

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04980

研究課題名(和文) 海綿動物の生活環に基づいた有用微生物による天然物生産機構の解明

研究課題名(英文) Identification of biosynthetic gene clusters of bioactive natural products and their producing bacteria based on sponges life cycle

研究代表者

高田 健太郎 (Takada, Kentaro)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：90455353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：海綿動物に含まれる化合物の一部が研究試薬や医薬品として利用されていることから、海綿動物は重要な海洋生化学資源のひとつとして認識されている。しかしながら、臨床開発に必要な試料を十分に供給できないことが問題になっている。本研究ではこの問題を解決するため、海綿動物の生活環に注目し有用天然物の生産者および生合成遺伝子を解明することを目的にした。その結果、カイメン *Mycale* sp. 由来でアクチン脱重合を阻害し強力な細胞毒性物質であるマイカロライドの生産者と生合成遺伝子を明らかにすると共に、その生産微生物はカイメンの親から子へ垂直伝播によって受け継がれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、海洋生物由来の有用物質の生産者および生合成機構を明らかにすることに成功し、創薬における医薬品候補化合物の応用開発に向けた大きな知見を得ることができた。また、活性物質の生産微生物が新規であったことより、海洋には未利用で有用な微生物資源が存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges have been recognized as critical marine biochemical resources because some sponge-derived natural products are used as research reagents and chemotherapeutic agents. However, the lack of a sufficient supply of bioactive compounds for clinical development has been a problem. In this study, we focus on the sponge life cycle to identify biosynthetic gene clusters of bioactive natural products and their producers. As a result, we found the biosynthetic gene cluster of mycalolides, inhibitors of actin depolymerization, and its producing bacteria. We also revealed that the *Mycale* sponge inherits symbiotic bacteria producing mycalolides from parents to offspring via microbial transmission.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：海洋天然物 共生微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最も原始的な多細胞動物である海綿動物は、極めて単純な体構造を持つにも関わらず、6億年以上もの間、その体構造を大きく変えることなく進化してきた。この背景には、微生物との共生がある。微生物の役割として、宿主への栄養源の供給、物質循環の環境構築に加え、二次代謝産物による化学防御があげられる。実際に、海綿は海洋無脊椎動物の中でも際立って多くの二次代謝産物を含んでおり、多くの天然物が研究試薬や医薬品として利用されていることから、重要な海洋生化学資源のひとつとして認識されている。しかしながら、海洋天然物の化学構造が複雑であり、臨床開発に必要な試料を十分供給できないことが問題になっている。サンプルを十分に供給できれば、海洋生物から発見された3万以上の化合物、もしくは未報告の膨大な数のケミカルライブラリーの中に、医薬資源として有効利用できる化合物が存在する可能性は高い。この問題を解決するためには、1. 生産微生物の培養、2. 生合成遺伝子の異種発現、などが考えられるが、海綿由来の天然有機化合物のほとんどは、生産者も生合成遺伝子も明らかにされていなかった。

Piel らは八丈島のカイメン *Theonella swinhoei* に含まれる30種以上の化合物が、*Entotheonella* という海綿特有の共生微生物により生産されることを遺伝子レベルで明らかにし、難培養性の共生微生物が新たな生物資源として利用できることを証明した。(文献1)その後、脇本らにより、*Discodermia calyx* に含まれる複数の生物活性物質がやはり *Entotheonella* 属の微生物によって生産されることが明らかにされた(文献2)。しかしながら、依然として多くの天然有機化合物の生産者あるいは生合成遺伝子に関しては未解明のままである。。

2. 研究の目的

申請者らはカイメン *Mycale* sp. の水槽での飼育に成功し、卵形成、胚発生、幼生を経て、次世代の個体にまで成長させることに成功した。そこで、これまでの研究の知見から共生における生物学的意義を考慮し、宿主にとって重要な微生物は垂直伝播するのではないかという仮説を立て、胚もしくは幼生に含まれる微生物を対象に研究を開始した。すなわち、このライフサイクルにおける共生微生物を精査し、細胞毒性物質の生産者、生合成遺伝子、および、その伝播機構の解明を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. カイメン *Mycale* sp. の採集

本研究では熊本県上天草市および三重県鳥羽市で生息しているカイメン *Mycale* sp. を研究対象とした。まず特定の時期に放出される当該カイメンから胚、および、幼生を採集した。幼生はさらにシャーレに着底させ、屋内水槽、屋外水槽、および、野外で飼育した。飼育した第2世代のカイメンを採集して以下の研究に用いた。

3-2. カイメン *Mycale* sp. 微生物叢のメタゲノム解析

当該カイメンの親個体から得た微生物画分からメタゲノムを抽出した。また、胚および幼生からもメタゲノムを抽出した。得られたメタゲノムを精製し、Illumina HiSeq でメタゲノム解析をおこなった。得られたリードを複数のソフトウェアでアセンブルを実施し、コンティグを得た。続いて、二次代謝産物の生合成遺伝子解析ソフト antiSMASH にて解析した。また、親個体および幼生のメタゲノムのうち高分子領域を別途精製し、Oxford Nanopore Minion にてメタゲノム解析をおこなった。

3-3. カイメン *Mycale* sp. ライフサイクルの各ステージにおける微生物叢解析

微生物叢解析はメタゲノムを抽出後、16S rRNA の V3-V4 領域を PCR で増幅し、アンプリコンを Illumina Miseq にて解析をおこなった。胚および幼生の微生物叢解析においては、同一の親から得られる 100 個体程度を用いた解析と、胚および幼生の 1 個体ごとの解析を実施した。

3-4. カイメン *Mycale* sp. ライフサイクルの各ステージにおける二次代謝物解析

3-1 で得られた各ステージの試料を EtOH で抽出後、適切な前処理をおこなった後に LC-MS 解析を実施した。得られた LC-MS データから、全イオンを抽出し、試料ごとの類似性をクラスター解析にて評価した。

4. 研究成果

本研究では、主にカイメン *Mycale* sp. に含まれる有用な生物活性物質を対象に、生産微生物および生合成遺伝子の探索を実施した。三重県鳥羽市および熊本県上天草市で採集した試料を用いてメタゲノム解析をおこなった結果、微生物叢に多数の二次代謝産物の遺伝子クラスターが存在していることが明らかとなった。そこで、mycalolide 類の化学構造情報を基に非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) およびポリケチド合成酵素 (PKS) が含まれる遺伝子クラスターをスクリーニングした。その後、各遺伝子のモジュールを詳細に解析した結果、約 110 kb からなる遺伝子クラスターが mycalolide 類の生合成に関与していることを明らかにした (図 1)。続いて、リード数と GC 含量を指標に全てのコンティグをプロットした結果、上記生合成遺伝子が含まれるクラスターに Verrucomicrobia 門の微生物 (微生物 A) の 16S rRNA が含まれたことから、この微生物が mycalolide を生産する微生物であると推測した。遺伝子クラスター上の複数の関連遺伝子の blast 解析もまたこれらの結果を支持した。続いて、Minion を用いた長鎖 DNA 解析をおこない、Illumina Hiseq で得られたリードで補正をおこなった。その結果、微生物叢に含まれる複数の微生物の全ゲノム解析に成功し、mycalolide の生合成遺伝子と微生物 A の 16S rRNA が同一ゲノム上に存在したことから、微生物 A が mycalolide 生産菌であると決定した。なお、微生物 A は blast 解析で *Coralimargarita akajimensis* と最も近い相同性を示したが、その一致度が 86% であったことから、新種の微生物であると考えている。

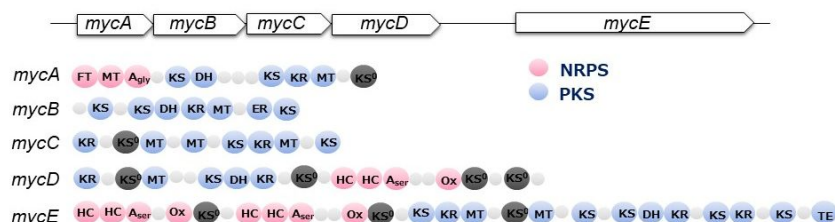


図 1. 推定の mycalolide 生合成遺伝子クラスター

続いて、三重県鳥羽市および熊本県上天草市で採集した試料を用いて微生物叢解析をおこなった。その結果、産地によって微生物叢に差異はあるものの、共通した微生物が存在していることが明らかとなった。また、親、胚、および幼生の微生物叢は組成比が多少異なる

ものの、主要な微生物は共通しており、全てのステージに微生物 A が存在していることが明らかとなった（図 2）。さらに胚、幼生 1 個体ごとの微生物叢を解析した。多数の胚および幼生からゲノム DNA を抽出して解析をおこなった際とは異なる微生物組成を示したものの、主要な微生物叢は存在していた。結果が異なったのは得られるゲノム DNA が少なく、環境微生物由来の 16S rRNA を増幅してしまった可能性がある。同様に屋内水槽、屋外水槽、および野外で飼育した試料からも同様の微生物叢を含むという結果が得られた。

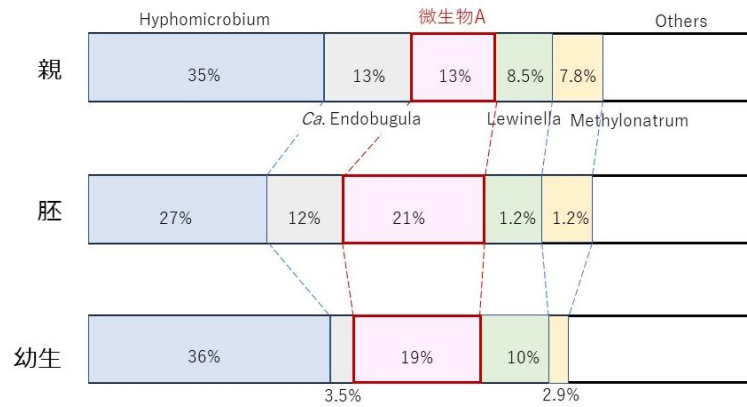


図 2 カイメン *Mycale* sp. のライフサイクルの各ステージにおける微生物叢組成

このように胚、幼生に mycalolide 生産菌である微生物 A の 16S rRNA、が存在していることが明らかとなったため、幼生に含まれる微生物叢のメタゲノム解析をおこない、mycalolide 生合成遺伝子の存在を確認した。すなわち幼生からゲノム DNA を抽出し、Illumina HiSeq で解析したところ、前述の mycalolide 生合成遺伝子クラスターの存在していた。

これら一連の研究から、mycalolide 生産菌は親から子へ垂直伝播によって継承されていくことが明らかとなった。すなわち、カイメンの生体防御を担う化合物を生産する微生物は水平伝播によって獲得するのではなく、確実に子孫へ受け継がれる共生システムを備えていることが考えられる。その詳細な移行メカニズムは明らかになっていないが、今後明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hitora Y, Takada K, Ise Y, Woo S.P, Inoue S, Mori N, Takikawa H, Nakamukai S, Okada S, Matsunaga S	4. 巻 28
2. 論文標題 Metachromins X and Y from a marine sponge <i>Spongia</i> sp. and their effects on cell cycle progression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 115233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115233	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suo R, Watanabe, R, Takada, K, Suzuki T, Oikawa H, Itoi S, Sugita H, Matsunaga S	4. 巻 67
2. 論文標題 Heptavalinamide A, an Extensively N-Methylated Linear Nonapeptide from a Cyanobacterium <i>Symploca</i> sp. and Development of a Highly Sensitive Analysis of N,N-Dimethylvaline by LCMS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Lett.	6. 最初と最後の頁 476-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b04420	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tian T, Takada K, Ise. Y, Ohtsuka S, Okada S, Matsunaga S	4. 巻 76
2. 論文標題 Microsclerodermins N and O, cytotoxic cyclic peptides containing a p-ethoxyphenyl moiety from a deep-sea marine sponge <i>Pachastrella</i> sp.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 130997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2020.130997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suo R., Takada K.*, Kohtsuka H., Ise Y., Okada S., Matsunaga S.*	4. 巻 81
2. 論文標題 Miuramides A and B, Trisoxazole Macrolides from a <i>Mycale</i> sp. Marine Sponge That Induce a Protrusion Phenotype in Cultured Mammalian Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Prod.	6. 最初と最後の頁 1108-1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b00101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suo, R., Takada K.*, Irie, R., Watanabe, R., Suzuki, T, Ise, Y., Ohtsuka, S., Okada, S., Matsunaga, S.*	4. 巻 81
2. 論文標題 Poecillastrin H, a Chondropsin-type Macrolide with a Conjugated Pentaene Moiety, from a Characella sp. Marine Sponge.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Prod.	6. 最初と最後の頁 1295-1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b00180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamukai, S., Takada, K.*, Furihata, K., Ise, Y., Okada, S., Morii, Y., Yamawaki N., Takatani, T., Arakawa, O., Gustafson, K.R., Matsunaga, S.*	4. 巻 59
2. 論文標題 Stellatolide H, a cytotoxic peptide lactone from a deep-sea sponge Discodermia sp.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 2532-2536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2018.05.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuhara, K., Takada, K.*, Watanabe, R., Suzuki, T., Okada, S., Matsunaga, S.*	4. 巻 81
2. 論文標題 Colony-wise Analysis of a Theonella swinhoei Marine Sponge with a Yellow Interior Permitted the Isolation of Theonellamide I.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Prod.	6. 最初と最後の頁 2595-2599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b00591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sun Y., Carandang R. R., Harada Y., Okada S., Yoshitake K., Asakawa S., Nogi Y., Matsunaga S., Takada K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Lactomycins A-C, Dephosphorylated Phoslactomycin Derivatives that Inhibit Cathepsin B, from the Marine-derived Streptomyces sp. ACT232	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md16020070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Irie R., Hitora Y., Ise Y., Okada S., Takada K., Matsunaga S.	4. 巻 74
2. 論文標題 Poecillastrin E, F, and G, cytotoxic chondropsin-type macrolides from a marine sponge Poecillastra sp.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 1430-1434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2018.01.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irie R., Takada K., Ise Y., Ohtsuka S., Okada S., Gustafson K., Matsunaga S.	4. 巻 19
2. 論文標題 Structure Revision of Poecillastrin C and the Absolute Configuration of the α -Hydroxyaspartic Acid Residue.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5395-5397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.7b02835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takada K., Irie R., Suo R., Matsunaga S.	4. 巻 80
2. 論文標題 Resolution of the Confusion in the Assignments of Configuration for the Ciliatamides, Acylated Dipeptides from Marine Sponges.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2845-2849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.7b00684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hitora Y, Takada K, Ise Y, Okada S, Matsunaga S.	4. 巻 79
2. 論文標題 Dragmacidins G and H, Bisindole Alkaloids Tethered by a Guanidino Ethylthiopyrazine Moiety, from a Lipastrotethya sp. Marine Sponge	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2973-2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.6b00710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueoka R, Hitora Y, Ito A, Yoshida M, Okada S, Takada K, Matsunaga S.	4. 巻 79
2. 論文標題 Curacin E from the Brittle Star <i>Ophiocoma scolopendrina</i>	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2754-2757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.6b00701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada K, Imae Y, Ise Y, Ohtsuka S, Ito A, Okada S, Yoshida M, Matsunaga S.	4. 巻 79
2. 論文標題 Yakushinamides, polyoxygenated fatty acid amides that inhibit HDACs and SIRT6, from a Marine Sponge <i>Theonella swinhoei</i>	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2384-2390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.6b00588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninomiya A, Katsuyama Y, Kuranaga T, Miyazaki M, Nogi Y, Okada S, Wakimoto T, Ohnishi Y, Matsunaga S, Takada K	4. 巻 17
2. 論文標題 Biosynthetic Gene Cluster for Surugamide A Encompasses an Unrelated Decapeptide, Surugamide F.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 ChemBiochem	6. 最初と最後の頁 1709-1712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201600350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高田健太郎
2. 発表標題 海綿動物の細胞毒性物質を生産する共生微生物と伝播機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田健太郎
2. 発表標題 海綿動物の細胞毒性物質を生産する共生微生物と伝播機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Takada
2. 発表標題 Biologically active secondary metabolites from marine-derived actinomycetes
3. 学会等名 The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kentaro Takada
2. 発表標題 Structures and a Function of Surugamides Isolated from Streptomycte
3. 学会等名 1st China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kentaro Takada
2. 発表標題 Structures and a function of cyclic peptides isolated from Streptomycte
3. 学会等名 15th MaNaPro (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	松永 茂樹 (Matsunaga Shigeki) (60183951)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	