

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03112

研究課題名(和文) 海綿共生細菌Entotheonella属による多様な生物活性物質生産機構の解明

研究課題名(英文) Bioactive secondary metabolites produced by sponge symbiont Entotheonella

研究代表者

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70363900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：海洋無脊椎動物の中でもとりわけ海綿動物は天然生物活性物質の宝庫として知られている。海綿動物が保有する多様な生物活性物質の多くは共生微生物によって生産され、化学防御物質として機能すると考えられている。それらの中には強力な生物活性を示し、医薬品のリード化合物として有望視されるものが複数存在する。本研究では海綿共生微生物Entotheonellaが有する物質生産能をさらに詳細に検証するために、様々な種々の海綿動物を対象に生合成遺伝子の取得や新規代謝産物の探索を進めることで、Entotheonella属バクテリアの海綿共生細菌としての普遍性や生産菌としての重要性を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges are prolific sources of bioactive molecules as well as highly complex consortia, including significantly large populations of symbiotic bacteria. The symbiotic bacteria often cannot be cultured under normal laboratory conditions. To access the gene clusters responsible for the biosynthesis of sponge-derived bioactive natural products, homology-based screening of the sponge metagenome library has been implemented. We successfully obtained the biosynthetic gene clusters of cytotoxic compounds, calyculins isolated from the Japanese sponge *Discodermia calyx* by a metagenome mining approach. The single cell analysis revealed that all these gene clusters were encoded by the same filamentous bacterium, which was identified as Candidatus "Entotheonella sp." based on the 16S rRNA sequence. In this study, we investigated new metabolites as well as other gene clusters responsible for the biosynthesis of bioactive peptides derived from *Discodermia kiiensis* and *Theonella swinhoei*.

研究分野：天然物化学

キーワード：海綿動物 生合成遺伝子 生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

海洋無脊椎動物の中でもとりわけ海綿動物は天然生物活性物質の宝庫として知られている。海綿動物は付着性で大量の海水をろ過することで、有機物を摂取して生きており、この際に一過性に取り込む微生物とともに、多種多様な微生物が共生している。海綿動物が保有する多様な生物活性物質の多くは共生微生物によって生産され、化学防御物質として機能すると考えられている。それらの中には強力な生物活性を示し、医薬品のリード化合物として有望視されるものが複数存在する。中でも、**halichondrin B**は海綿由来の生物活性物質をもとに抗がん剤開発に成功した例として記憶に新しい。

我々は先行研究において、**Theonellidae**科に属する海綿 *Theonella swinhoei* 及び *Discodermia calyx* の2種においてメタゲノム解析を行った。その結果、二次代謝産物生合成遺伝子を取得し、それら遺伝子をコードする共生細菌の同定に成功した。同定した生産菌は新門 **Tectomicrobia** 門に属する難培養性 **Entotheonella** 属細菌であり、ポリケタイドからペプチドなど多様かつ複雑な生物活性物質の生産を担う、極めて物質生産に秀でたバクテリアであった。

2. 研究の目的

本研究では海綿共生微生物 **Entotheonella** が有する物質生産能をさらに詳細に検証するために、*Discodermia*、*Theonella* に属する様々な種々の海綿動物を対象に生合成遺伝子の取得や新規代謝産物の探索を進める。現段階では2種海綿動物にとどまっている知見をさらに拡張することで、**Entotheonella** 属バクテリアの海綿共生細菌としての普遍性や生産菌としての重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Discodermia 属の海綿として伊豆半島や紀伊半島に生息する *Discodermia kiiensis* を研究対象とし、その新規二次代謝産物の探索や生合成遺伝子の取得、生産菌の同定を試みた。さらに *Theonella* 属海綿は、*Discodermia* 属の海綿動物に比較して温帯から熱帯に至る世界各地の海に生息している。先行研究においては、八丈島産の *T. swinhoei* について共生菌 **Entotheonella** や生合成遺伝子の解析を行ってきた。しかし、八丈島以外の海域に生息する *T. swinhoei* に関しても多種多様な生物活性天然物が見出されており、それらの探索や生合成経路の解明が待たれている。特に亜熱帯からフィリピンやインドネシアなどの熱帯太平洋域に生息する *T. swinhoei* は八丈島産とは異なる代謝産物を有することが知られており、本研究では沖縄以南に生息する *T. swinhoei* について代謝物や遺伝子の解析を進めた。

4. 研究成果

伊豆半島や紀伊半島沿岸に生息する *Discodermia kiiensis* には環状デプシペプチドである **discodermin** 類が主要な二次代謝産物として含まれていることが知られている。また、よりマイナーな成分として紀伊半島産 *D. kiiensis* より **discokiolide** 類が報告されている。我々は2014年に伊豆半島産 *D. kiiensis* より新規リポペプチド **lipodiscamide** 類を単離、構造決定した。環状構造内に2つのエステル結合を有し、シトルリン、ウレイドアラニン、デヒドロノルバリンなどの異常アミノ酸を含む特異な環状デプシペプチドであった。

日本産 *D. kiiensis* からは上記3つの特異な環状デプシペプチドが見出されている。しかし、それらの生合成遺伝子や生産菌の報告例はこれまで皆無であった。そこで、これら代謝産物の生合成遺伝子を取得し、その生産を担う共生微生物の同定を試みた。*D. kiiensis* の組織を人工海水に懸濁し、光学顕微鏡によって観察した結果、フィラメント状の特徴的な形態を有するバクテリア細胞が多数認められた。この形態は海綿共生細菌 **Entotheonella** 属の特徴でもあることから、それらを密度勾配遠心法によって分画し、エンリッチした画分からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによって解析した。その結果、**discodermin** 及び **lipodiscamide** の生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。**Discodermin** に関してはNRPSのA domainの基質特異性を検討した結果、構成アミノ酸と良い一致を示した。現在、各A domainの基質特異性の検証を行っている。

Lipodiscamide に関してはクラスター内に予想外の硫酸基転移酵素がコードされていたため、硫酸化 **lipodiscamide** の存在が示唆された。そこで実際に海綿抽出液中の探索を行った。硫酸化体は比較的極性が高いこと予想されたため、海綿抽出液を液液分配して得られたブタノール層を **Spehadex LH-20** カラムクロマトグラフィーによって分画し、網羅的な解析を進めた。その結果、**lipodiscamide** よりも分子量80大きい化合物を検出した。80マスユニットは硫酸基1個分に相当する。

Lipodiscamide の構造には水酸基は一つもないことから、硫酸化される部位として考えられる官能基は分子内に2つ存在するウレア残基のみであった。しかし、これまでに硫酸化ウレア構造を持つ天然物の報告例は皆無であったため、実際にそのような官能基が天然物として存在するかどうかは不明であった。そこで、各種2次元NMRスペクトルの詳細な解析を行い、**sulfolipodiscamide** のシトルリン残基のケミカルシフトが **lipodiscamide** と大きく異なっていることが判明した。したがって硫酸基はシトルリンのウレア基に結合していることが分かった(図1)。マウス白血病細胞P388に対する細胞毒性試験の結果、新規化合物 **sulfolipodiscamide** のIC₅₀値は **lipodiscamide** より約2倍程度低濃

度であった。以上の結果より *D. kiensis* 由来の discodermin 類、lipodiscamide 類はいずれも海綿共生微生物 *Entotheonella* によって生産されていることが明らかになった。

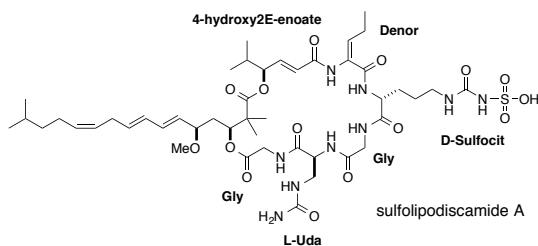


図1 Sulfolipodiscamide A の構造

沖縄およびインドネシア産の *T. swinhoei* に特徴的な化合物として theonellapeptolide 類があげられる(図2)。Theonellapeptolide 類は、1986年に大阪大学の北川らによって海綿 *Theonella swinhoei* より初めて単離された大環状デブシペプチドである。Theonellapeptolide Id は *N*-メチルアミノ酸や *D* アミノ酸の含有率が高いデブシペプチドであり、ウニ卵割阻害活性、 Na^+ 、 K^+ イオン輸送活性、ATPase 阻害活性、骨髄腫細胞に対する細胞毒性などの生物活性を示す。さらに、脂肪族アミノ酸や *N*-メチルアミノ酸に富む大環状構造は免疫抑制剤である cyclosporin A と類似しており、実際に混合リンパ球反応において抑制効果が認められている(図2)。このように theonellapeptolide 類は多様な生物活性を示し、新規免疫抑制活性も期待できる化合物であるが、その希少性ゆえに詳細な作用機序は未解明であり、さらに化学合成による構造確認および量的供給の報告例もない。

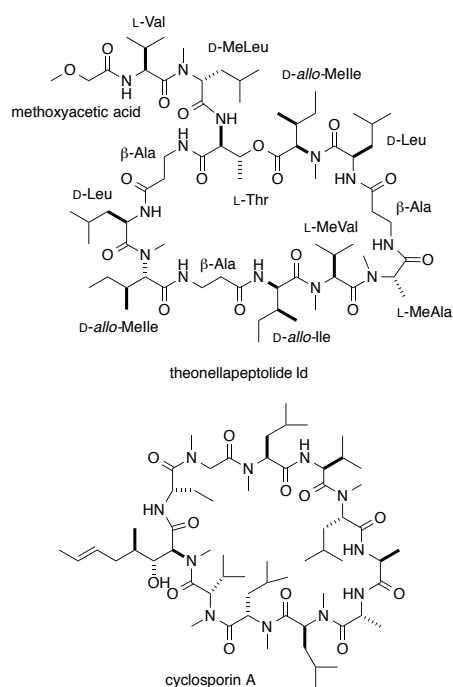


図2 Theonellapeptolide と cyclosporin A

そこで我々は theonellapeptolide Id (図2)の全合成を試み、Fmoc ペプチド固相合成法によって効率的な全合成を達成した。さらに theonellapeptolide 類には構造未解明な3つの類縁体 theonellapeptolide IV, V, VI の存在が知られている。インドネシア産 *Theonella swinhoei* よりそれらの単離精製を試み、theonellapeptolide IV, V, VI および新規 theonellapeptolide 類縁体 VII を得ることに成功した。これら類縁体の ^1H NMR スペクトルはシグナルのブロード化が激しく、その上、2つ以上の配座異性体が混在していたため、各種 NMR スペクトルのみを用いた構造解析には限界があった。そこで、メタノリシスによってエステル部位を開裂し、得られた鎖状ペプチド構造を MS/MS 分析に供することで、アミノ酸配列を解析し、平面構造を決定した。さらに部分加水分解によってペプチド断片を取得し、構成アミノ酸の立体化学を Marfey 法により決定した。さらに、沖縄産 *T. swinhoei* よりメタゲノム DNA を抽出、ライブラリーを作製し、theonellapeptolide 類の生合成遺伝子クラスターの取得を試みている。

本研究で得られた新規化合物はいずれも海綿共生微生物によって生産されることが予想される。引き続き生合成遺伝子を解析し、生物活性天然物の生産能に秀でた新規微生物の性状を明らかにしていく。特に本研究で対象とした *Entotheonella* は他の微生物には見られない特異な二次代謝産物を生産することがわかってきた。しかし未だ培養条件が確立できていないために、その有効利用を目指す上で解決しなければならない課題が多い。可培養化や生合成遺伝子の異種発現系の構築を通して、*Entotheonella* 由来の多様な生物活性物質を探索、利用していく技術基盤を確立することが今後の重要な課題であり、引き続き検討を進めていく。

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30件)

- ① Uria, A.R., Piel, J., Wakimoto, T., “Biosynthetic insights of calyculin- and misakinolide-type compounds in “*Candidatus Entotheonella* sp.” *Method Enzymol.* 査読有 604, 287-330 (2018). DOI: 10.1016/bs.mie.2018.02.017
- ② Kuranaga, T., Enomoto, A., Tan, K., Fujita, T., Wakimoto, T., “Total synthesis of theonellapeptolide Id”, *Org. Lett.*, 査読有 19, 1366-1369 (2017). DOI: 10.1021/acs.orglett.7b00249
- ③ Wakimoto, T., “Toward dark matter of natural products”, *Chem. Rec.*, 査読有 17, 1-12 (2017). DOI: 10.1002/tcr.201700009
- ④ Zhang, L., Hashimoto, T., Qin, B., Hashimoto, J., Kozono, I., Kawahara, T.,

- Okada, M., Awakawa, T., Ito, T., Asakawa, Y., Ueki, M., Takahashi, S., Osada, H., Wakimoto, T., Ikeda, H., Shin-ya, K., Abe, I., “Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 56, 1740-1745 (2017). DOI: 10.1002/anie.201611371
- ⑤ Nakashima, Y., Egami, Y., Kimura, M., Wakimoto, T., Abe, I., “Metagenomic analysis of the sponge *Discodermia* reveals the production of the cyanobacterial natural product kasumigamide by 'Entotheonella'”, *PLoS ONE*, 査読有 11(10): e0164468 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0164468
- ⑥ Tan, K. C., Wakimoto, T., Abe, I., “Sulfoureido lipopeptides from the marine sponge *Discodermia kienensis*”, *J. Nat. Prod.*, 査読有 79, 2418–2422 (2016). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00586
- ⑦ Wakimoto, T., Egami, Y., Abe, I., Nature’s way of making sponge-derived bioactive molecules. *Nat. Prod. Rep.* 査読有 33, 751-760 (2016). DOI: 10.1039/C5NP00123D
- ⑧ 江上蓉子、脇本敏幸、阿部郁朗、海綿共生微生物による生物活性物質の生産、バイオインダストリー, 査読有 33, 11-17 (2016)
- ⑨ Takeshige, Y., Egami, Y., Wakimoto, T., Abe, I., Production of indole antibiotics induced by exogenous gene derived from sponge metagenome. *Mol. BioSyst.*, 査読有 11, 1290-1294 (2015). DOI: 10.1039/c5mb00131e
- ⑩ 江上蓉子、脇本敏幸、阿部郁朗、海綿動物の化学防御を担う共生細菌、細胞工学, 査読有 34, 412-416 (2015)
- ⑪ 脇本敏幸、江上蓉子、阿部郁朗、海綿-共生微生物系の化学防御機構、化学と生物, 査読有 53, 479-499 (2015)
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 脇本敏幸、メタゲノムマイニングによる海綿由来新規天然物の探索 (招待講演)、日本薬学会第 138 年会、2018 年
- ② 脇本敏幸、メタゲノムマイニングによる海綿由来新規天然物の探索 (招待講演)、理研シンポジウム、高磁場・高感度 NMR 利活用促進のための天然物分野における日中連携シンポジウム 2017、2017 年
- ③ Wakimoto, T., Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes, International Conference on Marine Biodiversity and Biotechnology (招待講演), 2017 年
- ④ Wakimoto, T., Activated Chemical defense of Japanese marine sponge *Discodermia*

calyx, 2017 ISCE/APACE (招待講演), 2017 年

- ⑤ Wakimoto, T., Toward the dark matter of marine natural products, International Symposium on Marine Natural Products (招待講演), 2017 年
- ⑥ Wakimoto, T., A bacterial symbiont in Japanese marine sponges produces biologically active metabolites, 3rd Myanmar-Japan International Symposium (招待講演), 2016 年
- ⑦ 脇本敏幸、難培養微生物を起源とする海綿由来生物活性物質の生合成研究 (招待講演)、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年
- ⑧ Wakimoto, T., Recent topics in natural product-derived protein phosphatase inhibitors (招待講演), 第 93 回日本生理学会, 2016 年
- ⑨ Wakimoto, T., Activated chemical defense of a sponge-microbe association (招待講演), Gordon Research Conference of Marine Natural Products, 2016 年
- ⑩ 脇本敏幸、海綿—共生微生物系の化学防御機構 (招待講演)、第 67 回日本生物工学会、2015 年
- ⑪ 脇本敏幸、海洋天然物化学が明示した難培養微生物の存在 (招待講演)、第 50 回天然物化学談話会、2015 年
- ⑫ 脇本敏幸、海綿—共生微生物系の化学防御機構 (招待講演)、第 10 回化学生態研究会、2015 年

[図書] (計 1 件)

- ① 脇本敏幸、カリクリンの生合成、天然物の化学—魅力と展望— (上村大輔編) 科学のとびら 60、東京化学同人、2016 (分担執筆) p.61-66

[その他]

北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室 <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：70363900
- (3) 連携研究者
倉永 健史 (KURANAGA, Takefumi)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：70625201
- (3) 連携研究者
江上 蓉子 (EGAMI, Yoko)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：50758612