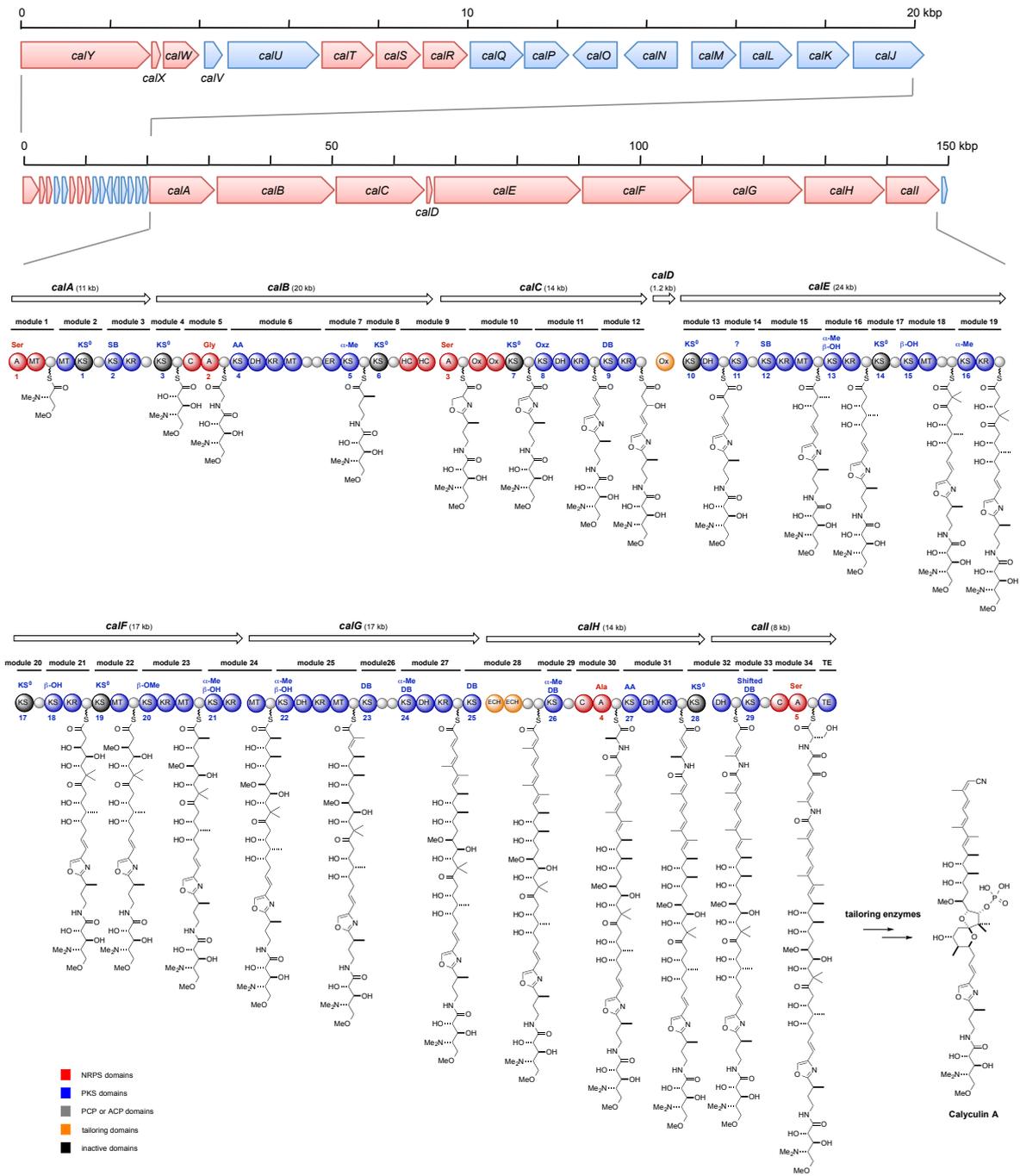


審査の結果の要旨

氏名 江上 蓉子

系統学的に最も原始的な多細胞生物として位置づけられる海綿動物は、多様な生物活性物質の宝庫であり、抗がん剤のリード化合物として有望な二次代謝産物が数多く単離報告されてきた。しかしながら、天然資源からの量的確保には限りがあることから臨床応用まで進んだ例は数少ない。一方で、海綿を起源とする有用な生物活性物質の真の生産者は、海綿に共生する難培養性微生物であることが長年示唆されてきた。海綿由来生物活性物質の生産を担う微生物の同定および生合成機構の解明は、その有効利用・安定供給を目指す上で鍵となる。江上は、伊豆半島沿岸に生息するチョコガタイシカイメン *Discodermia calyx* に由来する脱リン酸化酵素阻害剤である calyculin A の生合成遺伝子を取得し、その遺伝子を有する共生微生物を探索することによって生産菌の同定を目指した。さらに、生合成遺伝子の解析過程で海綿 *D. calyx* における calyculin 類を利用した化学防御機構を新たに見出した。

海綿動物を起源とする生物活性物質の生合成研究は、世界中の大学や研究機関において遂行されてきたにも関わらず、生合成遺伝子を取得した例はわずかに数例である。その大きな理由の一つとして、生物活性物質の生産者として示唆されている海綿共生微生物の 99%以上が現在の技術では培養困難であるため、生産菌の単離・同定が難しいことが挙げられる。このため、二次代謝産物の生合成遺伝子の取得は共生微生物を含む海綿全体のメタゲノムからの探索に限られる。しかし、多種多様で複雑な微生物叢を構成する海綿メタゲノムから、候補となる遺伝子を探索することは容易ではない。江上は、calyculin A の構造と遺伝子配列の相関性を利用したメタゲノムマイニングを応用することにより、生合成遺伝子を探索した。Calyculin A の生合成酵素として予想された I 型 PKS (polyketide synthase) は、モジュールの構成から *cis*-AT 型と *trans*-AT 型に分類される。Calyculin A に認められる特徴的な β -branch 構造は、*trans*-AT 型 PKS に由来する傾向にあるため、目的の生合成酵素は *trans*-AT 型 PKS であると仮説を立てた。先行研究により、*trans*-AT 型 PKS の KS (ketosynthase) ドメインの配列と伸長基質となる生合成中間体の部分構造との間には相関性が認められることが報告されている。この *trans*-AT 型 PKS 特有の配列情報を基盤として KS ドメインの配列を足がかりに海綿メタゲノムライブラリーより calyculin A 生合成遺伝子を探索した。海綿 *D. calyx* メタゲノム DNA に含まれる KS ドメインを網羅的に解析し、calyculin PKS の一部として可能性のある配列を絞り出した後、メタゲノムライブラリーよりスクリーニングした。その結果、150 kb 以上におよぶ *cal* 遺伝子を取得した (Fig. 1)。*cal* 遺伝子には主に PKS および NRPS がコードされていた。配列情報を詳細に解析した結果、NRPS によって伸長されるアミノ酸、PKS にコードされている α 位のメチル化を担う MT (methyltransferase) ドメインの位置、KR (ketoreductase) ドメインのアミノ酸配列から推測可能な水酸基の立体化学、およびモジュール全体の並びなど、calyculin A の構造と良い相関を示していたことから、*cal* 遺伝子が calyculin A 生合成遺伝子であることが強く示唆された。



A; adenylation, ACP; acyl-carrier protein, C; condensation, DH; dehydratase, ECH; enoyl-CoA hydratase, ER; enoylreductase, HC; heterocyclization, KR; ketoreductase, KS; ketosynthase, MT; methyltransferase, Ox; oxidation, PCP; peptidyl-carrier protein, TE; thioesterase
 KS clades: KS⁰; nonelongating ketosynthase, DB; double bond, SB; single bond, Oxz; oxazole, AA; amino acid

Fig. 1 本研究で取得した *cal* 遺伝子と calyculin A 推定生合成経路

取得した *cal* 遺伝子にはイントロンが認められなかったことから、calyculin A の生産者はバクテリアであることが支持された。そこで、江上は海綿共生微生物から *cal* 遺伝子を有するバクテリアを探索することで calyculin A 生産者の特定を試みた。バクテリアを含む海綿懸濁液を用いて CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization) およびレーザーマイクロダイセクションによるシングルセル解析を行った。さらに 16S rRNA 解析を行い、candidate phylum ‘Tectomicrobia’ に属する共生微生物 ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. を calyculin A の生産菌として特定した。

次に、calyculin A 生合成に関わる修飾酵素の機能解析を遂行した。*cal* 遺伝子の配列情報から推測可能な PKS-NRPS 産物が calyculin A の骨格となるにはニトリルやスピロアセタール環の形成、リン酸基の付加など複数の修飾反応が起こることが予想された。そこで、*cal* 遺伝子の上流に見出された 3 種類のリン酸基転移酵素と配列相同性を示す CalM、CalP および CalQ を大腸菌にて異種発現後、*in vitro* における機能解析を行った。その結果、CalQ が calyculin A をリン酸化することを明らかにした。しかしながら、過去にこのような化合物の単離報告例はなく、それに加えて、生合成の最終産物として考えられていた calyculin A のリン酸化は予想外であった。そのため、海綿抽出物を再度精査した。様々な抽出方法により海綿に含まれる化合物を分析した結果、calyculin A と CalQ の酵素反応生成物と一致する化合物が生合成の最終産物であることを明らかにした。さらに、本化合物を単離・精製し、calyculin A のピロホスフェート体 phosphocalyculin A と構造決定した (Fig. 2)。

海綿における phosphocalyculin A の存在意義の解明を目指した。生物活性試験の結果、phosphocalyculin A の細胞毒性および PP2A に対する酵素阻害活性はいずれも calyculin A より減弱していた。さらに、海綿の組織傷害に応じて酵素依存的に phosphocalyculin A から calyculin A へ変換を生じることを明らかにした。これらの結果は、化学防御物質の前駆体として蓄えられた phosphocalyculin A が、外部から刺激や攻撃が加わった際に直ちに脱リン酸化され強力な細胞毒性物質である calyculin A に変換される「activated chemical defense」機構を支持している (Fig. 2)。海綿動物における本化学防御機構について、生合成遺伝子に基づく知見を初めて示した。

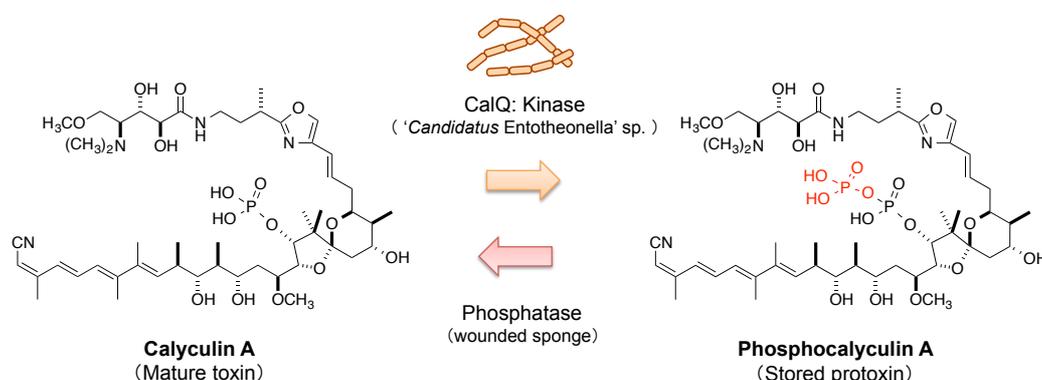


Fig. 2 本研究で見出した海綿 *D. calyx* における activated chemical defense 機構

本研究成果は、海綿メタゲノムから直接取得した遺伝子の配列をもとに生産菌の特定に成功した最初の事例であり、海綿由来医薬品リード化合物の生産菌を特定する上で有用な方法論を提示している。今後の生産菌の可培養化あるいは適切な異種発現系の開拓によって、希少生物資源である海綿由来有用天然物の供給法の確立に繋がることが期待される。また、*cal* 遺伝子の機能解析によって見出した海綿 *D. calyx* における **activated chemical defense** 機構は、海綿動物と微生物との共生関係における **calyculin A** のリン酸化を利用したクロストークの可能性を示唆しており、生態学的にも興味深い。以上のことより、博士論文に相応しい内容と判断した。