

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6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780210

研究課題名（和文）

海洋無脊椎動物を宿主とした共生微生物の生育誘引物質の解明

研究課題名（英文） Search for compounds enhancing cell growth of symbiotic bacteria derived from marine invertebrates

研究代表者

高田 健太郎 (TAKADA KENTARO)

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90455353

研究成果の概要（和文）：

海洋無脊椎動物、特に海綿動物の体内には多くの共生微生物が存在し、多様な二次代謝産物を生産することが知られているが、これらの共生微生物は難培養であると考えられている。本研究では、難培養微生物を培養可能にするべく、微生物生育に必要な宿主由来の因子、もしくは微生物間における新たなシグナル分子を探索すべく研究を開始した。スクリーニングをおこなったところ、クロイツカイメン中の共生微生物から生育誘引、もしくは生育補助作用を示す株を複数単離することに成功した。現在、複数の株から活性物質の単離を試みている。また、放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 からは5種の新規環状ペプチドを単離し、構造決定に成功した。これらの化合物は同種もしくは異種放線菌の生育に関与するタンパク質に作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sponges are one of the most important marine sources of biologically active natural products. These natural products have been thought to be produced by symbiotic bacteria in the marine sponges because structural frameworks of some natural products resemble those derived from terrestrial bacteria. However, there are few evidence that natural products are really produced by symbiotic bacteria since they are unculturable. In this project, we are searching compounds, which enhance cell growth, from the host sponge (*Halicondria okadai*) or another symbiont. In the related project, we isolated five novel cyclic peptides from marine-derived *Streptomyces* sp. JAMM992 and determined their structures including absolute configurations. Preliminary experiment implied that these peptides interacted one protein involving in cell growth of *Streptomyces* species.

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	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：天然物化学、海洋生物、共生微生物

1. 研究開始当初の背景

近年、海洋無脊椎動物から数多くの有機化

合物が医薬品のシード物質として発見されているが、これらの化合物の多くは、海洋無

脊椎動物自身が生産するのではなく、共生微生物による産物であると考えられている。しかしながら、共生微生物が難培養性であることから、天然物が共生微生物によって生産されているという、実験的な証拠は少ない。また、長年の土壌微生物中の抗生物質研究にも関わらず、近年の16S rDNA解析では、人類が環境中の数パーセントの微生物しか利用できていないという報告もあり、他の多くは難培養性であると考えられている。(Barer M. R. et al. *Adv. Microb. Physiol.* 1999, 41, 93-137.)

難培養である一つの理由として、環境中もしくは生体内では、無数の微生物が共存しており、同種、異種間で様々なシグナル物質を放出、受容していると考えられるが、この共生関係を実験室では完全に再現できないことに起因していると考えられる。これを示唆する研究として、土壌環境中で菌の培養をおこなったところ、通常培養では出現できない微生物を多く発見したという報告例がある。(Kaeberlein T. et al. *Science* 2002, 296, 1127-1129.)

実験室で共生状態の完全な再現は難しいものの、同種、異種間のシグナル物質の存在を仮定し、より共生に近い状態になるよう環境を整えることで、新たな共生微生物の発見と単離につながると考えている。微生物ではこれまでに、同種間のシグナル物質として、土壌中の放線菌が放出するエーファクターや、グラム陰性菌のクオラムセンシング物質、*N*-アセチルホモセリンラクトンなどが知られている。また、異種間では、海洋細菌由来のシデロフォアが報告されている。(D'Onofrio A. et al. *Chem. Biol.* 2010, 17, 254-264.)

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では海洋無脊椎動物中の共生微生物を用いて、宿主-微生物、微生物-微生物間における生育誘引物質の解明を目指し、活性試験を構築するとともに、生育誘引物質を単離し、各種機器分析を用いて化学構造を決定することを目的

とした。

3. 研究の方法

(1) カイメン *Halicondria okadai* 由来の共生微生物を用いた生育誘引物質の探索

神奈川県三浦半島でクロイソカイメンを採集し、大型ブレンダーを用いて、水で抽出した。抽出液は40・mメッシュでろ過後、遠心機を用いてバクテリア及び残渣を沈澱させた。さらに上清を5.0・mのフィルターを用いて粗めにろ過した後、最終的に0.25・mのフィルターを用いて滅菌ろ過をおこなった。得られた滅菌済み水抽出液は、オートクレーブ後の培地に添加して使用した。宿主依存的に生育する微生物の探索をおこなうため、クロイソカイメン抽出液を含む培地に生育した微生物を、再度、カイメン抽出液を含む培地、含まない培地での生育を比較検討した。

また、生育を相補する微生物を探索するため、比較的高濃度で共生微生物を含む試料を寒天プレートに播き、生育した菌株のうち近距離に生育する2つの菌株を選択し、別の寒天プレートに画線することで、生育誘引、生育補助作用を評価した。得られた候補株のうち、化合物供給側の菌株を液体培地にて培養したのち、メタノールにて抽出し、粗抽出物を得た。その後、二層分配、ODS フラッシュクロマトグラフィーで分画した。

(2) Surugamide 類の単離、構造解析と生物活性

① Surugamides の培養と精製

放線菌の培養は5 LのPC1培地(1%スターチ、1%ポリペプトン、1%肉エキス、1%モラセス)を用いて30℃で5日間おこなった。培養後、培養上清は酢酸エチルで、菌体はアセトンでそれぞれ抽出した。抽出物を合一後、二層分配、ODS カラムクロマトグラフィーで分画した後、最終的にはHPLCで精製した。

② 構造解析

高分解能MSスペクトルはESI-TOFMSによ

り測定した。NMR 解析は ^1H NMR に加え、COSY, TOCSY, HSQC, HMBC スペクトルを測定することで、部分構造を決定した。また、アミノ酸配列は NOESY スペクトルにより決定した。

③絶対配置の決定

化合物に 6N HCl を加え、110°C で一晩加水分解した後、Marfey 法により各アミノ酸の絶対配置を決定した。また、部分加水分解の際には 4N HCl を用い 100°C で 4 時間加水分解した。部分加水分解によって得られたペプチド断片は LC-MS により分析と分画を同時におこなった。すなわち、LC と MS の間にスプリッターを設置し、溶出液の 20% を MS に導入し、残りの 80% はフラクションコレクターにより分画した。LC-MS/MS にて各ペプチド断片のアミノ酸配列を同定することで、任意のペプチド断片を得た。ジペプチドの合成は、各アミノ酸のメチルエステルを調製し、Boc アミノ酸を縮合した後に Boc 基を脱保護し、さらに DAA 誘導体とした。一方で、Ile-Ile を含む部分加水分解画分もメチルエステルに変換後、DAA 誘導体とすることで合成標品との保持時間を比較した。

4. 研究成果

(1) カイメン *Halicondria okadai* 由来の共生微生物を用いた生育誘引物質の探索

カイメン *H. okadai* の抽出物を含む培地 (GE 培地) に生育する微生物を、再度、GE 培地およびカイメン抽出液を含まない培地 (G 培地) での生育を検討した結果、G 培地で明らかに生育しない株を数株発見した (Figure 1a および 1b)。また、互いに生育を促進する株も複数ペア確認することができた (Figure 1c)。前者に関しては、*H. okadai* の抽出物を用いて、後者に関しては化合物提供側の株を液体培養し、その抽出物を用いて、二層分配および各種クロマトグラフィーを用いて、活性物質の単離を試みているが、未だ単離には至っていない。

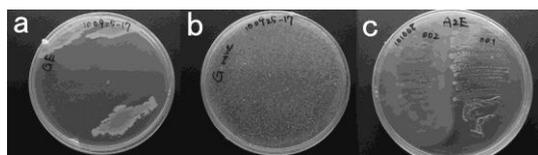


Figure 1 寒天プレート上の共生微生物の生育

(2) Surugamide 類の単離、構造解析と生物活性

関連研究より海洋放線菌 *Streptomyces* sp. から surugamides A-E と命名した 5 つの新規環状ペプチドを単離した。Surugamide A の平面構造は NMR および MS を主体とした機器分析により cyclo

[-Ile-Ile-Lys-Ile-Phe-Leu-Ile-Ala-] であることが明らかとなった。各構成アミノ酸の絶対配置を決定するために Marfey 法をおこなったところ、L-Lys, D-Phe, D-Leu, D-Ala が存在することが明らかとなった。一方で、分子中の 4 残基の Ile は L:D=3:1 で存在したため、分子中の D-Ile の位置を特定する必要があった。そこで、微量の天然物を部分加水分解し、LC-MS/MS-guided separation を用いて、複数のペプチド断片を精製することに成功した。そのうち Ile-Ile-Lys 断片を Marfey 法により分析したところ、L:D=1:1 で Ile が含まれており、他の Ile を含むペプチド断片からは L-Ile のみが検出された。そこで、全ての絶対配置の組み合わせを持つ Ile-Ile を化学合成し、天然物由来のペプチド断片との保持時間を比較することにより、L-Ile-D-Ile であると決定した。

Surugamides B-E は化合物 A に含まれる 4 つの Ile がそれぞれ Val に置換したペプチドであることが、各種機器分析により明らかとなった。また、構成アミノ酸の絶対配置について調べたところ、Val の置換位置に関わらずアミノ酸の絶対配置は化合物 A と同じであった (Figure 2)。この結果および抽出物中に化合物 B-E がほぼ等量含まれていることから、surugamides は非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成され、A-domain の基質認識の特異性の低さから一定の割合で Val 残基を取り込んでいることが示唆された。現在、生合成遺伝子の解明を試

みている。

Surugamides は転移性がん細胞の浸潤に関与する酵素 cathepsin B を弱いながら阻害した。また、更なる生物活性の評価をおこなったところ、放線菌の生育に関与するタンパク質を活性化する可能性が示唆されたため、現在、その詳細を検討している。

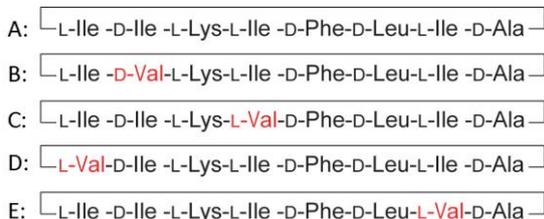


Figure 2 Surugamides A-E の化学構造

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kentaro Takada, Akihiro Ninomiya, Masato Naruse, Yi Sun, Masayuki Miyazaki, Yuichi Nogi, Shigeru Okada, Shigeki Matsunaga: Surugamides A-E, cyclic octapeptides with four D-amino acid residues, from a Marine *Streptomyces* sp.: LC-MS-aided inspection of partial hydrolysates for the distinction of D- and L-amino acid residues in the sequence J. Org. Chem *in press* (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. 二宮章洋, 高田健太郎, 岡田茂, 松永茂樹, 能木裕一: 海洋放線菌 *Streptomyces* sp. 由来の新規ペプチドの単離と構造決定, 2013 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 27 日, 東京

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://anpc.fs.a.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 健太郎 (TAKADA KENTARO)

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 90455353