

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20810022

研究課題名（和文） 生理活性を利用した海洋天然物の未同定生合成遺伝子の取得と物質生産

研究課題名（英文） Cloning and Expression of Marine Natural Product Biosynthetic Genes by Function Based Screening

研究代表者

藤田 雅紀（FUJITA MASAKI）

熊本大学・大学院先端機構・特定事業教員

研究者番号：30505251

**研究成果の概要（和文）:** 海洋メタゲノムを利用した有用物質生産を目標に、メタゲノムライブラリの作成技術構築から生産物質の同定まで一貫して行い、本方法論が実現可能であることを示した。本研究を通して、高品質海洋メタゲノムライブラリを約 10 万クローン作製し、また 300 以上の色素生産クローンを取得した。またそのうち 20 以上のクローンについて、その生合成遺伝子と生産物の同定を行った。

**研究成果の概要（英文）:** Metagenomics is a promising method to obtain useful genes from environmental samples. In order to prove that metagenomics is applicable to produce marine natural products, high quality marine metagenomic library consist of about 100 thousands clones was constructed. More than 300 pigment producing clones were screened from the library and their biosynthetic genes and products were characterized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：天然物化学

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：海洋天然物・生合成・メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

（1）海洋天然物には医薬品候補として有望な化合物が多いが、天然からの収量が少なく、複雑な化合物が多く合成的な生産も困難であるなど供給の問題から有効利用が進んでいなかった。

（2）環境中から直接ゲノム DNA を抽出して解析利用するメタゲノム法が開発され、土壌メタゲノム DNA から新規抗菌物質の生合成遺伝子を取得して大腸菌で生産するなどの研究成果が報告されていた。

## 2. 研究の目的

(1) メタゲノム法を利用して海洋環境から有用海洋天然物の生合成遺伝子を取得し、異宿主発現法により生産することを最終目的とした。

(2) 実際に海洋環境からメタゲノムライブラリを作成後、遺伝子をクローニングし、異宿主で生産するという研究は報告がほとんど無く、全ての段階において解決すべき課題が存在した。そこで、各段階の問題解決と比較的簡単な分子の生合成遺伝子取得と異宿主生産を当初の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 有明海八代海の干潟砂泥、天草諸島で採集した海洋無脊椎動物等を主な資料として海洋メタゲノムライブラリ構築技術の確立を行う。

(2) 作成したライブラリに対して色素生産・抗生物質生産等のスクリーニングを行い、低分子生産クローンを取得する。

(3) 取得した低分子化合物生産クローンが保有する生合成遺伝子の解析を行う。また得られた情報を元に、高生産クローンを作成し実際に有機化学的な手法を用いて生産物の単離および構造決定を行なう。

## 4. 研究成果

### (1) サンプル採集

有明海八代海に広がる干潟は生物多様性に優れ、また絶えず海水が循環し多くの微生物が存在する事でも知られており、海洋メタゲノムライブラリの構築対象として適していると考えられた。研究危難を通じて複数回干潟砂泥や海水の採集を行った。

また、熊本大学臨海実験所の支援を受けて天草諸島沿岸において 50 種を超える海洋無脊椎動物を採集した。さらに長崎大学水産学部の支援を受け、トカラ列島沖水深 1000m の海底堆積物および海底付着生物の採集を行った。

2009 年 9 月にはインドネシアのサンゴ礁において熱帯地域の海洋無脊椎動物、約 100 検体を採集した。

### (2) メタゲノムライブラリの構築

当初は陸上メタゲノム DNA の抽出法を適用したが不純物が多く、高品質メタゲノム DNA の取得には至らなかった。

そこで、サンプルの前処理、および DNA

の抽出方法精製方法を改良した。その結果、生合成遺伝子の取得に十分なサイズおよび純度の DNA を得た。

得られた海洋メタゲノム DNA は定法に従いファージを用いて大腸菌に導入し、平均インサート長 35 kbp の海洋メタゲノム DNA 約 10 万クローンを作成した。

### (3) 生合成遺伝子スクリーニング

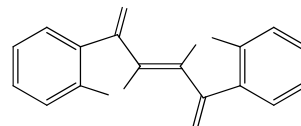
作成した海洋メタゲノムライブラリ約 10 万クローンに対して、色素生産および抗生物質生産能でスクリーニングを行った。

その結果、合計 300 クローンを超える色素生産クローンを見出した。色素は赤・青・黄色・黒および様々な蛍光色素と多様であり、化合物の極性や色合いなどからかなりの種類の化合物の生産が推測された。以上の結果から、実際にメタゲノム法により多くの低分子化合物の生合成遺伝子の取得が可能であり、また大腸菌という異宿主で物質生産が可能である事を確認した。

### (4) 生合成遺伝子の解析および生産化合物の同定

複数の色素生産クローンの解析を行ったところ、多様な生合成酵素および化合物を取得した。例として青色色素を生産した 6 クローンを解析した結果、生産物は全て植物色素である藍の主成分のインジゴであった。しかしながら、その生合成遺伝子は多岐にわたっており、メタゲノム法による多様な遺伝子の取得が可能である事を示した。

また、インジゴ生合成遺伝子は単一酵素で鮮やかな発色を示すため、レポーター遺伝子としての利用が考えられる。



その他、カロテノイド系色素、メラニン系色素、ポルフィリン系色素等様々な化合物およびその生合成遺伝子を取得した。

以上、本研究の目的であった、海洋環境からの生合成遺伝子取得に十分な高品質メタゲノムライブラリの構築技術を確立した。またそこからスクリーニングにより低分子化合物の生合成遺伝子を取得し、実際に大腸菌という異宿主で物質生産が可能なる事を示した。

本研究によりメタゲノムを利用した物質生産の実現性を確認したので、今後は各段階の技術を向上し、医薬資源として有望な物質の取得と応用展開へと結び付けていく計画である。

## 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)

[学会発表](計 10 件)

- 1) 藤田雅紀、酒井淳司、市川洋一、大塚雅巳  
海洋メタゲノムライブラリの構築と新規低分子化合物生合成遺伝子の探索  
第 130 回日本薬学会年会  
2010 年 3 月 28 日 - 30 日  
岡山 (岡山大学)
- 2) 藤田雅紀、Jon Clardy、酒井淳司、市川洋一、大塚雅巳  
異宿主発現法による新規生理活性物質の探索と生産研究  
第 32 回日本分子生物学会年会  
2009 年 12 月 10 日 - 12 日  
神奈川 (パシフィコ横浜)
- 3) 藤田雅紀、酒井淳司、市川洋一、大塚雅巳  
干潟微生物からのメタゲノムライブラリ作成および機能生遺伝子の探索  
第 26 回日本薬学会九州支部大会  
2009 年 12 月 12 日 - 13 日  
福岡 (九州大学)
- 4) Masaki Fujita、Jon Clardy  
Cloning and Heterologous Expression of Novel Antibiotic Pantocin C Biosynthetic Gene Cluster  
第 5 回日韓天然物化学談話会  
2009 年 8 月 27 日 - 29 日  
神奈川 (和光純薬研修所)
- 5) 藤田雅紀、酒井淳司、市川洋一、大塚雅巳  
海洋メタゲノムライブラリの作成と薬剤耐性遺伝子を指標とした新規生理活性物質生合成遺伝子の探索  
第 23 回海洋生物活性談話会  
2009 年 5 月 23 日 - 24 日  
神奈川 (東京大学三崎臨海実験所)
- 6) 藤田雅紀、酒井淳司、市川洋一、大塚雅巳  
海洋メタゲノムライブラリの作成と薬剤耐性を指標にした新規生理活性物質生合成遺伝子の探索  
第 129 回日本薬学会年会  
2009 年 3 月 28 日  
京都 (京都国際会館)
- 7) Masaki Fujita、Jon Clardy  
異宿主発現法を利用した新規生理活性物質  
Pantocin C の生産とその機能  
第 31 回日本分子生物学会年会  
2008 年 12 月 10 日  
兵庫 (神戸国際会議場)
- 8) 藤田雅紀・Jon Clardy  
異宿主発現法を用いた新規抗菌物質  
Pantocin C の生産と同定  
第 43 回天然物化学談話会  
2008 年 7 月 28 日 大阪 (エキスポパーク)
- 9) 藤田雅紀・Rebecca Bucher, Frank Schroeder, Jon Clardy  
線虫 *C. elegans* の耐性幼虫フェロモン: モデル生物の化学生態学  
第 3 回化学生態学研究会

2008年7月5日 北海道（ホテル湯の川）

10) 藤田雅紀・Jon Clardy

異宿主発現法で得られた新規抗菌物質  
Pantocin Cの構造と生合成遺伝子  
第6回次世代を担う有機化学シンポジウム

2008年5月30日-31日 東京（日本薬学会長居記念館）

〔その他〕

ホームページ等

<http://sendou.kuma-u.jp/research/fujita.html>

**6. 研究組織**

(1) 研究代表者

藤田 雅紀 (FUJITA MASAKI)

熊本大学・大学院先導機構・特定事業教員

研究者番号：30505251

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：