲノムデータベースの精査と生化学実験により、メナキノンとペプチドグリカンの生合成に関与する新規経路(酵素)を見出した。前者はピロリ菌が、後者はイネ白葉枯病菌が利用する。新規経路の阻害剤は、これら病原菌の特異的抗生剤・農薬になると考えられることから、放線菌と糸状菌の培養液に目的化合物を探索した。

【方法】メナキノン(MK)新規経路の阻害剤の探索は以下のように行った。当研究室では病原菌であるピロリ菌を扱うことができないため、スクリーニングには互いに近縁な2種の *Bacillus* 属細菌を用いた。既知MK生合成経路保有株である *Bacillus subtilis* および新規経路保有株である *Bacillus halodurans* を培養液サンプルの存在下でそれぞれ培養し、*B. halodurans* の生育のみを阻害するサンプルを探索した。

ペプチドグリカン新規生合成経路阻害剤の探索は、既知経路保有株として *Streptomyces lividans* を、新規経路保有株として *Micromonospora* sp. を被検菌に用いて生育阻止円検定を行い、後者にのみ生育阻害を示すサンプルを探索した。最終的には新規経路の生合成酵素を用いた *in vitro* アッセイで阻害を確認した。

【結果】MK新規経路阻害剤の探索は、放線菌と糸状菌の培養液 5,200 サンプルに対し行った結果、18 のヒットサンプルを得た。しかし、どれも既知の脂肪酸類であることが判明し、これらサンプルからの活性本体の単離は中止した。

ペプチドグリカン新規生合成経路阻害剤の探索は、放線菌培養物 3,280 サンプルを用いて行い候補サンプル1つを得た。候補サンプル生産菌を大量培養後、上清を酢酸エチルで抽出しHPLCで分析した結果、1つの大きなピークが検出された。本ピークを分取しペーパーディスクアッセイを行った結果、本ピークに活性本体が含まれていることがわかった。活性本体を精製後、精密質量分析を行った結果、 $m/z = 1255.6373$ を得た。活性化化合物は結晶性が良かったことから、結晶構造解析を行った結果、actinomycin D であることが明らかとなった。Actinomycin D が実際に新規経路を阻害するか組換え酵素を用いて *in vitro* で調べた結果、UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を付加する酵素を阻害することがわかった。Dixon plot で阻害定数を算出した結果、UDP-MurNAc-L-Ala に対し K_i 値は 0.46 mM であった。

Actinomycin D の構造

