

令和 2 年 12 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05629

研究課題名(和文)メタゲノム法を用いた環境機能分子およびその生合成遺伝子の探索と解析

研究課題名(英文) Identification of functional compounds and biosynthetic genes by metagenomic methods

研究代表者

藤田 雅紀(Fujita, Masaki)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：30505251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 23,810,000円

研究成果の概要(和文)：環境中での微生物間の化学的相互作用を解明する方法として、メタゲノム法、生合成、単離構造決定、バイオインフォマティクス、各種バイオアッセイを組み合わせる統合的なスキームを確立した。

その結果、赤潮・アオコの殺滅に関与する複数の細菌とその活性物質を同定した。また、環境中での生産と活性機構に関わる知見を得て、赤潮・アオコの生物学的防除の安全かつ効率的な利用につながる結果を得た。さらに、既知のシグナル物質とは全く異なる、新規のクオラムセンシングスーパーアゴニストを同定した。および、カイメン由来生理活性物質を生産する共生細菌の生合成遺伝子を同定し非常に新規性の高い系統であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境微生物、生合成、単離構造決定など異なる分野を統合して、環境中での微生物間化学相互作用を解析する試みは技術的にも困難でありほとんどなかった。その中で、DNA配列決定法とメタゲノム法の進展を取り入れ、体系的に研究するための方法論を確立できたことは、環境中で生じる未解明生命現象をとらえる上で大きな進歩である。

その結果、赤潮・アオコの生物学的防除につながる発見や、産業利用可能なクオラムセンシング物質の新規スーパーアゴニストの同定(特許取得済み)、カイメン共生微生物の有効利用を可能にする共生菌群の全ゲノム解明は、環境中での微生物機能を実用化する上でのモデルケースとなりうるものである。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the chemical communication among the environmental microorganisms, general scheme consisted of following methods and knowledges; metagenomics, biosynthesis, isolation and structure elucidation, bioinformatics, and variety of bioassays, were established.

Species, compounds, and biosynthetic genes clusters were identified from algicidal bacteria obtained from algal-blooming environmental samples. Furthermore, mechanisms of production and action of the active compounds were revealed which are important for practical usage of algicidal bacteria.

From the metagenomic clones, novel super-agonist of quorum sensing whose structure was completely different from the known signaling molecule was determined. Biosynthetic gene cluster of anti-tumor substance and its producer were identified from marine sponge symbiotic bacteria by metagenomics analysis. The producer is a quite unique bacterium belongs to the putative novel phylum, and exist in the specific marine sponge.

研究分野：生物有機化学

キーワード：メタゲノム 化学生態学 海洋天然物 クオラムセンシング 殺藻細菌 生合成 シデロフォア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境中微生物の99%以上は未培養である。未培養微生物間の化学的な相互作用は環境中における生物活動の大半を占める基盤的なものではあるが、これまで研究手法は極めて限られたものであり、間接的な情報が得られるのみであった。微生物の分離培養に依存せず、環境中の全てのDNAを取得し解析するメタゲノム法は、それら未培養微生物の機能を解析する上で、有用な方法と考えられた。さらに、二次代謝産物の生合成に関する知見の蓄積、DNA配列解析技術の急速な進歩とともに、本分野の発展が期待される状況であった。その上で、下記の項目を対象に検討を行う事とした。

(1) 微細藻類殺藻細菌

環境中には赤潮やアオコの原因となる微細藻類を殺滅する活性を有する殺藻細菌の存在が知られており、生物防除法の開発につながると期待されていた。しかし、殺藻細菌の種や殺藻機構に関しては不明な点が多く、さらに実際の環境での機能に関してはほぼ知見が無かった。

(2) シデロフォア

環境は生物利用可能な二価鉄が極度に不足しており、微生物はシデロフォアと呼ばれる鉄キレート物質を用いて、積極的に鉄を獲得している。また、シデロフォアは宿主への感染や共生、競合微生物への毒性など様々な生物間相互作用への関与が知られている。さらに、シデロフォア添加による難培養細菌の培養可能化も報告されており、未培養菌の生物資源化が期待されている。しかし、未培養菌のシデロフォアに関する報告はほぼ無いのが現状であった。

(3) クオラムセンシング物質

微生物は同種細胞の密度を感知しており、一定密度以上になった時に一斉に遺伝子を発現し機能を発揮するクオラムセンシング現象が知られている。培養可能細菌のクオラムセンシングに関しては多くの研究があるが、未培養菌が用いるクオラムセンシング物質に関する報告はほとんどなかった。その様な中、メタゲノム法を用いて未培養菌由来のクオラムセンシング物質生合成遺伝子の探索を行っていたところ、機能未知の酵素により、極めて活性の高いクオラムセンシング活性物質が生産されることを見出していた。

(4) カイメン共生細菌

海洋無脊椎動物からは多くの有用な生理活性物質が得られているが、そのほとんどは共生細菌が生産していると考えられている。また、実際に生産菌が同定された例もある。抗腫瘍物質マイカロライドを含む *Mycale* 属カイメンには既知の有用物質生産菌は共生しておらず、その生合成遺伝子も含めて全く不明であった。一方、*Mycale* 属カイメンは単年生であり研究室で生活環を回すことも可能であり、モデル生物として有用と考えられた。

2. 研究の目的

環境中の全DNAを取得可能なメタゲノム法、天然有機化合物の生合成、生理活性物質の単離と構造決定の技術を融合し、環境中における微生物間の化学的な相互作用を解明するための基本的なワークフローを確立し、下記に示す個々の課題の解決へ応用する。

(1) 微細藻類殺藻細菌

殺藻細菌が生産する殺藻物質の同定と、その生合成遺伝子および殺藻機構を明らかにする。また、それらが実際の環境で微細藻類の生育に影響を与えるかに関して、メタゲノム解析による殺藻細菌の増減や殺藻物質生合成遺伝子の検出、さらにはメタボローム解析による活性物質の検出により明らかにする。

(2) シデロフォア

未同定細菌由来のシデロフォア生合成遺伝子の探索と、異種発現による化合物生産、さらに単離と構造決定を行う。また、生産したシデロフォアが当該環境に生息する他の微生物に対してどの様な生物活性を示すのかについて明らかにする事で、環境中でのシデロフォア利用の全体像を明らかにする。

(3) クオラムセンシング物質

メタゲノム由来のクオラムセンシング物質の同定を行う。また、他種の細菌に及ぼす影響を明らかにする事で、環境中での機能に関する情報を得る。さらに、クオラムセンシング物質は、二次代謝産物生合成遺伝子の発現などに関与するため、培養可能微生物の有効利用へ適用する。

(4) カイメン共生細菌

Mycale 属カイメンの共生細菌メタゲノムから、マイカロライド生合成遺伝子クラスターおよびその生産菌を明らかにする。その後、共生細菌群のゲノム解析および共生様式を明らかにする事で分離培養法の開発を目指す。

3. 研究の方法

環境サンプルや海洋無脊椎動物からメタゲノム DNA を調製し、配列決定を行いそこに含まれる細菌叢および生合成遺伝子を明らかにする。遺伝子を異種発現して化合物生産や機能解析を行う。また、培養可能微生物を対象にする場合は、ゲノム配列の決定と生合成遺伝子の決定、さらに活性物質の同定と他の微生物への生理活性を検討する。

(1) 微細藻類殺藻細菌

既に取得している殺藻細菌を研究の起点として用いる。活性物質および生合成遺伝子を明らかにする。その後、環境サンプルから当該物質生合成遺伝子および生産物の量をリアルタイム PCR や LCMS など計測する事で、赤潮・アオコ発生終息との関連を検討する。

(2) シデロフォア

多様な試料由来のメタゲノム DNA から相同性を指標にシデロフォア生合成遺伝子クラスターを検出し、クローニング後に異種発現し化合物の生産と同定を行う。異宿主生産したシデロフォアを用いて、当該環境に生息する他の微生物に対する生育促進や毒性等の影響を検討する。

(3) クオラムセンシング物質

未知クオラムセンシング物質生産クローンの高発現株を作出し、構造決定に必要な化合物量を確保する。その後、各種スペクトル解析からその構造を決定する。既存のクオラムセンシング物質であるアシルホモセリンラクトンとの性情および機能比較を行うとともに、新規クオラムセンシング物質添加による環境微生物への影響を各種バイオアッセイにより検討する。

(4) カイメン共生細菌

Mycale 属カイメンから共生細菌画分を調製し、メタゲノム DNA を取得する。各種次世代シーケンス解析およびバイオインフォマティクス解析を行い、生合成遺伝子および生産菌を同定する。生合成遺伝子を指標に環境への分布や、各ライフサイクルのステージにおける生産菌の存在を検討し、伝播様式を明らかにする。最終的には生産菌および他の共生細菌の全ゲノムを決定し、代謝様式を明らかにするとともに、ゲノム情報からの分離培養法の確立を行う。

4. 研究成果

研究期間において、メタゲノム調製法、DNA 配列決定法、バイオインフォマティクス技術は長足の進歩を遂げた。それらを利用し、様々な試料からの高品質なメタゲノム DNA の調製、多様な手法による膨大な海洋メタゲノムデータの取得と蓄積し、取得したデータからのバイオインフォマティクスによる目的とする情報の獲得までの体系的なスキームを確立した(図1)。

(1) 微細藻類殺藻細菌

殺藻細菌 *Alteromonas* 属 D 株の培養液から赤潮原因藻類 *Chattonera antiqua* に対する殺藻物質として queatiomycin A (1) および新規化合物である questiomycins C-E (2-4) を見出した(図2)。

C. antiqua と *Alteromonas* 属 D 株の共培養を行ったところ、速やかに殺藻現象が起こったが、検出された共培養液中の queatiomycin 類の濃度は IC₅₀ 値よりもはるかに低濃度であった事から、微細藻類表面近傍で殺藻物質を生産し、局所的に高濃度となる事で殺藻活性を示す事が示唆された。実際に、半透膜で *C. antiqua* と *Alteromonas* 属 D 株を分離し培養を行ったところ、殺藻現象が起きなかったことから、上記の仮説が支持された。

瀬戸内海で赤潮発生時に採水し questiomycin 類および *Alteromonas* 属 D 株の検出を試みたが、いずれも検出されなかった。これは採水時の *C. antiqua* 密度が低かったことに加え、*Alteromonas* 属 D 株以外の殺藻細菌の寄与もあったと考えられる。

アオコ殺藻細菌のゲノム DNA 配列から *Pseudomonas protegens* と同定した。また培養液から、殺藻物質として pyoluteorin(5)および pyoluteorin B(6)と命名した新規化合物を得た(図2)。Pyoluteorin は抗真菌活性が知られているが、藍藻 *Microcystis* に対する殺藻活性は初の報告である。*P. protegens* は農業分野において真菌病に対する生物農薬として実用化されている。また、

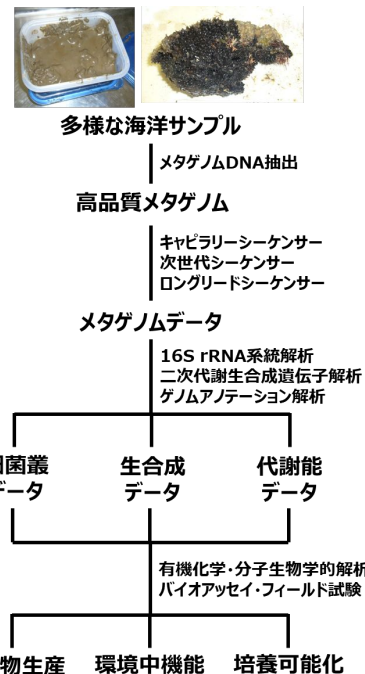


図1. 本研究で確立した全体に共通するスキーム。

世界各地から分離される一般的な土壌細菌である事から、湖沼におけるアオコ抑制の生物農薬としての実用化が期待される。

(2) シデロフォア

未同定カイメン由来のメタゲノム DNA から生産物未知のシデロフォア生合成遺伝子クラスターを取得した。大腸菌を宿主として異種発現による化合物生産を行い、活性を指標に精製を進め、スペクトル解析から agrobactin (7) と決定した(図2)。陸上植物病原菌由来の agrobactin 生合成遺伝子との配列相同性は比較的低い一方、海洋細菌である *Vibrio furnissii* 由来の vibriobactin 生合成遺伝子クラスターはより高い相同性を示した。

殺藻細菌 *Alteromonas* K 株が産生するシデロフォアの単離と同定を試みた結果、脂肪酸が結合した両親媒性の新規クエン酸型シデロフォア類 algicidobactins A-C (8-10) を出だした(図2)。Algicidobactin 類は *C. antiqua* に対して顕著な殺藻活性を示す一方、光照射下で三価鉄の還元活性を示した。これは、微細藻類生育促進活性を有するシデロフォア類と同様の活性である。以上の事から、algicidobactin 類は低濃度では微細藻類生育促進活性を、また高濃度では殺藻活性を示す両面性のあるシデロフォアである事が考えられた。

(3) クオラムセンシング物質

活性汚泥由来クオラムセンシング物質生産クローンはインジゴを副生する事から、海洋メタゲノム由来のインジゴ生産クローンについても、クオラムセンシング活性を測定したところ同様に活性を示した。一方、インジゴ産生後さらにアントラニル酸まで代謝するクローンでは活性が認められなかったことから、インジゴの蓄積が重要であることがわかった。そこで、インジゴを DMSO に溶解し、加熱したところ、効率は悪いものの、非酵素的にクオラムセンシング活性物質に変換されることを見出し、大量生産の方法を確立した。

本方法によりインジゴから活性物質を生産精製し、その構造を決定したところ、インジゴとは全く異なる新規インドロキナゾリン誘導体 (11, 12) である事を明らかにした(図2)。本物質はアシルホモセリンラクトン (AHL) と比較し、1/10 程度の濃度で同等の活性を示すとともに、高濃度領域においての最大活性は AHL よりも高い、スーパーアゴニストとしての活性を示した。さらに、AHL が活性汚泥中で速やかに分解し活性を失うのに対して、本物質は安定であった事から、AHL に代わるクオラムセンシング物質として各種の応用が期待された。

メタゲノム由来クオラムセンシング生産酵素はインジゴを産生する事から、インドール酸化酵素と考えられる。インジゴを DMSO 中で加熱する事でも、同一のインドロキナゾリン誘導体に変換されるが、その効率は大腸菌クローンと比較しはるかに低いものであった。そこで、メタゲノム由来の遺伝子がインドールを酸化し、大腸菌の内在酵素がさらにクオラムセンシング物質へと代謝している可能性が考えられた。そこで、大腸菌の培地に、インジゴを添加したところ、低頻度ながら非常に高いクオラムセンシング生産活性が認められたことから、内在酵素の関与が示された。しかし、その発現は安定的では無い事も示された。

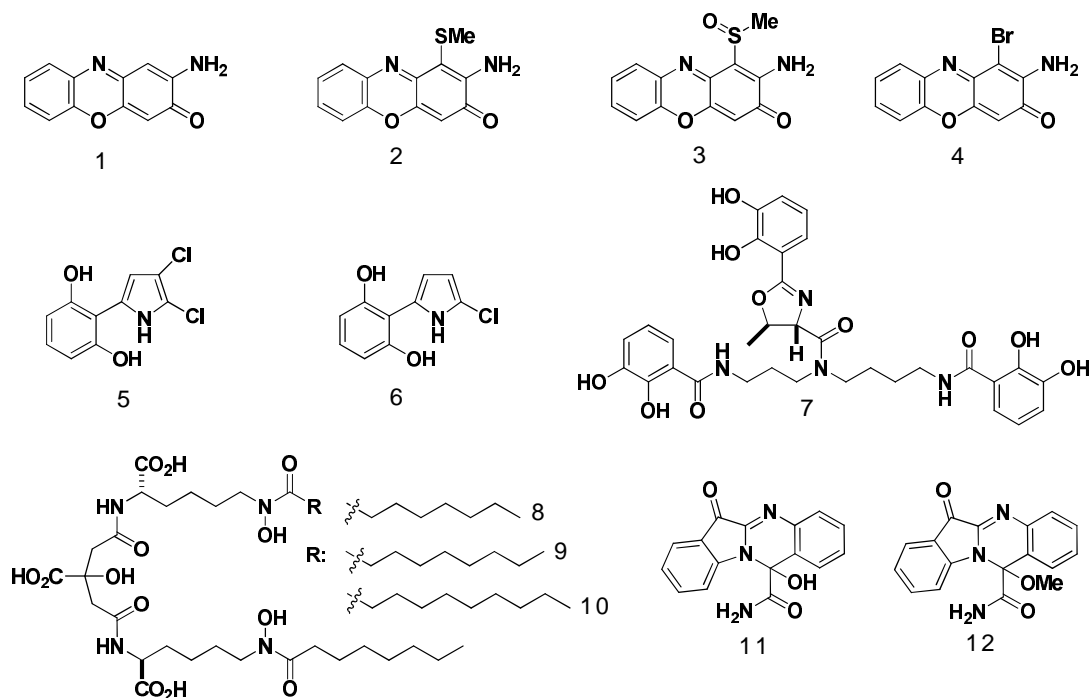


図2. 本研究で得られたメタゲノムあるいは環境微生物由来化合物。

(4) カイメン共生細菌

Mycale 属カイメン共生細菌画分について次世代シーケンスによる全ゲノム解析を行ったところ、推定された mycalolide 生合成遺伝子の特徴を有する遺伝子断片が複数見出された。それらを詳細に解析したところ、合計 120 kb からなる 5 つの DNA 断片で mycalolide 類の母核を完全に構築可能であることが明らかになり、生合成遺伝子クラスターと同定した(図3)。

また、約 5000 得られた DNA 断片を GC 含量とメタゲノム中での存在率で分類したところ、生合成遺伝子を含む 5 個の断片は *Verrucomicrobium* 門細菌の遺伝子と相同性を示すグループに含まれたことから、mycalolide の生産菌は *Verrucomicrobium* 門に属する可能性が示された。しかし、記載種で最近縁の細菌の 16S rRNA との相同性は 87% であり新門である可能性もあった。

生産菌の DNA 配列が得られたため、それらを指標に環境中での生産菌の分布と、*Mycale* 属カイメンの各生活環における共生を検討した。その結果、生産菌の DNA はカイメン生息域の海水や砂泥等からは一切検出されなかった。一方、*Mycale* 属カイメンの成体のみならず、胚や孵化直後の幼生からも生産菌の遺伝子が検出された。従って、mycalolide 生産菌は *Mycale* 属カイメンに特定の共生する事、また親世代から次世代に垂直伝播する事、さらに環境中で単独で増殖する事は無い事が示された。

ロングリードシーケンサーを用いて、共生細菌画分メタゲノムを解析したところ、約 2.5 Mb からなる共生細菌の全ゲノムを決定する事ができた。また、他の共生細菌についても全体の 95% 程度についてゲノム配列を決定し、ゲノム情報を元にした共生生態系と培養可能化のお検討を行う前提が整った。

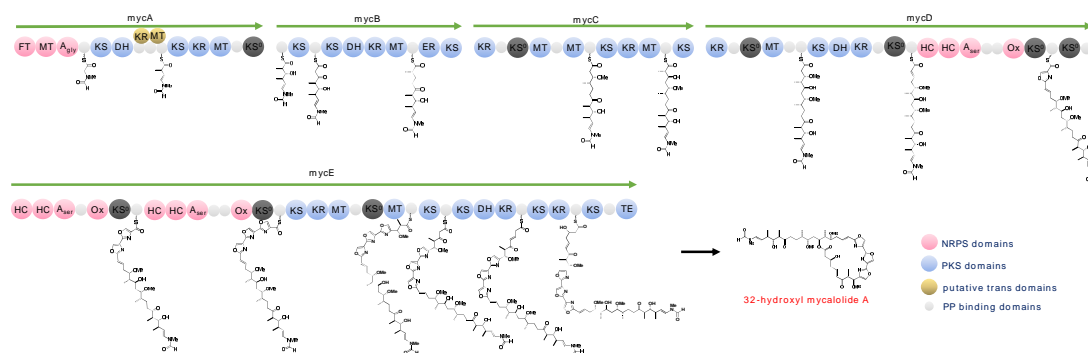


図3. *Mycale*属カイメン共生細菌画分メタゲノムから見出されたmycalolide類の生合成遺伝子から予想されるドメイン構成。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Inês Trindade, José M. Silva, Bruno M. Fonseca, Teresa Catarino, Masaki Fujita, Pedro M. Matias, Elin Moe and Ricardo O. Louro, Structure and reactivity of a siderophore-interacting protein from the marine bacterium *Shewanella* reveals unanticipated functional versatility, *J. Biol. Chem.* 2018, 294, 157-167. doi: 10.1074/jbc.RA118.005041 査読有

Masaki J. Fujita, Yusuke Goto and Ryuichi Sakai, Cloning of the Bisucaberin B Biosynthetic Gene Cluster from the Marine Bacterium *Tenacibaculum mesophilum*, and Heterologous Production of Bisucaberin B *Mar. Drugs* 2018, 16(9), 342-353. Doi: org/10.3390/md16090342 査読有

Nakamura, Yasuhide; Iwata, Izumi; Hori, Rie S.; Uchiyama, Naomi; Tuji, Akihiro; Fujita, Masaki J.; Honda, Daiske; Ohfuji, Hiroaki Elemental composition and ultrafine structure of the skeleton in shell-bearing protists-A case study of phaeodarians and radiolarians. *Journal of Structural Biology* (2018), 204(1), 45-51. DOI:10.1016/j.jsb.2018.06.008 査読有

Ken Matsumura, Tohru Taniguchi, James D. Reimer, Shuntaro Noguchi, Masaki J. Fujita, and Ryuichi Sakai KB343, a Cyclic Tris-guanidine Alkaloid from Palauan Zoantharian *Epizoanthus illoricatus*. *Org. Lett.* 2018, 20, 10, 3039-3043. DOI:10.1021/acs.orglett.8b01069 査読有

Tadokoro, Yohei; Nishikawa, Teruaki; Ichimori, Taichi; Matsunaga, Satoko; Fujita, Masaki J.; Sakai, Ryuichi N-Methyl- β -carbolinium Salts and an N-Methylated 8-Oxoisoguanine as Acetylcholinesterase Inhibitors from a Solitary Ascidian, *Cnemidocarpa Irene*. *ACS Omega* 2017, 2, 3, 1074-1080. DOI: 10.1021/acsomega.7b00127 査読有

Uchimasu, Hajime; Matsumura, Ken; Tsuda, Masashi; Kumagai, Keiko; Akakabe, Mai; Fujita,

Masaki J.; Sakai, Ryuichi Mellpaladines and dopargimine, novel neuroactive guanidine alkaloids from a Palauan Didemnidae tunicate. *Tetrahedron* 2016, 72, 45, 7185-7193.
doi.org/10.1016/j.tet.2016.09.051 査読有

〔学会発表〕(計27件)

藤田雅紀、高田健太郎 Mycale Sponge Inherits Mycalolide Producers Through Vertical Microbial Transmission、2018 Gordon Research Conference marine Natural Products、2018

藤田雅紀、似内梨紗、他、Biosynthetic Origin of Mycalolides from Marine Sponge Mycale sp.、JSFS International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”、2017

藤田雅紀、Biosynthetic Gene Cluster and Potential Producer of the Marine Sponge **Derived Macrolide, Mycalolides, US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, 2017**

梅津早紀、藤田雅紀、他、*Alteromonas* 属由来の殺藻物質の生産と殺藻様式に関する研究、第58回天然有機化合物討論会、2016

伊藤秀輝、藤田雅紀、他、海洋メタゲノム由来クオラムセンシング物質に関する研究、第29回海洋生物活性談話会、2015

〔図書〕(計2件)

藤田雅紀 他、KAIBUNDO、海をまるごとサイエンス ~水産科学の世界へようこそ~、2018、117-127

藤田雅紀 他、日本生物工学会、生物工学 96 巻 10 月号、カイメン(海綿)に共生する製薬工場 2018、593-593

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：新規インドロキナゾリン型化合物およびその製造方法

発明者：藤田雅紀、木村信忠、権利者：同上

種類：PCT 出願、番号：PCT/JP2017/043634 号

出願年：平成 28 年、国内外の別： 国外

名称：新規インドロキナゾリン型化合物およびその製造方法

発明者：藤田雅紀、木村信忠、権利者：同上

種類：特許、番号：特願 2016-252554 号

出願年：平成 27 年、国内外の別： 国内

○取得状況(計2件)

名称：新規インドロキナゾリン型化合物およびその製造方法

発明者：藤田雅紀、木村信忠、権利者：同上

種類：PCT 出願、番号：PCT/JP2017/043634 号

出願年：平成 28 年、国内外の別： 国外

名称：新規インドロキナゾリン型化合物およびその製造方法

発明者：藤田雅紀、木村信忠、権利者：同上

種類：特許、番号：特願 2016-252554 号

出願年：平成 27 年、国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：今井 一郎，ローマ字氏名：Imai Ichiro

研究協力者氏名：木村 信忠，ローマ字氏名：Kimura Nobutada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。