

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20717

研究課題名(和文) 海綿における水平伝播を起点とした生理活性天然物生合成遺伝子の探索と解析

研究課題名(英文) Horizontal gene transfer based discovery of biosynthetic genes of natural products from marine sponges

研究代表者

城森 啓宏 (Jomori, Takahiro)

琉球大学・理学部・助教

研究者番号：60964898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：海綿からは抗がん剤などの有用天然物が報告されている。本研究課題では稀少天然物の量的供給を指向し、海綿からの天然物の設計図である生合成遺伝子の取得に挑んだ。これまで生合成遺伝子クラスターには水平伝播を担う遺伝子がコードされていたことから、遺伝子情報が濃縮されている、遺伝子送達に重要な膜ベシクルを海綿から分離し、メタゲノムDNAをナノポアシーケンサーへ供しDNA情報を得ることに成功した。得られたDNA情報より生合成遺伝子解析ソフトを用いて抗真菌剤microsclerodermin推定生合成遺伝子クラスターを得ることに成功した。今後、推定修飾酵素の解析を通して生体触媒の応用を模索する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿由来の生合成遺伝子の探索は共生微生物を含むすべての海綿組織メタゲノムDNAから見出すか、微生物のシングルセル分析と遺伝子増幅を駆使して数例報告されてきた。一方、この常法が通用しないのが大多数の海綿を占める。本成果では、海綿の膜ベシクルDNAを用いることで生合成遺伝子を濃縮することで結果的に生合成遺伝子の発見へとつながったことが示唆され、今後他の海綿からの生合成遺伝子探索の開拓基盤となることが期待される。天然物の設計図である生合成遺伝子クラスターを見出すことが可能となれば、新奇な修飾を基盤に生体触媒開発や、異種宿主発現株の構築、稀少天然物の量的供給への基盤構築へとつながる。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges are well-known bioresources for bioactive substances such as anticancer agents but supply problems are still solved. In this research project, we attempted to acquire biosynthetic genes, which serve as blueprints for natural products from sponges, to get insights into the solution to the supply problem. Since genes responsible for horizontal transfer have been encoded in biosynthetic gene clusters so far, we fractionated membrane vesicles, important for horizontal transfer, and obtained metagenomic DNA sequences by a nanopore sequencer. From the obtained DNA information, we successfully found a putative biosynthetic gene cluster for the antifungal agent using the analysis software AntiSMASH. In the future, we will explore the application of biocatalysts through the functional analysis of modification enzymes.

研究分野：天然物化学

キーワード：海綿動物 生合成遺伝子 海洋天然物 生合成 修飾酵素 メタゲノム 膜ベシクル 水平伝播

1. 研究開始当初の背景

海綿動物からは、抗がん剤などの医薬品候補化合物が複数単離されている。しかし、それら化合物は低収量かつ複雑な構造を有し量的供給が難しいため、臨床応用に至った化合物は少ない。量産化に向けた知見を得るために、近年、次世代シーケンサーを用いて海綿メタゲノムから化合物の設計図である生合成遺伝子が数例報告された。それら遺伝子情報には、異種生物間の遺伝子移動 (= 水平伝播) に必要な因子が保存されていることが明らかになってきた。また 1 種の化合物が系統的に異なる複数の海綿から報告されていることから、生合成遺伝子クラスターが異種生物間で水平伝播している可能性が高い。海洋生物のみならず水平伝播は、環境中の至る所で起こっており、人々の健康とも密接な関係がある。例えば、ヒト腸内細菌叢において、毒素の生産遺伝子の移動による病原菌の蔓延や、抗生物質の耐性遺伝子獲得による多剤耐性菌の出現などが相互作用実験などにより明らかにされている。しかし、海洋生物における遺伝子水平伝播の挙動に関する知見は不足しており、なかでも生合成遺伝子クラスターの水平伝播に関する実体やその機構は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、海綿における遺伝子の水平伝播に着目した生合成遺伝子クラスター探索基盤を確立することを目指し、共生微生物が保有する遺伝子クラスターの水平伝播の実体を明らかにする。なかでも生物間の水平伝播ツール「運び屋」として知られているメンブレンベシクル(MV)に焦点を当て、生合成遺伝子情報の濃縮を図ることで新たな生合成遺伝子クラスターの取得を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 海綿メンブレンベシクルを用いた遺伝子水平伝播の現象を理解するために、初めにモデル実験として沖縄県産海綿 *Theonella swinhoei* のアクチン重合阻害剤 misakinolide 既知生合成遺伝子クラスター(mis BGC)を用いて、MV のプロファイリングを実施した。海綿全組織および超遠心にて分画した海綿 MV を用いて、mis 遺伝子を特異的に認識するプライマーを用いる PCR 法により遺伝子の増幅の有無や MV の代謝物解析を実施した。
- (2) 海綿動物は自己体積の 3 分の 1 も共生微生物を含むため、直接海綿のメタゲノム DNA を調製しシーケンサーで読んでも、存在量の少ない生合成遺伝子の発見できない場合が多い。そこで本研究では生合成遺伝子情報が蓄積されていると考えられるメンブレンベシクルを分離し、調製したMVメタゲノム DNA をロングリードシーケンサーNanopore へ供した。得られた DNA 情報より生合成遺伝子解析ソフトを用いて推定生合成遺伝子クラスターを探索した。

4. 研究成果

- (1) 海綿メンブレンベシクル MV のプロファイリングと水平伝播の検討  
 海綿メンブレンベシクルを用いた遺伝子水平伝播の現象を理解するために、初めに海綿より MV の代謝物解析や水平伝播の役割を担うトランスポザーゼなどの形跡を調査した。新鮮な海綿 *T. swinhoei* 全組織のメタゲノム DNA および超遠心にて分画した海綿 MV を調製することに成功した。misBGC の上流と下流にコードされている推定遺伝子 *misT1*、および *misT2* を特異的に認識するプライマーを用いてメタゲノム DNA または海綿 MV を鋳型に PCR を実施した結果、MV から調製したメタゲノム DNA より上流および下流の *misT* の増幅が確認できた。このことから海綿 MV には、misakinolide 遺伝子クラスターが含まれていることが示唆された。一方で、海綿 MV に対して、HPLC を用いた代謝物解析を行った結果、misakinolide が MV に含まれていることも示唆された。並行して遺伝子のアクセプターとして、宿主海綿より海洋細菌の分離も同時に実施し、合計 100 株の細菌を分離しており、今後それら細菌複合培養液へと MV を共培養し、*misT* 遺伝子の PCR スクリーニングによって遺伝子水平伝播の現象について知見を得る。

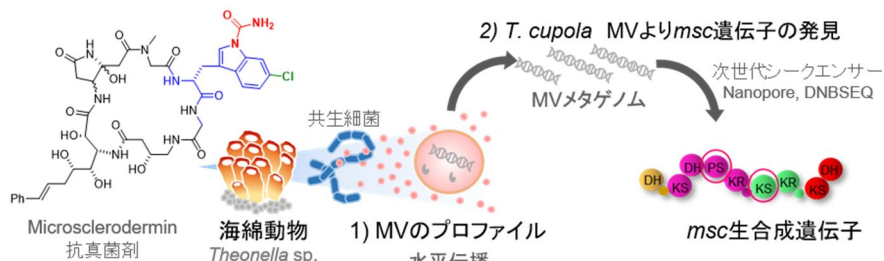


図 1. 研究成果の概要

- (2) 海綿 MV からの抗真菌剤 microsclerdermin C 推定生合成遺伝子クラスターの発見  
 上述の基礎的研究に加えて、これまで本課題で Theonellidae 科の MV には生合成遺伝子が

含有されていることを見出してきた。そこで知見が蓄積されつつある同じ科・属の沖縄県と那国産 *Theonella cupola* を研究ソースとして、海綿 MV メタゲノムからの有用天然物合成遺伝子クラスターの探索を実施した(図1)。 *T. cupola* には非天然型アミノ酸で構成されたペプチド cupolamide 類や抗真菌剤 microsclerodermin C/D を微量成分として含まれているが、それら合成遺伝子や経路については未解明である。本課題では、初めに *T. cupola* 由来 MV を調製し、そこから長鎖メタゲノム DNA の取得に着手した。超遠心により分画した MV 画分をゲノム DNA 抽出キットで粗 DNA 抽出物を得た後に、ピッピング DNA 電気泳動により平均 DNA 鎖長 40 kbp を調製することに成功した。それら MV メタゲノム DNA を用いてシーケンスライブラリを調製し、ロングリードシーケンサー-Nanopore に供した結果 2 Gb 以上の DNA 配列取得に成功した。その後、研究協力者の北海道大学協本教授・松田研一講師のもとで配列のアセンブリを実施した結果、断片的ではあるが >70kb を超える非リボソーム合成・ポリケチド配合型の推定合成遺伝子クラスター (NRPS-PKS 配合型 BGC) を発見した。しかしながら、最終合成産物を予測するにはエラー率が高かったため、次にショートリードシーケンサー-DNBSEQ により 15 Gb を取得し、長鎖配列とのハイブリットアセンブリを行うことで、完全長の推定合成遺伝子クラスターの取得することに成功した(図2)。そのクラスター内においてアデニル化ドメインの基質構成アミノ酸が、microsclerodermin C/D のものと良い一致を示したことから、この NRPS-PKS 配合型 BGC は、microsclerodermin 合成遺伝子クラスターであることが示唆された。2013 年 Müller らは土壌粘性細菌 *Myxobacterium* から低い抗真菌活性を示す microsclerodermin 類縁体とその合成遺伝子を報告している。一方、我々が海綿より発見した高い抗真菌活性を示す microsclerodermin C (mscC) の *mscC* 推定合成遺伝子は報告されていない。なかでも *mscC* 特異的な Trp-インドール上の 1*N*-カルバモイル基修飾は、抗真菌活性が約 20 倍向上することが知られているが、その修飾酵素と遺伝子は未同定である。今後の研究課題として新たな生体触媒のレパートリー拡充を目指し、*T. cupola* 由来カルバモイル転移酵素の推定遺伝子を大腸菌の異種発現系に供し、得られる組換え酵素と脱カルバモイル体の microsclerodermin D または Trp にカルバモイルリン酸を加え、酵素の機能解明を目指す。

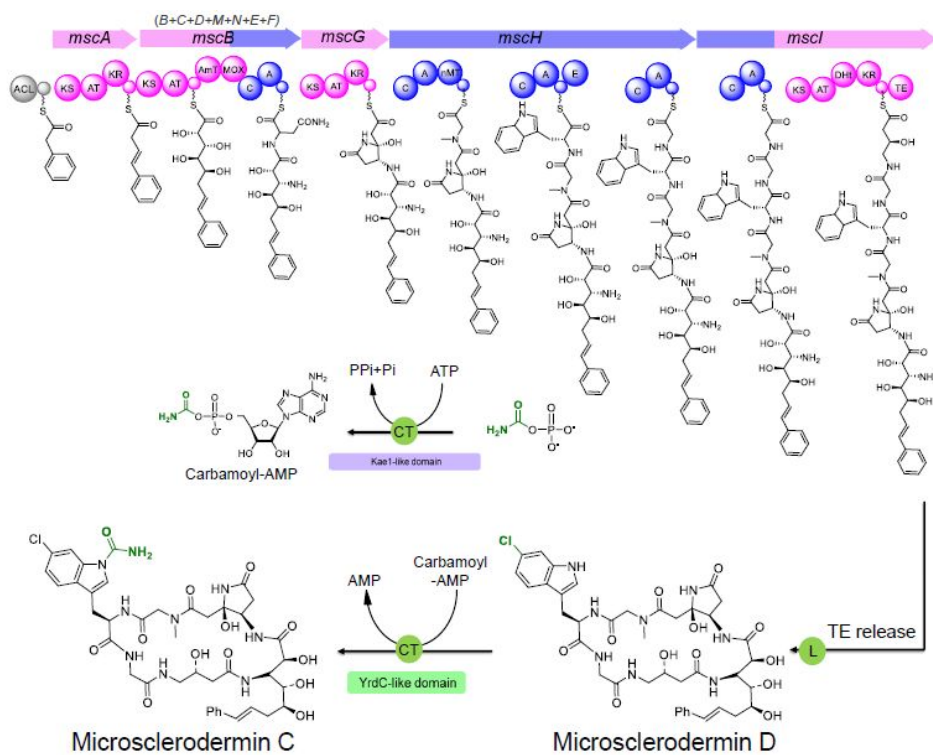


図2. 海綿 *T. cupola* 由来 microsclerodermin 推定合成経路

さらに 2013 年 Müller らは海綿メタゲノムにおける 16SDNA の系統解析の結果から、海綿 *Microscleroderma* 属や *Theonella* 属由来の microsclerodermin 類の真の生産者は、粘性細菌 *Myxobacterium* と予想していた。しかし、我々が海綿 *Theonella cupola* より得た *mscC* 推定遺伝子の多くは、フィラメント状細菌 *Entotheonella* 属と相同性が高いことが示唆された。本結果より海綿 *Theonella cupola* における *mscC* 生産菌は、研究室では培養が困難とされる難培養性の共生細菌 *Entotheonella* であることが示唆された。本細菌は他の *Theonellidae* 科にも共生しており、生物活性物質の生産能が高い有用細菌として報告されている。今後、CARD-FISH 法やシングルセル分析による同定を実施し、海綿における有用物質の真の生産者の同定を行うことで、化合物生産起源や水平伝播の可能性について知見を得る。以上の成果は、2023 年 11 月に開催された国際シンポジウムにてポスター発表にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fuyu Fujii, Kenichi Matsuda, Toshiyuki Wakimoto, Junichi Tanaka, Takahiro Jomori
2. 発表標題 Search for the biosynthetic gene clusters of bioactive cyclic peptides from a marine sponge Theonella swinhoei
3. 学会等名 International Symposium in Okinawa, 2023, on Ciguatera and Related Marine Biotoxins (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------