

氏名	加藤 翔		
博士の専攻分野の名称	博士 (学術)		
学位記号番号	博理工甲第 1156 号		
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 23 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Lucilactaene 生産糸状菌における二次代謝産物の生合成遺伝子と代謝産物の解析		
論文審査委員	委員長	連携教授	長田 裕之
	委員	教授	戸澤 譲
	委員	教授	小竹 敬久
	委員	教授	高橋 康弘

論文の内容の要旨

実験室環境下で生産される二次代謝産物はごく一部であり、多くの二次代謝遺伝子が休眠状態であり活用されていない二次代謝産物は多く残されている。これまでに様々な二次代謝の活性化手法が行われてきたが、これらの手法を発展させるためには新たな二次代謝の活性化手法が必要不可欠である。本研究では lucilactaene 生産菌における二次代謝産物の生産誘導および生合成遺伝子と代謝産物の解析を行った。

Lucilactaene は抗がんリード化合物として見出された二次代謝産物である。p53 温度感受性変異肺がん細胞においてのみ活性が報告されていたため、更なる生理活性の評価と構造活性相関に関するデータの取得に取り組んだ。Lucilactaene の生理活性を調べるべく、lucilactaene、NG-391、lucilactaene 脱メチル化体を精製し生物活性を評価した。その結果、lucilactaene は 0.056 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度で抗マラリア活性を示し、エーテル環の開環した NG-391 やカルボン酸のメチル基がない lucilactaene 脱メチル化体では活性が低くなることを明らかにした。これらの化合物はバクテリアや真菌に対して活性を示さなかった。これらの結果から、カルボキシル基のメチル化が活性に重要であることが示唆された。また、lucilactaene のエーテル環がマラリアに対する活性には非常に重要であることが示唆された。

Lucilactaene 生合成遺伝子クラスターの解析では、hygromycin B 選択による形質転換体の取得の際にプレートの赤色化が見られた。このことから、タンパク質合成阻害剤による二次代謝産物の生産誘導が考えられた。野生型株を hygromycin B を含むプレートで培養し代謝物を分析した結果、lucilactaene の生産が上昇していることが明らかとなった。大量培養を行い、赤色色素を精製し構造決定した結果、Fusarium 属が生産する二次代謝産物 fusarubin であることが明らかとなった。また、培養条件を変更したところ、新たに 1233A とその類縁体が hygromycin B によって生産誘導されることが明らかとなった。生産誘導された二次代謝産物の生理活性を調べた結果、lucilactaene と NG-391 は動物細胞とマラリア、fusarubin は動物細胞とグラム陽性細菌と真菌とマラリア、1233A は動物細胞とグラム陽性細菌とイネいもち病菌に対して生育阻害活性があることを見出した。

RNA-seq により hygromycin B 処理による二次代謝遺伝子群の変動を解析した。二次代謝産物生合成遺伝子クラスター中の基本骨格生合成に関与する遺伝子のうち hygromycin B 処理によって発現が 2 倍以上に

上昇した遺伝子は7つあり、その中に lucilactaene および fusarubin の基本骨格生合成遺伝子が含まれていた。発現上昇した基本骨格生合成遺伝子を含む No.3 生合成遺伝子クラスターに、1233A のターゲットとなる HMG-CoA 合成酵素の遺伝子が含まれていることが明らかとなった。No.3 内の 1233A 生合成遺伝子を破壊し代謝物を解析した結果、1233A とその類縁体の生産が確認されなくなった。これらの結果から 1233A 生合成遺伝子クラスターを同定した。1233A 生合成遺伝子クラスター中には HMG-CoA 合成酵素の遺伝子 (*g431*) が存在するが、クラスター外にも HMG-CoA 合成酵素の遺伝子 (*g6807*) が存在することが明らかとなった。この二つの HMG-CoA 合成酵素は 75% の相同性を示し、69% の類似性があった。また、活性に必要な部位が保存されていたことから、共に機能を持つ酵素であることが示唆された。*g431* を遺伝子破壊し、1233A に対する感受性を検討した結果、*g431* 破壊株では 1233A に対する感受性が上昇していた。この結果から、*g431* は 1233A に耐性を有することが示唆された。

本研究では lucilactaene 生合成遺伝子クラスターの解析から、タンパク質合成阻害剤 hygromycin B による二次代謝活性化の現象を見出した。Lucilactaene 生産菌において hygromycin B によって lucilactaene、fusarubin、1233A が遺伝子発現レベルで誘導されていることが明らかとなった。これらの二次代謝産物は様々な生物に対する生育阻害活性を有しており、中でも fusarubin が放線菌に対する増殖阻害活性を有していたことから、hygromycin B によって生育が阻害されたことによる防衛応答であることが示唆された。更に、未知であった 1233A の生合成遺伝子クラスターを同定し、遺伝子クラスター中に自己耐性に関与することが示唆される HMG-CoA 合成酵素遺伝子を見出した。

論文の審査結果の要旨

本学位論文の審査委員会は、当該論文の発表会を令和2年2月17日に理学部3号館にて開催し、詳細な質疑をもとに論文内容を審査した。以下に、学位論文の審査結果を要約する。

本論文は lucilactaene 生産糸状菌における二次代謝産物の生合成遺伝子と代謝産物の解析についてまとめたものである。実験室環境下で利用できる二次代謝産物はごく一部であり、多くの二次代謝生合成遺伝子が休眠状態であり活用されていない二次代謝産物は多く残されている。これまでに様々な二次代謝の活性化手法が行われているが、本手法を発展させるためには新たな二次代謝の活性化手法が必要不可欠である。本研究では lucilactaene 生産菌における二次代謝産物の生合成遺伝子と代謝産物の解析を行った。

第一章では、lucilactaene の生合成遺伝子と生物活性を解析した。lucilactaene は抗がんリード化合物として見出された二次代謝産物である。p53 不活性化温度感受性変異肺がん細胞においてのみ活性が報告されていたため、更なる生理活性の探索と構造活性相関に取り組んだ。lucilactaene 生合成遺伝子クラスター中に含まれるメチル基転移酵素遺伝子 *lucI* を破壊した株から、新たなピークが確認された。それを精製し構造解析した結果、カルボン酸末端となった lucilactaene 脱メチル化体であることが明らかとなった。lucilactaene の生理活性を調べるべく、lucilactaene、NG-391、lucilactaene 脱メチル化体を精製し生物活性を評価した。その結果、lucilactaene は 0.056 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低濃度で抗マラリア活性を示し、エーテル環の開環した NG-391 やカルボン酸のメチル基がない lucilactaene 脱メチル化体では活性が低くなることを明らかにした。これらの化合物はバクテリアや真菌に対して活性を示さなかった。以上の結果から、lucilactaene はいくつかのがん細胞やマラリア原虫に対して増殖阻害活性を示すことが明らかとなった。構造活性相関よりカルボキシル基のメチル化が活性に重要であることが示唆された。また、lucilactaene のエーテル環がマラリアに対する活性には非常に重要であることが示唆された。

第二章では、hygromycin B による二次代謝の活性化について解析した。lucilactaene 生合成遺伝子クラスターの解析に、タンパク質合成阻害剤 hygromycin B を形質転換体のセレクションマーカーとして用いていた。その際にいくつかの形質転換体においてプレートの赤色化が観察された。このことから、タンパク質合成阻害剤による二次代謝産物の生産誘導が考えられた。野生型株に対し hygromycin B を含むプレートで培養し代謝物を分析した結果、lucilactaene の生産が上昇していることが明らかとなった。大量培養により赤色色素を精製し構造決定した結果、*Fusarium* 属糸状菌が生産する二次代謝産物 fusarubin であることが明らかとなった。また、培養条件を変更したところ、新たに糸状菌の二次代謝産物である 1233A と 1233B が hygromycin B によって生産誘導されることが明らかとなった。生産誘導された二次代謝産物の生理活性を調べた結果、fusarubin と 1233A はいくつかの微生物及び動物細胞に対して生育阻害活性を示すことを明らかにした。

第三章では、hygromycin B で生産誘導される二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターについて解析した。まず、hygromycin B が遺伝子発現レベルで二次代謝産物を生産誘導しているか明らかにすべく RNA-seq 解析を行った。その結果、hygromycin B によって発現が上昇した二次代謝産物生合成の鍵遺伝子は7つあり、その中に lucilactaene、fusarubin 生合成遺伝子が含まれていた。鍵遺伝子周辺の生合成遺伝子も同様

に hygromycin B によって発現が上昇していたことから、hygromycin B が遺伝子発現レベルで二次代謝産物を生産誘導していることが明らかとなった。1233A の生合成遺伝子クラスターは発見の報告がない為、本研究で 1233A 生合成遺伝子クラスターの同定に取り組んだ。hygromycin B 処理によって発現上昇した二次代謝生合成遺伝子を含む No.3 生合成遺伝子クラスターに、1233A のターゲットとなる HMG-CoA 合成酵素が含まれていることが明らかとなった。No.3 生合成遺伝子クラスターを 1233A 生合成遺伝子クラスターと推定した。推定した各遺伝子 (*g430* ~ *g433*) を相同遺伝子組み換えによって破壊し代謝物を解析した結果、*g431* 破壊株を除いて 1233A とその類縁体の生産が確認されなくなった。これらの結果からクラスター No.3 が 1233A 生合成遺伝子クラスターであることが明らかになった。1233A 生合成遺伝子クラスター中の HMG-CoA 合成酵素遺伝子 (*g431*) の解析では、二つ目の HMG-CoA 合成酵素遺伝子 (*g6807*) がゲノム中に重複して存在していることが明らかとなった。*g431* と *g6807* のアミノ酸配列は 52% の相同性を示し、69% の類似性があった。また、活性に必要な部位が保存されていたことから、共に生体内で働く酵素であることが示唆された。*g431* を遺伝子破壊し、1233A に対する感受性を解析した結果、*g431* 破壊株では 1233A に対する感受性が上昇していた。これらの結果から、*g431* は 1233A に耐性を付与する遺伝子であることが示唆された。

以上のことから、*lucilactaene* 生産菌においてタンパク質合成阻害剤 hygromycin B によって *lucilactaene*、NG-391、*fusarubin*、1233A、1233B が遺伝子発現レベルで生産誘導されることが明らかとなった。これらの二次代謝産物は微生物等に対する活性を有していることが示唆された。本研究では未知であった 1233A 生合成遺伝子クラスターを RNA-seq 解析と遺伝子破壊実験により同定した。興味深いことに生合成遺伝子クラスター中に 1233A に対する耐性遺伝子が存在することが明らかになった。

以上、本学位論文では、*lucilactaene* の生合成遺伝子クラスターを同定するとともに、生物活性評価により *lucilactaene* が強力な抗マラリア活性を示すことを見出し、構造活性相関を明らかにした。さらに、hygromycin B 処理による *lucilactaene*、NG-391、*fusarubin*、1233A、1233B の遺伝子発現レベルでの生産誘導を明らかにした。未発見であった 1233A 生合成遺伝子クラスターを RNA-seq 解析と生合成遺伝子破壊株を用いて明らかにすることができた。この内容は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 誌と *The Journal of Antibiotics* 誌（筆頭著者として 2 報）に掲載された。本論文は、*lucilactaene* 生産糸状菌における二次代謝産物の生合成遺伝子と代謝産物の解明に貢献しただけではなく、将来の糸状菌二次代謝の活性化に貢献する研究である。以上のことから、本論文は博士の学位に相当する内容であると判断し、合格とした。