

審査の結果の要旨

氏名 トン ウェイ リー

放線菌は、有用な二次代謝産物のスクリーニング源として用いられており、これまでに多くの臨床薬が放線菌から単離されてきた。しかしながら近年、放線菌からの新奇化合物の単離報告例が減少している。一方で、ゲノムシーケンスが容易になったポストゲノム時代に入り、一放線菌のゲノム当たり、20 から 30 個の二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかにされている。このことは、一放線菌は 20 から 30 個の二次代謝産物の生産能を持っていることを示しているが、実際には、数個の二次代謝産物の同定にとどまっているにすぎない。このように、実際に単離された二次代謝産物の数とゲノム情報からの二次代謝産物の見積もり数の大きな差は、一部の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが通常の研究室での培養条件では発現していないか、あるいはその発現量が少ないために、潜在的な二次代謝産物が見逃されている可能性を示唆している。本研究では、そのような潜在的な二次代謝生合成遺伝子クラスターの発現を人工的に活性化させることで、新奇な骨格を含む天然化合物の同定に成功している。さらには、その生合成遺伝子クラスターを同定して機能解析を行い、それらの生合成機構についても考察している。

本論文は、天然化合物の生合成遺伝子クラスターの人工的な発現方法などを記述した序論に続き、第 1 章から第 4 章の 4 つの章によって構成されている。

第 1 章では、20 株の放線菌を抗生物質であるリファンピシンの存在下で培養し、高濃度のリファンピシン存在下においても生育可能な自然耐性を獲得した 278 株のリファンピシン耐性 (rif) 変異株の単離について述べている。さらに、これらの rif 変異株のうち 200 株を培養し、そのうちの 2 株が、それぞれの親株と比較して新たに検出された代謝物、または生産量が増大した代謝物を生産することを確認している。

第 2 章では、前章で選抜した 2 株の rif 変異株の生産する目的化合物の精製と構造解析について述べている。このうち、*Streptomyces* sp. SANK 60404 由来の rif 変異株 TW-R50-13 株が生産する化合物 3 と化合物 3a は、部分構造としてメチルベンゼン骨格と C₅N ユニットを含む新奇化合物と同定している。また、

Streptomyces sp. SoC090715LN-16 (S55)由来の rif 変異株 S55-50-5 株の生産する化合物 7 は、isoindolinone 骨格を含む新奇な 4 環性のポリケタイドであると同定している。さらに、それぞれの新奇化合物の生物活性を検討し、化合物 3 と化合物 3a は顕著な生物活性は示さないが、化合物 7 は SKOV-3、Meso-1、Jurkat 細胞に対して細胞毒性を示すこと、*Staphylococcus aureus* に対して抗菌活性を示すことを明らかにし、化合物 7 を isoindolinomycin と命名している。

第 3 章では、化合物 3 と化合物 3a の生合成遺伝子の同定と生合成経路の推定について述べている。メチルベンゼン環の生合成機構の推定のため、¹³C 標識酢酸ナトリウムを用いたトレーサー実験を行い、この環状構造が I 型 PKS によって生合成されたポリケトメチレン鎖が形成された後に環化してベンゼン環が生成すると推定している。次いで、SANK 60404 株のドラフトゲノム配列から、PKS を含む遺伝子クラスターを選抜し、それぞれの PKS 様遺伝子の遺伝子破壊とその破壊株の代謝産物を分析することで、化合物 3 と化合物 3a の生合成遺伝子を同定している。この PKS 様遺伝子は既知の PKS とは異なる点が多く、全容解明には至らなかったが、ポリケタイドの新奇な生合成機構を提唱している。

第 4 章では、isoindolinomycin の生合成遺伝子の同定と生合成経路の推定について述べている。S55 株のドラフトゲノム配列からクロル化に関与する酵素遺伝子を含む 2 つの遺伝子クラスターを見出し、次いで、遺伝子破壊によって、isoindolinomycin の生合成遺伝子クラスターを同定している。さらには、各種遺伝子破壊株が蓄積する生合成中間体の構造決定、および isoindolinone 骨格形成の鍵酵素の一つである NRPS 酵素を用いたインビトロアッセイにより、グリシンを開始基質とする II 型 PKS による骨格形成に続く isoindolinomycin 生合成経路の全容を推定している。

以上の研究成果は、放線菌の生産する二次代謝産物の可能性をさらに拡大するとともに、新奇な生合成機構を提供するものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。