

オカラ抽出物に含まれる *Bacillus* 芽胞形成誘導物質ジアセトナミンの単離精製・構造決定およびその類縁体を含む芽胞誘導活性評価に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 池田 陽

1. 緒言

グラム陽性細菌で栄養増殖菌体が典型的な長桿状を示す *Bacillus* 属は、飢餓等のストレスに晒されると桿菌から短桿形で耐久性の高い芽胞へと分化することが知られている。*Bacillus* 属細菌の芽胞への分化時には、環状リポペプチド系抗生物質の産生亢進や (*B. subtilis*), 昆虫特異的タンパク性毒素 Cry トキシンの菌体内への大量蓄積 (*B. thuringiensis*) など、多くの種で芽胞形成と二次代謝との明瞭な連動が確認されている。一方、オカラ抽出物は、*B. amyloliquefaciens* 野生分離株に対して芽胞形成率上昇と抗生物質イツリン A 産生量の亢進を示す。本研究では、オカラに含まれる *B. amyloliquefaciens* 芽胞形成誘導物質 (SIF) の探索・単離精製・構造決定を試み、その結果、SIF としてジアセトナミン (**1**) を同定した。また、化合物 **1** とそのアナログ類縁体を含めて *Bacillus* 芽胞誘導活性 (SI 活性) を比較し、芽胞形成誘導活性物質の構造活性相関についても検証と考察を試みた。また、この物質の発酵工学への応用の可能性についても検討した。

2. 方法

オカラ (湿重量 10 kg) MeOH 抽出液を減圧濃縮後、水に再溶解し hexane, EtOAc, *n*-BuOH の順に液液分配した。唯一、活性が確認された水層画分について、Sephadex G-10, Sephadex LH-20, CM-cellulose, DEAE-cellulose, Sephadex G-25, 順相シリカゲルの各種カラムクロマトグラフィーに供し、得られた分画物の SI 活性を指標として活性物質を追跡した。被検菌とした *Bacillus* 属細菌の芽胞化アッセイには、NB 液体培地で往復振盪 (30°C, 48 h, 100 rpm) 後、遠心分離で集菌した前培養菌体を 10 mL の MSG (Minimal Salts medium + Glutamate) 液体培地に再懸濁したものをを用いた。そこへ、試験する抽出物分画物 (オカラ 1 g 新鮮重相当量), 化合物 **1** あるいはその各種類縁体 (終濃度 4~400 μ M) を添加し、30°C でさらに 48 h 往復振盪培養 (80 rpm) した。培養終了後、菌体を LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit® で蛍光染色し、芽胞様菌体を蛍光顕微鏡下 (1500 倍率) で観察・計測した。

3. 結果・考察

最終的に得られた、SI 活性を示す精製画分は、順相 TLC 上、アニスアルデヒド硫酸試薬で桃色に呈色するスポットを与えたが、FD-MS で 5 種類の低分子化合物からなる混合物であることが分かった。この画分 (450 mg) のうち 25.4 mg をアセチル化し、主要な生成物を PTLC で 4.1 mg 得た。このアセチル化物について各種 MS 分析および NMR 解析を行い、この化合物を、先の混合物の主要成分から誘導された *N*-アセチルジアセトナミン (**1a**) と同定した。一方、市販の化合物 **1**・シュウ酸塩から化合物 **1a** を調製し、これがオカラから得た最終精製物アセチル誘導体と完全に一致することを確認した。また、化合物 **1**・シュウ酸塩から塩酸塩 **1b** を調製し、これが 40 μ M で芽胞形成を誘導することも確認した。化合物 **1** のアナログ類縁体 6 種を芽胞形成試験に供したところ、ジアセトンアクリルアミド (**2**) が化合物 **1** よりも強い SI 活性を有することが分かった。化合物 **1** および **2** は、40~400 μ M で *B. thuringiensis* および *B. megaterium* に対しても芽胞化を誘導することから、ジアセトナミンの芽胞誘導活性は多様な *Bacillus* 属細菌に対して認められることが示唆された。

今後、**1** 処理で活性化する芽胞形成誘導関連遺伝子の特定が期待される。

