

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790134

研究課題名（和文） 海洋メタゲノムからの金属結合物質シデロフォアの生合成遺伝子探索と異宿主生産

研究課題名（英文） Cloning and Expression of Siderophore Biosynthetic Gene Clusters from Marine Metagenome

研究代表者

藤田 雅紀（FUJITA MASAKI）

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：30505251

研究成果の概要（和文）：これまでにメタゲノムライブラリから 50 以上のシデロフォア生産クローンを取得し、4 つのクローンについてはその生合成遺伝子クラスター全長を決定した。また、取得した活性クローンのうち 2 つを解析し vibrioferrin と bisucaberin をその活性成分として同定した。Vibrioferrin 生産クローンにおいては、本来の生産菌の 40 倍という高い生産量を示した。一方、bisucaberin 生合成遺伝子はその配列から未解析微生物由来である事が示唆された。また、他のクローンからは遺伝子クラスター全長が 25 kbp 以上という、機能ベースメタゲノム法で取得された生合成遺伝子クラスターとしては最大級のものを見出した。以上の成果は、機能性メタゲノム法による生合成遺伝子の探索と異宿主生産の実用性と応用性を示すものである。

研究成果の概要（英文）： More than 50 siderophore producing clones were found from the marine metagenomic library. Among them, DNA sequences of the four clones were determined. By chemical and spectroscopic methods, vibrioferrin and bisucaberin were identified as active products from the obtained clones. Especially, isolation yield of vibrioferrin was 40 times higher than that of the original producer. The other clone had a biosynthetic gene cluster whose total size was about 25 kbp which is one of the largest one found by functional metagenomic screening. These results suggested the promising potential of the functional metagenomic technique for cloning of biosynthetic genes and heterologous production of active molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：天然物化学・生合成・メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

（1）研究背景 メタゲノム法は環境中から微生物の分離培養を経ず直接ゲノム DNA を

抽出し解析する手法である。環境中微生物のうち 99% 以上は人工環境下での培養が困難であるとされ、そのような大多数の難培養微

生物を利用・解析する手法として注目されている。

一方、海洋無脊椎動物からは数多くの生理活性物質が報告されており、その中には医薬品資源として有望なものも少なくない。しかしながら、無脊椎動物由来海洋天然物の大半は供給の問題からほとんど利用されていない。また、それら物質の多くはその共生微生物が生産していると考えられているが、共生菌の培養もほとんどの場合不可能である。

以上の理由から、メタゲノム法を海洋微生物に適用し、有用海洋天然物の生合成遺伝子を取得し、生物工学的に物質生産する事は、これまで供給の問題から利用できなかった有望な海洋天然物の活用を可能にするものである。

(2) 申請研究の経緯 我々の研究室では生物多様性の高い有明海の干潟砂泥や海洋無脊椎動物を対象に約 30 万クローンからなる海洋メタゲノムライブラリを作成した。また海洋環境が鉄イオン不足であり、海洋微生物の多くが生体必須元素である鉄イオン獲得のため金属結合物質シデロフォアを生産する事に着目し、新規スクリーニング系を計画した。シデロフォアは金属酵素阻害剤としてガンの抗転移剤のリード化合物となりうるものであり、またその他多くの金属タンパク質に作用し様々な生理活性の発現が期待される物質である。そのため多様な新規物質の探索さらにはその安定的な供給が求められている。

メタゲノムライブラリに対して金属呈色試薬 Chrome Azurol S を用いたシデロフォア探索アッセイを行ったところ、これまでに 50 を超えるシデロフォア生産クローンを見出している。

## 2. 研究の目的

シデロフォア探索スクリーニングにおいて見出された活性クローンから、分子生物学的手法による生合成遺伝子の解析、および有機化学的手法による生産物の精製と構造決定を行い、医薬品資源として有望なシデロフォアの探索と生物工学的な生産系の確立を目的とする。

得られた物質については各種バイオアッセイ系でその詳細な生物活性の検討を行う。有望な活性が見出された化合物については、生合成遺伝子の高発現系構築、あるいは生合成前駆体の投与などにより、実用的な生産系の構築を行う。

## 3. 研究の方法

シデロフォア生産クローンから、活性発現に必要な最低限の DNA 領域をサブクローニングし、その配列の決定を行う。また、得られた情報を元に物質生産用の高発現クローンを作成する。生産用クローンを培養後、有機化学的手法を用いて活性物質の抽出と精製および構造決定を行う。

また、取得した生合成遺伝子の改変を行い、生合成的構造変換等の、生産物多様化の検討をおこなう。

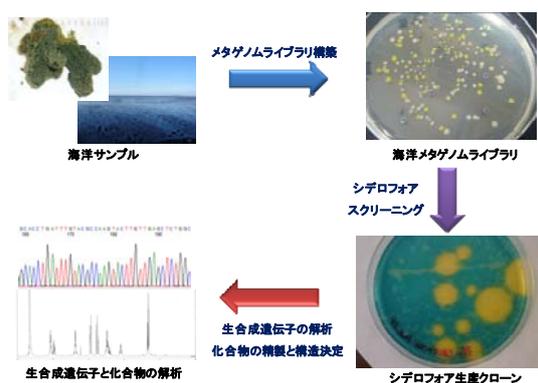


図 1. 研究計画の概要。

## 4. 研究成果

(1) **Vibrioferrin** 有明海干潟砂泥より構

築したメタゲノムライブラリから顕著なシデロフォア生産活性を示すクローンを見出した。全長約 35 kbp の Fosmid ベクターから活性発現に必須の領域をサブクローニングし、DNA 配列を決定したところ、5 個の ORF を含む約 7 kbp の領域を特定した。BLAST 検索の結果、それら ORF は *Vibrio* 属細菌由来のシデロフォアである vibrioferrin 生合成遺伝子クラスターと高い相同性を示したことから、本クローンも vibrioferrin あるいはその類縁化合物を生産している事が示唆された。

活性クローンを培養後、シデロフォア活性が認められた培養上清より各種クロマトグラフィーにて活性成分の精製を進め、最終的に逆相 HPLC により活性成分を得た。NMR および MS 等のスペクトル解析により、本物質を遺伝子構造から予測された vibrioferrin であると同定した。

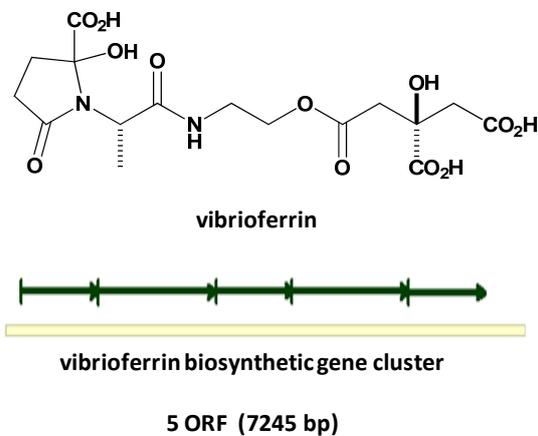


図 2. Vibrioferrin の構造と生合成遺伝子クラスター。

その生産量は 92.6 mg/L であり、本来の生産菌である *Vibrio parahaemolyticus* と比較し 40 倍もの高収率であった。また、*V. parahaemolyticus* が vibrioferrin の生産に鉄を厳密に除去した特殊な培地が必要であるのに対して、本クローンは通常の培地で良いな

ど、異宿主生産の有用性を示した。5 つの生合成遺伝子を必要とする、比較的複雑な構造を持つ化合物の生合成遺伝子をメタゲノム法で取得し、また効率的に異宿主生産できた事は本方法論の実用性を示すものであった。

(2) Bisucaberin トカラ列島沖水深 150-1000 m の深海堆積物由来メタゲノムライブラリから、シデロフォア生産クローンを取得した。前述と同様の手法で、原因遺伝子を解析したところ、4 つの ORF からなる全長約 5 kbp の生合成遺伝子クラスターを見出した。相同性解析の結果、*N*-hydroxy-*N*-succinyl cadaverine (HSC) 型シデロフォア生合成遺伝子との類似性が認められたが、その相同性は 40-60% であり、また HSC 型シデロフォアは複数知られていることから、DNA 配列からの生産物の推測は困難であった。

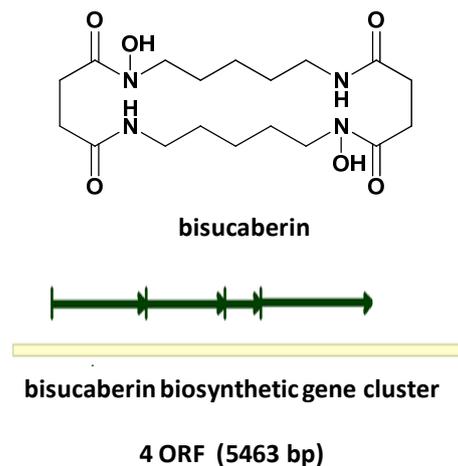


図 3. Bisucaberin の構造と生合成遺伝子クラスター。

そこで、活性を指標に化合物を精製後、各種スペクトルデータから構造を解析し、生産物を *N*-hydroxy-*N*-succinyl cadaverine の大環状 2 量体である bisucaberin と決定した。これまでに *Vibrio* 属細菌から bisucaberin の生合成遺伝子が報告されているが、今回取得したものは遺伝子クラスターの構成が異なり、また DNA 配列も大きく異なる事から、未解析微生物

物由来の生合成遺伝子クラスターであると考えられた。本結果は、メタゲノム法により未解析微生物由来の遺伝資源を取得し実際に物質生産まで行える事を示すものである。

**(3) Vibriobactin 関連物質** 天草産海綿より構築したメタゲノムライブラリ中にシデロフォア生産活性クローンを見出した。前述の手法により、その必須遺伝子のサブクローニングを試みたが、小さな DNA 断片では活性を失うことから、本化合物の生産には大きな生合成遺伝子クラスターが関与していると推測し、約 35 kbp の Fosmid ベクター全長の DNA 配列を決定した。

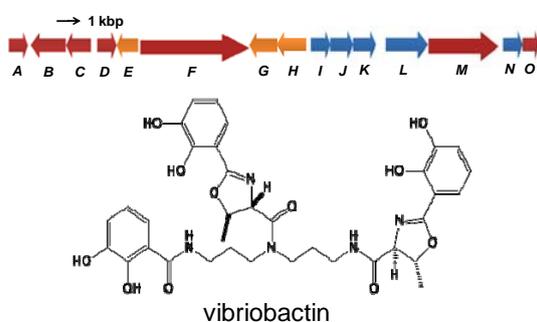


図 4. 取得した生合成遺伝子クラスターおよび配列相同性から関連が推測された vibriobactin の構造。

その結果、15 の ORF からなる約 25 kbp の生合成遺伝子クラスターであった。相同性解析の結果、*Vibrio* 属細菌由来の vibriobactin 生合成遺伝子クラスターとの相関が認められたが、vibriobactin クラスターに存在する遺伝子の一部が欠損しており、また逆に機能不明の遺伝子が複数存在するなど、明らかに異なる特徴を有する事から、新規化合物の生産が示唆された。これまで約 25 kbp という大きな生合成遺伝子クラスターが、機能ベーススクリーニング法で取得された例は無く、メタゲノム法の応用性の広さを示す例である。

一方、その生産物解析を試みたが、液体培養を行うと生産性が大きく下がる事、また生

産物の安定性の問題から未だ単離に至っていない。今後は、決定した DNA 配列をもとにサブクローニングを行い、不要な遺伝子の除去や発現の活性化などにより生産性の向上を行い、新規化合物と推測される生産物の同定を進めていく計画である。

#### 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 4 件)

(1) Fujita, M. J.; Nakano, K.; Sakai, R.; Bisucaberin B, a Linear Hydroxamate Class Siderophore from the Marine Bacterium *Tenacibaculum mesophilum*; *Molecules* 2013, 18, 4, 3917-3926.; doi:10.3390/molecules18043917 (査読有り)

(2) Nasuno, E.; Kimura, N.; Fujita, M. J.; Nakatsu C.; Kamagata, Y.; Hanada, S.; Phylogenetically novel LuxI/LuxR-type Quorum Sensing Systems Isolated Using a Metagenomic Approach; *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 22, 8067-8074.; doi:10.1128/AEM.01442-12 (査読有り)

(3) Fujita, M. J.; Kimura, N.; Yokose, H.; Otsuka, M.; Heterologous production of bisucaberin using a biosynthetic gene cluster cloned from a deep sea metagenome.; *Mol. BioSyst.*, 2012, 8, 482-485.; doi:10.1039/C1MB05431G (査読有り)

(4) Fujita, M. J.; Kimura, N.; Sakai, A.; Ichikawa, Y. Hanyu, T.; Otsuka, M.; Cloning and heterologous expression of the vibrioferrin biosynthetic gene cluster from a marine metagenomic library.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75, 12, 2283-2287.; doi:10.1271/bbb.110379 (査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

① 藤田雅紀・酒井隆一、海洋細菌からの非環状ヒドロキサム酸型シデロフォアの単離と推定生合成遺伝子のクローニング、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26 - 30 日、東京海洋大学 (東京)

② 藤田雅紀、メタゲノム法による難培養海洋環境微生物からの新規生合成マシナリーの探索と物質生産、生合成マシナリー第 4 回公開シンポジウム、2012 年 12 月 7 日、東京大学 (東京)

③ 藤田雅紀、メタゲノム法を用いた海洋天然物の異宿主生産、日本農芸化学会東北支部会第 13 回若手の会、2012 年 10 月 5 日、星と森のロマンピア (青森)

④ Masaki Fujita; Functional metagenomic study on marine natural products chemistry; 2012 International Conference of Natural Products Biosynthesis (8th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products); 2012年6月17-22日; 淡路夢舞台 (兵庫)

⑤ 藤野悠那・大塚雅巳・藤田雅紀、海洋メタゲノム由来シデロフォア生産クローンの解析、第132回日本薬学会年会、2012年3月26-30日、北海道大学 (北海道)

⑥ Masaki Fujita, Masami Otsuka; Heterologous Production of Siderophores by Metagenomic Approach; Gordon Research Conference, Marine Natural Products; 2012年2月26日-3月2日, Ventura Beach Marriott (California, USA)

⑦ Masaki Fujita; Heterologous Production of Siderophores by the Genes Cloned from a Marine Metagenome; 2011 US-Japan Bioorganic Marine Chemistry; 2011年12月11-16日; 沖縄コンベンションセンター (沖縄)

⑧ 藤田雅紀、メタゲノム法による難培養海洋環境微生物からの新規生合成マシナリーの探索と物質生産、生合成マシナリー第3回公開シンポジウム、2011年12月3日、東京大学 (東京)

⑨ 藤田雅紀、メタゲノム法による難培養海洋環境微生物からの新規生合成マシナリーの探索と物質生産、生合成マシナリー第2回公開シンポジウム、2011年6月4日、東京大学 (東京)

[図書] (計1件)

(1) 藤田雅紀, 他、東京化学同人、生体有機化学、2012、3-14

[その他]

ホームページ等

<http://www.cris.hokudai.ac.jp/fujita/index.html/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 雅紀 (FUJITA MASAKI)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：30505251

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし