

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712024

研究課題名(和文)非培養での海洋性共生微生物の生物資源化と有効利用

研究課題名(英文)Development of symbiotic bacteria producing sponge-derived natural products.

研究代表者

高田 健太郎(Takada, Kentaro)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90455353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：海洋生物、特に海綿動物には多数の共生微生物が存在していることが知られ、二次代謝産物のほとんどは共生微生物によって生産されていると考えられている。しかしながら、多くの共生微生物は培養が困難とされており、どの微生物が有用な天然化合物を生産するのかという情報は得られていなかった。本研究では、従来の培養に依存しない手法で海綿の微生物叢から特定の微生物を分離し、化合物情報および遺伝情報を用いて生産者の同定に成功することで、難培養微生物を新たな生物資源として利用する手段を確立した。

研究成果の概要(英文)：A lot of secondary metabolites with diagnostic structural features and biological activity have been isolated from marine sponges. These metabolites are expected to be produced by symbiotic bacteria in the sponges, however there is few study to identify the bacteria producing sponge-derived natural products. This study demonstrated the identification of the producer of several marine natural products under cultivation-free methods.

研究分野：天然物化学

キーワード：海洋天然物 海綿動物 共生微生物

1. 研究開始当初の背景

海洋天然物が盛んに研究されるようになってから約40年が経ち、海洋天然物が医薬品の候補として徐々に臨床開発されるようになってきている。現在、海洋生物由来の7つの化合物が薬剤として上市され、13が臨床試験中である。しかしながら、土壌由来の微生物から開発された医薬品を考慮すると、海洋天然物は未だ成功例が少ない。一つの理由に、海洋天然物の化学構造が複雑で臨床開発に必要な試料を十分供給できないことにある。例えば、クロイソカイメンより単離されたハリコンドリニンBは、その誘導体(エリプリン)が抗転移性乳がん薬として認可された海洋天然物の成功例であるが、その開発過程では、化学合成を駆使した多大な努力によりサンプル供給が実現したという経緯がある。この事例のように、サンプルを十分に供給できれば、海洋生物から発見された3万以上の化合物、もしくは未報告の膨大な数のケミカルライブラリーの中に、医薬資源として有効利用できる化合物が存在する可能性は高い。

海洋生物、特に海綿動物には多数の共生微生物が存在していることが知られ、二次代謝産物のほとんどは共生微生物によって生産されていると考えられている。しかしながら、多くの共生微生物は培養が困難とされており、現在でも、どの微生物が有用な天然化合物を生産するのかという情報はほとんど得られてない。同じ理由により、海洋天然物の生合成研究はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、海綿動物に共生する微生物が、難培養性であるという点を考慮し、寒天培地や液体培地を用いた従来の培養に依存しない手法で微生物叢から微生物を分離し、化合物情報および遺伝情報を取得することで、新たな生物資源として利用することを目的とした。難培養性微生物を培養することなく生物資源化できるようになれば、海洋天然物の利用の幅が大きく広がることが期待できる。

3. 研究の方法

海綿動物のライブラリーの中から注目する生物活性物質を含む試料を選別し、微生物叢を、大きさ、内部構造、および、自家蛍光を指標としてフローサイトメトリーにて微生物

物を分離した。分離した微生物は有機溶媒にて抽出し、その化合物プロファイルをLC-MSにて分析した。また、一部の微生物はゲノムを抽出し、ゲノム解析をおこなった。

生産者の種の同定は16S rRNAを用い、blastによって近縁種を検索した。また、日本近海で採集されたカイメンにおける *Entotheonella* の分布を調べるため、*Entotheonella* を特異的に検出できるプライマーを用いて16S rRNAを増幅し、TAクローニングによってサブクローニングし、塩基配列解析をおこなった。

4. 研究成果

研究代表者を含み、スイス工科大学のPiel教授を中心とした研究グループは、八丈島沿岸に生息するカイメン *Theonella swinhoei* (図1)に含まれる海洋天然物の生合成研究、および生産者に関する研究をおこなった。その結果、2-3 μmの細胞が数珠状に並び、蛍光を発する共生微生物 *Entotheonella* (図1)のゲノム中に31化合物の生合成遺伝子クラスター有しており、過去に単離されたペプチドおよびポリケチド化合物のうち、1種の化合物を除く全てが *Entotheonella* によって生産されていることを明らかにした。さらには未だに発見されていないペプチドの生合成遺伝子が数多く存在していた。また、この研究でゲノム解読された2種の *Entotheonella* が生産している化合物に重複がないことから、*Entotheonella* が生産する化合物の多様性とその化合物生産能の高さが伺える。



図1 カイメン *Theonella swinhoei* (左) と共生微生物 *Entotheonella* (右)

研究代表者はこの研究の中で、日本近海に生息するカイメンにおける *Entotheonella* の存在分布を調査した。共生微生物である *Entotheonella* はこれまでの研究で、一部の *Theonella* 属カイメンおよび *Discodermia* 属カイメンに共生していることが報告されている。16S rRNA 遺伝子を指標に分布を調べたところ、*Theonella* 属および *Discodermia* 属

のカイメンのみならず、非常に多様なカイメン中に *Entotheonella* が広く存在することを明らかにした(図2)。しかしながら、多くのカイメンでは 16S rRNA 遺伝子の存在は確認されるものの、*Entotheonella* に特徴的な数珠状の微生物の存在は確認できなかった。これは *Entotheonella* 属には多様な形態をもった種が存在することが示唆されているが、未だ明らかになっていない。このように、化合物生産能力の高さから *Entotheonella* は有望な生物資源として、創薬研究などに有効活用できる可能性がある。現在、*Entotheonella* の多様性や化合物生産に関する全容を明らかにする研究を実施している。

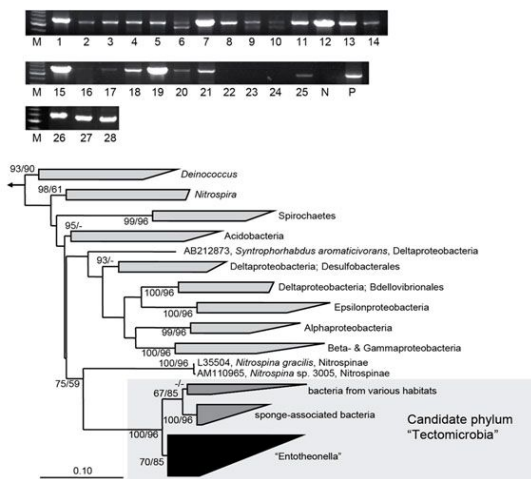


図2 様々なカイメンにおける *Entotheonella* の 16S rRNA 解析(上段)、系統樹における *Entotheonella* (下段)

前述の研究対象である *T.swinhoei* には内部色の異なる種が存在することが知られている。内部色の違いは含有する二次代謝産物が異なることに由来するが、実際に含有化合物のプロファイルは2種の海綿で全く異なる。今回の研究では、さらに白色の *T.swinhoei* に共生する *Entotheonella* をフローサイトメトリーで分離し、含有化合物を LC-MS によって解析した。カイメン粗抽出物中には、環状ペプチド theonellamide F が主要成分として、環状ペプチド配糖体である theonellamide D が微量成分として存在するが、分離した *Entotheonella* では theonellamide D が主成分として存在することが明らかになった。この差異は微生物で生合成された天然物が細胞外に排出される際にプロセッシングを受け、糖が脱離することを示唆している。ゲノム中に

はグリコシダーゼの存在を確認しており、胞体内において重要な機能を果たしている可能性がある。現在、詳細な解析をおこなっている。

上記の他にも、本研究課題では微生物を培養することなく化学情報、および、遺伝情報を得ることにより、複数の海綿動物から海洋天然物の生産者の同定に成功している。難培養性微生物が培養できるようになれば、海洋天然物の利用の幅が大きく広がることが期待できるが、現実的には、海綿動物に共生する膨大な数の共生微生物の中から目的の化合物を生産する微生物を探索することは依然として困難である。一方で、ゲノム情報を利用して目的遺伝子を異種の宿主に導入、発現させる技術が盛んに開発されている現状を考慮すると、まずは天然物の生産者同定と、そのゲノム情報を取得することが効率的な発酵生産への礎になる。本研究では一部の難培養性共生微生物を非培養下での生物資源化を実現したが、本研究課題の成果を活用し、今後も継続的に研究を実施することで、海洋天然物の有効利用に大きく貢献できるものと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. a E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., Piel, J. (2014) An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*. **506**, 58–62 (査読有) DOI: 10.1038/nature12959

Hitora, Y., Takada, K., Matsunaga, S. (2013) On the assignment of the absolute configuration at the isolated methyl branch in miyakosyne A, cytotoxic linear acetylene, from the deep-sea marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron*. **69**, 11070–11073. (査読有) DOI: 10.1016/j.tet.2013.11.013

Takada, K., Ninomiya, A., Naruse, M., Sun, Y., Miyazaki, M., Nogi, Y., Okada, S., Matsunaga, S. (2013) 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.* **78**, 6746–6750. (査読有) DOI: 10.1021/jo400708u

Sun, Y., Takada, K., Nogi, Y., Okada, S., Matsunaga, S. (2014) Lower homologues of ahpatinin, aspartic protease inhibitors, from a marine Streptomyces sp. *J. Nat. Prod.* **77**, 1749–1752. (査読有) DOI: 10.1021/np500337m

Takada, K., Okada, S., Matsunaga, S. (2014) Structural reappraisal of corticatic acids, biologically active linear polyacetylenes, from a marine sponge of the genus Petrosia. *Fish. Sci.* **80**, 1057–1064. (査読有) DOI: 10.1007/s12562-014-0776-0

Peddie, V., *Takada, K., Okuda, S., Ise, Y., Morii, Y., Yamawaki, N., Takatani, T., Arakawa, O., Okada, S., *Matsunaga, S. (2015) Cytotoxic Glycosylated Fatty Acid Amides from a Stelletta sp. Marine Sponge. *J. Nat. Prod.* **78**, 2808–2813. (査読有) DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00795

Pedrazzoli Moran, D. A., *Takada, K., Ise, Y., Bontemps, N., Davis, R. A., Furihata, K., Okada, S., *Matsunaga, S. (2015) Two cell differentiation inducing pyridoacridines from a marine sponge *Biemna* sp. and their chemical conversions. *Tetrahedron.* **71**, 5013–5018. (査読有) DOI: 10.1016/j.tet.2015.05.070

Fukuhara, K., *Takada, K., Okada, S., *Matsunaga, S. (2015) Nazumazoles A-C, cyclic pentapeptides dimerized through a disulfide bond from the marine sponge *theonella swinhoei*. *Org. Lett.* **17**, 2646–2648. (査読有) DOI: 10.1021/acs.orglett.5b01020

Takanashi, E., *Takada, K., Hashimoto, M., Itoh, Y., Ise, Y., Ohtsuka, S., Okada, S., *Matsunaga, S. (2015) Cytotoxic linear acetylenes from a marine sponge *Pleroma* sp. *Tetrahedron.* **71**, 9564–9570. (査読有) DOI: 10.1016/j.tet.2015.10.062

〔学会発表〕(計7件)

高田健太郎，多彩な海洋天然物と共生微生物の関係，天然物化学研究会(招待講演)，2013年10月18日，東京農業大学

高田健太郎，カイメンメタボロミクスから難培養性共生微生物への挑戦，天然物パワーシンポジウム(招待講演)，2014年7月19

日，東京大学

Kentaro Takada, Sponge Metabolomics and Challenges for Identification of the Producer of Marine Natural Products., Korean Society of Pharmacognosy (Invited Speaker), 2014/10/30, Korea

高田健太郎，海綿動物の分類から見る共生微生物および天然物の関係，日本分類学会連合(招待講演)，2015年1月8日，国立科学博物館

Kentaro Takada, Sponge-metabolomics for the discovery of new cytotoxic constituents., Pacificchem (Invited Speaker), 2015/12/18, Hawaii U.S.A.

Kentaro Takada, Yi Sun, Rogie R.Z. Carandang, Yuichi Nogi, Shigeki Matsunaga, Phoslactomycin-type compounds from a marine *Streptomyces* sp. A232., Gordon Conference, 2016/3/10, California U.S.A.

高田健太郎，海洋天然物を生産する共生微生物の探索，新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」地区ミニシンポジウム・京都，2016年2月23日，京都大学

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