

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 木 村 美 紀

系統学上、最も原始的な多細胞動物として位置づけられる海綿動物からはこれまで数千に及ぶ生物活性物質が見出されてきており、高等植物や微生物とともに重要な医薬品資源の一つである。中でも三浦半島沿岸産 *Halichondria okadaii* に含まれる halichondrin B は抗がん剤リード化合物として開発候補に挙がり、近年その類縁体が臨床応用に至っている。その他、カリブ海産の *Discodermia dissoluta* に由来する discodermolide など、現在いくつかの化合物が臨床試験段階にある。一方で、海綿動物には膨大な未知・未培養微生物が共生していることが知られており、多様な二次代謝産物の生産における共生微生物の関与が示唆されている。

日本近海産の海綿類の中で最も多様な二次代謝産物を含む海綿は *Theonellidae* 科に属する *Theonella* 属の海綿である。これまで polytheonamide B をはじとする多様な生物活性物質が報告されてきた。一方で、同じ *Theonellidae* 科に属する *Discodermia* 属からは calyculin 類や discodermin 類など主に含まれる二次代謝産物を除いて、その他の生物活性物質の報告例は数少ない。特に *Discodermia calyx* においては NRPS を主な生合成経路とするペプチドの単離報告例は皆無であったため、本研究では、*D. calyx* 由来新規ペプチド性化合物の探索を試みた。また、新たな探索手法として海綿メタゲノム DNA より未知生合成遺伝子クラスターを探索し、生合成産物の構造を予測、単離するメタゲノムマイニングの手法を試みた。

その結果、式根島産海綿 *Discodermia calyx* より、3つの新規化合物 allos-hemicalyculin A、calyxamide A と B、および藍藻由来の既知化合物である kasumigamide を単離、構造決定した。Allos-hemicalyculin A は一重項酸素による calyculin A の分解反応によって生成する過程を予測し、実際に同様の反応が光増感剤なしで進行することを明らかにした。また、calyxamide A および B は特異なアミノ酸残基を含む環状ペプチド性化合物であり、各種スペクトルデータおよび分解反応によって絶対立体化学を含む全構造の決定に成功している。Calyxamide A および B は構成アミノ酸である Ile の D、L が異なるジアステレオマーであり、その立体構造の差異が細胞毒性の強弱に関わる機構を考察している。また化学変換による構造活性相関の解析を行い、特徴的な α -ケトアミド構造のケトカルボニル基および N 末のホルミル基が細胞毒性の発現に重要である事も明らかにしている。Calyxamide 類が有する特徴的な部分構造や立体化学の異なる類縁体を産生する生合成経路は非常に興味深い。実際に共同研究者によって推定生合成遺伝子クラスターの解析がなされており、本化合物は非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) とポリケタイド合成酵素 (PKS) のハイブリッド生合成経路によって合成される事が示されている。

同様に海綿メタゲノムライブラリーより、PKS の KS domain 配列を鋳型とする縮重プライマーによって増幅した PCR 産物を基にスクリーニングを行った結果、新規の遺伝子クラスターが見出された。本遺伝子クラスターも calyxamide と同様に NRPS-PKS ハイブリッド型生合成遺伝子クラスターであり、4つの NRPS モジュールについて、A ドメインの結合ポケットに位置するアミ

ノ酸残基に着目し、基質選択性を予測した。 β -Ala の他に、L-Phe、L-Tyr、L-Trp のいずれか一つ、さらに Arg と Phe をコードする A ドメインと、それらのモジュール内に E ドメインが存在した事から、D-Arg と D-Phe 由来のアミノ酸残基を含むと推定した。1 つの PKS モジュールは、KR ドメインを含む基本構成単位であった。開始モジュールは、淡水性シアノバクテリア由来のペプチドである aeruginoside の生合成遺伝子配列と類似していたため、開始基質はフェニル乳酸であると推定した。以上の配列情報により、予想生成物は既知化合物である kasumigamide と良い一致を示した。Kasumigamide は淡水性のシアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* より単離報告があるのみで、海綿動物からの単離報告はない。そこで、海綿 *D. calyx* から予想生成物を探索した。その結果、実際に海綿中に ksumigamide が存在する事を明らかにしている。さらに、加水分解物を誘導体化後、Marfey 法を用いて立体化学を特定し、D-Arg と *erthro*- β -phenyl-D-serine を確認し、生合成遺伝子に存在する epimerase domain の機能を支持する結果を得た。Kasumigamide は P388 に対して IC_{50} が $4.8 \mu M$ の細胞毒性を示した。

Theonellidae 科の海綿は世界で 5 属知られており、そのうち日本近海では *Theonella* 属、*Discodermia* 属および *Siliquariaspongia* 属の 3 属が報告されている。これまで *Theonella* 属の海綿は世界中数多くの研究者が二次代謝産物の探索研究を行ってきたが、*Discodermia* 属の海綿では比較的研究例が少なかった。本研究では伊豆諸島、伊豆半島産の *Discodermia calyx* より新規ペプチド化合物 calyxamides の単離に成功した。本化合物は *Theonella* 属の海綿から見出された化合物と構造が類似しており、*Theonellidae* 科海綿に共通して共生する微生物の存在を示唆するものである。すなわち海綿由来二次代謝産物の産生を担う物質生産に秀でた未知微生物が存在する可能性が高いことを示した。さらに calyxamide A の構造活性相関の検討によって α -ケトアミド構造が細胞毒性の発現に必須であり、 α -ケトアミドに隣接する側鎖の立体化学が活性に影響するメカニズムを考察している。また、kasumigamide A の単離においては、淡水性のシアノバクテリアに含まれるペプチドが海洋性の海綿に含まれていることを初めて示した研究結果であり、その生合成遺伝子の由来、水平伝播の機構といった興味深い研究課題を新たに提示するとともに、天然物の探索におけるメタゲノムマイニングの有効性を実証した。

本研究成果は医薬品資源として重要な海綿動物に含まれる二次代謝産物の多様性創出機構の解明へ向けて一石を投じるものであり、とりわけ *Discodermia calyx* の二次代謝産物の構造多様性、共生微生物そして生合成遺伝子、それらの解析に糸口を見出した重要な研究成果と位置づけられる。したがって、博士論文に相応しい内容と判断した。