

審査の結果の要旨

氏名 二宮 章洋

Streptomyces 属放線菌からは数千に及ぶ二次代謝産物が報告されているが、それらの生産者における生理機能が明らかになっているものは極めて少ない。一般的に環境中の微生物の生育を抑制すると考えられている抗生物質でさえ、実際に生産者が生育する環境中に、他の微生物に対して有効な濃度で存在しているか定かではないため、生理機能は不明である。

制がん活性を示す化合物を探索する過程で、海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 の抽出物中に新規化合物スルガミド A-E を発見した。当該放線菌株の培養液から数段階のクロマトグラフィーによる精製を経て、スルガミド A-E を得た。HR-ESIMS および NMR スペクトルを解析することで、スルガミド A-E の平面構造を決定した。スルガミド A-E は環状オクタペプチドであり、スルガミド B-E はスルガミド A に含まれる 4 つの Ile のうちいずれか 1 つが Val に置換した構造を有していた。スルガミド A-E はがんの浸潤と転移において重要な機能をもつ酵素カテプシン B の阻害活性を示した。

スルガミド A-E は、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成され、アデニル化ドメイン (A-ドメイン) の低い基質選択性により Ile から Val への置換が生じると考えた。そこで、次世代シーケンサーを用いて JAMM992 株のゲノム配列を解析した後、antismash を用いてゲノム中に含まれる二次代謝産物の生合成遺伝子を網羅的に探索したスルガミド A の生合成遺伝子を同定する一方、隣接する遺伝子が生産するスルガミド F を同定しその構造を決定した。

先述した遺伝子情報を基に、生合成遺伝子の破壊実験をおこなったところ、スルガミド A と F はいずれも生産菌の気中菌糸形成に関与することが明らかになった。スルガミド A と F の生産量と菌体の乾燥重量を経時的に測定したところ、スルガミド A と F は対数増殖期中に生産が誘導されることが示された。次に、スルガミド A の、気中菌糸形成誘導における標的分子を明らかにすることとした。スルガミド A が、プロテアーゼであるカテプシン B に対する阻害活性を示すことから、スルガミド A が生産菌自身のプロテアーゼに作用して気中菌糸形成を促進する可能性に着目した。*Streptomyces* 属放線菌は細胞外に様々なプロテアーゼを分泌し、これらが放線菌の増殖と形態分化に関与することが知

られている。そこで、培地中に放出された菌体外プロテアーゼに対するスルガミド A の作用を調べたところ、スルガミド A によって、メタロプロテアーゼ活性が上昇することが示された。メタロプロテアーゼは *Streptomyces* 属放線菌において気中菌糸の形成に関与するとの報告があることから、申請者は、スルガミド A がメタロプロテアーゼの活性化を通して生産菌の気中菌糸形成を促進するという仮説を立てた。スルガミド生産株の培養上清から調製した粗酵素を精製し、メタロプロテアーゼ (SJAP) を得た。プロテインシーケンサーを用いて決定した SJAP の N 末端配列を、スルガミド生産株のゲノム配列に対して検索し、SJAP をコードする遺伝子 *sja* を同定した。SJAP の組換えタンパク質を用いて酵素試験をおこなった結果、スルガミド A が組換え SJAP を活性化することが確認できた。さらに、Biacore を用いた相互作用解析により、スルガミド A と組換え SJAP が相互作用することが明らかになった。以上の結果から、スルガミド A は、分泌型プロテアーゼである SJAP を活性化する、という機構によって放線菌の形態分化を制御する可能性が示された。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。