

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5月1日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24651246

研究課題名（和文） 海洋無脊椎動物共生微生物系のケミカルバイオロジー

研究課題名（英文） Chemical Biology on the Symbiotic System in Marine Invertebrates

研究代表者

中尾 洋一（NAKAO YOICHI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60282696

研究成果の概要（和文）：

海洋無脊椎動物はユニークな化合物の宝庫であり、これらの化合物の多くが、海洋無脊椎動物に共生している微生物由来であることが明らかとなってきた。そこで本研究では、マーカーとなる海洋天然化合物 calyculin A とそれらを含む海綿 *Discodermia calyx* の共生微生物の分離・同定を試み、calyculin A を含む微生物画分の濃縮に成功し、ついで、この微生物濃縮画分からゲノム DNA を抽出してメタゲノムシーケンス解析を行った。この結果、本画分に含まれる主要な微生物の同定・ゲノム DNA マッピングを行い、ポリケチド合成酵素の遺伝子群について 13 個のコンティグを確認した。

研究成果の概要（英文）：

It has been disclosed that most of the marine secondary metabolites originate from the symbiotic microbes. In this research project, we focused on a unique marine metabolite, calyculin A from a marine sponge *Discodermia calyx*, and tried to separate and identify the calyculin A producing microbe. We have succeeded to obtain the fraction with concentrated microbes thought to produce calyculin A and extraction of genomic DNA from this assembly of the concentrated microbes. The metagenomic DNA sequencing analysis of the extracted genomic DNA and the following DNA mapping allowed us to identify the major microbe constituents and 13 contigs of PKS gene clusters.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：共生、海洋天然化合物、海綿、生合成、シグナル、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

海綿に含まれる海洋天然化合物の多くは、共生微生物によって生合成され何らかのシグナル分子として機能していると考えられるものも多い。これらのシグナル分子は、二次代謝産物の生合成を制御して、海綿と共生微生物のように種特異的共生関係を成立させている可能性が考えられた。そこで、シグナル分子を産生する微生物の特定と同定、二次代謝産物の生合成遺伝子の特定、および共

生微生物系の中でのこれらの生合成遺伝子の発現調整機構の解明が、海洋無脊椎動物における共生微生物系の理解に必要不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、具体的な研究項目として、①宿主海綿からマーカーとなる二次代謝産物の産生微生物の分離・同定、②分離した共生

微生物のメタゲノム解析および生合成遺伝子の同定、③単離した共生微生物の二次代謝に作用するシグナル分子の同定の3項目について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、

- ① 宿主海綿からマーカー化合物の産生微生物の分離・同定
- ② 単離した共生微生物のメタゲノム解析および化合物の生合成遺伝子の同定
- ③ 単離した共生微生物の二次代謝に作用するシグナル分子の同定

の3つの研究項目から成り立つ。このうち①と③については研究代表者（中尾）が行い、②は分子生物学が専門の研究分担者（木村）と研究代表者が共同で行うこととした。

4. 研究成果

①宿主海綿からマーカー化合物の産生微生物の分離・同定

宿主海綿として *Discodermia calyx* を選び、主要な二次代謝産物である calyculin A をマーカーとして、この化合物を産生する共生微生物の分離・同定を試みた。

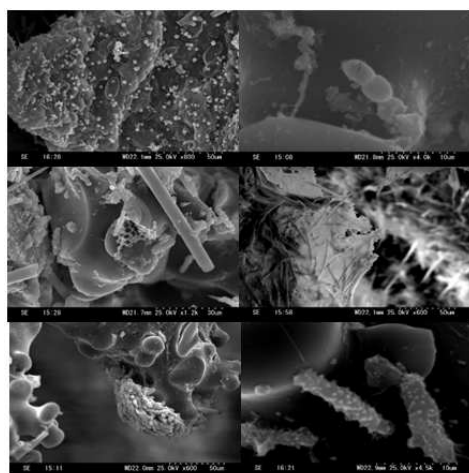
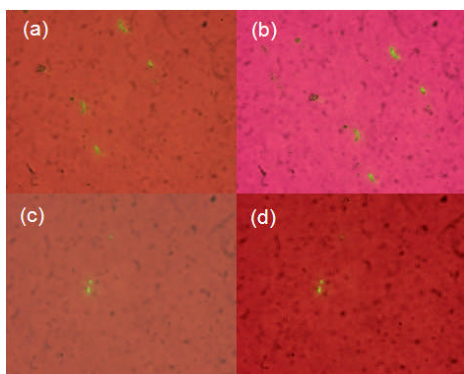


Fig. 1 Microbes in *D. calyx* (Scanning Electron Microscope)

海綿を海水中で破碎後、各ポアサイズのメッシュを通して共生微生物をサイズごとに分画した。

②単離した共生微生物のメタゲノム解析および化合物の生合成遺伝子の同定

Calyculin A を含む微生物はΦ8 μm のメッシュを通る画分に濃縮されたため、この微生物濃縮画分からゲノム DNA を抽出してメタゲノムシーケンス解析を行った。Meta velvet を用いた解析結果からもΦ8 μm のメッシュを通すことで微生物が濃縮されていることが認められた。

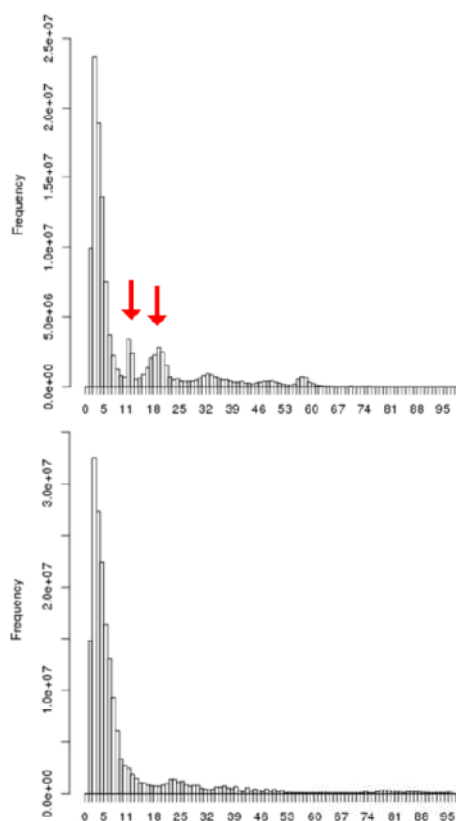


Fig. 2 kmer coverage of assembling result (meta velvet)

この結果、本画分に含まれる主要な微生物として *Pseudomonas* 属のバクテリアであることが明らかになった。

Genus	8>	95	Total count
<i>Pseudoalteromonas</i>	105840	85821	191661
<i>Pseudovibrio</i>	36266	19188	55454
<i>Desulfovibrio</i>	14446	5665	20111
<i>Sulfurimonas</i>	1688	598	2286
<i>Chromohalobacter</i>	6645	4424	11069
<i>Halomonas</i>	5683	3852	9535
<i>Psychrobacter</i>	18762	15617	34379
<i>Desulfomicrobium</i>	783	332	1115
<i>Desulfobacterium</i>	488	203	691
<i>Desulfotalea</i>	586	287	873

Table.1 Taxonomic Group Analysis using MetaCV.

一方、calyculin A の生合成酵素の候補と考えられるポリケチド合成酵素の遺伝子群について 13 個のコンティグが確認できた。

さらに、明らかになった主要な微生物 *Pseudomonas* 属のバクテリアの公表されているゲノム配列に対して、得られた DNA ライブラリーをマッピングしたところ、全ゲノムの 94% をカバーすることができた。

③ 単離した共生微生物の二次代謝に作用するシグナル分子の同定

Calyculin A について共生微生物間で働くシグナル分子としての機能を調べるために、海綿 *D. calyx* に含まれる共生微生物について、calyculin A の有無で培養した際の違いを比較した。まず、好気性/嫌気性、寒天培地/セルロース培地振り分けた 4 つの培養条件に対して、calyculin A の有無による微生物コロニーのつき方を比較した。

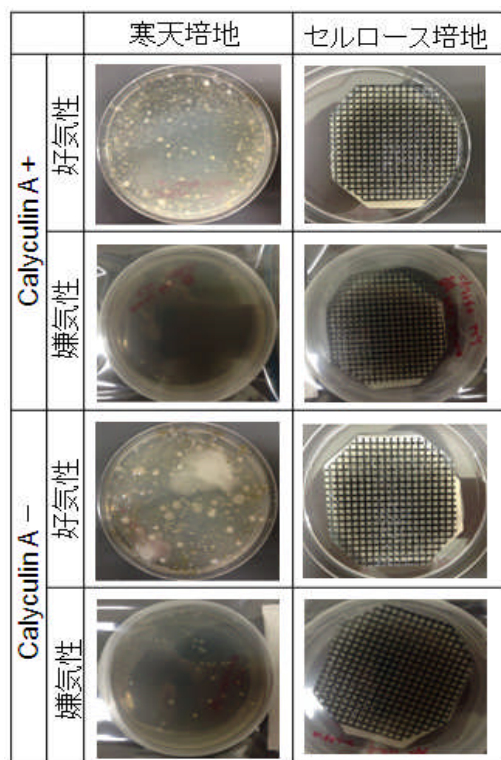


Fig. 3 microbial culture (8 conditions)

その結果、calyculin A の存在下では明らかに生じる微生物コロニーの種類が抑えられていることが認められた。現在、コロニーからの抽出物を MS 分析し、calyculin A 生成微生物の探索を行っている。

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) すべて査読あり。

- 1) Umehara, M.; Negishi, T.; Maehara, Y.; Nakao, Y.; Kimura, J. Stereochemical analysis and cytotoxicity of kulokekahilide-2 and its analogues *Tetrahedron*, **69**, 3045-3053, (2013).
- 2) Sepe, V.; Ummarino, R.; D'Auria, M. V.; Tagliatalata-Scafati, O.; D'Amore, C.; Renga, B.; Nakao, Y.; Fusetani, N.; Fiorucci, S.; Zampella, A.; Marino, S.; Chini, M.; Bifulco, G. Preliminary Structure-Activity Relationship on Theonellasterol, a New Chemotype of FXR Antagonist, from the Marine Sponge *Theonella swinhoei* *Mar. Drugs*, **10**, 2448-2466, (2012).
- 3) Ishigami, S.-T.; Goto, Y.; Inoue, N.; Kawazu, S.-I.; Matsumoto, Y.; Imahara, Y.; Tarumi, M.; Nakai, H.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Cristaxenicin A, an antiprotozoal xenicane diterpenoid from the deep sea gorgonian *Acanthoprimnoa cristata* *J. Org. Chem.*, **77**, 10962-10966, (2012).
- 4) Umehara, M.; Negishi, T.*; Tashiro, T.; Nakao, Y.; Kimura, J. Structure-related cytotoxic activity of derivatives from kulokekahilide-2, a cyclodepsipeptide in Hawaiian marine mollusk *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 7422-7425, (2012).

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 戸町祐輝、中尾洋一、伊藤昭博、吉田稔、『海綿由来のSIRT3阻害活性化化合物の探索』、日本化学会第93春季年会、滋賀・立命館大学、2013年3月25日。
- 2) 町田光史、岡本真由美、清水功雄、中尾洋一、『Shinanthrene Aの立体化学研究と生物活性』、日本化学会第93春季年会、滋賀・立命館大学、2013年3月25日。
- 3) 吉野哲哉、中尾洋一、切替照雄、『海綿動物由来の多剤耐性緑膿菌に対する抗菌活性物質の探索』、日本化学会第93春季年会、滋賀・立命館大学、2013年3月25日。
- 4) 梅原将洋、秋山将太、山崎正稔、中尾洋一、松本芳嗣、三條場千寿、長田康孝、木村純二、『抗リーシュマニア活性物質、ciliatamide類似体の合成と構造活性相関の検討(2)』、日本化学会第93春季年会、滋賀・立命館大学、2013年3月22日。

- 5) 梅原将洋、柳生左京、久保ちなみ、根岸隆之、中尾洋一、木村純二、
『Kulokekahilide-2およびその類似体の構造活性相関と細胞毒性評価』、日本化学会第93春季年会、滋賀・立命館大学、2013年3月22日。
- 6) 杉山結香、田中順子、石上進太郎、吉野哲哉、伊藤彰英、中尾洋一、三輪佳宏、
『蛍光プローブを用いたFGFシグナル検出メカニズムの解析』、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。
- 7) 鈴木律裕、佐々木和樹、伊藤明博、高木基樹、新家一男、中尾洋一、吉田稔、
『ヒストンメチル化を検出する新規蛍光プローブの開発および生細胞内におけるヒストンメチル化の動態解析』、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。
- 8) 喜納惟斗、林陽子、木村宏、中尾洋一、
『海洋生物由来のヒストン修飾制御剤探索法の開発』、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。
- 9) 町田光史、木村信忠、山副敦司、勝又啓史、細山哲、藤田信之、佐々木哲彦、中尾洋一、
『海綿*Discodermia calyx*共生微生物のメタゲノム解析』、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。
- 10) Nakao, Y. “Anti-parasitic agents from marine organisms” *Asian Natural Products and Chemical Biology* 中国杭州 2012年11月。

〔図書〕（計1件）

- 1) Nakao, Y.; Fusetani, N. Enzyme Inhibitors from Maine Invertebrates, In *Marine Natural Products Handbook*, Springer, Vol. 2, pp. 1145-1229, (2012).

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

- 1) 名称：環状デプシペプチドの新規使用方法
発明者：中尾洋一、前島寛、土井隆行、山下潤、魚崎英毅、福島弘之
権利者：学校法人早稲田大学、国立大学法人東北大学、国立大学法人京都大学
種類：特許申請
番号：特願 2012-193433
出願年月日：2012年9月3日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾洋一 (NAKAO YOICHI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：60282696

(2) 研究分担者

木村信忠 (KIMURA NOBUTADA)
独立行政法人産業技術総合研究所・プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：30344162