

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：24658181
研究課題名(和文)抗腫瘍環状ペプチド didemnin の生合成研究

研究課題名(英文) Biosynthetic investigation of the didemnins

研究代表者

酒井 隆一 (Sakai, Ryuichi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：近年カリブ海産のホヤ *Trididemnum solidum* より見出された抗腫瘍性ペプチド、ジデムニンが世界各地で採集された海洋細菌 *Tistrella mobilis* より相次いで発見された。しかしホヤにおける真の生産者や生合成に関する知見は皆無である。そこで、培養 *T. mobilis* 及びカリブ海産の *T. solidum* について、化学的・生化学的な比較分析を行った。その結果、ホヤと細菌ではジデムニン類の生産パターンが異なり、また、ホヤには共生生物として大量のシアノバクテリアが含まれるが *T. mobilis* は極僅か検出されたのみであったことから、ホヤと細菌での生合成経路は異なっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The antitumor peptide didemnins originally found from the Caribbean tunicate *Trididemnum solidum* were recently identified in the cultured marine bacterium *Tistrella mobilis* collected in various regions in the world. We thus compared the production and genetic profiles between the tunicate and the microbe. We found that the metabolic pattern in the bacteria differed largely from that of the tunicate. Analysis of microbial fauna in the tunicate indicated that a genus of cyanobacteria is a main associate of the tunicate, but *T. mobilis* was found as only a minor microbe that associate with the host.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産科学

キーワード：didemnin *Tistrella mobilis* biosynthesis symbiosis

1. 研究開始当初の背景

近年、海洋生物由来の生理活性物質が医薬品として開発・実用化される例が相次ぎ、海洋天然物の本格的な医療への応用が現実のものとなっている。カリブ海産の群体ボヤ *Trididemnum solidum*、抗腫瘍環状デブシペプチド didemnin 類を含むが、その一つである didemnin B は海洋生物由来の抗腫瘍物質として初めてヒトでの臨床試験が行われた海洋天然物として知られる。さらに最近その誘導體である aplidin (dehydrodidemnin B) は臨床試験で有効性が認められており、現在開発が進められている。このような生理活性物質を効率よく産生することができれば海洋天然物の応用研究が加速すると期待される。

我々は 2011 年に千葉県館山湾の海砂から単離された α -proteobacteria の *Tistrella mobilis* が didemnin B を生産することが見出された報告¹に着目し、細菌及びボヤにおけるジデムニン類の生合成研究を行う本研究計画を策定し、研究費の申請を行った。しかし、研究開始直前の 2012 年に紅海株 *T. mobilis* (K 株) の全ゲノム配列および didemnin B 生合成遺伝子が中国/米国の共同研究グループにより発表され、NRPS や PKS が組み合わさった 10 のクラスター (Did A ~ J) によって構成されることが報告された。²その後、伊豆諸島産の海綿、そしてインド洋で採集された *T. mobilis* が didemnin B を産生しているという報告 (私信及び学会発表) が相次いだ。しかし、ボヤにおけるジデムニンの生合成に関する報告は皆無でそれが *T. mobilis* によるものなのか、他の共生微生物もしくはボヤ自身によるものか等の疑問は未解決であった。

参考文献

1. Tsukimoto, M. *et al.* Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B. *J Nat Prod* **2011**, *74*, 2329-31.

2. Xu, Y. *et al.* Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 8625-32.

2. 研究の目的

この背景を受け、本研究では特に海産ボヤ *Trididemnum solidum* において didemnin 類を産生している真の生産者と生合成機構について、海洋細菌の生合成情報と比較しながら解明することを目的とした。

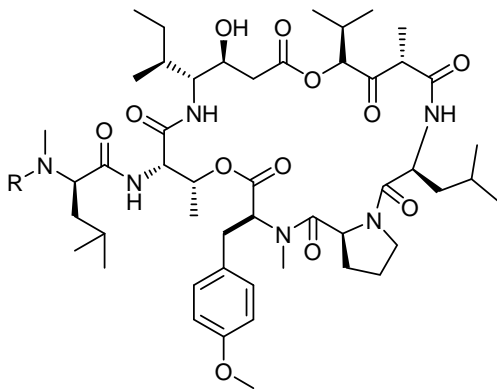
3. 研究の方法

千葉県沿岸およびタイの排水 (理研より分譲) で採集した海洋細菌 *T. mobilis* (それぞれ T 株、R 株とする) の培養を行い、ジデムニン類の産生を確認した。次に両者のジデムニン生合成遺伝子を、報告されている紅海株の生合成遺伝子の情報を基に PCR 法を用いて探索した。

カリブ海で採集した *T. solidum* について、遺伝子の抽出およびジデムニン類の分離・分析を行った。Didemnin 類のおおよその含量は MALDI-TOF-MS のピークを比較することで推定した。*T. solidum* の微生物叢解析を行うために 16srDNA を増幅し、DNA シーケンサを用いて網羅的な解析を行った。また、ボヤの組織内に観察される微生物を分離し、その成分を調べた。

4. 研究成果

T. mobilis T 株, R 株 それぞれの培養液抽出物 (IT3-7-1, IT3-7-2), および菌体抽出物 (IT3-7-3, IT3-7-4) について didemnin 含量の比較を行った結果、T 株 R 株共培養液抽出物には didemnin B, nordidemnin B が、菌体抽出物には didemnin B, X, Y, nordidemnin B が含まれていた (図 1)。



didemnin A: R = H
 didemnin B: R = Lac-Pro-
 aplidin: R = Pyruv-Pro-
 didemnin X: R = 3-hydroxydecanoyl-(Gln)₃-lac-Pro-

図 1 . Didemnin 類の構造

報告例では培養液抽出物に didemnin X, Y が含まれているとされていたが、今回それらは培養液抽出物ではなく菌体に含まれていた(図 2)。Didemnin 類はポリケチド合成酵素 (PKS) と非リボゾーマルペプチド合成酵素 (NRPS) により産生されているので次に、それらのジェネラルプライマーを作成し、遺伝子の増幅を試みたが特定の遺伝子の増幅は見られなかった。

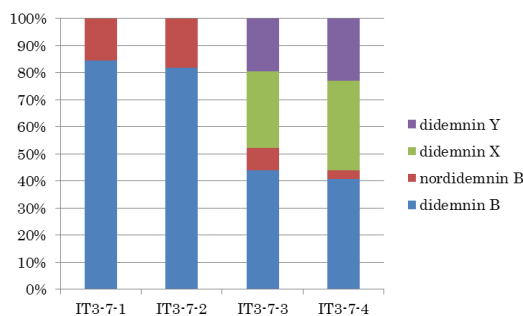


図 2 . *T. mobilis* の菌体及び培養液における didemnin 類の組成

そこで公表された Didemnin 生合成遺伝子の保存性の高いことで知られるアデニルドメインの配列を基に作成したプライマーで生合成遺伝子クラスターの増幅を試みたところ(図 3)、生合成遺伝子クラスターの一部である did A~didE ドメインのクローンがそれぞれの株で得られた。

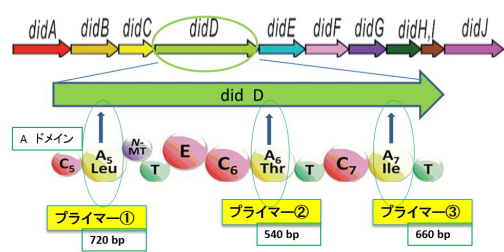


図 3 . *T. mobilis* (K 株) より見出された didemnin の生合成遺伝子クラスター

この部分は株間で 93~96%の配列相同性を持っていた。これらの結果から細菌の didemnin 生合成遺伝子の配列は採集地が大きく異なるものの保存されていることが示唆された。

次に、ホヤ *T. solidum* の試料を用いて didemnin 類の組成分析を行った(図 4)。その結果、ホヤにおける didemnin の組成はバクテリアのそれと大きく異なり didemnin A を主成分としていることが分かった。また、未同定ではあるが、didemnin D, E, G に相当する分子イオンも質量分析で観察された。Didemnin X の存在が確認された個体もあったがその量は僅かであった。個体間の差は見られたものの顕著ではなかった。

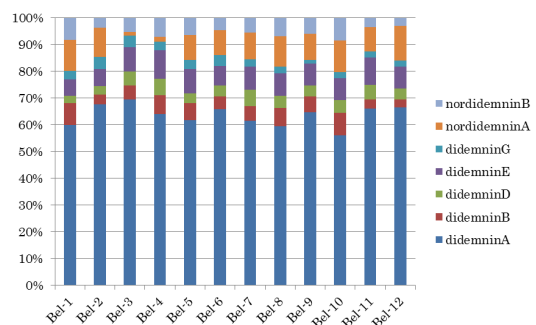


図 4 . *T. solidum* の抽出物における didemnin 類の組成

この結果は、細菌とホヤにおける didemnin 類の生合成経路が大きく異なることを示唆している。しかしこれまでの背景から didemnin 産性能を持つ *T. mobilis* は世界

各地広く分布していることから、ホヤにも *T. mobilis* が含まれており、didemnin の生合成に参与している可能性も否定できない。そこで、ホヤの微生物叢の解析を行いこの点を解明することとした。

まず、ホヤの遺伝子を抽出し、16SrDNA 増幅用プライマーを用いて増幅・クローニングを行い、得られた 32 クローンの遺伝子配列を Blast により検索したところ、Didemnidie 科のホヤに共生することが知られているシアノバクテリアと相溶性の高い配列を持つ 5 クローンに加え、*Clostridium*, *Achromobater* 等の細菌と相溶性の高いクローンが多数得られた。そこで、さらに精密かつ網羅的な解析を行うため次世代シーケンサを用いて PCR 産物の解析を行った。その結果、9900 個の遺伝子より約 83 種の微生物の遺伝子が同定された。(図 5)

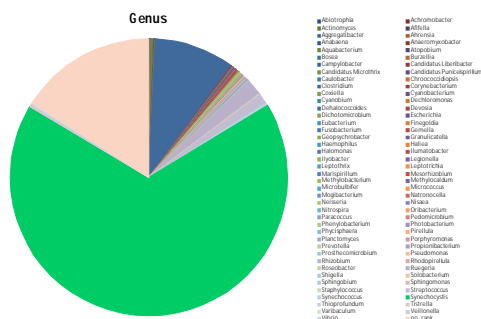


図 5 次世代シーケンサにより解析された *T. solidum* の微生物叢。緑 *Synechosystis* ; 青 *Clostridium* ; ピンク未同定。

その結果、微生物叢のほとんど (68%) は *Synechosystis* 属のシアノバクテリアであり、それに続き *Clostridium* (14%) が観察された。一方 *Tistrella* と相溶性を持つクローンは 3 個 (0.03%) であった。これらの結果から、*T. solidum* に含まれる微生物は主にホヤに共生することで知られている *Synechosystis* および偏性嫌気性グラ

ム陽性菌の *Clostridium* からなることが分かった。*Clostridium* 属の細菌には窒素固定能を持つものもあるので、そのホヤにおける役割は興味深い。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 隆一 (Sakai Ryuichi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721

(2) 研究分担者

今田 千秋 (Imada Chiaki)
東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科 海洋生命科学専攻・教授

研究者番号：90183011