

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 戸村友彦

論文題目

疫病菌交配ホルモン生合成機構の解明に
向けた基盤研究および粘液細菌新規二次
代謝産物の化学的研究

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	北	将樹
委員	名古屋大学准教授	中川	優
委員	名古屋大学講師	近藤	竜彦

論文審査の結果の要旨

戸村友彦の博士論文は微生物が生産する生理活性物質に関する研究であり、2部からなる。第1部では農業上重要な真核病原微生物の繁殖ホルモンの生合成について、第2部では難培養性の海洋性細菌の生産する新規生理活性物質の構造と生理作用について論じている。

1. 疫病菌交配ホルモン生合成機構の解明に向けた基盤研究

農作物に甚大な被害を与える疫病菌 (*Phytophthora* 属糸状菌) は、有性生殖により急速な薬剤耐性化を起こすため、その分子メカニズムの解明は疫病菌防除につながる重要な課題と言える。疫病菌の有性生殖は、2つの交配型 A1 と A2 が出会い、相手が分泌する交配ホルモン (α_2 と α_1) を認識することで開始される。これまでに両ホルモンの化学構造、生合成前駆体などの化学的基盤が解明されてきたものの、その作用機構や生合成機構など未解明な点が多い。本研究では、交配ホルモンの生合成機構の解明を目指した。

これまでの研究で交配ホルモンは $\text{phytol} \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_1$ の経路で各交配型により生合成されることが判った。各段階はアルカンの水酸化 ($\text{C-H} \rightarrow \text{C-OH}$) で進行するため、その生合成酵素は A1, A2 交配型がそれぞれ持つ特異的なシトクローム P450 と仮定した。そこで、 α_2 を生産する *P. nicotianae* の菌体から粗タンパクを抽出し、NADPH を含む反応液中で phytol と反応させ、生成する α_2 を LC/MS で検出・定量したが、 α_2 の生成を検出できなかった。そこで、菌体の破碎程度を変えて α_2 の生産を調べたところ、僅かでも破碎操作を行うと α_2 の生成は起こらなくなることが判明した。一方、 α_1 を生産する 2 種 *P. nicotianae* と *P. cryptogea* から粗タンパクを抽出し、前駆体である α_2 を加えて同様に反応したところ、 α_2 から α_1 への変換が確認され粗タンパク質に生合成酵素が含まれることが証明できた。しかし、収率がそれぞれ 0.2%、0.006% と極めて低いこと、上述のように A2 交配型を用いた α_2 生合成酵素アッセイでは α_2 生合成は全く確認されなかったことから、生化学的手法による生合成酵素の精製は困難と考えられたため、遺伝子発現解析 (RNA-seq) により生合成酵素を探索することにした。

RNA-seq 解析を行うにあたり、ゲノム情報が公開されている *P. nicotianae* と *P. capsici* についてホルモン生産量 (生合成酵素の発現) に影響を与える因子を種々検討した。その結果、培養日数や培地を工夫することで RNA-seq に適した菌体サンプルを得た。最終的に *P. nicotianae* 2 株 (α_1 生産株、 α_2 生産株) と *P. capsici* 3 株 (α_1 生産株、 α_2 生産株、非生産株) の菌体から RNA を抽出し RNA-seq 解析を行った。シトクローム P450 に絞って解析した結果、*P. capsici* の 34 個の P450 遺伝子のうち 3 個の発現量が α_2 生産株で他の 2 倍になっており、これらが α_2 生合成酵素候補遺伝子と考えられた。一方、*P. nicotianae* の遺伝子のうち上記候補遺伝子と類似性を示し

P450 をコードし発現量が $\alpha 2$ 生産株で2倍以上（および1/2以下）になる遺伝子が6個（及び1個）見出され、これらが本菌種の $\alpha 2$ （及び $\alpha 1$ ）生合成酵素候補と考えられた。今後、これら候補遺伝子の組換えタンパク質や遺伝子サイレンシングを駆使して機能解析することで生合成酵素の特定に繋がることが期待される。

2. 粘液細菌新規二次代謝産物の化学的研究

希少微生物である粘液細菌は、様々な生理活性を示す二次代謝産物を生産するため、医薬品シードの探索源として注目されている。本研究では、特に培養が難しい海洋性粘液細菌の1種 *Enhygromyxa niigataensis* に着目し、新規二次代謝産物を探索することを目的とした。

E. niigataensis SNB-1 の培養液から酢酸エチル可溶性画分を得た。これをシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーおよび2回の逆相 HPLC で分離し、HeLa-S3 癌細胞に毒性を示す物質を得た。各種 NMR および MS 解析より、この成分は天然では極めて稀な decahydroacenaphthylene 骨格を有する新規ジテルペンであり、enhygromic acid と命名した。さらに別のフラクションから、既知化合物の新規類縁体（フェノール基がフェニル基になった類縁体）として deoxyenhygrolide A および B を得た。Enhygromic acid の絶対配置は NOESY 相関、配座解析および CD スペクトル解析により、4*S*,5*S*,9*R*,10*R*,13*S* と決定した。これら新規化合物の生物活性を評価したところ、enhygromic acid は B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性 ($IC_{50} = 46 \mu M$)、PC12 細胞に対する神経成長因子 (NGF) の神経様突起伸長活性の増強作用 (67%, $10 \mu M$)、*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性 ($MIC = 8 \mu g/mL$) を示した。一方 deoxyenhygrolide A および B は、本研究で用いた生物検定では活性を示さなかった。Enhygromic acid は4つの isoprene から成るためジテルペンであると考えられるが、近縁種 *E. salina* のゲノム情報を antiSMASH (塩基配列から生合成産物を予測するソフト) で解析したところ、ジテルペン環化酵素をコードする遺伝子はなく、代わりにセスキテルペン合成酵素である pentalenene synthase の相同配列が存在した。したがって、enhygromic acid は pentalenene の前駆体 α -humulene から環化とイソプレニル化を経て生合成されると推定した。今後、生合成機構の解明とともに、誘導化による高い生理作用をもつ物質の開発が期待される。

以上のように戸村友彦の成果は、微生物の繁殖システムを分子レベルで理解するための重要な基盤の確立や、抗菌剤や神経疾患治療薬など医農薬への展開が期待される物質の発見など、当該分野の学術研究に大きく貢献するもの言える。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。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	戸村 友彦
試験担当者	主査 小鹿 一、北 将樹、中川 優、近藤竜彦			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年 8月 1日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				