【393】

氏　名（本籍）	奈須野（なすの）　恵（え）　理（り）（東 京 都）
学 位 の 種 類	博　　士（生物工学）
学 位 記 番 号	博　乙　第　2620　号
学位授与年月日	平成 24 年 11 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Identification and Functional Characterization of Novel Quorum Sensing Signal Synthases using a Metagenomic Approach** （メタゲノム解析手法を用いた新規クオラムセンシングシグナル合成酵素の同定と機能解析）

主　　査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（理学）	花　田　　智
副　　査	筑波大学教授	農学博士	佐　藤　誠　吾
副　　査	筑波大学教授	博士（農学）	高　谷　直　樹
副　　査	産業技術総合研究所主任研究員	博士（農学）	木　村　信　忠

論 文 の 内 容 の 要 旨

メタゲノム解析手法を用いて、主に未知微生物により構成される環境中の微生物生態系に存在する新たなクオラム・センシング（QS）機構を発見した。発見された新規 QS 機構はアシルホモセリンラクトン（AHL）に基づく LuxI/R タイプのもの 2 種と、インディゴ生合成の中間代謝物が関与している系の 1 種である。前者の 2 つはそれぞれコークス廃水処理活性汚泥、土壌を対象としたメタゲノムライブラリから発見されたものである。活性汚泥由来のものは *Betaproteobacteria* 綱に属すると思われる未培養細菌、そして土壌由来のものは *Nitrospirae* 門に属する可能性が高い未培養細菌に起源を持つことが系統解析から明らかにされた。特に *Nitrospirae* 門に見出された新規 LuxI/R タイプ QS 機構は遺伝子配列（アミノ酸配列）の相同性は低かったものの、AHL 合成酵素である LuxI タイプのタンパク質は触媒活性に必須なアミノ酸に置換はなく、立体構造解析の結果からも酵素の構造そのものに変形は確認されなかったことから、AHL 合成の機能は保持されていることが強く示唆された。なお、これら 2 種の生産するシグナルを調べたところ、両者が同一の AHL（C12-HSL：C12 の長さのアシル基鎖を持つ AHL）であることが NMR（核磁気共鳴）分析と FAB-MS 分析より明らかとなった。門レベルで隔たっている微生物に存在する分子進化的にも遙か古くに分岐した酵素ホモログが全く同一の AHL を合成するのは、進化学的に興味深いことであるばかりでなく、細菌の門を越えた異種間でクオラム・センシングが行われている可能性を示唆する重要な発見であると言える。

一方、土壌メタゲノムライブラリの中に見出された AHL 生産とは別の代謝物が関与していると考えられたものは、QS システムの誘導のみならず、コロニーに青色の呈色が見られたものであった。TLC（薄層クロマトグラフィー）を用いた分析法により、これらの発色はインディゴ、インジルビン等の色素であることが明らかとなった。色素展開シリカゲルに直接センサー菌株を塗布した試験（アガーレイヤー法）において、これら色素は QS システムの誘導に関与しておらず、これらと移動度の異なる無色の物質（＝中間代謝物）が直接の誘導物質となっていることを明らかとした。この誘導物質がどの様な物質であるか質量分析等の解析により確かめたところ、本シグナル物質はインドールからインジルビン、インディゴを合成する経路の中

間体である「2,3-hydroxyindole」である可能性が高いことが示された。

また、本研究に用いられた手法は、同様な研究に用いられてきたQSシグナルのセンサー菌の中でメタゲノム由来のインサートを含むプラスミドを共発現させる方法（イントラセルラー法）ではなく、メタゲノム由来のインサートを含む組換え大腸菌の培養物（または、その上精）を用いてセンサー菌の反応を検出するという、言わば「インターセルラー法」と呼べる新しい方法である。この方法は、様々な環境試料に対してライブラリを作り直すことなく応用可能である、感度が異なる（または検出対象の異なる）複数のセンサー菌を同時に使用することが可能であるというメタゲノムを対象とした未知QS機構の探索に有利な特徴を持っている。

審査の結果の要旨

本研究により発見された新規QS機構のひとつは*Nitrospirae*門に起源を持つ可能性が高く、従来知られている*Proteobacteria*門以外の別の門からの発見として価値のある成果である。また、その遺伝子解析ばかりでなく、それにより生産されるAHLを特定したことも高く評価できる。更にQS機構にインディゴ中間代謝物が関与する事を見出し、そのシグナル物質が何であるかを示唆出来た研究も十分に評価に値する。また、本研究で提案された「インターセルラー法」は、メタゲノムに潜む未知QS機構の探索に有利な特徴を有し、本分野の研究を加速する重要な方法となって行くであろう事は疑いがない。

平成24年10月10日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。