

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

著者	竹重 勇哉
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073865

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 竹重 勇哉

【序論】

単離培養可能な微生物の数は、環境中に存在する微生物の総数より大幅に少ない事が指摘されている。実際、微生物のうち 99.9%は難培養性である事が報告されており、従来の実験室環境下の培養に依存した方法では膨大な生物資源のほとんどを利用出来ない事になる。近年、これまで見過ごされてきた有用遺伝子資源を物質生産へと活用する技術として、環境中から微生物を単離する事なく直接 DNA を抽出し、大腸菌等の培養可能な宿主に導入後、利用・解析するメタゲノム法が注目を浴びている。そこで本研究では、未開拓な微生物資源の有効利用の為、大腸菌を宿主としたメタゲノムライブラリを構築し、有用な活性化合物の探索、及び活性に関与する機能発現遺伝子の同定を試みた。

また、メタゲノムライブラリのスクリーニング手法として、既知酵素の塩基配列に基づく探索手法 (sequence-based screening) ではなく、抗菌活性や色素産生試験等の宿主内で生産される化合物の生物活性や物性を指標とした手法 (function-based screening) を用いた。

【本論】

1. メタゲノムライブラリの構築、及びスクリーニング系の適用

メタゲノムライブラリ構築の資源として、海綿動物に着目した。海綿動物は最も原始的な多細胞動物に位置付けられ、多様な二次代謝産物を生産する事が知られている。それと同時に、海綿中には豊富な微生物が共生している事が知られており、多い物では海綿重量の 40%が共生微生物であるといった報告もある。その為、海綿動物はメタゲノムライブラリの構築に最適な資源と言える。そこで、強力な細胞毒性を有する calyculin 類等の多様な二次代謝産物が報告されている海綿 *Discodermia calyx* を資源としたメタゲノムライブラリ構築を試みた。海綿メタゲノムを抽出後、Fosmid ベクターへと組み込む事でプラスミド構築を行い、大腸菌を宿主としたライブラリ構築を試みた結果、約 35 kbp の海綿及びその共生微生物由来の断片を有するメタゲノムライブラリ (2.5×10^5 cfu) の構築に成功した。

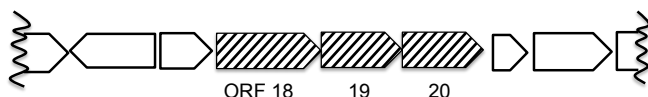
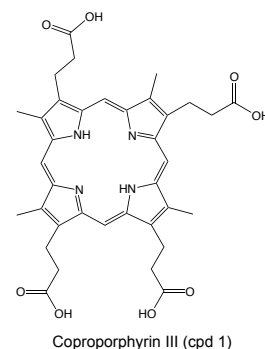
また、構築したメタゲノムライブラリを用いて、種々のスクリーニング系への適用を図った。適用したスクリーニング系 (抗菌、抗酸化、色素産生、カテコール分解、鉄キレート活性試験) をメタゲノムライブラリに対して行った結果、各試験系において陽性を示すクローンを見出だした。

2. 色素産生試験における化合物、遺伝子の同定

これらのうち、色素産生試験においてはプレート上で赤色を示すクローンが得られた。その為、液体培地にて大量培養し、コントロールと比較して新たに生産が確認された化合物の単離を試みた。結果、赤色色素である coproporphyrin III (1) を含む porphyrin 系化合物 4 種を同定した。

本化合物が挿入されたメタゲノム DNA によって生産されているかを確認する為、次世代シーケンサーを用いて挿入遺伝子配列の解読を行った結果、全長 40 kbp の遺伝子配列解読に成功した。得られた遺伝子情報に対して、BLAST を利用した相同性検索を行った所、計 31 個の推定 ORF が含まれている事を明らかにし、その中には、glutamyl-tRNA reductase や porphobilinogen deaminase 等の porphyrin 生合成に関与する遺伝子群が含まれている事が判明した (Figure 1)。

従って、メタゲノムライブラリを用いた function-based screening が有効な機能発現遺伝子探索手法の一つである、と示す事が出来たとと言える。



ORF	aa	Predicted function	Identity
18	420	glutamyl-tRNA reductase [<i>Thermodesulfator indicus</i>]	49
19	322	hemC-porphobilinogen deaminase [<i>endosymbiont of Riftia pachytila</i>]	49
20	322	hemB-porphobilinogen synthase [<i>Thermodesulfator indicus</i>]	65

Figure 1. 色素産生クローンに挿入された遺伝子と相同性検索結果

3. 抗菌活性化合物、及び関連遺伝子の同定

興味深い事に、先述した色素を生産するクローンは *Bacillus cereus* に対する抗菌活性試験においても陽性を示した事から、本クローンが porphyrin 系化合物以外に抗菌活性物質の生産も行っていると推察された。そこで、得られたクローン培養液より、*B. cereus* に対する抗菌活性を指標として活性化合物の単離・同定を試みた。Diaion HP-20、ODS、Silica gel、最終的に HPLC を用いて順次精製を行った結果、2 種のインドール化合物、2,2-di(3-indolyl)-3-indolone (**5**) 及び turbomycin A (**6**) を抗菌活性化合物として同定した。

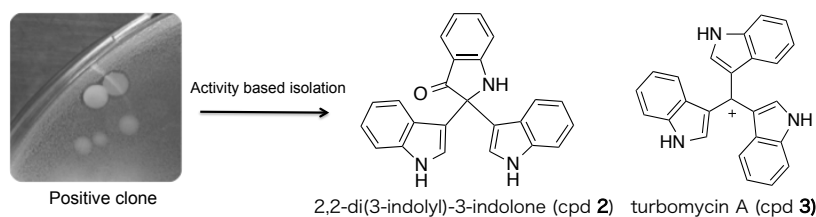


Figure 2 抗菌活性試験を基に単離された化合物

これらは *B. cereus* に対して抗菌活性を有する化合物として報告されていたが、その生合成知見に関して報告が少ない。そこで、挿入されている遺伝子をサブクローニングによって分割し、本化合物の生産に関与する遺伝子の同定を試みた。先述した次世代シーケンサーによって得られた全長 40 kbp を 4 断片に分け、各断片のクローニングを行った。得られた各クローンの培養液を単離スキームに基づいて分離し、LC-MS 解析によって化合物の生産確認を行った。結果、4 種のうち 1 種のサブクローン培養液にのみ、**5** の生産が確認された。このクローンには、3 種の ORF (ORF 24-26) が挿入されていた為 (Figure 3a)、次いで各 ORF 単独発現時の活性化合物の生産確認を試みた所、3 種の ORF のうち、inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPD) と 67% の相同性を示す遺伝子 ORF 25 が組み込まれたクローンの培養液中にのみ、**5** の生産を確認した (Figure 3b 中段)。

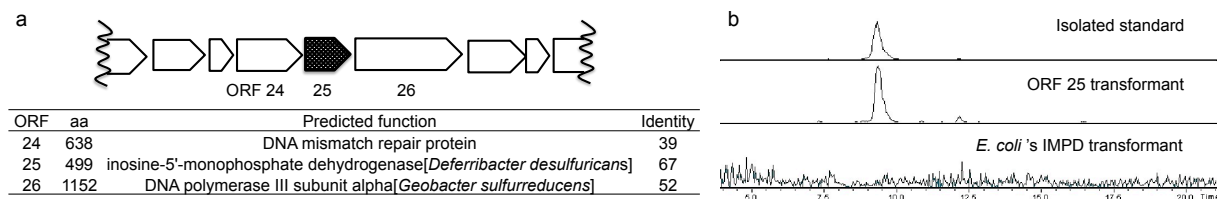


Figure 3. cpd 5 の生産に関与する遺伝子とサブクローニングの結果

IMPD は本来、 NAD^+ 依存的に inosine-5'-monophosphate から xanthosine-5'-monophosphate へと酸化反応を行うプリン体の *de novo* 合成酵素である。このことから、大腸菌一次代謝系へのプリン体蓄積により 5 が間接的に生産される生合成経路が想定された為、大腸菌 BL21 株由来 IMPD を過剰発現させる系を構築して化合物生産の確認を行った。しかしながら、この系においては 5 の生産は確認されなかった (Figure 3b 下段)。従って、5 は ORF 25 の生合成に直接的に関与していると示唆された。

【総括】

本研究では海綿由来のメタゲノムライブラリを構築し、種々の生物活性試験を指標としたスクリーニングを行う事で、各試験系に対して陽性を示すクローン、生物活性化合物、及びその生合成酵素を見出だした。なお、メタゲノムライブラリを用いた抗酸化活性試験の確立、及び抗酸化活性物質の単離・構造決定は、本研究が初めての報告例である。

メタゲノムライブラリを用いた function-based screening を行う事で、これまで利用出来なかった探索資源を選択する事が可能となった。また、様々なスクリーニング手法を導入する事で、多様な生物活性物質の獲得や機能発現遺伝子の同定が期待される。

以上の様に、活性試験に対して陽性を示すクローンが得られた場合、「生物活性化合物・化合物生産に関与する遺伝子・その遺伝子の塩基配列」という生化学的に重要な3つの要素を一挙に手に入れる事が可能となる (Figure 4)。その為、メタゲノムライブラリを用いた function-based screening が新たな生物活性化合物の発見や、生合成酵素、機能発現遺伝子の同定の為に有効な手法であると言える。

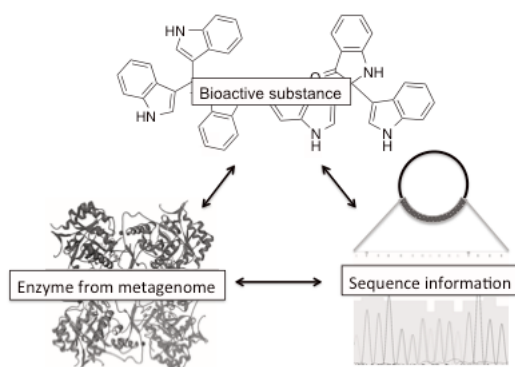


Figure 4. function-based screening の利点