

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560399

研究課題名(和文) 海綿二次代謝産物生産を担う共生微生物の同定とゲノム解析

研究課題名(英文) Identification and genome analysis of bacterial symbiont producing sponge-derived secondary metabolites

研究代表者

脇本 敏幸 (Wakimoto, Toshiyuki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70363900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では伊豆半島、伊豆諸島沿岸に生息するTheonellidae科の海綿類、特にDiscodermia属およびTheonella属について二次代謝産物の生産を担う共生微生物を特定し、そのゲノム解析を試みた。Theonellidae科の仲間には多様な生物活性物質が含まれており、それらの生産菌を明らかにすることは未利用医薬品資源の供給方法の確立にも繋がる。今回Theonellidae科の3種の海綿動物を対象として解析を進めた結果、すべてにおいて、Entotheonella属の共生微生物が物質生産を担っていることが明らかとなり、多様な海綿由来生物活性物質の生産機構の解析へ向け、重要な糸口を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify the bacterial symbiont producing sponge-derived secondary metabolites. Theonellidae family sponges are well known to contain diverse secondary metabolites. However, the real producer of them had been unknown, though it had been supposed to be symbiont bacteria. The identification of such bacteria could be a key issue to pave the way for the supply limitation of medicinally important sponge-derived compounds. Three Theonellidae sponge species were therefore subjected to genetic evaluation, cell separation and single cell analysis. As a result, the Entotheonella was identified to be the real producer of almost all secondary metabolites of three sponge species. Our findings provide not only the proof of a sponge-specific molecule synthesized by the unique and uncultured bacterium rather than sponge itself, but also useful insights into the supply of sponge-derived medicinally important compounds.

研究分野：天然物化学

キーワード：海綿共生微生物 生物活性物質 Discodermia Theonella 生合成

1. 研究開始当初の背景

海綿動物からはハリコンドリル B をはじめとする医薬品リード化合物等、様々な生物活性物質が見出されており、天然医薬品資源として貴重な生物である。一方で、海綿由来生物活性物質には微生物由来の二次代謝産物に類似する構造を有する化合物が複数見出されてきたことから、その真の生産者は海綿に共生する微生物であることが長年疑われてきた。1990年代後半になり、カリフォルニア大学サンディエゴ校の D. J. Faulkner らは、海綿動物の中でも最も多様な二次代謝産物を含む仲間である *Theonella* 属、*Discodermia* 属を含むイシカイメン目 (Lithistida) の仲間に着目し、その生産者の解析を試みた。彼らは密度勾配遠心法を駆使してパラオ産海綿 *Theonella swinhoei* の細胞分画を行い、海綿細胞、フィラメント状細菌、単一細胞細菌、シアノ細菌画分に分け、それぞれの画分に含まれる化合物を分析した。その結果、環状ペプチドの *theopalauamide* をフィラメント状細菌画分に、ポリケタイド *swinholid A* を単一細胞細菌画分に検出した。本研究では化合物の局在をもとに、海綿以外の生産者の存在を明示するとともに、見出されたフィラメント状細菌は、光合成に必要なチラコイドが含まないため、シアノ細菌ではないことが示された。したがって、イシカイメン目海綿類の多様な二次代謝産物の生産者はシアノ細菌以外の共生細菌である可能性が高くなった。その後、2000年になり、同グループが、この新規細菌の 16S rRNA 解析を行い、“*Candidatus Entotheonella palauensis*”と命名した。この際、彼らはこの細菌の培養を試みているが、倍加時間が極端に遅いため、培養による物質生産の確認には至らなかった。

そのため、培養方法に頼らず、真の生産者であることを明らかにするには、生合成遺伝子に基づく解析が求められた。2000年以降、遺伝子配列解析技術の革新にとともに、海綿由来二次代謝産物の生合成遺伝子の取得も実現の可能性を帯びてきた。そこで J. Piel (現在、ETH) は昆虫と海綿動物に共通に見出される骨格を有する *pederin* および *onnamide* に着目した。まずハネカクシの仲間である *Paederus fuscipes* の毒、*pederin* の生合成遺伝子を取得し、イントロンを含まない原核生物由来の遺伝子であることを明らかにした。同様に八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* より *onnamide* 生合成遺伝子クラスターの取得に成功し、やはり原核生物由来の遺伝子であることを明らかにした。この研究は海綿由来二次代謝産物の生合成遺伝子の取得に成功した初めての報告例である。しかし、遺伝子レベルでの生産菌の解析は本研究課題を開始するまで報告例がなかった。

2. 研究の目的

放線菌やカビなどの微生物が産生する二次代謝産物からは、数多くの医薬品や医薬品リード化合物が見出されているため、重要な生物資源として位置づけられる。一方で、そのような培養可能な微生物群は地球上の微生物の中のごくわずかであり、99%以上は従来の培養方法によっては培養できない難培養微生物であることが明らかになってきた。このことは物質生産に秀でた未知難培養微生物群がまだまだ存在する可能性を示唆している。実際に、難培養微生物による物質生産が顕在化している事例として、海綿動物の事例が挙げられる。およそ一万種が現存するといわれる海綿動物から、すでに多様な生理活性物質が発見されており、高等植物や土壌微生物とともに重要な天然有機化合物資源として注目されている。中でもイシカイメン目の海綿動物にはポリケタイドやペプチドなどの複雑な構造を有する二次代謝産物が数多く見出されており、その種類は数百種を超える。さらにそれらのほとんどは高等植物や土壌微生物には見られない、海綿動物特有の化合物である。

海綿動物はなぜ多様な生物活性物質を生産するのか？本研究ではこの問いの答えを探る。これら海綿二次代謝産物の実際の生産者は海綿に共生する難培養微生物であることが長年疑われてきている。しかし、明確なデータによって示された報告はほとんどない。そこで本研究ではホスト (海綿動物) と共生者 (微生物) との関連を二次代謝産物を鍵として紐解くことを目的とした。海綿由来生物活性物質の生合成遺伝子を取得し、その遺伝子を含有する共生微生物を同定することによって、生産菌を特定するとともに、ゲノム解析を試みる。

3. 研究の方法

本研究では以下の海綿動物を研究対象として選んだ。伊豆半島産チョコガタイシカイメン、*Discodermia calyx* および *Discodermia kiiensis*。八丈島産 *Theonella swinhoei*。いずれも *Theonellidae* 科に属する。

(1) PKS-NRPS ハイブリッド生合成遺伝子クラスターの探索

採集した海綿動物よりフェノール/クロロホルム抽出によってメタゲノム DNA を抽出した。抽出したメタゲノム DNA を鋳型として I 型 PKS の KS domain に対する縮重プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物の配列解析から、*trans*-AT PKS および *cis*-AT PKS の KS amplicon に分類し、それぞれに特異的なプライマーを設計した。一方で、抽出したメタゲノム DNA より、さらに約 35 kb の DNA 断片を精製後、市販の Fosmidベクター (pCC1FOS、Epicentre) に組み込み、大腸菌を宿主とするメタゲノムライブラリーを作製した。メタゲノムライブラリーより、上述の特異的プライマーを用いて

スクリーニングを行った。得られたポジティブクローンの末端配列をもとに、さらにスクリーニングを繰り返し、PKS-NRPS ハイブリッドな遺伝子クラスターのクローニングを行った。得られたクローンの挿入配列を次世代シーケンサー (Illumina Analyzer II および Ion PGM) によって解析し、約 150 kb、40 kb と 24 kb、合計 3 つの PKS-NRPS ハイブリッド生合成遺伝子クラスターを取得した。

(2) CARD-FISH 法

海綿を calcium/magnesium-free の人工海水中で破砕し、4% パラホルムアルデヒドによって固定した。得られた細胞固定液をスライドガラスへ塗布し、50%、70%、および 96% エタノールに順次浸漬し、脱水、風乾させた後に、proteinase K によって処理した。生合成遺伝子クラスターの配列に特異的な Biotin ラベル化 DNA プローブを BioNick Labeling System (Invitrogen) によって調製した。バクテリア細胞を固定化したスライドガラスと調製したプローブ (2 ng/μL) をハイブリダイゼーション緩衝液中 (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.01% SDS, 30% ホルムアルデヒド) で 46 °C、4 時間インキュベートした。その後、洗浄バッファー (0.7 M NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7.4, 50 mM EDTA, 0.01% SDS) によって 3 回洗浄した。Tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法による検出は、TSA Plus Fluorescein Kit (PerkinElmer) を用いて行った。

(3) Laser microdissection によるシングルセル解析

CARD-FISH 法の際に調製した細胞懸濁液を membrane slide (PEN-Membrane 2.0 μm, Leica) に塗布し、50%、70%、および 96% エタノールに順次浸漬し、脱水、風乾させた。Laser microdissection (Leica LMD7000) を用いてバクテリア細胞を PCR tube に回収した。さらに Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1% Tween 20) を加えた後に、凍結融解によって溶菌し、生合成遺伝子クラスターに特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

4. 研究成果

(1) *Discodermia calyx* について

まず伊豆半島、伊豆諸島に生息するチョコガタイシカイメン (*Discodermia calyx*) に含まれる主要な細胞毒性物質 calyculin A の生合成研究に着手した。calyculin A は分子量 1008、tetraene、5,6-spiroketal、phosphate、oxazole 等を含み、その構造的特徴から PKS と NRPS のハイブリッド経路によって生合成されることが予想できる。しかし、単純な I 型 PKS の生合成機構では説明できない部分構造がいくつか認められる。その一つに tetraene 部分に 2ヶ所存在する β-branch 構造が挙げられる。これまで β-branch 構造を

有する多くの I 型 PKS 産物が trans-AT タイプの PKS によって生産されることが知られていることから、我々は trans-AT PKS の KS ドメインの配列を足掛かりに海綿メタゲノムより PKS-NRPS hybrid 遺伝子クラスターの探索を進めた。その結果、全長 150 kbp に及ぶ PKS-NRPS hybrid 生合成遺伝子クラスターを取得することに成功した。その module の並びより推定される生合成産物の構造は calyculin A の構造と良い一致を示した。また cis-AT PKS に配列相同性を示した KS amplicon をもとに screening を行ったところ、2 つの NRPS-PKS ハイブリッド遺伝子クラスターを取得した。それぞれの大きさは約 40 kbp と約 24 kbp であった。40 kbp の遺伝子クラスターは 8 つの NRPS module と 2 つの PKS module からなり、遺伝子配列の詳細な解析から calyxamide の生合成遺伝子クラスターである可能性が示唆された。また、もう一方の 24 kbp の生合成遺伝子クラスターの産物は未知であったが、遺伝子配列の解析から、その生合成産物は淡水性の藍藻 *Microcystis aeruginosa* より単離報告例のある kasumigamide に類似する化合物であることが示唆された。しかしながら、海綿からの kasumigamide の単離例はこれまで皆無であることから、海綿 *D. calyx* より探索を進めた。その結果、実際に海綿より kasumigamide を単離、構造確認するに至った。

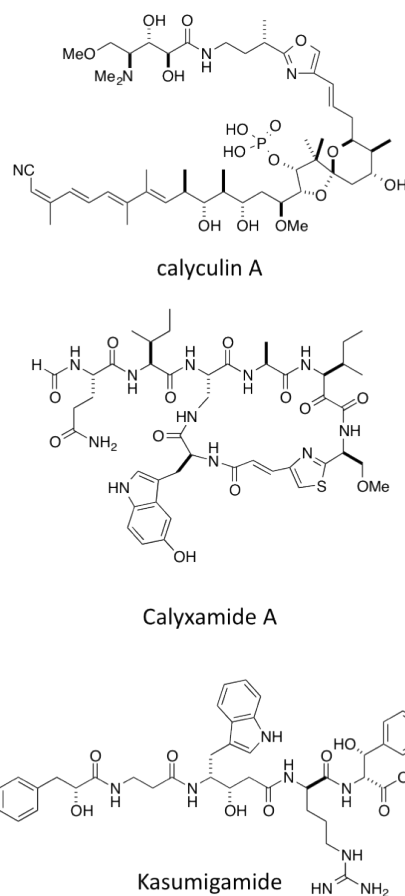


図 1 *D. calyx* 由来二次代謝産物の構造

次に生産菌の特定を目指した。海綿共生菌のほとんどは難培養性であることが予想されたことから、その解析手法は培養に依存しないシングルセル解析法が必要になる。そこでまず、海綿由来の細胞画分に対し、生合成遺伝子クラスター特異的なプローブを用いた CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization) 解析を行った。その結果、顕微鏡下、特徴的な形態を有するフィラメント状細菌を特異的に蛍光検出した。さらに確証を得るために、レーザーマイクロダイセクションを用いてシングルフィラメントを取得し、特異的プライマーを用いた PCR 検出を試みたところ、やはり単菌したフィラメント状細菌のみが陽性を示した。16S rRNA 解析の結果、このフィラメント状細菌は *T. swinhoei* において見出された新規細菌と同様に “Candidatus Entotheonella” sp. であることが判明した。

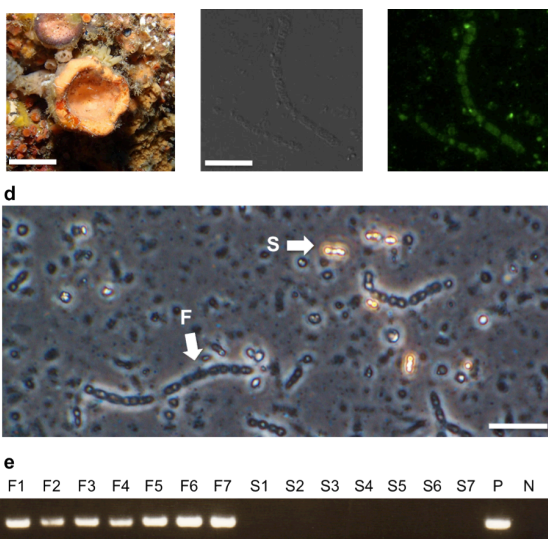


図2 Calyculin 生産菌の特定

a; *Discodermia calyx* (Scale bar, 5 cm) **b;** Filamentous bacteria (微分干渉, Scale bar, 10 mm) **c;** Filamentous bacteria (CARD-FISH) **d;** 海綿懸濁液 (位相差, Scale bar, 20 mm) **e;** Calyculin A 生産菌の特定, 鋳型 DNA (F1-4; F x 1, F5-7; F x 4, S1-4; S x 4, S5-7; S x 8, P; *D. calyx* metagenomic DNA, N; Negative control)

(2) *Discodermia kiiensis* について

伊豆半島に生息する *Discodermia kiiensis* においても海綿懸濁液中にフィラメント状細菌の存在を確認した。そこで Percoll を用いた密度勾配遠心法によって、フィラメント状細菌細胞を分画、濃縮した。得られた画分よりゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによるゲノム解析を試みた。その結果、PKS および NRPS をコードする複数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを見出した。それらのいくつかは推定生合成産物が既知二次代謝産物と一致する一方で、未知の生合成遺伝子も複数見出された。そこで、

新規生合成遺伝子に基づく推定産物の構造から、*D. kiiensis* 抽出物より候補化合物の探索を行った。その結果、新規化合物 lipodiscamide を単離構造決定した。現在、詳細な生合成経路の検討を行っている。また、これら生合成遺伝子をコードする *D. kiiensis* 由来フィラメント状細菌を 16S rRNA 解析に供した結果、やはり *Entotheonella* 属の細菌であることが明らかになった。

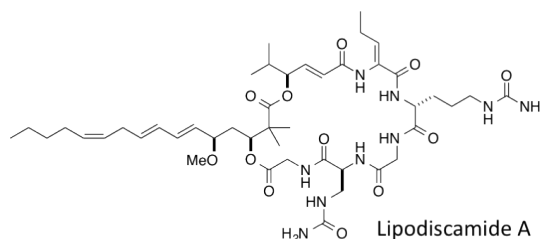


図3 *D. kiiensis* 由来二次代謝産物の構造

(3) *Theonella swinhoei* について

八丈島産 *Theonella swinhoei* についてはスイス ETH の Piel らを中心とした国際共同研究によって遂行した。*Discodermia* 属と同様に膨大なフィラメント状細菌が存在しており、それらを密度勾配遠心法によって分画し、ドラフトゲノム解析に供した。その結果、本海綿より報告されている二次代謝産物のほとんどの生合成遺伝子クラスターが “Candidatus Entotheonella factor” にコードされていることを明らかにした。本細菌の系統学的な位置づけとして candidate phylum “Tectomicrobia” を提唱している。*Discodermia* 属と *Theonella* 属はともに Theonellidae 科に属する。これらの研究成果は、少なくとも Theonellidae 科の海綿動物においては *Entotheonella* 属の海綿共生細菌が二次代謝産物の生産者である可能性を示唆している。この細菌は未だ難培養性であるが、可培養性あるいは適切な異種発現系の開拓によって、稀少生物資源である海綿由来の有用天然物の供給法の確立が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- (1) [T. Wakimoto](#), Y. Egami, Y. Nakashima, Y. Wakimoto, T. Mori, T. Awakawa, T. Ito, H. Kenmoku, Y. Asakawa, J. Piel, I. Abe, Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nat. Chem. Biol.* 10, 648-655 (2014) 査読有 DOI: 10.1038/nchembio.1573
- (2) M. C. Wilson, T. Mori, C. Rückert, A. R. Uria, M. J. Helf, K. Takada, C. Gernert, U. Steffens, N. Heycke, S. Schmitt, C. Rinke, E. J. N. Helfrich,

- A. O. Brachmann, C. Gurgui, T. Wakimoto, M. Kracht, M. Crüsemann, U. Hentschel, I. Abe, S. Matsunaga, J. Kalinowski, H. Takeyama, J. Piel, An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 506, 58-62 (2014) 査読有 DOI: 10.1038/nature12959
- (3) Y. Matsuda, T. Wakimoto, T. Mori, T. Awakawa, I. Abe, Complete biosynthetic pathway of anditomin: nature's sophisticated synthetic route to a complex fungal meroterpenoid. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 15326-15336 (2014) 査読有 DOI: 10.1021/ja508127q
- (4) T. Awakawa, L. Zhang, T. Wakimoto, S. Hoshino, T. Mori, T. Ito, J. Ishikawa, M. E. Tanner, I. Abe, A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 9910-9913 (2014) 査読有 DOI: 10.1021/ja505224r
- (5) Y. Egami, T. Wakimoto, I. Abe, Phosphocalyculin C as a pyrophosphate protoxin of calyculin C in the marine sponge *Discodermia calyx*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5150-5153 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.10.002
- (6) S. Hoshino, L. Zhang, T. Awakawa, T. Wakimoto, H. Onaka, I. Abe, Arcyriaflavin E, a new cytotoxic indolocarbazole alkaloid isolated by combined-culture of mycolic acid-containing bacteria and *Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823. *J. Antibiot.*, 67, 1-3 (2014) 査読有 DOI: 10.1038/ja.2014.147
- (7) X.-L. Yang, T. Awakawa, T. Wakimoto, I. Abe, Three acyltetronic acid derivatives: noncanonical cryptic polyketides from *Aspergillus niger* identified by genome mining. *ChemBioChem*, 15, 1578-1583 (2014) 査読有 DOI: 10.1002/cbic.201402172
- (8) K. C. Tan, T. Wakimoto, I. Abe, Lipodiscamides A-C, new cytotoxic lipopeptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. *Org. Lett.* 16, 3256-3259 (2014) 査読有 DOI: 10.1021/ol501271v
- (9) H. Tajima, T. Wakimoto, K. Takada, Y. Ise, I. Abe, Revised structure of cyclolithistide A, a cyclic depsipeptide from the marine sponge *Discodermia japonica*. *J. Nat. Prod.* 77, 154-158 (2014) 査読有 DOI: 10.1021/np400668k
- (10) Y. Matsuda, T. Awakawa, T. Wakimoto, I. Abe, Spiro-ring formation is catalyzed by a multifunctional dioxygenase in austinol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10962-10965 (2013) 査読有 DOI: 10.1021/ja405518u
- (11) T. Awakawa, X.-Y. Yang, T. Wakimoto, I. Abe, Pyranonigrin E: A PKS-NRPS hybrid metabolite from *Aspergillus niger* identified by genome mining. *ChemBioChem*, 14, 2095-2099 (2013) 査読有 DOI: 10.1002/cbic.201300430
- (12) K. C. Tan, T. Wakimoto, K. Takada, T. Ohtsuki, N. Uchiyama, Y. Goda, I. Abe, Cycloforskamide, a cytotoxic macrocyclic peptide from the sea slug *Pleurobranchus forskalii*. *J. Nat. Prod.* 76, 1388-1391 (2013) 査読有 DOI: 10.1021/ol5002973
- (13) T. Wakimoto, K. C. Tan, I. Abe, Ergot alkaloid from the sea slug *Pleurobranchus forskalii*. *Toxicon*, 72, 1-4 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.05.021
- (14) X.-Y. Yang, T. Wakimoto, Y. Takeshige, R. He, Y. Egami, T. Awakawa, I. Abe, Indole-porphyrin hybrids produced by metagenomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 3810-3813 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.076
- (15) X.-L. Yang, T. Awakawa, T. Wakimoto, I. Abe, Induced production of novel prenyldepside and coumarins in endophytic fungi *Pestalotiopsis acaciae*. *Tetrahedron Lett.* 54, 5814-5817 (2013) 査読有 DOI:10.1016/j.tetlet.2013.08.054
- (16) X.-L. Yang, T. Awakawa, T. Wakimoto, I. Abe, Induced production of the novel glycolipid ustilagic acid C in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Tetrahedron Lett.* 54, 3655-3657 (2013) 査読有 DOI:10.1016/j.tetlet.2013.04.131
- (17) M. Kimura, T. Wakimoto, I. Abe, Allos-hemicalyculin A, a photochemically converted calyculin from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron Lett.* 54, 114-116 (2013) 査読有 DOI:10.1016/j.tetlet.2012.10.130

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 脇本敏幸: "The significance of unstable marine natural products" Flinders University Marine Biotechnology Seminar (Adelaide, Australia)、2015年2月9日

- (2) 脇本敏幸：「多様な天然物を生産する海綿共生バクテリア」 静岡大学農学部公開講演会（静岡）2014年7月14日
- (3) 脇本敏幸：「海綿由来生物活性物質の合成に関する研究」日本生薬学会第61年会（福岡）学術貢献賞受賞講演、2014年9月14日
- (4) T. Wakimoto: “A bacterial symbiont of Japanese marine sponge Discodermia calyx, produces biologically active metabolites” The 14th International Symposium of Marine Natural Products (La Toja, Spain) Sep. 17, 2013
- (5) 脇本敏幸：「海洋生物に由来する医薬品資源の開拓と利用を目指して」福井県立大学 生物資源学特別セミナー（福井）、2013年8月23日
- (6) 脇本敏幸：「海綿共生微生物を起源とする生理活性物質の生産機構解析」第1回薬学の有機化学を考える in 北海道（札幌）、2013年7月20日

〔図書〕（計 1 件）

- (1) T. Wakimoto, K. C. Tan, H. Tajima, I. Abe, Cytotoxic cyclic peptides from the marine sponges. Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin, Springer, Chapter 6, pp. 113-144 (2015)

〔新聞報道〕

- (1) 日本経済新聞 2014年7月1日（朝刊）
「海綿の有用物質 細菌の関与発見」
- (2) 日経産業新聞 2014年7月1日「抗がん剤量産へ 海綿動物が一役」

〔その他〕

- (1) 脇本敏幸、阿部郁朗、海綿動物の化学防御を担う共生細菌、ライフサイエンス新着論文レビューFIRST AUTHOR'S, 2014年8月11日, <http://first.lifesciencedb.jp/archives/910>
- (2) 脇本敏幸、阿部郁朗、カイメン共生バクテリア系の化学防御機構、バイオサイエンスとインダストリー, 73, 49-51 (2015)
- (3) 江上蓉子, 脇本敏幸, 阿部郁朗、海綿動物の化学防御を担う共生細菌、細胞工学, 34, 412-416 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇本 敏幸 (Toshiyuki Wakimoto)
東京大学大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：70363900