

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13091

研究課題名(和文) 有用海洋シアノバクテリアの培養株構築と生合成遺伝子の解析

研究課題名(英文) Cultivation of Useful Marine Cyanobacteria and Analysis of Biosynthetic genes

研究代表者

末永 聖武 (Suenaga, Kiyotake)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：60273215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： カナミエナミドを産生する海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* について全ゲノム増幅を行った。吸光度・鎖長とも十分な質のゲノムサンプルが得られたことが確認できたので、次世代シーケンサーによる網羅的配列解析を行った。バイオインフォマティクス的手法によりメチルエノールエーテル構造をもつ鎖状ペプチド *lyngbyapeptin B* の生合成に関与すると思われる遺伝子を見出した。現在、モデル基質を用いた酵素反応と機能解析について検討している。また、カナミエナミドの全合成を達成し、その真の生物活性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Whole genome amplification of marine cyanobacteria *Moorea bouillonii* which produces kanamienamide were conducted. Amplified genome DNA had good quality and purity, its sequence analysis was performed and biosynthetic gene clusters of *lyngbyapeptin B* with enol ether moiety were found. Enzymatic reaction with model substrates have been investigated. In addition, total synthesis of kanamienamide was achieved. The several assays of synthetic kanamienamide revealed its real biological activity

研究分野：天然物化学

キーワード：海洋シアノバクテリア カナミエナミド エノールエーテル リングピアペプチンB 全ゲノム増幅 全合成 生物活性

1. 研究開始当初の背景

海洋シアノバクテリアは、様々な海洋天然物の真の生産者であると考えられている。しかしながら海洋シアノバクテリア自体を対象とした生物活性物質探索は世界的に例が少なく、年間発見される海洋天然物のうち、わずか 1% 程度にとどまっている [Nat. Prod. Rep. 2015, 32, 116.]。

このような背景の下、申請者は日本近海の海洋シアノバクテリアに着目し、その二次代謝産物の探索研究を行った。その結果、二次代謝産物の生産能が非常に高い数種のシアノバクテリアを発見し、10 種を超える有用な新規生物活性物質を発見した [Org. Lett. 2015, 17, 652. など]。これらの研究を通じて、申請者は日本近海の海洋シアノバクテリアの二次代謝産物の重要性を示した。その一方で、これらの化合物の生合成経路の解明や、遺伝子資源としての海洋シアノバクテリアの重要性は明らかにされていない。

本研究は、これらのシアノバクテリアを培養株化し、その全ゲノム解析を行う。それによって、生物活性物質探索における海洋シアノバクテリアの有用性を、生合成遺伝子の観点から明らかにすることができる。

2. 研究の目的

(1) 二次代謝産物生産能が高い海洋シアノバクテリアの培養株化

海洋シアノバクテリアの多くは難培養性である。このことは発展的な研究を進める上で障害となる。そこで本研究では、海洋シアノバクテリアの培養株化を目指す。培養株の確立により、生物種の安定した供給が実現する。

(2) 二次代謝産物生産能が高い海洋シアノバクテリアの全ゲノム解析法の確立

海洋シアノバクテリアの表面には、多量の夾雑生物が付着しているため、純度の高い遺伝子を得ることが困難である。それが、全ゲノム解析の障害となっている。本研究では、温和な条件下での夾雑生物の除去法を開発することで、海洋シアノバクテリアの全ゲノム解析法を確立する。

(3) 二次代謝産物生産能が高い海洋シアノバクテリアの生合成遺伝子の評価

全ゲノム解析の結果を基に、海洋シアノバクテリアの物質生産能を評価する。具体的には、当研究室で見出した生物活性物質の生合成経路の解析、および未知の生合成遺伝子ク

ラスターの発見とコードする化合物の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 二次代謝産物生産能が高い海洋シアノバクテリアの培養株化

二次代謝産物生産能の高い海洋シアノバクテリアの採集を行った。従来の探索研究における知見から、研究対象の海洋シアノバクテリアを沖縄県中部～北部、および鹿児島県の奄美群島を中心とする地域において採集した。

海洋シアノバクテリアの培養株の作成

二次代謝産物生産能の高い海洋シアノバクテリアの培養株作成を検討した。培養装置として照明付き低温インキュベータを用い潮間帯の環境を実験室で再現し、培地成分である微量金属やビタミン、無機塩、土壌抽出物等の種類・濃度について網羅的に検討した。増殖能については、乾重量もしくは光合成色素（フィコビルン類）の蛍光強度から定量した。

培地中のビタミン濃度、培養スケール、夾雑生物の除去が重要な要因であることがわかったため、これらの要因を中心に検討を行った。

(2) 二次代謝産物生産能が高い海洋シアノバクテリアの全ゲノム解析

本研究で用いた繊維状のシアノバクテリアは、多糖質の鞘に包まれていた。この鞘はゲノムの抽出を妨げるとともに、バクテリアを大量に含むため、コンタミの原因となる。シアノバクテリアは微細な生物であるため、この鞘の物理的な除去は困難であった。そこで、界面活性剤と酵素で処理することにより、温和な条件下での化学的な手法による鞘の除去を検討した。しかし、その効果は限定的であった。種々検討の結果、シアノバクテリアを液体窒素により凍結したのち破砕し、ゲノム抽出中に遠心操作を複数回組み込むことによって、鞘の大部分を取り除くことができた。

シアノバクテリアの培養について種々検討したが、その増殖速度は非常に遅かったため、全ゲノム解析に十分な量の DNA を確保することができなかった。そこで、生物量に依存しない全ゲノム解析法の開発を目指して、数個～数百個の細胞の遺伝子を鋳型とした全ゲノム増幅法を試みた。

少量の鋳型 DNA をもとにした全ゲノム増幅には、Phi29 ポリメラーゼを用いた Multiple Displacement Amplification (MDA) 法を利用した。増幅したゲノムの純度は吸光度測定 ($A_{260/280}$ 値) により確認した。鎖長は電気泳動により確認した。目的とする生物由来の遺伝子が得られていることは、16S rDNA の配列解析で確認した。

以上の評価のもと、適切なサンプルが得られたカナミエナミド産生シアノバクテリア *Moorea bouillonii* については、次世代シーケンサーによる網羅的配列解析を実施した。

海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* の配列情報に対して、バイオインフォマティクス的手法によりカナミエナミドや関連物質の生合成遺伝子クラスターの探索を行った。

また、カナミエナミドの全合成研究を行った。市販の光学活性原料を出発物質に用い、大環状構造を光延法により構築し、エノールエーテル部分を最終段階で導入し、全合成を達成した。合成品を用いて生物活性試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 海洋シアノバクテリアの培養株化

沖縄や奄美地方で最終した二次代謝産物生産能の高い海洋シアノバクテリアについて、照明付き低温インキュベータを用いて培養条件について種々検討したが、今のところ培養株の確立には至っていない。しかしながら、増殖速度が遅いながらも小規模な培養が可能なシアノバクテリアも少数あった。今後、培養の成否には何が重要な要因であったのかを精査することで、培養株化に繋がる知見を得たい。

(2) 海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* の全ゲノム増幅・解析

カナミエナミドを産生する海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* について、Phi29 ポリメラーゼを用いた全ゲノム増幅を行った。吸光度・鎖長とも十分な質のゲノムサンプルが得られたことが確認できたので、次世代シーケンサーによる網羅的配列解析を行った。バイオインフォマティクス的手法によりカナミエナミドの生合成遺伝子クラスターを探索したが、今のところ目的の生合成遺伝子を見つけることはできていない。しかし、チアゾール環およびメチルエノールエー

テル構造をもつ鎖状ペプチド lyngbyapeptin B の生合成に関与すると思われる遺伝子を見出した。現在、モデル基質を用いた酵素反応と機能解析について検討している。メチルエノールエーテルはカナミエナミドにも含まれる部分構造であり、関連性を今後検討する。

(3) カナミエナミドの全合成

市販の光学活性原料、Roche エステルを出発原料として、最長直線工程 23 段階、総収率 6.4% でカナミエナミドの全合成を達成した。環化の位置・条件は種々検討したが、光延ラクトン化により最もよい結果が得られた。論文投稿中に、He らによりカナミエナミドの初の全合成が達成されたため、本研究は 2 例目の合成となった。合成品を用いて生物活性試験を実施したところ、天然品に比べて増殖阻害活性が約 10 分の 1 と弱く、ネクロトーシス様の細胞死であった。天然品で見られたアポトーシス様の細胞死は、極微量含まれる不純物に由来すると思われる。全合成を達成したことで、カナミエナミドの真の生物活性を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Daisuke Ojima, Arihiro Iwasaki, Kiyotake Suenaga: Total Synthesis of Kanamienamide and Clarification of Biological Activity. *The Journal of Organic Chemistry*, **82** (23), 12503-12510 (2017). (査読有)

2. Arihiro Iwasaki, Ikuma Shiota, Shimpei Sumimoto, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, Kiyotake Suenaga: Kohamamides A, B and C, Cyclic Depsipeptides from an *Okeania* sp. Marine Cyanobacterium. *Journal of Natural Products*, **80** (6), 1948-1952 (2017). (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 小林正幸・澄本慎平・四宮誠一・照屋俊明・岩崎有紘・末永聖武: 海洋産リポペプチド Minnamide A の合成研究と立体化学の決定 日本化学会第 98 春季年会 (日本大学船橋キャンパス), 4D1-46, 2018 年 3 月 23 日

2. 小島大輔・岩崎有紘・末永聖武: エナミド構造を有する 11 員環マクロラクトン Kanamienamide の合成研究, 日本化学会第 98 春季年会 (日本大学船橋キャンパス), 2D2-37, 2018 年 3 月 21 日

3. 小島大輔・岩崎有紘・末永聖武: エナミド構造を有する環状デプシペプチド Kanamienamide の合成研究, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学日吉キャンパス),

2C7-51, 2017年3月17日

4. 四宮誠一・澄本慎平・岩崎有紘・末永聖武:海洋産リポペプチド Minnamide A の合成研究, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学日吉キャンパス), 2C7-42, 2017年3月17日

5. 澄本慎平・四宮誠一・岩崎有紘・犬塚俊康・照屋俊明・末永聖武:海洋シアノバクテリア由来新規リポペプチド Minnamide 類の単離と構造決定, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学日吉キャンパス), 2C7-40, 2017年3月17日

6. 塩田育万・澄本慎平・岩崎有紘・末永聖武:海洋シアノバクテリア由来の新規環状デプシペプチド kohamamide 類の単離と構造. 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学日吉キャンパス), 2C7-35, 2017年3月17日

7. 澄本慎平, 四宮誠一, 岩崎有紘, 大野修, 犬塚俊康, 照屋俊明, 末永聖武:海洋シアノバクテリア由来のリポペプチドの構造, 第58回天然有機化合物討論会 (仙台), p121-126, 2016年9月15日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://user.keio.ac.jp/~suenaga/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末永聖武 (Suenaga Kiyotake)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 60273215

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

岩崎有紘 (Iwasaki Arihiro)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号: 00754897

工藤史貴 (Kudo Fumitaka)
東京工業大学・理工学部研究科・准教授
研究者番号: 00361783

(4) 研究協力者

()