

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07114

研究課題名(和文) ソフトコーラルと海綿由来のテルペノイドの多様性と起源

研究課題名(英文) Study on the diversity and the origin of terpenoids in soft corals and sponges

研究代表者

田中 淳一 (Tanaka, Junichi)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：20163529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、沖縄沿岸に生息する海綿由来のメタゲノムDNAの抽出とソフトコーラル類のテルペン環化酵素について主に検討した。海綿由来のメタゲノムDNA抽出方法では、他の生物試料とは異なり、特定の方法が確立されていないことから、様々な抽出条件を検討した。しかしながら、どの海綿試料に対しても適用できる一般的な方法を見いだせなかった。一方、ソフトコーラル類からは、メタゲノムDNAが比較的容易に抽出でき、さらに既知のテルペン環化酵素を参考にして、候補遺伝子を見出すことに成功した。この研究では、当初メンバーに入らなかった城森助教が3年目に加入したことにより、かなりの発展をみた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿やソフトコーラルなどの含有成分には、生理活性や特異な分子構造で注目されるものが多く見だされてきた。21世紀に入ってからそれらの分子の形成に関与する生合成遺伝子が明らかにされつつあるが、まだまだ多くのものが未解明である。

この研究では、まだ試行錯誤状態である海綿からのメタゲノムDNA抽出条件の検討、およびソフトコーラル類のテルペン環化に関与する遺伝子について、沖縄沿岸の生きた海洋生物試料を用いて挑戦することとした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we examined extraction conditions for obtaining good quality metagenomic DNAs from sponge specimens and also for genes of terpene cyclases from soft coral specimens.

Although we tried various methods to prepare metagenomic DNAs from live sponges collected along the Okinawan coast, we could not find a general method applicable to any sponge species. On the other hand, metagenomic DNAs from soft corals can be prepared relatively easily and candidates for terpene cyclases were found by comparing with known terpene cyclases.

Dr. Jomori, who joined our laboratory in the third year, contributed to this project.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：海綿 ソフトコーラル テルペノイド テルペン環化酵素 メタゲノムDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生物などの海洋生物由来の天然有機化合物は、新規医薬資源や海洋生物の生命現象を解明する鍵物質として注目されてきた。海洋生物の中でも海綿類とソフトコーラル類はこれまでに非常に多くの研究がなされ、数多くの生理活性物質が報告されてきた。海綿由来の化合物は、その分子構造の多様さと様々な生理活性から多くの研究者を引き付けてやまない。一方、ソフトコーラル類はジテルペンやセスキテルペン類の宝庫として知られ、医薬探索資源としては海綿類に劣るものの、そのテルペノイド類の多様性は興味深い。さらに、これらの分子がどのようにそれぞれの生物で作られているのかについては、まだまだ未解明の部分が多い。

2004年のPielらによる onnamide A の生合成遺伝子の報告の後、いくつかの(しかし多くはない)海洋生物由来の興味深い化合物の生合成遺伝子が解明されてきた。一方、この研究を開始した時点では、海綿およびソフトコーラル由来のテルペノイドの生合成遺伝子の報告例はなく、まだ未解明の領域であった。

その理由として、海綿の場合には生物試料自体が多くの(共生)微生物を含んでいることに加え、様々な性状から高品質の遺伝子抽出が容易ではないことが推測される。一方、ソフトコーラルでは、薬剤に発展している化合物があまり多くないことが注目されていない理由ではないかと予想された。しかし、様々な環構造のジテルペン類が報告されており、何が原因でそのような多様性をもたらしているのかは興味深い。

研究開始当初は代表者単独の研究であったが、3年目は新たに研究室に加わった城森助教が研究協力者となり研究を進めた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、多様な物質を含有している海綿類については、一筋縄でうまくいく試料とは思えないことから、そのメタゲノム DNA を抽出すること自体を課題とした。沖縄沿岸ですでに主要代謝成分が解明されている海綿類がある程度あり、生きた試料を用いて抽出条件を検討してみることにした。一方、ソフトコーラル類は比較的容易に遺伝子を得ることができるので、こちらは一部をシークエンサーで解析した後、テルペン環化酵素、あるいは関連する酸化酵素などの探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

海綿では、まずテルペノイド(manoalide, heteronemin, pupukeanane, curcuphenol, spongian など)、またはメロテルペノイド(arenarol, avarol, puupehenone など)、あるいは他の系統の化合物(ポリケチド、アルカロイド等)を含有する海綿類を一度に2個体程度採集した。採集直後にそれぞれ二等分した試料のうち一方をカルシウムイオン等を抜いた人工海水で処理し、生かしたまま実験室に持ち帰った。各試料をミキサーまたは乳鉢を用いた組織の破碎、CTAB または Sarkosyl 等の試薬などでの処理後、フェノールクロロホルム抽出を行い、得られたメタゲノム DNA の状況を電気泳動で検討した。

また、海綿の場合には、組織に微生物が共生していることが予想されたので、SEM-EDX を使用してその表面や内部の観察を行い、果たして独立した微生物が生息するか、あるいは SEM-EDX でも見えない共生微生物しか考えられないか検討した。

一方、ソフトコーラル類では、新鮮な試料を酵素処理した後、Qiagen のキットを使用して DNA を得た。比較的良い DNA については、シークエンサーに送付することとした。また、過去に共同研究者が行ったシークエンス結果があったので、それも活用した。

4. 研究成果

海綿の場合では、上記の方法以外も含め、各試料について抽出方法をいくつも検討したが、どの海綿試料においても比較的長いメタゲノム DNA が得られる方法は見いだせなかった。

しかし、電気泳動の結果、比較的長いメタゲノム DNA を含む試料の中から数検体を次世代シークエンサーに送付し、結果を得た。試料によってはテルペン環化酵素の候補遺伝子が見いだされたものがあつた一方で、候補遺伝子が全く見いだせない試料も存在した。

一方、ソフトコーラル類については、先に共同研究者(前川教授、戸村博士)が *Sarcophyton* 属の試料から得ていた RNASeq の結果を相同性検索したところ、テルペン環化酵素候補遺伝子を見出した。

しかしながら、この研究途中で2つのアメリカの研究グループ(Erick Schmidt ら、Brad Moore ら)によって、数種のソフトコーラル類のテルペン環化酵素の同定だけでなく、発現したタンパク質による物質生成と同定、タンパク結晶解析による構造まで明らかにされた。

そこで、当研究室ではこれまでに *Sarcophyton* 属ソフトコーラル類の化学的、形態的、遺伝的多様性などに取り組んできたことから、多様性の観点からさらに追及することとした。

新たに沖縄沿岸で採集したソフトコーラル試料を含有成分の同定とともに遺伝子を調べたところ、含有成分と関係なく2つのテルペン環化酵素推定遺伝子をもっていた。これらについて大

腸菌の異種宿主発現系を用いて調整した組み換えタンパク質を用いて機能確認したところ、組み換えタンパク質が基質を環化することが明らかになった。しかし、ソフトコーラルのテルペン生合成遺伝子と含有テルペン類の多様性の関係はまだ明らかにできていない。

上記以外に、台湾の NMBA の Sung 教授との共同研究で、*Briareum* 属の briarane 型ジテルペン類の多様性について報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Huynh Thanh Hao, Wen Zhi-Hong, Su Jui-Hsin, Yao Zhi-Kang, Zheng Li-Guo, Tsai Yu-Chi, Tanaka Junichi, Liaw Chia-Ching, Sung Ping-Jyun	4. 巻 71
2. 論文標題 Briastecholide M, a New Polyoxygenated Briarane from Briareum stechei	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 183 ~ 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c22-00605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	城森 啓宏 (Jomori Takahiro) (60964898)	琉球大学・理学部・助教 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
その他の国・地域	NMMBA		