

海洋微生物共生系を支えるメカニズムの理解にむけた 海洋天然化合物プロファイルの解析

町田 光史・親泊 安基・中尾 洋一*

はじめに

天然物化学は、医薬品開発などの応用研究のみならず、化学や生命科学といった基礎研究分野の発展にも貢献してきた¹⁻¹²⁾。一方、潜水技術の発展に伴って天然化合物の探索源は海洋生物にまで広がり、化合物の分離・分析技術の飛躍的な進歩によって、これまでに3万近い海洋天然化合物が見いだされてきた¹³⁾。これらの多くは陸棲生物由来の化合物とは大きく異なる分子構造をもつため、海洋生物はユニークな生物活性が期待できる未開拓な探索源として注目を集めるようになった¹⁴⁾。なかでも海綿は、物理的な防御手段を持たず移動もできないため、独特な二次代謝産物を化学防御手段として蓄えるようになったと考えられている。しかしながら、これらの海洋天然化合物を医薬品などに応用しようとする場合、海綿から単離される天然の化合物量が十分でないことが大きな壁となっている。

近年の遺伝子解析技術の向上に伴い、海綿の二次代謝産物の多くは、海綿内に共生する微生物によって生合成されていることがわかってきた¹⁵⁾。そこで、二次代謝産物を生産する共生微生物を培養して化合物の供給量不足を解消しようとする方法が精力的に検討されている。ところが、海綿内に共生する微生物の99%以上は培養法が確立されていない微生物ダークマターであるため、これら難培養性の共生微生物を分離培養するためには、共生関係を支えるケミカルシグナルなど、共生メカニズムについての本質的な知見を得ることが必要不可欠である。

近年、海綿のメタゲノム解析とメタボローム解析を組み合わせて、二次代謝産物生産メカニズムに関する知見を得ようとする研究アプローチが見られるようになりつつある。しかしながら、微生物の共生モデルとしての海綿における二次代謝産物の役割を理解するには、そのアプローチに加えて、より“ウェットな研究”であるフィールドワークを組み込んで、フィールドでの共生微生物と二次代謝産物の関係も解析する必要がある。

このような観点から筆者らは、海洋微生物の共生系を支えているメカニズムを理解するための切り口として、

同種もしくは近縁の海綿について、採集地(イタリア・ポルトフィーノまたはイスキア島, 日本・見島, 隠岐, および知夫里島)別にその二次代謝産物のプロファイルを解析し、結果を比較することとした。

LC-MSを用いた海綿二次代謝産物の比較と探索

海綿内に共生する多様な微生物は、宿主である海綿の3~5割の体積を占めるともいわれている¹⁶⁾。生息環境が異なり、共生微生物叢が異なれば、同種の高綿であっても二次代謝産物プロファイルが異なる可能性がある。そこで本研究では、異なる場所で採集した同種もしくは同属の高綿サンプルのMeOH抽出物についてLC-MSを用いた多変量解析を行い、それぞれの二次代謝産物プロファイルと比較した。さらに、採集場所の違いで特徴づけられた化合物を単離・構造決定し、高綿の二次代謝産物の特徴を生み出している化合物の同定を行った。

多変量解析に用いた高綿サンプル ここでは世界中の海域から報告されている*Petrosia*属の高綿を対象生物とした。*Petrosia*属の高綿からはアセチレン化合物が数多く報告されており、その構造多様性をもとにした化学分類(ケモタキソノミー)についても研究されている¹⁷⁾。これらのアセチレン化合物は陸上の生物由来のものと同様、おそらくポリケチドや脂肪酸の生合成経路を利用して作られていると想像されているが、意外なことに、その真の生産者や生合成遺伝子を特定した報告例はない。

本研究では、なじみ深いがどのように作られているかよくわかっていないアセチレン化合物に焦点を当てて、日本で採集した高綿*Petrosia ushitsuensis* 3検体、イタリア産の*P. ficiformis* 3検体、また比較対照用に他属高綿として日本産の*Chondrosia oxyastera* 1検体とイタリア産の同属高綿*C. reniformis* 1検体のサンプルを用いて二次代謝産物プロファイルの解析を行った(図1)。

方法 各高綿サンプルをMeOHで抽出し、濃縮後、H₂OとCHCl₃で二層分配した。CHCl₃層をODSカラムで脱塩後、MeOH溶出画分をLC-MS(正イオン測定モード)分析に付した。得られた質量分析のデータを多変量解析ソフトReifycs Signpost MSTMを用いて解析した。

それぞれのイオンピークを多変量解析し、主成分分析

*著者紹介 早稲田大学大学院先進理工研究科(教授) E-mail: ayocha@waseda.jp

およびクラスタリング解析を行った結果、*P. ficiformis*の3検体および*P. ushitsuensis*の3検体それぞれに含まれるイオンピーク群は、それぞれの種ごとに類似性が高いことが示された。また、*P. ficiformis*および*P. ushitsuensis*という異なる種であっても、これら同属の6検体のイオンピーク群は、他の属(*Chondrosia*属)の海綿と比較すると、類似性が高いことが明らかになった。すなわち、同種の海綿である*P. ushitsuensis*の海綿サンプルS14006、およびS14023、S14025由来のイオンピーク群は類似性が高く、*P. ficiformis*の3検体(S14105、S14111および

S14112)においても同様に類似性が高いことが分かった。その一方で、各サンプル固有に含まれる化合物や、同種間あるいは同属間でのみ共通して含まれる化合物の存在も確認できた(図2、図3)。

以上の多変量解析により、各サンプルは特徴的な化合物を含むことが分かったため、それらの化合物を単離することとした。イタリア・ポルトフィーノ産*P. ficiformis*(S14105)にのみ含まれ、組成推定の結果、新規である可能性が示唆された化合物1 { m/z 399.3249 [M + H]⁺ (calcd for C₂₇H₄₃O₂, 399.3263)}, *P. ficiformis*の3検体

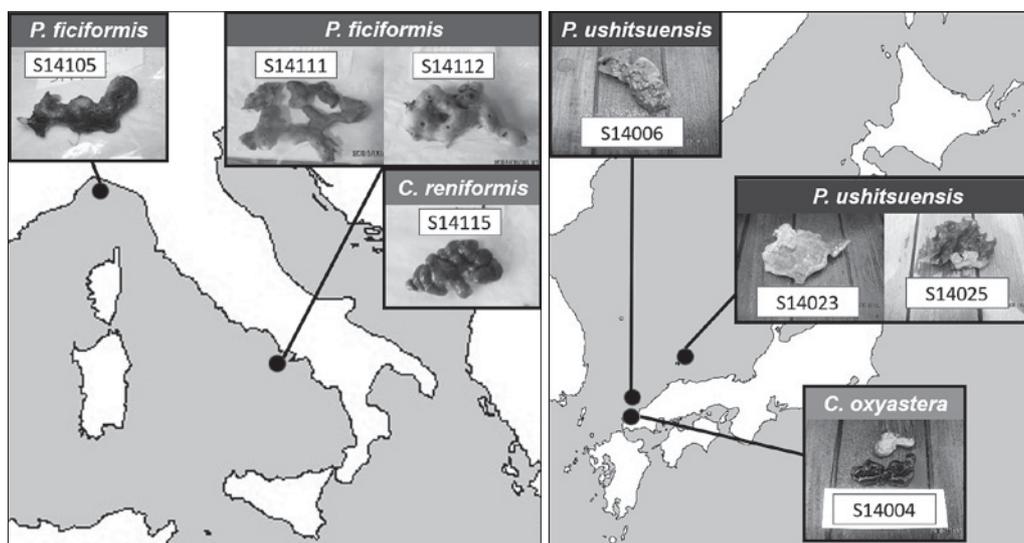


図1. 海綿サンプルの採集場所(左:イタリア, 右:日本)

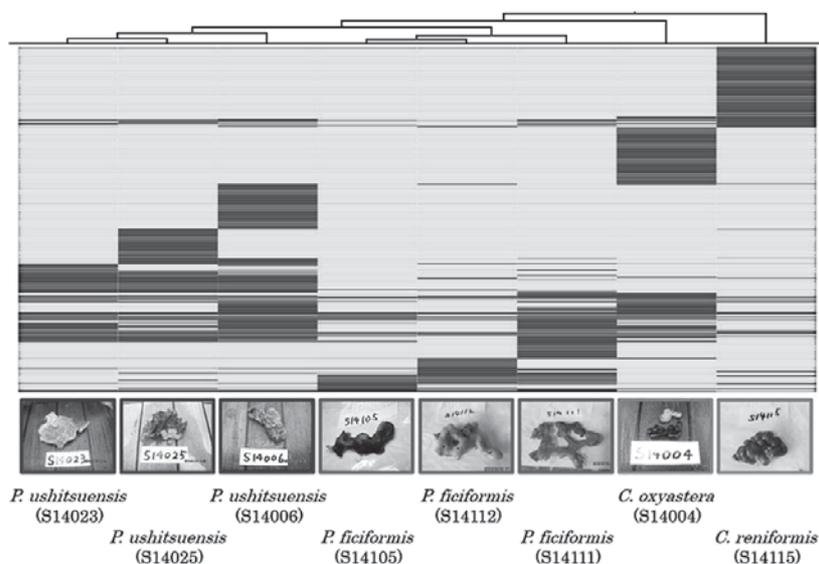


図2. 海綿抽出物のクラスタリング解析結果。色の濃い部分が含まれている化合物を示している。海綿ごとに色の濃い部分のレーンが異なることから、違う化合物プロファイルパターンを有していることがわかる。

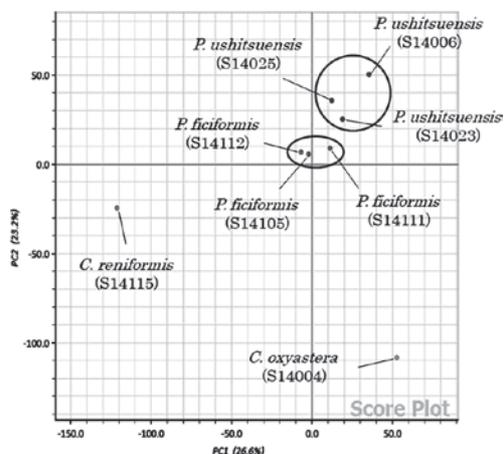


図3. 主成分分析結果

に共通して含まれ, 組成推定の結果, 新規である可能性が示唆された化合物2 { m/z 371.2945 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{25}H_{39}O_2$, 371.2950)}, *P. ushitsuensis* の3検体に共通して含まれる化合物3 { m/z 677.5268 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{70}O_2Na$, 677.5274)}, *Petrosia* 属の海綿6検体すべてに共通して含まれる化合物4 { m/z 275.1623 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{15}H_{24}O_3Na$, 275.1623)} に着目し, 化合物1 および2 を *P. ficiformis* (S14105) から, 化合物3 および4 を *P. ushitsuensis* (S14023) から単離することとした.

化合物1および2の単離 湿重量200 gのポルトフィーノ産海綿 *P. ficiformis* (S14105) を粉碎し, MeOH を用いて抽出した. 得られた抽出物を濃縮後, 液-液分配および各種クロマトグラフィーを用いて精製し, 化合物1 および2 をそれぞれ1.1 mg ずつ得た.

化合物1の構造解析 HRESI-MS (正イオン測定モード) 測定において, m/z 399.3249 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{27}H_{43}O_2$, 399.3263) および m/z 421.3073 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{27}H_{42}O_2Na$, 421.3083) の2つのイオンピークを与えたため, 化合物1の化学式を $C_{27}H_{42}O_2$ と決定した.

1H NMR スペクトル (methanol- d_4) では, 4つのオレフィンプロトン { δ_H 6.00, 5.45, 5.34 (2H)}, 末端アルキンのプロトン (δ_H 3.41), および複数の飽和脂肪族由来のプロトンシグナル (δ_H 1.25–1.40) が観測された. ^{13}C NMR スペクトル (methanol- d_4) では, 1つのカルボニル炭素 (δ_C 162.4), 4つのオレフィン炭素 { δ_C 146.6, 131.0 (2C), 109.5} の存在が確認できた. COSY, HMQC, および HMBC スペクトルの解析により, 部分構造 a (C-1 ~ C-6), b (C-7 ~ C-12), c (C-22 ~ C-27) が明らかになった (図4). H-3/H-4間のスピン結合定数 (11 Hz) より, Δ^3 の立体化学は Z に決定した. アリル位の C-8 および

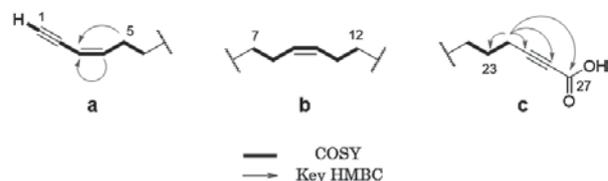


図4. 化合物1の部分構造 a ~ c

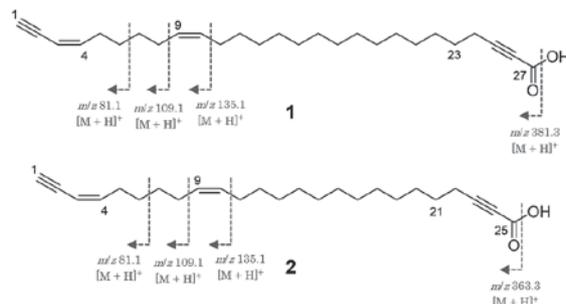


図5. 化合物1および2の構造とESI-MS/MSフラグメンテーション

C-11 (δ_C 28.30, 28.24) が, 飽和脂肪族由来の炭素 (δ_C 29.6 ~ 31.3) よりも, 遮蔽されていることから, Δ^9 の立体化学を Z と決定した. 部分構造 a と b 間および b と c 間をそれぞれメチレン直鎖でつなげることで, 化合物1の構造を決定した. 得られた構造は, m/z 399.3 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとする ESI-MS/MS (正イオン測定モード) スペクトルの解析によって, 確定することができた (図5). 化合物1は新規アセチレン化合物であったため, ficiformylene A (1) と命名した.

化合物2の構造解析 HRESI-MS (正イオン測定モード) 測定において, m/z 371.2945 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{25}H_{39}O_2$, 371.2950) および m/z 393.2766 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{25}H_{38}O_2Na$, 393.2770) の2つのイオンピークを与えたため, 化合物2の化学式を $C_{25}H_{38}O_2$ と決定した.

1H および ^{13}C NMR スペクトル (methanol- d_4) の類似性から, 化合物2は化合物1の類縁体であることが示唆された. m/z 371.3 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとする ESI-MS/MS (正イオン測定モード) 分析により, 化合物1と同様のフラグメンテーションパターンが観測されたため, 化合物2の構造は, 化合物1の C-11 ~ C-24 の炭素鎖が2つ分短くなった新規構造だと決定し, ficiformylene B (2) と命名した.

化合物1および2の細胞毒性 Ficiformylene A (1) はヒト子宮頸部がん細胞 (HeLa細胞) に対しては $10 \mu\text{g/mL}$ で毒性を示さなかったが, マウス白血病細胞 (P388細胞) に対しては, IC_{50} $4.5 \mu\text{g/mL}$ の弱い細胞毒性を示した.

Ficiformylene B (2) はHeLa細胞およびP388細胞に対して、10 µg/mLで毒性を示さなかった。

化合物3および4の単離・構造決定 湿重量970 gの島根県隠岐産海綿 *P. ushitsuensis* (S14023) を粉碎し、MeOHを用いて抽出した。得られた抽出物を濃縮後、液-液分配および各種クロマトグラフィーを用いて精製し、化合物3を2.8 mg, 化合物4を0.1 mg得た。NMRおよびMSスペクトルデータの比較により、化合物3は既知化合物 petrocortyne A (3), 化合物4は既知化合物 petroraspaillyne A1 (4) と同定した。

考 察

Petrosia 属の海綿は、さまざまな生理活性アセチレン化合物の探索源として注目されており、これまでに petrosynol A¹⁸⁾, petroformynes¹⁹⁻²²⁾, petrocortynes²³⁾, petrosiacetylenes²³⁾, corticatic acids²⁴⁻²⁶⁾, petroraspaillynes²⁷⁾ などの多様なアセチレン化合物が単離されている (図6)。本研究ではLC-MSを用いた多変量解析を利用することで、*Petrosia* 属海綿サンプルのイオンピーク群から特徴的な化合物を見だし、さらに、LC-MSデータを指標に目的化合物を探索することで、新規アセチレン化合物 ficiformylenes A (1) および B (2) を単離することができた。化合物1および2は、*P. ficiformis* における含有量がともに $5.5 \times 10^{-4}\%$ と低く、サンプルごとの含有量にも個体差があった。また、細胞毒性も弱いため活性を指標

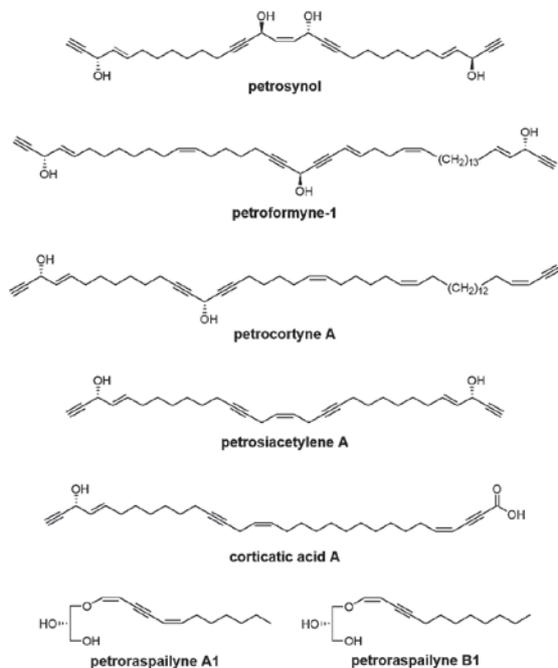


図6. *Petrosia* 属の海綿から単離されたアセチレン化合物の例

とした精製が難しいと考えられた。このように含有量が低く生物活性も弱い天然化合物の探索には、本研究のようにLC-MSデータの多変量解析を利用した手法が適している。

海綿の二次代謝産物プロファイルが、同種間でも大きく異なるという本研究の解析結果は、海綿の二次代謝産物の多くが共生微生物により生産されているという仮説を支持するものであり、その生産は共生微生物の生息環境に左右されることを示唆している。今後、海綿共生微生物叢のメタゲノム解析と、代謝産物のメタボローム解析を組み合わせることで、代謝産物プロファイルの違いを生み出す共生微生物の同定するための手法が確立されると期待される。

おわりに

本稿では *Petrosia* 属の海綿に含まれる二次代謝産物のプロファイル解析研究について紹介した。微生物叢を網羅的に解析するメタゲノミクスをはじめとする遺伝子解析技術が大幅に進歩したことで、共生環境中に存在する微生物の姿が明らかとなってきた。また、遺伝子のビッグデータ解析により遺伝子からつくられる化合物の予想も可能となってきた。しかし、それら科学の進歩をもってしても、なぜ環境微生物の99%以上が分離培養できないのか？ についての本質的な解を導き出せていないのが現状である。今回着目したアセチレン化合物群の中には抗菌・抗真菌活性が知られてものも含まれていることから、共生微生物叢に何らかの影響を与えている可能性も考えられる。さらに、海綿の二次代謝産物が、どのような共生環境下で微生物によって生成されるかをつきつめることで、その共生系を支えるメカニズムという本質的な疑問に対する答えが見つかることを期待している。

謝 辞

本研究の遂行に当たっては、ジェノヴァ大学Giorgio Bavestrell先生、Marco Bertolino先生、ナポリ大学Maria Valeria D'Auria先生、Angela Zampella先生、および広島大学の堀貫治先生、平山真先生、ならびに練習船豊潮丸の皆様のご協力を賜りました。また、本研究は科学研究補助金(基盤研究(B)海外学術調査、研究課題番号25303008)の予算を使用して行われたものです。

文 献

- 1) McCurdy, C. R. and Scully, S. S.: *Life Sci.*, **78**, 476 (2005).
- 2) Wongsrichanalai, C. *et al.*: *Lancet Infect. Dis.*, **2**, 209 (2002).
- 3) Haux, J.: *Med. Hypotheses*, **53**, 543 (1999).
- 4) Marvin, G. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4745 (1959).
- 5) Wani, M. C. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325 (1971).

- 6) Falconer, S. B. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 415 (2011).
- 7) Victory, S. F. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 893 (1996).
- 8) Comroe, J. H. Jr.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **117**, 773 (1978).
- 9) Endo, A. *et al.*: *J. Antibiot.*, **29**, 1346 (1976).
- 10) Ueda, H. *et al.*: *J. Antibiot.*, **47**, 301 (1994).
- 11) Kino, T. *et al.*: *J. Antibiot.*, **40**, 1249 (1987).
- 12) Campbell, W. C. *et al.*: *Science*, **221**, 823 (1983).
- 13) Blunt, J. W. *et al.*: *Nat. Prod. Rep.*, **35**, 8 (2018).
- 14) Gerwick, W. H. and Fenner, A. M.: *Microb. Ecol.*, **65**, 800 (2013).
- 15) Piel, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16222 (2004).
- 16) Brantley, E. S. *et al.*: *Tetrahedron*, **51**, 7667 (1995).
- 17) Erpenbeck, D. *et al.*: *Mar. Biotechnol.*, **9**, 2 (2007).
- 18) Fusetani, N. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **28**, 4313 (1987).
- 19) Cimino, G. *et al.*: *J. Nat. Prod.*, **48**, 22 (1985).
- 20) Cimino, G. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3563 (1989).
- 21) Cimino, G. *et al.*: *J. Nat. Prod.*, **53**, 345 (1990).
- 22) Guo, Y. *et al.*: *Tetrahedron*, **50**, 13261 (1994).
- 23) Seo, Y. *et al.*: *Tetrahedron*, **54**, 447 (1998).
- 24) Li, H. *et al.*: *J. Nat. Prod.*, **57**, 1464 (1994).
- 25) Nishimura, S. *et al.*: *J. Nat. Prod.*, **65**, 1353 (2002).
- 26) Takada, K. *et al.*: *Fish. Sci.*, **80**, 1057 (2014).
- 27) Seo, Y. *et al.*: *J. Nat. Prod.*, **62**, 122 (1999).