

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 LIU Ying

論文題目 Biosynthetic study of miuraenamide A, an antifungal antibiotic of a slightly halophilic myxobacterium

(亜好塩性粘液細菌の抗真菌抗生物質 miuraenamide A の生合成に関する研究)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 小鹿 一

委 員 名古屋大学教授 西川俊夫

委 員 名古屋大学教授 北 将樹

委 員 名古屋大学准教授 恒松雄太

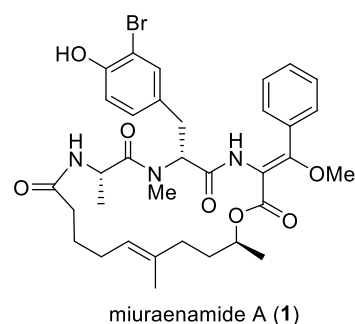
委 員 名古屋大学講師 近藤竜彦

論文審査の結果の要旨

LIU Ying は、難培養性ながら新規な生物活性天然物を生産する潜在能力を持つ粘液細菌の一種について、詳細なゲノム解析を行うとともに、本菌が生産する抗真菌性抗生物質の生合成遺伝子群の異種発現による効率的生産に成功した。以下にその要旨を記載する。

1. 背景

滑走性および子実体形成を特徴とする希少細菌である粘液細菌は、医薬品リードの新しい微生物工場として近年注目されている。粘液細菌の二次代謝産物の中には抗がん剤として開発されたものもある。粘液細菌のうち好塩性（海洋性）種は非常に希少で分離・培養が困難だが、遺伝子的に新規構造をもつ生物活性二次代謝産物を生み出す大きな可能性を有している。神奈川県海岸近くの砂から発見された *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4 は強力な抗真菌性抗生物質 miuraenamides A (1) を生産するが、培養に 2 週間を要し生産性は 1 mg/L と低い。この論文では、1 の効率的生産を目指して生産菌のゲノム解析、生合成遺伝子クラスターのクローニングと異種発現を行った。

2. 粘液細菌 *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4 のゲノム解析

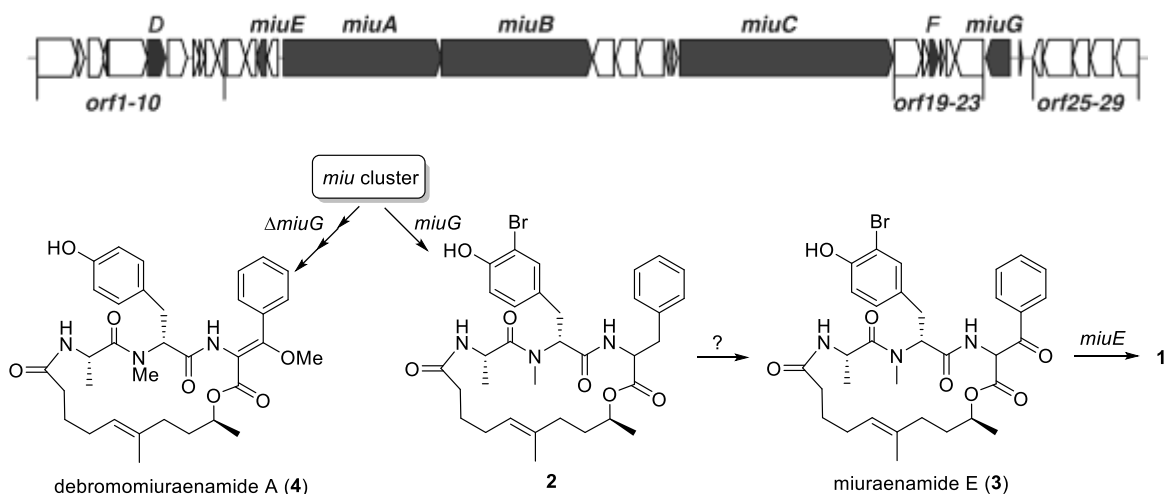
Miuraenamides A (1) 生産菌 *P. miuraensis* SMH-27-4 のドラフトゲノムとして、164 個のコンティグ（連続配列）からなる全長 11.8 Mbp の配列を決定した（完全なゲノムの 93% と推定）。GC 含量は 69.7% で、9,280 の遺伝子が含まれていた。菌株の発見者による形態学的観察等から Nannocystaceae 科の新属 *Paraliomyxa* として提唱されていたが、今回得られたゲノム配列に基づく系統解析から新属であることが支持された。二次代謝予測ツールにより 17 の生合成遺伝子クラスター（BGC）が検出され、そのうちの 1 つである type I polyketide synthase/nonribosomal peptide synthase hybrid (PKS/NRPS) は、遺伝子機能解析に基づいて miuraenamides A の BGC であると推定された。他の 16 の BGC には、別の 2 つの PKS/NRPS hybrid、4 つのテルペノイド、1 つのシデロフォア、1 つの NRPS などの生合成遺伝子クラスターが含まれていた。これらは以前に報告された既知物質の BGC と類似性が低いか無いことを示し、この菌株が新規の二次代謝産物を多数生成する大きな可能性をもつことを示唆した。

3. Miuraenamides A 生合成遺伝子クラスターの同定と異種発現

塩基配列から推定された miuraenamides A (1) 生合成遺伝子クラスター (*miu*) は 36 個の orfs（計 85.9 kbp）からなる（下図）。このうち 3 つのコア遺伝子 *miuA*-

論文審査の結果の要旨

miuC の産物 (MiuA/MiuB (PKS) および MiuC (NRPS)) は 5 つの C2/C3 カルボン酸と 3 つのアミノ酸を順次結合して初期中間体 **2** を生成し、4 つの遺伝子 miuD-miuG の産物は修飾酵素であると推定された。遺伝子クラスター全長が制限酵素 BlnI で切り出しできることを利用して、陸生粘液細菌の一種 *Myxococcus xanthus* に形質転換した。しかし、構築された形質転換体 *M. xanthus::miu* の miuraenamide A 生産性は 0.06 mg/L と元の SMH-27-4 株の 6% に過ぎなかった。修飾酵素の機能を証明するため形質転換体を用いて遺伝子破壊実験を行った結果、MiuE (O-メチルトランスフェラーゼ) はメチルエノールエーテル形成 (**3**→**1**) に、MiuG (ハロゲナーゼ) はチロシンの臭素化に関与していることを証明した(下図)。たとえば遺伝子 miuG を破壊すると非天然物 debromomiuraenamide A (**4**) が生成した(下図)。MiuD (シトクロム P450) と MiuF (チオエステラーゼ) は、それぞれ酸化反応 (**2**→**3**) と酵素からの切り出し/環化 (**2** の生成) に関与することが予想されたが否定され、機能未知の遺伝子産物によると考えられた。次に、連続した機能未知の orf 領域 4 つを順次除去し **1** の生産性を調べた結果、2 つの領域 (orf25-29 および orf19-23) の除去により **1** の収量が大幅に増加し (0.7 mg/L)、さらにこの変異体に 3-bromo-L-tyrosine を添加して培養すると生産性が 1.2 mg/L まで向上した。この量は元の SMH-27-4 株と比較して同等以上であり、変異体の増殖速度 (培養時間 4 日) を考慮すると約 5 倍の効率であった。機能未知の orf のさらなる詳細な解析により、実用化に耐えうる生産性を実現できる可能性が期待できる。



以上のように、LIU Ying はゲノムの解析と改変技術を駆使して、難培養性細菌の二次代謝産物生合成遺伝子を巧みに利用し抗生物質の効率的生産を達成し、この研究分野に重要な成果の一例を提示した。したがって、本委員会は本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。