

審査の結果の要旨

氏名 竹重 勇哉

環境中には莫大な数の微生物が存在しているが、これらのうち、実験室環境下で培養可能な微生物の割合は非常に少ない事が近年知られている。実際、微生物のうち 99.9%は難培養性であると報告されており、従来の培養法では膨大な生物資源のほとんどを利用出来ていない。その為、これまで見過ごされてきた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、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。

そこで本研究において竹重は、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。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。

第 1 章において竹重は、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。

また各章の中で、構築したメタゲノムライブラリを用いて多様なスクリーニング系 (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い、各試験系において陽性を示すクローンを見出だした。

このうち第 2 章にて竹重は色素産生試験を行い、プレート上で赤色を示すクローンが獲得した。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を明らかにした。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言える。

また、第 3 章において竹重は、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す事を発見し、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した。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・同定を試みた所、2種のインドール化合物、2,2-di(3-indolyl)-3-indolone 及び turbomycin A を抗菌活性化合物として同定した。

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、2 の生産を確認した。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、2 の生産を確認した。

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。この事から、大腸菌一次代謝系へのプリン体蓄積により 2 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 2 の生産は確認されなかった。従って、2 は ORF 25 の生合成に直接的に関与していると示唆された。以上の事から、竹重は第 3 章において抗菌活性試験を指標としたスクリーニングを行い、メタゲノム遺伝子の影響から大腸菌中にて新たな化合物の代謝系を構築する事に成功した。

本研究で竹重は、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。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、本研究が初の達成例となる。

以上の様に竹重の研究では、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。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。