

博士論文

海綿由来メタゲノムライブラリを用いた多様な
機能発現遺伝子と生物活性物質の探索

平成 28 年 3 月

竹重勇哉

目次

序論

天然資源由来医薬品	3
海洋資源由来医薬品	4
海洋資源由来医薬品の問題.....	6
難培養性微生物の存在とその利用.....	6
メタゲノムライブラリを用いたスクリーニング.....	7
本研究の目的.....	12

本論

第 1 章 メタゲノムライブラリの構築.....	14
第 2 章 色素産生試験.....	18
第 3 章 抗菌活性試験.....	25
第 4 章 抗酸化活性試験.....	43
第 5 章 その他のスクリーニング系への適応.....	55

総括.....	61
---------	----

実験項.....	63
----------	----

Appendix.....	88
---------------	----

参考文献.....	100
-----------	-----

謝辞

序論

天然資源由来医薬品

植物、セイヨウイチョイより単離されたタキサン系に類する抗悪性腫瘍剤 **paclitaxel**¹⁾ や芥子由来の鎮痛薬 **morphine**²⁾、あるいは 1928 年にフレミングによって発見された青カビ由来のペニシリン³⁾等に代表される様に、天然資源からはこれまでに多種多様な医薬品リード化合物が単離・報告され、医薬品として上市されている (Figure 1)。⁴⁾

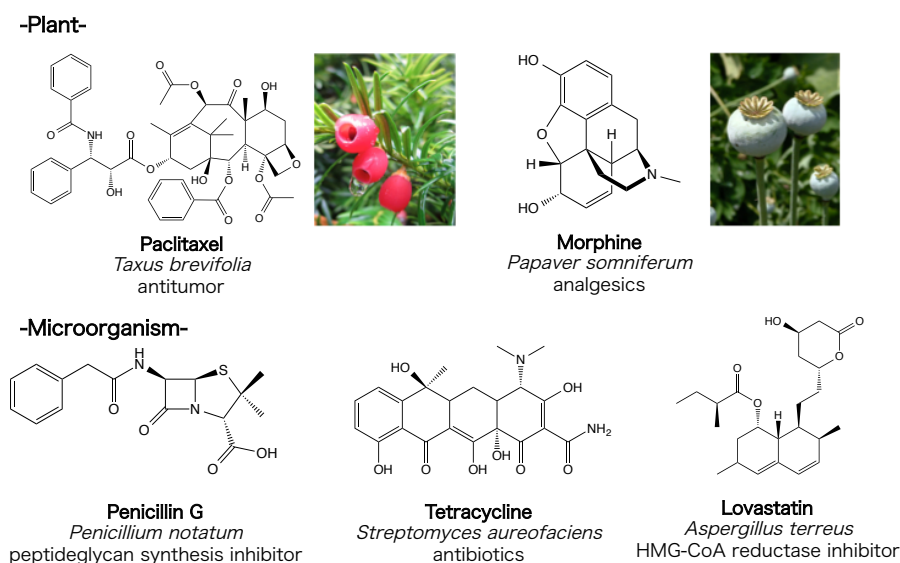


Figure 1. 植物・微生物由来医薬品の例

それらに合わせる様に、高分解能 MS 解析⁵⁾や微量サンプルでの構造決定⁶⁾等、化合物分析技術も飛躍的な進歩を遂げている。その為、現在でも植物あるいは微生物からは非常に多くの新規化合物が報告されている。しかしながら近年、医薬品の上市数にある問題が生じている (Figure 2)。

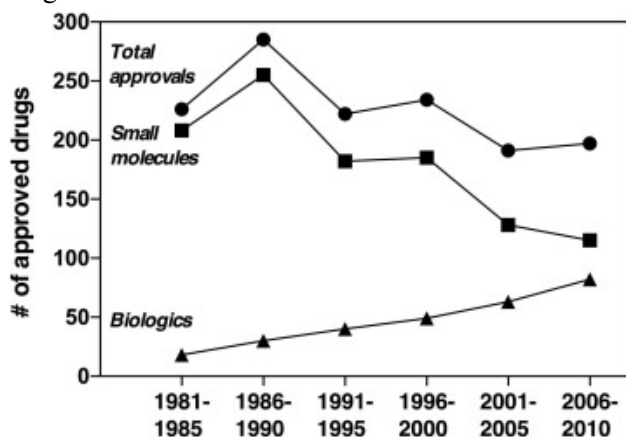


Figure 2. 医薬品上市数の推移

Figure 2 は 1991 年から 2010 年までの医薬品上市数に関して、5 年毎にその推移をまとめたグラフである。⁷⁾ 化学技術の発展に伴い、▲で示した関節リウマチ治療薬等が知られる生物製剤が増加傾向にある事に対して、●で示された医薬品の全上市数が年々減少している事が見てとれる。また、これらの中で特筆すべきは■で示した低分子化合物の上市数の推移である。生物製剤上市数の増加に反して、年が経つ毎にその減少が見てとれる。

この原因の一つに、新規骨格を有する化合物の報告例が少なくなっている事が挙げられる。近年新規化合物として報告される化合物は、これまでに単離・報告されてきた化合物の類縁体も多く、医薬品リード化合物として利用可能な新規化合物の探索は困難となっている。

その為、これまでに扱われていない新たな探索資源が求められている。そこで、上に示した植物資源あるいは微生物資源に次いで近年注目を集めている資源が海洋生物由来の天然資源である。地球上で広大な面積を持ちながらも、その資源探索は土壌のそれと比較して困難である事から、未だ開拓されていない資源が海洋には眠っていると期待される。⁸⁾

海洋資源由来医薬品

これまで、ホヤ、ウミウシ、海綿等の海洋生物からは、抗腫瘍活性、抗菌活性、酵素阻害活性等、多種多様な活性を示す新規化合物が数多く見出されており⁹⁾、いくつかの化合物は臨床試験を通過し上市されている (Table 1)。

Table 1. 医薬品認可を受けた海洋資源由来医薬品

Compound name	Collected sources	Biosynthetic source	Molecular target	Disease area
Ziconotide	Cone snail	Cysteine knot peptide	N-type Ca channel	Pain
Vidarabine (Ara-A)	Sponge	Nucleoside	Viral DNA polymerase I	Antiviral
Cytarabine (Ara-C)	Sponge	Nucleoside	DNA polymerase	Cancer
Omega-3-acid ethyl esters	Fish	Microalgae	Triglyceride-synthesizing enzyme	Hypertriglyceridemia
Trabectedin (ET-743)	Tunicate	Bacterium	Minor groove of DNA	Cancer
Eribulin Mesylate	Sponge	Bacterium	Microtubules	Cancer
Brentuximab vedotin	Mollusk	Cyanobacterium	CD30 and microtubules	Cancer

例えば、イモ貝の 1 種であるヤキイモ *Conus magus* より単離されたペプチドを基に設計された Ziconotide は、2004 年 12 月末に米食品医薬品局 (FDA) により鎮痛剤を認可された。¹⁰⁾ 他の治療法が効かない重度疼痛の治療薬として上市され、海洋生物、特に無脊椎動物が医薬品開発に貢献し得る可能性を示した初の例である (Figure 3)。

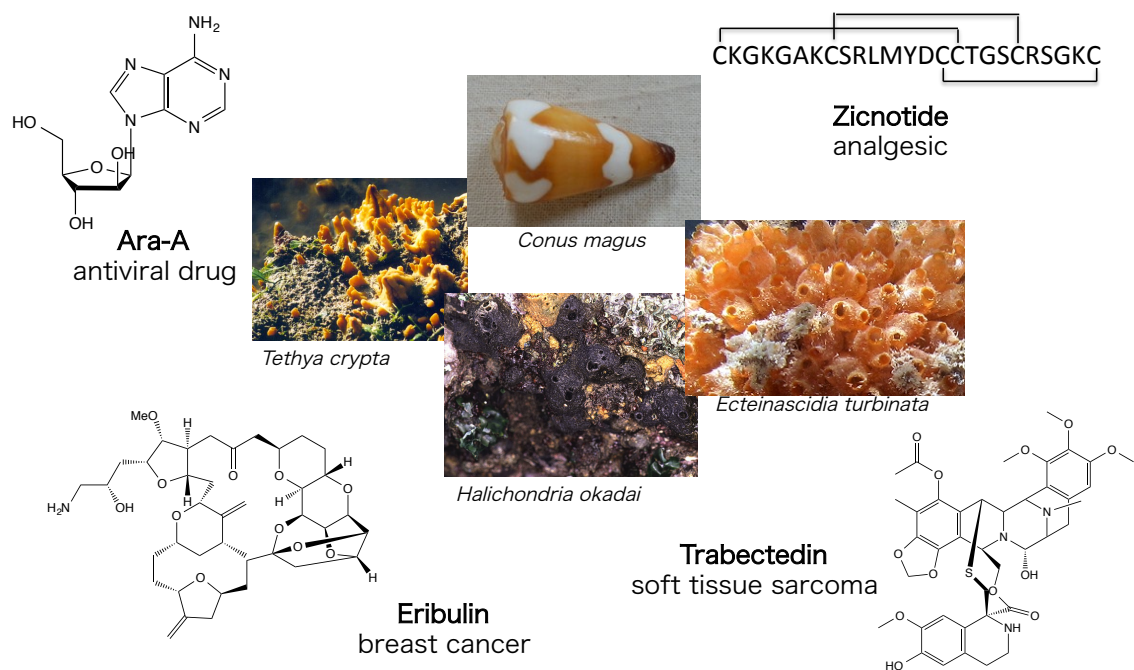


Figure 3. 海洋資源から上市された医薬品

また、クロイソカイメン *Halichondria okadai* より単離された Halichondrin B¹¹⁾の構造を簡略化し、活性を維持した化合物 Eribulin mesylate (Halaven)¹²⁾も上市された。FDA は、後期乳癌で既に 2 種類以上の化学療法を受けている転移性乳癌患者の治療薬として本化合物を承認している (Figure 4)。

Halichondrin B は計 32 個の不斉炭素を持ち、約 160 工程という複雑な工程を経て全合成が報告されたが、その複雑さ故に大量供給の為の問題点が生じていた。その問題を解決したのが、構造を簡略化した Halaven の生産であった。¹³⁾活性を維持しながらも不斉炭素 20 箇所、35 工程にて Halichondrin B の構造を部分的に合成した Halaven の全合成を達成し、医薬品供給の問題点解決に大きな進展を齎した。¹⁴⁾

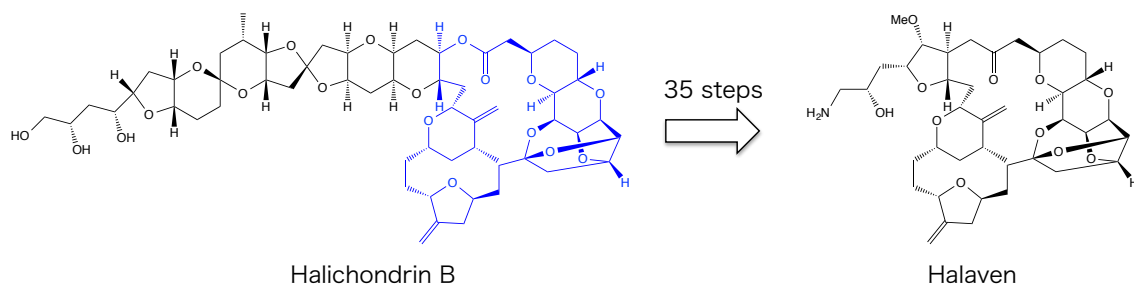


Figure 4. Halichondrin B から Halaven 合成の達成

以上の様に、海洋生物由来の医薬品は現在までに計9種類上市されており、その実用性は既に証明されている。¹⁵⁾ また、これらに続く形で多くの海洋生物資源由来の化合物も臨床試験の段階にあり、医薬品リード化合物の探索を行う為の資源として非常に期待の持てる天然資源であると言える (Table 2)。¹⁶⁾

Table 2. 臨床試験の段階に進んでいる化合物

Clinical status	Compound name	Collected sources	Biosynthetic source	Molecular target	Disease area
Phase III	Plitidepsin (Aplidine)	Tunicate	Bacterium	Rac 1 and JNK activation	Cancer
Phase II	DMXBA (GTS-21)	Worm	Worm	α 7 nicotinic acetylcholine receptor	Cognition
Phase II	Plinabulin (NPI 2358)	Fungus	Fungus	Microtubules and JNK stress protein	Cancer
Phase II	Elisidepsin	Mollusk	Bacterium	Plasma membrane fluidity	Cancer
Phase II	Zalypsis (PM00104)	Nudibranch	Bacterium	DNA binding	Cancer
Phase II	Glembatumumab vedotin (CDX-011)	Mollusk	Cyanobacterium	Glycoprotein NMB and microtubules	Cancer
Phase I	Marizomib	Bacterium	Bacterium	20S proteasome	Cancer
Phase I	Trabectedin analog	Tunicate	Bacterium	Minor groove of DNA	Cancer
Phase I	SGN-75	Mollusk	Cyanobacterium	CD70 and microtubules	Cancer
Phase I	ASG-5ME	Mollusk	Cyanobacterium	ASG-5 and microtubules	Cancer
Phase I	Hemiasterlin derivative	Sponge	Bacterium	Microtubules	Cancer
Phase I	Bryostatin 1	Bryozoan	Bacterium	Protein kinase C	Cancer, Alzheimer's
Phase I	Pseudopterosins	Soft coral	Bacterium	Eicosanoid metabolism	Wound healing

海洋資源由来医薬品の問題点

海洋生物由来の二次代謝産物の中には、上述した様に医薬品となり得る有望な化合物があるにも関わらず、上市の為にはいくつかの問題が生じている。

その原因の一つとして、Halichondrin B の様な物質供給の問題が挙げられる。海洋生物資源の採集は自然保護の観点から制限されており、採集量はわずかとなる為、海綿を養殖する試みも行われている。^{17, 18)}

また図にも示す通り、多くの海洋由来天然化合物はその構造が非常に複雑であり、化学合成は困難を極める。これまでも多くの化学者がこれらの化合物をターゲットとして合成を達成してきたが、その工程には数十ステップを要する物もあり、工業的なスケールでの実現は難しい状況である。

難培養性微生物の存在とその利用

こういった問題に対して近年、一つの興味深い知見が得られている。即ち、多様な活性を示す海洋資源由来の天然化合物の真の生産者が、その海洋生物に共生している微生物である、と言う可能性である。¹⁹⁾

同様の背景から、これら共生微生物を培養する事によって、大量に二次代謝産物を獲得する事が可能となるのでは、と期待が寄せられている。しかし近年、従来の実験室環境下での培養法では99%以上の微生物は分離・培養が困難である事が微生物生態学の成果として明らかになってきた (Table 3)。²⁰⁾

Table 3. 各環境中での培養可能な微生物の割合

生育環境	培養可能な微生物の割合 (%)
海水	0.001 ~ 0.1
淡水	0.25
中栄養湖	0.1 ~ 1
非汚染河口水域	0.1 ~ 3.5
活性汚泥	1 ~ 15
堆積物	0.25
土壌	0.3

上の表には各環境中における培養可能な菌の割合を示しているが、例えば分離源が海水のケースでは、培養可能な割合は 0.1%にも達せず、実験室での分離培養という当然の工程が、有用資源の利用への大きな妨げとなっている事が見てとれる。また、培養可能な割合が最も大きいとされる活性汚泥でもその割合は 15%である事から、ほとんどのバクテリアが培養困難である事も見えて取れる。

しかし裏を返せば、仮にこの様な難培養性微生物を資源として扱う事が出来れば非常に莫大な天然資源となる為、これら未開拓資源に対する利用法の確立が様々な方面から試みられている。その解決法の 1 つとして台頭してきた手法がメタゲノム解析である。

21)

メタゲノムライブラリを用いたスクリーニング

メタゲノムとは、遺伝子全体を示す言葉であるゲノムに、接頭語として高次元・複数の、という意味を持つ「メタ」を付けた用語であり、環境中に存在する微生物群全 DNA の混合体を指す (Figure 5)。

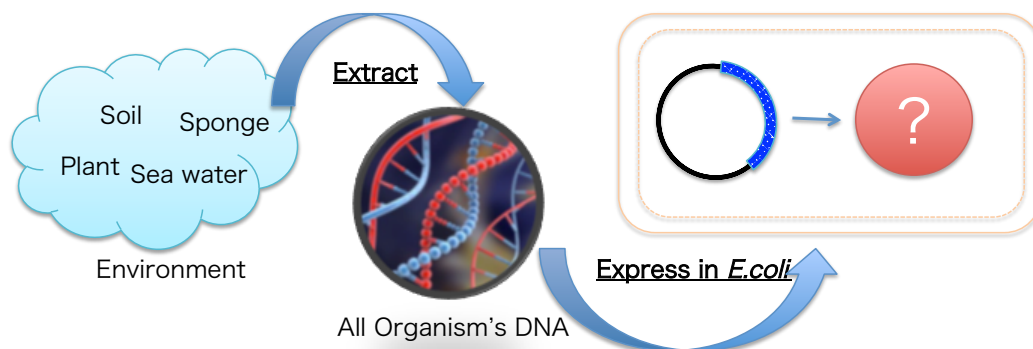


Figure 5. メタゲノムライブラリの概要

上の図に示す様に、特定の環境中（土壌・植物・海綿等）から、そこに生息する全ての生物の DNA を一挙に抽出する事でメタゲノム DNA が得られる。メタゲノム DNA を培養可能な宿主へと導入する事で、メタゲノムライブラリの構築が可能となった。²²⁾ メタゲノムライブラリは、上述した様に非常にバラエティに富んだ DNA ライブラリであり、これまでに利用する事が困難であった未開拓な資源を遺伝子として保存、複製、利用する事が可能となった。

様々な環境から構築したメタゲノムライブラリを用いるスクリーニング手法は大きく2種類に分類される。一つはこれまでに報告されている酵素の塩基配列を基に設計したプライマーを用いてライブラリに対して PCR を行い探索する手法である **sequence-based screening** である。もう一方は構築したメタゲノムライブラリの挿入遺伝子を宿主中にて発現させ、産生される化合物や酵素の生物活性や物性に基づいて探索を行う **function-based screening** である (Figure 6)。²³⁾

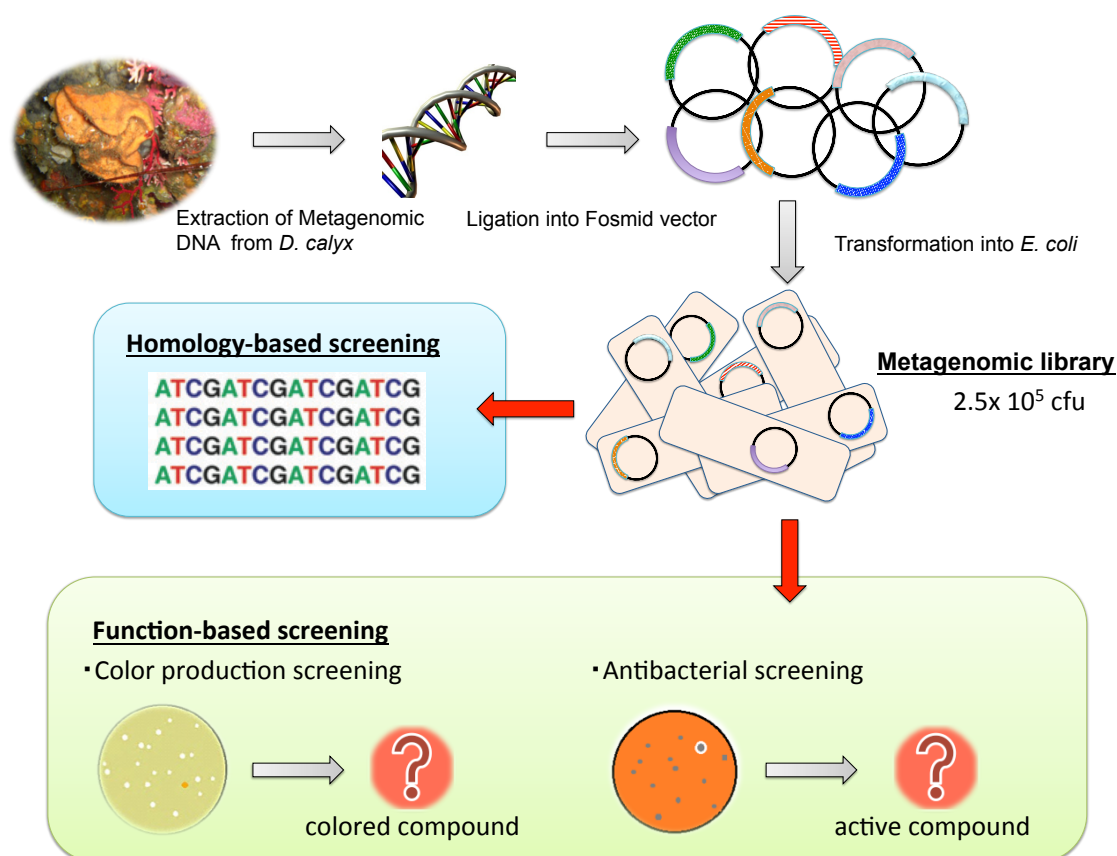


Figure 6. メタゲノムライブラリを用いたスクリーニング

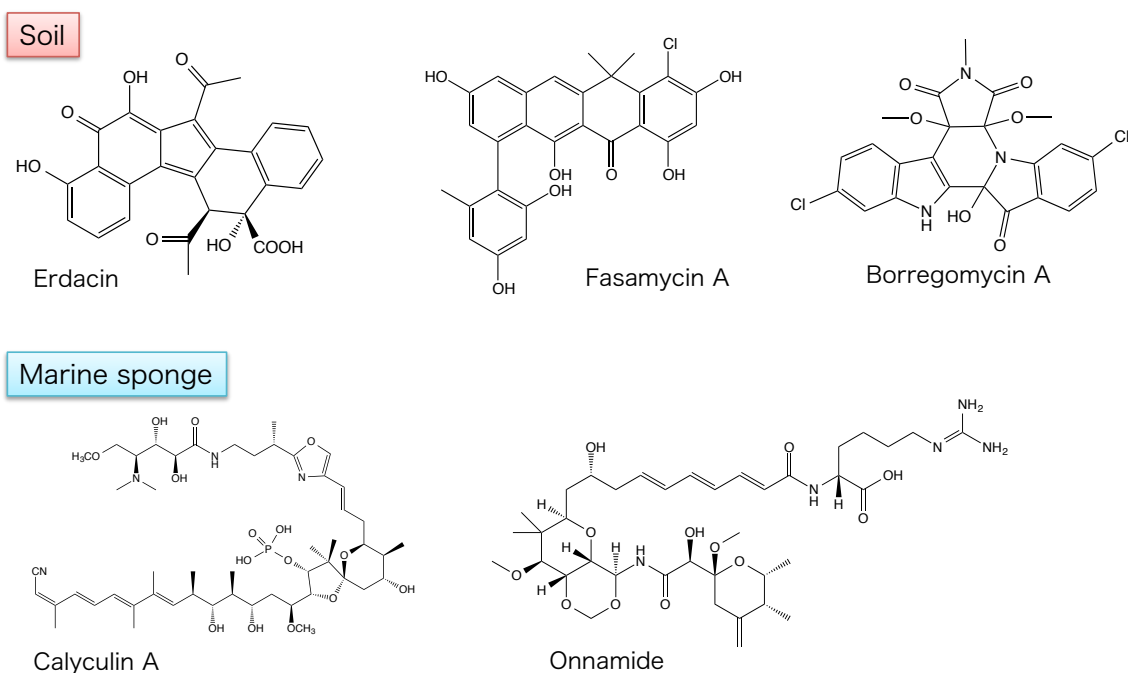
Sequence-based screening

Sequence-based screening は既存の酵素配列を鋳型として縮重プライマーを作製し、PCR の増幅によってスクリーニングを行う手法である。²⁴⁾ Sequence-based screening では、高次にクラスター化したポリケタイド化合物合成遺伝子群のスクリーニングの際にはその威力を大いに発揮する事ができる。

生理活性物質であるポリケタイド合成系のオペロンは 100kbp を超える巨大な遺伝子クラスターを形成しているものもあり、その中にはアミノ酸配列がよく保存された遺伝子が存在している。²⁵⁾ 現在は、この保存された配列を指標にメタゲノム由来の新たな合成遺伝子群のスクリーニングが行われている。²⁶⁻²⁹⁾ ポリケタイド化合物合成遺伝子群では一部の遺伝子に高い相同性がある場合でも、オペロン全体として何らかの新規性が得られれば、新規化合物が合成される期待が持てる。

Sequence-based screening を用いた生合成遺伝子報告例

下図にこれまでに sequence-based screening を用いて探索が行われた例を示す (Figure 7)。土壌、海綿等からメタゲノムライブラリの構築が達成され、Erdacin³⁰⁾、Fasamycin A³¹⁾、Borregomycin A³²⁾、Onnamide³³⁾ 等、複雑な骨格を持つ化合物の興味深い生合成知見が得られている。



Function-based screening

Sequence-based screening に対して、function-based screening は挿入されたメタゲノム DNA を宿主中で発現させ、生産された化合物の生物活性や物性、あるいは発現した酵素活性を指標としてスクリーニングを行う手法である。³⁴⁾ 構築したメタゲノムライブラリをプレート上で培養し、色素の産生、抗菌活性、あるいは分解酵素による基質の色調等々、その変化を捉える事でライブラリよりコロニーを選別する事が可能となる。

Table 4. Function-based screening を用いた分解酵素探索の一例

標的酵素	eDNA資源	ヒット数	スクリーニング数	使用ベクター	インサートサイズ (kbp)
Esterase	綿畑土壌	1	92000	plasmid	3.5
β -galactosidase	油田土壌	3	12000	plasmid	4.8
Esterase	南極土壌	1	10000	fosmid	30
Protease	砂漠土壌	1	30000	plasmid	6
		16	17000	fosmid	32
Amylase	海洋堆積土	1	20000	fosmid	30-40
Cellulase	コンポスト	4	100000	cosmid	33

Function-based screening を用いたスクリーニングでは、分解酵素の探索が多く報告されている。³⁵⁾ これはスクリーニング系が非常に簡便で、かつ未開拓資源から探索を行う為に、これまでに報告されている酵素とは活性の異なる物が発見されやすいと考えられる。一例を Table 4 に示したが、非常にユニークな資源を基にライブラリが構築され、*esterase*³⁶⁻³⁸⁾ や *protease*³⁹⁻⁴¹⁾ 等の加水分解酵素や、環境汚染物質の分解酵素⁴²⁻⁴⁴⁾ が見出されている。対象とする酵素が異なる為、一概には言い難いが、インサートサイズが大きくなるにつれ、クローンのヒット数も増加している様に見てとれる。

その一方で、コロニーの色調変化を捉える色素産生スクリーニング⁴⁵⁾ や、コロニー周辺に阻止円を示す様な抗菌活性⁴⁶⁾ を基にした探索法等、酵素活性ではなく酵素によって生産される化合物に準じたスクリーニングも行われており、2000 年に Wang らによって報告された terrazine 類⁴⁷⁾以降、色素化合物の violacein⁴⁸⁾ や indigo^{49, 50)}、抗菌活性を有する N-acyltyrosine^{51, 52)}、鉄キレート活性によって同定された vibrioferrin⁵³⁾ や bisucaberin⁵⁴⁾ といったシデロフォア等に加え、この他にも様々な化合物がメタゲノムライブラリから単離され⁵⁵⁻⁵⁸⁾、その生合成知見と共に報告されている (Figure 8)。

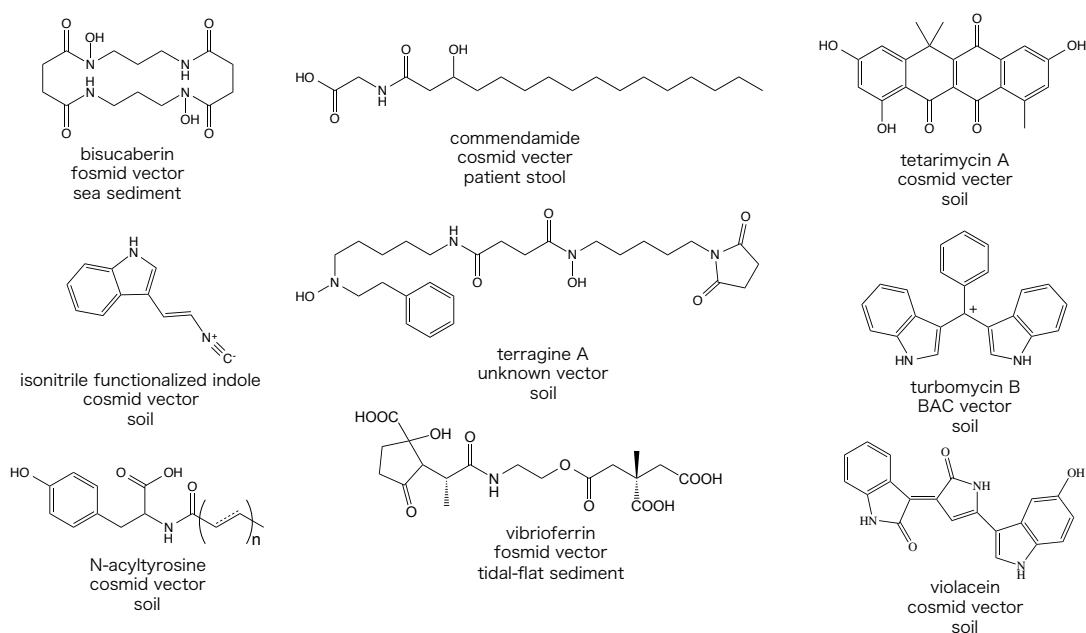


Figure 8. Function-based screening を用いた報告例

Function-based screening の利点

Function-based screening を用いて各試験系に対して陽性を示すクローンを見出す事が出来れば、『活性に対する化合物本体・その化合物の生産に関与する酵素・その酵素をコードする遺伝子』の生化学的に重要な3つのファクターを一挙に手に入れる事が出来る (Figure 9)。この点が function-based screening を探索手法として用いた際の大きな利点である。

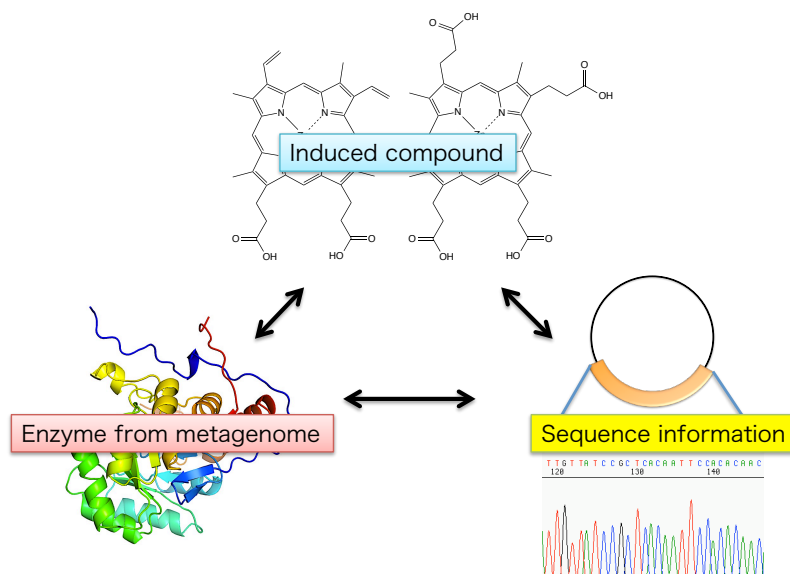


Figure 9. Function-based screening の利点

本研究の目的

以上の様に、海綿動物中には非常に多くの種の微生物が存在していると考えられ、それらを利用・解析する手段としてメタゲノム解析が台頭している。これまでも海綿動物由来メタゲノムライブラリを構築し、それらに対して **sequence-based screening** 及び **function-based screening** を用いて有用な二次代謝産物あるいは活性に関与する酵素の探索は行われてきたが、その報告数は他の資源由来メタゲノムスクリーニングと比較して少ない。とりわけ、**function-based screening** を用いて二次代謝産物を探索している例は顕著に少ない。そこで、海綿中に含まれる豊富な遺伝子資源が **function-based screening** を用いたメタゲノムライブラリへと適応可能か、海綿動物よりメタゲノムライブラリを構築し、有用な二次代謝産物の同定、及びその化合物生産に必要な遺伝子の同定を試みた。

本論

第1章 メタゲノムライブラリの構築

海綿動物

海綿動物は海綿動物門 Porifera に属し、多細胞動物の中で最も下等な動物の位置付けにあり、神経も筋肉も分化していない未発達な状態である。⁵⁹⁾ また、襟細胞室という養分を摂取する独特な器官を有する事も特徴である (Figure 10)。海綿の体の構造は、小孔(入水孔)→流入系→襟細胞室→流出系→中空→大孔(出水孔) からの流水系と、体を支持する骨格および数種の細胞群で構成されており、スポンジ状の構造を有する事から、様々な微生物の住処となっている。^{60, 61)} これが先述した共生微生物であり、多い物では海綿重量の約 40%が微生物である海綿も報告されている。⁶²⁾ その為、海綿動物は遺伝子資源として非常に魅力的な資源であると言える。

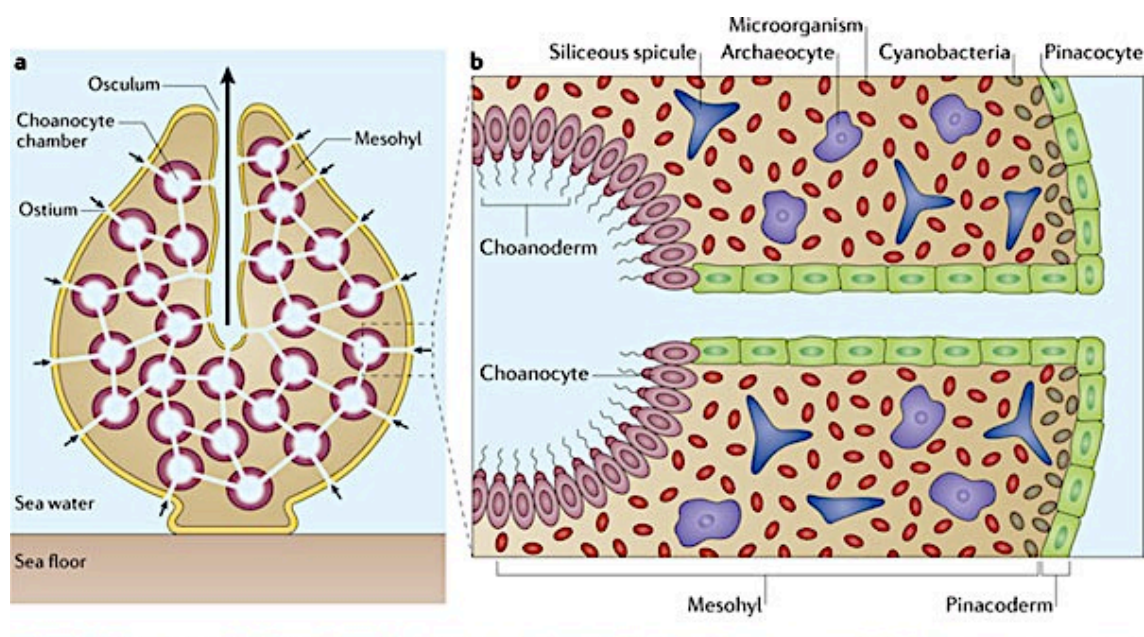


Figure 10. 海綿動物の構造

本研究では海綿動物の中でもとりわけ、Theonella 科の海綿動物に着目した。Theonella 科に属する海綿には Theonella 属と Discodermia 属の海綿が存在しており、それぞれの海綿動物から非常に興味深い化合物の報告がなされている (Figure 11)。⁶³⁻⁷⁰⁾

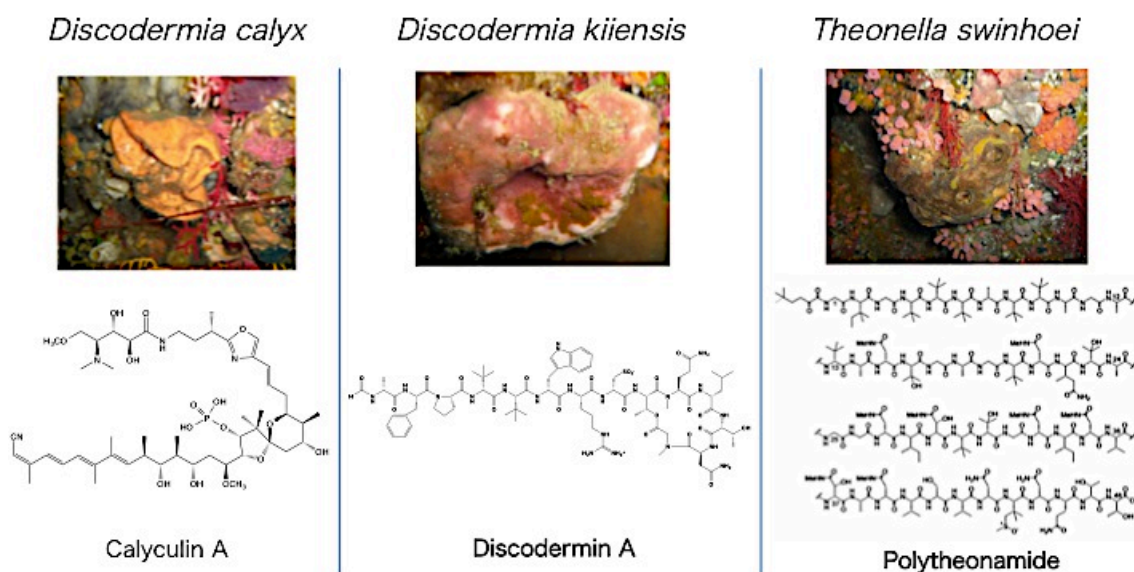


Figure 11. 海綿 *Theonella* 科に属する海綿動物

上に *Theonella* 科海綿の一例を示しているが、各海綿から構造的に非常に複雑、かつ巨大な化合物の単離も報告されており、*Theonella* 科に属する海綿動物の有用性が見てとれる。これらの海綿を用いたメタゲノムライブラリの構築も近年達成されており、特に海綿 *Theonella swinhoei* より構築されたメタゲノムライブラリでは、これまでに *T. swinhoei* から単離報告のある様々な化合物の生合成知見が一挙に得られている。^{71, 72)}

海綿 *Discodermia calyx*

相模湾に生息するイシカイメン目 (Lithistida) セオネラ科 (Theonellidae) の海綿 *Discodermia calyx* は東京大学創設直後の 1883 年、医学部予科の博物学教師であった Ludwig H. P. Doderlein が初めて記載した海綿動物である。⁷³⁾ この海綿に含まれる二次代謝産物のうち、特に興味深い化合物は、1986 年に伏谷らによって単離された calyculin A である。⁷⁴⁾ Calyculin A はテトラエン、リン酸基、スピロ環構造等々、多くの特徴的な官能基をその構造中に有し、生合成的にも非常に興味深い化合物である (Figure 12)。また、この化合物は PP1 及び PP2A と言ったタンパク質脱リン酸化酵素の活性を阻害する為、生化学試薬として市販されている化合物でもある。⁷⁵⁾

この *D. calyx* には先述した calyculin 類⁷⁶⁻⁸⁰⁾ の他に、ペプチド化合物である Calyxamide⁸¹⁾ やポリケタイド化合物 Icadamide C⁸²⁾、また構造中にハロゲンを含む deoxytopsentin⁸³⁾ 等々、多くの興味深い化合物の単離報告がなされている (Figure 12)。

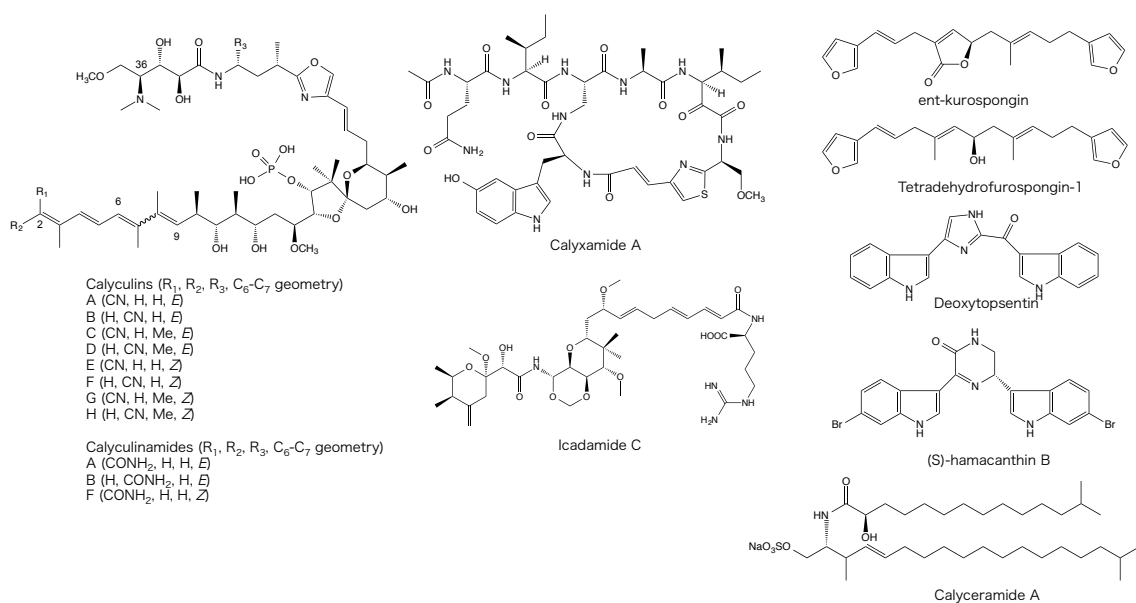


Figure 12. 海綿 *D. calyx* からの単離報告例の一部

以上の様に、*D. calyx* からは多くの興味深い化合物が報告されているが、その生合成知見に関しては未解明な物もあり、これらの化合物を生産すると考えられる共生微生物には多くの有用遺伝子が含まれていると期待出来る。そこで本研究では、海綿 *D. calyx* を用いてメタゲノムライブラリの構築を行った。

メタゲノム DNA の抽出・ライブラリ構築

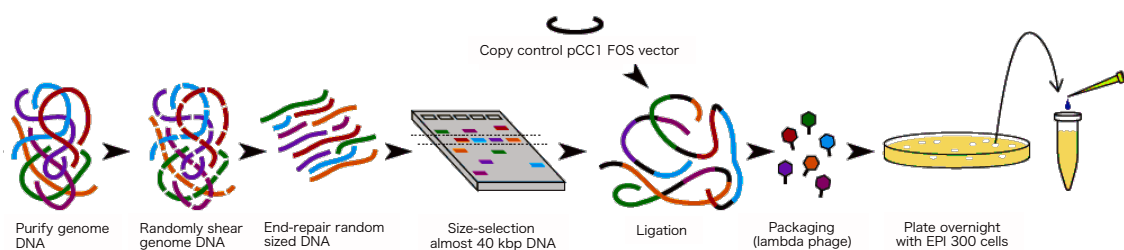


Figure 13. Fosmid ベクターを用いたメタゲノムライブラリの構築

上にメタゲノムライブラリ構築のスキームを示す (Figure 13)。式根島にて採集された海綿 *Discodermia calyx* よりフェノール・クロロホルム抽出法にて、メタゲノム DNA を抽出後、断片の平滑末端化を行った。その後、Fosmid ベクターに組み込む為に適切なサイズである 40kbp 程度の長さのメタゲノム DNA を得る為、電気泳動にて目的とするサイズの DNA の切り出しを試みた (Figure 14)。

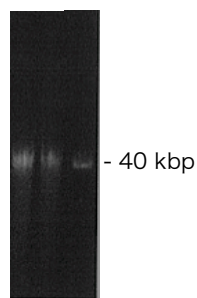


Figure 14. 切り出しを行ったメタゲノム DNA の電気泳動図

得られたゲノム DNA は目的とするサイズも含め、広範なサイズを有していた為、40kbp 周辺のバンドを切り取り、得られたメタゲノム DNA を用いて fosmid ベクターとのライゲーションを行った。その後、ファージによるパッケージングを行い、ファージ耐性を持つ大腸菌 EPI300 株へと形質転換し、メタゲノムライブラリを構築した。⁸⁴⁾

ライブラリのバラエティ確認

メタゲノムライブラリの希釈を段階的に行い、プレートにて各希釈溶液を培養した。その後、培養できたコロニーの数を計測し、構築したライブラリのバラエティを確認した所、挿入された鎖長が平均約 35 kbp で 2.5×10^5 cfu のバラエティに富むメタゲノムライブラリの構築を達成した (Table 5)。

Table 5. 希釈溶液の培養に対するコロニー生育数の計測

Dilution	# of clones	Efficiency (cfu/mL)	Library size(cfu)
1	many	-	
10	246	2.5×10^5 cfu	
100	25	2.5×10^5 cfu	2.5×10^5 cfu
1000	4	4.0×10^5 cfu	

第2章 色素産生試験

スクリーニング系の構築

今回構築したメタゲノムライブラリが実際に function-based screening へと適応可能か評価する為、簡便且つ活性の判別が付きやすい色素産生スクリーニングを用いて本ライブラリより探索を試みた。

メタゲノムライブラリを用いた function-based screening では、数万、あるいは数十万の膨大なクローンを、構築したアッセイ系を用いて一度に評価する必要がある。その為、より簡便で正確なスクリーニング系の構築が求められる。そこで、寒天培地上でコロニー周辺の変化を捉える評価系が多く利用されている。寒天培地を用いる事が出来れば、プレート1枚あたりに数百のクローンを評価する事が可能となるため、メタゲノムライブラリのスクリーニングにおいては非常に有効な手法と言える。

色素産生スクリーニングは既に適応した報告例があり^{49,50)}、メタゲノムライブラリを調べる適切な試験系である為、初めに本スクリーニング系を試みた。

色素産生クローンの探索

Chloramphenicol を含む LB 培地を作製し、プレート1枚に対して200コロニー程度となる様に構築したメタゲノムライブラリを希釈し、プレート上へとまいた。30℃、3日間培養した後に、コロニーの色に変化が検出されるか、目視にて確認を行った (Figure 15)。

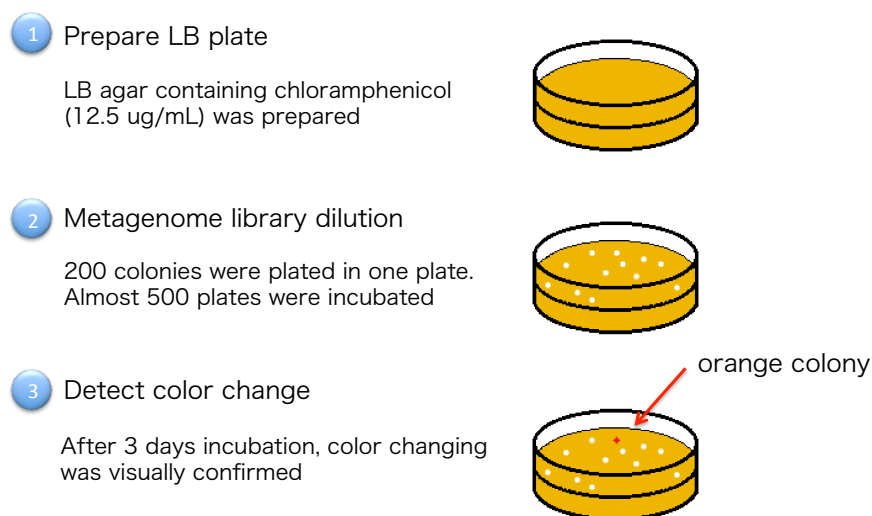


Figure 15. 色素産生スクリーニング系の構築

約 500 プレート程度の色素産生スクリーニングを行い、結果として、negative control と比較してオレンジ色を呈色するコロニーを見出した (Figure 16)。

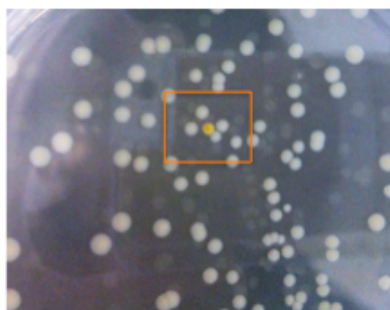


Figure 16. 色素産生クローン

このクローンの色調変化がどのような要因によって引き起こされているか、液体培養にて大量培養し、単離精製を行う事でその色素化合物の同定を試みた。

Negative control との比較検討

Fosmid ベクターを EPI300 へと形質転換した大腸菌を negative control として用いて、得られた色素産生クローンとの比較を試みた。両クローンを Chloramphenicol 含有 LB 培地にて 30℃、3 日間培養し、各培養液を遠心した後上清をエバポレーターにて濃縮した。得られた溶液を HPLC にて分析し、ピークに変化が見られるか、検討を行った。結果、短波長側 (220 nm) では negative control と比較して大きな変化は見られなかったが、長波長側 (400 nm) において新たに生産された 4 つのピークを検出した (Figure 17)。

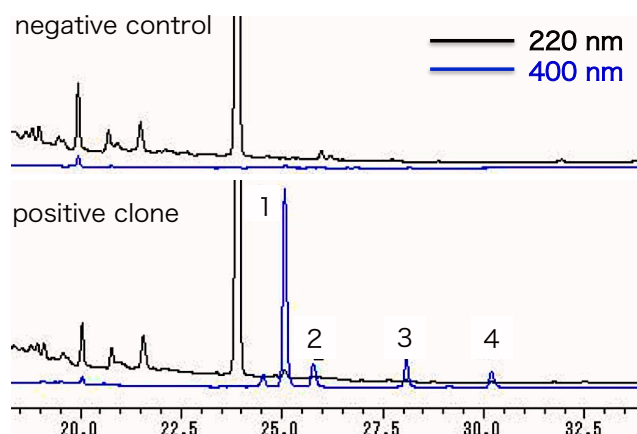


Figure 17. HPLC を用いた negative control との比較

色素化合物の単離・精製

液体培地にて本クローンを大量培養後、誘導された色を指標として単離精製を試みた。LB 培地 12 L を培養した後に遠心し、得られた培養液上清に Diaion HP-20 を加えて化合物の吸着を行った。これを MeOH にて溶出させた後に、MeOH 抽出物を ODS column へと供した。次いで 0%、25%、50%、75% 及び 100% MeOH にて stepwise gradient の溶出を行った。各フラクションをエバポレーターにて濃縮した所、50%及び 75%のフラクションに色素化合物の存在を確認した。

これら色素産生の確認された2つのフラクションを続く LH-20 を用いた分離へと供した。MeOH の単一溶媒にて溶出させ、色素化合物を含むフラクションを集めた後に、HPLC にて最終精製を行った。アセトニトリル-水系を用いて単離精製を試み、結果として、先述した新たに生産された化合物 4 種を単離した。

色素化合物の構造決定

高分解能マスペクトルから化合物 **1** の分子式を $C_{36}H_{37}N_4O_8^{64}Zn$ (m/z 717.1903) と決定した。また、 1H -NMR において 10.08 (1H)、10.10 (2H)、10.16 (1H) ppm と、低磁場領域にシングレットピークが観測された。また、HPLC で分析を行った所、今回単離した化合物群は類似した UV クロマトグラムを示しており、これらの化合物が 405 nm に最大吸収波長を有する事から、本化合物がポルフィリン発色団を含む化合物である事が推定された。また、3.62 ppm に観測された 4 つのメチル基及び、3.18 (8H)、4.33 (8H) ppm からなる 4 つのメチレン鎖より、擬対称性を有する構造である事が推察された。更に、構造中に含まれるピロール環構造に対して HMBC 相関を用いたメチル基やメチレン鎖と言った置換基の位置関係を詳細に解析し、本化合物が Zn-coproporphyrin III (**1**) であると同定した。⁸⁵⁻⁸⁷⁾ また化合物 **2** に関して分子量を測定した所、その分子式を $C_{36}H_{37}N_4O_8$ と決定した。また、 1H -NMR 及び 2D-NMR においても先ほどの化合物 **1** と同様のスペクトルを示した事から、化合物 **2** を coproporphyrin III (**2**) と決定した (Figure 18)。

一方で、高分解能マスペクトルから化合物 **3** の分子式を $C_{34}H_{33}N_4O_4^{64}Zn$ (m/z 625.1793) と決定した。また、化合物 **1** との 1H -NMR の比較より新たにエキソメチレンの存在が確認された。 1H -NMR 及び 2D-NMR のデータから単離報告がなされているポルフィリン系化合物を参照し、化合物 **3** を Zn-protoporphyrin IX (**3**) と決定した。⁸⁸⁾ また、化合物 **4** に関しては化合物 **2** と同様に、Zn を構造中に含まない protoporphyrin IX (**4**) と決定した。

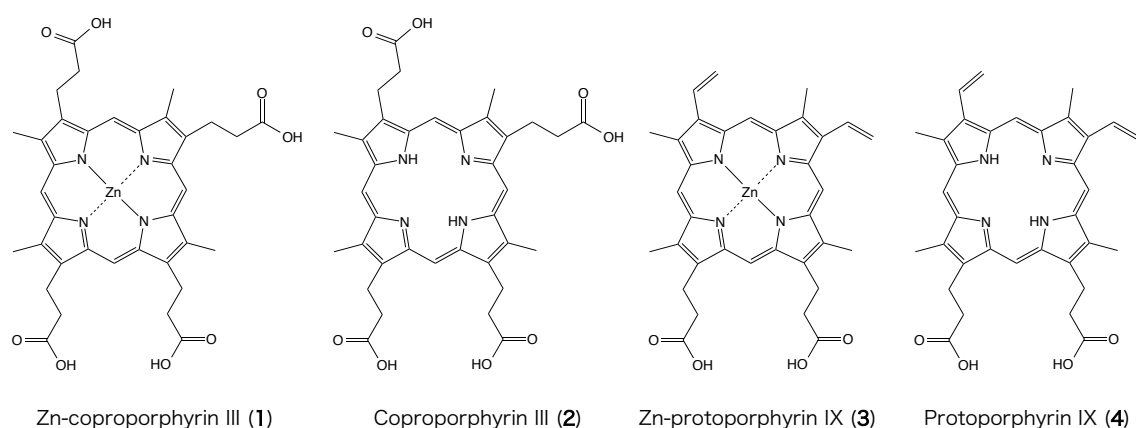


Figure 18. 同定した色素化合物の構造

挿入メタゲノム DNA 関与の可能性

以上の様に、オレンジ色を呈色するクローンより、その色を指標とした精製を試みた結果、coproporphyrin III 及び protoporphyrin IX の単離に至った。先述した通り、メタゲノムライブラリより活性に対して陽性を示すクローンを発見し、誘導された化合物を同定する事が出来れば、「誘導された化合物本体、化合物生産に関与する酵素、酵素の塩基配列情報」という3つのファクターを一挙に手に入れる事が可能となる。

では、今回単離・同定した porphyrin 系化合物は、実際に挿入されたメタゲノム DNA によってその生産が誘導されているのか、興味を持たれる。そこで、次世代シーケンサーによって挿入されたメタゲノム DNA の遺伝子配列解読を試みた。

次世代シーケンスの結果、全長 40 kbp、31 個の推定 ORF を含む挿入配列の存在が明らかとなった (Table 6)。これらのうち、得られた porphyrin 系の化合物群の生産に関与する遺伝子が存在しているか、推定した ORF を精査した所、ORF 18、19 及び 20 の3種が本化合物の生産に関与している事が推察された。

Table 6. 挿入メタゲノム配列の相同性検索結果

ORF	Size (aa)	Predicted function	Identity (%)
1	159	multi-sensor signal transduction histidine kinase	43
2	492	diguanylate cyclase [<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4]	29
3	552	multi-sensor hybrid histidine kinase	45
4	195	putative transmembrane protein [<i>NC10 bacterium</i>]	39
5	560	TonB-dependent receptor, plug [<i>NC10 bacterium</i>]	49
6	971	conserved hypothetical protein, membrane [<i>Candidatus Poribacteria</i> sp.]	48
7	321	serine/threonine kinase [<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> M045]	31
8	583	unnamed protein product [<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2]	41
9	405	amidohydrolase [<i>Sebalidella termitidis</i> ATCC 33386]	39
10	200	conserved hypothetical protein [<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506]	52
11	464	hypothetical protein NIDE3054 [<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>]	51
12	236	proteasome subunit alpha [<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>]	59
13	226	proteasome subunit beta [<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>]	59
14	80	unnamed protein product [<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22]	54
15	491	putative proteasome component [<i>NC10 bacterium</i> 'Dutch sediment']	54
16	611	ATPase [<i>Streptomyces</i> sp. C]	58
17	261	cytochrome c-type biogenesis protein CcsB [<i>Geobacter</i> sp. FRC-32]	37
18	420	glutamyl-tRNA reductase [<i>Thermodesulfatator indicus</i> DSM 15286]	49
19	322	hemC-porphobilinogen deaminase [<i>endosymbiont of Riftia pachyptila</i>]	49
20	322	hemB-Porphobilinogen synthase [<i>Thermodesulfatator indicus</i> DSM 15286]	65
21	155	RsmD family RNA methyltransferase [<i>Eubacterium infirmum</i> F0142]	35
22	355	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA [<i>Geobacter</i> sp. FRC-32]	54
23	155	cytoplasmic protein[<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB]	40
24	638	DNA mismatch repair protein	39
25	499	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase[<i>Deferribacter desulfuricans</i>]	67
26	1152	DNA polymerase III subunit alpha[<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA]	52
27	236	transporter, MotA/TolQ/ExbB proton channel family [γ proteobacterium]	40
28	145	Biopolymer transport protein ExbD/TolR[<i>Moritella</i> sp. PE36]	36
29	192	N-acetyltransferase GCN5	40
30	436	group 1 glycosyl transferase	48
31	214	beta-lactamase domain protein [<i>Arthrospira maxima</i> CS-328]	39

Porphyrin 生合成

大腸菌における色素化合物 Protoporphyrin IX の生合成は C5 経路が利用されており、Glutamyl-tRNA^{Glu}を出発物質として 7 種の酵素反応によって生産される生合成経路が明らかになっている。⁸⁹⁾

先述した次世代シーケンサーによって得られた結果より、Glutamyl-tRNA^{Glu} から Glutamate 1-semialdehyde への変換を促す glutamyl-tRNA reductase⁹⁰⁾と相同性を示す ORF 18、それに続く異性化によって得られた aminolevulinic acid (ALA) から porphobilinogen への反応を触媒する porphobilinogen synthase⁹¹⁾と相同性を示す ORF 19、更に porphobilinogen の 4 量体化に関与する porphobilinogen deaminase⁹²⁾と相同性を示す ORF 20、計 3 種の ORF が挿入配列中に含まれている事が判明した。

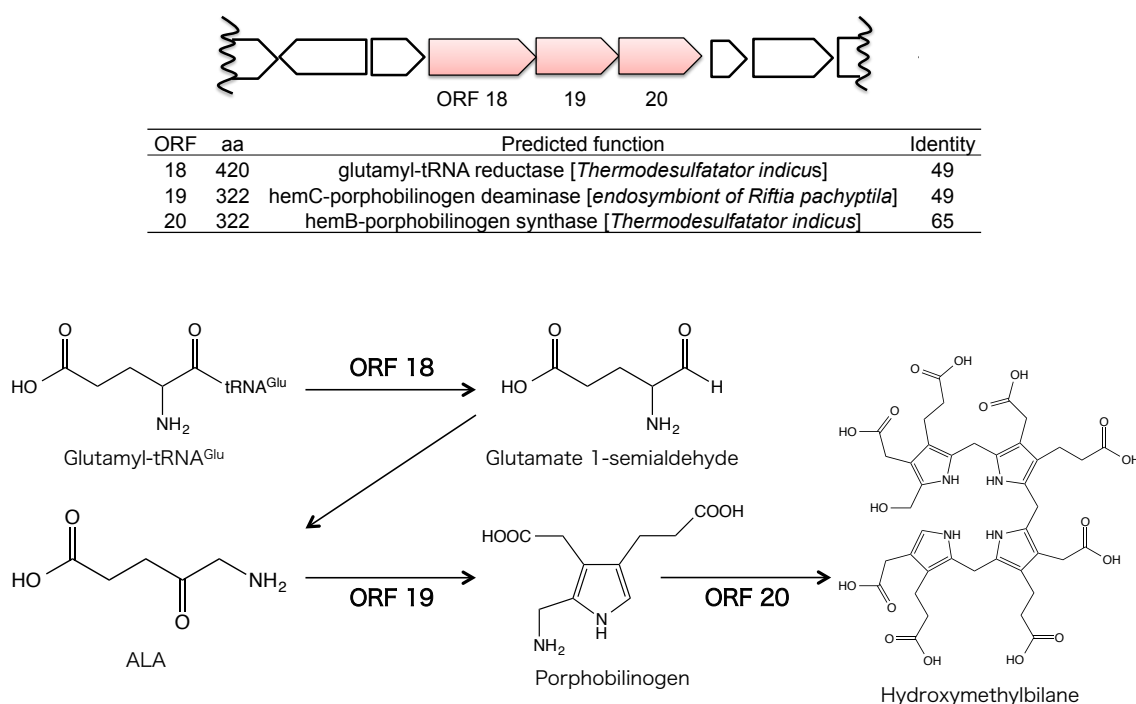


Figure 19. Porphyrin 化合物生合成に関与する ORF 3 種の酵素反応

これらは porphyrin 化合物の生合成における初発段階の酵素であり、この部分の生産が亢進された事によって、Porphyrin 系化合物の生産が増加したと考えられる。実際に、これら 3 つの ORF を含むフラグメントをサブクローニングによって構築し、単離した porphyrin 系化合物の生産確認を行った所、negative control と比較して鮮明に培養液の色が赤色へと変化し、porphyrin 系化合物が生産された事からも、この 3 種類の ORF が大腸菌中にて porphyrin 系化合物生産の為に機能している事が明らかとなった。

過去の研究報告例

色素産生スクリーニングは既に確立された手法であり、海綿動物由来メタゲノムライブラリが実際に function-based screening へと適応可能かを判断する為に適切な手法であった。以前の報告では、2001 年、I. A. MacNeil らはイギリスで採集した土壌及び BAC ベクターを用いてメタゲノムライブラリの構築を試み、平均挿入鎖長が 37 kbp で 1.7×10^7 cfu のバラエティに富むライブラリの構築に成功している。⁵⁰⁾ このライブラリを用いて色素産生スクリーニングを行った所、negative control と比較して大きく色の変化が見られたクローンを発見し、その因子が indigo 及び indirubin であると同定している (Figure 20)。また、挿入配列の解読から、これらの生産に必要な indole dioxygenase と高い相同性を示す ORF が含まれている事も同時に報告している。

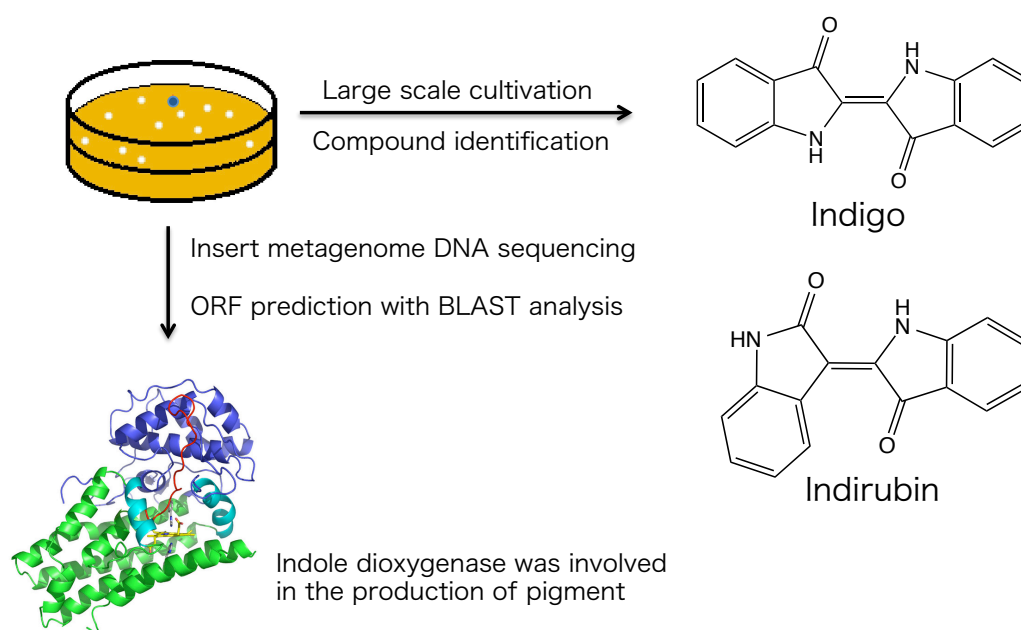


Figure 20. 土壌メタゲノムライブラリより得られた色素化合物

今回の色素産生スクリーニングを用いた探索は、メタゲノムライブラリ全体としては 3 例目となるが、海綿動物由来メタゲノムライブラリを用いた探索では初の報告となる。以上の様に、本ライブラリが実際に function-based screening の系へと適応可能であった為、続いて抗菌活性試験系への適応を試みた。

第3章 抗菌活性試験

抗菌活性物質は医薬品として欠かす事の出来ない化合物群であり、様々な疾病を治療する為に重要な位置を占めている。その為、抗菌活性試験は抽出単離分野において最も用いられている活性指標の1つであり、医薬品を開発する上でも重要な試験である。これまでも、細胞壁合成阻害薬、転写開始阻害薬等、様々な抗菌薬、抗生物質が開発されている。^{93, 94)} 以下にその化合物群を簡略的に示す (Figure 21)。

- ・細菌細胞壁阻害薬

β -ラクタム系抗生物質、ホスホマイシン、ビコザマイシン等が挙げられ、ペニシリンと特異的に結合するペニシリン結合タンパク質 (penicillin binding protein) と呼ばれる細胞壁合成酵素を阻害することで、細菌の細胞壁を形成するペプチドグリカンの合成を阻害する。

- ・タンパク合成阻害薬

テトラサイクリン系抗生物質 (オキシテトラサイクリン、ドキシサイクリン等)、マクロライド系抗生物質 (エリスロマイシン、スピラマイシン等)、アミノグリコシド系抗生物質 (カナマイシン、ゲンタマイシン等)、チアンフェニコール等があり、リボソーム構成粒子に結合しタンパク合成を阻害する。

- ・核酸合成阻害薬

ナリジクス酸、フルオロキノロン系合成抗菌剤は、DNA 鎖に固有の立体構造を与える DNA ジャイレースの阻害作用を示す。また、リファンピシンは RNA ポリメラーゼに結合して転写の開始を阻害する作用を有する。

- ・細胞膜障害薬

ポリミキシン B やコリスチンは、細菌の細胞膜に作用して殺菌的に作用する。

- ・代謝拮抗薬

合成抗菌剤であるサルファ剤は、代謝経路の前駆物質や中間体等との構造の類似性から、代謝経路に入り込む事で本来の代謝過程を制御する。

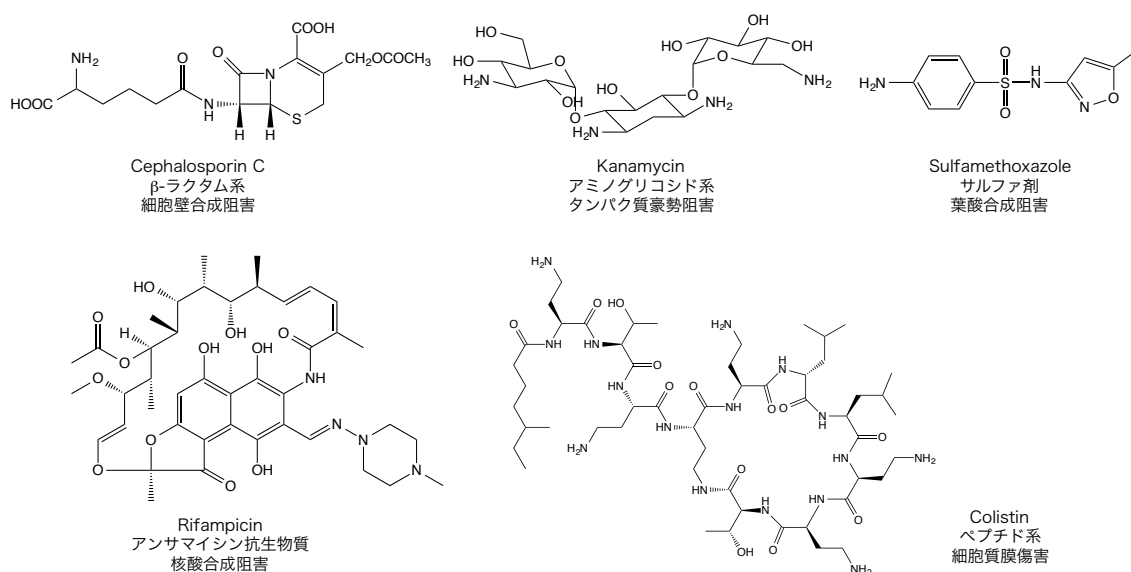


Figure 21. 多様な活性を示す抗生物質

上述の通り、抗菌薬の構造的多様性あるいは標的とする作用は様々存在するが、その後を追って薬剤耐性菌の出現は報告され^{95,96)}、未だ抗菌リード化合物の探索が求められる。そこで本研究では、海綿動物より構築したメタゲノムライブラリを用いて抗菌活性スクリーニングを行い、より有用な抗菌活性を有する抗菌性物質の探索、及びその生合成機構の解明を試みた。

スクリーニング系構築

抗菌活性試験のスクリーニング手法としてはオーバーレイアッセイを採用した。この手法は、2005 年に Lim らによって提唱された手法である。本試験では試験菌として、グラム陽性桿菌・通性嫌気性菌であり食中毒の原因となる *Bacillus cereus* を選択した。⁹⁷⁾ 事前に chloramphenicol 含有 LB 寒天培地を用いて、メタゲノムライブラリを 1 プレート辺り 200 コロニー程度となる様に希釈して培養した。コロニーを形成させた後に、この培地上に試験菌である *B. cereus* を混合した LB 半寒天培地を被せて培養を行い、コロニー周辺で試験菌に対して阻止円が形成されるクローンを目視にて探索した (Figure 22)。

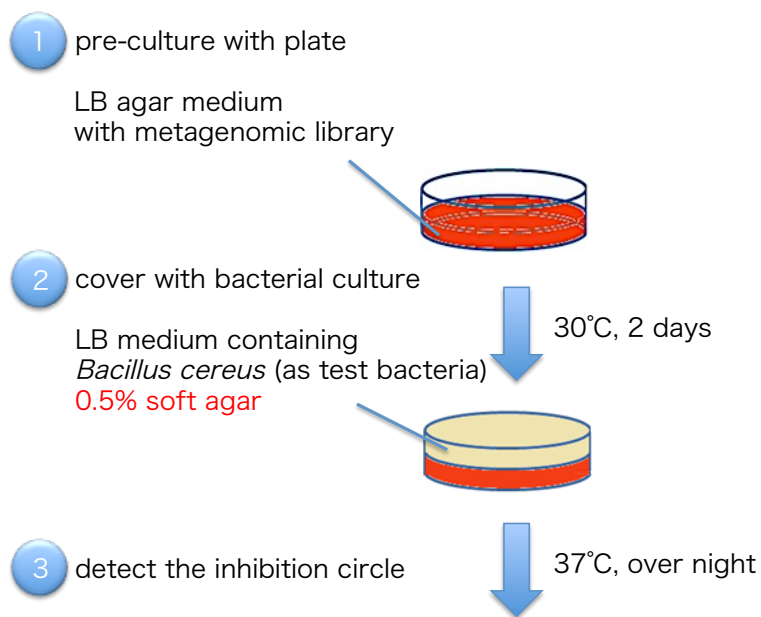


Figure 22. 抗菌活性スクリーニングの適応

結果として、下に示す様なコロニー周辺に阻止円を示すクローン 1 種を見出した (Figure 23)。この結果から、得られた抗菌活性試験に対して陽性を示したクローンが *B. cereus* に対する抗菌物質を生産している事が示唆された。その為、本クローンを液体培地にて大量培養し、目的とする抗菌活性を指標とした活性化合物の探索・同定を試みた。

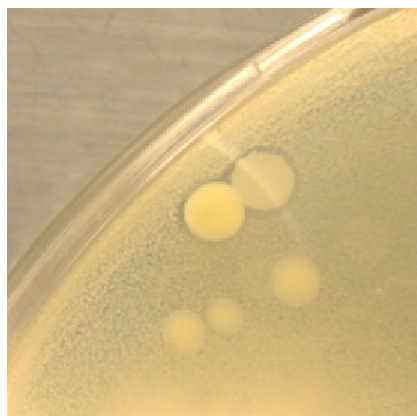


Figure 23. 抗菌活性陽性クローン

抗菌活性物質の同定

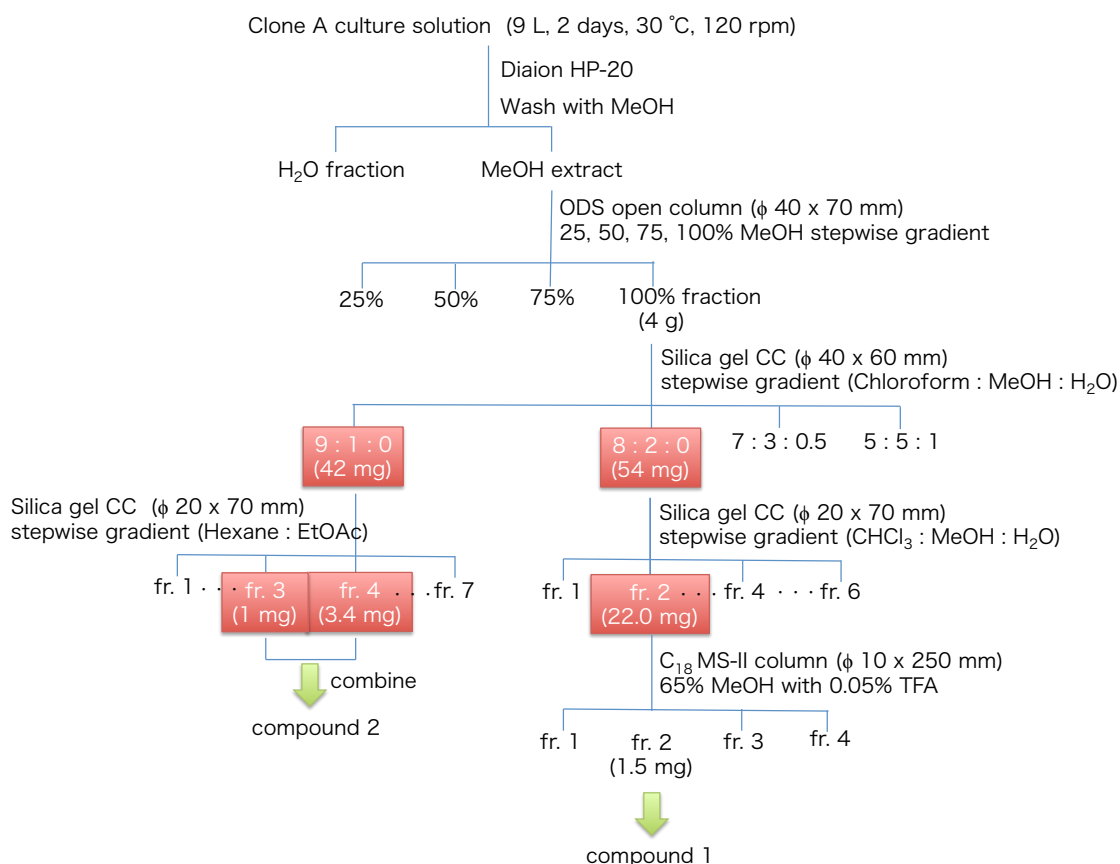


Chart 1. 抗菌活性を指標とした活性化合物単離

見出した抗菌活性に対して陽性を示したクローンを LB 液体培地にて大量培養後、*Bacillus cereus* に対する抗菌活性を指標として、分離を試みた。得られた培養液を遠心した後、培養液上清に Diaion HP-20 を加えて吸着させ、MeOH にて溶出した。この MeOH 抽出物に対して ODS column を用いて step wise gradient にて分画を行った。得られた ODS 画分 (25%, 50%, 75%, 100% MeOH fraction) それぞれに対して抗菌活性試験を行った所、100% MeOH fraction において抗菌活性を確認した。

活性が見られたフラクションに対して Silica gel column を 2 度用いて分離を行い、同様に抗菌活性を確認した所、2 つのフラクションに抗菌活性が検出された。その為、得られた活性フラクションに対して HPLC を用いて精製を行い、各フラクションから化合物 5 及び 6 を単離した (Chart 1)。

単離した 2 種の化合物について、各種 NMR スペクトル、及び MS 分析を行う事で各化合物の構造決定を試みた。

化合物 5 の同定

化合物 5 は赤色固体物質として得られた。高分解能マスペクトルから、化合物 5 の分子式を $C_{24}H_{17}N_3O$ と決定した。また 1H -NMR 及び COSY スペクトルより、7.09、7.19、7.36、7.62 ppm の 4 つのシグナルに相関が見られ、それらのカップリングからオルト 2 置換ベンゼンを構造中に有すると推測した。更に 6.94 ppm にシングレットシグナルが観測され、8.10 ppm にはアミノプロトンと考えられるシグナルも観測されたことから、化合物 5 の構造中にはインドール基が含まれていると推測した。また 1H -NMR の積分値から、この化合物中にインドールが 2 分子含まれると判断した。

次いで、インドール構造以外に観測されたシグナルに関して精査すると、6.89、6.91、7.51、7.73 ppm のシグナルにおいてそれぞれ COSY 相関が見られたことから、こちらもオルト 2 置換ベンゼンに由来すると推測した。また、 ^{13}C -NMR より、201.5 ppm にケトカルボニルと考えられるシグナル、更に 68.2 ppm には HSQC において相関の観測されない 4 級炭素の存在を確認した。これらの結果を基に、HMBC における相関を精査した所、本化合物は 2,2-di(3-indolyl)-3-indolone (5) であると決定した (Figure 24)。^{98, 99)}

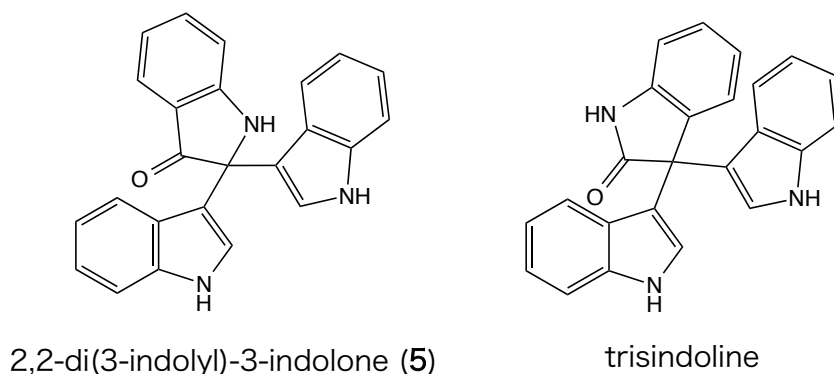


Figure 24. 化合物 5 及びその類縁体 trisindoline の構造

Table 7. 化合物 5 のケミカルシフト

¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data for Cpd 5 in CDCl₃

	¹³ C	¹ H		
Position	δ (ppm)	δ (ppm)	Intensity	Multiplicity
indoxyl				
1-NH	-	8.09	1H	br.s
2	68.2	-		
3	201.5	-		
3a	120.8	-		
4	125.5	7.73	1H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
5	119.4	6.89	1H	t (<i>J</i> = 8 Hz)
6	137.6	7.51	1H	t (<i>J</i> = 8 Hz)
7	112.9	6.91	1H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
7a	160.3	-		
indole				
1-NH	-	8.10	2H	br. s
2', 2"	124.1	6.94	2H	s
3', 3"	115.1			
3'a, 3"a	125.7	-		
4', 4"	120.4	7.36	2H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
5', 5"	119.9	7.19	2H	t (<i>J</i> = 8 Hz)
6', 6"	122.3	7.09	2H	t (<i>J</i> = 8 Hz)
7', 7"	111.4	7.62	2H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
7'a, 7"a	137.0	-		

化合物 5 について

化合物 5 は海綿由来 *Vibrio* sp. や海水由来 *Aeromonas* sp. CB101 等の菌からの単離が報告されており、実際に *Bacillus cereus*、methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) に対して抗菌活性が報告されている抗菌活性化合物である。^{98, 99)} また、本化合物の類縁体である trisindoline にも強力な抗菌作用が報告されており、これら indole 類縁体の医薬品リード化合物としての有用性が示唆されている。

化合物 6 の同定

化合物 6 は黄色固体物質として得られた。 ^1H -NMR スペクトルの結果から、観測されたシグナルは低磁場側に存在する 6 本のみであり、その構造は非常にシンプルな構造であると推定された。

更に、 ^1H -NMR 及び COSY において、7.09、7.19、7.36、7.62 ppm の 4 つのシグナルに相関が認められたため、化合物 5 と同様にオルト位での 2 置換ベンゼンを有すると推察した。また、低磁場側にシングレットのシグナルとアミノプロトンと考えられるシグナルが認められたことからインドール基を構造中に持つと推定した。更に、ESI-TOF MS を用いた質量分析により化合物 6 の分子量は 360 であったことから、インドール 3 量体の可能性が示唆された。

インドール 3 量体化合物には 1,1,1-tris (3-indolyl) methane, turbomycin A 等が例として挙げられるが、化合物 6 の UV スペクトルは非常に特徴的であり、284 nm と 468 nm に最大吸収を示していた (Figure 5b)。これは turbomycin A に特徴的に見られる吸収波長である。更に、TLC による R_f 値を検討した所、turbomycin A の単離が報告された論文に示されている R_f 値と一致した。以上の結果から、化合物 6 は turbomycin A であると決定した (Figure 5a)。

Table 8. 化合物 6 のケミカルシフト

^1H -NMR (500 MHz) data for Cpd 6 in CDCl_3				
Position	δ (ppm)	Intensity	Multiplicity	
1, 1', 1''-NH	7.96	3H	br. s	
2, 2', 2''	6.94	3H	s	
4, 4', 4''	7.36	3H	d ($J = 8$ Hz)	
5, 5', 5''	7.19	3H	t ($J = 8$ Hz)	
6, 6', 6''	7.09	3H	t ($J = 8$ Hz)	
7, 7', 7''	7.62	3H	d ($J = 8$ Hz)	

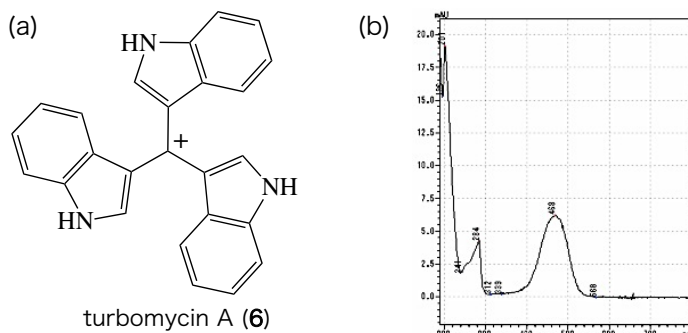


Figure 24. (a) 化合物 6 の構造、(b) 化合物 6 の UV 吸収スペクトル

化合物 6 について

化合物 6 は、その構造の中央にカチオン構造を有する希有な化合物であり、これまでも *Saccharomyces cerevisiae* 培養液から単離報告されている。¹⁰⁰⁾ また、化合物 6 も化合物 5 と同様に、グラム陽性菌、陰性菌を始めとして、幅広い抗菌スペクトルを有する事が報告されている (Table 11)。

得られた抗菌活性物質の生合成

両化合物の生合成経路について考えてみると、化合物 5 及び 5 の類縁体である trisindoline は、恐らく indole 系化合物を基質としており、共通の前駆体からこれらの作り分けが行われているのか、あるいは全く違う経路で各化合物が生合成されているのか、非常に興味を持たれる。また、化合物 6 に関しても同様に indole 系化合物を基質として生合成されと考えられるが、中央炭素原子のカチオン構造の形成、またその炭素原子の由来等、未だ推測の域を出ていない。そこで、得られた抗菌活性物質が挿入されたメタゲノム DNA のうち、どの遺伝子がこれらの生産に関与しているか、次世代シーケンサーを用いてその挿入配列の解読を試みた。

挿入配列解析の結果

色素産生スクリーニングにて得られたクローンの分析方法と同様の手法にて、挿入された遺伝子配列を解読した。その結果、興味深い事に、この抗菌活性に対して陽性を示したクローン及び色素産生試験において色の変化を示したクローン中には全く同じメタゲノム DNA が挿入されていると判明した。つまり、このクローンはポルフィリン系化合物に加え、抗菌化合物も生産している事が判明した。

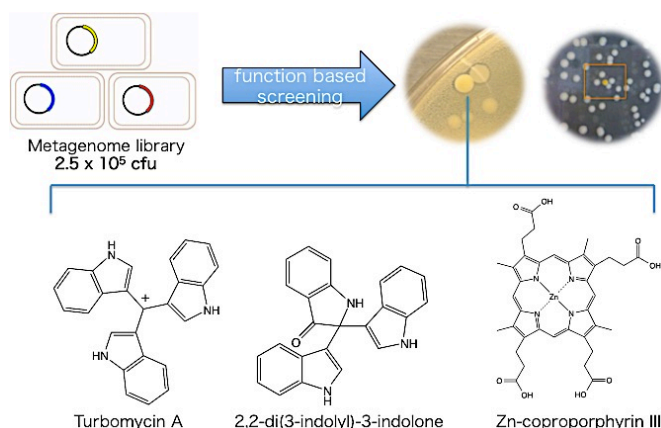


Figure 25. 1 種のクローンより得られた化合物

サブクローニングによる生産に関与する遺伝子の推定

Table 9. 挿入メタゲノム配列の相同性検索結果

ORF	Size (aa)	Predicted function	Identity (%)
1	159	multi-sensor signal transduction histidine kinase	43
2	492	diguanylate cyclase [<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4]	29
3	552	multi-sensor hybrid histidine kinase	45
4	195	putative transmembrane protein [<i>NC10 bacterium</i>]	39
5	560	TonB-dependent receptor, plug [<i>NC10 bacterium</i>]	49
6	971	conserved hypothetical protein, membrane [<i>Candidatus Poribacteria</i> sp.]	48
7	321	serine/threonine kinase [<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> M045]	31
8	583	unnamed protein product [<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2]	41
9	405	amidohydrolase [<i>Sebalidella termitidis</i> ATCC 33386]	39
10	200	conserved hypothetical protein [<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506]	52
11	464	hypothetical protein NIDE3054 [<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>]	51
12	236	proteasome subunit alpha [<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>]	59
13	226	proteasome subunit beta [<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>]	59
14	80	unnamed protein product [<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22]	54
15	491	putative proteasome component [<i>NC10 bacterium</i> 'Dutch sediment']	54
16	611	ATPase [<i>Streptomyces</i> sp. C]	58
17	261	cytochrome c-type biogenesis protein CcsB [<i>Geobacter</i> sp. FRC-32]	37
18	420	glutamyl-tRNA reductase [<i>Thermodesulfatator indicus</i> DSM 15286]	49
19	322	hemC-porphobilinogen deaminase [<i>endosymbiont of Riftia pachyptila</i>]	49
20	322	hemB-Porphobilinogen synthase [<i>Thermodesulfatator indicus</i> DSM 15286]	65
21	155	RsmD family RNA methyltransferase [<i>Eubacterium infirmum</i> F0142]	35
22	355	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA [<i>Geobacter</i> sp. FRC-32]	54
23	155	cytoplasmic protein[<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB]	40
24	638	DNA mismatch repair protein	39
25	499	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase[<i>Deferribacter desulfuricans</i>]	67
26	1152	DNA polymerase III subunit alpha[<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA]	52
27	236	transporter, MotA/TolQ/ExbB proton channel family [γ proteobacterium]	40
28	145	Biopolymer transport protein ExbD/TolR[<i>Moritella</i> sp. PE36]	36
29	192	N-acetyltransferase GCN5	40
30	436	group 1 glycosyl transferase	48
31	214	beta-lactamase domain protein [<i>Arthrospira maxima</i> CS-328]	39

ここで改めて、先ほど得られた挿入配列遺伝子の解析情報を示す (Table 9)。得られた全長 40 kbp、31 個の推定 ORF のうち、赤い枠で囲っている ORF 18、19 及び 20 については、色素産生スクリーニングにおいて porphyrin 系化合物の産生に必要な遺伝子である事が判明している。その為、今回得られた抗菌活性化合物の生産に関してはこれらを除いた何れかの遺伝子が関与していると考えられる。しかし、BLAST を用いた相同性検索の結果だけでは生産に必須な遺伝子の推定が困難であった。そこで、どの領域が抗菌化合物の生産に関わっているかを同定する為、サブクローニングを試みた。

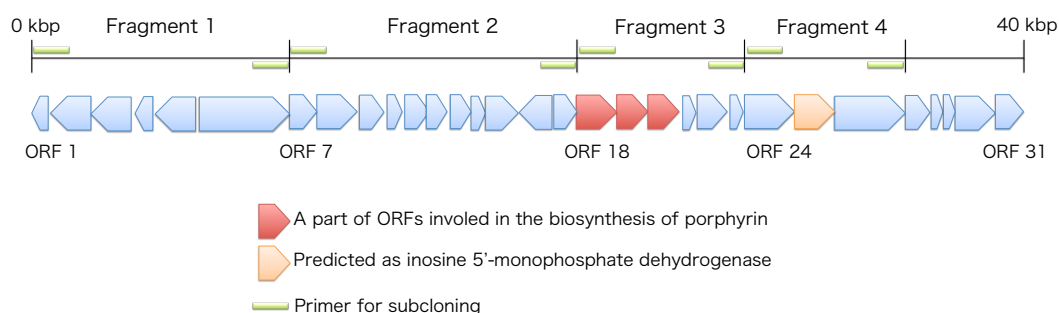


Figure 26. サブクロニング構築模式図

上には得られた挿入配列の模式図を示す (Figure 26)。解析によって得られた挿入遺伝子配列から4つの適当な配列鎖長を構築する為にプライマーを作製し、PCRによって増幅を試みた。得られた増幅断片をそれぞれ fosmid ベクターへと組み込み、メタゲノムライブラリ構築に用いた大腸菌 EPI300 株へと形質転換を行った。各フラグメントを含むサブクローンを構築後、LB 液体培地にて各々培養し、Diaion HP-20、ODS column chromatography の分離によって精製を行った後に、単離した化合物が含まれるフラクションに関して LC-MS を用いて生産確認を試みた。結果、fragment 4 を含むサブクローン培養液中にのみ、2,2-di(3-indolyl)-3-indolone (5) の生産が確認された (Figure 27)。

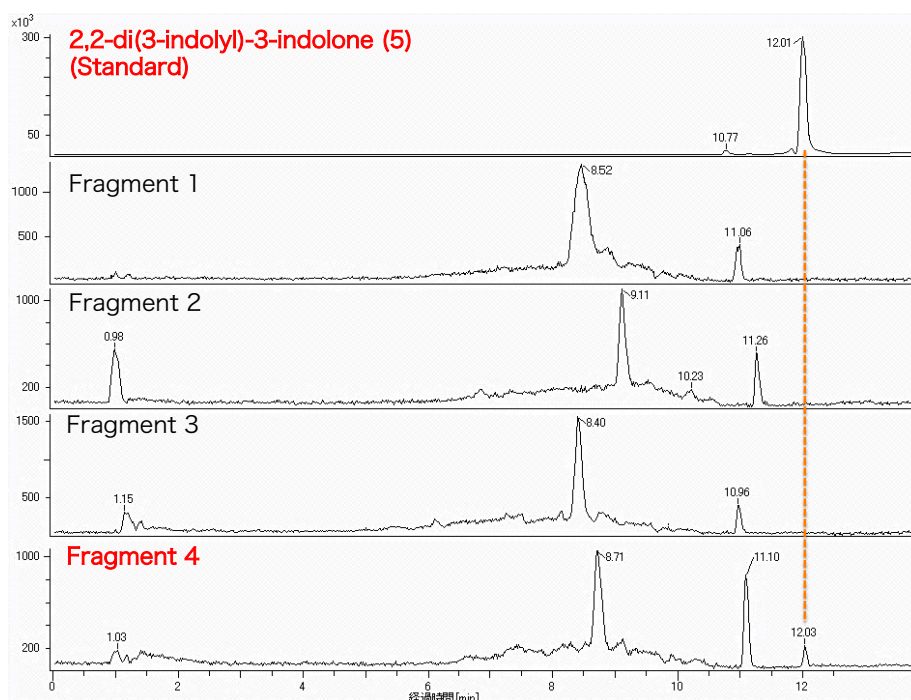


Figure 27. 化合物 5 標品と各サブクローン培養液の比較

この結果から、fragment 4 に含まれる ORF のうちの何れかが化合物 5 の生産に関与すると考えられる。この fragment 4 には ORF 24-26 が含まれていた (Table 10)。

Table 10. Fragment 4 に含まれる挿入遺伝子配列

ORF	Size (aa)	Predicted function	Identity (%)
24	638	DNA mismatch repair protein	39
25	499	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase[<i>Deferribacter desulfuricans</i> SSM1]	67
26	1152	DNA polymerase III subunit alpha[<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA]	52

更に詳細に化合物生産に必要な遺伝子を同定する為、同様の手法で各 ORF を単独で組み込んだ形質転換体を作製し、化合物 5 の生産の確認を試みた。その結果、inosine 5' -monophosphate dehydrogenase (IMPD) と相同性を示す ORF 25 が化合物 5 の生産に必要である事が判明した (Figure 29)。

一方、本サブクローニングの実験では化合物 6 の生産をその培養液中から確認する事は出来なかった。この結果から、化合物 6 に必要な遺伝子は挿入遺伝子配列中に複数存在しており、その為に本化合物の生産が確認されなかったと推定している。また後述するがこの様なメタゲノムライブラリを用いた大腸菌中でのインドール系化合物の生産は、単一の経路では生産が行われておらず、多様な経路によってその生産が行われると推測している (Figure 32)。

Inosine 5' -monophosphate dehydrogenase (IMDP)

IMPD はプリン *de novo* 合成における主要な一次代謝酵素である。¹⁰¹⁾ この酵素はイノシン-5' -リン酸 (IMP) からキサントシン-5' -リン酸 (XMP) への NAD 依存性酸化反応を触媒し、NADH および XMP を産生する (Figure 28a)。この反応では、IMP の 1 位窒素原子に隣接するイノシン酸 2 位の炭素原子が酸化される。生成した XMP は更に GMP synthetase によってグアノシン-5' -リン酸 (GMP) へと変換されるが、IMPD はこの GMP 産生の律速段階となる酵素である。

これまでに IMPD の結晶構造解析は報告されており、ヒポキサンチン、リボース、リン酸の各部位にそれぞれ対応するアミノ酸が水素結合を形成し、IMPD のキャビティ内にイノシン-5' -リン酸を留める事が判明している (Figure 28b)。¹⁰²⁾

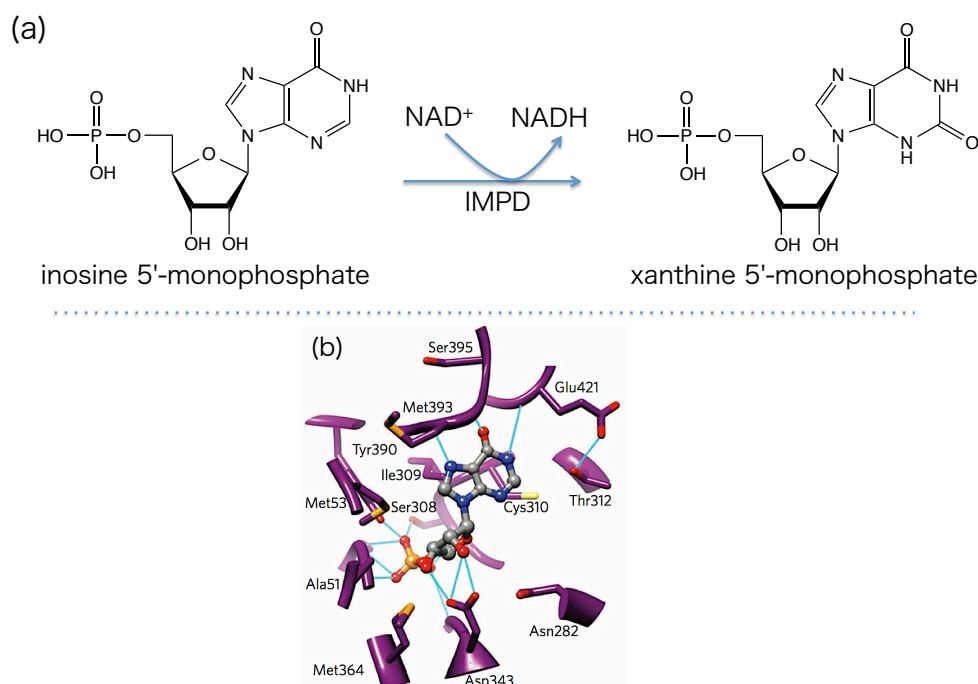


Figure 28. (a) IMPD 本来の反応、(b) *Streptococcus pyogenes* 由来 IMPD の IMP 結合サイト

大腸菌由来 IMPD 過剰発現体との比較

以上の様に、IMPD は一次代謝系の酵素であり、通常は二次代謝産物の生産に関与する酵素ではない。その為、IMPD ホモログである ORF 25 がどの様にして抗菌化合物である化合物 **5** の生産に関与するか、疑問が持たれる。

即ち、IMPD ホモログが直接的に化合物 **5** の生合成に必要と考えられるインドール系化合物を基質として酸化反応を触媒し、大腸菌が本来持つ酵素と協奏的に化合物 **5** の生産を誘導しているのか。あるいは ORF 25 が挿入される事で本来の IMPD の酵素機能が亢進され、その影響から副次的にインドール系化合物の生産に変化が生じているのか、推測の域を出ない。

この疑問点を解決する為、大腸菌 BL21 株由来 IMPD のクローニングを行い、EPI300 株を用いて形質転換体を作製した。構築した形質転換体の培養液より、同様の手法にて化合物生産の確認を試みた。その結果、この培養液からは化合物 **5** の生産は確認されなかった (Figure 29)。

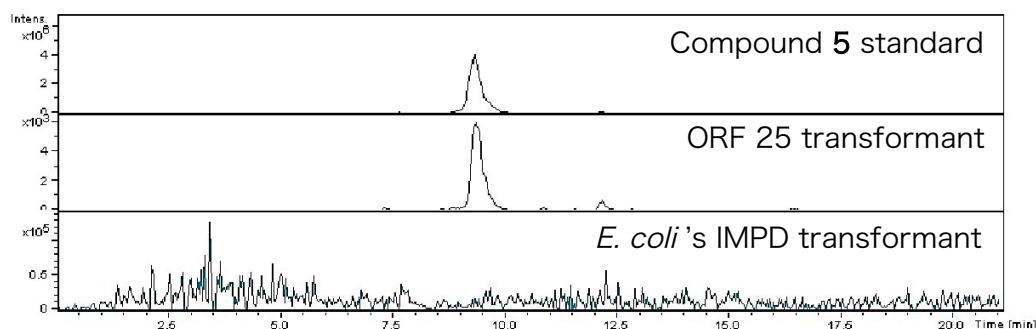


Figure 29. ORF 25 サブクローン体及び IMPD 過剰発現株での化合物生産

その為、IMPD ホモログである ORF 25 が直接的にインドール系化合物を基質として酸化反応を触媒し、化合物 5 の生産を担っている事が示唆された。

In vitro 反応を用いた解析

以上の結果から、ORF 25 の詳細な酵素反応機構解明の為に ORF 25 を大腸菌にて発現させ、精製酵素を用いて機能の解析を試みた。しかしながら、様々な大腸菌宿主を検討したが、大腸菌を宿主とした発現系では酵素が不溶正画分へと移行する為、可溶性画分に発現させる事が困難であった。こうした共生微生物由来の遺伝子発現は BLAST で比較した際に相同性が高い場合であっても、発現の条件検討が非常に困難な物があり、詳細な実験が必要となる。

この解決策の一つとして、発現宿主に大腸菌ではなくメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いる手法がある。¹⁰³⁾ *P. pastoris* を用いた発現系は発現蛋白質の N 末端側に α ファクターという酵母特有のシグナル配列を導入する。その為、発現蛋白質を細胞外の培地中に分泌させる事が出来るので、細胞破碎等する必要がなく精製が比較的容易になる。また、細胞外に分泌される過程で様々なシャペロン蛋白質の影響を受け、正確に折り畳まれた状態で目的の蛋白質が分泌される為、発現後のリフォールディング操作をする必要が少ない。

-*Pichia pastoris* system-
Vector : pPIC-z
Host : *P. pastoris*
Buffer : 100mM Tris-HCl (pH7.5)
200mM NaCl
5% glycerol
10, 300 mM imidazole each

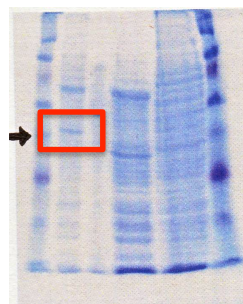


Figure 30. *P. pastoris* を用いた発現系の構築

この様な利点から *P. pastoris* を用いた ORF 25 の発現を試みた。その結果、可溶性画分にて本タンパクを発現させる事に成功した (Figure 30)。そこで、得られた酵素に対して、化合物 5 の基質と考えられるインドール系化合物数種 (indole、indole aldehyde、tryptophan、3-oxyindole) を単独で、あるいは組み合わせて酵素反応を試みた。しかしながら、種々の条件検討をした際にも、化合物 1 の生産を確認出来なかった。また、本来の IMPD の反応では NAD^+ を補酵素として反応が進行するが、 NADP^+ を利用した際にも反応は進行しなかった。現時点では、*in vitro* 反応での活性は見出せていないが、更なる条件検討によって IMPD ホモログによる酸化反応が検出されると期待している。

化合物の推定生合成機構

以上の結果から化合物 5 の生合成では、大腸菌自身の酵素と挿入遺伝子である IMPD ホモログの酵素が協奏的に働く事で、化合物 5 が生合成されると推察される。まず大腸菌本来の酵素である tryptophanase 及び monooxygenase により indoxyl が生産される。次いで indoxyl が 3-oxyindole へと変換される時、IMPD ホモログが 3-oxyindole を受け入れれば、3-oxyindole 2 位の炭素原子が酸化され、反応性に富む isatin が産生される。その後、2 分子の indole 3 位から isatin 2 位への求核攻撃を経て本化合物が生合成する生合成経路を予想している (Figure 31)。

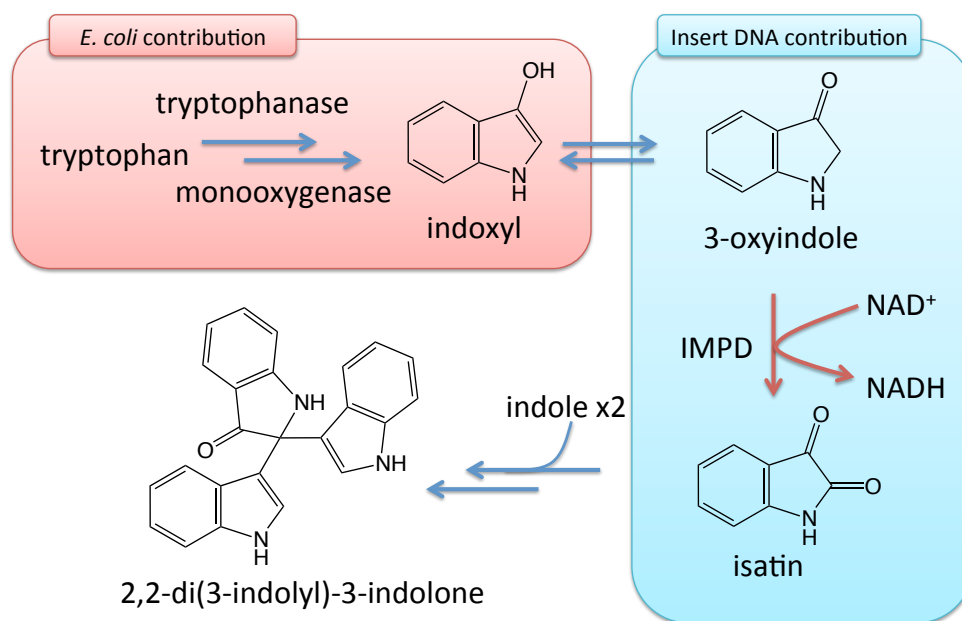


Figure 31. 化合物 5 の推定生合成経路

しかし、通常であれば isatin が求核攻撃を受ける位置は 2 位ではなく、3 位へと行われる可能性が高い。その場合、生産される化合物は化合物 5 ではなく類縁体である trisindoline と推定されるが、今回のサブクロニング実験では trisindoline の生産は確認されなかった。これは IMPD ホモログが 3-oxyindole を基質として酸化した後に、プロダクトをリリースせず、その場でインドール 2 分子が 3 位ではなく 2 位へと求核攻撃させやすい構造を維持する事で、化合物 5 への変換が進行していると考えられる。この推定反応機構に関しては、今後 *in vitro* 反応解析によって活性を検出した後に、X 線結晶構造解析を用いる事で明らかにしたい。

インドール分子はバクテリアにとって重要な化合物であり、これまでにグラム陽性、陰性を問わず 90 種近い細菌が大量の indole を生産する事が知られているが、その機能のほとんどは未解明である。しかし、これまでも indole はバイオフィーム形成阻害、プラスミド安定性の調節、対数増殖期から定常期への移行制御等、様々な機能に関与していると報告があり、¹⁰⁴⁾ 今回宿主として用いた大腸菌中でも、トリプトファンをインドールへと変換する tryptophanase (tnaA) によって多量に生産されている。また、indole 自身の酸化反応も非常にバラエティに富み、その反応性は多岐にわたる。この様に、大腸菌のインドール代謝系へのメタゲノム DNA の挿入・影響によって新たな代謝経路が発生する点はメタゲノム解析を用いた非常に興味深い結果であり、今後もメタゲノム DNA が大腸菌生産系に多様な影響を与える事で、未だ生合成機構の解明されていない化合物の生産やその生産に関与する遺伝子の発見に繋がると期待出来る。

化合物 6 の先行研究

また、化合物 6 は Handelsman らによって、2002 年に土壌由来メタゲノムライブラリより単離され、その生合成に関わる遺伝子が推定されている。¹⁰⁵⁾ この論文で Handelsman らは、土壌よりメタゲノムを抽出し、bacterial artificial chromosome (BAC) vector を用いて、平均鎖長 44.5 kbp を有する 2.5×10^4 cfu のメタゲノムライブラリを構築している。BAC ベクターは大腸菌プラスミド F 因子を利用して、約 150 kb に及ぶ大きな断片のクローニングを可能とするベクターである。その為、ライブラリのバラエティにもよるが、探索をした際にスクリーニングのヒット数が上昇する可能性がある。

彼らは構築した土壌由来メタゲノムライブラリを用い、色素産生スクリーニングを行った所、茶褐色を呈するコロニーを見出した。このコロニーを液体培養後、生産されている化合物を解析した所、turbomycin A 及び turbomycin B、そしてメラニンの生成が確認された。turbomycin B は turbomycin A と同様にその構造の中央部分にカチオン構造を有する化合物である (Figure 32)。また、それぞれの抗菌活性試験を行った所、2 種の化合物は共に幅広い抗菌スペクトルを有する事が判明している (Table 11)。

Table 11. Turbomycin A 及び B に対する種々の抗菌活性試験結果

	turbomycin A	turbomycin B
Gram-negative bacteria		
<i>E. herbicola</i> IRQ	+	+
<i>E. coli</i> HS997	+ / -	+ / -
<i>P. aeruginosa</i> 9020	-	-
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium LT2	+	+
Gram-positive bacteria		
<i>B. cereus</i> subsp. mycoides 1003	+	+
<i>B. subtilis</i> BR151pPL608	+	+
<i>E. faecalis</i> 4025	-	-
<i>S. aureus</i> 3001	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8P01	+	+
<i>S. griseus</i> 6501	+	+
Fungi or Protists		
<i>C. guilliermondii</i> Y001	+ / -	+ / -
<i>P. ultimum</i> 1033	-	-
<i>F. solani</i> (f. sp. glycine) 90.1	-	-

Handelsman らは得られた色素産生クローンの挿入 DNA を解析し、その挿入鎖長を約 25 kbp であると判断した。更に、この配列情報を基に 2 種の turbomycin 類生産に関わる遺伝子領域の同定を試みた所、配列中に含まれる 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD) がこれらの化合物の生産に関わっている事を明らかにした。

4-HPPD は本来、ユビキノン合成、チロシン及びフェニルアラニン代謝に関わる酵素であり、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPA) をホモゲンチジン酸 (HGA) へと変換する酸化還元酵素である。¹⁰⁶⁾ この反応で精製した HGA からは Handelsman らは種々の確認実験から、この酵素が 2 種の turbomycin 類生産に関与していると推定した。

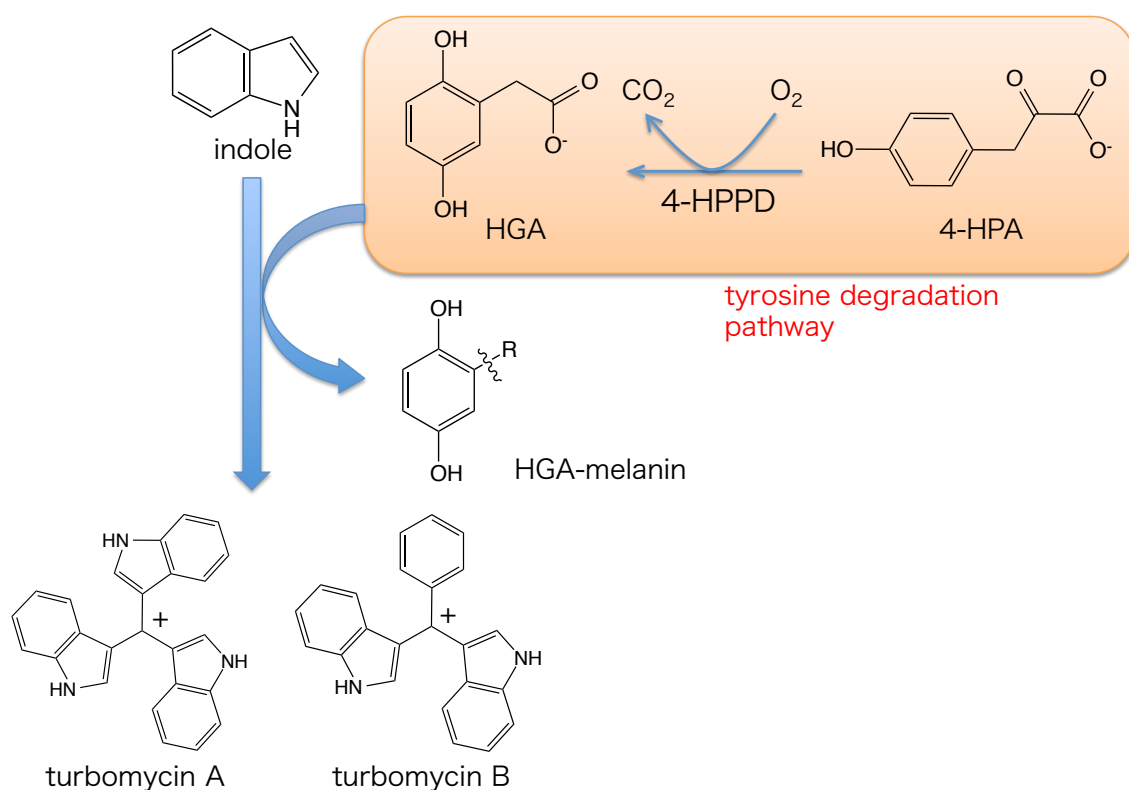


Figure 32. 提唱された turbomycin 推定合成経路

挿入されている 4-HPPD の影響によって生産される HGA は、好氣的条件下において自発的なポリマー化を起こし、結果 HGA-melanin を生成する。この HGA から HGA-melanin への酸化的ポリマー化を駆動力として、インドールアルデヒド及びインドール 2 分子のから、turbomycin A が生産されると推定した (Figure 32)。また turbomycin B に関しては、彼らはインドールアルデヒドに代わり、ベンズアルデヒドに対してインドール 2 分子が攻撃したと推測している。

その一方で、今回得られた抗菌活性に対して陽性を示すクローンに含まれるメタゲノム DNA を解読・解析した 31 個の高い相同性を示す ORF の中で、彼らが turbomycin A 及び B の産生に関与すると推測している 4-HPPD と相同性を示す遺伝子は見出されなかった (Table 9)。その為、今回得られたクローン中では、別の酸化的駆動力の存在、あるいはより直接的に turbomycin A 産生に関わる複数の酵素が存在し、それらを利用した turbomycin A の生成が行われているのではないかと推察している。また、現在構築したサブクローン体では、隣接したフラグメントの遺伝子、例えば ORF 6 と ORF 7 の様な遺伝子を含むサブクローン体の検討は行っていない為、それらが協奏的に働く事で turbomycin 類の生産が行われる可能性もある為、現在検討を行っている段階である。

第4章 抗酸化活性試験

活性酸素とは、一般的には O_2^- 、一重項酸素、OH ラジカル及び過酸化水素水などが狭義の活性酸素となるが、広義には、それらに加えて脂質過酸化物や O_2^- を生成しやすい有機ラジカルなど生体内分子を酸化する物も含む。

フリーラジカルは非特異的な反応をすることが多く、多くの生体内分子を標的としている。脂質、核酸、アミノ酸、炭水化物等々、種々の生物学的活性物質などを標的とするが、標的が異なるが故に多くの病態・疾患と関連していることになる。特に、全ての細胞膜の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸は活性酸素により攻撃され、脂質過酸化連鎖反応を介して過酸化脂質を生成する。生体膜は脂質や蛋白で構成されているが、それらは細胞や小器官を仕切る隔壁としてのみならず、生理活性物質の素材として、あるいは酵素として、膜表面の受容体として多様な機能を集約した場を形成している。その為、この連鎖的脂質過酸化反応は、膜構造を破壊するだけでなく、そこで働く蛋白の酵素作用や受容体機能にも大きな障害を与える事になる (Figure 33)。¹⁰⁷⁾

この様なフリーラジカルによる脂質過酸化反応は生体膜全てに共通しており、その障害が神経細胞に及ぶと、細胞壊死、アポトーシス等を生じる。その為、これらの活性酸素種・フリーラジカルの消去剤は、脂質過酸化反応の開始を予防する事ができる可能性がある。一度不飽和脂肪酸より水素引き抜き反応が生じると、脂質過酸化反応はペルオキシラジカルを担体として連鎖的に進行し、脂質過酸化物が生成する。このペルオキシラジカルを捕らえ、連鎖反応を断つ物質として、 α -トコフェロールの様なラジカル捕捉型の抗酸化剤がある。

Table 12. 活性酸素に対する消去因子

活性酸素	ラジカルスカベンジャー	抗酸化剤
O_2^-	SOD	ビタミン C グルタチオン
H_2O_2	catalase glutathione peroxidase	
$RO\cdot / ROO\cdot$		ビタミン C グルタチオン ビタミン E
$OH\cdot$	D-mannitol 安息香酸 ギ酸 DMSO	グルタチオン ビタミン E
一重項酸素	b-カロチン	ビタミン C ビタミン E

それぞれの活性酸素には活性酸素消去酵素及び、消去因子が存在する。これらによって生体内の過剰な活性酸素が消去される事でバランスが保たれている。消去酵素としては、 O_2^- を H_2O_2 と O_2 にする SOD (superoxide dismutase)、 H_2O_2 を H_2O と O_2 にするカタラーゼ等がある。消去因子としては特定の活性酸素を消去するラジカルスカベンジャーと呼ばれる物と、何種類かの活性酸素を消去する抗酸化剤がある。ラジカルスカベンジャーの例としては、先述した SOD や一重項酸素に対して作用する β -カロチン等があり、抗酸化剤の例としては、アスコルビン酸、 α -トコフェロールやフラボノイド等が挙げられる (Table 12)。^{108, 109)}

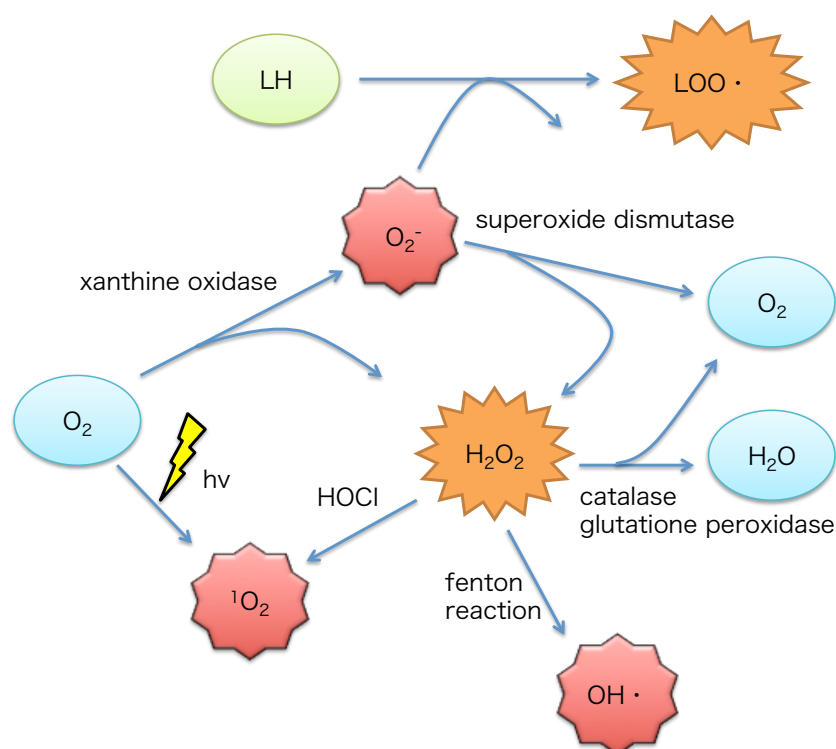


Figure 33. 活性酸素発生メカニズムとその消去因子

アスコルビン酸や α -トコフェロール等の低分子化合物は、体外から取り込む必要のあるビタミンである。これまでも天然資源から抗酸化物質単離報告例は多く、更に未開拓な資源を探索する事によって、抗酸化剤の代替物となる化合物を見出す可能性がある。本研究では、メタゲノムライブラリを用いた function-based screening によって、抗酸化剤としての機能を果たす低分子化合物の探索を行った。

スクリーニング系構築

抗酸化活性試験においては 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いて活性を有するクローンの探索を行った。ラジカルは一般的にその反応性の高さから、短時間にて分解消去されるため、通常測定に用いる事は困難である。

しかしながら、DPPH はその構造の嵩高さから、安定に存在する事の出来る紫色のラジカル化合物であり、その最大吸収は 517 nm である (Figure 34a)。¹¹⁰⁾ DPPH はフリーラジカルが除去されると紫色から黄色へと明瞭な色の変化を示す。この色の違いを目視で捉える事により、抗酸化活性を有するクローンの探索を試みた (Figure 34b)。

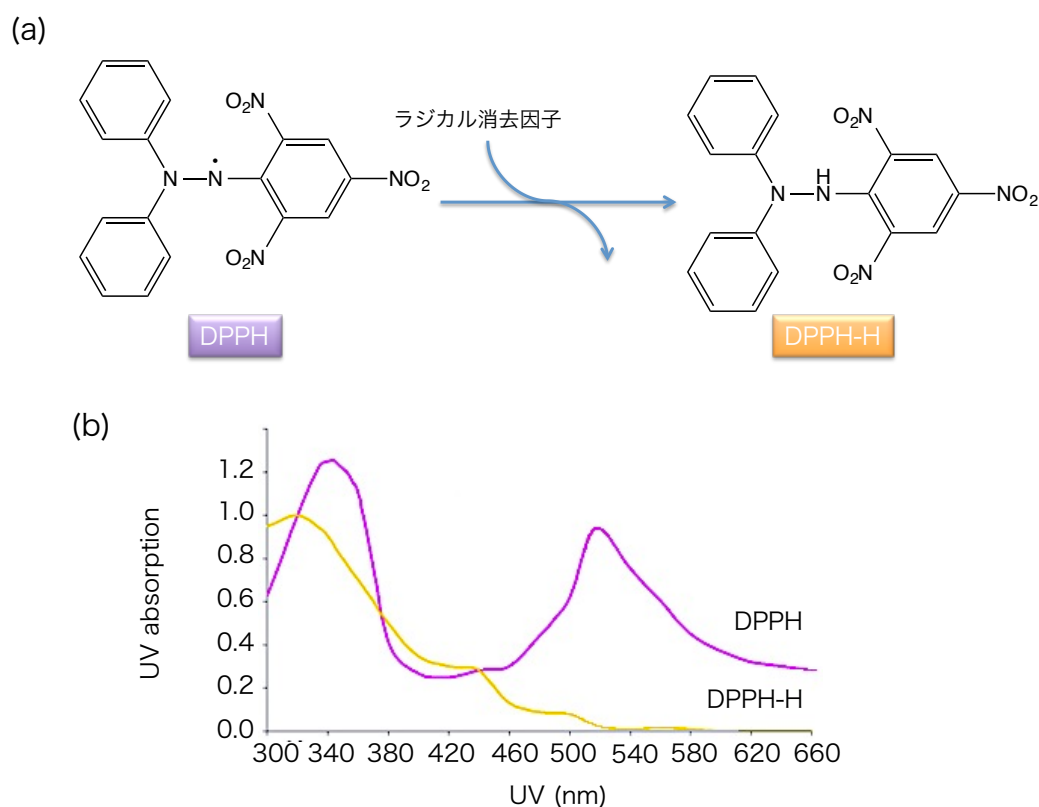


Figure 34. (a) DPPH 除去機構、(b) DPPH 及び DPPH-H の UV クロマトグラム

スクリーニング手法としては抗菌活性試験と同様に、オーバーレイアッセイを用いる事でプレート上での活性試験を試みた。メタゲノムライブラリを用いた抗酸化活性試験系の構築は本研究が初めての適応となる (Figure 35)。

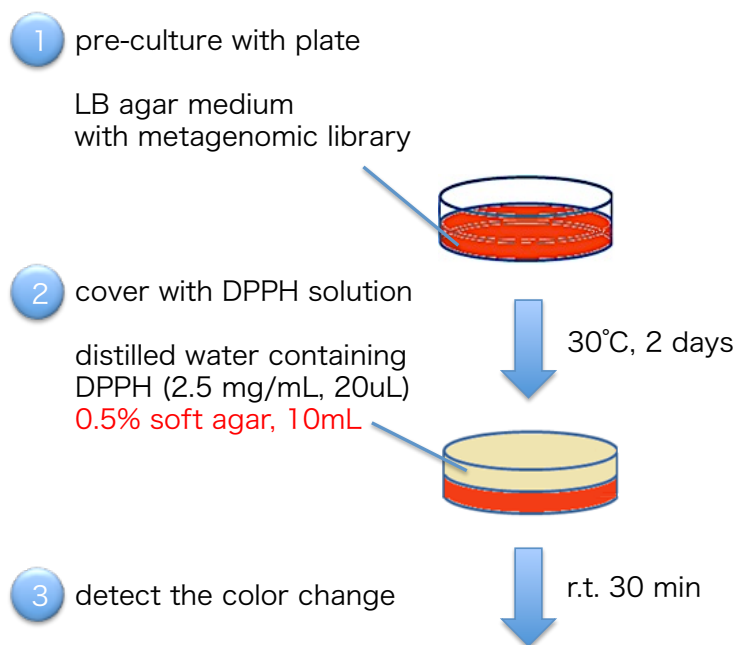


Figure 35. 抗酸化活性スクリーニング法

抗酸化活性陽性クローンの探索

本試験において、抗酸化活性物質を産生しているクローンでは、DPPH を含む寒天培地でコロニーを上から覆った際に、そのコロニー周辺でのみ DPPH が消費され、DPPH の紫色から通常のコロニーの色である黄色へと色調が戻る為、その色調変化の検出を目視によって試みた。

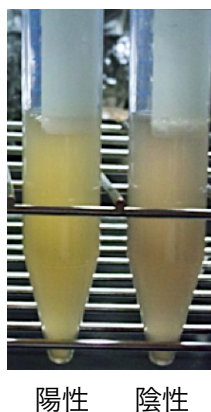


Figure 36. 抗酸化活性陽性クローンの確認

構築したメタゲノムライブラリより探索を試みた結果、本スクリーニング系に対して陽性を示すコロニーの発見に至った。実際に、空ベクターを含む negative control の培養液と陽性を示したクローンを LB 培地にて液体培養して比較をした所、抗酸化活性に対して陽性を示すクローンでは DPPH の色調が薄くなっている事が目視で確認できた (Figure 36)。従って、このクローンが DPPH 除去作用を有する化合物を生産していると判断した。次いで、得られた本クローンを液体培地にて大量培養し、DPPH を用いた抗酸化活性を指標として活性化合物単離を試みた。

抗酸化化合物の単離

得られたポジティブクローンを LB 液体培地にて大量培養後、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) を用いた抗酸化活性を指標にして、分画を行った。得られた培養液を Diaion HP-20 にて溶出後、ODS を用いて分離を step-wise gradient にて行った。得られた ODS 画分 (25%, 50%, 75%, 100% MeOH fraction) に対して DPPH を用いた抗酸化活性試験を行った所、75%及び 100% MeOH fraction において活性を確認した。

更にこれらの活性フラクションに対して silica gel column chromatography を用いて分離を行い、2つのフラクションに抗酸化活性を確認した。これらの活性を示したフラクションに対して HPLC を用いた分離・分析を試み、100% MeOH フラクションから化合物 **7** を単離し、75% MeOH フラクションから化合物 **8a-8d** を単離した。

化合物 7 の同定

化合物 **7** は赤色油状物質として得られた。¹H-NMR スペクトルより、化合物 **5** 及び **6** と同様にインドールに特徴的な 6.89 ppm のシングレットシグナル、更に 7.29、7.48 ppm のダブルットシグナル及び、6.91、7.03 ppm のトリプレットシグナル、計 5 つのシグナルが観測された。また、これらのピークは積分値がそれぞれ 2 であった事から、構造中にはインドール基が 2 つ含まれていると判断した (Table 13)。

また、高磁場領域には 4.18 ppm に積分値 2 のメチレンピークも観測された。これらの結果から、本化合物は 3,3'-diindolylmethane (**7**)であると決定した (Figure 37)。

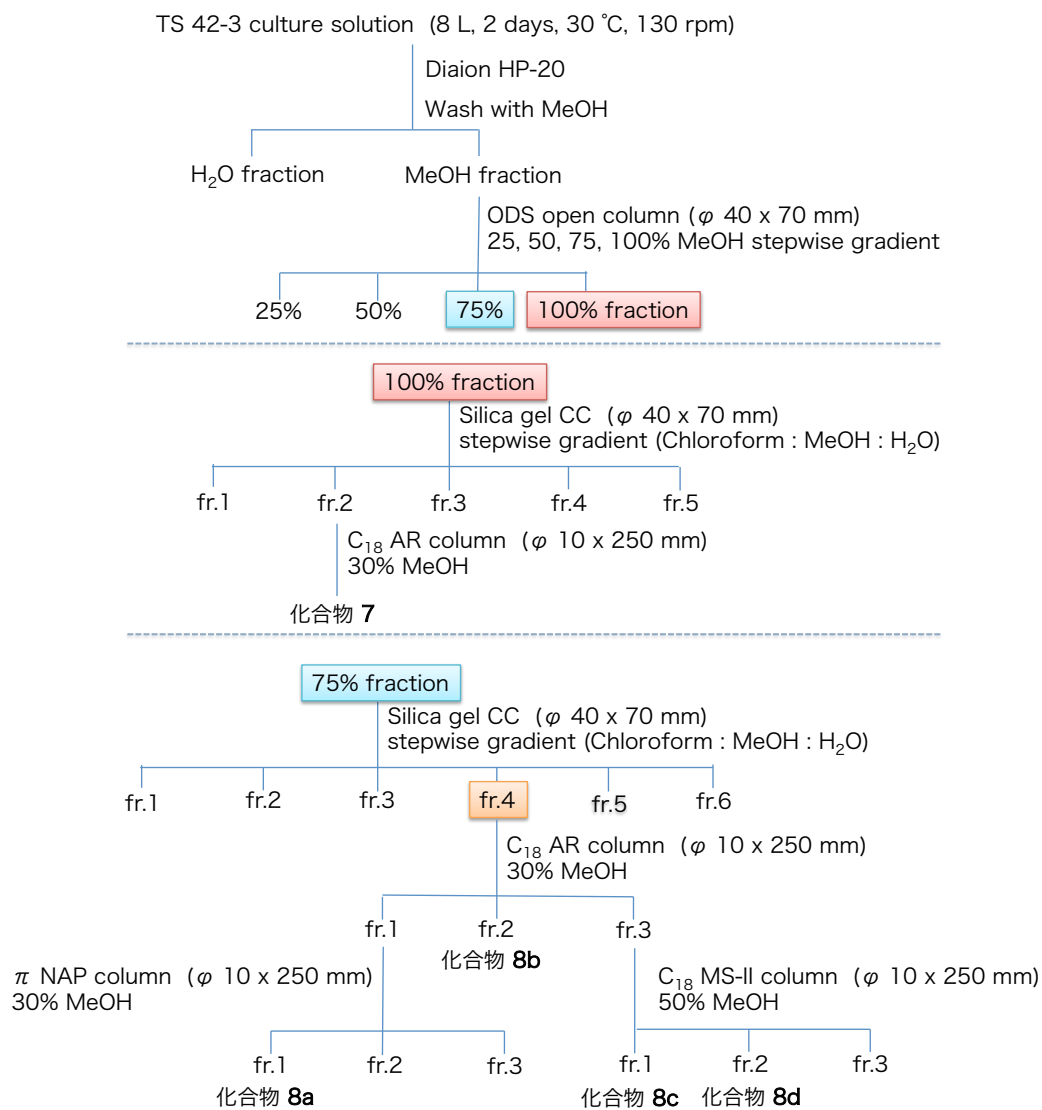
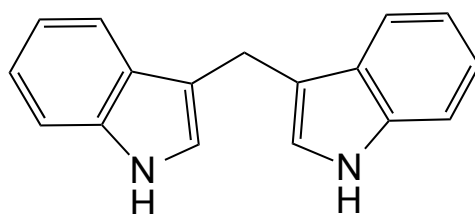


Chart 2. 抗酸化活性を指標とした活性化合物単離



3,3'-diindolylmethane (7)

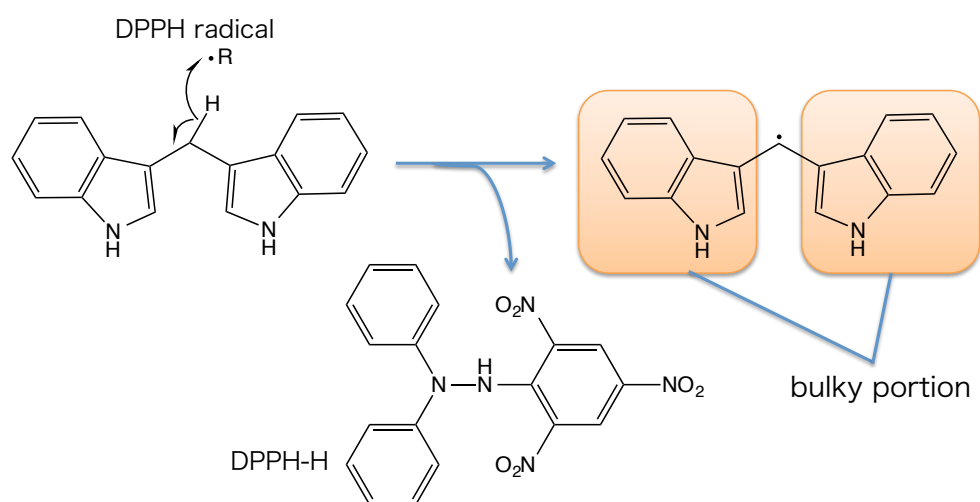
Figure 37. 化合物 7 の構造

Table 13. 化合物 **7** のケミカルシフト¹H-NMR (500 MHz) data for Cpd **7** in CD₃OD

Position	δ (ppm)	Intensity	Multiplicity
indole			
1, 1'-NH	-		
2, 2'	6.89	2H	s
4, 4'	7.48	2H	d ($J = 8$ Hz)
5, 5'	6.91	2H	t ($J = 8$ Hz)
6, 6'	7.03	2H	t ($J = 8$ Hz)
7, 7'	7.29	2H	d ($J = 8$ Hz)
CH ₂ portion			
8	4.18	2H	s

化合物 **7** について

化合物 **7** は、構造中に立体的に嵩高い置換基であるインドール 2 分子を有している。その為、DPPH を指標にした活性を確認する際、化合物 **7** は中央のメチレン鎖で DPPH ラジカルを捕捉し、ラジカルスカベンジャーとして働いたのではないかと考えられる (Figure 38)。

Figure 38. 化合物 **7** のラジカル捕捉メカニズムの推定

また、化合物 **7** はブロッコリーやケール等のアブラナ科の植物や野菜に多く含まれる物質である。これは植物中の Glucobrassicin という成分が変化する事で生成されると報告されている。即ち、Glucobrassicin が加水分解して indole 3-carbinol へと変換された後、不安定な indole 3-carbinol が、2 分子重合した化合物 **7** へと変化する (Figure 39)。¹¹¹⁾

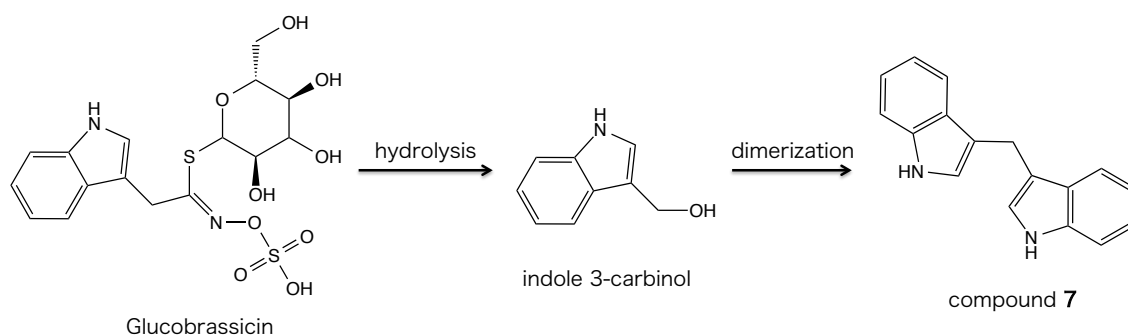


Figure 39. 化合物 **7** の産生機構

化合物 **8a-8d** の同定

化合物 **8a-8d** は類似した極性及びNMR スペクトルを示した。まず化合物 **8a** に関して、¹H-NMR スペクトルを精査すると、アミノ酸のα位プロトンと考えられる 4.04 及び 4.35 ppm のシグナルが観測された。また、6.69 及び 7.03 ppm にダブルットシグナルが観測されたことから、パラ 2 置換ベンゼンが構造中に存在すると推察し、チロシンがその部分構造に含まれていると考えた。また、残ったシグナルに関して精査すると、COSY による相関から、アルキル鎖であると判断し、もう一方のアミノ酸をプロリンと推定した。しかしながら、¹³C-NMR スペクトルにおいて、アミノ酸末端に存在するカルボン酸に対応する低磁場のシグナルが観測されず、代わりに 165.6 及び 169.5 ppm のシグナルが見られた (Table 14)。また、ESI-TOF MS によって **8a** の分子量を 244 と推定した。これらのことから、本化合物は 2 つのアミノ酸が互いにアミド構造を形成する diketopiperazine 構造であると推定し、化合物 **8a** を Pro 及び Tyr によって構成される diketopiperazine 類であると決定した。

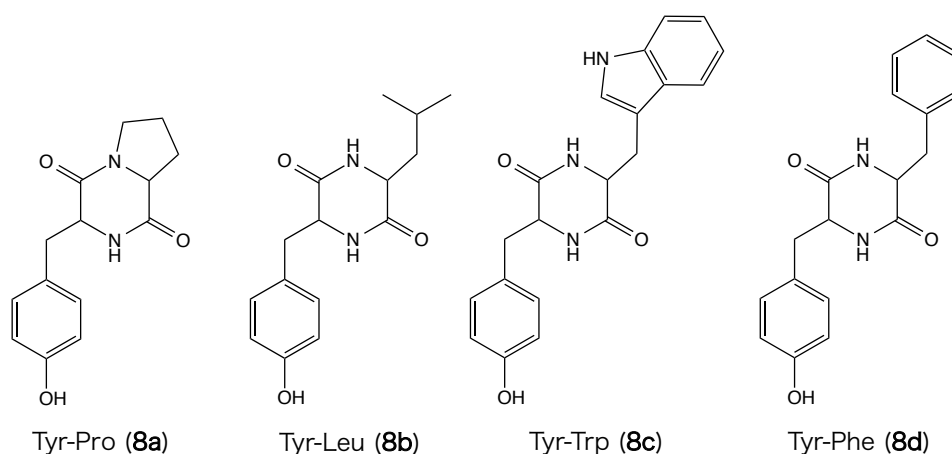


Figure 40. Diketopiperazine 構造を有する活性化合物

また、他に単離された化合物 **8b**、**8c** 及び **8d** の各 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルからは、**8a** と類似したシグナルが見られ、それら全ての化合物中にチロシンを含む事が示唆された。更に、各化合物において $^1\text{H-NMR}$ を精査した結果、**8b** はロイシン、**8c** はトリプトファン、**8d** はフェニルアラニンをその構造中に含む diketopiperazine 化合物であると構造を決定した (Figure 40)。

Table 14. 化合物 **8a-8d** のケミカルシフト

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) and $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz) data for Cpd **8a** in CDCl_3

Position	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Intensity	Multiplicity
1	165.6	-		
2	-	-		
3	44.6	3.54	1H	m
		3.34	1H	m
4	21.4	1.79	2H	m
5	28.1	1.22	1H	m
		2.09	1H	m
6	58.7	4.04	1H	s
7	169.5	-		
8	-	-		
9	56.6	4.35	1H	
10	36.3	3.06	1H	
Ar				
1'	156.4	-		
2', 6'	130.8	7.03	2H	d ($J = 8$ Hz)
3', 5'	114.9	6.69	2H	d ($J = 8$ Hz)
4'	126.3	-		

¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data for Cpd **8b** in DMSO

Position	¹³ C	¹ H	Intensity	Multiplicity
	δ (ppm)	δ (ppm)		
1	167.4	-		
2	-	8.05	1H	br.s
3	53.4	3.46	1H	m
4	23.0	0.77	1H	m
		0.17	1H	m
5	24.0	1.39	1H	m
6	22.8	0.65	3H	d (<i>J</i> = 7 Hz)
7	23.0	0.63	3H	d (<i>J</i> = 7 Hz)
8	168.6	-		
9	-	8.01	1H	br.s
10	56.8	4.02	1H	m
11	38.7	2.98	1H	m
		2.67	1H	m
Ar				
1'	157.6	-		
2', 6'	134.7	6.90	2H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
3', 5'	115.6	6.64	2H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
4'	126.9	-		
-OH	-	9.32	1H	br.s

¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data for Cpd **8c** in DMSO

Position	¹³ C	¹ H	Intensity	Multiplicity
	δ (ppm)	δ (ppm)		
1	-	-		
2	7.62		1H	br.s
3	3.93		1H	m
4	-	-		
5	7.80		1H	br.s
6	3.75		1H	m
Tyr				
1'	-			
2', 6'	6.56		2H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
3', 5'	6.53		2H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
4'	-			
-OH	9.15		1H	br.s
7'	2.78		1H	m
	2.46		1H	m
Trp				
1-NH	10.9		1H	br.s
2"	6.98		1H	s
3"	-	-		
4"	7.47		1H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
5"	6.97		1H	t (<i>J</i> = 8 Hz)
6"	7.06		1H	t (<i>J</i> = 8 Hz)
7"	7.31		1H	d (<i>J</i> = 8 Hz)
8"	2.41		1H	m
	1.81		1H	m

¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data for Cpd **8d** in DMSO

Position	¹ H	Intensity	Multiplicity
	δ (ppm)		
1	-	-	
2	-	-	
3	3.94	1H	m
4	-	-	
5	-	-	
6	3.89	1H	m
Tyr			
1'	-	-	
2', 6'	6.84	2H	d ($J = 8$ Hz)
3', 5'	6.68	2H	d ($J = 8$ Hz)
4'	-	-	
-OH	9.21	1H	br.s
7'	2.17	2H	m
Phe			
1'	-	-	
2', 6'	7.03	2H	d ($J = 8$ Hz)
3', 5'	7.27	2H	t ($J = 8$ Hz)
4'	7.20	1H	d ($J = 8$ Hz)
7'	2.55	2H	dd ($J = 11, 5$ Hz)

化合物 8a-8d について

Diketopiperazin 類の生合成に関しては、tRNA 依存的 diketopiperazine 類生合成経路¹¹²⁾ 及び NRPS 依存的 diketopiperazine 類生合成経路¹¹³⁾ が報告されている。diketopiperazine 骨格合成酵素はいくつか報告されており、どのアミノ酸を取り込んで骨格を形成するかによって特性がある (Table 15)。

Table 15. Diketopiperazine 生合成酵素の生産特異性

Enzyme	Source	Cyclodipeptides produced
AlbC	<i>Streptomyces noursei</i>	cyclo FX
Rv2275	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	cyclo YX
YvmC-Bsub	<i>Bacillus subtilis</i>	cyclo LX
YvmC-Blic	<i>Bacillus licheniformis</i>	cyclo LX
YvmC-Bthu	<i>Bacillus thuringiensis</i>	cyclo LX
pSHaeC06	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	cyclo LX
Plu0297	<i>Photorhabdus luminescens</i>	cyclo LX
JK0923	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	cyclo LX
Nvec-CDPS2	<i>Nematostella vectensis</i>	cyclo WX

Table 15 には各 diketopiperazine 合成酵素において、基質として取り込むアミノ酸の傾向を示した。例えば AlbC では、diketopiperazine 構造のうち、片側のアミノ酸にフェニルアラニンを取り込み、もう一方に何種類かのアミノ酸を取り込む傾向がある (Figure 41)。¹¹⁴⁾

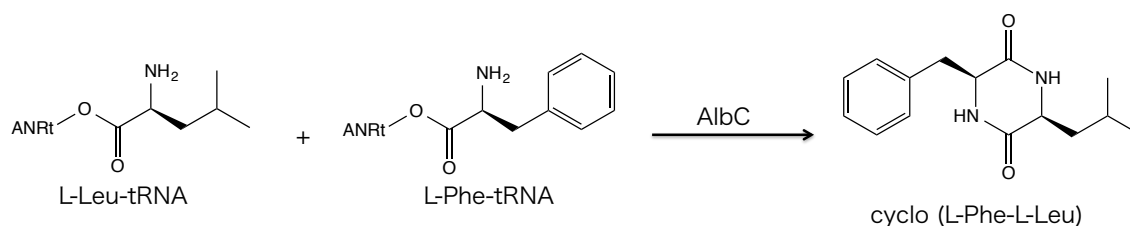


Figure 41. AlbC による diketopiperazine 産生

本研究において単離した化合物群は、化合物 8a-8d の全ての構造の一方がチロシンで構成されている。Diketopiperazine 生合成酵素において、チロシンを片側に取り込む酵素として、Rv2275 が知られている。¹¹⁵⁾

現在、得られた抗酸化活性クローンの挿入遺伝子配列の配列解析を行っていないが、恐らくこの diketopiperazine 合成酵素と相同性を示す ORF が含まれており、その影響によってチロシンを含む diketopiperazine 類が生じたと推測している。

第5章 他のスクリーニング系への適応

先述した試験系に次いで、海綿動物に含まれるメタゲノム DNA がどの程度広範なスクリーニング系へと適応が可能を検討する為、鉄キレート活性及び、カテコール分解活性試験への適応を試みた。

鉄キレート活性試験

これまでに、土壌由来メタゲノムライブラリより鉄キレート活性試験系の構築が達成されており、vibrioferrin や bisucaberin 等の活性化合物の同定、またそれらに関する詳細な生合成知見が報告されている。^{53, 54)} そこで、今回構築した海綿動物由来メタゲノムライブラリに対して鉄キレート活性試験系を試みた。

CAS を用いたスクリーニング系構築

本スクリーニング系では Chrome azurol S (CAS) を用いて構築が行われた。^{116, 117)} 通常、キレート化合物である CAS が鉄イオンを配位する際には青色を呈色しているが、他の鉄キレート化合物がその鉄をキレートする事で、溶液の色はオレンジ色へと変化する (Figure 42)。

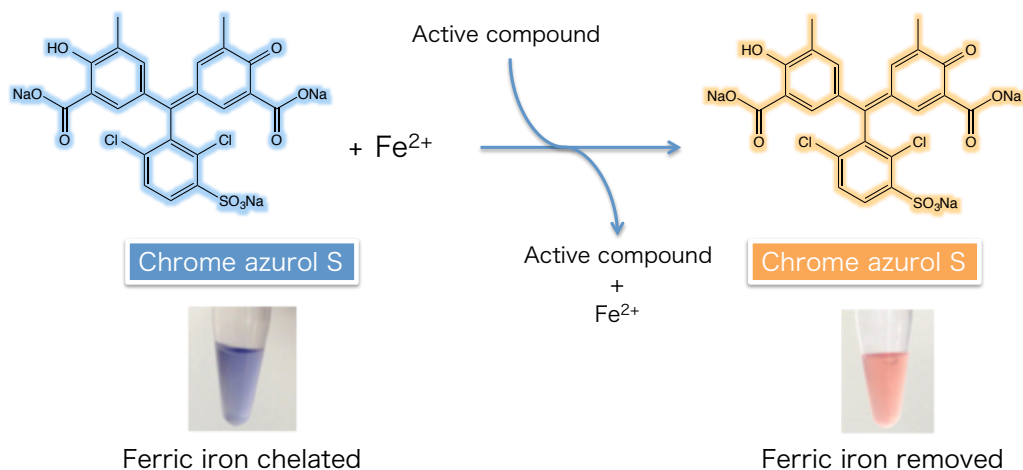


Figure 42. Chrome azurol S を用いた溶液の色調変化のメカニズム

この色調変化は目視にて活性評価を行うメタゲノムスクリーニングに適しており、CAS を含む培地上にメタゲノムライブラリを培養する事で、その周囲の色に変化が検出されるか、探索を試みた。

鉄キレート活性試験系に対して陽性を示すクローンの探索

LB 培地中に事前に作製した CAS 溶液を添加し、CAS 及び Chloramphenicol 含有 LB 寒天培地を作製した。作製した寒天培地上にメタゲノムライブラリを希釈して 1 プレートに 200 コロニー程度を培養した。30℃、3 日間培養した後、コロニー周辺に色の変化が見られるクローンの探索を試みた。結果、コロニー周辺が青色から黄色へと変化したクローンを発見した (Figure 43)。実際に、空ベクターを含む EPI300 株と培養して比較した所、その変化が明確に確認された。

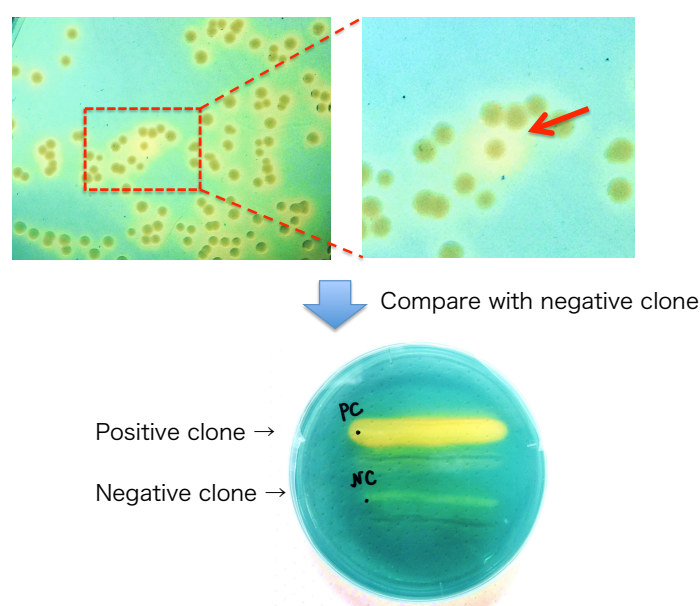


Figure 43. CAS プレートを用いた function-based screening の結果

これらの変化がどのような要因によって引き起こされるか同定を試みたが、鉄キレート化合物はその極性が高い物質が多く、同定が困難である事が予想された為、まず得られた鉄キレート活性に対して陽性を示したクローンに含まれる挿入メタゲノム配列の解読を試みた。

次世代シーケンサーによる挿入配列の解読

解読の結果、全長が 26 kbp で、28 個の推定 ORF を含む挿入配列であると判明した (Table 16)。これらの遺伝子のうち、どの遺伝子が鉄キレート活性に対して必須な遺伝子かを同定する為、先述した抗菌活性試験での必須遺伝子の同定と同様に、サブクローニングを行う事でその推定を試みた。

Table 16. BLAST を用いた挿入配列の相同性検索結果

ORF	Size (aa)	Predicted function	Identity (%)
1	144	aspartate carbamoyltransferase [<i>Desulfotomaculum hydrothermale</i>]	60
2	600	dihydroorotase [<i>Syntrophomonas zehnderi</i>]	57
3	65	hypothetical protein [<i>Scytonema hofmanni</i>]	69
4	85	dienelactone hydrolase [<i>Frankia</i> sp. DC12]	36
5	319	nuclease of the RecB family protein [<i>Paenibacillus polymyxa</i>]	25
6	59	phenylalanine--tRNA ligase subunit beta [<i>Eggerthia cateniformis</i>]	42
7	254	short-chain dehydrogenase [<i>Arthrobacter</i> sp. MA-N2]	45
8	286	enoyl-CoA hydratase [<i>Frankia</i> sp. Iso899]	47
9	165	hypothetical protein [<i>Photobacterium marinum</i>]	38
10	251	ubiquinone biosynthesis methyltransferase UbiE [<i>Anoxybacillus flavithermus</i>]	24
11	63	cyclodehydratase [<i>Streptomyces</i> sp. CNT302]	39
12	369	carbamoyl phosphate synthase small subunit [<i>Dehalococcoidia bacterium</i> SG8_51_3]	62
13	79	antitoxin [<i>Syntrophobolus glycolicus</i>]	44
14	94	twitching motility protein PilT [<i>Geobacter daltonii</i>]	37
15	219	glycerophosphodiester phosphodiesterase [<i>Bacillus</i> sp. FJAT-18019]	38
16	1056	carbamoyl phosphate synthase large subunit [<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i>]	65
17	381	aspartate aminotransferase [<i>Mastigocladus laminosus</i>]	37
18	154	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1 [<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1]	35
19	287	carbon-monoxide dehydrogenase [<i>Nitrolancea hollandica</i>]	54
20	155	carbon monoxide dehydrogenase [<i>Thermorudis peleeae</i>]	76
21	114	transcriptional regulator [<i>Acidovorax temperans</i>]	46
22	138	transcriptional regulator [<i>Nitrococcus mobilis</i>]	61
23	244	hypothetical protein ETSY2_16275 [<i>Candidatus Entotheonella</i> sp. TSY2]	66
		3-ketoacyl-ACP reductase [<i>Miscellaneous Crenarchaeota</i>]	44
24	126	carbon-monoxide dehydrogenase [<i>Sphaerobacter thermophilus</i>]	41
25	269	hypothetical protein ETSY2_09650 [<i>Candidatus Entotheonella</i> sp. TSY2]	52
		enoyl-CoA hydratase [<i>Kyrpidia tusciae</i>]	37
26	152	hypothetical protein [<i>Phaeospirillum molischianum</i>]	50
27	283	enoyl-CoA hydratase [<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>]	49
28	308	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [<i>Candidatus Entotheonella</i> sp. TSY1]	64

サブクローニングによる遺伝子の探索



Figure 44. 相同性検索結果の模式図

上に次世代シーケンサーによって得られた相同性検索結果の模式図を示す (Figure 44)。この配列より適切な長さの断片となる様にプライマーを作製し、フラグメント 1-4 の 4 種サブクローン体構築を試みた。結果、4 種の形質転換体構築を達成した。次いで、これらのうちどの遺伝子が活性に必要なか判断する為、CAS を含む培地上にこれらのクローンを培養し活性評価を行った。

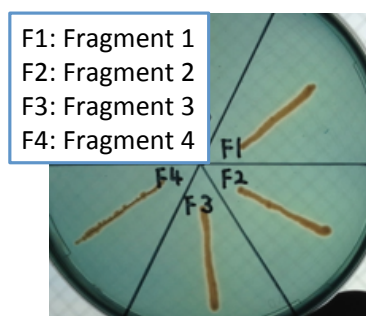


Figure 45. CAS 培地を用いた活性評価

結果、これら 4 種のサブクローン体では鉄キレート活性を見出す事は出来なかった (Figure 45)。その為、本活性に必要な遺伝子は複数存在し、それらが協奏的に作用する事で活性化合物の生産が行われていると推察された。

複数遺伝子の関与から推定される化合物の構造

この培養液からの活性化合物の単離には至っていないが、サブクローニングの結果から、複数の遺伝子がこの化合物生産に関与すると推定された事から、相同性検索の結果を改めて精査する事とした。得られた 28 個の推定 ORF のうち、協奏的に機能する可能性のある遺伝子を探索した所、ORF 1、2、12 及び 16 の 4 つにその関連性が見られた (Figure 46)。

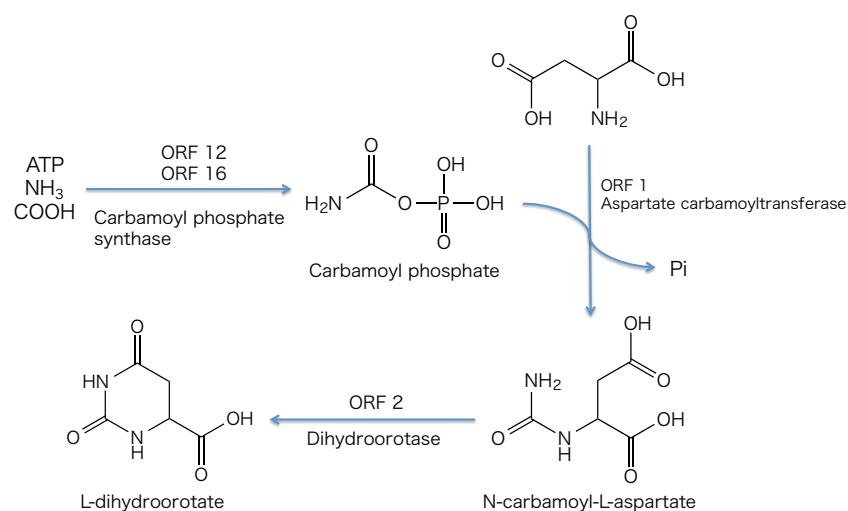


Figure 46. ジヒドロオロチン酸の生合成経路

上にはピリミジン生合成の中間体として明らかにされているジヒドロオロチン酸の生合成経路を示している。¹¹⁸⁾ ジヒドロオロチン酸の生合成にはアンモニアや ATP 等の

開始物質より 3 工程の酵素反応にてその生産が行われている。今回得られた挿入配列中には、Carbonyl phosphate synthase、Asparatate carbamoyltransferase、Dihydroorotase とそれぞれ相同性を示す遺伝子が含まれていた為、今回生産される活性化合物はジヒドロオロチン酸に類する化合物であろう事が示唆された。¹¹⁹⁻¹²¹⁾

これまでに報告されているシデロフォア化合物は、構造的にジヒドロオロチン酸と類似した構造を含む化合物も多く、これらに関連した化合物が生産されている可能性は十分に考えられる。

カテコール分解試験

メタゲノムライブラリを用いた function-based screening では、宿主によって生産される化合物と並行して挿入配列に含まれる酵素を指標としたスクリーニングも多く探索されている。実際に、これまで報告されてきた酵素よりも反応性が高い物、あるいは広範な基質特異性を有する物やこれまでは基質として受け入れなかった化合物を受け入れるようになった酵素等、多くの知見が得られている為、難培養性微生物は工業的にも非常に魅力的な資源である。そこで今回、海綿動物由来メタゲノムライブラリの遺伝子資源多様性を評価する為、カテコール分解活性試験への適応を試みた。

カテコール分解試験系の適応・探索

カテコール分解にはオルト開裂経路とメタ開裂経路の 2 種類が存在するが、カテコールがメタ開裂した際には黄色化合物が生成する (Figure 47)。¹²²⁾ その為、function-based screening で探索を行う際には、メタ開裂を引き起こす酵素の探索を試みた。

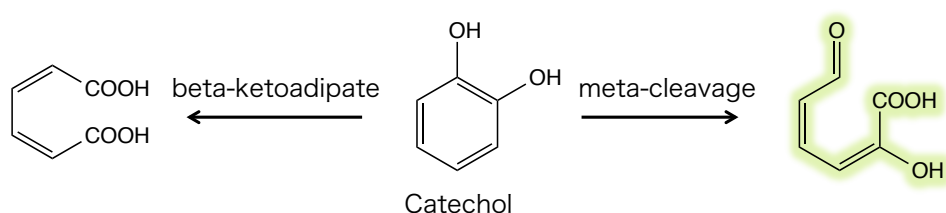


Figure 47. カテコール分解経路

本試験系では、まず Chloramphenicol 含有 LB 寒天培を調製し、1 プレートに 300 コロニー程度となる様にメタゲノムライブラリを希釈してまき、30℃、3 日間培養し、コロニーを形成させた。その後、カテコール溶液をプレート上に噴霧し、コロニー自身の色調変化を確認した。結果、コロニーが黄変するクローンを 5 種発見した (Figure 48)。

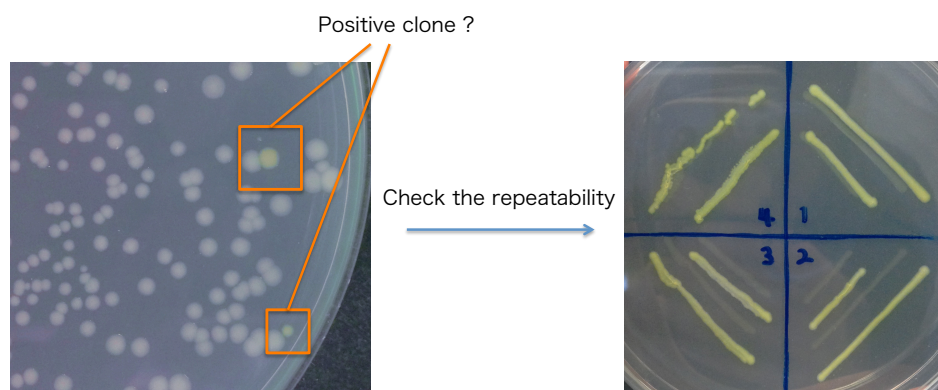


Figure 48. カテコール分解活性試験を用いた探索結果

以上の様に、海綿動物由来メタゲノムライブラリを用いた際にも、カテコール分解活性を有するクローンの発見に成功した。得られたこれらのクローンに含まれる挿入遺伝子の解析により、酵素反応速度、あるいは基質特異性の異なるカテコール分解酵素の発見が期待される。

総括

本研究では海綿動物よりメタゲノムライブラリ構築を試み、 2.5×10^5 cfu にてライブラリの構築を達成した。また、本メタゲノムライブラリに対して 5 種類の function-based screening を行い、各試験系に対して陽性を示すクローンを見出した。これらのスクリーニング系のうち、色素産生試験は海綿動物を用いたスクリーニングとしては初の報告であり、抗酸化活性試験の確立に関しては、メタゲノムライブラリを用いたスクリーニングにおいて初めての適用例である。

各試験に対して陽性を示したクローンを液体培地にて大量培養する事で活性化合物本体の同定を試み、色素産生スクリーニングでは porphyrin 系化合物 4 種、抗菌活性スクリーニングでは 2,2-di(3-indolyl)-3-indolone 及び turbomycin A の 2 種、また、抗酸化活性スクリーニングでは arundine 及び 4 種の diketopiperazine 化合物、の計 11 種の化合物同定に至った。

このうち、2,2-di(3-indolyl)-3-indolone の生産に関わる遺伝子同定の為、次世代シーケンサーを用いてその挿入配列を解読した。得られた全長 40 kbp の遺伝子情報からサブクローニングによって化合物生産を確認し、IMPD と相同性を示す ORF 25 がその生産に必要な事を明らかにした。

今後の展望

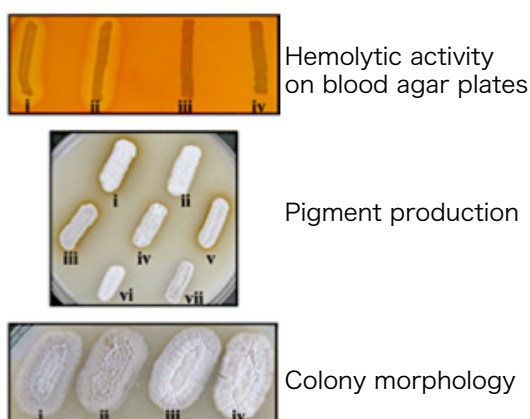
以上の様に、海綿動物由来メタゲノムライブラリを用いて様々なスクリーニング系へと適応が可能となった。また、2000 年以降にメタゲノム解析が本格的に利用される様になり、様々な資源からもメタゲノムライブラリが構築されてきており、これまでに生合成知見が得られていなかった化合物群の詳細な知見が得られる様になった。しかしながら function-based screening を利用して、多様な解析が出来る様になった現在も、未だ多くの改善点が残っている。

その中で最も重要な点はライブラリ構築に用いる資源と宿主の選択である。これまでにメタゲノムライブラリ構築の際に用いられてきた宿主のほとんどが大腸菌である。これは遺伝子操作が行いやすい事が大きな理由ではあるが、メタゲノム DNA 中には GC 含量の問題等から、大腸菌中での発現に適していない遺伝子も当然の事ながら多数存在している。

その為、近年では大腸菌以外の発現宿主、具体的には放線菌 *Streptomyces lividans* やグラム陰性細菌 *Ralstonia metallidurans* 等を用いたメタゲノムライブラリの構築も

達成されている。実際に、放線菌由来メタゲノムライブラリからは形態変化や色調変化を誘導するクローンが発見されている。¹²³⁾ 更には *R. metallidurans* 由来メタゲノムライブラリに対しても抗菌活性試験試まれ、コロニー周辺に阻止円を示すクローンが発見されている。また、そのクローンの液体培養から、それらの要因が PKS 産物である事も同定されている (Figure 49)。^{124, 125)}

Streptomyces lividans



Ralstonia metallidurans

Antibacterial activity

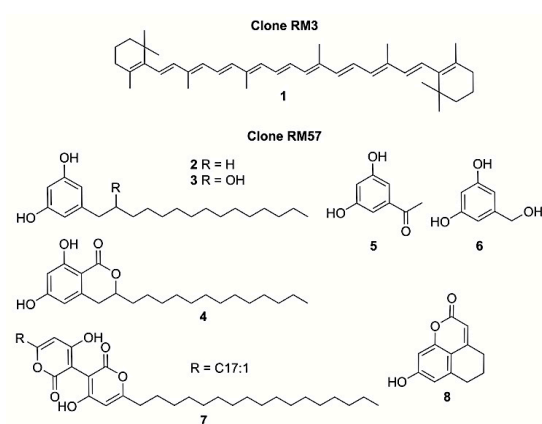


Figure 49. 大腸菌以外での発現宿主を基にした function-based screening

こうしたメタゲノムライブラリを用いた探索手法は未だ黎明期にあり、先述した発現宿主や構築に用いる資源の多様性、また、実際に function-based screening で行う新たな試験系の適応等によって、今後更に興味深い化合物の単離、あるいはその化合物生産を担う酵素の発見が期待できる。¹²⁶⁾

実験項

実験一般

Experimental equipment

Water deionizer: Milli-Q[®] Integral 5 超純水製造装置 (Millipore)

Autoclave apparatus: BS-325, KS-243 (TOMY)

Shaker: innova4230 (New Brunswick Scientific), NR-20, Bio-Shaker BR-42FL, DOUBLE SHAKER NR-30 (TAITEC), ORBITAL SHAKING INCUBATOR MODEL: OSI-502LD (FIRSTEK)

Rotary Evaporator: ROTARY EVAPORATOR N-1000 (EYELA)

Freeze-drier: FDU-2200 (EYELA)

Freezer: Deep Freezer MDF-292, MEDICAL FREEZER (SANYO), ULT-2586-35D (REVCO)

Incubator: M-230F (TAITEC), CI-610 (ADVANTEC)

Clean bench: CCV (Hitachi)

pH meter: SevenEasy[™] pH Meter S20, InLab[®] Routine Pro (METTLER TOLEDO)

Vortex: VORTEX GENIE2 (Scientific Industries Inc.)

Cooled centrifuges (for Eppendorf tubes): M X-300, MX-305 (TOMY)

Centrifuges: CAPSULEFUGE PMC-060 (TOMY)

DNA centrifugal evaporator: DNA プチ vac PV-1200 (WAKENYAKU)

Agarose gel electrophoresis tank: Mupid-2plus (ADVANCE)

Gel scanner: AE-6905H Image Saver HR (ATTO)

PCR Thermal Cyclers: PTC-100, PTC-200 (MJ Research Inc.), TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (TaKaRa)

Sequence Analysis Software: DNASIS[®] Pro (Hitachi Software Engineering)

French Press: FRENCH[®] PRESSURE CELLS AND PRESS (Thermo Spectronic)

LC/MS: micro TOF focus-ws (BRUKER DALTONICS) with a HP1100 series LC System (Agilent)

HPLC: 8020 series (TOSOH)

NMR: JNM-ECX 500, JNM-ECA 500 (JEOL)

NMR Data Analysis Software: Delta, Alice2 (JEOL)

Biochemical materials

Restriction enzymes: TaKaRa, New England Biotech,

Dephosphorylation enzyme: Alkaline Phosphatase (Shrimp) (TaKaRa)

DNA polymerase: iProofTM High Fidelity DNA Polymerase (BIO-RAD)

Escherichia coli Strains

EPI 300 : *F*, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)$ 7697, *galU*, *galK*, λ , *rpsL*, *nupG*, *trfA*

Several kits for experiments

DNA ligation: DNA Ligation Kit Ver.2.1 (TaKaRa)

Plasmid DNA preparation from *E. coli*: Wizard[®] Plus Minipreps (Promega), Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)

DNA purification: Wizard[®] SV Gel and Clean-Up System (Promega)

Fosmid library construction: CopyControlTM Fosmid Library Production Kit with pCC1FOSTM Vector (epicenter)

キット類は添付のプロトコルに従い使用した。

Chemical reagents

特に記載がない限り和光の特級品を用いた。

Stock solutions and stock mixtures

Chloramphenicol solution: 12.5 mg/ml の Chloramphenicol EtOH 溶液を調製し、これを 0.22 μ m 孔径のメンブレンフィルター (MILLEX GP[®] 0.22 μ m, Millipore) にて濾過滅菌したものを用いる。

CAS solution:

<Composition>

Chrome azurol S	605 mg
CTAB	729 mg
FeCl ₃	16.22 mg
10 mM HCl	

up to 1 L (with H₂O)

上述した CAS (Wako)、CTAB、FeCl₃ 及び HCl を混合し CAS 溶液として 1L 調製し、続くスクリーニング系へと用いた。

DPPH solution : DPPH (Wako) 10 mg を秤量し、MeOH に溶解させた後に 0.22 μm 孔径のメンブレンフィルター (MILLEX GP[®] 0.22 μm , Millipore) にて濾過滅菌したものを DPPH 溶液として使用した (濃度 10 mg/mL)。

Catechol solution: カテコールを滅菌水に溶かした後に、0.44 μm フィルターを用いてフィルター濾過を行いカテコール溶液とした。この試薬を用いてカテコール分解活性を有するクローンの探索を試みた (濃度 1 mg/mL)。

Media・Buffers

LB liquid medium: LB Broth, Miller 2.5 g (nacalai tesque), dH₂O up to 100 ml

LB agar medium: LB Agar, Miller 4.0 g (nacalai tesque), dH₂O up to 100 ml

Column

Diaion HP-20 (NIPPON RENSUI)

Silicagel column chromatography (関東化学)

ODS column chromatography (関東化学)

COSMOSIL 5C₁₈-MS-II column (nakarai tesque)

COSMOSIL AR column (nakarai tesque)

COSMOSIL 5C₁₈ PAQ column (nakarai tesque)

培地、試薬類、実験器具など滅菌可能なものは全て 121 °C、20 min でオートクレーブした。

第1章 *Discodermia calyx* 由来メタゲノムライブラリの構築

海綿採集

2011年5月、式根島にて採集された海綿 *D. calyx* を用いて、ライブラリ構築を行った。また、採集した海綿は-30℃にて凍結保存した。

D. calyx メタゲノム DNA の抽出

抽出法として、フェノール・クロロホルム抽出法を採用した。凍結保存しておいた海綿 10 g を乳鉢及び乳棒を用いて液体窒素下で破碎した。破碎した試料を 50 mL ファルコンチューブへと移し、Lysis buffer (組成: 8 M urea, 2% SDS, 350 mM NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 20 mL 加え、60℃、1 時間インキュベートした。振盪後、この溶液を室温、500 g、5 分間遠心を行い、上清を回収した。この上清と等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) を添加し、転倒混和した後、室温、800 g、5 分間遠心した。この操作を 2 度繰り返した後に、得られた DNA 溶液を 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 及び 2.5 倍量の 99.5% 冷エタノールを加え、析出した白色沈殿物をパスツールピペットにて回収した。得られた DNA を 70% 冷エタノールで 2 度洗浄した後に風乾し、DNase – Rnase free water を用いて溶解させた。この DNA 溶液に 100 ug/mL proteinase K 及び 0.5% SDS を添加し、50℃、1 時間インキュベートした。振盪後、再度フェノール・クロロホルム法にて DNA を抽出し、これを *D. calyx* メタゲノム DNA とした。

メタゲノムライブラリの構築

D. calyx 由来メタゲノムライブラリの構築には CopyControl™ Fosmid Library Production Kit を用い、プロトコールに従った抽出した *D. calyx* メタゲノム DNA 100 ug に対して 0.8% アガロースゲルを用いて冷却しつつ 50 V、2 時間電気泳動を行った。その後、fosmid ベクターへと組み込む為に適切なサイズである 40 kbp 周辺のバンドを切り出した。

得られたゲルを 70℃、10 分インキュベートし、アガロースゲルを完全に融解させた。300 mg のアガロースゲルに対して 1 U の GELase enzyme preparation を加えて 45℃、2 時間インキュベートした後、70℃、10 分間インキュベートする事で GELase を不活性化させた。この溶液を 11,000 g で 20 分間遠心した後、その上清に対して 2.5 倍量の 99.6% EtOH 及び 0.1 倍量の 3 M CH₃OONa (pH 7.0) を加え、11,000 g で 30 分間遠心した。上清を除去し、冷やした 70% EtOH で 2 回洗浄した。沈殿した DNA を 50 uL の 10 mL Tris

buffer (pH 8.5) で再度溶解させた。得られた DNA に End-repair enzymemix を加え、室温にて 45 分間インキュベートした後に 70°C、10 分間インキュベートする事で反応を不活化させた。ここで再度エタノール沈殿を行い、平滑末端化を行った DNA 240 ng 及び pCC1FOS vector 500ng を用いてライゲーションを試みた。

ライゲーション後の反応液 10 uL に MaxPlaxTM Lambda Packaging Extracts 25 uL を加えて 30°C、120 分間インキュベートを行った。この操作を 2 回行った。パッケージング後のファージ 10 uL を大腸菌 EPI300TM-T1^R 100 uL と混合して 37°C、1 時間インキュベートを行った。ファージ感染後の EPI300TM-T1^R をクロラムフェニコール含有 LB 培地へと塗布し、37°C にて一晩静置培養した。その後、形成したコロニー数をカウントし、ライブラリサイズを算出した (Table 5)。

得られたカウント数を基に、2500 cfu/plate となる様にクロラムフェニコール含有 LB 培地へと塗布し、37°C にて一晩静置培養した。その後、形成したコロニーを 1 mL の LB 培地にて回収し、終濃度 20% となる様にグリセロールを加えて、*D. calyx* メタゲノムライブラリとして -80°C にて保存した。

第2章 色素産生試験

色素産生試験

- ・メタゲノムライブラリのプレート上での培養、及び色素成分産生の探索

海綿 *Discodermia calyx* 由来メタゲノムライブラリを LB 寒天培地 (chloramphenicol 12.5 ug/mL 含有) プレート上に 1 プレート当たり 200-300 コロニー程度になる様にチューブ毎に希釈溶液を作製し、プレート上に 200 uL の希釈溶液をまいた後にコンラージ棒を用いてプレート上に撹拌させた。風乾後、作製したプレートを 37℃、3 日間培養して、コロニー生育を行った。

培養を行った後、各プレート上で培養されたコロニーの色調に変化が見られないか、目視にて確認を行った。その際、通常のコロニーと異なり赤色を示すコロニーを発見したので、爪楊枝を用いて植菌し、37℃、160 rpm、12 時間培養を行い、グリセロールストックを作製した。

化合物 1-4 の単離

- ・色素産生試験で陽性を示したクローンの液体培養

色素産生試験においてコロニーの色調変化を示したクローンのグリセロールストック 100 uL を 10 mL の LB 培地に添加した後、12 時間、37℃、160 rpm で前培養を行った。その後、1 mL の前培養液を chloramphenicol 含有 LB 液体培地 1L に添加し、合計 12 L の LB 培地を 3 日間、30 °C、120 rpm で振盪培養した。

- ・Diaion HP-20 による吸着

得られた培養液を 6000 rpm、10 分間、室温にて遠心し、上清を Diaion HP-20 に供した。バッチ法を用いて上清の成分を 2 時間吸着させた後、MeOH によって溶出させた。エバポレーターによって濃縮した後、MeOH extract とした。

- ・ODS カラムを用いた分離

濃縮した MeOH extract を用いて ODS open column (φ 40 x 80 mm) による分離を試みた。サンプルを H₂O に溶解させた後、カラム上へアプライした。その後、25%、50%、75%、100% MeOH 溶液を 400 mL ずつ調整し、step wise gradient によってアプライしたサンプルを溶出させた。誘導された色を指標として分画を試みた所、50%及び 75%のフラクションに色素化合物の存在を確認した。これら色素産生の確認された 2 つのフラクションを併せてエバポレーターにて濃縮した後に、続く LH-20 を用いた分離へと供

した。

・ LH-20 による色素分離

色素産生が確認されたフラクションを LH-20 カラム (φ 4 x 80 cm) 上へとアプライした。MeOH を用いて溶出を行い、フラクションコレクターにて 2 mL ずつ分取を試みた。色素化合物が見られたフラクションを纏めて分取した後に HPLC にて分析した時、4 種の porphyrin 化合物がこのフラクション中に含まれている事が判明した。

・ HPLC を用いた精製

検出した 4 種の化合物を単離する為、以下の条件にて HPLC にて最終精製を行った。アセトニトリル-水系を用いて精製を試み、結果として、先述した新たに生産された化合物 1-4 を単離した (Figure 17)。

HPLC condition

Column : COSMOSIL 5C18 PAQ column (10 x 250 mm)

Solvent : MeCN-0.1% AcOH system

Flow scheme : 55% MeCN isocratic

Flow rate : 3.2 mL/min

UV detection : 400 nm

次世代シーケンサーによる挿入遺伝子配列解読

得られたクローンより、Fosmid ベクターを Wizard[®] Plus Minipreps を用いて抽出した後、Genome analyzer II (Illumina) を用いて挿入遺伝子配列の解読を試みた。また、得られた挿入遺伝子配列中における ORF 及び機能の予測に関しては Genious 5. 5. 6、Frame plot 2. 3. 2 及び BLAST を用いて行った。

第3章 抗菌活性試験

抗菌活性に対して陽性を示すクローンの探索

Chloramphenicol 含有 LB 寒天培地を用いてメタゲノムライブラリを1プレート辺り 200 コロニー程度となる様に希釈した後に、30℃、3 日間培養してコロニーを形成させた。この培地上に試験菌である *Bacillus cereus* を混合した LB 半寒天培地 (0.5% agar) を被せて再度 30℃、一晩静置して培養を行い、コロニー周辺で *B. cereus* に対して阻止円が形成されるクローンを目視にて探索した

化合物 5 及び 6 の単離精製

- ・ 抗菌活性試験で陽性を示したクローンの液体培養

Bacillus cereus を用いた抗菌活性試験に対して陽性を示したクローンのグリセロールストック 100 uL を 10 mL の LB 培地に添加した後、12 時間、37℃、160 rpm で前培養を行った。その後、1 mL の前培養液を chloramphenicol 含有 LB 液体培地 1L に添加し、合計 9 L の LB 培地を 3 日間、30 °C、120 rpm で振盪培養した。

- ・ Diaion HP-20 による吸着

得られた培養液を 6000 rpm、10 分間、室温にて遠心し、上清を Diaion HP-20 に供した。バッチ法を用いて上清の成分を 2 時間吸着させた後、MeOH によって溶出させた。エバポレーターによって濃縮した後、MeOH extract とした。

- ・ ODS カラムを用いた分離

濃縮した MeOH extract を用いて ODS open column (φ 40 x 70 mm) による分離を試みた。サンプルを H₂O に溶解させた後、カラム上へアプライした。その後、25%、50%、75%、100% MeOH 溶液を 300 mL ずつ調整し、step wise gradient によってサンプルを溶出させた。得られた各溶液を濃縮し、次いで抗菌活性の確認を行った。

- ・ *Bacillus cereus* を試験菌とする活性試験

得られた各 ODS 画分 (25%, 50%, 75%, 100% MeOH fraction) に対してペーパーディスク法を用いて *B. cereus* に対する抗菌活性試験を行った。各フラクションを 10 mg/mL に調製し、20 uL ずつペーパーディスクへと添加、乾燥させた後、*B. cereus* を含む LB 寒天培地 (1% agar) 上に載せ、37 °C、12 時間培養し、阻止円の確認を行った。結果、100% MeOH fraction においてペーパーディスク周辺に阻止円を確認した。

・ Silica gel column を用いた単離

抗菌活性が見られた 100% MeOH fraction を Silica gel column (φ 40 x 70 mm) を用いて分離を試みた。TLC を用いた溶媒検討の結果、以下の溶媒系にて 100 % MeOH fraction の分離を試みた。

Table. Silica gel column の分離に用いた溶媒系

CHCl ₃	:	MeOH	:	H ₂ O
95	:	5	:	0
9	:	1	:	0
8	:	2	:	0
7	:	3	:	0.5
6	:	4	:	1

各フラクションを濃縮し、ODS column 後の方法と同様のスキームにて *B. cereus* に対する抗菌活性を確認すると Chloroform : MeOH = 9 : 1 及び 8 : 2 の 2 つのフラクションに活性を確認した。

・ 化合物 6 の単離

抗菌活性に対して陽性を示した Chloroform : MeOH = 9 : 1 のフラクションを再度 Silica gel column (φ 20 x 70 mm) で分離を行った。分離に用いた溶媒系を以下に示す。各濃度の溶媒を 10mL ずつ調整し、溶出させた。結果、化合物 6 を単離した。

Table 17. Silica gel column の分離に用いた溶媒系

Hexane	:	EtOAc
8	:	1
5	:	1
3	:	1
1	:	1

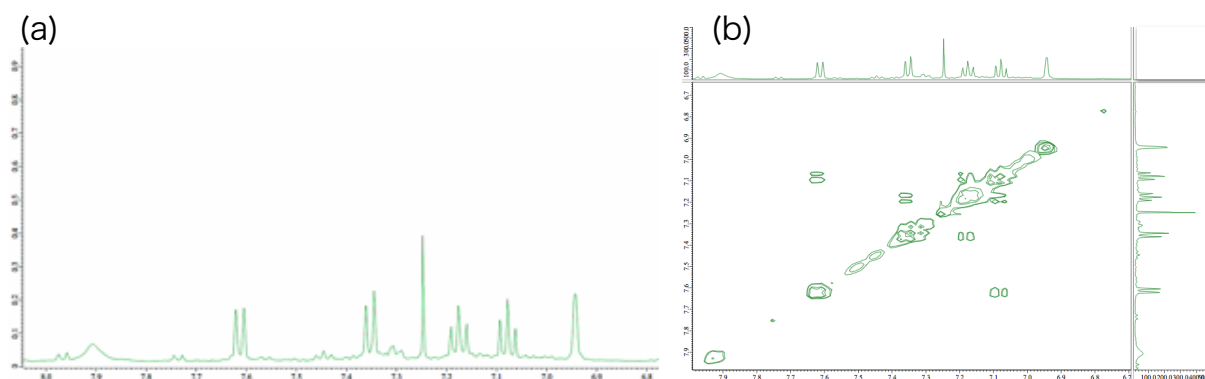


Figure 50. 化合物 6 の NMR チャート

(a) ¹H-NMR (b) COSY

・ Silica gel 及び HPLC による活性画分の精製

また、抗菌活性に対して陽性を示した CHCl_3 : MeOH = 8 : 2 のフラクションに関して
も同様に再度 Silica gel column を用いて精製を行った。以下に溶媒系を示す。

Table 18. Silica gel column の分離に用いた溶媒系

CHCl_3	:	MeOH	:	H_2O
10	:	0	:	0
95	:	5	:	0
9	:	1	:	0
8	:	2	:	0
7	:	3	:	0.5

Silica gel column にて活性画分を分離した後、更に HPLC による精製を試みた。条件
検討の結果、COSMOSIL C_{18} MS-II column を用いて以下の条件にて精製を試み、化合物
5 を単離した

HPLC condition

Column : COSMOSIL 5C18 MS-II column (10 x 250 mm)

Solvent : MeOH-0.05% TFA system

Flow scheme : 65% MeOH isocratic

Flow rate : 3.2 mL/min

UV detection : 280 nm

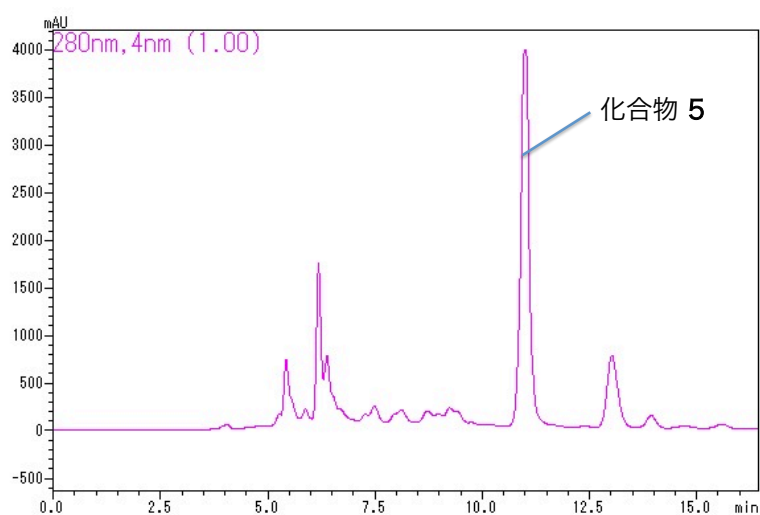


Figure 51. HPLC による化合物 5 の精製

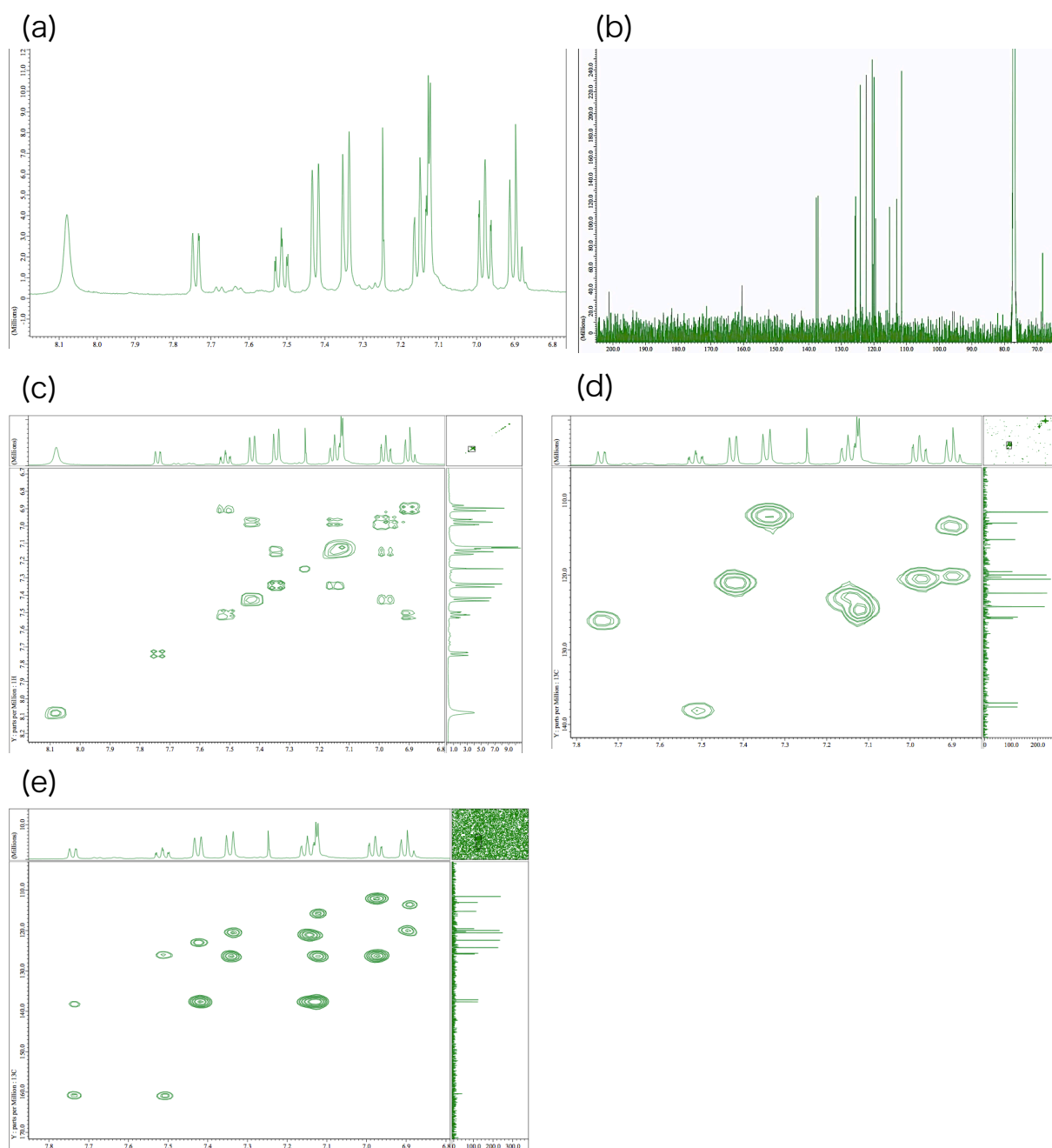


Figure 52. 化合物 **5** の NMR チャート
 (a) ^1H -NMR (b) COSY (c) ^{13}C -NMR (d) HSQC (e) HMBC

サブクローニング実験

抗菌活性を指標とした単離精製によって得られた 2 種の化合物、2,2-di(3-indolyl)-3-indolone (**5**) 及び turbomycin A (**6**) の生合成を明らかにする為、抗菌活性に対して陽性を示したクローンの挿入遺伝子配列を次世代にシーケンサーによって解析し、サブクローニングを行う事でどの遺伝子が抗菌活性化合物の生産に関与するか、同定を試みた。

・ Fosmid ベクター構築

CopyControl™ Fosmid Library Production Kit の fosmid ベクターに *Bam* HI 処理を行う事で平滑末端を作製し、増幅を行うインサートとのライゲーションを可能にした。

<Reaction mixture>

10 x K buffer	5 uL
Fosmid NC	10 uL (3 ug)
Bam HI	1 uL
up to 50 uL (with H ₂ O)	

・ フラグメント部分の構築

挿入された遺伝子配列を解析した結果、その全長約 40 kbp であった為、得られた配列から均等な鎖長となる様に各 10 kbp のフラグメント増幅を試みる為、8 種のプライマーを構築した。プライマー上流に共通して存在する TGATCA 配列は制限酵素サイトである。

Table 19. 増幅に用いたプライマー

Name	Primer sequence
fragment 1- Fw	ATATGATCACCATGATTACGCCAAGCTAT
fragment 1- Re	ACGTGATCAAACTACCGCATACTCATTT
fragment 2- Fw	ATATGATCACATCGAAATCCCGTGCGATA
fragment 2- Re	ATATGATCATCAGAGAAAACATGCCTCGC
fragment 3- Fw	ATATGATCATATATATGCCGACACCAGCG
fragment 3- Re	ATATGATCAGCCGGGGTATTGAAAAACAG
fragment 4- Fw	ATATGATCACATTGGCCACCATGGGATTT
fragment 4- Re	ATATGATCAATACTTGGGCTCGATCTCTA

作製したプライマーを用いて PCR 増幅を行い、各フラグメントの構築を行った。

<Reaction mixture>

5 x PrimeSTAR buffer	10 uL
2.5 mM dNTP mix	4 uL
Primer forward	1 uL
Primer reverse	1 uL
Clone A plasmid	1 uL
Prime STAR HS DNA polymerase	0.5 uL
<hr/>	
up to 50 uL (with H ₂ O)	

PCR にて増幅を行った後、*Bcl* I を用いて制限酵素処理を行った。

<Reaction mixture>

Amplified DNA	3 ng
10 x M buffer	5 uL
<i>Bcl</i> I	1 uL
<hr/>	
total	up to 50 uL

反応後、ゲル精製を行い、ライゲーション反応を行った。

・ライゲーション及び形質転換

DNA Ligation Kit Ver.2.1 を用いてインサートとベクターのライゲーション反応を行った。その後に、EPI300 株のコンピテントセルに対してライゲーション溶液 5 uL を混合し、30 分間氷上で静置した。次いで、42℃、45 秒間加温し、大腸菌 EPI300 コンピテントセルへと形質転換を行った。

形質転換後、Chloramphenicol を含む LB 寒天培地上に形質転換体を塗布して一晩 37 °C にて培養後、生えてきたコロニーに対してコロニーPCR を行い、形質転換及びインサートのチェックを行った。条件は以下の通りである。

<Reaction mixture>

5 x KAPA Taq Extra buffer	2 uL
2.5 mM dNTP mix	0.3 uL
25 mM MgCl ₂	0.7 uL
Primer Fw	0.4 uL
Primer Re	0.4 uL
KAPA Taq Extra DNA polymerase	0.05 uL
colony	
<hr/>	
up to 50 uL (with H ₂ O)	

化合物の生産確認

構築した 4 種のサブクローンに関して、Chloramphenicol (12.5 mg/mL) を 200 μ L 添加した 200 mL の LB 液体培地にて、30 $^{\circ}$ C、3 日間、120 rpm でそれぞれ振盪培養を行った。培養後、各培養液を Diaion HP-20 にて吸着後、ODS open column (ϕ 20 x 70 mm) にて分離を行った。溶媒は 25%, 50%, 75%, 100% MeOH を各 100 mL 用いて溶出させ、各フラクションを回収した。得られた ODS 画分のうち、100 % MeOH fraction について LC-MS を用いて分析を行った。分析条件については以下に示す。

Column : Cosmosil C₁₈ MS-II column (2 x 100 mm)

Solvent : MeOH-0.1% AcOH

Flow scheme: 10% \rightarrow 100% MeOH gradient (0-10 min)

100% MeOH (10-15 min)

Flow rate: 0.2 mL/min

LC-MS 分析の結果、化合物 5 が fragment 4 の形質転換体の培養液中にのみ確認された。その為、fragment 4 に含まれる各 ORF を単独で発現させ、同様の手法にて各形質転換体の培養液から化合物の生産確認を試みた。その結果、ORF 25 を含む形質転換体でのみ、化合物 5 の生産を確認した。

第4章 抗酸化活性試験

抗酸化活性試験を用いたクローン探索

スクリーニング法には抗菌活性と同様にオーバーレイアッセイを採用した。調製した DPPH 溶液を

化合物 7-8d の単離抽出

- ・抗酸化活性試験にて陽性を示したクローンの液体培養

DPPH を用いた抗酸化活性試験に対して陽性を示したクローンのグリセロールストック 100 μ L を 10 mL の LB 培地に添加した後、12 時間、37℃、160 rpm で前培養を行った。その後、1 mL の前培養液を 1L の LB 液体培地に添加し、合計 8 L の LB 培地を 3 日間、30 °C、120 rpm で振盪培養した。

- ・Diaion HP-20 による吸着

得られた培養液を 6000 rpm、10 分間、室温にて遠心し、上清を Diaion HP-20 に供した。バッチ法を用いて上清の成分を 2 時間吸着させた後、MeOH によって溶出させた。エバポレーターによって濃縮した後、MeOH extract とした。

- ・ODS カラムを用いた分離

濃縮を行った MeOH extract を用いて ODS open column (ϕ 40 x 70 mm)による分離を試みた。サンプルを H₂O に溶解させた後、カラム上へアプライした。その後、25%、50%、75%、100% MeOH 溶液を 300 mL ずつ調整し、step wise gradient によってサンプルを溶出させた。得られた各溶液を濃縮し、次いで抗酸化活性の確認を行った。

- ・DPPH を用いた抗酸化活性試験

得られた ODS 画分 (25%, 50%, 75%, 100% MeOH fraction) それぞれに対して DPPH 溶液 (10 mg/mL) に対する抗酸化活性を指標とした抗酸化活性試験を行った。各フラクションを 10 mg/mL に調製し、10 μ L ずつ DPPH 溶液 100 μ L へと添加し、経時的に DPPH 溶液の色の変化を追った。結果、75%及び 100% MeOH fraction の 2 つのフラクションにおいて抗酸化活性を確認した。

- ・Silica gel column による分離

抗酸化活性試験に対して陽性を示した 100% MeOH fraction について Silica gel column

(ϕ 40 x 70 mm) を用いて分離を試みた。条件検討の後、各 50 mL の以下に示す溶媒系を用いて溶出させ、分離を行った。

Table 20. Silica gel column の分離に用いた溶媒系

CHCl ₃	:	MeOH	:	H ₂ O
10	:	0	:	0
95	:	5	:	0
9	:	1	:	0
8	:	2	:	0
6	:	4	:	1

得られた各フラクションに対して抗酸化活性を確認すると CHCl₃ : MeOH = 95 : 5 のフラクションに活性を確認した。そこで、更に HPLC を用いて活性画分の探索を行った。

・ HPLC を用いた精製

得られた活性画分に対して以下の条件を用いて単離を試みた。結果、100% MeOH fraction から化合物 **7** を単離した。次いで、このフラクションとは別に抗酸化活性が検出された 75% MeOH fraction の探索を試みた。

HPLC condition

Column : COSMOSIL 5C₁₈ AR column (10 x 250 mm)

Solvent : MeOH-0.05% TFA system

Flow scheme : 30% MeOH isocratic

Flow rate : 3.2 mL/min

UV detection : 280 nm

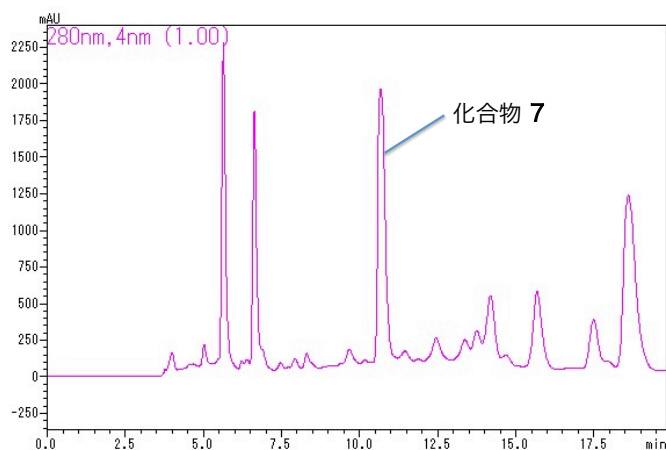


Figure 53. 活性画分からの探索

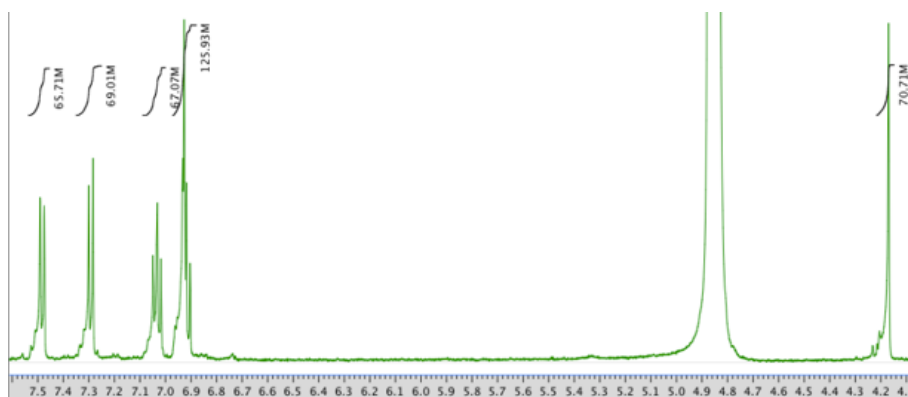


Figure 54. 化合物 7 の ^1H -NMR チャート

・ 75% MeOH fraction からの探索

一方で、抗酸化活性が検出された 75% MeOH fraction について Silica gel column (ϕ 40 x 70 mm) を条件検討した溶媒を用いて、各 50 mL の溶媒で溶出させて分離を行った。

Table 21. Silica gel column の分離に用いた溶媒系

CHCl_3	:	MeOH	:	H_2O
10	:	0	:	0
95	:	5	:	0
9	:	1	:	0
8	:	2	:	0
7	:	3	:	0.5
6	:	4	:	1

得られた各フラクションについて抗酸化活性を確認すると、Chloroform : MeOH = 8 : 2 のフラクションに活性を確認した。この活性フラクションについて更に HPLC を用いて分離を行った。

・ HPLC を用いた化合物 **8b** の単離

得られた活性フラクションに対して C_{18} AR column を用いて活性成分の探索を試みた。結果、化合物 **8b** の単離を達成した。また、分離したフラクションのうち、別のフラクションについても抗酸化活性が確認されたことから、HPLC の条件を変え、更に探索を試みた。

HPLC condition

Column : COSMOSIL 5C₁₈ AR column (10 x 250 mm)

Solvent : MeOH-0.05% TFA system

Flow scheme : 30% MeOH isocratic

Flow rate : 3.2 mL/min

UV detection : 280 nm

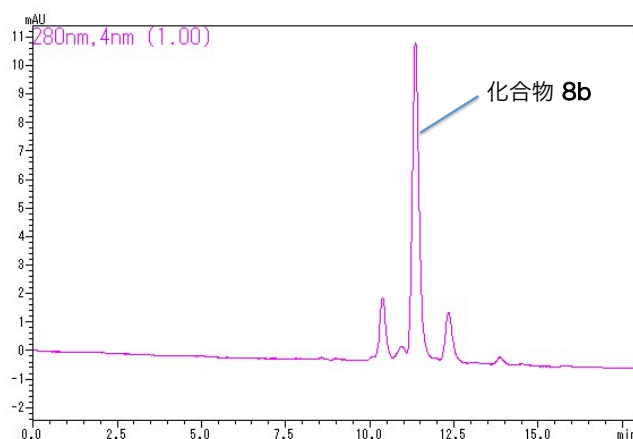


Figure 55. 化合物 **8b** の単離

・ HPLC を用いた化合物 **8a** の単離

活性の見られたフラクションのうち、一方のフラクションに対して π NAP column を用いて条件検討を行い、以下の条件によって単離精製を試みた所、化合物 **8a** の単離を達成した。

HPLC condition

Column : COSMOSIL π NAP column (10 x 250 mm)

Solvent : MeOH-0.05% TFA system

Flow scheme : 30% MeOH isocratic

Flow rate : 3.2 mL/min

UV detection : 280 nm

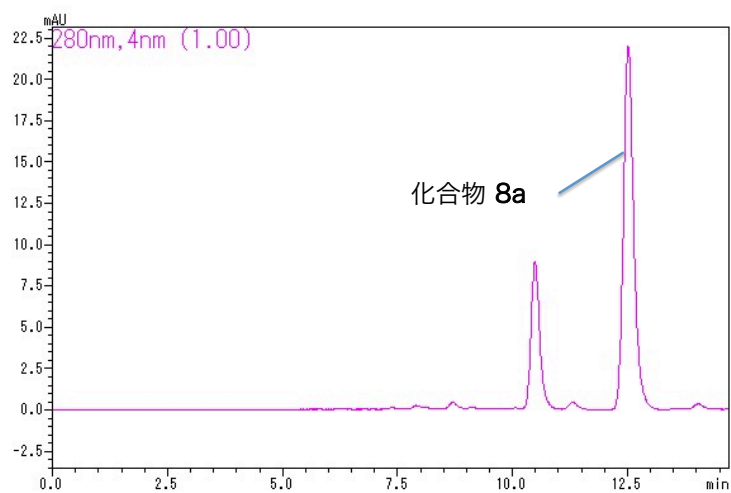


Figure 57. 化合物 8a の単離

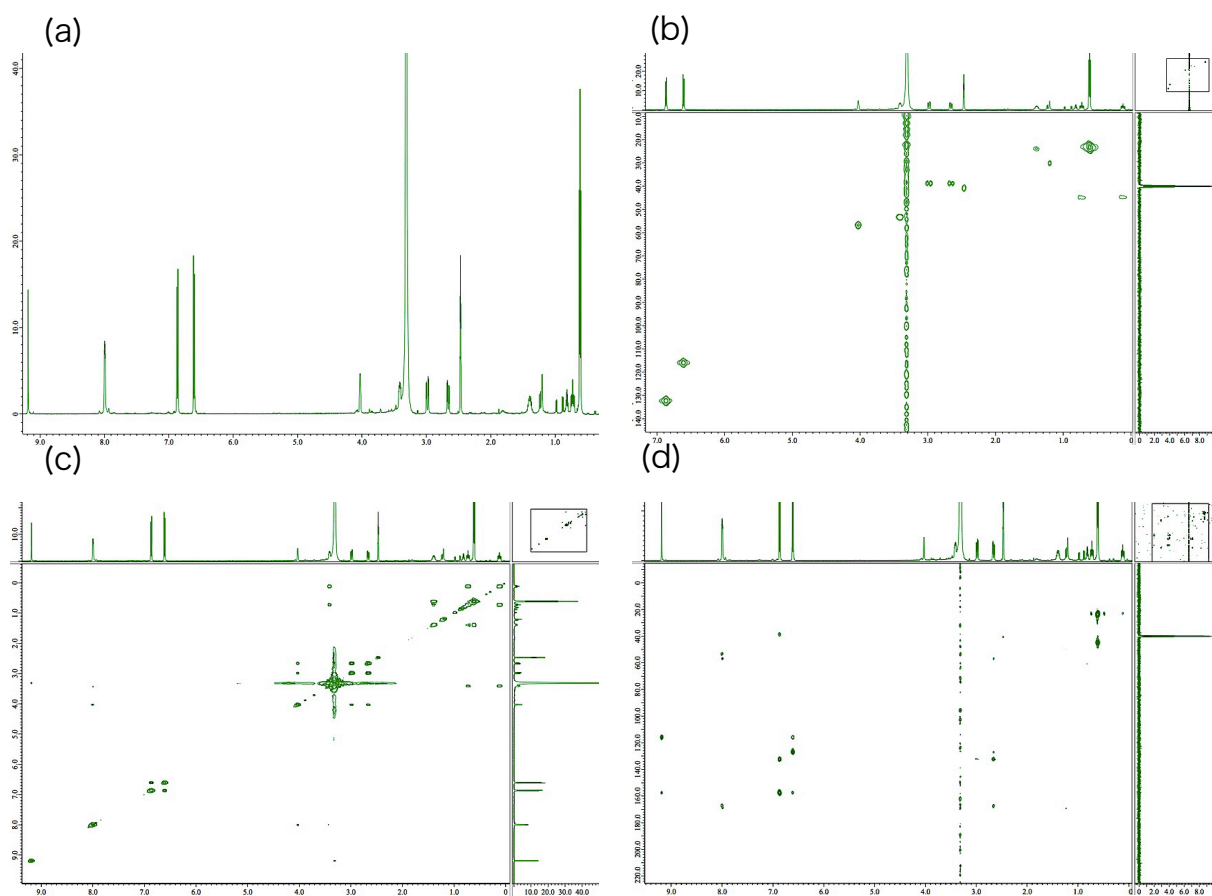


Figure 56. 化合物 8b の NMR チャート

(a) ^1H -NMR (b) HSQC (c) COSY (d) HMBC

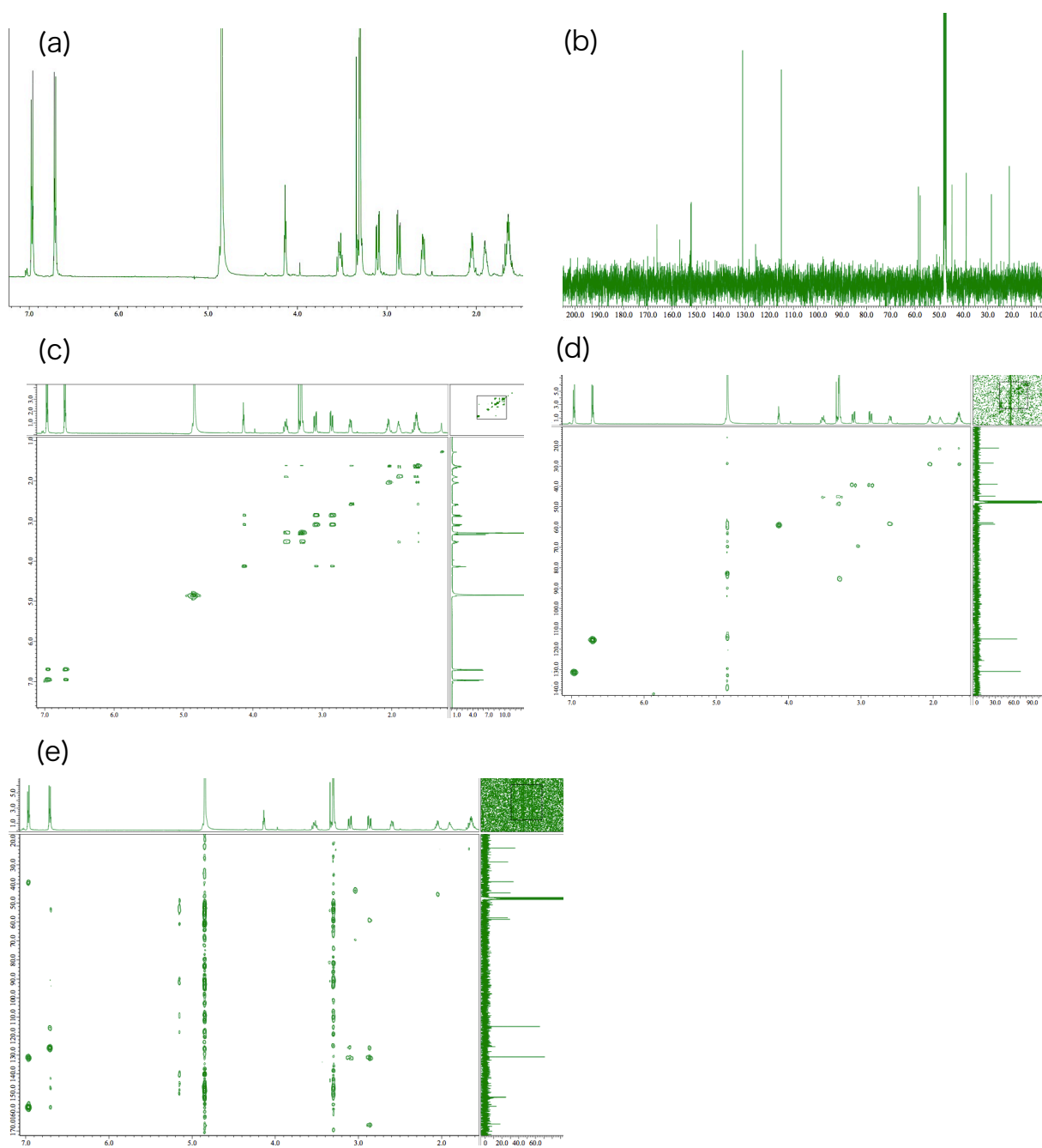


Figure 58. 化合物 **8a** の NMR チャート
 (a) ^1H -NMR (b) ^{13}C -NMR (c) COSY (d) HSQC (e) HMBC

・ HPLC を用いた化合物 **8c** 及び **8d** の単離

化合物 **8a** を含むフラクションとは別の活性画分より、C18 MS-II column を用いて化合物の探索を試みた。結果、以下の条件にて単離を行い、化合物 **8c** 及び **8d** の単離を達成した。

HPLC condition

Column : COSMOSIL 5C₁₈ MS-II column (10 x 250 mm)

Solvent : MeOH-0.05% TFA system

Flow scheme : 50% MeOH isocratic

Flow rate : 3.2 mL/min

UV detection : 280 nm

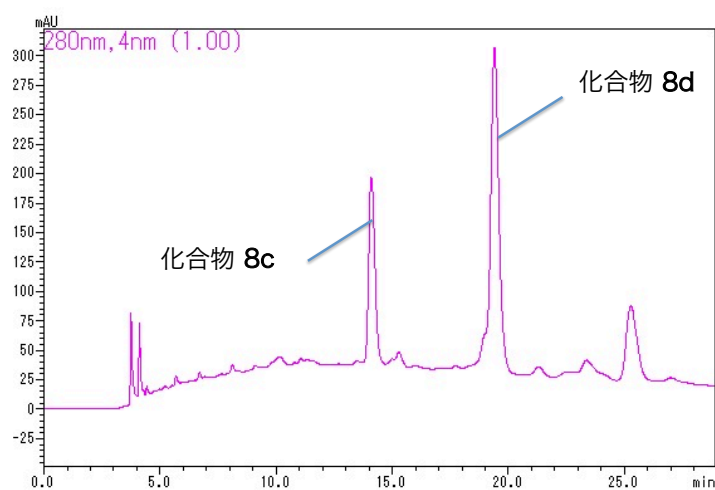


Figure 59. 化合物 **8c** 及び **8d** の単離

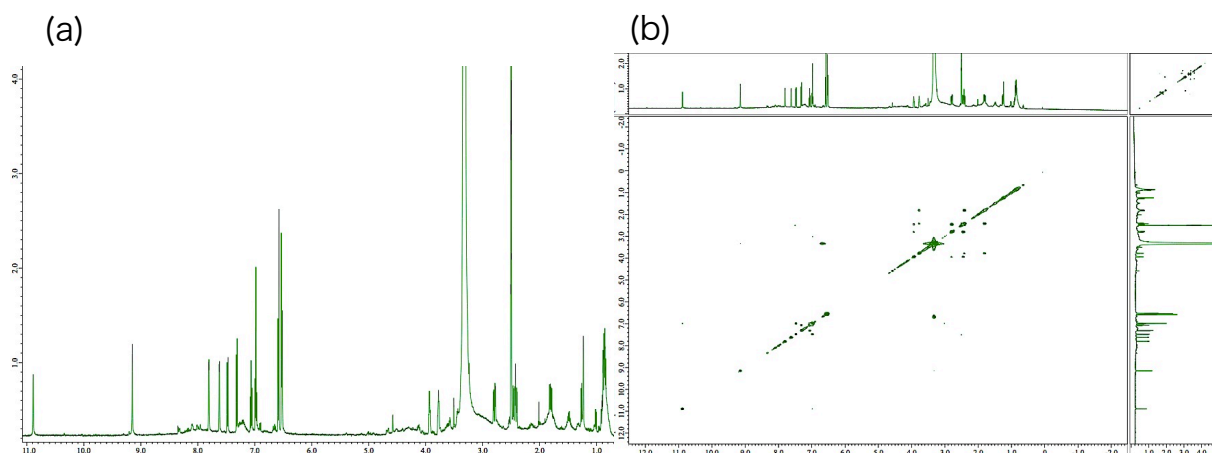


Figure 60. 化合物 **8c** の NMR チャート

(a) ^1H -NMR (b) COSY

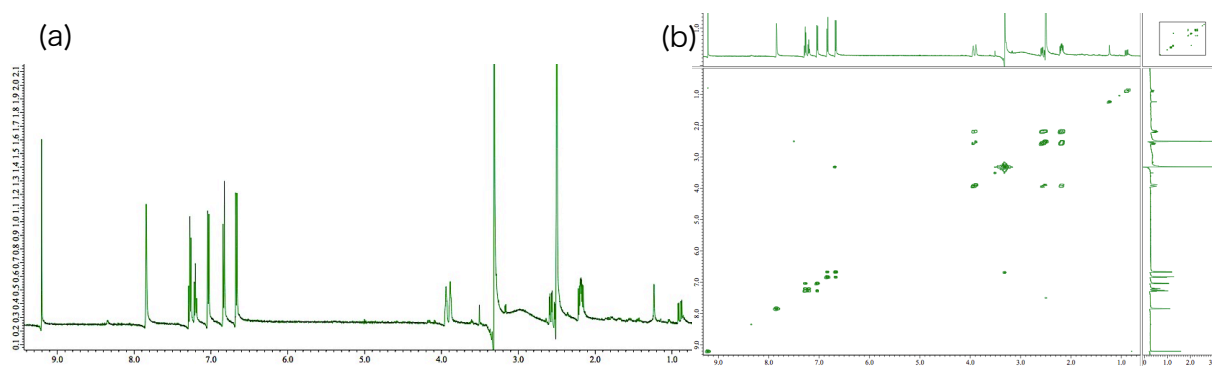


Figure 61. 化合物 **8d** の NMR チャート

(a) ^1H -NMR (b) COSY

第5章 その他のスクリーニング系の適応

鉄キレート活性試験

・CAS 含有 LB プレートの作製

100 mL 滅菌水中に LB 寒天培地を混合し、オートクレーブを行った。その後、寒天培地が固まる直前に作製した 5 mL の CAS 溶液及び 100 μ L の Chloramphenicol (12.5 mg/mL) を加え、LB プレートの作製を行った。

・メタゲノムライブラリの CAS 含有 LB プレート上での培養

海綿 *Discodermia calyx* 由来メタゲノムライブラリを先ほど作製した CAS 含有 LB プレート上に 1 プレート当たり 200-300 コロニー程度になる様にチューブ毎に希釈溶液を作製し、プレート上に 200 μ L の希釈溶液をまいた後にコンラージ棒を用いてプレート上に撹拌させた。風乾後、作製したプレートを 37°C にて培養を開始した。

・鉄キレート活性の確認

プレート上での鉄キレート活性の確認に関しては、その活性が経時的に変化する為、6 時間おきに 2 日間培養を行いながら活性確認を試みた。結果、CAS プレート上にてコロニーの色調が変化するクローンを発見した。

カテコール分解活性試験

・メタゲノムライブラリのプレート上での培養

海綿 *Discodermia calyx* 由来メタゲノムライブラリを LB 培地 (Chloramphenicol 12.5 μ g/mL 含有) プレート上に 1 プレート当たり 200-300 コロニー程度になる様にチューブ毎に希釈溶液を作製し、プレート上に 200 μ L の希釈溶液をまいた後にコンラージ棒を用いてプレート上に撹拌させた。風乾後、作製したプレートを 37°C、2 日間培養して、コロニー形成を行った。

・カテコール分解活性試験

前培養を行ったメタゲノムライブラリのコロニーに対して、ガラス噴霧器を用いて調製したカテコール溶液を噴霧した。

その後、30 分間隔で 3 時間コロニーの色調変化を確認し、白色から黄変するコロニーの検出を試みた。カテコール分解試験に対して陽性を示したクローンは、LB

(Chloramphenicol 12.5 ug/mL 含有)培地へと滅菌した爪楊枝を用いて植菌し、37℃、160 rpm、12 時間培養を行い、グリセロールストックを作製した。

・各クローンに対する制限酵素処理

得られた 5 種のクローンに含まれている挿入遺伝子が同じ物かを確認する為、各クローンより fosmid ベクターを抽出し、制限酵素処理によって得られるバンドを比較する事とした。

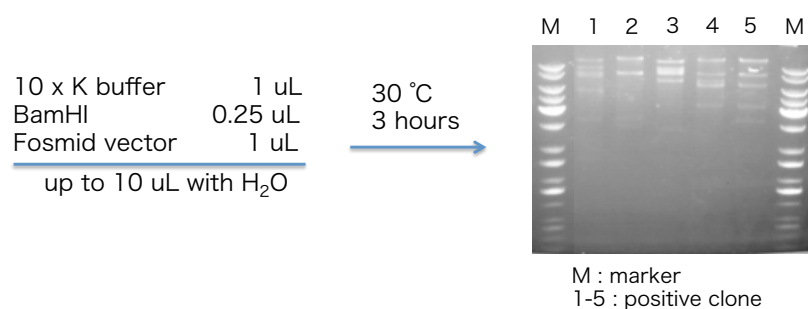


Figure 62. 制限酵素処理による各クローンの検討

參考資料

抗菌活性に対して陽性を示したクローンの挿入配列遺伝子から予測した ORF

Multi-sensor signal transduction histidine kinase

ATGACCAAACCCGTCAACGACGCGATTTTGCTAGCGCGAGTTCGTAGTTATCTACGAAAAAACGAGCCGAAGAAGGATTGCGTGCCG
CCAAAGAAGCAGCTGAAGCTGCCAACAGGCGAAGAGTCAATTCCTGGCCAATATGTCACACGAACTCCGCACCCCGCTGCACGCGAT
TCTCAGTTGCGCCGGCTTCGGGATGCGACGCGTTGACGCTGCACCTCCAGCTAAACTGCAGCGTTATTTACCCAAATCGATCAAAGT
GGCCGGACGCTTCTCACCCTGCTCAACGACCTACTCGATTTGGCTAAACTGGAAGCTGGCAAGATGACCTTTAAGTTAGAGACGACCC
ATGTAGATCGCTTGATAACCCATGCATGTGAGGAGTTTGAGTCCTATATCTCAGAACGCGATTTACAGCTGCATTTGTGGGATCCTCT
AGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAG

Diguanylate cyclase [*Nitrosococcus halophilus* Nc4]

ATGCATTACCTGACACCGATGGCATCGCACTGGCTCGCACCATTAAAGCCGATCCGGACCTCGCATCGATTCTCTGGTGCTCTTGA
CCGCCTCGAGTTCGCCCCATGATATCGAAAACGCATCGGAAGTTGGCATTATCGAGTGTTTGACCAAACCGATTTCGCCAATCTCAATT
CTACCGGGTTCTCACCAGATATCTTGCCAGTGGCTTCGAAACCCCTCCCGCCCCGCAACGTTACCGTCTCCTGAGCCCCGACGATCGA
TTTAATGCCTTGGAAGGGCTCATTTTGCTAGCTGAAGATAATGAGGTCAATCAAATCGTTGCCATCGGTATGCTCACGAGTCTCGGCT
GCCAGATCCATATCGCGAGCAACGGCCACGAGGCGGTTGAGGCATTTCTGTCGCACCGCTTATGATCTGGTGTTGATGGACTGTCAGAT
GCCGGAGATGGACGGCTTTGCTACCACCGAGGCATTGCGGCATCACGAGCGTTTGAGAAACCAAACGCCACCCCGATCGTTGCTTTG
ACCGCACATGCCACCACGCGGGATCGCGCTCAATGCCTGGCCGCCGCGATGGACGATTATCTGAGTAAACCGTATACACAGGAAGGAT
TGTATACGGTTTTGCGCCGTTGGCTAACCGCCCCGCCGACAAAGACGGCCCTCTGGCTGGCCCCAGTGTCTCGATCTCCAGTGCTTT
GATATCCGGTACCACGACCTTAGAGACCACGACGCCATCCGTCCCGTCTTTGGATACCCAGGTTCTCTCGACGCTCAAACTCTGCCA
GATGGCGAAATGCGTGTCGAACGCATTTTAAACGACTTACCTTGAAACCTCTGCCGATTGATCATAAGCTGCGCGACGCTGCCACCA
ACTATCATAGCACTCTACAACAAGTAGCCACACCCCTGAAATCGAGCAGTGCCAATGTGGGTGCGCGGCGCTTGTACAACTGTG
TGGCGAACTGGAATCGATCAATTCCGATGCGGTGACGCCATATGTGCAACAGCTCGTCAATCAAATTGAGGACGAATATCCAACGGTC
CGAACGCATTAATGGTGCTAGTAAGCCCCAAGCCACACCGCCCCGAAGGTCTCGACCCCGACGGTGCCGAGACCATCTACGATGC
ATCATGCCCTCGAGCGGTACCTGTCTTGCGGCTGATCCCTTGCGTTAGAACCCTCGGATGTCACCATCTTGTGCTCGATGATGA
ACCCACCAATCTCGAAGTTCTGCAGGCCATCTGGCGCCAGCGGACTACCAGCTCATCAAAGCGCTCAACGGTCCCGAAGCCCTCGAC
GTTCTCAATTGCGACCCGCGGACATCATTTTACTTGACCTCGTCATGCCCGGACTCGATGGCTTTGAAGTTTGTGCGCGTATTAAAT
CATCGGCACATTGGCAGTCCATTCCGGTCATCGTGCTTACTGGTTTGACGAAGCGAAATCCTATATTTAG

Multi-sensor hybrid histidine kinase

ATGCAGTTCTTTACCATTTATCCGTCCAGGAAAGCTCTGTGCGTTAATAGTGATCACCAGTAGTGCGGCGCTGATTTGCGCCGCAA
CCGTCTTGGTCGGCTACGAACTGCAAGTCTCCCGCCACGCCTTAGTCGAACAGCTCGCCACCCTTGCTACCGTGACGAGCACCACAG
CACCGCAGCCATGGTGTTCGAAGATAGCAAAGATGCAGAAGATCTCTAGCCGCCCTGCATGTGAAACCTTACATTCTCCACGCCAGA
ATCAGACCCCGCAGCGGCGAGCTTTTGCCAAGTATACGGCTCGTGATGCGCGCTCAGCCCGCATCGCCATCGATCGCGAGCCACCCA
CCCACGAGTTTGGCGATTGGCACCACGCGCTACCAAGTGAGCCGCCGAGCGTCCGCGTCCAGCAACCCATTGTGCACGATGGCGA
GCACATCGGCGACATCGACATTATCTCCGATCCTGGCGAGCTGTACCGCAAGCTGCACGACTACTTTTCGATTGTGCGGTTGGTCATG
ACCAGCTCATTCGTGGTGGCCGTTCTCCTCGCCTCTCGGCTGCAACGCGTCATCTCGAACCCGATTCTGTAACCTGGCCCAAACCATGA
CGGCAGTGTACAGGCCAATGACTATACTATCCGGGCCGCAAGCAAAACCATGACGAAATTGGTAGCCTTATCGACGGCTTTAACGC
GATGTTGGCGCAAGTTCAAGTGCGTGATGAGCAACTCGCGCAGCACCAGATCACCTCGAAGATCAGGTGGCGCAACGCACCACCGAA
TTGGTCCAGAGCAATCATGCCCTGCGGCAGGCCAAAGAGGCGGCAGAGGCGGCCAGCCACGCCAAATCTCAGTTTTTAGCCAACATGA
GCCATGAAATCAGGACGCCCATGAACGGCGTCCTGGGGATGACCGAACTGCTCCTCACCAGTCCACTGACCGAAAACCAACAGCATTT
TGCCGAGACCGTGCATCGCTCGGCCCATACCCTACTGGACATCATTAACGAAATTTCTCGACTTTTCTAAAATTGAAGCGGGCAAGCTC

AACTTGGAATACACCAACTTCAGTTTGGCGTCAGGTCGTGCGAAGAGGCGATCGAACTGCTGGCCGAACGCGCCCATCAAAAAGGTCTTG
AAGTTGTCTATTCTATCGATGCTGACATTCCGATGATGCTCCGTGGCGATCCGGTTCGCATCCGACAAATTCTAACGAATCTCGTCCA
CAATGCGATCAAATTCACAGCGAGTGGCGAAGTGGTGGTACGAATCAGCGCCATTGACATGACAGATGCCTATGCCGAGCTCTGCCTC
GAAGTGGGTGATACTGGCATTGGTATCGCTTCGGAGCATCAGGTCCATCTGTTTGAATCTTTTGTGCAAGCCGATGGCTCGACCACAC
GTCAATACGGCGGCACTGGACTGGGGCTGGCGATGACCAAACAACCTGGTGAAATGATGCGTGGTACGATTGAGGTGAAAGCACGAT
TGGCAAAGGATCGACCTTCCGCTGCATCTGCAGCTGGGTCTGTGTCTGACGAGGCACCGTCCGAGCTCCCATCCCATCCGATTTTG
AAGGGCCTGCGCCTCCTCGTGGTTCGATGACAATACCACGAGCCTTGAAATCTTAAGCCATCAAGCCCATGCTTGA

Putative transmembrane protein [NC10 bacterium]

ATGAACCATACCCTGCTAACTGCTGTGTCAACTGGACGGTGATCGCCCTCTTGGTTTTGTTTCATCATGTCAGCGCATCTATGTATTG
CCGCATCGCGTTATAAGGAAGATGAAATCAAAGCCGTGCTCATCTACCACTCTGCCAAATTTATCGACTGGCCACCCGAGGCATTGCC
GCCGACACCTTTTCGGTGAGGTGCCCTCCGAATTCACGCTGTGTATCTTCGGCACCGGTTTGCTCGACAACGCCTTGGCATCGATCCGG
GGCAAGCCAGTTAAAGGGCGGCCCTCGTCATCCGGCACGTCAATCGCCCGGCCAGCTACAGACCTGTCACACCTTATTTCATCAGTG
CCTCAGCCTTTGCGTTGGCAGCTCCGTTTTTGACCTACGCGAAAACTTGCCCATCGTCACCATTAGCGATTTGACTGGGTTTGACG
TATTGGGGGATGTTTAACTTCATTTCGCTCCAATGACACCATTGGCTTTGAAGTCAATCCGGAAGCGGCTCGACGCGTTGGCTTAACC
ATTCGCTCTAAGCTGCTACGACTGGCGATAACCGTCGTCCGAAGCGATGTTGAGAGGTAG

TonB-dependent receptor, plug [NC10 bacterium]

ATGTGTAACCATACGCCATTTACCTTAACAACGAGGTATGACCCGTAGTCAAACCCGCGCGTCAACGGCCACGCCACGTTGGTGCT
GCGTCATGCGTCGGCTCCTATGGCTTCTGCTCGCCATCGCCAGCAGTACCCTACACCTTAGCCTAATCTCTGCCAGTTCTCAGATGA
CGTCGACCTGACGGAATGAGTATCGAAGAAGTCTTACAGCTCGAAGTGATCTCAGCCGCCAAAAAACCGCAAAAGCTGACCAACGTC
GCTGCCGTATTTTTGTCATCACAGCCGAAGACATCCGCCGCTCCGGTGCCACCAGCATTCCCGAAGTATTACGTATGGTGCCCGGCC
TGCAAGTGGCGCGTATTGACGCCAATAAATGGGCCATCACCTCGCTTGGGTTTCAGCGGTCGATTGCGCAACAACTGCTGGTGTGAT
CGACGGACGTAGCGTGATACCCCGTCGTTCTCCGGAGTTTACTGGGAAGTTCAAGACACACTGCTCGCCGATATTGACCGCATCGAG
GTGGTTCGCGGTCCGGGGCTGCGCTGTGGGGCGCAATGCCGTCAATGGCATCATCAACATTATCACCAAGCACACCCGCGACACGC
CAGGTGGCGAGTTGACCGTGGCGTCGGCACCGAAGAACGCGGTTTCGCTCGTCTCCGGTACGGCCAGGCATTGAGCGATACGGCATT
TCTACGCATCTACGCCAAATACTTCAACCGCGATGGCTCTGTGGACTCCGAGGGCCGTGACACGCCCGATGCTTGGGACACCATTTCGT
TCCGGCATGCGTTTGGATTGGCAGGCGACAAACCGTGATGACATCACGGTGCAAGGCGATGTCTATGATGGCGACGCCACACAAACGC
TGAGTTTACCGTCATTACCGCGCCCTATCGCGAGCGCCGACCACGGCTATCGATTGGTCCGGAGCCCATCTCTTGGGGCGCTGGCA
ACATCATGTCTCAGACGCGAGTAACCTGACCTTGCAAGTGATTACGATCGTACCAGACGCGATGAAAACGGCGTCGTGGGAGAAACG
CGAGATACGTTTGATCTCGACCTTCAGCACCAGTTTTTCATGGGGGAGTGGCAAGACCTCATATGGGGGTTCGGGTATCGCTTTACCC
GTGATGAATTCACCGACAACGCCCTTCATTTCAGCTCAACCCCCAAAGCGTTCTCTACATCTGTTTCAGCGCCTTTGTACAAGATGATAT
CACCCTCATCGACAACCACTTGCACATCATTTTGGGATTAAAATTCGAACACAATGACCACACGAGCTTTGAGATCCAACCGACCGCT
CGCCTGCTGTGGACGCCACATCGTCGACACACCGTTTGGGCCGCGATCTCACGCGCCGTCGCGACGCCGCAAAATCCGGGGGCCCTAC
CCATTTTGGTCCGCTTTTTTGGGCAATCGGAATTTTCGCATCTGAGGAACTGATCGCCTACGAGCTTGGCTATCGCCTACGACCGATCGA
CCGCGTCTCATTGGACCTCGCTGCATTTTACAACACATACGATGATCTGCGCACGGTGGAGCTTGGTCAGCCATTTCGCTGATCTGACC
GCCGCCCCCCCCCGTGGTGGTCTCGCCTCTCACCTTAGACAATCAACTCCGGGTGAGACGTACGGCGTGGAGCTGGCCCTGGAGTG
GCAACTCCTAG

Conserved hypothetical protein, membrane [Candidatus Poribacteria sp. WGA-A3]

ATGCATGGATCAGGTGCGAGCGGTAGGGCGTTTATGGGACATCGGTTATCGATACTTGGGGGCGTGGTAGGCCTCGCCCTGTGTTTGA
ATAGTGGTACCTCGTGGCCACGGCAGAACCGTCATTATTTTATTTGGCAAATGTCGGCTTTCACGTTGTGCTGGGGGGTTGGGTGC

CCCCTTGTGTGTCTCGCTGCGTGCGGGCTTTGGACGTGGGGGGGGCCCTTGCCACCACGACAACCCGCCGCTACTGGCCCTGGGA
 GGGGGCACCTCCTCCTCGGTTTTGGCACTGGCCTGGCTGTATCGTATTGGGCAATACGCGGAGCACCATTGGCTGCTCAACACGC
 ATATCGGCCTTTGTGTGATGGCGATCGTATGTGGACTCGTAGGGCTGGCATCTCTACGTCAGCAGTTCTACCCGCTCAGCACCGAAT
 GTGGCGCACGGCCTGGGGATCGGTGGTGAAGTGGGTGTTGATCGCTGGCTTTTTACAGCCCGCCGCTCTGGCAACCCGAGCCGTT
 CGCGTCGTCAATCCCTCGCTGCCGCCGCTGAGCCAGGACGATGAAGGGATGGGCGGACAAGATGGCCCGTTTCACCCGGCCGGGTCT
 ATACCAACACCAGGGGCCGATTCCGTCCGATTTTTTATGACTTCGGAGCGCTGTGGCGATTGTCATCAGGATATTTACCGACAGTG
 GTCCGAGTCAGCTCACCATTTCGTGCTGAACAACCAATGGTATCGCAAGTCGATCGAGTACATGCAAGATGTCTCGGCACGCGG
 GCCAGCCGTTGGTGTGCTGGCTGTACGATGTGCGATTGCTCCTCAACGGCATGATGGATAACCCAGTGCAGAGAGCTGCTCGATACGC
 CTGAGGCCACGTGGGCTTGGCGTGTACCGCTTGTACGCGATTACCCAAGTGGGGATACGATGGGCAATGGCAATTATGAAATCAC
 CTATCCGGCTCTACACGACTGGATGAACAGTGACAACCCCTGGCTTCACGCCATGCACGATTTTCTCGTGCATGTGGATCCCGGTCCG
 CATCGCCAAGTGTTTTTGAAACCGTTTCATCACAATGACCAAAGTCCGGCTTTTGTTCACGTGCCATAAAGTGACCTCGATACGC
 ATGTGAACAACATATCGTTGGTCCCGGGGATTTAATGAATATGATGCCTGGCAGGCCAGTGGCGTGTGGGCGATGGGGCGCGGTCAAT
 CTACTACCCGGACACACCTCAGACGTGTAATGACTGTGATGTCATATGCCATTGGTGCCGTCGGACGATCCGGGCCATCGTCAGGGCCTGGTA
 CACAGCCATCGTTTTCCGGCCGCAATACAGCCCTGCCAACGGCAAATCGTCATCGCGACCAGCTCGACACCACTATGGCATTGCTCC
 GCAGTGGCGTGGTGTGCTCGATATTTTTGCGATGAGTCCCGCTCCGCCATCATCGCGTGTGCCATGGCCTCTGGAGCTGCGCCATC
 GGGCCCGCGCGCTCGCAACCACGTTCCCGGTAGGGGAAGAGCAAGCGCTGCAGGTGGTGGCAATCTACCCGCCGCTCGGCAC
 ATCAGGGTCCGCTCGACGACGCTGAAGTCGTGGTCAAGCGGGGTTAGAGGTGATCGTGGACGTGGTGGTGGCAATCGTGGGTGG
 GACACTTTTTTCCGGCGGCACTTTGGATGCGTTTCGATGTGTGGGTGCGAGTTTCAGGCGGTAGATGAGCAGGGCCAAATCTTGTCTG
 GAGCGGGCGGTGACAGATCATGGTTCGCGGGCCGGTCGAGCCCTATGCCATCGGTACGGGGCGCGGTTGGTAGATGCGCACGGCAAT
 ACAATCAACAAACGCAATGCCTGGGCCGACGCGCAGTTGTCTACGCCAACGCCATTCGCCCGGCTCGGCCGATGTGGTGCATACC
 GCTTGCCATTCCCAGCATGCTGGTGAACGGCTGACCCTCACGGCCAAAGTGCATACCCGAAATTCGATTGGTGGTACACCCAGTG
 GCGTATGCGGGCGAGCGGACCCCTGCACAGCAACTCGAGCCAGCGTCAGCCCGATTACGATGATGGCGAGTGGGTCTTTACCGGT
 GATACCTCAGAGGTTTCAGGCGCGGTGAAAGCGATTCCCGACGTGCCGATCGCGACCATGGCATCGGCGACCGTCACTTTGCGAGTGA
 GCAAGTCTGGTGCGGCCAAAGCGGCATCGTTACGCTTGCCAGACCACCGTCAGGGCGAACCAGGGCGTGGGTGAGAAGTGGGTGAGA
 GCGTTGGAACGACTACGGTATTGGCCTGCTGCGACAGGGGGATTGCGAGGGGCAGAAGTTGCCTTTTCGGCGCGTCTCGGAGCTGGCA
 CCAGACGATGCCGATGGCTGGGTCAATCTCGGCCGGGTTACCTTCAGGACGGCGATTGGAGCGGGCACGCACGGTGTGAATCAAG
 CCTTGGTGCAAAGGCCCAATTGCCCGCGCCTTGTTTTTTCTCGCCATGGTGTAAAGCAGAGGGGGACTACGAAACGGCCCTCAG
 CCATTTGCGACAGGTGCTAACGTCCATCCCCGCGACCGAGTGGTGGCAATCAAATGGGCCGTTTATTATTTTATTGGGGCAGTAC
 GAGGCAGCGAGAACGGAGCTGCAAGCGGTGTTGCGCATCGATCCGGAAGATCTGCAAGCCCACTATAACCTGATGCTCTGCTACCGCG
 CCCTAGGGGATGAAACGCGAGCCGAGACCCACCACCGGTTATACTTGCCTTTTAAAGCCGACGAGTCCGCTCAGGTGATCGCAGGCAA
 GGCGCGGACGCTGACCCGGGGGCCAACCTGGAGAGCCAACCCGTACACGAGACCGCTCCATGCCGCTACCGCCGACATCGCCCCGC
 ACCGGCGGCTAG

Serine/threonine kinase [*Streptomyces griseoaurantiacus* M045]

ATGAAAACCGAGGAGTCAAGTCGCGTGAGCTGTGGGAAGGAATTCATCGTGAGGGCACAGCTGCAAACCATCGTGTGGATCGCGGTGG
 TTTGCATCGCCGAAGCCCCCTGTATATGGCACTCGATCGAGTCAACGCGCACCACCATCCCAATCACGATACCGTTCCGGTGCGCCA
 ATTGTTGACAATCTACGAGTGCTCAAGATGCCACCGATTGAACACGCCGCATCGTCTCATCGGGCCGAGTCTCTGGCAACTTGGCCAG
 CGCAAAACGGCAGCGGACGTACGCGCTGCCCTCCTCGATCCCAATGCCATCATTGTGACGGGCTTTCCGGCTGGCCTGATGAAAAAC
 GGCTGCAAGCGGTGGGATTTTACAAGGACATTGAGCATGATCCAACCATCTGGATCGCATCGTGGCGTATCTCATTGCTCCCCGA
 GGCTGCTCCGGCCCCGGTCGCAATCAGATGACTGCGAGCCCTGCTCCAGCTTCTCCAATGCCTTGGGAATCGATTGGTAGCAGTC
 ACGAAAAAGCAATTTGCCGCCTTTATGGCGGATGGGGGTACAGACCAAGCGTTACTGGGATCGGATCGGCTGGGCATCGGTTATCC
 GGCGGCGTCATCGCACGCAGCCACAGGTGGGACTCGGCTCGGGATGTGGCCTCCAGCAACCCCTGGTGGGCGTCAATTGGTACGA

AGCCGATGCCTATTGCCGCTGGGCCGGCAAACTCTGCCAACGGTGCAAGAATGGGAACGTGCTTGTGTGATTGCGGACGTGGGCC
GATGCACCGCCGCAAAGTGACCTGCAGTGGGAGTGGACGGCCGATGCGATTTGAAAGCGGCACCGGCCAGTGGGACAACCTCGCGTG
ATCACTGTACCGAACGCGTCGCTCCCATCGCGCCTTGGATGGCTATCGCACGGGATTCGATGCCACGCCGTCGCGCGCCCGTAA

Unnamed protein product [*Desulfobacterium autotrophicum* HRM2]

ATGCACTCATATTCATCCTTAGGAATACATCATGAAAGACCTGTCCCATTCTACGCCCCGATGTGTGTCCGGAGACAACGCCAACGGC
GAAATCGTCTCGATTTTTGTGCGATTACGATCACCCGCTGCTTCAGCTCTGGCAGACTCTACCCTGGGCGCAGATGACCGAGCTCCTGA
TCCAGGAGTGGCGTCTGTGAGCAAAAACGTCGATGGTGGACCTGGGCGGCCCTTGGATGTGTCCTTATATGTGCCATTGGTCGTGTT
GATGATGGTGCAGGGATTCAATTCGCGCCAGATGGAGGCGTACGTGTCCGAGAATGTGGTGGCCCGAGTGTTTCATCAGCAGACAGGAT
CAAGTGACGGCTGCGATTGCGGATCATGCCAACATCGCTCGAGTCTATGCGGCGCTGAGCCAAGAGGGTTTGGAAAGCCCTCAATACCT
TGGTGGTGCACGAAGCCAAGCGCCACGGTTTTGCCGATGCCAGTATGCTTGTGTCGTCGGACACGACGATGCAGGAGTTGCCCATCGGCT
ACCCCAACGAGCCCGGGATATTACGGGGTCTCGCCAGCGCTGTTTGCCTGCGGTGGAGAAGTTGGGCAAGCAAGGGGTTGCGGGTAT
CGAAGGCCCGCGGTGGAGAAGGCCAACGATGTCTGCGCTCAGTCAAGGAGCACCATCTGTTTGCCAAAGGCAAGAAGCCAAGCAGC
AGGTGTTGGAGCGAATCATGTTGAAACCGAGGCCCTTTTGAACACCACCGATGGCCTCGTGGCAGCCTCGGCCAGCCTCAAGAAGC
GAGCAAGCAAGCGGCGCTGCGAACCTACGGACCATGAAGGAGGTTGCCACCGGGCTTCTGCCTCAGATCACGCATTGGCTGACCACG
GGCAGGTTGGCCAAGGGCAACATTCTACATGCGGGATTGACTCAAGCGGTGTGCGTGGTTCGCAACAAAGCAGGCAAGCGAACGGAGT
TCGGCTTGCCGTATTTGCTCAGCCGTTTGGGTGGTGGGTATGTGTTCCGAACGCTGTTGAGTCGGGCACCGGACGAGACGAAGATGCC
GTTGCATGCCCTGGTGGCTTATCGCGAGCGTTTTGGCGACGAGTCGGTCCCGAGTTGATGGTCTACGACCGAGGGGGCTATGCCAAG
GGAACGTTGGATGCATTGGCCACGAAGGCGTCAAACAGATTGGTGTTCAGCCACGGGCAAGGGAGCCTGGCGGGTTGCCGAGGAAG
TCCGCGAGACGATTGGAAGCGAGAGAGGGATGACCGAGGGAGTCATTGGGACGCTCAAAAGCAACAAATACGGCTTCAACAACCCCAA
GGAGCGGACCTGGGAGACGCTTGAATGGCAGGGACGAAGTCCATCTTGTGCTTAATCTGAACAAATTAATGCGGGATGTGGTGGAG
GCCAAGAGTTAAGGAACCACGAAATCGGATTAGACAAAAGCGGAACCAGAGGAATGCAAGAGGGTGGAGGGAGAGCCCTGAGGAGGGG
CTTCGGCCCTCAGAGGAATTCGCGACATGCTCTATCTATGGTATCTTGCATGTGTTGTTTTCCGCTATTCTCAAGGCAATTTTTTTC
TTGCCTATGTTTCTCACCGTTGGTCTGTTTGCAATCATCATCAATGCATTTTTTGTCTTTGTACAGACAAACTACCGATGATTTTG
AGATTGAAACCTCAAAGACACCCTGATTGGAGCGGTGTTGTTAACCGTGTTAATTCGTTTGGCGTTTATTTTTCTAG

Amidohydrolase [*Sebaldella termitidis* ATCC 33386]

ATGGACGATATATTATTGCGTGGTGGTATGGTAGAGGGGAACCTCGTGACATCGCGATTGAAACGGCCGATTTCGGCAAATTGCAT
CGCAGATTCAAACGGAGGCGGTGCACATCTTAGATGTCCATGGGCATCTTGTGGTGGCGGGGTTTGTGAGTCTCACATCCATCCCGA
CAAGGCATTTCATTGCCGACCGGGCACCAGGCTTGCAAGTCGGGGGGGCTACCCGCGAGACGCTGGTGGCCGAGCTGAAAAAAGCTTT
ACCGTGAGGATATTGCCAGCGAGCCAGCCGCTGCTCGAGATTGCCCTGCGGCACGGTTGTACTGCCATGCGCGCCTATGTGGAGA
TCGATACCTACATGGAAGTGCAGGGGTAGAAGCCATGTTACAGGTGCAGCAGGCGTGGGATGGCAGAGTGGATTGCAACTGGTCGC
ATTTGCCCAAGAGGGTATTACCACGACGACAGCACCTGCGATCTCTTGCAGCAAGGGTTGCGGATGGGGCTGCCGACGTTGGGTGGC
TGTCGGTATATGGATAGGGACCAAAACCGCCACATCGATTGGTTTTTTGAGACGGCAGCGGATTTTGGGGTGGCCTCGACTTTCAG
CCGATTCCTCTGACGACCCGGCTATGCTCACCTGCGATTACATTGCTGAGCAGACCATTGTCTACGGCATGCAGGGGAGGTGACACT
CGGGCATCTGTCCACGTTGGACATACTGGAACCCGCCACCGAGCTGATGTCATTGCCAACTCCACGAAGCCGGTGTCCATGCCATG
AGCTTGCTGCCACCGAGTCGCACGTGAAGGGACGAATGACACCCGACATACCTGGCGCGCGTACACGCATTGGCGAGCTGTGTG
AGGCTGGCCTCAACGTGTCGTTGTGACCAATAATATTGTCAACCCTTTTACGCCCTACGGACATCCTGACTTGTGCGGCAGGCACT
CGTGGCCGCGATGACCGCGCATCTGGGCAATCTGGAACAGATGGCCTGGCTACTGGACCTGGTACTGTGAATCCGGCCCGTGCCTTG
GGGCTCGTGGATTACGGCTTGGAGGAGGGTTGTCGGGCCGACTTGGTGGTATTGGATGCCACAACCCCGGCCCAAGCGATTACGGAGC
AGGCGGAAAACTTTGGGTATGCAAGGACGGCCGCGTGGTGGTGCACAATTCGCGCGCCACCGAGTTCATGTAA

Conserved hypothetical protein [*Oscillatoria* sp. PCC 6506]

ATGCGCGGTCATCGCGGCCACGAGTGCCTGCCGCAGCAAGTCAGGATGTCCGTAGGGCGTAAAAGGGTTGACAATATTATTGGTCGAC
AACGACACGTTGAGGCCAGCCTCACACAGCTCGCCAATGCGTGTGACGCCGCGCCAGGTATGTGCGGTGTCATTGCGTCCCTTCACGT
GCGACTCGGTGGCAGGCAAGCTCATGGCATGGACACCGGCTTCGTGGAGTTTGGCAATGACATCAGCTCGGTGGGCGGGTTCCAGTAT
GTCCAACGTGGACAGATGCCCCGAGTGTACCTGCCCCTGCATGCCGTAGACAATGGTCTGCTCAGCAATGTAATCGCAGGTGAGCATA
GCCGGGTGCTCAGAGGAATCGGCGTGAAAGTCGAGGCGCACCCCAAAATCCGCTGCCGTCTCAAAAAACCAATCGATGTGGCGGGTTT
GGTCCCTATCCATATACGGACAGCCACCCAACGTGGCAGCCCCATCCGCAACCCTTCGCGCAAGAGATCGCAGGTGCTGTCTGTCGTG
GTGAATACCTCTTGGGCAAATGCGACCAGTTGCAAATCCACTCTGCCATCCCACGCCTGCTGCACCTGTAA

Hypothetical protein NIDE3054 [*Candidatus Nitrospira defluvii*]

ATGAAAAAGCGTATCTATGGGCTGAAAAACGAATTCGGCATTGCCTTACGTGCGACGGGCGGGGACGCTACCGTCGGAAAGGGTGG
TGCGCTATTTGTTTGAAAACTCATCACCACGGAAGGGTTCTTGAACGTTTTCTGAAAAATGGCGCCCGATTATCTCGACACCGG
TTGCCATCCGGAATACGCCACCCCGAATGCGCCAGTCCGCTCGATGTGACCATTATGACAAGGCGGGCGAACGCATCTTGAAAAAT
CTGCTCCAATATGCCAAGGCAAAGTGCGGGAGGAGGGATTTACGGCAATCTGGCGATCTTCAAGAACAATACGGATTTTGTGCGCA
ATTCTACGGCTGCCACGAAAAATTACCTGGCCGAGCGCGCCTCGGACTTTTACTACATGGCGGAACAATCATCCCATTTCTGGTGAC
CCGACAGATCTTCACTGGGGCTGGCAAGGTGTTTCGCACGCGCCGGGAACGGTGTTTACATTTCTCAGCGCGCTCAGCACATTCCG
CAAAAAATCTCGGGGACGACGACGAATGAGCGCAGTATTATCAATACCCGCGATGAGCCCCATGCGATCAAGGAAAAGTATCGCCGAT
TGCACATTATCGTAGGCGATTCCAATATGTGCGAGTACACCACGTATCTCAAAGTCGGGACCACGGCCATCATCTTAGAGATGATTGA
GGACGATTTTATTACGCCGAATTGCTCGTGCGAATCCGGTGGGGCGGATTAAAGACATCTCTCGTGACCTCACATGCCGCGAGCAG
GTGCCGCTCAATAATGGCAAAAAGTATTTCGGCCCTGGAGTTGCAAAAAGAGTACTTGGAGCTGGCGCACCGCTATTACAGCACCCGGC
AAAAAAGCGAGATGGTGACCGATATCCTCGACAAGTGGGAAGAGGTGCTGACCAAGCTGGAAGAGGATCCCATGCAGTTGGACCGCAA
GGTCGACTGGGTGACCAAGATGAACCTGCTCAAAGCCTATGGGGAGCGGACGAAACAACCGTCTGAAACCAGTGGCGACCGGATGCTC
ATGCTGGATTTGCAATATCACGATATCCGGCGCGACAAGGGCTTGTATTATCTGTTGGAACGCAAGGACAAGGTGGAGCGCGTGACCA
CGGATGAGGCGATTGACAAGGCCATGGTGGACCCGCCGCAAAATACCCGCGCAAGATGCGAGGCGAGCTGATCAAGTTGGCCAAGAT
GAAACGCATTCCCTACGATCTCGATTGGAACATATTTGCGATTGGCTACCTGCTGAATTTGTGGGTCAAGTGCAATGATCCGTTCCAA
GAAGAGAACGAAAAGGTGACGCAGCTTAAGCGGCGGATCGAGCGTTCTAATTTTAAGTATGGGTATCTGTTGTAG

Proteasome subunit alpha [*Candidatus Nitrospira defluvii*]

ATGGCTACGCCATTCTATGTGTCGCCTGATCAGATCATGCAAGATAAGGCGGAGTATGCTCGCAAAGGCATTGCCAAAGGGCGTTCAA
TTGTGGTGGTCAATTTAGCGATGGCATTGCTGACGGCTGAAAATCCGAGTTGCTCACTCAGCAAGATCTCCGAGATCTACGATCG
CATCGCTTTTGCGGGCGTGGGCAAATACAGCGAGTTGAAAACCTCCGCAAAGCGGGCATTGCTATGCGGATATCAAAGGCTATTCT
TATAGCCGCGAGGACGTTACCACCAAGTCGTTGGCCAATGCCTACTCGGAGAGCATCGGCAACATTTTTACAGTAACCCCAAAACCGC
TTGAAGCGGAAATTTTAGTGGTTGAAGTGGGTGAGCAACCGCATCAAAACGAGCTCTACCACATCTCGTTTGATGGCAGCATACCCGA
CCATCGCAACTACGCGGTGATTGGCGGGCAGGCCGATCGGATTGCAACGTACTTGCAGGAGCATTCCAAGGCGGATCTCGACCTGCAG
GCAGCCTTGGTCTTTAGCCGTCAAGCCCTACTTGCAGGCTATGAAAAACCCCGTCAGAGGAAAGCGCGCTCGAAGTAGGGGTCTTGG
ATCGTCAACGGCCAAAACGTAGTTTCTACCGTCTGAGTCAGGATGACATCACCCAGGCGCTCAAGGCTGTGAGTGGCGCCGGCGAATA
A

Proteasome subunit beta [*Candidatus Nitrospira defluvii*]

ATGTCGGCTGTGGTACCGTTTGGCACCACGGTGTGGCGCTGCACTTTGCCGATGGCATTGTCATCGGTGGCGACCGGCAGGCCACCG
AGGGGTTTGAGGTGTCATCGCGCCGCATTGAGAAAAGTTTACAATGCGGATGACTATTCGGTCATCGCGATCGCCGGGGCGGCGGGTCC
CTGTTTGGAAATGGTCAAGCTGTTCCAAATTGAGATGGAACACTATCAAAAGATTGAAGGCGAGGTGCTCGTCCTGGAGGGCAAGGCC

AATAAGCTGGCCCAAATGATTGACAAAACTTGCCCGCCGCTTTTCAAGGGCTCATCGTGATTCCGATTTTTTGCCGGTTACGATCTCA
ACACGCAACAGGGCCGAATTTACAAGTACGATATCACTGGGGGTCGGTACGACGAGCGGGATTTCTATTCCACGGGGTCGGGCAGCCG
AGAGGCCCCGAGCACGTTAAAAAAGCGCTTTGAGCCCGACATGCAACGGGATGCGGCAGTGCCTTTGGCGTTGGAGGCCCTGGTGAAC
GCCGCGGATCTCGATATCGGCACCGCCGACCGGATCTGCACCGGGGCATTTACCCGGTGGTCAAAGTCGTGACCCAGAACGGCATTG
AGGATGTGGGTGAAGACGAACTGCGCTCCATGAGTGAGGCGTTGCTGGCCGAGCTGAAAGGATGA

ATPase [*Streptomyces sp. C*]

ATGGAAGAGGTCCCAAAGAGAGAAGAGCGCAAAGGGTTTGTCCGTGACACGATGCGCAAATTTTCGATTCATGTACCGCGCTCAGAAG
GGTCATTCCAGAACAACTCTCCAGTACGAAGATGAGCTGAATGAGTTGCAAGAGCGAATGCGGCAAATGGACCATGAATCTGAGAC
GATTGCCAGACATCTTGAGCAAACCTTTAAATCAATATGAAGTGTTAAATCGCAAGTACTGCCAAGTTAATGAACAGCGCGGTCAAGGG
AAGAAACAGAACGAGAAGTTAGTGGCCGCCCTACAGGAAGCCAAGGAGCAAATTAATTCGCTTAAAAAGGACTTTGAGAAGCTTTGCG
CACCTCCCAATAGCTACAGCGTCTTTCGCCAACGCAACAAGGACGGCACGGTAGATGTCGATCTCGATGGGCGCCGCTTGAAGGTCAA
CGTGATCCGAAGCTCGAATCGTACGACTTCGAACCTGGACAGTTGTTGGCGCTCAACGAGTCGCTCAACATCGTCGATTTGGGCGAC
TACGAAACCCGGGGCGAAGTGGTCCGCTTGAAAAACCGGTTGGATGAGGGCCGGGTGTTAGTGGTGGGGCGCGCGGACGAAGAGCGGG
TGGTGGTGTGACCGAGCGCATCCGGCACTTGATCTCGACGTGGGAGACAACCTGCTGCTCGATCCCCGCTCGAATTACATTTTGA
GAAGTTGCCTAAGTCCAAAGTCGAGGAAGTCATGCTCGAAGAGGTCCCGGATATCAGCTACCTGGATATCGGGGGGTTGGACGAGCAG
ATTGAGGCGCTGCGTGACGGCATTGAATTGCCCTATCTCTATCCGGACGAATTTCTGTAGCACCAGTTGCGGCCGCCCAAGGGGGTGT
TGTTGTACGGCCCGCAGGATGCGGCAAAACGCTGATCGCCAAGGCGGTGGCCAACAGCTTGCAAAAAAGTTCCGCCGAGCGGGCTGG
GGTTGAAGAGGCGCGCAGTTACTTTCTCAATATCAAGGGCCCGAGCTGCTCAACAAATACGTTGGCGAGACGGAGTCGAAGATTTCG
GAAGTCTTTAAAAAGGCGCGGAAAAAGGCGAATAATACGACACCGGTGATCGTCTTTTTCGACGAGATGGACGCGTTGTTTCGAGTGC
GCGGCTCGGGTATTTCTGTCGACGTGGAATCACCACCGTGGCCAGTTTCTCTCCGAACTCGACGGTCTCGAATCGCTGGAACCGT
CATTGTCATCGGGGCGAGCAACCGCCAGGATCTGATCGACCCGGCGTCTTGCGACCGGGGCGCCTGGACATCAAGATCAAGGTGGAC
CGCCCAGATCGCCAGGCGGCCAAAGATATTTTCTCGAAGTACTTGAGGCCCCGAGTTGCCCTTGACGAGACGCTTTTGGCCGAAGTCG
AATCGGACCGCCAAGCCGCGATCGACCGGATGATTGACCACGCCTGCGACCATATGTACAGTGACCGGGAAGAGAACAAATTCCTGGA
GGTGACGTATGCTCGCGGGGATAAAGAGACGTTTTACTTCAAAGATTTCGCCAGTGGCGCGATGATTGAGAACATTATCGCCCAGCC
AAAAAAGCGGCTTAAAGCGATATTTGTCTCATGAAGAAAAAGGCATTAAGCTTCAAGACCTCATTGATGCCATCCAGGGCGAATTCA
GCGAAAACACAGATCTTCCCAACACCACGAATCCGGACGACTGGGCGCGGATTTCCGGTACGAAGGGCGAAAAGATTATCAATATCAA
TATTCGCACGTTGGTGGGATCGAAGAGTCCGAAAGCGCAGTCCATCGAAGATATTGCGCCGGGTCAGTATCTCTAA

Cytochrome c-type biogenesis protein CcsB [*Geobacter sp. FRC-32*]

ATGAACAGCATTCTATTTTCATGTCGTGCTCTTGGCATACTTGTGGCCACCCTGGGTTTTTGGTGTTACTTTGGCGTGCGGCAGGGGT
GGTTGTTTCGCACGGCCACGGCTTGGTGTACGTGGGGCTGCTCTTTCAGACTGTGCTGTAGCCCAGCGCGGTTACCCCCAGCGGT
TTGGAGCAGTGTCTCCGCCCTCGCTCGCCCTGCTCGCCTGGGCCATCGGCATTGGCTACGTGGTGGGGTGGTGGCGCTACCGCATGGAG
GCGCTCGGATCGTTCATGATTCCGTTGGCGTTTCTCGCCGTGGCGCTCTCGAGCGTGCCGGCGGCGGGTGGTGGCGCTACCGTCGT
CTTTGCAGCGCACCTATTGGTGGTGCACATCGTCTTGGCCGTCTTGGGTTACGCGGCCCTGGCTCTGACGTTTTGTGCCGGCGTGAT
GTATTTGATACAAGAGCGTCAGCTCAAGTCGAAACAGCCCGGCTGTGGTGAACCGGCTGCCGTGCTGTGGGTGCTCGACGAACTC
AATGCCAAGGCCCTTGCCCTGGGGCTGCCGTGCTCACTCAGGGCGTGATCAGGGATCGGTGTGGGCCAAGGCCATGCGGGGTTCTT
ATCTCAGCTGGAGCATGACGTGCTGCCGCTCCTGCTGGCACTGGCCTTGACGTGTTGTTGTTGGGGGGCGCTACACCCTGGGTTG
GCAGGGCAAAAAGGCGGCGTTTGCCGCCGTGACGGGCTTTTTATTGGTACTTGCTTCCTATGTCGTCCACACGTGCGCCTAG

Glutamyl-tRNA reductase [*Thermodesulfator indicus* DSM 15286]

ATGGTCGTTGTCGGATTAAACCATAAAACCGTCCGGTGGCGGTGCGGGAGCAGTTGGCCATCGCCGAATCGGACCTCGCCGAGCCGC

TGGCGCAGTTTCGCCACCCGACGCTGAACGAGTTGGTGATTCTCTCGACCTGCAACCGGGTCGAGATCTATATGGAGACGGGTGACAC
GGCGGCCTGTACCGCCGCTGTACGGATTTTTTGGCCGCTACCGCGGGTGGAGCCGGCCGCTTTGAGCCCCATCTCGTCTACCGC
TACGACATGGAGGCGGTGCGGCACCTGTACCGGGTGTGCGCGAGCTTGATTTCGCTGGTGGTGGGCGAGCCGAGATCCTGGGTCAGG
TGAAGGCGGCCTATATGGCGGCGCGCAGGCGGGCCGACCGGATCGGTGTTTCACCAGTTGTTGACCGCGCCCTCGGGGTGGGCAA
GGCGGTGCGGCACGAGACCGGCATTAACGACAACGCGGTGTGCGTGAGCTACGCGGCGGTGGAGCTGGCCAAGAAAAATTTTGAGAGT
CTGCAGTCGCGCACGGCGATGGTTTTGGGGGCTGGAGAGACGTGCGAACTCGCGGCCCGGCACCTGGTGCGCCAGGGGTGACCTCGA
TTTTTGTGCCAACCGGACCCACGAGCGCGCCGTCAAATTGGCCACGCCCTGCAGGGCAAGGCGATTGCCTGGGAGCACGTGGAAGA
GCATTGGCCACACCGACATCGTGGTGAGTTCGACAGCCGCCCCGAGCCGTTGTGACAAGACGATGGTGACGCGGGTCATGCCA
GCGCGGCGGCAGCAGCCGATGTTTTTATCGATATCGCCGTGCCGCGGACATCGCCCCGAGGTGAACAGCGTTGAAAACGTGTTTC
TCTACGACATCGACGACTTGGAACACGTGATTGCCGCCAACCGCCGGAACGCGAGCGGAGGCGCTGGTGGCAGAGGAGATCGTCTG
GCGGAAAATGCGCCAGTTCGACCAAGTGGTGAAGCCAGGATGCGGTGCCGACGATCGTAGCCCTGCGCCAGCGGGCGGAGCACATT
CGCCAAGAGGAGCTGGAAGGCACTCGCCAAGCTCGGCCCGCTCGACGCTCGGCAGCGTCGGGCGCTCGACGCGCTGACGTCGGGCA
TTGTCAATAAACTCCTGCACACGCCGACGGTCAATCTCAAGCGCGCTACCGGACAGGGGCGTTTGGGGATTACGTGCAGCTCGTGCG
GCATTTGTTTGGCTGGACGCATGA

HemC-porphobilinogen deaminase [*endosymbiont of Riftia pachyptila* (vent Ph05)]

ATGAGCGCGGCGCCGATCGCCCCCAGGGGTCTACCGATATCGTCCGGCTCGGCTCACGCGGCAGCCCGCTGGCGCTGTGGCAGACGC
GGACGATCGCCGAGGCGTTGCAGTCGCACCACCCGTTTGCAGACCGAGATCGTCATCATTCGCACGGAAGGGGATCGCAACCGCCA
GGATCCATTGTGAAAATTGGCGGCCAAGGGGTTTTCTGTCGGGAAATCAGAGCGGCTCTCATGCGCGGCGACATCGATATTGCGGTG
CACAGTATGAAAGACATGCCGACCGAACAGCCGTCGACGTTGCATTTCCGGTGGTGGCGCGCGGGGCGACGTGCGCGATGCGTACA
TCGCACGCGATGGCCAGCCCTGACTTCTAGCTCGGGCAGCCGAGGCAGTTTGCGCATTGGGACCGGGAGTTTGCGCCGCCAGGCGCA
ACTGTTGGCCGCAATACGGACTTGAGCTGCGCGAGGTGCGCGGCAATGTCGATACTCGGTTGCGCAAGATGCGAGAGGGCGAAGTG
GACGGTTTGGTGTTGGCCGAGCTGGGCTTATCCGCTTGGGGCGCGAGACGGAGATCACGGAATATCTACCCTTGACGTGATGCTGC
CGGCGGTGGGTGAGGCAGCACTCGGGGTACAAACGCGCTGCGGCGATGCGGTGGAGGCGCTACTGGCGCCGCTACACGACGTGGCCAC
GGGGTGGGCGGTGACGGCCGAGCGGACTTTTTTGCCCACTTGAACGGGGGCTGCATGGTGCCCATCGCCGCGTTTGGCGCGTGCCGA
GGGGATCGTTTACATCTTACGGGCTGGTGAGTTCGCCACGTGGTGAACAGGTGTTGCGGCACCGAGTTGAGGGGCCGTGTGAGCAAG
CGGTGTCCCTGGGCCAAACGCTCGCCGAGGTGCTGCTGGACAGCGGGGCCGCGATATTCTAAGGGCGCAACGGGACGTTTCAGGTTG
A

HemB-Porphobilinogen synthase [*Thermodesulfatator indicus* DSM 15286]

ATGCGTTTTCCAATTACCGAGCGCGCCGTTGCGCGAGCACGACGTGCTGCGCCAAATGGTGCAAGAGACGCGGTGGCGCCGAGG
ATTTTATCTATCCGTTGTTGTGACGCCGGTTCGGGGATACGCGAGGAAATTTCTGTCGATGCCGGGCAACTACCACCTGTCCGTGGA
CCAGGTGGAGGAAGAAGTCCAGGAAGTGGCGGATTTGGGCATTCCGGCGGTGCTGCTGTTCCGTTTGCCGAGAGCAAGGACGCGGTG
GGACGCGAGGCCTACAGCCGAGCGGGGTGATTACGAGGCGTCGAGGCGATTAAAAAAGTGGCGCCGCTACTGATGGTGGTGACCG
ATGTGTGCTTGTGCGAGTACACCGATCACGGCCACTGTGGCGTCATCGAGGGCAATCACATCGTCAACGATCTGACGCTGGACTTGTT
GTGCCGCACGGCCCTGTGCGACGTGGAGGCAGGGGCGGACATGGTGGCGCCGTCGGATATGATGGATGGGCGCGTCGGCGCCATTTCGC
GAGACCCTAGATGCCAAGGGGCACGTGAACGTGCCGATCATGGCCTATGCCGCAAGTACGCTCAAGCTTTACGGGCCGTTTCGCG
AAGCGGCGGATTCGACGCCGAGTTTGGTGACCGCCGTCGTACCAGATGAATCCGGCCAACGCGCGAGAGGCGCTGCGCGAGGTGCG
TCTGGATATCGAAGAGGGCGCGGATATCGTGATGGTGAAGCCGGCCCTGGCCTATCTCGACGTCATCTGCCAAGTGGGCAAATGACC
GACTTGCCGTTGGCGGCTACAACGTTAGCGGCGAGTTTGCCATGATTAAGGCGGCCGCGCGCTGGGGTGGCTAGATGAGATGCCAG
CTATGCTGGAAGCGCTCATTGGCATCAAGCGAGCCGGGGCGGATATCATTATGACCTATTGCGCCAAAGAGGTAATGCCCCATCTTTA
G

RsmD family RNA methyltransferase [*Eubacterium infirmum* F0142]

ATGTTGCGTCCGGTCATCCGGGATGCTATCTTCGTAGATCTCTTTACCGGCACCGGCAGCGTCGGCTTAGAGGCCCTCAGCCACGGTG
CCAAACAGGTGTTTTTTGTCGAGCAAGATCGCCGCGTGGCGGCGACACTGCGGCACAACATTGAGCAGTGTGCGGTGGGTGACCGCGC
CACCGTGATTGCGGCGGCGCTGCCTCAGGCGGTGCAGCGGCTGCCGATCGAGCCGCAAGCGGACATCGTGTTCCTGGATCCGCCCTAC
GCCTCCGAACTGGCGGAACAGACCCTGGACGCATTTCGCGCCACGGTCGCTCTTGGCGCCGACGCGGTGGTCATTTGGCAGCACGCCG
TACGCCATGCCGTGCCTGAAGAAGTATTGGGGCGGGAGGTGATGGTGGGGAAGCCGCGGCGCTACGGGGATACGCAATTGTCGATCTA
TGGCGACTTACGACCGGCGTCGCAGTGA

tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA [*Geobacter* sp. FRC-32]

ATGAGTGGCGGGGTGGACAGCTCGGTGGCAGCGCGTGTGTTGCATGAGCAGGGCTATGATGTGATCGGCATGACCATGAAGCTTTGGG
ACGGCCCCGAGACGGCCGAGGCCGGTCACAAGACGTGCTGCACGCTGGATGACGTCTCCGATGCCCGGCGGGTGGCCGCCAGTTGGG
GATTCCGTTCTACGTGGCCAAATTTAAAGACCAGTTTGCCACCCACGTCATGGACTACTTTACCGATGCCTATCGCCACGGGTATACG
CCGAACCCGTGCGTGCAGTGCAACCGTTATCTCAAGTTCACCCATTTGTTGCAGCGCGCCGACAGCTCGGCGCCCGTTGGGTAGCAA
CCGGCCACTACGCCTCGGTGGACCATGGCGAGGACGGTCGCTACTACCTGCGCCGGGGCCGCGACGGCAACAAAGATCAGTCGTATTT
TTTATTTGACATGACGCAAGAACAATTGCGCCAGACGCTATTGCCCTCGGGCAGTACTGCAAAGACGAGGTGCGCGCCATGGCCGCG
CGCTGGCAACTCAACGTGGCGACAAAGGCGGAGAGCCAAGAAATCTGTTTTATTCCGGATGGCGATTACCGGACGTTTTTACGCACGC
GCCTGGGGCCTGAAGAAGCGCGGCCGGCCAGATGGTCAACGCGGCCGGCGAGGTGGTGGGTGAACATCAGGGCCTGCCGTTTTACAC
CGTTGGCCAGCGGCGCGGTTTAGGGGTGGCGACCGGTCAACCCCTCTACGTACCGAGGTTCAACCGGAACCTAATGTCTTGTTGTC
GGGCCGCGCCAGGAGGCGATGTCCGAGACGTGCACGGTGGAGCGGCTCAATTGGTTGCGCCCGCCCCGGATCGTGCGATTCAAACCA
CGGTGCAAATCCGCTACCGCCACCCGCCGGTGGCGGCCAGGTCGAGCCCTGGGCGGCGACCGCGCCCGCATCGTGTGCAAGCGCC
TCAATTTGCTGTGACGCCGGGACAAGCAGCGGTGTTTTACGAGGGCGACAGGGTGATTGGCGGCGGGTGGATTTGCCGGAAGCGGTA
TCTGACGGTTGA

Cytoplasmic protein [*Syntrophus aciditrophicus* SB]

ATGACGCCCTCAGAATCGCGAAGAGGAACAGCAGGAAACGGGTTTTACCGTATCGGATAAGCGCTTGTTACCAAGGACGGGGCCCCGGC
GCGAAGGGCACGAACGCCCTGAACCCGAACGTCCCGCCCCGCCGCCGCCCGAGATCGGCCCCGCCGCCCGCAGGAGGCCCGGAC
CGCAGAGGCTGACGCGCCCCCGAAGCGATGTCCACCGGCCGATTTTCGACGTACGTGGTCATGTTAGCCAATACCGTGATGATGA
TGCTCGGACAGATGCCCGATCCGGTCACGCAACAGCGTCGCCTCGATCTCGTGCAGGCCAAACACACCATCGACATTCTCATGATGTT
GCAAGCCAAAACGCAGGGCAATCTCAATGCCGAAGAAATCAAGTTGCTCGAAGACGTCTTGCCACAGCTGCAAATGGCTTACGTGAGT
ATCAGTCGGCAGGCCGGTGCCGGTTAG

DNA mismatch repair protein

ATGGACGCCGACGATGCAACGCACTGTTTTACGCGGCACGCCACGAGCAAGCTGCGCACGCTGTGCGATCTGGAGGCATTGGCCACCA
TGCGATTTTCGCGGCGAGGCCCTGCCGAGCATTGCCGCCGTGTGCGCTTGCAAATGACCTCGCGGTGCGCGACCGACGTGGCCGGGAC
GCAGGTGGTCATCGAAGGGGGGCGGATCGACAGTGTGGAGACCTGTGGTGCGCCACCGGGCACGTCGTTTCGCATCGCCGATCTGTTT
TTCAATACCCCGGCCCGCCGAAGTTTCTCAAGAGCCCGGCCACCGAGTCCGGCCATATCGTGCAGAGGTTTACGGCTTTGGCCCTGA
CCGCGACGGATGTGCACATGACCTTGCGGCTCAACGGCCGTCTGCACACCCAAGCCGCGCCGACCAATCGCTTGGCGAGCGGCTCGA
CATGATTTTTGGGGCGGGCTTGACAGGACCACTCCTCGCCATTGAGCACGTTGAAGACGGGCTGCAGATACCGGCCCTCATCGCCCGG
GCGACGTTTACCGCGCCACCCGCCGACAGCAGTTTTTTTTTCGTAACCAGCGGCCCGTGCAGAGCCGCTCACTGAATCAAGCACTCT
ACGACGCCTACCGGACGCTGTTGCCGCGGACCGTCACCCCGTGGTCTGTGTGTTTCTACCCCTGCCGCCGAGTGAGGTGGACGTGAA
TGTCCACCCGGCGAAGTTAGAGGTCCGGTTTCGACGCGAGCGCCATATTTACGACTGTATCCGGCGCCTGCTGATTGGCGGTTTGAA

GAGACGCTCATCGGACCGTCCGGTCCGGTCCGAGAGTCCGGCGGGTCCGGCCCTGGCCTCGCCACCGCGCGCCCGTACCCATGA
TGTGGGGAACGGCGCCGACGTCGACCCCAAAGCCGACCGTGCCCCAGACGCTTCACACCTCTGGAGGCGATGCGGCATCACCCGGCCC
GGCCAAGGCGTGGTCGAGCCCTCTGGCCCGTCCGGCCATTATCCCGTGCGGCCGGTGCGAACAAAAGCGCGGATAAAAGTCAGGGC
CTTGGCTTTCACACCGTTACCCGGCCGAGGGTAGCGCTGTGCTCGACGGTGAACCCTTGGGTGAGTTGCACGAAACCTATCTCTTAG
TGCAGTATCCCGAGGGGTGTTTATCGTCGATCAACACGCGGCTCACGAGCGTATCGTGTACGAACGACTCGTCGCCAAGATGCAGGC
GTCGTTGGCCGAGTCACAACAACTCCTCTTTCCGGTGAACATCGATTGAACGGCGTTGATCCCGACTGGTTGGAGGCGTGCATGCCG
CGTCTGACGTCGTTTCGTTTTTCCCTCGAACCCTTTGGCGGACAGACGTACCGCATGCACAGCGTCCCTGCCTTGTGGCGGAGCGCG
ATCATGCCGCGCACTCATGGATGTACTCGATGTGCTGCGCACGCCAACGCCGATGAAGCCCCGGAGCACGCGCGACCGGTGTGCC
CAGCGTCTTGACCGGGTGGTCACGGTGATGGCGTGTACGGGGCCATCCGGGGCCACCAGCGGCTGCAGGATGCCGAAATGCGTGCG
CTCTTACGGGATTTAGCCCGCACACCGAGACCGTTTACGTGCCCGCACGGCCGTCCCGTTTTGGTCAATGTGGCCCTATCCGACATTG
AGAAAACCTTCTTGCGCCGTAA

Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [*Deferribacter desulfuricans* SSM1]

ATGATTCGGGCACAACGTTGTCAAAGGGAGCTGTCTATGTTGGAAGCAACCATACTATGGGTCTACGTTTGATGACGTCCTACTCG
TTCCGGCCCGCTCGGATATCGTGCCGCGGACACGGATGTCTCCACCATTCTCACCCATCACATTCCGATGACCATTCCCTCATCAG
TTCCGCTATGGACACCGTGACTGAGAGTAGCTTGCCATTGCCCTGGCCAGGAGGGCGGCATCGGGGTGATTCAAAAAACCTGTCC
ATCGAGGCCCAAGCTGCTGAGGTCGACAAAGTAAACGCTCGGAGAGCGGCATGATTGTCGACCCCATACCATGTGCGCGCATCAAA
CCGTGCAAGACGCCCTCGACGTGATGGCGCGTACCGCATCTCCGGCATTCCGATCACCGAAGGGTCCAAGCTCGTGGGCATTTTGAC
CAATCGCGATCTTCGTTTGTCAACGACACCGCACAGCTCATTTCCGCCCTGATGACCAAAGATAATTTGGTCACCGTGTCCGAGGGC
ACGAGCCTGGACGAGGCCAGCGCTTGCTCCACGCCACCGCATTGAAAACTTCTGGTGGTCGACGAATTGTTTCACCTCAAAGGGC
TCATACCATCAAAGATATTGAAAAGCGGCGCAAATACCCGTTGGCTGCAAAGACGACCTCGGGCGCTTGCGGGTGGGCGCGGCCAT
TGGGGTGACCCCGATCGCCTCGAGCGCTTGCAAGAACTGATGCGCTGCGGGGTGATGTGGTGGTGGTCGACAGTGCACACGGCCAC
TCGACCAATGTGTTGGCAACCATTGAAGAGGTGAAGAAAACGGCGCCGATCTCCAAGTATTGGCGGCAATGTGGCCACTGCGGCCG
CCACCCGCGACACGATTAACGCGGGGGCCGACGCGTCAAAGTGGGCATTGGACCTGCCCTCCATTTGTACCACTCGGGTGGTGGCCGG
CACCGCGTGCCGACGCTCACGGCCATTGCGGAATGCGCCAGGTGGGCGAGCAGTACGGCATTCCGATCATTGCCGATGGCGGGGTG
AAGTACTCCGGCGATATTGTTAAAGCGTTGGCGCGGGGGCGCACTCGGTAATGATTGGCAGTCTGTTTGCCGGGACGGAAGAGAGTC
CGGGCGAGCGGTGCTGTATCAAGGCCGAGTTACAAAGTGTACCGGGGCATGGGATCGCTCGGGGCGATGGCCGGGGGCCACGGCGA
CCGCTACTTCCAAGGCGAAGAGCGAGAGCTGAGCAAGCTCGTGCCGAAGGCGTCGAGGGCCGATTCCGTTCAAGGGGGTGTGGCT
GACGTGGTCTACCAGCTGGTCGGCGGGTTGCGAGTGGGCATGGGCTACTGCGGTTGCAAGAGTATCGACGCCCTTGCGCCGAGGGCG
GTTTTGTGCAAAATTACCAATGCCGGTTCCGGGAAAGCCATGTTACGACGTGATGGTGACCCAGGAGGCCCGAATTATCAGATGGA
CTAA

DNA polymerase III subunit alpha [*Geobacter sulfurreducens* PCA]

ATGGCTAACGACACCTTTGTCCATTTACATCTGCACACGGAGTACAGCCTGCTGGACGGGGCGAATCGGATTGGCGAACTGGTTGAGC
GGACGGCAGAACTCGGCATGCCGGCGGTGGCCATGACCGACCATGGCAACATGTTTGGGGCCATGAAATTTTACAAGGCGGCCAAGCG
CCAAGGCATCAAGCCGATCCTGGGTGCGAAGCCTATATCACGCCGGGCTCGCGCTTTGACCGGGCCATGACCGAGCGCGGGCGGGCG
GCGACCATCTCACGTTGTTGGCCAAGGATTTTACCGGCTACCAAACTTGTGCGCCTGCTGAGCACCGCCTATATCGACGGCTTTT
ACTACAAGCCGCGCATTGATAAAGCGGCCTTGGCCGAACACGCCGAGGGCTCATCGCCCTCTCCGGGTGTCTCAAAGGCGAGCCCAA
TGGCCACATCATGCACGATGAGATCAAACAAGCGGCCGACGCCATCGACAGTTACCGCCAGATTCTCGACCGGACAACCTACTACTTG
GAGATCATGGCCACGGGCTGGAGCCGACACCAAGGTCAATCGGCAGCTCATCGATTTTAGTAAAGATATGAATGTGCCACTCGTGG
CCACCAACGATTGCCACTACTTGCGCGCGGGCGATGCCGTGCCGCACGACATCCTGCTCTGCATTGGCACCGGCAAGAGTTACAACGA
TCCAAGCGCATGCGCTACGACCCGACGAATACTACGTCAAGTCGCCCGAGGAGATGTACGAGGTGTTCCGAGAGTACCCGAGGCG

TGTCGGCGCACGCTGGAGATCGCCGAGCGCTGCAATCTCGACTTGCCGTTTGACTCCTTGATGTTGCCGCTGTACGAAACCCCGGACG
 ATTTGTCACTGGACGACTATCTGGAGCAGGTGGTGCAAGAGGGGCTCAAAGTGCCTTTGAAGCGCATCAAAAGAGCAAAGGCCGCTT
 GCCCTATCCGGAGGGTGACTACCAGGCACGGTTGCAAAAAGAGCTCGACATCATTCGCACCTGCGGGTACTCAGGCTACTTCTTGATC
 GTGTGGGACTTTATCCGGCACGCCCAGGAGGCGATCCCGGTGCGGCCGGGGCGAGGCTCTGCCGCCGGCAGCCTGGTGGCCTACT
 GCCTGCGCATTACCGACGTCGACCCGCTGGAATACGACCTGCTGTTTCGAGCGTTTCTTAAATCCCGAGCGCGTCACCATGCCGGATAT
 CGACATCGACTTCTGCATGGATCGGCGCGAGGAAGTGATTAGTATGTGACGGAGAAGTACGGCAAGGACAATGTGGCGCAGATCATC
 ACCTTTGGCACCATTGTTGGCCAAAGGTGTGCTGCGCGACGTAGGCCGCACGTTAGATATGTCGTACAGTGATGTGGACCGCATTGCCA
 AGCTGGTGCCGAACCGGCTCAATATCACGCTCAACGACGCGCTGCAGGAAGAGCCGCGCTTGAGGAGTTGCAGACCCAGGACCCCAA
 AGTCGGGCAGCTCATCGAGTCGGCGCGCCGCTTAGAGGGCTTGACGCGCCACGCTTCGGTACACGCGGCCGGGTGGTGATCGCCCCG
 GAACCCCTGCGCAATGTGGTGCCCTGTACCGCAGCCCCAAAGGCGAGGAAGTAGTGACCCAGTACCCCATGGACGACGTGGAGGGCA
 TGGGGTGCTGAAGATGGATTTCCTGGGGCTGCGCACCCCTGACGGTACTCAAAAATGCCGTGATATGATTTCGCGACAACACGGCAT
 CGAGCTCGATCTCGACCACCTGCCGCTGGACGATCAGCCGTCGTACCAACTGCTCTCGGACGGCCGCACCCAAGGGGTGTTTCAGTTT
 GAGGGCAGCGGTCTGCGGGACTTGCTACGCAAGTCGAGCCCTCGGTGTTTCGAGGACCTGGTGCGGTGGTGGCGCTGTACCGTCCGG
 GGCCGTGGGCAGCGGCATGGTGGACGACTTTGTGAGCGGGCGCACGGGCGCCGCGAGATCGAATACGAATTGCCAGAGCTCGAACC
 GATTTTGCCTCGACCTACGGCGTCATCGTGTTCAGAGCAAGTCATGCAGATCGCGACCACCCTGGGCGGCTTTACCCTGGGTGGG
 GCCGACTTGTTGCGCCGGGCCATGGGCAAGAAAAAGCCGAGGTCATGGCCGAACAGCGCGAGTACTTTGTCAAAGGCGCATTGCAAA
 ATGGCTTTCCCGAGGACAAAGCGGGCAAGATTTTGTATCTCATCGCCTACTTTGCCGGGTACGGTTTCAACCGCAGCCACAGCGTGTG
 CTACGCGCTCATCGCTACCAGACCGCCTACTTAAAGGCGCACTACCCGCGGGAGTTTCATGGCCGCCCTCATCACCAGTGATATGGAC
 AACACGGACAAGGTGATGCGCTATATCGGGGAGTGTGCGGACTTGACAGTGCGCGGTGTTGCCGCCGGACATCAATACCGGCTTTGCCG
 GCTTTACGGTAGGTGGCGAGAACGTGCGGTTGCGGCTCGGGGCGATCAAGGGCGTGGGGCAAAATGCCATTACCTCGGTGGTGGCGGA
 ACGCGAGGCCAATGGGCCATTTAAATCCTTTGCCGACATGTTGGAGCGCGTCGATTACCGCTTGGTGAATAAAAAAGGTGATCGAGAGC
 TTAATCAAGGGCGGAGCGCTCGACGGCCTGGGCATGCACGGGGCCGAAATGCTCGGCAACATGGCCCGGTTCATGGAGTGGGCCAGC
 GCCAACAAGAGGACGCGCAACAGGGTCAAATCAGCCTCTTTGGCGGCACCACCGAGCCAGCTGCGACTGGCATGTTGTGCTCGATT
 GGTCATGCCTTGAACGATGCCGAGCAGTTGGCCATGAAAAAGAAGCCCTTGATTCTATATCAGCAGCCACCCGCTCACCAGCGGTG
 CAGCCGACGCTCCAGCGCTTGGTGACGGCCAATAGCCAAACCTTGCCGAGCAGCCCGCGCGAGGTAAGTTCGGTGGGGTGATCA
 CCCAGCAACGCACCCAGTTGACCAAAAAAGGCGACCGCATGGCCTTTTTCGACTTGAGAGGATCTCTACGGGACGATGGAGGTGATCGT
 CTTTCCGGAGACCTATCGCCAGAGCATCACGCACTGTGAAAGCGAGGAGCCGCTGCTGATCTGGGGTACGGTCGAGGGCGATAGCGAT
 GGCCGATTATTGCCAGCGCATCATGCCCTGCAGTCGGAAGAGACCTGGCGCGAGTGCCGACAGGTCACCTGACGCTGGCACCGC
 AGTTGGACCAAGCCGTGCTGTTGCAAGTTCGCGACCTGTTGACATCAGCCCCGGGTGAAGCGGATGTGGTCGTGGCCCTGTCTTTGA
 AGATGGTGAACAGGTGCGGTTGCGGGCGAGCCAACGCCTGTGTGTGGCGCCGACGCATCAGTTGCTCGACGACCTGGATCAGTTGCTA
 GGTGCGGGCAACGTGCGCGTGGCTTAA

Biopolymer transport protein ExbD/TolR [*Moritella* sp. PE36]

ATGAGTGGGCTGCAGTTGTCCCTTGGCGAGTGGTTGCAGCGTTATGGCGGTAGCTTGTGCCCCGTGATTACATGGGTGTGGCAGCTG
 GCATTGCCCTGTGTTCACTGGTGGTGGTGCGATCGCCATCGAGCGTTTTTTCGCCCTGCGGCAGCGGCGCATCATGCCACCGCGATG
 GCTGGAACAAGTGCGGCGCCACGTCTACCGGGGCGATATCCAGGCGGCCCTCGATAGCTGCGACGGGCAGCCAGCCATGCTGGCACGC
 ATTTTGTGTGCCGGCTCAGCCGCTATGGCGAAGGCATGGCCGAGGTGGAAGAGACCCTGGAGAGCGTTGGGCAGATTGAAGCGGGCA
 CCTTGACCCAGCACATGCGCGGCTTGGGCATGATTGCCAGTTTGGCGCCGATGCTGGGCTTTTTGGGTACGGTCACCGGTATGATCAA
 GGCGTTCAATGCCATTGCGGTGCTGGCACGAGCCATGCGGGCCTGGTGGCGAGCGGCATTTCCGAAGCGCTTTGACCACCGCTGCC
 GGCCTCCTCGTCGGCATTTCCGCTGGGCGTTGTTCAATGTCTTGCAGAGCCGGGCGGACCGGCTGACCACCGCCATGGAGGCGGTCA
 CATTGAGCTGTTTGAAGAGTTGAGTGTGAACAGCATCGCTTTGTCGCTCCGTTACGACGGGGACAGCGTCGCTCCACCCCGGGC
 CGAAGATGCCAAGCCCGCCCTGGCCGAGGATCGCAACCATGCGGTTTAG

N-acetyltransferase GCN5

ATGGGTAAAAAGACTTTGTGTCTATTCTGAAGTGGCACTGAAAACGGCCCAATTGCCCCGTGTGCGAGGCGCGTCTCGATGTGAGTACC
GCCTGTTGGATACAGCGGCCTGGGCCACCCAACCGCACACGGGACACATGGTGGATCGGCACCTCTTTCCCTCTCGTCTCGAACGGGG
AGAGGAATTCTGGACAGCACAGCGCGACAACCGTATTGTCTCGTACTGCTGGGCCACGCAAGAACCGGTGAAATCGGCGAGATTTCG
TTTACGGTGAGACCTCGCAGAGACGAGATCTATCTCTATGACGCCTATACATTTGAAGAGCACCGCGGGCCGAATCTCTACCCGGCGC
TGCTCTACCACATTTTGCAACACAGCCGCGACGCTGGCCTGCGCCGGGCGTTGATTTTTGTCATGAGTGACAACACCCCTCGATTTCG
GGGGGTGACGAAAGCGGGCTTTGCCGAATTCAGCGTGTCACTTACGCCACGCTACTCGGCTTCGGCCGTTATACCTACGAGCCACGC
CTATCTGCCGAAGCGGGCGTGGATTTGGTGACAAATTAG

Group 1 glycosyl transferase

ATGATCAAACCTACTGATGCGGCACCGGCATTGCGCCGTGTGCGGATGTTGAGCGTGACAGCAGCCACTGGCGACCTTAGGGGGGC
AAGTGACGGGCGGCATGAATGTCTATGTGCGGAGTTGAGTCGACAACTGAGTCAGCACGATATTGCAGTCGATGTGTACACGCGCCG
CCAGGACCCGGAGCTACCGGAGATCCTAGAATTCGATCGGCTGGCGCGGGTCATTCACTCAATGCCGGTCCGCCAGCGCCGTATCCC
AAAAACGATGCGTACGACCACATGCCGGAGTTTGTGTCTCACATGCAGGCCTTTATTGCGAAAGCGGGCTTGCAATACGACTATCTGC
ACAGTCACTACTGGTTATCGGGCTGGGTGGCGTTGCGGCTCCGGGAGCGTTTGACAGGCGCCGGTGGTGCACATGTCCACACCTTGGG
CTACCCCAAAAATTCGGCCGTCCAGCAGGCCTGGGAGCGCAACCGCCACGCGGCTACAAGTGAGTACGAGGTCCTGAAGCACAGC
GACCGCCTGATTGCCGAAAGTCAGGCCAGCAAAGACCACATGGTGCAGGACTACGGCGTCGACCCAGAGCGCATTGAAATTATTCCGT
GTGGCGTGAGACCTCGATTTTCCATCCGCACGACCGCCAAGAGGCCCGGATCGGCTTGGGCTGCCTGGCGGGCCGATCTTGTTGTT
CATTGGCCGGTTGCAACCGCTCAAAGGCATCGATACACTATTGAGGTGCGCACACGATGTGCGACGCCAGCACGACGATGTGCAGGTG
TTGATCGTGGGTGGTGGGTGGACTCGGACGACCCGCACGAGCGGCAGGAGCGCGAGCGCTTGACGCCTTGACGGGGGAACCTCGATC
TCACCTATTGCGTCCGTTTATCGATGCCCAGCCTCAAGAGGCATTGGCGTATTACTACGCGGCGGCAGATGTATTGGTCATGCCGTC
CCATTACGAGTCTTTCCGTATGGTGGTCTTGGAGGCCATGGCTTGTGGAACACCAGTGGTGGCGTCACACGTGGGCGGATTGGCCTCT
ATCGTGTGCGGGGCGAGCTGGGTTTTTGGCGCCAGTGGGCGATGTGCAAGCATTGCTCAATCGATCGAACAGCTCATTGGCGATT
CGGAGTTGTGGCAGTCGATGAGTGAGGCAGCTTATCTGCGAGCTCAAGCCTACACTTGGCCACGCATTATGAAACGGACCCTGCAGCT
TTATCGCGAGTCGCAGCGTCAAAATACGGCTCGCCAAGGAATCCGTGCGCCATGGCCACGCCGTGTCTAGCCCGATGA

Beta-lactamase domain protein [*Arthrospira maxima* CS-328]

ATGCGACGGCCATACTATCCCATTCGATGCATGCAATGGCGGGCCGTATGGATTTACCTCGATGGCCGAGGGCAGTGCCACGCACG
ATGTGCCAGGGGCCAAGATTGAAGCGTGTGAGCTGAATCATCCCGGCAAAACGCTGGGCTTTCGCGTCGAGGTCGAGGGCAAGTCTT
TGTATATGCCACCGACAATGAGCCCTTTGGCTCCGACCCAGTGACCAACACTTGGTGAGTCCCTCACGCTTGGTGAAGTTCGCTCAA
GGGGCAGATCTGCTGATTCAAGATGCGCAGTACACGCAACAGGAGTACCCGCAACACCTTGGGTGGGGCCACTCCACCCACATTGATG
CGCTGCAGTTGGCCCGCATGCAGGGGTTAAGCAGCTCGCCCTGTATCACCACGACCAACTCATTGCGATGCGGATATCGATCAGAT
GGTGACGCAGTGTGAGTCGTGGATGCACAAGCACCAGCCAGGGTTTACGTTTTTGTGCGGCTGAGGGGGATACAGTCACGCTGTGA

引用文献

1. Malik, S. ; Cusidó, R.M. ; Mirjalili, M.H. ; Moyano, E. ; Palazónb, J. ; Bonfill, M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures. *Process Biochem.* **2011**, 46, 23-34
2. Faura, C.C. ; Collins, S.L. ; Moore, R.A. ; McQuay H. J. Systematic review of factors affecting the ratios of morphine and its major metabolites. *Pain* **1998**, 74, 43-53
3. Fleming A. On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, 10, 226-236
4. Dias, D.A. ; Urban, S. ; Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2012**, 2, 303-336
5. Hoffmann, T. ; Krug, D. ; Hüttel, S. ; Müller, R. Improving natural products identification through targeted LC-MS/ MS in an untargeted secondary metabolomics workflow. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 10780-10788
6. Hashi, K. ; Ohki, S. ; Matsumoto, S. ; Nishijima, G. ; Goto, A. ; Deguchi, K. ; Yamada, K. ; Noguchi, K. ; Sakai, S. ; Takahashi, M. ; Yanagisawa, Y. ; Iguchi, S. ; Yamazaki, T. ; Maeda, H. ; Tanaka, R. ; Nemoto, T. ; Suematsu, H. ; Miki, T. ; Saito, K. ; Shimizu, T. Achievement of 1020 MHz NMR. *J. Magn. Reson.* **2015**, 256, 30-33
7. Stratton, C.F. ; Newman, D.J. ; Tan, D.S. Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 4802-4807
8. Mayer, A.M. ; Glaser, K.B. ; Cuevas, C. ; Jacobs, R.S. ; Kem, W. ; Little, R.D. ; McIntosh, J.M. ; Newman, D.J. ; Potts, B.C. ; Shuster, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2010**, 31, 255-265
9. Gerwick, W.H. ; Moore, B.S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 85-98
10. Teichert, R.W. and Olivera, B.M., Natural products and ion channel pharmacology, *Future Med. Chem.*, **2010**, 2, 731-744
11. Hirata, Y. ; Uemura, D. Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure. Appl. Chem.* **1986**, 58, 701-710
12. Yeung, B.K., Natural product drug discovery: the successful optimization of ISP-1 and halichondrin B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 523-528
13. Zheng, W. ; Seletsky, B.M. ; Palme, M.H. ; Lydon, P.J. ; Singer, L.A. ; Chase, C.E. ; Lemelin, C.A. ; Shen, Y. ; Davis, H. ; Tremblay, L. ; Towle, M.J. ; Salvato, K.A. ; Wels, B.F. ; Aalfs, K.K. ; Kishi, Y. ; Littlefield, B.A. ; Yu, M.J. Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5551-5554
14. Scarpace, S.L. Eribulin mesylate (E7389): review of efficacy and tolerability in breast, pancreatic, head and neck, and non-small cell lung cancer. *Clin. Ther.* **2012**, 34, 1467-1473
15. Rinehart, K. ; Holt T.G. ; Fregeau, N.L. ; Stroh, J.G. ; Keifer, P.A. ; Sun, F. ; Li, L.H. ; Martin, D.G. ; Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent

- antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4512-4515
16. Galmarini, C.M. ; Incalci, M.D. ; Allavena, P. Trabectedin and plitidepsin: Drugs from the sea that strike the tumor microenvironment. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 719-733
 17. Belarbi, E.H. ; Gomez, A.C. ; Chisti, Y. ; Camacho, F.G. ; Grima, E.M. Producing drugs from marine sponges. *Biotech. Adv.* **2003**, 21, 585-598
 18. Osinga, R. ; Sidri, M. ; Cerig, E. ; Gokalp, S.Z. ; Gokalp, M. Sponge aquaculture trials in the east-mediterranean sea: new approaches to earlier ideas. *The Open Marine Biology Journal* **2010**, 4, 74-81
 19. Schmidt, E.W. ; Obratzsova, A.Y. ; Davidson, S.K. ; Faulkner, D.J. ; Haygood, M.G. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus* Entotheonella palauensis" . *Mar. Biol.* **2000**, 136, 969-977
 20. Amann, R. I. ; Ludwig, W. ; Schleifer, K. H. ; Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **1995**, 59, 143-169
 21. Trindade, M. ; Zyl, L. J. ; Fernández J.N. ; Elrazak, A.A. Targeted metagenomics as a tool to tap into marine natural product diversity for the discovery and production of drug candidates. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 890
 22. Milshteyn, A. ; Schneider, J.S. ; Brady S.F. Mining the metabiome: identifying novel natural products from microbial communities. *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1211-1223
 23. Iqbal, H.A. ; Feng, A. ; Brady, S.F. Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies. *Curr. Opin. Microbiol.* **2012**, 16, 109-116
 24. Leis, B. ; Angelov, A. ; Liebl, W. Screening and expression of genes from metagenomes. *Adv. Appl. Microbiol.* **2013**, 83, 1-68
 25. Nguyen, T.A. ; Ishida, K. ; Kodama, H. J. ; Dittmann, E. ; Gurgui, C. ; Hochmuth, T. ; Taudien, S. ; Platzer, M. ; Hertweck, C. ; Piel, J. Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 225-233
 26. Fieseler, L. ; Hentschel, U. ; Grozdanov, L. ; Schirmer, A. ; Wen, G. ; Platzer, M. ; Hrvatin, S. ; Butzke, D. ; Zimmermann. K. ; Piel, J. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Environ. Microbiol.* **2004**, 8, 921-927
 27. Beyer, S. ; Kunze, B. ; Silakowski, B. ; Müller, R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg al5 and a combined polyketide- (poly) peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce 90. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1445, 185-195
 28. Ginolhac, A. ; Jarrin, C. ; Gillet, B. ; Robe, P. ; Pujic, P. ; Tuphile, K. ; Bertrand, H. ; Vogel, T.M. ; Perrière, G. ; Simonet, P. ; Nalin, R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 5522-5527

29. Moffitt, M.C. ; Neilan, B.A. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J. Mol. Evol.* **2003**, 56, 446-457
30. King, R.W. ; Bauer, J.D. ; Brady, S.F. An environmental DNA-derived type II polyketide biosynthetic pathway encodes the biosynthesis of the novel pentacyclic polyketide, erdacin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 6257-6261
31. Feng, Z. ; Chakraborty, D. ; Dewell, S.B. ; Reddy, B.B. ; Brady, S.F. Environmental DNA-encoded antibiotics fasamycins A and B inhibit FabF in type II fatty acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 2981-2987
32. Chang, F.Y. ; Brady, S.F. Discovery of indolotryptoline antiproliferative agents by homology-guided metagenomic screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 2478-2483
33. Piel, J. ; Hui, D. ; Wen, G. ; Butzke, D. ; Platzer, M. ; Fusetani, N. ; Matsunaga, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 16222-16227
34. Brady, S.F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 1297-1305
35. Lorenz, P. ; Eck, J. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 510-516
36. Henne, A. ; Schmitz, R.A. ; Bömeke, M. ; Gottschalk, G. ; Daniel, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 3113-3116
37. Park, H.J. ; Jeon, J.H. ; Kang, S.G. ; Lee, J.H. ; Lee, S.H. ; Kim, H.K. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. *Protein Expr. Purif.* **2007**, 52, 340-347
38. Kim, Y.J. ; Choi, G.S. ; Kim, S.B. ; Yoon, G.S. ; Kim, Y.S. ; Ryu, Y.W. ; Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr. Purif.* **2006**, 45, 315-323
39. Pushpam, P.L. ; Rajesh, T. ; Gunasekaran, P. ; Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome. *AMB Express* **2011**, 1, 3
40. Prabavathi, R. ; Mathivanan, V. ; Ambika, A. Screening of protease enzyme by construction of metagenomic library from marine soil sediments. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, 3, 396-399
41. Lee, D.G. ; Jeon, J.H. ; Jang, M.K. ; Kim, N.Y. ; Lee, J.H. ; Kim, S.J. ; Kim, G.D. ; Lee, S.H. ; Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. *Biotechnol. Lett.* **2007**, 29, 465-472
42. Ono, A. ; Miyazaki, R. ; Sota, M. ; Ohtsubo, Y. ; Nagata, Y. ; Tsuda, M. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 74, 501-510
43. Miyazaki, R. ; Sato, Y. ; Ito, M. ; Ohtsubo, Y. ; Nagata, Y. ; Tsuda, M. Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid, pLB1, involved in γ -Hexachlorocyclohexane degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 6923-6933
 44. Suenaga, H. ; Ohnuki, T. ; Miyazaki, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ. Microbiol.* **2007**, 9, 2289-2297
 45. Yang X. L., Wakimoto, T. ; Takeshige, Y. ; He, R. ; Egami, Y. ; Awakawa, T. ; Abe, I. Indole-porphyrin hybrids produced by metagenomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 3810-3813
 46. Clardy, J. ; Brady S.F. Cyclic AMP directly activates NasP, an *N*-Acyl amino acid antibiotic biosynthetic enzyme cloned from an uncultured β -Proteobacterium. *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 6487-6489
 47. Wang, G.Y.S. ; Graziani, E. ; Waters, B. ; Pan, W. ; Li, X. ; McDermott, J. ; Meurer, G. ; Saxena, G. ; Andersen, R.J. ; Davies, J. Novel natural products from soil DNA libraries in a Streptomycete host. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2401-2404
 48. Brady, S.F. ; Chao, C.J. ; Handelsman, J. ; Clardy, J. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1981-1984
 49. Guan, C. ; Ju, J. ; Borlee, B.R. ; Williamson, L.L. ; Shen, B. ; Raffa, K.F. ; Handelsman, J. Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 3669-3676
 50. Lim, H.K. ; Chung, E.J. ; Kim, J.C. ; Choi, G.J. ; Jang, K.S. ; Chung, Y.R. ; Cho, K.Y. ; Lee, S.W. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers Indirubin and Indigo production on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 7768-7777
 51. Brady, S.F. ; Clardy, J. Synthesis of long-chain fatty acid enol esters isolated from an environmental DNA clone. *Org. Lett.* **2003**, 5, 121-124
 52. Brady, S.F. ; Chao, C.J. ; Clardy, J. Long-chain *N*-acyltyrosine synthases from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 6865-6870
 53. Fujita, M.J. ; Kimura, N. ; Sakai, A. ; Ichikawa, Y. ; Hanyu, T. ; Otsuka, M. Cloning and heterologous expression of the vibrioferrin biosynthetic gene cluster from marine metagenomic library. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, 75, 2283-2287
 54. Fujita, M.J. ; Kimura, N. ; Yokose, H. ; Otsuka, M. Heterologous production of bisucaberin using a biosynthetic gene cluster cloned from a deep sea metagenome. *Mol. BioSyst.* **2012**, 8, 482-485
 55. Cohen, L.J. ; Kang, H.S. ; Chu, J. ; Huang, Y.H. ; Gordon, E.A. ; Reddy, B.V.B. ; Ternei, M.A. ; Craig, J.W. ; Brady, S.F. Functional metagenomic discovery of bacterial effectors in the human microbiome and isolation of commendamide, a GPCR G2A/132 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 4825-4834
 56. Powers, Z.C. ; Banik, J.J. ; Owen, J.G. ; Craig, J.W. ; Brady, S.F. Selective

- enrichment of environmental DNA libraries for genes encoding nonribosomal peptides and polyketides by phosphopantetheine transferase-dependent complementation of siderophore biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 138-143
57. Brady, S.F.; Clardy, J. Cloning and heterologous expression of isocyanide biosynthetic genes from environmental DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 7063-7065
 58. Courtois, S.; Cappellano, C.M.; Ball, M.; Francou, F.X.; Normand, P.; Helynck, G.; Martinez, A.; Kolvek, S.J.; Hopke, J.; Osburne, M.S.; August, P.R.; Nalin, R.; Guérineau, M.; Jeannin, P.; Simonet, P.; Pernodet, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 49-55
 59. Hentschel, U.; Piel, J.; Degnan, S.M.; Taylor, M.W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, 10, 641-654.
 60. Taylor, M.W.; Hill, R.T.; Piel, J.; Thacker, R.W.; Hentschel, U. Soaking it up: the complex lives of marine sponges and their microbial associates. *ISME J.* **2007**, 1, 187-190
 61. Vogel, G. The inner lives of sponges. *Science* 2008, 320, 1028-1030
 62. Brantley, S.E.; Molinski, T.F.; Preston, C.M.; DeLong, E.F. Brominated acetylenic fatty acids from *Xestospongia* sp., a marine sponge bacteria association. *Tetrahedron* **1995**, 51, 7667-7672
 63. Winder, P.L.; Pomponi, S.A.; Wright, A.E. Natural products from the Lithistida: A review of the literature since 2000. *Mar. Drugs*, **2011**, 9, 2643-2682
 64. Fukuhara, K.; Takada, K.; Okada, S.; Matsunaga, S. Nazumazoles A-C, cyclic pentapeptides dimerized through a disulfide bond from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Org. Lett.* **2015**, 17, 2646-2648
 65. Festa, C.; Marino S.D.; Sepe V.; Monti, M.C.; Luciano, P.; Dauria M.V. Perthamides C and D, two new potent anti-inflammatory cyclopeptides from a Solomon Lithistid sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron* **2009**, 65, 10424-10429
 66. Festa, C.; Marino, S.D.; Sepe, V.; Dauria, M.V.; Bifulco, G.; Debitus, C. Solomonamides A and B, new anti-inflammatory peptides from *Theonella swinhoei*. *Org. Lett.* **2011**, 13, 1532-1535
 67. Marino S. D.; Festa, C.; Dauria, M.V.; Cresteil, T.; Debitus, C.; Zampella, A. A potent cytotoxin from the marine sponge *Theonella swinhoei*, *Mar. Drugs* **2011**, 9, 1133-1141
 68. Festa, C.; Marino, S.D.; Dauria, M.V.; Bifulco, G.; Renga, B.; Fiorucci, S. Solomosterols A and B from *Theonella swinhoei*. The first example of C-24 and C-23 sulfated sterols from a marine source endowed with a PXR agonistic activity. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 401-405
 69. Marino, S.D.; Ummarino, R.; Dauria, M.V.; Chini, M.G.; Bifulco, G.; Renga, B. Theonellasterols and conicasterols from *Theonella swinhoei*, Novel marine natural ligands for human nuclear receptors. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3065-3075
 70. Marino S.D.; Ummarino, R.; Dauria, M.V.; Chini, M.G.; Bifulco, G.; Damore, C.

- 4-Methylenesterols from *Theonella swinhoei* sponge are natural pregnane-X-receptor agonists and farnesoid-X-receptor antagonists that modulate innate immunity. *Steroids* **2012**, 77, 484-495
71. Wilson, M.C. ; Mori, T. ; Rückert, C. ; Uria, A.R. ; Helf, M.J. ; Takada, K. ; Gernert, C. ; Steffens, U.A. ; Heycke, N. ; Schmitt, S. ; Rinke, C. ; Helfrich, E.J. ; Brachmann, A.O. ; Gurgui, C. ; Wakimoto, T. ; Kracht, M. ; Crüsemann, M. ; Hentschel, U. ; Abe, I. ; Matsunaga, S. ; Kalinowski, J. ; Takeyama, H. ; Piel, J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **2014**, 506, 58-62.
 72. Freeman, M.H. ; Vagstad, A.L. ; Piel, J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated 'Entotheonella' bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, 31, 8-14
 73. Döderlein, L. Studien an japanischen Lithistiden, *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* **1884**, 40, 62-104
 74. Kato, Y. ; Fusetani, N. ; Matsunaga, S. ; Hashimoto, K. Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2780-2781
 75. Fagerholm, A.E. ; Habrant, D. ; Koskinen, A.M.P. Calyculins and related marine natural products as serine-threonine protein phosphatase PP1 and PP2A inhibitors and total syntheses of calyculin A, B and C. *Mar. Drugs* **2010**, 8, 122-172
 76. Kato, Y. ; Fusetani, N. ; Matsunaga, S. ; Hashimoto, K. Calyculins, potent antitumor metabolites from the marine sponge *Discodermia*. *Calyx: Biological activities. Drugs Exptl. Clin. Res.* **1988**, 14, 723-728
 77. Matsunaga, S. ; Fujiki H. ; Sakata, D. Calyculins E, F, G and H. Additional inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron* **1991**, 41, 2999-3006
 78. Kimura, M. ; Wakimoto, T. ; Abe, I. Allos-hemicalyculin A, a photochemically converted calyculin from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 114-116
 79. Egami, Y. ; Wakimoto T. ; Abe, I. Phosphocalyculin C as a pyrophosphate protoxin of calyculin C in the marine sponge *Discodermia calyx*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 5150-5153
 80. Nakao, Y. ; Takada, K. ; Matsunaga, S. ; Fusetani, N. Calyceramides A-C: neuraminidase inhibitory sulfated ceramides from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron* **2001**, 57, 3013-3017
 81. Kimura, M. ; Wakimoto, T. ; Egami, Y. ; Tan, K.C. ; Abe, I. Calyxamides A and B, cytotoxic cyclic peptides from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 290-294
 82. Shinde, P.B. ; Mansoor, T.A. ; Luo, X. ; Hong, J. ; Lee, C.O. ; Jung, J.H. Cytotoxic polyketides from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, 28, 990-994
 83. Jung, J.H. ; Shinde, P.B. ; Hong, J. ; Liu, Y. ; Sim, C.J. Secondary metabolites from

- a marine sponge *Discodermia calyx*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, 35, 48-51
84. 東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室 江上蓉子博士論文より参照
 85. Horiuchi, K.; Adachi, K.; Fujise, Y.; Naruse, H.; Sumimoto, K.; Kanayama, N.; Terao, T. Isolation and characterization of zinc coproporphyrin I: a major fluorescent component in meconium. *Clin. Chem.* **1991**, 37, 1173-1177
 86. Toriya, M.; Yaginuma, S.; Murofushi, S.; Ogawa, K.; Muto, N.; Hayashi, M.; Matsumoto, K. Zincphyrin, a novel coproporphyrin III with zinc from *Streptomyces* sp. *J. antibiot.* **1993**, 46, 196-200
 87. Anttila, J.; Heinonen, P.; Nenonen, T.; Pino, A.; Iwaï, H.; Kauppi, E.; Soliymani, R.; Baumann, M.; Saksi, J.; Suni, N.; Haltia, T. Is coproporphyrin III a copper-acquisition compound in *Paracoccus denitrificans*? *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2011**, 1807, 311-318
 88. Kim, J.S.; Lim, H.K.; Lee, M.H.; Park, J.H.; Hwang, E.C.; Moon, B.J.; Lee, S.W. Production of porphyrin intermediates in *Escherichia coli* carrying soil metagenomic genes, *FEMS Microbiol. lett.* **2009**, 295, 42-49
 89. Mauzerall, D.C. Evolution of porphyrins, *Clin. Dermatol.* **1998**, 16, 195-201
 90. Schubert, W.D.; Moser, J.; Schauer, S.; Heinzl, D.W.; Jahn, D. Structure and function of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and prokaryotes, *Photosynth. Res.* **2002**, 74, 205-215
 91. Jaffe, E.K. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism, *Bioorg. Chem.* **2004**, 32, 316-325
 92. Anderson, P.M.; Reddy, R.M.; Anderson, K.E.; Desnick, R.J. Characterization of the Porphobilinogen deaminase deficiency in acute intermittent Porphyria, *J. Clin. Invest.* **1981**, 68, 1-12
 93. Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I, *Chemosphere* **2009**, 75, 417-434
 94. Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II, *Chemosphere* **2009**, 75, 435-441
 95. Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74, 417-433
 96. Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, 13, 42-51
 97. Edward J. Bottone, *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23, 382-398
 98. Stull, T.L.; Hyun, L.; Sharetzsky, C.; Wooten, J.; McCauley, J.P.; Smith, A. B. Production and oxidation of indole by *Haemophilus influenza*, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 5-8
 99. Kobayashi, M.; Aoki, S.; Matsunami, K.; Kurosu, M.; Kitagawa, I. Marine natural products. XXXIV. Trisindoline, a new antibiotic indole trimer, produced by a bacterium of *Vibrio* sp. separated from the marine sponge *Hyrtios altum*. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 2449-2451
 100. Budzikiwicz, H.; Eckau, H. Bis (3-indolyl)-indolyliden-methane, Ein von *Saccharomyces cerevisiae* gebildeter farbstoff. *Tetrahedron lett.* **1972**, 36,

101. Sintchak, M.D. ; Nimmesgern, E. The structure of inosine 5' -monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* **2000**, 47, 163-184
102. Sintchak, M.D. ; Fleming, M.A. ; Futer, O. ; Raybuck, S.A. ; Chambers, S.P. ; Caron, P.R. ; Murcko, M.A. ; Wilson, K.P. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell* **1996**, 85, 921-930
103. Daly, R. ; Hearn, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering. *J. Mol. Recognit.* **2005**, 18, 119-138
104. Lee, J.H. ; Lee, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, 34, 426-444
105. Gillespie, D.E. ; Brady, S.F. ; Bettermann, A.D. ; Cianciotto, N.P. ; Liles, M.R. ; Rondon, M.R. ; Clardy, J. ; Goodman R.M. ; Handelsman, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 4301-4306
106. Moran, G.R. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 433, 117-128
107. Blokhina, O. ; Virolainen, E. ; Fagerstedt, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* **2003**, 91, 179-194
108. Wolf, G. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *J. Nutr.* **2005**, 135, 363-366
109. Catni, C. ; Peters, A. ; Schaefer, H.M. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Anim. Behav.* **2008**, 76, 1107-1119
110. Alam, M.N. ; Bristi, N.J. ; Rafiquzzaman, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal* **2013**, 21, 143-152
111. Fujioka, N. ; Ainslie-Waldman, C.E. ; Upadhyaya, P. ; Carmella, S.G. ; Fritz, V.A. ; Rohwer, C. ; Fan, Y. ; Rauch, D. ; Le, C. ; Hatsukami, D.K. ; Hecht, S.S. Urinary 3,3' -Diindolylmethane: A biomarker of glucobrassicin exposure and indole-3-carbinol uptake in humans, *Cancer Epidem. Biomar.* **2014**, 23, 282-287
112. Belin, P. ; Moutiez, M. ; Lautru, S. ; Seguin, J. ; Pernodet, J.L. ; Gondry, M. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 961-979
113. Gu, B. ; He, S. ; Yan, X.J. ; Zhang, L. Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 8439-8453
114. Lautru, S. ; Gondry, M. ; Genet, R. ; Pernodet, J.L. The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1355-1364
115. Vetting, M.W. ; Hegde, S.S. ; Blanchard, J.S. The structure and mechanism of the

- Mycobacterium tuberculosis* cyclodityrosine synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 797-799
116. Starczewska, B. ; Halaburda, P. ; Kojlo, A. Studies and analytical application of reaction of imipramine with chrome azurol S. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2002**, 30, 553-560
 117. Milagres, A.M.F. ; Machuca, A. ; Napoleao, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Meth.* **1999**, 37, 1-6
 118. Truong, L. ; Hevener, K.E. ; Rice, A. J. ; Patel, K. ; Johnson, M.E. ; Lee, H. High-level expression, purification, and characterization of *Staphylococcus aureus* dihydroorotase (PyrC) as a cleavable His-SUMO fusion. *Protein Expres. Purif.* **2013**, 88, 98-106
 119. Guillou, F. ; Rubino, S.D. ; Markovitz, R. S. ; Kinney, D.M. ; Lusty, D.J. *Escherichia coli* carbamoyl-phosphate synthetase: Domains of glutaminase and synthetase subunit interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 8304-8308
 120. Aitken, D.M. ; Bhatti, A.R. ; Kaplan, J.G. Characterization of the aspartate carbamoyltransferase subunit obtained from a multienzyme aggregate in the pyrimidine pathway of yeast. Activity and physical properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **1973**, 309, 50-57
 121. Garcia, A.G. ; Lallous, N. ; Tejada, C.D. ; Maiques, S.R. Structure, functional characterization, and evolution of the dihydroorotase domain of human CAD. *Structure* **2014**, 22, 185-198
 122. Vaillancourt, F.H. ; Bolin, J.T. ; Eltis, L.D. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **2006**, 41, 241-267
 123. McMahon, M.D. ; Guan, C. ; Handelsman, J. ; Thomas, M.G. Metagenomic analysis of *Streptomyces lividans* reveals host-dependent functional expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 3622-3629
 124. Craig, J.W. ; Chang, F.Y. ; Brady, S.F. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chem. Biol.* **2009**, 1, 23-28
 125. Iqbal, H.A. ; Craig, J.W. ; Brady, S.F. Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, 354, 19-26
 126. Mullany, P. Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence* **2014**, 5, 443-447

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なご指導を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室教授 阿部郁朗先生に深甚なる謝意を申し上げます。時に厳しく指導して下さいましたこの5年間は私にとって一生の財産になると感じています。

様々な天然資源からの単離抽出や構造決定等、全ての実験において指導して下さいました、北海道大学大学院薬学研究院 天然物化学教室教授 脇本敏幸先生には本当にお世話になりました。脇本先生には海綿動物の面白さ、精密に実験を行う難しさを教えていただき、最後まで真摯に向き合って下さりました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院薬学系研究科 有機反応化学教室 井上将行先生、薬品代謝化学教室 浦野泰照先生、薬化学教室 大和田智彦先生には、本論文執筆にあたって、貴重なご助言を多く頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究のメタゲノムライブラリの構築、及びクローニング実験において多くのアドバイスを頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 天然物化学教室助教 江上蓉子先生に感謝申し上げます。

東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室助教 森貴裕先生には公私に限らず様々な面でお世話になりました。また、博士課程を続ける上で、私に近い立ち位置で多くのアドバイスを頂きました。深く感謝致します。

東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室助教 松田侑大先生にも、修士課程の頃より様々なご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

サブクローニング実験で多くの御助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室助教 淡川孝義先生に深く感謝致します。

研究の指導を賜るとともに、研究における様々な心構えを示して頂いた富山大学和漢医薬学総合研究所・資源開発研究部門天然物化学分野教授 森田洋行先生に厚く御礼を申し上げます。

また、所属していた天然物化学教室の皆様には本当にお世話になりました。先輩方、後輩達が皆優秀な方でしたので、机を並べて実験に取り組む事で非常に良い経験になったと感謝しております。皆様の今後の素晴らしいご発展をお祈りしております。

最後に、実家から遠い東京での生活にも関わらず、5年間の研究生活を経済的にも精神的にも支えて頂いた父 秀敏、母 美佐子、姉 綾香、並びに竹重家、西家の祖父母に心から感謝致します。

また、村上家の皆様には博士課程在学中に家族同様に親身に接して下さい、私にとって本当に大きな支えになりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

平成 28 年 3 月

竹重 勇哉