HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ゲノムマイニングと休眠遺伝子活性化手法を活用した生物活性天然物探索基盤の構築
Author(s)	馬目, 照久
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第16790号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16790
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99635
Type	doctoral thesis
File Information	Teruhisa_Manome_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博士（薬科学） 氏 名 馬目 照久

学 位 論 文 題 名

ゲノムマイニングと休眠遺伝子活性化手法を活用した生物活性天然物探索基盤の構築

細菌は生物活性天然有機化合物（天然物）の重要な探索源であり、これまでに発見された細菌由来天然物をもとに医薬品など有用物質が開発されてきた。細菌ゲノム上では天然物生合成に関わる遺伝子がクラスターを形成する場合が多く、この領域は生合成遺伝子クラスター（BGC）と呼ばれる。近年の細菌ゲノム配列情報の蓄積により、細菌が保有する膨大な BGC のほとんどは産物未知であることが示された。その結果、それら産物未知 BGC から所望の天然物を獲得するゲノムマイニングと呼ばれる手法が天然物探索に用いられている。しかし産物未知 BGC の大半は通常の研究室培養条件では発現しない休眠遺伝子と考えられる。そこで、ゲノムマイニングによって選抜した所望の BGC を多数保有する細菌種に対して、休眠遺伝子の活性化剤を添加することで、新規天然物の獲得が期待できる。本研究では、効率的な天然物探索基盤を構築するため、生物活性天然物の BGC を予測するゲノムマイニング手法と、細菌由来の細胞外膜小胞（MVs）を活用した休眠遺伝子活性化法の確立を目指した。

1. 生物活性に着目したゲノムマイニング手法の確立

近年のゲノムマイニングによる天然物探索研究では、天然物のユニークな化学構造を生合成する酵素遺伝子に着目する手法が主流となっている。これは、様々な天然物の生合成機構が解明され、生合成遺伝子と天然物の化学構造の相関がある程度予測可能になりつつあるためである。一方、天然物の生合成遺伝子と生物活性との相関に関する知見は乏しく、生物活性に着目したゲノムマイニング手法はほとんど報告がない。本研究では生物活性天然物の生合成機構に着目することで、生物活性天然物の BGC を予測可能なゲノムマイニング手法の構築を目指した。

細菌由来の生物活性天然物の生合成過程では、菌体内で非活性な前駆体が構築されたのち、細胞膜周辺でさらなる修飾などを受け、活性化合物が細胞外に放出される例が数多く知られている。例えば、海綿共生細菌 *Candidatus* Entotheonella calyx 由来の calyculin A は、タンパク質脱リン酸化酵素を阻害することで強力な細胞毒性を示す。本化合物の生合成過程では、リン酸基を 2 個有する非活性な前駆体 phosphocalyculin A が菌体内で生合成された後、ペリプラズムに局在する脱リン酸化酵素 CalL が化合物中のリン酸基を一つ除去することで活性型の calyculin A に変換される。本機構で生物活性発現に関わる CalL は細胞膜周辺に局在し、前駆体構築を担う生合成酵素群と同じ BGC にコードされている。さらに多くの膜局在タンパク質と同様、CalL もシグナルペプチドを有し塩基性の等電点を示す。以上から、膜局在タンパク質をコードする BGC は生物活性天然物を生産する可能性があると着想した。そこでまず、BGC にコードされる生合成タンパク質の物理化学的特性と生合成産物の生物活性との相関を検証した。

約 1,700 の既知天然物の抗菌活性の有無を文献調査した。並行して、それら天然物の BGC にコードされる全タンパク質に対し、シグナルペプチドの有無と等電点の値を予測した。それらの結果と生合成産物の抗菌活性の有無との相関を分析した結果、シグナルペプチドを有しかつ 9.2～11.0 の等電点を示すタンパク質をコードする BGC が抗菌活性天然物の生産に関わる可能性が高いことを見出した。そこで約 16 万種類の産物未知 BGC から本条件を満たすタンパク質をコードする BGC を探索した。ヒット BGC と既知天然物の BGC を網羅的に比較し、新規性の高い BGC を選抜した。選抜した BGC の保持数を指標に細菌を順位付けし、上位に位置する 31 細菌種について培養抽出物の抗菌活性を評価した。その結果、29 細菌種の培養抽出物が抗菌活性を示し、本手法にて抗菌活性天然物生産能が高い細菌種を選抜できることが示唆された。

ヒット細菌 *Burkholderia anthina* の細菌培養液から抗菌活性を指標に新規天然物 **1** を得た。MS、NMR と microED 解析を組み合わせることで、本化合物の構造を決定した。本化合物は *E. coli* に対して抗菌活性を示し、その IC_{50} 値は 50.2 μM であった。

さらに *Chitinophaga eiseniae* の細菌培養液から新規天然物 **2**、**3** を得た。各種 NMR 解析の結果、両化合物は 3 種類の非天然アミノ酸を構造中に含む新規リポペプチドと決定した。化合物 **2**、**3** はともに *E. coli* に対して抗菌活性を示し、それぞれ IC_{50} 値は 28.3 μM および 4.8 μM であった。

化合物 **1**–**3** はいずれも非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）型 BGC により生合成されると推定した。それら BGC にコードされたタンパク質の物理化学的性質を検証した結果、いずれの BGC からもシグナルペプチドを有し、9.2～11.0 の等電点を示すタンパク質を見出した。以上から、生合成タンパク質の物理化学的性質を指標とするゲノムマイニングにより抗菌活性天然物の BGC を選抜できることが示された。

2. 多様な MVs の休眠遺伝子活性剤としての汎用性の検証

生物活性天然物の BGC を予測するゲノムマイニング手法により、新規抗菌活性天然物の獲得に成功した。しかし、本手法にて選抜した細菌種のほとんどが抗菌活性を示した一方で、生産量が少ないために単離・構造決定に至らなかった化合物も多数存在した。この原因の一つとして、選抜した細菌種が保有する BGC の多くが休眠遺伝子である可能性が考えられた。

休眠遺伝子の活性化手法として低濃度の抗生物質や異種細菌を単一細菌培養液に添加する手法などが報告されている。それらは細菌を本来の生育環境を模倣した条件で培養することで休眠遺伝子を活性化できることを示唆している。MVs はほとんどの細菌が放出する細胞外膜小胞で、細菌間相互作用に関わることが知られている。この機能に着目し、最近当研究室では *Burkholderia multivorans* の MVs が多様な細菌種に対して様々な天然物を生産誘導することを明らかにした。MVs の組成は生産菌ごとに異なるため、MVs ごとに多様な天然物を生産誘導できる可能性がある。多様な細菌由来 MVs の休眠遺伝子活性化剤としての汎用性を検証した。

北海道大学札幌キャンパスの土壌などから分離したグラム陰性細菌を対象に MVs 高生産株を探索した。一般に、MVs は細菌培養液上清を超遠心分離することで得られる。そこで約 300 細菌種を 96 ウェルプレートで培養し、培養液上清の濁度が高い約 20 株を選抜した。それら菌株から定法により MVs を採取することで、選抜した菌株が MVs を高生産することを確認した。さらに、MVs の天然物生産誘導活性を評価するため、*B. multivorans* の MVs に対して最も感受性が高かった *Xenorhabdus innexi* に対して、得られた MVs を添加して培養した。3 種の代謝産物の生産量を指標に、MVs 非添加時より当該代謝産物を生産誘導した MVs を選抜した。その結果、天然物生産誘導活性を示す MVs の高生産株として 8 株を得た。16S rRNA 解析から、6 株は *Pseudomonas* 属細菌、残る 2 株はそれぞれ *Delftia* 属、*Caulobacter* 属細菌であった。

MVs 高生産株のうち、*Caulobacter* sp. WL1、*Pseudomonas* sp. WL3 と *Pseudomonas* sp. WL7 の 3 菌株から採取した MVs を約 50 細菌種に添加して培養した。得られた培養液抽出物のメタボローム解析から、MVs 添加時にのみ生産される代謝産物を選抜した。その結果、いずれの MVs も多様な細菌種に対し様々な物理化学的性質を示す代謝産物を生産誘導した。また MVs ごとに生産誘導した代謝産物の種類が異なっていた。以上から、複数種類の MVs が天然物生産誘導活性を有し、それらを使い分けることで多様な天然物を取得できることが示唆された。

3. MVs が生産誘導する天然物の単離・構造決定

C. vibrioides sp. WL1 の MVs が *Mycolicibacterium parafortuitum* に対して生産誘導した代謝産物 **4** を単離した。MS、NMR 解析から、本化合物を N^6-OH リシン及びオキサゾリン環を構造中に含むペプチド性天然物と決定した。本化合物は *Mycobacterium* 属細菌が生産するシデロフォア mycobactin 類に分類される新規天然物であった。

さらに、*Pseudomonas* sp. WL7 の MVs が *Streptantibioticus cattleyicolor* に対して *m/z* 349 を示す新規代謝産物を生産誘導させた。精製の過程で、当該化合物は LC-MS 上で隣接する 2 本のピークを与え、両者の ^{1}H NMR スペクトルが類似していたことから、これらは異性体と示唆された。NMR 解析の結果、化合物 **5**、**6** の平面構造は 2 つのキナゾリノン環部位とシクロヘキサン部位がそれぞれスピロ結合を形成した構造であることが明らかになった。さらに両化合物の microED 解析の結果、両化合物をキナゾリノン環の配向が異なる立体異性体と決定した。