

【目的】 海洋天然物化学の分野は近年非常に発展し、多くの天然物がカイメン類から単離・構造決定されてきた。例えばクロイソカイメン *Halichondria okadai* からはオカダ酸が単離されている。またクロイソカイメンからはオカダ酸以外にもオカダ酸誘導体である、ディノフィシストキシン、グリコオカダ酸などが単離されている。私達もクロイソカイメンよりハリコンドリリン B を単離・構造決定している。この構造をもとに新規抗がん剤ハラヴェン®が開発され、すでにアメリカ、日本等で上市され、カイメン由来天然物の医薬リードとしての価値が強く認識されている。それ以外にも、ハリクロリンやハリクローム A などを単離・構造決定している。近年こうした天然物はカイメンに住む共生微生物が産生していることが報告されている。しかしこうした微生物がなぜこのような天然物を生産するのかは依然不明である。というのも環境中の細菌の大部分は難培養性であるためである。このような背景より私達は天然物そのものに注目した新しいアプローチを導入することにした。生物種や生合成遺伝子等の情報がまったくない状態では、天然物の構造こそが最大の手がかりであるからである。研究対象としては前述のように様々な有用医薬リードが報告されてきたクロイソカイメンを用いた。探索対象は先ずオカダ酸とした。

【方法】 採取したクロイソカイメンはオートクレーブで滅菌した海水中で破碎し、石や貝類等はデカンテーションで除去した。クロイソカイメン破碎液は固定し、抗オカダ酸抗体で免疫染色した。二次抗体は Dylight488 と Dylight650 を用いた。免疫染色したサンプルを用いてフローサイトメトリーで解析を行った。セルソーターで回収したサンプルを試料として、蛍光顕微鏡で観察を行った。さらに、シングルセルの条件で PCR チューブに回収した。また、マニピレーターを用いた回収も行った。回収した微生物は定法に基づきゲノムを抽出し、WGA キットでゲノムの増幅を行った。抽出したゲノムを鋳型に PCR を行い、回収した微生物の同定を行った。また、固定操作を行わずに生きたまま免疫染色も行った。染色後、セルソーターで回収し培養を試みた。真菌 A を培養し、抗オカダ酸抗体で免疫染色、フローサイトメトリーで解析した。また、真菌 A の培養抽出物に対し逆相 TLC プレートを用いてクロマトグラフィーを行った。真菌 A 培養抽出物を展開した TLC プレートを抗オカダ酸抗体で免疫染色した。また、増幅したゲノムを次世代シーケンサーで解析し、PKS 遺伝子を中心にゲノムマイニングを行った。

【結果】 抗オカダ酸抗体を用いてカイメン破碎液を免疫染色し、蛍光を指標に染色された微生物を回収したところ、複数の微生物が取得された。解析の結果、一つは真菌であり、もう一つは複数の細菌から構成されるバイオマットであった。そこで、固定を行わず同様に免疫染色を行い、回収した微生物の培養を試みた。その結果、真菌の培養に成功した。培養した真菌を抗オカダ酸抗体で免疫染色したところ、染色を確認した。培養抽出物をクロマトグラフィーで分離し、プレートごと免疫染色したところ、蛍光を示すバンドを確認した。また、ゲノムマイニングの結果、真菌由来の Lovastain 生合成遺伝子を含む複数の遺伝子クラスターを確認した。さらに、細菌に関しても多数の酸化還元酵素をクラスター内に含む放線菌由来の PKS 遺伝子クラスターを確認した。

Structures of okadaic acid and halichondrin B

