

論文の内容の要旨

論文題目 海綿由来細胞毒性物質 Calyculin A の生合成に関する研究

氏名 江上 蓉子

【序論】

系統的に最も原始的な多細胞動物として位置づけられる海綿動物は、多様な生物活性物質の宝庫であり、抗がん剤のリード化合物として有望な二次代謝産物が数多く単離報告されてきた。しかしながら、これらの化合物を安定的に供給できる確立した方法がないことから、臨床応用まで至った例は数少ない。一方で、海綿を起源とする有用な生物活性物質の真の生産者は海綿に共生する難培養性微生物であることが長年示唆されてきた。海綿由来生物活性物質の生産を担う微生物の同定および生合成機構の解明は、その有効利用・安定供給を目指す上で鍵となる。本研究では、伊豆半島沿岸に生息するチョコガタイシカイメン *Discodermia calyx* を起源とするタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤 calyculin A の生合成遺伝子を取得し、その遺伝子を有する共生微生物を探索することによって生産菌の同定を目指した。さらに、生合成酵素の機能解析により、海綿と微生物の共生意義について考察した。

【本論】

Calyculin 生合成遺伝子の探索

2000 年以降、ゲノムシーケンス技術の革新により様々な微生物のゲノム解析が急速に進み、二次代謝産物の生合成遺伝子も次々と同定されてきた。その一方で、海綿由来生物活性物質の生合成遺伝子の単離報告例は未だ数少ないのが現状である。その原因として、二次代謝産物の真の生産者として示唆されている海綿共生微生物の 99%以上が現在の技術では培養困難であり、生産菌の単離・同定が難しいことがあげられる。このため、二次代謝産物の生合成遺伝子の取得は共生微生物を含む海綿メタゲノムからの探索に限られる。しかしながら、多種多様で複雑な微生物叢が含まれる海綿メタゲノムから、候補となる遺伝子を選別することは極めて難しいことが予想される。本研究では calyculin A の構造と遺伝子配列の相関性から候補遺伝子を選別し、生合成遺伝子の同定を目指した。

Calyculin A は、その構造から I 型 PKS (polyketide synthase) と NRPS (nonribosomal peptide synthetase) のハイブリッド経路から生合成されると予想した。I 型 PKS はモジュールの構成によって *cis*-AT 型と *trans*-AT 型に分類される。2009 年に J. Piel らによって、伸長反応を担う KS (ketosynthase) ドメインの詳細な解析が遂行され、*trans*-AT 型の KS ドメインは生合成中間体の部分構造に依存して配列相同性を示し、複数の clade に分類されることが報告された。また、 β -branch 構造を有する化合物の 9 割以上が *trans*-AT 型 PKS 由来であり、同様の部分構造が calyculin A のテトラエン部分にも認められる。そこで、calyculin A は *trans*-AT 型 PKS 由来であるという仮説を立て、KS ドメインの配列情報を足掛かりに海綿メタゲノム DNA より生合成遺伝子の探索を進めた。

まず、式根島産海綿 *D. calyx* よりメタゲノム DNA を抽出し、KS ドメインに特異的な縮重プライマーを用いた PCR を行った。増幅した遺伝子断片の配列を解析した結果、*D. calyx* メタゲノム中に *cis*-AT、*trans*-AT および *sup* (sponge ubiquitous PKS) に分類される I 型 PKS が存在することを明らかにした。さらに、*trans*-AT 型の KS ドメインについて詳細に解析した結果、calyculin A の部分構造と一致する clade が複数認められたため、それらは calyculin PKS の一部である可能性が示唆された。そこで、*D. calyx* メタゲノム DNA より fosmid ライブラリーを構築し、これらの KS ドメインの配列を基に PCR スクリーニングを行った。さらに、陽性クローンの末端配列に対してスクリーニングを繰り返し、最終的に 12 個の fosmid クローン pDCYE1-12 を得た。

取得した fosmid DNA の配列を次世代シーケンサーにより解析し、150 kb 以上におよぶ PKS-NRPS をコードする *cal* 遺伝子の配列情報を得た (Fig. 1)。クラスターの上流には 3 つの NRPS モジュールがコードされており、A (adenylation) ドメインの配列から推測可能な伸長基質は順番に Ser、Gly、Ser であった。最初のモジュールには 2 つの MT (methyltransferase) ドメインが認められ、トリメチルセリンの生成が推測された。また、3 つ目の A ドメインの上流、下流にはそれぞれ環化酵素と酸化酵素がコードされており、オキサゾールの形成が予想された。これらはいずれも calyculin A に認められる特徴的な構造である。さらに下流には巨大な PKS がコードされており、 α 位のメチル化を担う MT ドメインの位置、KR (ketoreductase) ドメインのアミノ酸配列から推測可能な水酸基の立体化学、KS ドメインの clade、およびモジュール全体の並びは calyculin A の構造と良い相関を示していた。また、 β -branch の生合成に関与する酵素群も認められ、*cal* 遺伝子が calyculin の生合成遺伝子であることが強く示唆された。

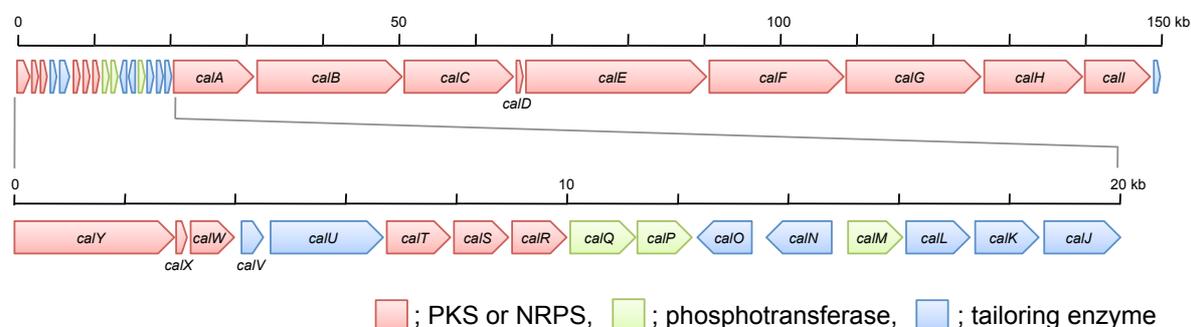


Fig. 1 *cal* 遺伝子の概要

Calyculin 生産菌の特定

取得した遺伝子にはイントロンが認められなかったことから *cal* 遺伝子はバクテリア由来であることが示唆された。そこで、calyculin 生産菌の特定を目指した。まず、*D. calyx* に共生するバクテリアを遺伝子から探るため、海綿メタゲノム DNA に含まれる 16S rRNA 解析を行った。その結果、過去に報告された様々な海綿と同様、*D. calyx* には Proteobacteria や Chloroflexi、Acidobacteria など多様なバクテリアが共生していることが示唆された。一方、海綿懸濁液を光学顕微鏡にて観察したところ、特徴的な形状を有する 2 種類のフィラメント状バクテリアの存在を確認した。そこで、バクテリアを含む海綿懸濁液を用いて CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization) およびレーザーマイクロダイセクションによるシングルセル解析を行った。その結果、1 種のフィラメント状バクテリアに *cal* 遺伝子がコードされることを明らかにした。さらに 16S rRNA 解析により、calyculin 生産菌を candidate phylum 'Tectomicrobia' に属する '*Candidatus Entotheonella*' sp. と特定した。

Calyculin 推定修飾酵素の機能解析

取得した *cal* 遺伝子が calyculin の生合成遺伝子であることを示すには、本遺伝子によって calyculin が生産されることを実証しなければならない。しかしながら、現段階の試みでは *cal* 遺伝子をコードする共生バクテリア '*Candidatus Entotheonella*' sp. の培養に成功していない。そのため、本遺伝子の表現型を生産菌ベースで証明することは困難であった。また、別の微生物を宿主としたクラスター全体の異種発現においても、150 kb におよぶ巨大な二次代謝産物遺伝子クラスターの発現例はなく、極めて難しいことが予想された。そこで、*cal* 遺伝子の一部を機能解析することで、本クラスターの calyculin 生合成への関与を検討した。遺伝子情報から推測される PKS-NRPS 産物が最終的に calyculin A へ変換されるためには、複数の修飾反応が必要である。*cal* 遺伝子上流には、リン酸基転移酵素と配列相同性を示す 3 つの ORF、*calM*、*calP* および *calQ* が認められた。これらが calyculin A の生合成において修飾反応を担うことが予想されたことから、その機能解析を行った。

N 末端 His タグ融合タンパク質として大腸菌にて異種発現した CalM、CalP および CalQ を Ni-アフィニティカラムにより精製した。Calyculinamide A および dephosphonocalyculin A を基質として、精製タンパク質を用いた *in vitro* における酵素反応を行った。その結果、CalQ と calyculinamide A および calyculin A との酵素反応液に新たな生成物を検出した。LC-MS 解析により、この新規生成物の分子量は基質よりそれぞれ 80 増加することが判明し、1 分子のリン酸基が付加した化合物の生成が推測された。しかしながら、過去にこのような化合物の単離報告例はなかった上に、生合成の最終産物として考えられていた calyculin A のリン酸化は予想外であった。そこで、海綿抽出物を再度精査した。採集後の生海綿あるいは凍結保存した海綿を用いて各種有機溶媒による抽出を試みたが、いずれの場合も calyculin A が主要代謝産物として検出されるのみであった。一方で、採集後の新鮮な海綿を液体窒素下で瞬間凍結し、そのまま凍結乾燥した試料を MeOH で抽出した結果、主要代謝産物は CalQ 酵素反応生成物と一致する化合物であることが判明した。そこで、本化合物を精製し、NMR 解析を行った結果、calyculin A のピロホスフェート体 phosphocalyculin A と構造決定した。以上の結果は、*cal* 遺伝子が calyculin の生合成に関与することを強く支持するとともに、calyculin 生合成の最終産物が phosphocalyculin A であることを示した。

海綿 *D. calyx* における phosphocalyculin A の存在意義の解明

Phosphocalyculin A のヒト子宮頸がん細胞 HeLa およびマウス白血病細胞 P388 に対する細胞毒性試験を行った。その結果、phosphocalyculin A の細胞毒性は calyculin A よりも約 1,000 倍減弱していた。また、タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A に対する阻害においても、phosphocalyculin A の活性は calyculin A より減弱することが判明した。一方で、海綿粗酵素液を用いた検討により、phosphocalyculin A から calyculin A への変換が *D. calyx* 特異的に存在する脱リン酸化酵素によって生じることを明らかにした。さらに、採集後の海綿をミンチ状に砕くことで物理的な傷害を与え、その代謝物を経時的に分析した。その結果、傷害を与えた海綿組織において瞬時に phosphocalyculin A から calyculin A への変換が起こることが判明した。以上の結果は、phosphocalyculin A が化学防御物質の前駆体として海綿体内に蓄えられ、外部から何らかの刺激や攻撃が加わった際に直ちに脱リン酸化され、強力な細胞毒性物質である calyculin A に変換される「activated chemical defense」機構を支持している (Fig. 2)。

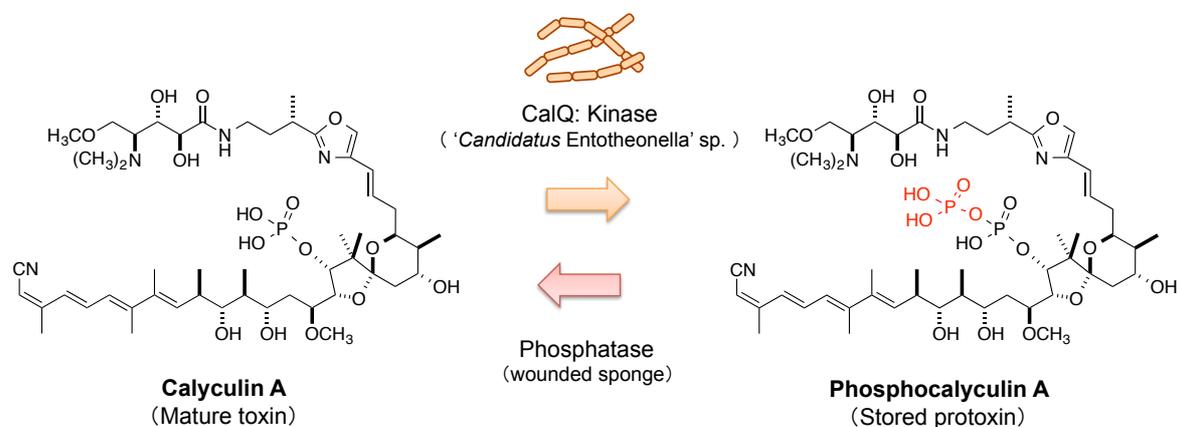


Fig. 2 海綿 *D. calyx* における calyculin 類を利用した activated chemical defense 機構

【総括】

本研究において、私は、化合物の構造と *trans*-AT 型 PKS 特有の配列情報をベースとしたメタゲノムマイニングにより calyculin 生合成遺伝子の取得に成功した。さらに *cal* 遺伝子を用いたシングルセル解析により、共生バクテリア *Candidatus Entotheonella* sp. を calyculin 生産菌として特定した。これらの研究成果は、海綿メタゲノムから直接取得した遺伝子配列をもとに生産菌を特定した初めての事例であり、海綿由来医薬品リード化合物の生産菌を特定する上で有用な方法論である。今後、生合成遺伝子の適切な異種発現系の構築あるいは生産微生物の可培養化によって、有用な海綿由来二次代謝産物の供給法の確立に繋がることが期待される。また、従来の単離精製条件では検出できなかった生合成最終産物を *cal* 遺伝子の機能解析をもとに明らかにした。さらに、*D. calyx* における phosphocalyculin-calyculin を利用した activated chemical defense 機構を見出した。本研究結果は、主要代謝産物として単離構造決定された天然物が必ずしも生合成の最終産物であるとは限らないことを示すとともに、海綿と微生物の共生関係の意義について興味深い知見を提示する。