

カリクリンAの生合成遺伝子ならびに生産菌の解明

東京大学大学院 薬学系研究科 天然物化学教室
脇本 敏幸

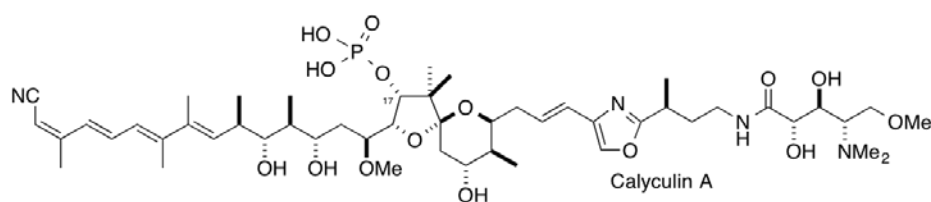
1. 緒言

日本近海に生息する海綿動物からは多種多様な生物活性物質が見出されてきた。それらの中にはハリコンドリンBなど医薬品リード化合物として重要な化合物も数多い。しかし海綿動物は稀少生物資源であるため、その供給方法の限界が有効利用の足かせとなってきた。一方で海綿二次代謝産物の多くは、海綿に共生する微生物が産生することが長年疑われてきた。そのため、海綿二次代謝産物の生合成遺伝子を特定し、その生合成機構の解明、ならびに生産菌を同定することは、異種発現や生産菌の培養方法を確立する上で必須の基盤的知見となる。海綿動物の中でもイシカイメン目 (Lithistida)、Theonellidae科の海綿は特に多様な二次代謝産物を産生することが知られている。中でも *Discodermia* 属からは抗がん剤のリード化合物として有望な discodermolide など、50種以上の生物活性物質が報告されてきた。本研究では、伊豆半島、伊豆諸島近海に生息するチョコガタイシカイメン (*Discodermia calyx*) に含まれる生物活性物質について、生合成遺伝子の取得と生産菌の同定を試みた。

2. 方法

カリクリンAは伊豆半島産チョコガタイシカイメンより単離・構造決定された強力な細胞毒性物質である。カリクリンAの細胞毒性は特異的かつ強力なタンパク質脱リン酸化酵素の阻害活性に基づくことから、現在和光純薬工業より生化学試薬として市販されている。その構造は分子量1008、テトラエン、5,6-スピロケタール、リン酸エステル基を含み、ポリケタイドとリボソーム非依存性ペプチドのハイブリッド型生合成産物であることが予想される。真の生産者は海綿に共生するバクテリアと考えられるが培養困難な微生物と予想されることから未だ同定されていない。そこで本研究では海綿由来のメタゲノムライブラリーを構築しカリクリンA生合成遺伝子クラスターの取得を試みた。海綿メタゲノムから生合成遺伝子クラスターを単離することは極めて困難であるが、近年I型ポリケタイド合成酵素のketosynthaseにおける保存領域をもとにした縮重プライマーいくつか報告されている。そこで、各種縮重プライマーを用いて海綿より抽出したメタゲノムを鋳型としたPCRを行った。増幅した58個のampliconのシークエンス解析を行い、BLASTによる相同性検索を行った結果、未同定配列を除き、既知配列との相同性を示す5つのグループに分けることができた。5グループのうち、1つはcis-AT typeのPKSに属し、残りの4つはtrans-AT PKSに属する配列であった。Type 1 PKSの中で

trans-AT PKSはKSの配列情報からClade別に分類することが可能であり、各モジュールの伸長構造単位を予測することができる。そこで、生合成産物であるカリクリンAの構造から、必要とされるCladeを予測し、得られたampliconの選別を行った。その結果、数個のampliconがカリクリン生合成遺伝子クラスターに該当する可能性が明らかとなった。そこで、チョコガタイシカイメンよりメタゲノムDNAを抽出し、Fosmid library作成キットを用いて、大腸菌を宿主とした平均インサート長約35 kbp、約25万クローン of *D. calyx* metagenome libraryを構築した。上記の方法によって得られた*trans*-AT PKSに属する3つのKS ampliconに基づき、プライマーを設計し、*trans*-ATのClade別にスクリーニングを行い、12種のポジティブクローンを得た。



3. 結果 研究成果

生合成遺伝子クラスターの単離

カリクリンAの構造的特徴には、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。その一つにテトラエン部分に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。9 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。カリクリンAの構造より、その生合成経路はメトキシ基とジメチルアミノ基を有するトリメチルセリン残基より始まり、NRPS-PKSのモザイク状の経路を経た後に、オキサゾール形成へと向かうことが予想できる。この間、NRPSのA (adenylation) domainは3つ存在し、その基質特異性は順にSer、Gly、Ser (oxazole)となる。実際の配列解析の結果、上流には3つのNRPS A domainが存在し、そのNRPS code)に基づく予想基質は推定経路と一致した。また最初のA domainを含むmoduleに2つのMT (methyltransferase) domainが存在することから、トリメチルセリン残基の生成が示唆される。引き続きオキサゾール以降はPKSによってポリケチド鎖が生合成される。PKSのmoduleに含まれるMT domainの配置はcalyculin Aのメチル基の位置と完全に一致した。また、配列情報から予測できるKR (ketoreductase) domainの立体選択性は17位の水酸基を除くすべての水酸基の立体化学と一致した。さらにKSのCladeから予測される各モジュールの伸長基質の構造はcalyculin Aの構造と良い一致を示した。通常ポリケチドはC2単位で伸長するため主鎖炭素数は偶数になるが、calyculin Aではオキサゾール形成以後のPKSで生じる主鎖の炭素数がC25となり、奇数である。このことは、ポリケチド鎖伸長過程において減炭が生じる事を示唆している。実際にPKSの1つのモジュール内にFlavin依存性酸化酵素に配列相同性を示すORFが見出されている。

この酸化酵素を含む一連のPKSモジュールによって減炭過程が生じると推定している。上述のように本PKS-NRPS hybrid遺伝子クラスターはカリクリンAの推定生合成経路と良い一致を示した。

生産菌の同定

複雑な微生物網を構成する海綿共生微生物のほとんどは難培養性と予想されるために、分離培養によるカリクリン生産菌の探索は困難であった。そこで、取得した生合成遺伝子を基にCARD-FISH法を試みた所、海綿懸濁液に見出されるフィラメント状バクテリア細胞が特異的に検出できた。そこで、レーザーマイクロダイセクションを用いてフィラメント状バクテリア細胞を分離後、シングルフィラメントを鋳型とするPCRによって、生合成遺伝子に特異的なバンドを検出した。16S rRNA解析の結果、フィラメント状バクテリアを*Entotheonella* sp.と同定した。したがって、海綿共生菌*Entotheonella* sp.がカリクリン生産菌であることが強く示唆された。

4. まとめ

我々は、推定カリクリン生合成遺伝子クラスターの上流にコードされているリン酸基転移酵素を大腸菌にて異種発現し、カリクリン類縁体を基質に用いて機能解析を行った結果、カリクリンAが選択的に基質として認識されることを明らかにしている。したがって、本遺伝子クラスターがカリクリン生合成遺伝子であると考えている。生産菌として同定したフィラメント状バクテリア*Entotheonella* sp.は*Theonella*属の海綿よりFaulknerらによって初めて報告された海綿共生菌である。最近、ETHのPielらとの共同研究によって海綿動物に広く存在する難培養性微生物であることが明らかになっている。また既知微生物群の中に系統的に近縁の門が報告されていないため、まったく新しい門「Tectomicrobia」として提唱した。¹ 海綿由来生物活性物質の供給方法を確立するためには、*Entotheonella* sp.に由来する遺伝子の異種発現系として適切なホストを見出すことが重要となる。今後、より詳細なゲノム解析や海綿における共生の意義を明らかにしていきたい。

5. 参考論文

1. M. C. Wilson, T. Mori, C. Rückert, A. R. Uria, M. J. Helfl, 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*, **2013**, *in press*.