

論文審査報告書

氏名	アマット ラジ シャルマ Amit Raj Sharma
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第24号
学位授与日	令和2年6月25日
論文題目	Screening of new bioactive compounds from marine bacteria associated with stony corals (イシサンゴ由来海洋細菌からの新規生理活性物質の探索)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 五十嵐 康弘 教授 伊藤 伸哉 教授 占部 大介 講師 奥 直也 東京海洋大学 教授 今田 千秋

内容の要旨

ペニシリンの発見以来、抗生物質、抗癌剤、抗糖尿病薬、免疫抑制剤などさまざまな医薬品が微生物から発見、実用化されてきた。それらの多くが放線菌と糸状菌から得られたため、探索研究はその二群の微生物に集中した。その結果、放線菌と糸状菌からの新規物質の発見数は減少し、1990年代後半以降、微生物からの新薬開発のペースは以前に比べて低下している。当初、天然物に代わる創薬ライブラリーとしてコンビナトリアル合成化合物が注目を集めるようになったが、新薬創出の成果は期待するほどには得られていない。これは合成化合物の構造多様性が天然物に比べて低く、合成化合物の構造が本質的に生物学的意味を有さないことが一因である。一方で天然物は生来、生体分子との高い親和性を示す。タンパク質の構造パターンは有限であり、天然物の生合成酵素と創薬の標的タンパクとが共通の構造モチーフを持ちうるからである。したがって、創薬ライブラリーの多様性を拡張し、新規なリード化合物を得るためには、天然物の利用が不可欠と言える。しかし、これまで医薬探索の中心とされた陸生微生物、特に糸状菌や放線菌のような主要分類群からの新規物質発見は容易ではなく、新薬探索のための新たな生物資源の開拓が強く求められている。

海洋微生物の利用研究は陸生微生物に比して歴史が浅いため、新規物質発見の余地は大きいと考えられている。実際に、海底堆積物、海草、海洋動物などからも放線菌や糸状菌は分離され、多様な新規生理活性物質が発見されるとともに、臨床開発へ進められた化合物も存在する。そのような先行研究に対して、本研究では海洋無脊椎動物の中でも、特にイシサンゴに共生する海洋細菌に着目した。イシサンゴはそれ自体の成長が遅く、環境保護の観点から大量採取が困難なため、成分研究がほとんどなされて

おらず、それゆえ共生細菌の生産する生理活性物質に関する報告も本研究に着手する時点で皆無であった。一方でイシサンゴの共生細菌が、サンゴの白化や感染症の抑制に寄与する生理活性物質を生産することが示唆されている。加えて、海洋細菌の多くは海水要求性であるため、海洋環境に特異的であり、これまでの陸上微生物を対象とした探索研究ではスクリーニングされずに取り残されていると考えられた。以上の背景に基づき、本研究では、イシサンゴ共生細菌の生産物の解析を通じて、その医薬探索資源としての新規性ならびに有用性を評価した。本論文は全6章から構成されており、各章の主な内容は以下の通りである。

第一章では、天然物創薬の歴史と成功事例、現状と問題点、将来の展望について、特に海洋天然物を中心に概説し、本研究の目的と意義を論じている。

第二章では、海洋細菌の分離実験手法を解説し、新規化合物の探索方法論について述べている。本研究では、海洋細菌の物質生産能、さらには生産物の構造新規性の評価を主目的とするため、活性指標の探索に代えてUVスペクトルを指標とした分光学的スクリーニングを採用した。UVスペクトルは化合物の共役系構造を反映するため、UVスペクトルデータベースを利用することにより、スペクトル形状から構造タイプの予測が可能である。

第三章では、*Labrenzia* 属海洋細菌 C1-1 株からのカテコール系新規化合物の単離、構造決定、生物活性について述べている。生産菌は *Montipora* 属イシサンゴ体内から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性からアルファプロテオバクテリア綱に属する *Labrenzia* 属細菌と同定された。*Labrenzia* は運動性を有する、好気性、グラム陰性の桿菌であり、生育に海水を要求する。これまで海底堆積物や海洋刺胞動物からの分離が報告されているが、生産物に関する報告は本研究に着手した時点では二例のみであった。一方でゲノム解析データによると、*Labrenzia* はポリケタイドや非リボソームペプチドなどの生合成遺伝子を有しており、その生産物に興味を持たれた。C1-1 株を三種類の液体培地で物質生産能を比較したところ、A3M 海水培地中で培養したときに 208, 250, 314 nm に吸収極大を示す特徴的な UV スペクトルの未知化合物の生産を確認した。そこで培養抽出物から分画、精製を行い、目的化合物を得た。本化合物の分子式は精密質量分析により $C_{32}H_{36}N_4O_{10}$ と推定されたが、重 DMSO 中での ^{13}C NMR スペクトルでは 32 個以上の炭素シグナルが観測された。これは互変異性に起因するものと推察されたため測定溶媒の検討を行い、重クロロホルムと重メタノールの混合溶媒中では観測される炭素シグナルがほぼ 32 個となることを見出した。さらに COSY, HSQC, HMBC 等の二次元 NMR スペクトルによる構造解析を行い、本化合物はスペルミジンの三か所のアミノ基が、2,3-ジヒドロキシ安息香酸もしくはその誘導体によりアシル化された新規物質 (*labrenzbactin* と命名) であることを明らかにした。またセリンに由来するオキサゾリン部位の不斉炭素の絶対配置は、本化合物を酸加水分解し、改良 Marfey 法により S 配置と決定した。本化合物に類似の天然物は細菌類から複数報告されているが、いずれもオキサゾリン部位はスレオニンに由来しており、セリン由来の化合物は前例がない。また安息香酸部位のフェノール水酸基がメチル化された化合物もこれまでに報告がない。本化合物は、作物の青枯病原因菌 *Ralstonia solanacearum* に対する抗菌活性、マウス白血病 P388 細胞に対する殺細胞活性を示した。

第四章では、*Microbulbifer* 属細菌 C4-6 株の生産する不飽和脂肪酸(2Z,4E)-3-methyl-2,4-decadienoic acid の単離、構造決定、生合成について述べている。生産菌は、*Porites* 属イシサンゴ体内から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Microbulbifer* と同定された。*Microbulbifer* はガンマプロテオバクテリア綱のグラム陰性細菌であり、塩田、海底堆積物、海洋無脊椎動物などからの分離報告が多く、生育に海水を要求する海洋細菌である。本研究に着手した時点で *Microbulbifer* の生産物に関する報告はなく、本属の物

質生産能力に興味を持たれた（その後、本研究の実施中に *Microbulbifer* 由来化合物の最初の論文報告がなされた）。培養スクリーニングの結果、A3M 海水培地中で 262 nm に吸収極大を示す化合物の生産が認められたため、単離、構造解析へと進め、培養液のブタノール抽出物から精製し、目的物質を得た。その分子構造を精密質量分析と ^1H 及び ^{13}C NMR スペクトルデータに基づき解析し、本化合物を (2Z,4E)-3-methyl-2,4-decadienoic acid と決定した。この化合物は合成化合物として知られていたが、天然物としての単離は今回が最初の報告である。脂肪酸もしくはポリケタイドの生合成では、二炭素ずつ鎖伸長するため、メチル基などの分岐はカルボキシ基の炭素位置を 1 番とするときに、必ず偶数位置 (2, 4, 6 番...) に生ずる。ところが本化合物では奇数位置 (3 番) にメチル基が置換しており、通常の脂肪酸とは異なる生合成反応の関与が示唆された。そこでメチル基の生合成起源を探るべく、安定同位体前駆体の取り込みによる ^{13}C 標識実験を行い、そのメチル基炭素がメチオニンに由来することを明らかにした。これまでに脂肪酸の奇数位置炭素上でのメチル置換は、酵母のスフィンゴ脂質や *Mycobacterium* 属細菌の脂質中に見出されており、S-アデノシルメチオニンから二重結合炭素へのメチルカチオン供与反応の介在が示唆されている。しかしながら、既知の例がいずれも炭素鎖中の孤立した二重結合炭素上での反応であることに対して、今回の化合物では電子密度の低いカルボキシ基 β 位でのメチルカチオン置換であることより、先行例とは異なる反応機構の存在が推察された。なお本化合物は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に弱い抗菌性を示した。

第五章では、*Micrococcus* 属細菌 C5-9 株の生産する二種類の不飽和ケト脂肪酸の単離、構造決定、生物活性について述べている。C5-9 株は *Catalaphyllia* 属イシサンゴから分離され、16S rRNA 遺伝子解析により *Micrococcus* 属細菌と同定された。*Micrococcus* は放線菌門に属する球菌で、いわゆる放線菌のように菌糸を形成しない。比較的幅広い環境に見い出され、海洋ではカイメンやサンゴ等の無脊椎動物に共生することが知られている。サンゴ由来 *Micrococcus* の生理活性物質に関する報告が見られなかったことから C5-9 株の生産物を精査することとした。本株は A16 海水培地中で 275 nm 付近に吸収極大を示す複数の化合物を生産したため、培養液抽出物から数段階の精製を行うことにより二種類の化合物 A と B を得た。次いで、両化合物を精密質量分析と NMR スペクトル解析に供し、いずれの化合物も 5 位にケト基、6 位と 8 位に共役ジエン構造を有する炭素数 14 の脂肪酸であることを明らかにした。二重結合の幾何異性はカップリング定数に基づき、化合物 A では 6E,8Z と決定した。一方、化合物 B では 6 位と 7 位の炭素間と同様に E と決定されたが、8 位と 9 位についてはプロトンの化学シフト値の差が小さく、second order effect のためにカップリング定数を解析することは不可能であった。そこでスピン系シミュレーションによるプロトンシグナル形状の計算予測を行い、実測スペクトルと比較することにより、8 位と 9 位の炭素間が E であることを決定した。以上より、化合物 A は (6E,8Z)-5-oxo-6,8-tetradecadienoic acid、化合物 B はその (6E,8E)-異性体と決定され、いずれも新規化合物であった。類縁構造のケト不飽和脂肪酸が植物から見出されているが微生物からの報告はない。さらに得られた二化合物の生理活性評価を行った。化合物 A は魚類皮膚感染症の原因菌 *Tenacibaculum maritimu* に対し、化合物 B は根頭癌腫病の原因菌 *Rhizobium radiobacter* に優れた抗菌性を示した。転写因子 PPAR α の活性化は肝臓での脂質代謝の亢進、PPAR γ の活性化は脂肪組織でのインスリン感受性の増強など、生活習慣病の抑制、病態改善に寄与する。両化合物ともに PPAR α と PPAR γ を活性化する作用が認められ、化合物 B がより強い活性を示した。

第六章では、前章までの内容を総括し、結論を述べている。

審査の結果の要旨

感染症、癌、糖尿病等のさまざまな疾病の治療薬が微生物代謝物から発見、実用化されてきたが、薬剤耐性菌や生活習慣病の増加に対応した新薬の継続的開発は今後も不可避である。しかし、これまで医薬探索の中心とされてきた陸生微生物、もしくは糸状菌や放線菌等の主要分類群からの新規物質発見は困難となり、新薬探索のためには新たな天然資源の開拓が強く求められている。本研究では未研究生物資源としてイシサンゴの共生細菌に着目した。イシサンゴはそれ自体の成長が遅く、環境保護の観点から大量採取が困難なため、成分研究がほとんどなされておらず、それゆえ共生細菌の生産する生理活性物質に関する報告も本研究に着手する時点で皆無であった。一方でイシサンゴの共生細菌が、サンゴの白化や感染症の抑制に寄与する生理活性物質を生産することが示唆されている。加えて、海洋細菌の多くは海水要求性であるため海洋環境に特異的であり、従来の陸上微生物を対象とした探索研究ではスクリーニングされていない未研究資源と考えられた。以上の背景に基づき、本研究ではイシサンゴ共生細菌の生産物解析を通じて、それらの医薬探索資源としての新規性ならびに有用性の評価を試みた。主な内容は以下の通りである。

第一章では、天然物創薬の歴史と成功事例、現状と問題点、将来の展望について、海洋天然物を中心に概説し、本研究の目的と意義を論じている。また第二章では、海洋細菌の分離実験手法と新規化合物の探索方法論について論じている。

第三章では、*Montipora* 属イシサンゴから分離した *Labrenzia* 属海洋細菌 C1-1 株からアシル化されたスペルミジン骨格を有する新規化合物 *labrenzbactin* を単離し、スペクトル解析と改良 *Marfey* 法により絶対構造を決定した。*Labrenzia* 属からはこれまで I 型ポリケタイド、脂質誘導体の二例しか報告がなく、本研究を通じて同属細菌の有用物質生産能を示す新たな知見を得ることができた。また、本化合物が作物の青枯病原因菌 *Ralstonia solanacearum* に抗菌性を示すことを明らかにした。

第四章では、*Porites* 属イシサンゴから分離された *Microbulbifer* 属海洋細菌 C4-6 株から不飽和脂肪酸 (2Z,4E)-3-methyl-2,4-decadienoic acid を単離、構造決定した。本化合物は通常の天然脂肪酸には見られない置換位置にメチル基が存在したため、生合成前駆体による標識実験を行い、前例のないメチル化反応が関与する生合成機構を提唱するに至った。*Microbulbifer* 属の生産物はこれまで一例のみであり、同属細菌の生合成多様性を示す新たな例となった。

第五章では、*Catalaphyllia* 属イシサンゴから分離した *Micrococcus* 属細菌 C5-9 株から 2 種類の新規不飽和ケト脂肪酸を単離、構造決定し、それらの化合物が魚類や植物の病原性細菌に抗菌性を示すこと、糖尿病等の代謝疾患の抑制に関わる核内受容体 $PPAR\alpha$ と $PPAR\gamma$ を活性化することを明らかにした。

以上、第三章から第五章に詳述されているように、これまで創薬資源として研究報告のないイシサンゴ共生細菌の物質生産解析を通じて、分子系統の異なる三種の細菌株、アルファプロテオバクテリア綱 *Labrenzia* 属、ガンマプロテオバクテリア綱 *Microbulbifer* 属、放線菌門 *Micrococcus* 属から新規生理活性物質を得ることに成功した。得られた化合物はいずれも既知化合物とは異なる構造上の特長を有し、抗菌活性や核内受容体アゴニスト活性など創薬リード化合物として有望な性質を示した。化合物の構造多様性と新規性は、医薬探索において最も重要な要素の一つであることから、本研究で得られた知見の中でも特に、新たな医薬探索源となり得る微生物群を見出した点において、今後の有用微生物探索に与える影響は大きく、生物工学的価値が認められる。

研究成果は、申請者が筆頭著者の 3 件の査読付き、国際学術誌に掲載されている。2019 年 11 月 26 日

に予備検討委員会を開催，2020年3月17日に博士論文の審査および最終試験を行った結果，申請者は
学術研究にふさわしい討論ができ，当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行す
る能力を有するものと判定し，博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。