

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 孫 雨 偉 (SUN, Yuwei)

論 文 題 目

Biosynthetic analysis of marine myxobacterial secondary metabolites

(海洋性粘液細菌二次代謝産物の生合成解析)

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	柘 植 尚 志
委 員	名古屋大学准教授	中 川 優
委 員	名古屋大学助教	近 藤 竜 彦

論文審査の結果の要旨

医薬品の約半数は抗生物質など天然有機化合物を基に開発されてきた。しかし近年、構造的に新規性の高い化合物の発見数が大きく低下し、新薬開発を困難にしていることが指摘されている。この課題に対する解決法は、人類が培養できる微生物種は実際に環境中に生息する種の1%程度という見積もりに基づくものであり、99%の未利用微生物資源の利用、例えば培養法の工夫や抗生物質生合成遺伝子の利用などが考えられる。こうした未利用微生物の1つに「粘液細菌」が知られている。粘液細菌は環境中に普遍的にしながら分離し培養することが困難な難培養微生物である。本研究では、粘液細菌の中でも特に珍しい海洋性粘液細菌の最初の例である *Haliangium ochraceum* が生産する抗生物質の生合成遺伝子とその利用を目指した。

H. ochraceum からはこれまでに抗真菌性ポリケチド化合物 *haliangicin* が発見されていたが、その生産性は約 1 mg/L と低く、培養に2週間を要する。この低い生産性を格段に高めるため、*haliangicin* 生合成遺伝子群 "*hli*" のクローニングと易培養性微生物を宿主とした異種発現を試みた。まず、生産菌 *H. ochraceum* のゲノムライブラリー（コスミドライブラリー）を作成し、ポリケチド生合成遺伝子に良く保存された塩基配列をプローブに2つのクローンに絞った。これらのゲノム由来断片は両者で *hli* 全長をカバーしていると予想されたので、培養しやすい陸生粘液細菌 *Myxococcus xanthus* のゲノムに順次導入した。得られた組み換え宿主は5日間の培養で元の生産菌と同等の *haliangicin* 生産性を示し、異種発現に成功した。この結果、*haliangicin* に関する様々な実験が容易になった。まず、安定同位体標識した生合成前駆体（酢酸、プロパン酸、グリセロール、メチオニン）を培地に添加した実験で、分子構造のどこにこれら前駆体を取り込まれるかを明らかにできた。この実験は、生産性の低い *H. ochraceum* では困難であった。次いで、*haliangicin* 生産性のさらなる向上を目指してこれらの前駆体を培地に添加して培養を行ったところ、酢酸ナトリウムを添加した場合においてのみ濃度依存的に生産性が向上し、酢酸ナトリウム 200 mM を添加した場合、最大約 11 mg/L の生産量を記録した。培養日数が 1/3 に短縮したことと合わせると約 30 倍の効率化を達成したと言える。以上の結果、異種発現株には *haliangicin* 生合成遺伝子が完全な形で導入されたことが証明できた。そこで生合成遺伝子 *hli* の塩基配列を詳しく調べた結果、5つのポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子と16の修飾酵素遺伝子からなる全長 47.8 kbp のクラスターであることが判った。この遺伝子構造を *haliangicin* の化学構造と対応させるため、相同検索により各遺伝子の機能予測を行った結果、ジプロピオネートを出発として *hliS*→*hliT*→*hliP*→*hliG*→*hliF* の順に炭素骨格を伸長し、*hliL*·*hliM*·*hliN*·*hliO*·*hliC* のセット (β -methyl branching cassette) が 9-メチル枝分れ構造を、*hliH*·*hliI*·*hliJ*·*hliK*·*hliQ* のセット (methoxymalonyl-ACP cassette) が 3,4-dimethoxy 構造を構築すること、*hliR*, *hliD*, *hliU* がそれぞれ末端二重結合、1-OMe、12,13-エポキシ基の形成に関与することが予想された。これらの予

想を証明するため、*hliR*, *hliD*, *hliU* 遺伝子の各破壊株を作成した結果、それぞれ末端二重結合を欠損した 14,15-飽和体、メチルエステル化されなかったカルボン酸誘導体、12,13 位二重結合がそのまま残った脱エポキシ体が得られた。これらは全て本来の生産菌の培養では得ることのできない *haliangicin* 類縁体であった。さらに、末端脱水素反応に関与すると思われた酵素遺伝子 *hliR* の機能解析を行うため、大腸菌で組換えタンパクを作成し、16 種の各種短鎖アシル-CoA 類似化合物（アシル-SNAC）と反応した。その結果、この酵素は α,β -不飽和ペンタン酸誘導体を 4 時間で 100%ジエンに変換できる γ,δ -脱水素酵素であることが判明した。他のアシル-SNAC は部分的に変換されるか全く変換されないことから、基質特異性の高い酵素であることが判った。遺伝子破壊実験で得られた 2 種の非天然型誘導体（14,15-飽和体、12,13-脱エポキシ体）について抗疫病菌活性と HeLa 細胞に対する細胞毒性を調べた。その結果、14,15-飽和体は天然 *haliangicin* と同等の抗疫病菌活性を示すが、脱エポキシ体は活性が低下することが判った。一方、興味深いことに、細胞毒性試験では脱エポキシ体が *haliangicin* より高い阻害作用を示した。以上の結果は、培養困難な微生物の抗生物質でも、異種発現を利用することでその生産量と多様性を向上させることが可能であることを示す。

海洋性粘液細菌 *H. ochraceum* のゲノム配列を調べると、上記 *haliangicin* 生合成遺伝子群の他に少なくとも計 6 個の PKS（ポリケチド合成酵素）または NRPS（非リボゾームペプチド合成酵素）遺伝子群が存在する。そこで培養物中から他の二次代謝産物を探索した結果、新規化合物 *haliamide* を発見した。この化学構造から生合成遺伝子群の 1 つが *haliamide* 生合成遺伝子であると予想した。そこで取込実験により生合成前駆体を確認し、その結果と塩基配列情報からモジュール構造を含めた *haliamide* 生合成遺伝子群 *hla* の構造と生合成機構を推定した。その他の遺伝子配列から予想される二次代謝産物はまだ発見されていないので、今後、これらの代謝物の発見が待たれる。

以上のように孫 雨偉の成果は、難培養性ながら新規性の高い二次代謝産物を生産する潜在能力を秘めた微生物の遺伝子に着目したものであり、新たな医薬・農薬のシーズ発見への展開が期待できる点で当該分野の学術研究に大きく貢献するものと言える。よって本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認め、論文審査に合格と判定した。