

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25303008

研究課題名(和文) 海洋微生物の共生 - 進化系理解のための日 - 欧連携フィールドワーク

研究課題名(英文) Euro-Japan collaborative field work for the understanding of symbiotic evolution of marine microbes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：イタリアで採集した海綿サンプルについて、LC-MS/MSを用いたメタボローム解析を比較し、日本産近縁サンプルとの二次代謝産物プロファイルに一部違いを認めた。また、PXR活性物質を含むTheonella属の海綿からDiffusion Chamber (DC) 法を用いて、きわめて新規性の高い共生微生物群を取り出すことに成功した。研究者の往来(往2014年、来2015年)研究協力体制を強めることができた。

研究成果の概要(英文)：We have compared the metabolome analysis of marine sponge by LC-MS/MS. As the results, we have found the difference between the metabolite profiles of two closely related sponge samples collected in Italy and Japan. Also, we could isolate highly novel microorganisms from the sponge of genus Theonella by means of newly developed Diffusion Chamber method. Through this project, a sound base for the collaborative activity between Italy-Japan marine natural products chemistry has been established.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：海洋天然物化学 共生微生物 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

海綿動物などの海洋無脊椎動物には、多様な微生物が共生しており、ユニークな構造や生物活性を有する化合物を生み出していると考えられている。製薬企業に巨大な売上をもたらす画期的新薬の候補としても期待されるこれら海洋天然化合物は、これらを生み出す共生微生物を人工的に培養することが難しいため、医薬品への展開に必要な化合物の供給量が常に問題となってきた。そこで、共生微生物を単独培養して、化合物を安定的に供給する技術を確立するには、共生系を維持させているメカニズムを理解する必要があると考えた。

一方、共生関係によって生物のエピジェネティクス変化が起こり、その変化が形態や機能の変化となって固定されることが進化であるととらえると、海洋生物における微生物の共生系では、ケミカルシグナルとしてやり取りされる海洋天然化合物が共生関係を維持するとともに、進化にもかかわると考えられた。実際、海洋生物の抽出物には、ヒストンの修飾に代表されるエピジェネティクス変化を引き起こし、細胞の分化にも影響を与える化合物が数多く見出されている。さらに、代表的なエピジェネティクスの機構であるヒストンアセチル化を行う酵素の阻害剤は微生物の生合成遺伝子発現変化を引き起こし、産生される天然化合物プロファイルが変化することも報告されていた。

すなわち、天然化合物自身がエピジェネティクスの変化を引き起こし、それによって別の天然化合物の生合成の変化を引き起こすという互いに依存したシグナルネットワークの集大成が共生関係を維持し、進化を推し進めるメカニズムであると考え、天然化合物が引き起こすエピジェネティクス変化を指標として、共生関係を理解することが必要となると考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では海洋生物の中でも原始的な多細胞生物である海綿に注目し、そこに存在する共生微生物系について、エピジェネティクス、幹細胞生物学、ケモタキソミー、共生微生物学、海洋天然物化学から多面的に解析を行い、海洋生物内の共生関係を維持させるメカニズムの理解につなげるだけでなく、生命進化のメカニズムに対しても分子レベルで理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、①海洋生物サンプルの採集・飼育、②海洋生物中の化合物の分析（メタボローム解析）、③化合物の生理活性の評価（特にエピジェネティクス制御、細胞分化制御、ストレス応答活性）、④特定の生理活性化合物を生産する共生微生物の分離・同定および培養法の検討、⑤共生系で働く化合物の機能（生合成遺伝子の制御、細胞分化制御）解析の5段階から成り立っており、それぞれの段階の研究に精通する専門家と研究代表者の共同作業によって研究を進めた。

具体的には、海綿の成分研究がすすんでいるイタリア周辺海域をフィールドに定め、そこに生息する海綿における微生物共生系を維持させるメカニズムについて多面的に解析を行い、日本の近縁種との比較を行うこととした。欧州をフィールドとすることでケモタキソミー、共生微生物学、海洋天然物化学の専門家とのダイレクトな共同研究が可能となった。

4. 研究成果

平成25年度は海外共同研究者である独ミュンヘン大学 Erpenbeck 博士を訪問研究者として中尾の研究室に受け入れ、水族館にて飼育可能な海綿の LC-MS によるメタボローム解析の共同研究を行った。また、海外共同研究者である伊ナポリ大学 D'Auria および Zampella 両教授との共同研究において、

Theonella 属海綿由来のステロイド化合物の類縁体群について分析を行い、それらの生理活性 (PXR 活性) について検討を行った (雑誌論文 4)。さらに日本産の同種海綿について飼育実験を行うとともに、共生状態を維持したままで、微生物を単離・培養可能な Diffusion Chamber (DC) 法を用いて、共生微生物の単離を試み、きわめて新規性の高い微生物群を得ることに成功した (投稿準備中)。現在はこれらの培養物中に含まれるメタボローム解析を継続して行っている。

鹿児島県産の *Mycale* 属の海綿については、構造的にも多様な生合成経路による二次代謝産物が豊富に含まれ、これらの中には本研究で注目しているエピジェネティクス制御に関わるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性など、各種生理活性化合物が含まれていることを明らかにしていることから、この海綿に焦点を絞って採集を行い、各成分の分析・精製、各種生理活性評価を行った。この結果、HDAC に対して nM オーダーで非常に強い阻害活性を示す新規化合物を見出すことができた (投稿準備中)。

平成 26 年度は海外共同研究者である伊ジェノア大学 Bavestrello、および D'Auria、Zampella 教授との共同研究において、8 月 29 日~9 月 7 日の期間でイタリアを訪問し、ポルトフィーノ (ジェノア大学、Giorgio Bavestrello 教授)、およびイスキア島 (ナポリ大学、Maria Valeria D'Auria 教授および Angela Zampella 教授) とイタリアの南北 2 か所において海綿の採集を行った。採集対象として、日本国内でも近縁種が採集可能な *Petrosia* 属、および *Ircinia* 属、*Agelas* 属の海綿を中心に海綿を採集し、メタゲノム解析用およびメタボローム解析用のサンプル調製を行った後、LC-MS によるメタボローム解析および化合物の生理活性評価を行った。採集した海綿サンプルについて、心筋分化誘導活性を調べたところ、日本産・イタリア産ともに *Chondrosia*

属海綿に活性を認めたため、活性本体の精製を行っている (継続中)。

平成 27 年度も引き続き、本海綿に含まれる二次代謝産物について、LC-MS および LC-MS/MS を用いた詳細なメタボローム分析を行った。この結果、日本国内で近縁種を採集した *Petrosia* 属および *Chondrosia* 属の海綿を対象としたメタボローム分析結果の比較において、日本およびイタリアで採集された海綿については、近縁種であっても一部成分に違いが認められることが明らかとなったため、それぞれに含まれる二次代謝産物プロファイルの違いをさらに詳細に解析した (現在も継続中)。

ナポリ大学、Maria Valeria D'Auria 教授および Angela Zampella 教授を招聘 (平成 27 年 10 月 16 日~10 月 24 日) し、以上の結果をもとに研究の進捗について打ち合わせを行った。同時に、早稲田大学において講演会を開催し、京大 CiRA、理研神戸バイオイメージングセンター、函館市国際水産・海洋総合研究センターにて、海綿由来二次代謝産物の生物活性評価 (心筋分化活性)、化合物の動態イメージング (PXR 活性化合物)、および海綿の飼育方法についてのディスカッションを行った。

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 9 件) すべて査読あり

1. Nakaoka, S.; Sasaki, K.; Ito, A.; Nakao, Y.; Yoshida, M. A Genetically Encoded FRET Probe to Detect Intranucleosomal Histone H3K9 or H3K14 Acetylation Using BRD4, a BET Family Member. *ACS Chem. Biol.*, *11*, 729-733, (2016). DOI: 10.1021/cb501046t
2. Arai, D.; Hayakawa, K.; Ohgane, J.; Hirosawa, M.; Nakao, Y.; Tanaka, S.; Shiota, K. An epigenetic regulatory element of the Nodal gene in the mouse and human genomes. *Mech. Dev.*, *136*, 143-154, (2015). DOI:10.1016/j.mod.2014.12.003

3. Han, C.G.; Doi, H.; Kimura, J.; Nakao, Y.; Suzuki, M. ¹¹C-Labeling of the C(1)-C(10) dihydroxy acid moiety for the study on the synthesis of kulokekahlilide-2 PET tracer. *Int. J. Org. Chem.*, 4, 269-277, (2014). <http://dx.doi.org/10.4236/ijoc.2014.44029>
4. Sepe, V.; D'Amore, C.; Ummarino, R.; Renga, B.; D'Auria, M. V.; Novellino, E.; Sinisi, A.; Tagliatalata-Scafati, O.; Nakao, Y.; Limongelli, V.; Zampella, A. Fiorucci, S. Insights on pregnane-X-receptor modulation. Natural and semisynthetic steroids from *Theonella* marine sponges *Eur. J. Med. Chem.*, 73, 126-134, (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.005>
5. Tsubokura, K.; Iwata, T.; Taichi, M.; Fukase, K.; Nakao, Y.; Tanaka, K. Direct guanidination of amino groups by cyanamide in water: Catalytic generation and activation of unsubstituted carbodiimide by Sc(OTf)₃ *Synlett.*, 25, 1302-1306, (2014). DOI: 10.1055/s-0033-1341080
6. Machida, K.; Abe, T.; Arai, D.; Okamoto, M.; Shimizu, I.; de Voogd, N. J.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Cinanthrenol A, an Estrogenic Steroid Containing Phenanthrene Nucleus, from a Marine Sponge *Cinachyrella* sp. *Org. Lett.*, 16, 1539-1541, (2014). dx.doi.org/10.1021/ol5000023
7. Hirohama, M.; Voet, A. R.; Ozawa, T.; Saitoh, H.; Nakao, Y.; Zhang, K. Y.; Ito, A.; Yoshida, M. Assay methods for SUMO-SIM interactions in vivo and in vitro using a split-luciferase complementation system *Anal. Biochem.*, 448, 92-94, (2014). doi:10.1016/j.ab.2013.12.009
8. Ito, A.; Takemoto, M.; Kawamura, Y.; Hirohama, M.; Yamaguchi, Y.; Handa, H.; Saitoh, H.; Nakao, Y.; Kawada, M.; Khalid, K.; Koshino, H.; Kimura, K.; Yoshida, M. Inhibition of protein SUMOylation by davidiin, an ellagitannin from *Davidia involucrata* *J. Antibiot.* 67, 335-338, (2014). doi:10.1038/ja.2013.142
9. Hirohama, M.; Kumar, A.; Fukuda, I.; Matsuoka, S.; Igarashi, Y.; Saitoh, H.; Takagi, M.; Shin-Ya, K.; Honda, K.; Kondoh, Y.; Saito, T.; Nakao, Y.; Osada, H.; Zhang, K.; Yoshida, M.; Ito, A. Spectomycin B1 as a novel SUMOylation inhibitor that directly binds to SUMO E2 *ACS Chemical Biology*, 8, 2635-2642, (2014). dx.doi.org/10.1021/cb400630z

[学会発表] (計46件)

1. 中村文彬、中尾洋一、『加計呂麻島産シアノバクテリアに含まれる環状ペプチドの構造と活性』、第30回海洋生物活性談話会、鳥取、2016年5月14日。
2. 坂本匠、中尾洋一、『ミクロネシア産海綿からの抗多剤耐性緑膿菌活性物質の探索』、第30回海洋生物活性談話会、鳥取、2016年5月14日。
3. 親泊安基、町田光史、中尾洋一、『日本産およびイタリア産海綿二次代謝産物のLC-MS解析の比較』、第30回海洋生物活性談話会、鳥取、2016年5月15日。
4. 町田光史、松本拓郎、中尾洋一、『タツナミガイから単離した新規セスキテルペンの構造』、第30回海洋生物活性談話会、鳥取、2016年5月15日。
5. 中村文彬、前島寛、中尾洋一、『海洋シアノバクテリアからの新規環状ペプチドの単離と構造決定』、日本化学会第96春季年会、京都、2016年3月26日。
6. 町田光史、中尾洋一、『熊本県産タツナミガイ *Dolabella auricularia* から得られた新規ハロゲン化ジテルペンの構造』、日本化学会第96春季年会、京都、2016年3月24日。
7. Nakao, Y.; Arai, D.; Kina, Y.; Kataoka, R.; Hayashi-Takanaka, Y.; Kimura, H. “New approach to study histone modification changes controlling biological phenomena by small molecules” 2015環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM2015) 米国ハワイ州、2015年12月17日。
8. Arai, D.; Sakuma, C.; Hayashi-Takanaka, Y.; Kimura, H.; Nakao, Y. “Marine natural products that control a specific set of histone modifications” 2015環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM2015) 米国ハワイ州、2015年12月18日。
9. Otsuka, S.; Sugie, K.; Machida, K.; Arai, D.; Hayashi-Takanaka, Y.; Kimura, H.; Nakao, Y. “Search for active components of Japanese “miso” affecting histone modification and neural differentiation” 2015環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM2015) 米国ハワイ州、2015年12月16日。
10. Machida, K.; Ishibashi, N.; Kataoka, K.; Arai, D.; Hayashi-Takanaka, Y.; Kimura, H.; Fusetani, N.; Nakao, Y. “Isolation and structure elucidation of an active compound affecting histone modification from the marine sponge” 2015環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM2015) 米国ハワイ州、2015年12月16日。
11. 芹澤茉里子、中田明子、前田里子、中尾洋一、伊藤昭博、吉田稔、『HIF-1 α 内因性活性化物質の同定と作用機序の解明』、第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月
12. 則次恒太、伊藤昭博、中尾洋一、吉田稔、『新規アセチル化タンパク質Early Growth Response 2の同定と機能解析』、第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月2日
13. 下本哲平、新井大祐、永井麻美、加勢友香梨、浅野茂隆、中尾洋一、『ヒト慢性骨

- 髓性白血病由来細胞株MB-1のcobblestone area形成に対する海洋天然化合物の活性評価』、第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月3日
14. 三輪佳宏、木嶋(田中)順子、杉山結香、阿部真太郎、町田光史、中尾洋一、『新規細胞周期阻害剤の細胞への影響と分子機構の解析』、第38回 日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月2日
 15. 万場昌子、中尾洋一、河津信一郎、井上昇、菅沼啓輔、松本芳嗣、後藤康之、『海綿由来の抗トリパノソーマ活性化化合物の探索』、化学フェスタ、東京、2015年10月15日
 16. 町田光史、松本拓郎、中尾洋一、『熊本県産海洋無脊椎動物からの新規天然化合物の探索』、化学フェスタ、東京、2015年10月15日
 17. 坪倉一輝、岩田隆幸、中尾洋一、田中克典、『2-アミノイミダゾールの選択的な構築法を用いたアゲラジンA誘導体のワンポット・カスケード合成』、化学フェスタ、東京、2015年10月14日
 18. 中尾洋一 基調講演『海洋毒・海洋生理活性物質の探索研究へのMSの応用』 第63回 質量分析総合討論会 つくば2015年6月17日
 19. Miwa Y., Kijima J., Sugiyama Y., Machida K., Abe S., Nakao Y., 『Analysis of the targets and molecular mechanisms of novel inhibitors for EGF-dependent degradation of Grb2』、第37回 日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月27日
 20. Otsuka, S.; Iwata, T.; Tsubokura, K.; Arai, D.; Fukase, K.; Tanaka, K.; Nakao, Y. “Chemical biology of cell differentiation using chemical probes derived from marine natural products” The International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2014 中国杭州 2014年11月24日.
 21. 岩田隆幸、大塚悟史、坪倉一輝、新井大祐、深瀬浩一、中尾洋一、田中克典、『アルギニンの翻訳後修飾に学ぶ血管新生阻害剤ageladine Aのワンポット全合成と活性リモデリング分子創製』、第56回天然物化合物討論会、高知、2014年10月
 22. Nakao, Y. “Search for natural products controlling epigenetics” Sino-Japan Workshop on Chemical Biology 中国北京 2014年10月11日
 23. 中尾洋一 『天然化合物によるエピゲノム制御』 環境ホルモン学会 東京 2014年6月19日
 24. 坪倉一輝、岩田隆幸、中尾洋一、田中克典、『ルイス酸触媒によるアミノ基の水での直接的グアニジン化反応』、日本化学会第94春季年会、名古屋大学、2014年3月
 25. Wen D., Ishigami S.T., Goto Y., Matsumoto Y., Kanto K.K, Nakao Y., 『Search for Anti-leishmanial Compounds from Marine Sponge』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 26. 中岡志保、佐々木和樹、伊藤昭博、中尾洋一、吉田稔、『BETファミリーに属するBRD4のヒストンH3のアセチル化認識を検出する新規蛍光プローブの開発』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 27. 波多野稔子、Muddassar M., Zhang K. Y., 中尾洋一、伊藤昭博、吉田稔、『メチル化リジン結合タンパク質CBXのがん細胞増殖における機能とその阻害剤の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 28. 町田光史、岡本真由美、清水功雄、新井大祐、伏谷伸宏、中尾洋一、『新規天然化合物shinanthrene Aとそのエストロゲン活性』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 29. 宮崎美琴、新井大祐、中尾洋一、『海洋生物由来細胞毒性物質の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 30. 吉野哲哉、切替富美子、切替照雄、新井大祐、中尾洋一、『多剤耐性緑膿菌に対する海綿由来抗菌活性化合物の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 31. 神平梨絵、喜納惟斗、林陽子、木村宏、新井大祐、中尾洋一、『H3K9アセチル化誘導活性を有する海洋天然化合物の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 32. 佐久間千晶、林陽子、木村宏、Kind K. Kanto、新井大祐、中尾洋一、『海洋生物からのヒストン修飾制御剤の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 33. 阿部真太郎、新井大祐、杉山結香、田中順子、三輪佳宏、中尾洋一、『海洋生物由来EGFR阻害剤の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 34. 片岡亮佑、新井大祐、林陽子、木村宏、中尾洋一、『多重免疫染色法を利用したヒストン修飾制御剤の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 35. 加勢友香梨、永井麻美、嶋根みゆき、野村仁、新井大祐、浅野茂隆、中尾洋一、『ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株MB-1のコブルストーンエリア形成阻害を標的とする海洋天然化合物の探索』、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月
 36. 佐久間千晶、林陽子、木村宏、中尾洋一、『海洋生物からのヒストン修飾制御剤の探索』、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良、2013年5月31日
 37. 神平梨絵、喜納惟斗、林陽子、木村宏、中尾洋一、『H3K9アセチル化誘導活性を

有する海洋天然化合物の探索』、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良、2013年5月30日

(他 全 46 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

1. 発明の名称：白血病幹細胞のニッチ形成抑制活性を有する海洋生物由来の化合物及び組成物
発明者：中尾洋一、浅野茂隆、新井大祐、加勢友香梨、下本哲平
権利者：学校法人早稲田大学
種類：特許
出願番号：特願 2016-004523
国内外の別：国内
2. 発明の名称：イミダゾピリジンアミン化合物、その製造方法及び用途
発明者：中尾洋一、大塚悟史、田中克典
権利者：中尾洋一
出願番号：特願 2015-203032
国内外の別：国内
3. 発明の名称：高血糖によるエピゲノム異常の抑制のための方法及び組成物
発明者：中尾洋一、新井大祐、塩田邦郎、早川晃司
権利者：中尾洋一
出願番号：特願 2015-177459
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

山下 潤 (YAMASHITA Jun)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：50335288

(3)連携研究者

木村 宏 (KIMURA Hiroshi)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号：30241392

(4)連携研究者

井倉 毅 (IKURA Tsuyoshi)
京都大学・放射線生物研究センター・准教授
研究者番号：70335686