

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

平成 30年 9月 1日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所属部局・研究科 薬学研究科

職 名・学 年 博士課程3年

氏 名 吉村 彩

助 成 の 種 類	平成 29年度 ・ 在外研究助成	
研 究 課 題 名	休眠遺伝子覚醒による新規天然物探索基盤の開発	
受 入 機 関	Princeton大学	
渡 航 期 間	平成 29年 9月 1日 ~ 平成 30年 8月 31日	
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( )	
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	2,653,000円
	使用した助成金額	2,653,000円
	返納すべき助成金額	0円
		航空運賃(大阪ーニューヨーク)
		プリンストンでの滞在費
当財団の助成について	今回、他の研究助成金と併せて海外留学費用としました。併用不可の助成金が多いなか、まとまった額で他助成金と併用できる柔軟性がありがたかったです。助成期間中に得た実験結果・実験手法は今後の研究人生に大いに利用できると思います。	

## 成果の概要 / 吉村彩

天然有機化合物(天然物)は天然資源から得られる小分子化合物の総称である。

人類は古くから天然物を薬・農薬・研究試薬などとして利用してきた。その有用性からこれまでに多くの天然物が単離・構造決定されている。しかし近年の新規天然物の報告数は減少の一途を辿っており、医薬資源の枯渇が危惧されている。

天然物は生合成遺伝子にコードされた生合成酵素がアミノ酸や脂肪酸などの体内小分子群を組み立てることで合成される。近年のゲノム研究の発展に伴って多くの微生物の全ゲノムが解明され、微生物のゲノム中には天然物生合成遺伝子群が多数存在することが明らかになってきた。その多くは通常の研究室での培養条件下では発現しておらず休眠状態にあることから休眠生合成遺伝子と呼ばれている。休眠生合成遺伝子を覚醒させ天然物を合成させることができれば、医薬品として有用な新規天然物を取得できると期待できる。これまでいくつかの休眠生合成遺伝子覚醒法が開発されてきた。それらは休眠遺伝子の覚醒メカニズムを理解できないため、新規天然物取得にはトライアンドエラーを繰り返す必要があった。そこで、我々は休眠生合成遺伝子の覚醒メカニズムを理解で

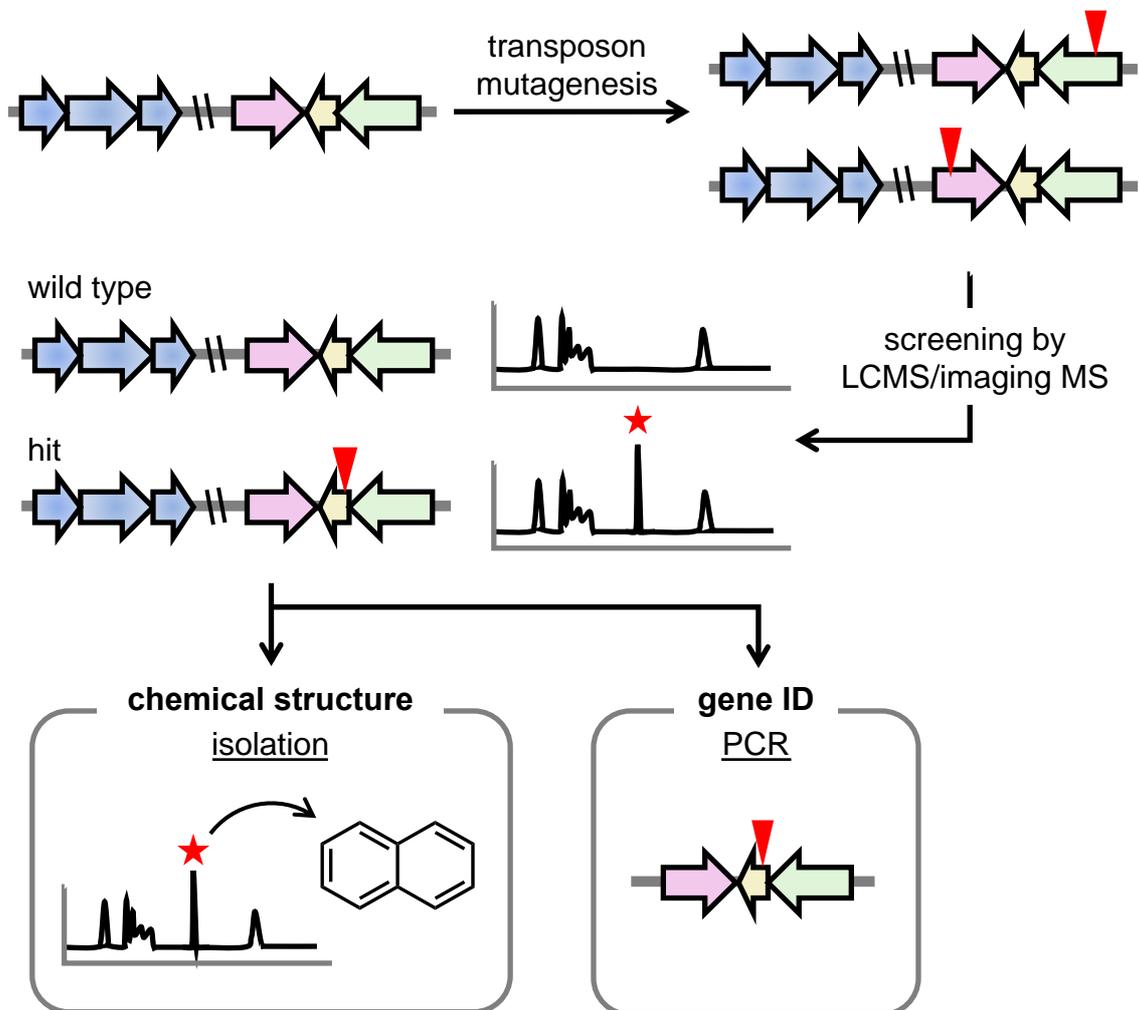
き、かつ新規天然物が取得可能な手法を開発した。

以下に研究計画の概要を示す。

我々はグラム陰性菌 *Burkholderia gladioli* (*B. gladioli*) にランダムに遺伝子変異を導入し、各遺伝子変異株を収容したライブラリーを構築した。ライブラリー内の各変異株と野生株の培養液抽出物を取得し、LCMS もしくはイメージング MS で抽出物内の全天然物の分子量を測定した。野生株と変異株間で MS 強度が大きく異なる天然物を同定し、その天然物を大量に生産する変異株をヒット株とした。ヒット株からは 2 種類の情報を得た。一つは、ヒット株が大量に生産する天然物の化学構造を、二つ目はヒット株の変異導入遺伝子の情報を取得した。すなわち、変異が導入された遺伝子がコードするタンパク質を知ることによって、そのタンパク質が構造決定した天然物の生合成機構に関与していることが理解できる。さらに、標的とした天然物は休眠遺伝子由来の天然物であるため、特定したタンパク質は休眠生合成遺伝子覚醒メカニズムに関与していると言える。

ゲノム解析によると *B. gladioli* は 19 の天然物生合成遺伝子を持つ。報告された天然物は 4 つであるため、15 の休眠生合成遺伝子を持つ有望なターゲットであ

ると言える。また、本研究計画ではランダム変異導入にトランスポゾン導入を採用した。トランスポゾンは「動く遺伝子」として全生物に保存されている。遺伝子配列内に薬剤耐性遺伝子を持つトランスポゾンを標的とする微生物に導入すれば、ライブラリー構築が簡単に行える。さらに、PCR法で容易にトランスポゾン導入位置を知ることができる。



以下に研究結果を示す。

*B. gladioli* にトランスポゾンによるランダム変異を導入し、約 2000 株の変異株を作製した。変異株の培養液抽出物を取得し、野生株由来の抽出物と MS 測定結果を比較した。スクリーニングの結果、p12-6 株は野生株に比べて m/z 230 の分子量を持つ天然物を多く生産することがわかった。野生株では本天然物の生産はほとんど見られなかった。そこで、p12-6 株のトランスポゾン導入部位を PCR によって解析した結果、adenine-specific DNA methyltransferase 遺伝子に変異が導入されていることが明らかになった。一方、p12-6 株の培養液抽出物を二層分配と各種クロマトグラフィーによって精製し、標的天然物を取得した。NMR 解析から本化合物は indole-3-glycerol であることが明らかになった。Indole-3-glycerol は 1971 年に *Neurospora crassa* から単離されているが、*B. gladioli* からの報告例はない。

以上の結果から、*B. gladioli* の体内では adenine-specific DNA methyltransferase が何らかの方法で indole-3-glycerol の生合成に関与していることが明らかになった。

これまでに adenine-specific DNA methyltransferase が indole-3-glycerol の合成に関与しているという報告はなく、本手法では未同定天然物の生合成機構に未

知のタンパク質が寄与していることを解明できる。

今後は、本手法を他の微生物にも適用し、新規天然物の取得と、その覚醒メカニ  
ズムの解明を目指す。