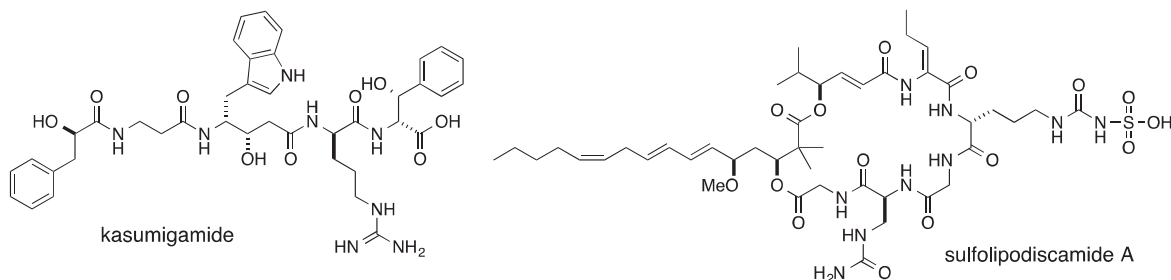


申請代表者	脇本 敏幸	北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室	教授
所外共同研究者	江上 蓉子	北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室	助教
所内共同研究者	森田 洋行	天然物化学分野	教授



■背景・目的

海洋無脊椎動物の中でもとりわけ海綿動物は天然生物活性物質の宝庫として知られている。海綿動物は付着性で大量の海水をろ過することで、有機物を摂取して生きており、この際に一過性に取り込む微生物とともに、多種多様な微生物が共生している。海綿動物が保有する多様な生物活性物質の多くは共生微生物によって生産されており、化学防御物質として機能すると考えられている。それらの中には医薬品のリード化合物として有望視されるものが複数存在する。中でも、ハリコンドリリンBは海綿由来の生物活性物質が抗がん剤開発に成功した例として記憶に新しい。

2000年以降、シークエンス技術の革新的な進歩により、微生物ゲノムの解析が急速に進み、様々な二次代謝産物の生合成遺伝子が明らかになってきた。希少医薬品資源である海綿由来生物活性物質においても、その生合成遺伝子の取得は真の生産者の特定や異種発現系の構築への礎となるため重要な研究課題である。しかし、海綿由来生物活性物質の生合成研究においては、共生微生物叢の複雑さや海綿メタゲノム調製の困難さが障害となってきた。

このような背景のもと、我々は先行研究において、Theonellidae科に属する海綿 *Theonella swinhoei* 及び *Discodermia calyx* の2種において二次代謝産物生合成遺伝子の解析を進め、遺伝子をコードする共生細菌の同定に成功した。同定した生産菌は新門 Tectomicrobia 門に属する *Entotheonella* 属難培養性細菌であり、ポリケタイドからペプチドなど多様かつ複雑な生物活性物質の生産を担う、物質生産に極めて秀でたバクテリアであった。従来、海綿動物からの二次代謝産物生合成遺伝子の取得は非常に困難とされてきたが、我々の研究によって海綿メタゲノムに基づく解析が実現可能であることを示すことができた。ひとたび生合成遺伝子が取得できれば、生産菌の特定のほか、詳細な生合成経路の解析やメタゲノムマイニングによる新規代謝産物の探索にも有用な情報が得られる。特にメタゲノムマイニングにおいては生合成産物が未同定な生合成遺伝子クラスターも同時に得られることが多く、新たな天然物の探索の重要な指標となる。そこで、本研究ではメタゲノムマイニングによって海綿由来二次代謝産物の生合成遺伝子の取得を試みるとともに、遺伝子情報に基づく新たな代謝産物の特定を試みた。

■結果・考察

海綿 *Discodermia calyx* のメタゲノムマイニングによる kasumigamide の単離

我々は伊豆半島産、海綿 *D. calyx* から calyculin 生合成遺伝子クラスターの取得に成功している。その過程で calyculin 生合成遺伝子クラスターとは異なる PKS-NRPS ハイブリッドな全長約 37 kbp の生合成遺伝子を見出した。その生合成産物は不明であったため、主骨格を形成すると予想される PKS-NRPS module の解析に着手した。PKS-NRPS 生合成遺伝子はオペロンとなっており、KasA、KasB、KasC によって構成されていた。KasA は NRPS module であり N 末端側から A ドメイン (KasA-A1)、KR ドメイン (KasA-KR)、PCP ドメインとアノテーションした。A ドメインの基質結合サイトから基質選択性の予測を試みたが、過去に報告されたどの基質結合サイトとも類似性を見出すことはできなかった。KR ドメインは PKS の構成ドメインとして知られているが、NRPS の構成ドメインとしての報告例もある。KasA-KR に着目し BLASTp 検索を試みたところ aeruginosin の生合成遺伝子である AerA の KR ドメイン (AerA-KR) と 41% の相同性を有した。AerA の構成要素は KasA と同様に N 末端側から A ドメイン (AerA-A1)、KR ドメイン (AerA-KR)、PCP ドメインである。AerA では AerA-A1 による phenyl pyruvic acid の認識及び、Aer-KR による phenyl pyruvic acid の α

位のケトンのヒドロキシル基への還元によって、D-phenyl lactic acidの伸長反応を担うことが推測されている。このことから、KasAもAerA同様にD-phenyl lactic acidの伸長反応を行うと予想した。KasBはPKS-NRPSハイブリッドなmoduleであり、その構成要素はN末端側からCドメイン、Aドメイン (KasB-A1)、PCPドメイン、Cドメイン、Aドメイン (KasB-A2)、PCPドメイン、KSドメイン (KasB-KS)、ATドメイン、KRドメイン、ACPドメインであった。KasB-A1のアミノ酸選択性の予測を試みたところ、 β -Alaを認識する既知のAドメイン (TlmIV-M1) の基質結合サイトと完全に一致したことから、KasB-A1は β -Alaを基質として認識すると予想した。KasB-A2に対しても同様の予測を試みたが、KasA-A1同様に過去に報告されたどの基質結合サイトとも類似性を見出すことはできなかった。Module 4のPKSはその構成要素にKSドメイン、KRドメインを有することから β -hydroxyacyl基の伸長に関与していると予想した。KasCはNRPS moduleであり、その構成要素はN末端側からCドメイン、Aドメイン (KasC-A1)、PCPドメイン、Eドメイン (KasC-E1)、Cドメイン、Aドメイン (KasC-A2)、PCPドメイン、Eドメイン (KasC-E2)、Cドメイン (KasC-C3) とアノテーションを行った。KasC-A1の基質結合サイトはL-Argを認識するPvdI-MA2と良い相関を示すことから、KasC-A1はL-Argを認識すると予想した。一方でKasC-A2はL-Pheを認識するAドメインに広く保存されている結合サイトを有していた。また、KasCに含まれる2つのEドメイン (KasC-E1及びKasC-E2) はそれぞれ、L-Arg残基、L-Phe残基の立体反転を行い、D-Arg残基及びD-Pheへの変換を担うと予想した。PKS及びNRPSの生合成遺伝子クラスターでは伸長されたポリケタイド鎖またはポリペプチド鎖と結合したホスホパンテテイン鎖からの切り出しが必要である。この切り出しに関与する酵素は幾つか知られており、代表的なものとしてTEドメイン、reductaseドメイン (Rドメイン)、Cドメインが挙げられる。TEドメインはペプチド鎖をカルボン酸または分子内環化体として、Rドメインはアルデヒド体としてそれぞれ放出することが知られている。Cドメインの機能はペプチドの縮合反応が知られているが、TEドメインと同様な加水分解反応も報告されている。今回見出したPKS-NRPS生合成遺伝子クラスターにはTEドメインを見出すことができなかった。しかしながら、その代わりにKasCのC末端に機能未知のCドメイン (KasC-C3) の存在が明らかになった。したがってKasC-C3がこのPKS-NRPS生合成遺伝子においてTEドメインの代わりとして機能していると推測した。

続いて、PKS-NRPS生合成遺伝子の周辺酵素の機能予測を行った。KasA-Cの上流には β 位のヒドロキシル化酵素CmlAと39%の相同性を示すKasDを見出した。CmlAはクロラムフェニコールの生合成酵素の1つでありホスホパンテテイン鎖に結合したL-*p*-aminophenylalanine (L-PAPA)をL-*p*-aminophenylserine (L-PAPS)に変換する。KasC-MA2の基質はL-PAPAのホモログであるL-Pheと予想した。よって、KasDはL-Phe残基の β -ヒドロキシル化によるL-*threo*-3-phenylserineへの変換を担うと考えた。また、CmlAは結晶構造解析がなされており活性中心が報告されている。この活性中心はKasDでも保存されていた。これにより、CmlAと同様の機構で β -ヒドロキシル化が行われると考察した。KasDによって生じたL-*threo*-3-phenylserineはKasC-ME2によってさらにD-*erythro*-3-phenylserineへ変換されると予想した。以上の機能予測よりこの機能未知のPKS-NRPS生合成遺伝子クラスターによる生合成産物をkasumigamideと予測した。続いて、予想した化合物またはその類似化合物が過去に単離報告されているか否かをSciFinderにより検索した。その結果、淡水性シアノバクテリア*Microcystis aeruginosa* NIES 87から初めて単離報告された抗藻活性を有するkasumigamideが候補に挙がった。Kasumigamideは海綿*D.calyx*より単離報告さ

れた例は無いことから、今回見出した未知のPKS-NRPS生合成遺伝子クラスターの生合成産物を kasumigamide またはその類縁体と予想し、海綿 *D. calyx* から新規化合物の探索を試みた。海綿 *D. calyx* からの kasumigamide 及びその類縁体の探索を行った結果、2 kg の凍結海綿 *D. calyx* から 2.3 mg の kasumigamide を単離した。この結果は、新規 PKS-NRPS 生合成遺伝子クラスター *kasA-K* が kasumigamide の生産に関与することを強く示唆するものであった。

海綿 *Discodermia kiiensis* のメタゲノムマイニングによる sulfolipodiscamide 類の単離

伊豆半島や紀伊半島に生息する *Discodermia kiiensis* には環状デブシペプチドである discodermin 類が主要な二次代謝産物として含まれていることが知られている。また、よりマイナーな成分として紀伊半島産 *D. kiiensis* より discokiolide 類が報告されている。我々は2014年に伊豆半島産 *D. kiiensis* より新規リポペプチド lipodiscamide 類を単離、構造決定した。環状構造内に2つのエステル結合を有し、シトルリン、ウレイドアラニン、デヒドロノルバリンなどの異常アミノ酸を含む特異な環状デブシペプチドであった。

日本産 *D. kiiensis* からは上記3つの特異な環状デブシペプチドが見出されている。しかし、それらの生合成遺伝子や生産菌の報告例はこれまで皆無であった。そこで、これら代謝産物の生合成遺伝子を取得し、その生産を担う共生微生物の同定を試みた。*D. kiiensis* の組織を人工海水に懸濁し、光学顕微鏡によって観察した結果、フィラメント状の特徴的な形態を有するバクテリア細胞が多数認められた。この形態は海綿共生細菌 *Entotheonella* 属の特徴でもあることから、それらを密度勾配遠心法によって分画し、エンリッチした画分からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによって解析した。その結果、discodermin 及び lipodiscamide の生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。Discodermin に関してはNRPSのA domainの基質特異性を検討した結果、構成アミノ酸と良い一致を示した。Lipodiscamide に関してはクラスター内に予想外の硫酸基転移酵素がコードされていたため、硫酸化 lipodiscamide の存在が示唆された。そこで実際に海綿抽出液中の探索を行った。硫酸化体は比較的極性が高いことが予想されたため、海綿抽出液を液液分配して得られたブタノール層を Spehadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによって分画し、網羅的な解析を進めた。その結果、lipodiscamide よりも分子量が80大きい化合物を検出した。80マスユニットは硫酸基1個分に相当する。

Lipodiscamide の構造には水酸基は一つもないことから、硫酸化される部位として考えられる官能基は分子内に2つ存在するウレア残基のみであった。しかし、これまでに硫酸化ウレア構造を持つ天然物の報告例は皆無であったため、実際にそのような官能基が天然物として存在するかどうかは不明であった。そこで、各種2次元NMRスペクトルの詳細な解析を行い、sulfolipodiscamide のシトルリン残基のケミカルシフトが lipodiscamide と大きく異なっていることが判明した。したがって硫酸基はシトルリンのウレア基に結合していることが分かった。マウス白血病細胞P388に対する細胞毒性試験の結果、新規化合物 sulfolipodiscamide の IC_{50} 値は lipodiscamide より約2倍程度低濃度であった。以上の結果より *D. kiiensis* 由来の discodermin 類、lipodiscamide 類はいずれも海綿共生微生物 *Entotheonella* によって生産されていることが明らかになった。

■ 結論

海綿 *D. calyx* のメタゲノムマイニングによって kasumidamide を新たに見出した。*D. kiiensis* から

は lipodiscamide の生合成遺伝子クラスターを取得し、クラスター内にコードされた硫酸基転移酵素の存在から sulfolipodiscamide を新規化合物として同定するに至った。これらの化合物はいずれも海綿共生微生物 *Entotheonella* によって生産されていることが明らかになった。これらの結果は、海綿動物由来生物活性物質の生合成遺伝子の取得が、生産菌の特定につながるとともに、メタゲノムマイニングによる新規天然物の発見にも有効であることを示している。

