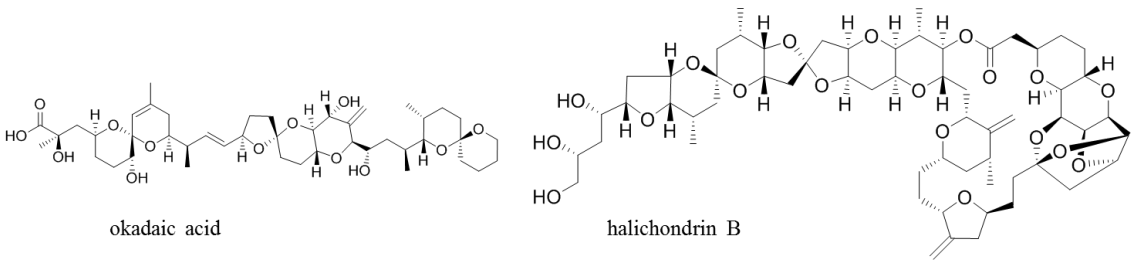
2　免疫染色を用いた生物オリジン探索研究	上村　大輔

【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砕し、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砕液は固定し、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、マニュ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砕液を免疫染色し、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



okadaic acid　　halichondrin B

2. 免疫染色を用いた生物オリジン探索研究

上村　大輔

神奈川大学 理学部

Key words : okadaic acid, bio-origin, immunostaining, flow-cytometry, sponge

緒　言

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［1〜3］。

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。私達は以前、クロイソカイメン中の微生物相を解析した結果、様々な微生物がクロイソカイメン中に存在することを明らかとした。この膨大な種類の微生物群の中から天然物の真の生産者を見つけ出すことは、クロイソカイメンとそれら微生物との共生システムの解明につながるものと私達は期待している。

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。オカダ酸に関しては渦鞭毛藻 *Prorocentrum lima* 等で生産が報告されており、ラベルした酢酸の取り込み実験などが行われている。しかしながら、クロイソカイメンにおけるオカダ酸の生物オリジンに関する報告は未だなされていない。その生合成経路に関しても依然不明な点が多く、クロイソカイメン内でのオカダ酸の働きを明らかにするためにも　、オカダ酸の真の生産者を明らかとすることは学術上重要である。

本研究は以下のように進めた。先ずオカダ酸を抗原とした一次抗体を用いてクロイソカイメンに免疫染色を行った。次にクロイソカイメン中のオカダ酸生物オリジンを、蛍光を指標にセルソーター等を用いて単離した。結果、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、もう一つは複数の微生物から構成されるバイオマットであった。そこで、固定を行わず同様の操作を行い、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、バイオマットに関しても、ゲノムを抽出し次世代シーケンサーで解析を行った。その結果、バイオマットには *Bacillus* 属、*Vibrio* 属、*Sphingomonas* 属等の多様なバクテリアが含まれていることが明らかとなった［4］。さらに詳細に検討したところ、バイオマット中心は *Vibrio* 属および *Renibacterium* 属が占めていることが確認された。

方法および結果

1. クロイソカイメンの免疫染色

クロイソカイメンは神奈川県の三浦半島で採取を行った。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砕し、石や貝類等はデカンテーションで除去した。カイメン破砕液を先ず、低速（500 G）で遠心分離し、上清を高速（8,000 G）で回収した。破砕液はグリセロールストックの状態で冷凍保存した。

保存したクロイソカイメン破砕液は使用直前に解凍し、氷冷した滅菌海水で洗浄した。次に 4%パラホルムアルデヒド溶液でカイメン破砕液の固定を行った。その後 PBS バッファーで洗浄を行った。免疫染色は Vector Laboratories 社の VECTASTAIN ABC Kit 及び Vector Red を用いて、ABC 法で行った。固定化したサンプルをブロッキング溶液で処理した。PBS バッファーで洗浄した後、一次抗体溶液で処理した。PBS バッファーで洗浄した後、ビオチン標識した二次抗体溶液で処理した。PBS バッファーで洗浄した後、アビジンービオチン標識酵素溶液で処理した。PBS バッファーで洗浄した後、基質溶液で処理し発色させた。一次抗体はモノクローナル抗オカダ酸抗体（マウス）を購入し、100 倍以上希釈して用いた。染色後サンプルを顕微鏡で観察した。

先ずコントロールとして免疫染色をしていないクロイソカイメン破砕液（図 1）と比較しながら可視光での観察を行うことにした。コントロールを観察の結果、ローダミン様色素と同色の微生物は確認されなかったため、Vector Red を用いた染色を行うことにした。Vector Red は染色部分が赤色を示すため可視光下肉眼で確認でき、さらにローダミン様の蛍光パターンを示すため、可視光及び蛍光での観察を行った。結果、染色したサンプルにおいて、赤色に染色された 10～20 ミクロンの微生物を確認することができた。さらに本プレートを蛍光で観察した結果、赤色に染まった微生物がローダミン様の蛍光を示すのを観察することができた。また Cy5 様色素を付加した抗体を用いても同様の結果を得た（図 2）。本結果によって、抗オカダ酸抗体を用いて、カイメン破砕液を免疫染色することが確認できた。一方で、染色された微生物は極めて希少にしか存在せず、更なる解析を進めるために効率的に微生物を回収することにした。

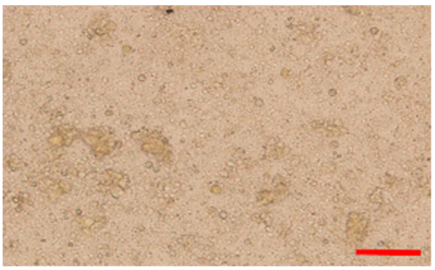


図 1. クロイソカイメン破砕液

スケールバー：20 μm

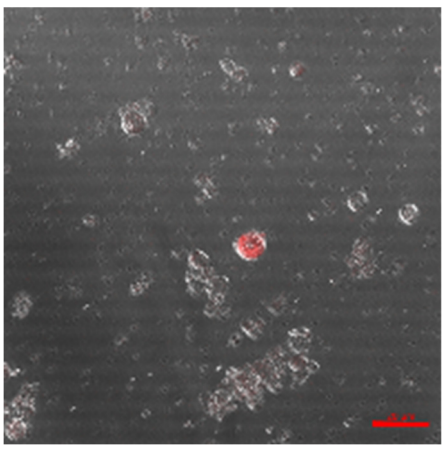


図 2. 免疫染色したクロイソカイメン破砕液の蛍光顕微鏡写真

スケールバー：20 μm

2. フローサイトメトリーを用いたクロイソカイメン破砕液の解析

クロイソカイメン中の微生物に対して抗オカダ酸抗体を用いて免疫染色ができることを確認した。そこで、次にセルソーターを用いたオカダ酸生物オリジンの単離を試みた。一次抗体は免疫染色で用いた抗オカダ酸抗体を用いた。二次抗体はそれぞれ異なる蛍光を示す抗体を用いることで自家蛍光の影響を排除することにした。本研究では Dylight488 と Dylight650 を用いた。クロイソカイメン破砕液をパラホルムアルデヒドで固定し免疫染色を行った。

Dylight488 は DyLight 色素で標識された抗 IgG 抗体であり励起波長は 493 nm、蛍光波長は 518 nm、一方 Dylight650 の励起波長は 655 nm、蛍光波長は 670 nm であるため、蛍光の計測に際して Dylight488 および Dylight650 の蛍光をそれぞれ青色レーザー（488nm）赤色レーザー（647 nm）で励起し、類似色素である FITC 用、Cy5 用の検出器で計測を行った。

先ず微生物の自家蛍光の影響を調べるためコントロールとして、免疫染色していないカイメン破砕液をフローサイトメトリーで解析した。次に、一次抗体では染色せずに直接二次抗体でのみ染色したサンプルを用いて計測した。以降、基本的にこの二次抗体のみで染色したサンプルをコントロールとして使用した。オカダ酸一次抗体と 2 種類の二次抗体を用いて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。

コントロールをフローサイトメトリー（セルソーター）で解析・回収した。縦軸に Dylight650 の蛍光を、横軸に Dylight488 の蛍光をプロットした（図 3 左）。コントロールに弱い蛍光を示すセルを確認したが、これは自家蛍光によるものと考えられた。次に、染色したカイメン破砕液の解析を行った。結果、Dylight488 と Dylight650 共に強い蛍光を示すセルを確認した。コントロールの解析結果と比較しながら、自家蛍光を示すセルを可能な限り回収しないように回収する蛍光強度の範囲を図に示すようにゲーティングした（R6）（図 3 右）。

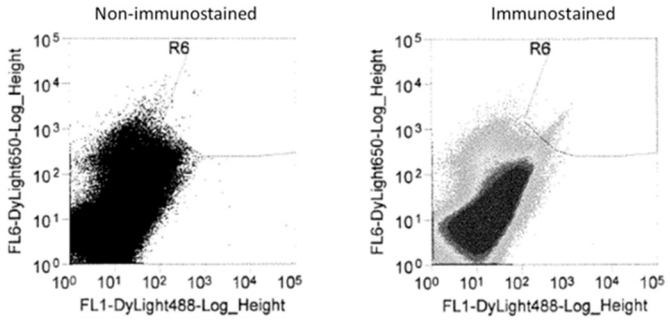


図 3. フローサイトメトリーによる染色した破砕液の解析
非染色クロイソカイメン破砕液（左）と染色したカイメン（右）

3. セルソーターで回収したサンプルの解析

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、シングルセルのプログラムでの回収も行った。また、マニュ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、16S rRNA と 18S rRNA の増幅をそれぞれ行い、PCR 産物の電気泳動、抽出、クローニングを行った。それぞれ複数のプラスミドを抽出・精製し、シーケンサーで解析を行った。各プラスミドの遺伝子配列は Blast（refseq_rna）で解析し、それぞれの生物種の同定を行った。

セルソーターで回収したサンプルを蛍光顕微鏡で観察した（図 4）。Dylight488 の蛍光は FITC の、Dylight650 は Cy5 のフィルターで観察した。観察の結果、Dylight488 および Dylight650 両方の蛍光を示す微生物は少なくとも 2 種類（微生物 A（a）、微生物 B（d））存在することが確認された。微生物 A、微生物 B それぞれゲノムを抽出し 、生物種の特定を行った。結果、微生物 A（可視光：a、488 nm：b、650 nm：c）は子嚢菌 *Paracoccidioides lutzii* と比較的近い（18S rRNA 相同性 95%）真菌であることが明らかとなった。一方、微生物 B（可視光：d、488 nm：e、650 nm：f）は *Bacillus* 属、*Vibrio* 属、*Sphingomonas* 属等の多様なバクテリアから構築されたバイオマットであった。カイメンを破砕する際にバイオマットは様々な大きさに破砕されており、蛍光ビーズを指標に 2.5 ミクロン以下のセルをシングルセル用のプログラムで回収し解析した。結果、バイオマット内で蛍光を示している中心的な細菌は *Vibrio* 属・*Renibacterium* 属であることが確認された。現在、それらバクテリアのゲノム解析を進めている。

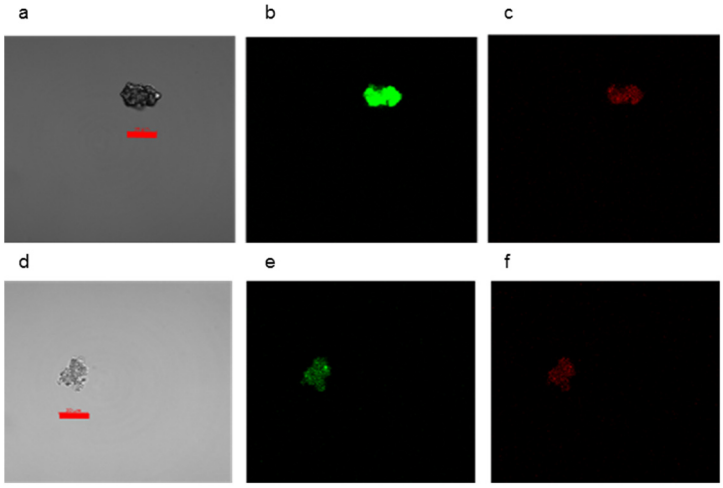


図 4. 蛍光顕微鏡による回収したサンプルの観察

セルソーターで回収した 2 種類の微生物を蛍光顕微鏡で観察した。

微生物 A（可視光：a、488 nm：b、650 nm：c）、

微生物 B（可視光：d、488 nm：e、650 nm：f）

スケールバー：20 μ m

4. 非固定免疫染色

解凍したクロイソカイメン破砕液を NaCl 濃度 3%に調整した PBS で洗浄した。その後 3 分割し、塩濃度、0.9%、2%、3%PBS でそれぞれ懸濁した。免疫染色を行った。以降の、ブロッキングや免疫染色の操作もそれぞれ 0.9%、2%、3%PBS 下で行った。一次抗体はモノクローナル抗オカダ酸抗体で、二次抗体は Dylight488 および Dylight650 を用いた。フローサイトメトリーで解析後に蛍光を示す画分を回収し、複数の培地に塗布して室温で培養を行った。

フローサイトメトリーで解析した結果、蛍光強度の低下は見られるが 3%PBS でも染色画分を確認した。そこで、2%および 3%PBS で免疫染色したサンプルから目的の画分を回収した（図 5）。塩濃度の上昇に対応して蛍光強度が低下しているのは、抗原抗体反応にバッファーの塩濃度が影響したためであり、この結果はサンプルの蛍光が自家蛍光ではなく二次抗体によるものであることを示唆している。また、固定処理を行わずに免疫染色が成功した結果より、抗オカダ酸抗体の抗原物質が、菌体表面にも存在している可能性が示唆された。

回収したサンプルを幾つかの細菌用、真菌用の培地で培養した。結果、真菌の培養に成功し、rRNA を解析した結果微生物 A と同定した。以降、微生物 A を真菌 A と表記する。

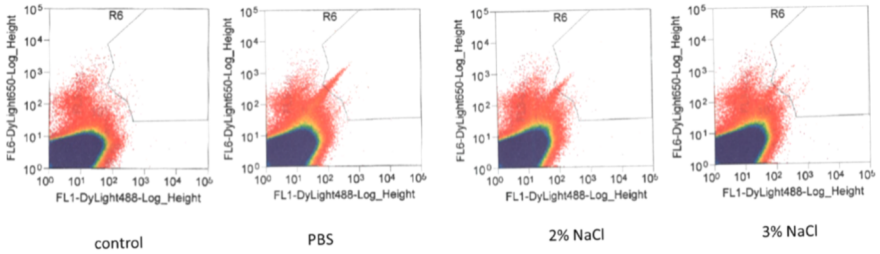


図 5. フローサイトメトリーによる非固定免疫染色した破砕液の解析

5. 真菌 A およびその培養抽出物の免疫染色

真菌 A の培養を行った。菌体の一部を回収し、免疫染色を行いフローサイトメトリーで解析した。結果、コントロール（図 6 左）と比較して、染色した真菌 A は（図 6 右）強い Dylight488 および Dylight650 の蛍光が確認できた。このことから、真菌 A の蛍光が抗オカダ酸抗体に由来するものであることが示された。また、蛍光を示す菌体は全体のごく一部であることも示唆された。一般に真菌や放線菌は形態分化と二次代謝に強い関係があることが知られている。現在、真菌 A の形態と蛍光強度の関係に関して検討を行っている。

実際にどの化学物質が抗体と結合し蛍光を示しているのかを確認することにした。培養液は酢酸エチルで分画した。菌体は 10%メタノール／クロロホルムで抽出した。抽出物は逆相 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 プレートを風乾後、ポリイソブチルメタクリレート含有クロロホルム－ヘキサン混液に浸してプラスチックコーティングを施した。風乾後免疫染色を行った。免疫染色した TLC プレートはフルオロ・イメージアナライザーで解析した（図 7）。解析の結果、2 本の強い蛍光を示すバンドと一本の弱い蛍光を示すバンドが確認された。現在、天然物化学的手法で該当のバンドを構成する物質の同定を進めている。

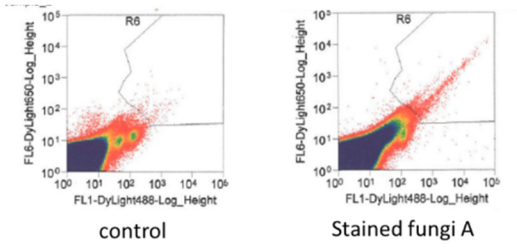


図 6. フローサイトメトリーによる真菌 A の解析

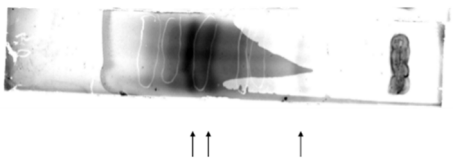


図 7. 真菌 A 抽出物の TLC 解析

6. ゲノムマイニング

回収した真菌Aからゲノムを抽出しポリメラーゼを用いて全ゲノム増幅を行った後、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行った。オカダ酸の生合成に関与すると予想される *polyketide synthase*（*PKS*）遺伝子を対象に探索した結果、*PKS* 遺伝子は 100 bp ほどの断片も含めると 5 つ確認された（表 1）。その内 *PKS4* を含む Contig に関して解析を進めたところ、*PKS4* は 1 型 *PKS* であり図 8 に示すように KS、AT、ACP 等のドメインも確認された。*PKS4* 遺伝子周辺 20 kb を解析した結果、*P450* や他の *PKS* 遺伝子は確認できなかった。また、本遺伝子は *Rasamsonia emersonii* 株の *Lovastain nonaketide synthase* 遺伝子と 35.5%の相同性を示した。そこで *PKS* 遺伝子周辺の構造を比較したが、類似した遺伝子構成は確認できなかった。特に *Lovastain PKS* 遺伝子クラスターは複数の *PKS* 遺伝子から構成されるが、*PKS4* には確認できなかった。今回、シーケンスできた *PKS* 遺伝子の長さはどれも短かった。これは環境中から回収したサンプル由来のため、真菌 A 以外のさまざまなゲノム DNA がコンタミネーションしていたためと考えられる。真菌 A は培養に成功しており、今後培養した菌体から抽出したゲノムを次世代シーケンサーで解析することで全ゲノム解析を行う。

また、微生物 B をゲノム解析した結果、*Renibacterium* 属由来の *PKS* 遺伝子が *P450* を含む多数の酸化還元酵素とクラスターを構成していた。現在、詳細な検討を進めている。

表 1. 真菌 A のゲノム解析結果

	Length (kb)	Identity (%)	
PKS1	0.5	58.7	polyketide synthase (*Botyrytis cinerera*)
PKS2	0.1	86.5	polyketide synthase (*Grosmannia clavigera*)
PKS3	2.9	53.7	polyketide synthase (*Aspergillus sclerotioniger*)
PKS4	7.4	35.5	Lovastatin nonaketide synthase (*Rasamsonia emersonii*)
PKS5	0.5	92.8	polyketide synthase (*Cercospora beticola*)

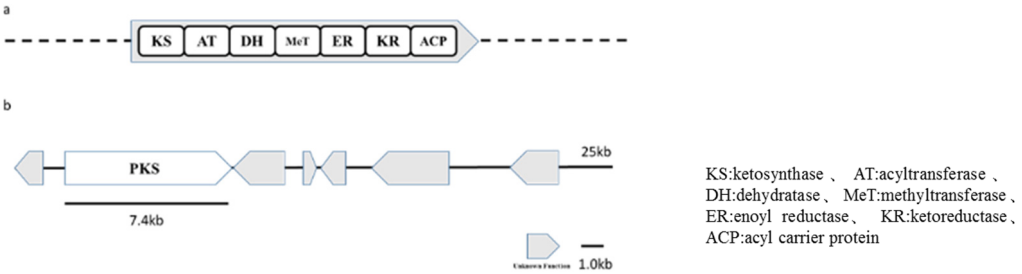


図 8. PKS4 の遺伝子クラスターおよびそのドメイン構成

a) 遺伝子クラスターを構成するドメイン。

b) PKS4 内の遺伝子クラスター。灰色は生合成に関与しない遺伝子。

考 察

近年、遺伝子工学の発達により様々な天然物生合成遺伝子クラスターの解析が進んでいる。一方で、これまで海洋無脊椎動物から単離されてきた有用天然物の中で、生合成経路が明らかになったものは極わずかである。そこで筆者は天然物の特異な構造に着目し、抗原抗体反応を用いて天然物の生物オリジン探索を試みた。結果、クロイソカイメンを対象に抗オカダ酸抗体を用いた免疫染色に成功し、本手法の有効性を確認できた。一方で、抗体には交差性の問題がある。実際、オカダ酸の生物オリジンに関しては 2 種類の微生物が染色された。筆者は回収手法を工夫して、微生物 A の培養に成功し、また微生物 B の回収・同定にも成功しており、それぞれ遺伝子解析を進めている。オカダ酸生物オリジン探索研究で免疫染色法を用いた生物オリジンの探索研究に関して必要な知見を多く得ることが出来た。

現在、筆者はオカダ酸以外にもハリコンドリン B 等の生物オリジン探索研究も進めている。オカダ酸研究によって本手法の有効性を証明することができた。交差性の問題はエピトープの異なる複数の一次抗体を作製することでも克服できると考えている。オカダ酸生物オリジン研究を完結させるとともに、本研究で得られた知見をハリコンドリン B の生物オリジン探索研究に生かしたい。

共同研究者・謝辞

本研究は、神奈川大学天然医薬リード探索研究所および総合理学研究所において、学生諸氏の協力のもと実施された。また、静岡県立大学薬学部渡辺賢二教授および恒松雄太講師と共同で次世代シーケンス解析を進めた。両氏のご協力に深謝する。また、研究費の支援を受けた上原記念生命科学財団に特に感謝申し上げる。

文 献

1) Uemura D. Exploratory research on bioactive natural products with a focus on biological phenomena. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 2010 86 (3): 190-201. DOI:https://doi.org/10.2183/pjab.86.190

2) Hirata Y, Uemura D. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. Pure Appl. Chem. 1986 58(5): 701-710. DOI: http://dx.doi.org/10.1351/pac198658050701

3) Uemura D, Han C, Hanif N, Inuzuka T, Maru N, Arimoto H. Recent insights into natural venoms. Pure Appl. Chem. 2012 84(6): 1297-1315. DOI: https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-09-32

4) Uemura D, Kawazoe Y, Inuzuka T, Itakura Y, Kawamata C, Abe T. Drug leads derived from Japanese marine organisms. Curr. Med. Chem. 2020 27: 1-14 DOI: 10.2174/0929867326666191022125851