

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23710252

研究課題名（和文） テトロドトキシン生産菌のゲノム解析に基づく生合成機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of tetrodotoxin biosynthesis based on the genome sequence analysis of the potential producer microorganisms

研究代表者

工藤 史貴 (Kudo Fumitaka)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00361783

研究成果の概要（和文）：フグ毒として有名なテトロドトキシン（TTX）の生合成機構を解明するために、TTXを生産するとして保存されている微生物のゲノム解析を行い、TTX生合成に関与すると推定した酵素遺伝子を *in silico* にてスクリーニングした。その結果、想定したような特徴的な遺伝子からなるクラスターを発見することは出来なかった。また、本研究で取り扱った微生物による TTX 生産性を再検討した結果、培地成分に由来する TTX 同族化合物と質量が一致する夾雑物ばかりで、TTX 生産性を再確認することは出来なかった。これらの結果から、TTX の生合成は低分子の一次代謝産物から多段階を経て生合成されるものではなく、比較的炭素数の揃った核酸などの分子から短行程で生合成される可能性を考えるに至った。

研究成果の概要（英文）：The genome sequence analysis of *Shewanella algae* JCM 21037, *Pseudoalteromonas tetraodonis* JCM 21038, and *Vibrio alginolyticus* NBRC 15630 that are deposited as tetrodotoxin (TTX) and/or its homolog producers were performed to identify the TTX biosynthetic gene clusters. Although three hundreds of characteristic genes were found in *Vibrio alginolyticus* by comparison with same genus of bacteria, any obvious gene cluster that seems to be responsible for the TTX production was not identified. Therefore, it was speculated that the TTX biosynthetic genes might spread out in the genomic DNA. Otherwise, they are maybe smaller number of genes than that of initial expectation. This might suggest that TTX could be biosynthesized from relatively large size of molecules rather than small primary metabolites. Thus, in future, such advanced analogs of TTX would be utilized as potential substrates to identify TTX biosynthetic enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

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：生合成・微生物ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

テトロドトキシン（TTX, 図1）はフグ毒として有名であるが、ある種のカエルやイモリにも含有することが知られている。TTX含有量は個体、季節、地域により大きく異なることが明らかにされており、これら動物の体内産物ではなく、外部の餌から体内に取り込

まれ蓄積されるとされている。したがって、TTXの起源は食物連鎖をさかのぼって微生物が生産することが示唆され、実際、複数の微生物が TTX 生産菌として報告されている。TTXは、その複雑な構造と毒性のために、古くから多くの天然物化学研究者の研究対象となってきたが、未だその生合成研究は進ん

でない。

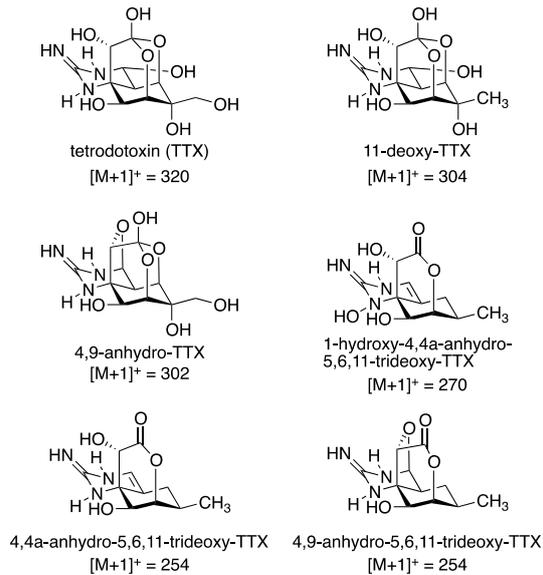


図1 テトロドトキシン (TTX) と単離報告されている同族化合物

TTX の生合成はこれまでに、アルギニンもしくは 2-デオキシ-3-オキソペントースとグアニジンから構成されるユニットと、イソプレニルニリン酸 (IPP) 間での縮合により基本骨格が構築されると提案されているが、その確たる証拠は今のところ報告されていない。一方その化学構造からは、糖質に由来する炭素 6 員環を足がかりとした生合成経路や、核酸塩基の異化代謝経路に類似する生合成経路なども推定することができる。しかしながら、TTX を生産するとして報告されている微生物が生産する TTX 量は実験室レベルでは極めて少なく、微生物による TTX 生産性に関しては今なお真偽が問われており、興味深い TTX 生合成研究は全く行なわれていなかった。

2. 研究の目的

TTX 生産微生物への投与実験も生合成研究の一手法であるが、実験室レベルでの生産量は極めて少なく実現性に乏しいと考えられた。一方、21 世紀に入り、DNA 配列解析の技術革新が進み、各種生物種のゲノム DNA 配列が短時間・低コストで行なわれるようになり、ゲノム配列からのトップダウンによる標的遺伝子の取得も容易となった。そこで本研究では、TTX もしくはその同族化合物を生産するとして微生物保存機関に登録されている *Shewanella algae* JCM 21037、*Pseudoalteromonas tetraodonis* JCM 21038、*Vibrio alginolyticus* NBRC 15630 のゲノム DNA を配列解析し、TTX の生合成に関与する推定酵素遺伝子を *in silico* にて探索することにした。そして、謎の多い TTX 生合成機構

解明に向けたきっかけを見だし、その興味深い生合成機構を解明することを目的とした。またこの成果により、毒物である TTX を生産する生物を、遺伝学的手法により検出可能になると期待した。

3. 研究の方法

まず、TTX もしくはその同族体を生産すると報告されている生物を文献検索した結果、*Shewanella algae* JCM 21037、*Pseudoalteromonas tetraodonis* JCM 21038、*Vibrio alginolyticus* NBRC 15630 の 3 株が入手可能であった。これら微生物は、指定された培養条件にて培養し、得られた菌体からゲノム DNA を抽出した。高速 DNA シークエンス解析は外部委託し、ドラフトゲノム DNA 配列を得た。

in silico におけるスクリーニングの結果、TTX の生合成に関与すると推定できる酵素遺伝子の周辺には、これら微生物にだけ特徴的に存在する遺伝子を発見することが出来なかった。微生物二次代謝遺伝子クラスターは一般に、生産微生物のゲノム DNA の一領域にクラスターとして存在する。そこで次に、同属のゲノム DNA 配列と比較して、これら微生物だけに特徴的な遺伝子領域が存在しないか調べた。結果として、本研究で配列解析した微生物ゲノム DNA 配列の大部分の領域は、同属のゲノム DNA 配列と類似しており、いくつか見つかった特徴的な遺伝子 (*Vibrio alginolyticus* では 4537 遺伝子中 378 遺伝子) に関しては、不連続な領域に存在するものが多かった。これら特徴的な遺伝子がコードするタンパク質の推定機能と TTX 分子形成に関与しうる反応との対応付けも試みてきたが、現在までのところリーズナブルな機能注釈ができていない。機能推定が困難な遺伝子も多く、これまでに知られていない形式の反応を触媒する酵素により生合成されることも想像された。

トップダウンによる TTX 生合成遺伝子の特定が難航したため、*Vibrio alginolyticus* に絞り、ランダムに遺伝子を発現させて TTX 同族体の異種菌生産の検討も試みているが、現在までのところポジティブな結果は得られていない。本実験に関しては、異種微生物由来の遺伝子組換え大腸菌により、毒物である TTX 生産を検討するため、遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置に関して大臣確認した (23 受文科振第 243 号)。

以上の研究状況から、本研究で使っている微生物の TTX 生産能が疑われた。そもそも TTX 生産量が少ないことが懸念されたので、論文報告に従って、各種培養条件を検討した。特に、TTX が塩基性条件下で分解されることが知られているので、培養液が極端な塩基性

にならない培養条件を種々検討した。培養液から活性炭吸着物を抽出し LC-ESI-MS 分析した結果、多くの培養抽出物から TTX の同族化合物と考えられる質量電荷比のピークが複数観測された (図 2)。しかしながら、コントロール実験として行なった培地成分から抽出したサンプルからも同じ形状のピークが複数観測された。抽出物をイオン交換クロマトグラフィーにより分画して NMR 分析を行なったが、TTX 同族体と考えられる化合物の存在を確認することができなかった。高分解能 ESI-MS 分析でも、TTX 同族体と考えられる化合物の組成式からなるシグナルは検出されなかった。従って、本研究で取り上げた微生物は、本研究で検討した培養条件下では TTX を生産しない、もしくは、本研究で利用した分析手段の検出限界以下の量しか生産しないことがわかった。また、LC-ESI-MS 分析では TTX 同族化合物と同じ質量電荷比のピークが複数検出されたことから、生産性の確認には、高分解能 LC-ESI-MS や NMR 分析により確認するなど、慎重に進める必要性を再認識するに至った。

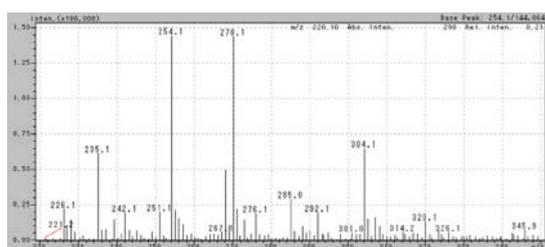


図 2 *Vibrio alginolyticus* 培養抽出物の LC-ESI-MS スペクトル (ポジティブモード)。TTX; $[M+1]^+ = 320$, deoxy-TTX; $[M+1]^+ = 304$, 1-hydroxy-4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxy-TTX; $[M+1]^+ = 270$, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxy-TTX; $[M+1]^+ = 254$ に相当する m/z が観測された。(培地成分由来のスペクトルもほぼ同様であった。)

4. 研究成果

本研究では、論文として外部発表できる成果は得られなかったが、TTX を生産するとして公共機関に保存されている微生物のゲノム解読したこと自体が TTX 生合成研究を進める上で大きな一歩を踏み出したと考えている。同属微生物と比べて、それら微生物だけに特徴ある遺伝子クラスターを見いだすことが出来ないという事実は、グルコースやアミノ酸、酢酸などといった低分子を出発物質として多段階生合成反応により構築されるというよりも、比較的炭素数が揃ったアデノシンなどの核酸塩基などを出発物質として“短工程”で生合成される可能性が考えられた。同位体標識化合物の投与実験による生

合成解析が皆無であることから、TTX の構造に類似する化合物がごく微量自然界に存在し、それが短行程で生合成される可能性が考えられる。これまで推定してきた生合成経路を大きく見直すことになったのも、一つの成果として考えている。

生体内で必ずしも多くない補因子などの化合物の生合成、もしくは異化代謝するための経路の副生成物として存在するために、非常に少量の生産に留まっている可能性も考えられる。生体内補因子として知られているモリブドプテリンやチアミンジリン酸のピリジン環の生合成酵素反応を考えると、これまでに予想していなかったアデノシンなどの核酸化合物を基質として、多段階転位反応により TTX のグアニジン含有骨格が形成されうる。従って、核酸化合物の生合成、代謝異化に関わる酵素の機能解明を行い、それを起点として類似酵素反応を行う可能性のある酵素遺伝子を、バイオインフォマティクスを駆使して探索することも一手法として考えられる。TTX 自体が、ごく微量で微生物にとって重要な役割を果たす補因子のような化合物であることも考えられる。

本研究で解読した微生物ゲノム DNA 配列中の特徴的な遺伝子の機能推定を再度行い、TTX の生合成に関与する可能性のある酵素遺伝子を異種発現させて、TTX 生合成の前駆体とも考えられる同族化合物を基質として酵素反応解析を行うことも、今後の研究課題の一つであろう。また、これまでに単離報告されている TTX 同族体のうち、酸化度が低い同族化合物を変換することができる微生物をスクリーニングして TTX 生合成に関与する酵素を探索することも今後の研究手段として考えられる。今回取り扱った微生物による TTX 生産性を再検討した結果、TTX 同族体とクロマトグラフィーの挙動と質量が一致する化合物が複数培地成分に含まれることを再認識した。従って、期待するような微生物をスクリーニングする際には、TTX とは無関係の夾雑物の存在を十分考慮しながら検討する必要がある。

一方で、微生物による TTX 生産能を明確に評価できない以上、遺伝子破壊実験や同位体標識化合物の投与実験などによる生合成研究は困難を極める。これまでに生産菌として報告されている微生物は、TTX が検出された生物種から単離されていることが多い。質量分析やクロマトグラフィー、抗体による検出に頼っている場合が多く、培養抽出物から NMR により化学構造が確認された報告は皆無である。生産量が微量であっても、培養のスケールを大きくすることで単離精製することが可能のはずだが、低分解能質量分析で観測される TTX 同族化合物と同じ質量を有

し、クロマトグラフィーでの挙動も類似する化合物との分離は容易でないと考えられ、微生物による生産自体も再検討する必要があると感じている。

もし、TTXを生産するとして報告されている微生物が低分子一次代謝産物を利用して生合成するのであれば、同位体標識したグルコースや酢酸ナトリウムなどを培地成分に加えることで、なんらかの経路で標識されたTTXもしくは同族体が生産されるはずである。生合成研究としては古典的な手段であるが、これまで全く報告がないことを鑑みるに、培養により標識化されたTTXが得られていないと考えている。従って、生産するとして単離された微生物でも、一からTTXを生合成するわけではなく、TTXの炭素原子や窒素原子のほぼ全てが含まれる何らかの前駆体を出発物質として変換されて構築される可能性がある。つまり、TTXの前駆体は自然界ではありふれた化合物であり、比較的短行程でTTXへと変換する経路が存在することが想像された。これは、ゲノムDNA配列中に、特徴ある遺伝子クラスターを見いだすことができなかつたこととも対応する。

また、微量成分としてしか検出されないことを鑑みるに、TTXやその同族化合物は、ごくごく微量は自然界に無機的に存在し、生産性が検出されてきた微生物による生態濃縮も否定できない。先にも述べたが、TTX生合成前駆体と考えられる同族化合物を選択的に認識して変換する酵素活性を有する生物を見つけることが、今後のTTX生合成研究のブレークスルーになるであろう。

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)

外部公表できる論文無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 史貴 (Kudo Fumitaka)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00361783