

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14811

研究課題名（和文）カイメンにおけるメンブレンベシクルを介した物質輸送の解明

研究課題名（英文）Transport of secondary metabolites via membrane vesicles in sponges

研究代表者

二宮 章洋 (Akihiro, Ninomiya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：50823522

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、カイメン *Theonella swinhoei* から、遠心分離と密度勾配遠心分離によってメンブレンベシクルを単離し、透過電子顕微鏡によって観察した。高速液体クロマトグラフィー-質量分析によって、メンブレンベシクルにカイメンの共生細菌 *Entotheonella* が産生する二次代謝産物が含まれることが明らかになった。さらに、RNAシーケンシング解析によって、メンブレンベシクルに二次代謝産物の生合成遺伝子の転写産物が含まれることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿動物において、共生細菌がどのような機構を通して化合物を輸送するかについては理解が進んでいない。本研究は、カイメン中のメンブレンベシクルに共生細菌が産生する二次代謝産物が含まれることを示した。海綿動物中の物質輸送に関して新しい知見を与えると同時に、複雑な微生物叢からなる環境における二次代謝産物の輸送について理解を深めるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, membrane vesicles were isolated from the sponge *Theonella swinhoei* by centrifugation and density gradient ultracentrifugation, and observed by transmission electron microscopy. Liquid chromatography-mass spectrometry analyses revealed that the membrane vesicles contain several secondary metabolites produced by *Candidatus Entotheonella* sp. Furthermore, RNA-sequencing analyses suggested that transcriptional products of biosynthetic genes for the secondary metabolites are contained in the membrane vesicles.

研究分野：天然物化学

キーワード：カイメン メンブレンベシクル 二次代謝産物 共生細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 共生細菌エントセオネラは卓越した物質産生能を持つ

カイメンやホヤをはじめとする海洋無脊椎動物は、多様な化学構造を持つ低分子化合物を含むことから、新規有用物質の探索源として利用されてきた。実際、カイメンからはエリブリン、ホヤからはトラベクテジンとプリチデプシンという抗がん剤が開発され、上市されている。近年、このような二次代謝産物の生産者は無脊椎動物自身ではなく、共生細菌であることを示す報告が複数挙がっている。^[1]カイメンとホヤは 1 cm^3 あたり最大 10^9 程度の細菌を含むことが知られており、^[2]共生細菌が複雑な微生物叢を形成していると考えられる。カイメン *Theonella swinhoei* は、海洋無脊椎動物の中でも特に多様な二次代謝産物を含む種であり、抗菌、抗真菌、細胞毒性等の生物活性を示す、20 を越えるグループの化合物が当該種から報告されている。^[3]近年、驚くべきことに、*T. swinhoei* から報告されている二次代謝産物の大半は *T. swinhoei* に共生する「エントセオネラ」という細菌によって産生されることが明らかになった。^[1a]エントセオネラ自身は難培養性であるが、ゲノム情報を基に、二次代謝産物の生産者とみなされている。エントセオネラは生育する地域に依らず *T. swinhoei* に普遍的に見られることから、宿主の生育に重要な役割を果たす微生物であると考えられる。

(2) メンブレンベシクルは物質輸送を担う小胞である

メンブレンベシクル (MV) は脂質二重膜から構成される小胞で、タンパク質、核酸、シグナル伝達物質等の生体分子を内包、輸送する。MV は細菌において、微生物間相互作用、宿主との相互作用、薬剤耐性獲得等、重要な生命現象に関与することが明らかになりつつある。^[4]最近、放線菌が抗生物質を含む MV を産生することで対峙する細菌の生育を抑制することが報告されており、^[5]実際の生態系においても二次代謝産物を内包する MV が微生物間相互作用に寄与することを示唆している。

2. 研究の目的

カイメンにおいてエントセオネラは、宿主であるカイメン、およびカイメンに含まれる多様な微生物と対峙しており、エントセオネラが産生する生物活性物質はこれら対峙する生物との相互作用に影響を与えると予想される。従って、複雑な共生系における宿主-微生物間、および微生物間相互作用を理解する上で、共生細菌による二次代謝産物の輸送機構を明らかにすることは重要である。研究代表者はこのような背景の下、「エントセオネラは MV を用いて二次代謝産物を菌体外に分泌する」という仮説を立て、カイメン由来の MV 画分に含まれる化合物を調べた結果、過去にカイメンから報告された二次代謝産物を検出した。この結果を受けて、エントセオネラによる MV を介した物質輸送機構を解明する本研究を着想した。本研究課題の目的は、「卓越した物質産生能を持つカイメン共生細菌は、どのような物質を、どのような機構を通して、どこへ輸送するか」を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) MV 精製

本研究では、八丈島沖で採取した、内部が黄色 (*T. swinhoei* yellow; TSY) と白色 (*T. swinhoei* white; TSW) の *T. swinhoei* を用いた。カイメンを破砕後、破砕液を遠心分離し、MV 画分を得た。当該画分を、iodixanol を密度媒体とした密度勾配遠心分離によって分画した。得られたフラクションについて、脂質二重膜の染色に用いられる蛍光色素 FM4-64 を用いて、蛍光の強さを指標に、どの画分に膜成分が多く含まれるかを調べた。脂質二重膜が多く含まれる画分について、ネガティブ染色法によって顕微鏡観察をおこない、MV が含まれる画分を明らかにした。さらに、TSY については、MV を樹脂に包埋してスライスした切片を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

(2) 化合物の分析

(1) で得られた MV について、有機溶媒を用いて抽出し、抽出物を高速液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) によって分析した。

(3) 転写産物の分析

(1) で得られた MV について、TRIzol 試薬を用いて RNA を抽出し、PureLink キットを用いて精製した。得られた RNA を DNase I 処理し、DNA を除去した。反応液を RNA Clean & Concentrator キットを用いて精製し、全 RNA を得た。cDNA ライブラリ作製とシーケンス解析は外部業者に委託して実施した。

4. 研究成果

(1) TSY の MV 精製

TSY の破砕液から得た MV 画分を、密度勾配遠心分離に供した結果、3 本の黄色いバンドが観

察できた（上からそれぞれバンド A, B, および C とする）。また, 染色によってこれらのバンドに脂質二重膜が比較的多く含まれることが明らかになった。そこで, 各画分をネガティブ染色によって観察したところ, バンド A と B には直径 100 μm 程度の小胞状の構造物が見られたが（図 1A）, バンド C には小胞状の構造物はほとんど含まれず, 生体膜の破片のような構造物が多く見られた。以上の結果から, バンド A と B は MV を含むバンドであると結論づけた。バンド A と B について, MV を樹脂に包埋し, 切片を TEM で観察したところ, MV の大半は単層の脂質二重膜から構成されることが示唆された（図 1B）。

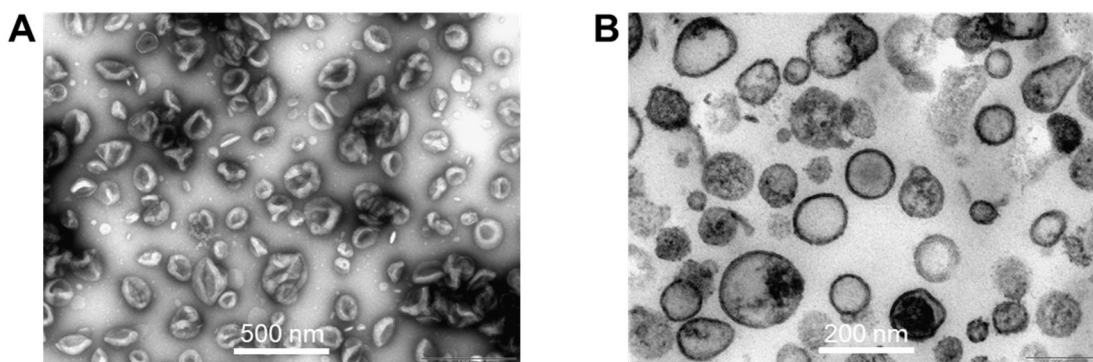


図 1. (A) TSY 由来の MV をネガティブ染色によって観察し得られた像。(B) TSY 由来の MV を樹脂に包埋し, 切片を TEM 観察し得られた像。

(2) TSW の MV 精製

TSY と同様にして, MV 画分を密度勾配遠心に供した結果, 2 本の褐色のバンドが生じ（上からバンド D および E とする）, バンド D と E は脂質二重膜を比較的多く含むことが明らかになった。TSY と同様にネガティブ染色によって観察したところ, バンド D には直径 50 μm 以下の小胞状の構造物が（図 2）, バンド E には生体膜の破片のような構造物が多く見られた。以上の結果から, バンド D は MV を含むバンドであると結論づけた。

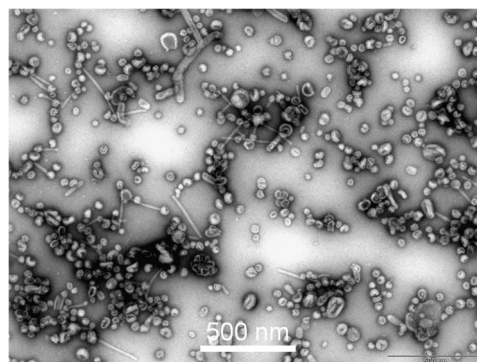


図 2. TSY 由来の MV をネガティブ染色によって観察し得られた像。

(3) 化合物の分析

密度勾配遠心の結果得られた各画分を, エタノールによって抽出し, 抽出物を LC-MS 分析に供した。その結果, TSY では, MV 画分にオンナミドとテオネラミドを検出した。一方, TSW では, MV 画分にテオネラミドとミサキノリドを検出した。以上の結果は, MV に二次代謝産物が含まれることを示唆するものである。

(4) 転写産物の分析

TSW から得た MV から RNA を抽出し, RNA シーケンシング解析をおこない, 48 M リードからなるデータを得た。これらのリードを, *Candidatus Entotheonella sarta* のテオネラミド, およびミサキノリドの生合成遺伝子クラスターに対してマッピングした。その結果, raw transcript count の値が 1.2-7.1 と低い, 生合成遺伝子の転写産物が存在することを示唆する結果を得た。

< 引用文献 >

- [1] (a) Wilson, M. C. *et al.* (2014). *Nature* 506, 58–62, (b) Rath, C. M. *et al.* (2011). *ACS Chem. Biol.* 6, 1244–1256, (c) Xu, Y. *et al.* (2012). *J. Am. Chem. Soc.* 134, 8625–8632, [2] McCauley, E. P. *et al.* (2020). *J. Antibiot.* 73, 504–525, [3] Winder, P. L. *et al.* (2011). *Mar. Drugs* 9, 2643–2682, [4] Toyofuku, M. *et al.* (2015). *Adv. Colloid Interface Sci.* 226, 65–77, [5] Hoefler, B. C. *et al.* (2017). *Cell Chem. Biol.* 24, 1238–1249.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------