

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19570063	
研究課題名 (和文)	シーケンスキャプチャー法による生理活性ペプチド遺伝子の効率的なクローニング
研究課題名 (英文)	Molecular cloning of cDNAs encoding bioactive peptides by the sequence capture method
研究代表者	岩室 祥一 (IWAMURO SHAWICHI) 東邦大学・理学部・准教授 研究者番号:70221794

研究成果の概要：

本研究では、両生類の皮膚から抗菌性のペプチドの単離を行なうとともに、その効率的な遺伝子クローニング法の開発を行なった。その結果、日本産の数種類のカエルから有用な抗菌ペプチド及びその配列を多数見つけ出すとともに、抗菌ペプチド遺伝子の発現には甲状腺ホルモンが重要であることを示した。また、ヒストン H2B という本来は細胞の核にあるタンパク質がカエルの皮膚から得られていることに基づき、その抗菌メカニズムを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：動物形態

1. 研究開始当初の背景

抗菌ペプチドは、微生物から哺乳類、さらには植物までの広い範囲の生物に存在する先天的な一次防御機構の一つであり、病原性微生物から宿主を守る上で、極めて重要な役割を果たしている。抗菌ペプチドの活性はペプチドの総正電荷数や α -ヘリックス、 β -シートなどの二次構造に依存するため、抗生物質と比べて耐性菌を生じにくいことから、医薬品への応用面で非常に注目が集まっている。中でも両生類の皮膚抗菌ペプチドは構造及び機能の上で多様性に富み、世界各地のカエ

ルからその単離が試みられている。代表者らは本研究開始当初の段階で、8種いる日本固有 *Rana* 属カエル種のうち7種から皮膚抗菌ペプチドを単離し、論文報告したが、その過程において、抗菌ペプチドをカエルの皮膚から単離するにはかなりの個体数を要することから、遺伝子クローニングを主体に、塩基配列レベルから有用な抗菌ペプチド様配列を探索する方法の重要性を痛感した。加えて、世界中のカエルから積極的に抗菌ペプチドが探索されている一方で、その分泌や合成を調節する機構はあまり解析されておらず、生

物学的解析が必須である状況にあった。

2. 研究の目的

両生類の抗菌ペプチドは前駆体タンパク質からプロセッシングと翻訳後修飾を受けて生じる。前駆体タンパク質は N 末端側からシグナルペプチド、介在配列、抗菌ペプチドの3つのドメインが並ぶ構造であり、シグナルペプチド領域のアミノ酸配列は前駆体タンパク質間で非常に高く保存されている。この特徴は抗菌ペプチド前駆体タンパク質の mRNA やゲノム DNA の特異的な選別を可能とすることから、本研究は以下に挙げる2点を主たる目的とした。

(1)両生類の抗菌ペプチド遺伝子に特徴的な塩基配列（シークエンス）を利用し、そのシークエンスを有する cDNA やゲノム DNA にターゲットを絞って選別する方法を開発し、抗菌ペプチド遺伝子を効率的に増幅する。

(2)8種いる日本固有 Rana 属のうち唯一抗菌ペプチドの単離が試みられていなかったチョウセンヤマアカガエル、及び樹上棲カエルの代表的存在であるニホンアマガエルの皮膚から、抗菌ペプチドを単離する。

さらに、上記目的を遂行して行く上で重要となった以下の3点も目的とした。

(3)これまでに単離した抗菌ペプチド遺伝子についてその発現を調節する因子を探求する。

(4)カエル以外の動物の抗菌ペプチド cDNA のクローニングを行なう。

(5)代表者らが以前に報告したシュレーゲルアオガエルの皮膚抗菌物質としてのヒストン H2B について、遺伝子組換えによりタンパク質を作製し、その抗菌メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

上記2の各研究目的に即した研究方法を以下のように設定した。

(1)抗菌ペプチド前駆体タンパク質間で保存的な配列を基に、PCR 用プライマーをデザインし、RT-PCR 法並びに 3' -RACE 法により特定のシークエンスをもつ mRNA を捕獲し、カエル皮膚より抗菌ペプチド cDNA を増幅する。塩基配列の解析により新規の抗菌ペプチド様配列が得られたら、ペプチド合成を行ない、微量液体希釈法により抗菌活性を測定する。また、プライマーと同じ配列を有するオリゴ

DNA を磁気ビーズに結合し、カエル血球細胞より得た DNA とハイブリダイゼーションさせる。磁石を用いて磁気ビーズに結合した DNA を回収し、これを鋳型に、cDNA の塩基配列を基に作製したプライマーを用いて抗菌ペプチドのゲノム DNA をクローニングし、配列を決定する。

(2)チョウセンヤマアカガエルとニホンアマガエルの皮膚を凍結乾燥した後、タンパク質を粗抽出し、数種類のカラムを用いた HPLC 法で抗菌ペプチドを単離し、アミノ酸配列と質量を決定するとともに、グラム陰性菌と陽性菌に対する抗菌活性と哺乳類の細胞に対する毒性を測定する。

(3)両生類の皮膚構造は変態の前後で大きく様相が異なり、抗菌ペプチドを合成・分泌する皮膚腺は変態に伴い発達して来る。そこでヤマアカガエルとタゴガエルの皮膚 Total RNA を発生段階ごとに採取し、半定量的 RT-PCR 法により、抗菌ペプチド mRNA の発現量を解析するとともに、変態に重要な役割を果たしている甲状腺ホルモンの影響を検証する。

(4)ニワトリ並びにウズラの血球系/免疫系組織に着目し、骨髄・肺・ファブリキウス嚢等より Total RNA を抽出し、抗菌ペプチド Cathelicidin に特異的なプライマーを作製して、RT-PCR法により cDNA の増幅を試みる。

(5)マルトース結合タンパク質と融合したシュレーゲルアオガエルのヒストン H2B 組換え体タンパク質 (MBP-H2B) を作製し、抗大腸菌作用を検証する。

4. 研究成果

(1)ヤマアカガエル、タゴガエル、ナガレタゴガエル、ニホンアカガエル、リュウキュウアカガエル、ツシマアカガエルからそれぞれ数種類の抗菌ペプチド前駆体の cDNA をクローニングした。一部についてはすでに論文発表し、残りについては学会発表を行なっている。なお、その数は現在も増加中である。また、ヤマアカガエルとタゴガエルの抗菌ペプチド Temporin について、全長或いは部分的なゲノム DNA をクローニングし、塩基配列を決定した。特にプロモーター領域を中心に配列を解析したところ、NF-IL6 や GATA-1 など、感染や炎症に関連する転写因子と結合する配列が頻出することを見つけ、国際学会等で発表している。

(2)チョウセンヤマアカガエルから数種類の抗菌ペプチドを単離し、アミノ酸配列と質量を決定するとともに、回収量が十分であった

ペプチドについては抗菌活性を測定した。また、同様の方法を用いてニホンアマガエルの皮膚からの抗菌ペプチドの単離を試みたが、抗菌活性を有する画分は得られず、細胞溶解性を示すタンパク質を得た。部分的なアミノ酸配列の決定と質量分析の結果から非修飾型のヒストン H4 であることが示唆されたので、遺伝子クローニングにより、その配列を決めた。このとき、ニホンアマガエルのヒストン H4 mRNA はこれまでに報告されているヒストン H4 の 3' -UTR のコンセンサス配列と大きく異なることが明らかになった。成果はそれぞれ論文発表を行なった。

(3)(1)において cDNA クローニングしたヤマアカガエルの Temporin とタゴガエルのハチ毒メリチン様ペプチド (MRP) について、変態の進行に依存して皮膚における mRNA の発現量が増加することを検出し、さらにヤマアカガエルの Temporin mRNA は甲状腺ホルモンにより発現促進することを確認した。成果はそれぞれ論文発表を行なった。

(4)ニワトリのファブリキウス嚢由来の培養細胞から Cathelicidin-B1 の cDNA を、またウズラ骨髄から Fowlicidin-1, -2, -3 の cDNA をクローニングした。現在、cathelicidin-B1 の特異的抗体を作製するとともに、培養細胞からの cathelicidin-B1 の単離を目指している。成果の一部は学会発表を、またこれに関連する事象について論文発表を行なった。

(5)シュレーゲルアオガエルのヒストン H2B cDNA を用いて組換え体 MBP-H2B を作製し、ヒストン H2B の抗菌活性のメカニズムの解析を行なった。その結果、大腸菌は外膜のプロテアーゼでヒストン H2B を断片化するがその断片は大腸菌の細胞膜を透過し、細胞内の核酸と結合することで抗菌活性を示すこと、この透過する断片はヒストン H2B の N 末端側であること、また外膜プロテアーゼを持たない大腸菌に対しても細胞壁に結合し抗菌性を示すことを明らかにするとともに、シュレーゲルアオガエルの皮膚腺の一部細胞の細胞質にヒストン H2B が局在し、皮膚腺の収縮により体外に分泌されること、などを明らかにした。成果については論文発表を行なった。

(6)抗菌ペプチドも含め、両生類を用いた研究全般の面白さを伝えるため、代表者と分担者である菊山がオーガナイザーとなって、18 年度の日本動物学会第 78 回大会において、「両生類はワンダーランド」というシンポジウムを開催した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 10 件、すべて査読付)

- 1) Ohnuma A, Conlon JM, Iwamuro S. Developmental and thyroid hormone induced expression of preprotemporin genes in the skin of Japanese mountain brown frog *Rana ornativentris*. *Annals NY Acad Sci*, 2009, in press.
- 2) Conlon JM, Iwamuro S, King JD. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. *Annals NY Acad Sci*, 2009, in press.
- 3) Kobayashi T, Takaso A, Tanaka S, Amano M, Takahashi A, Iwamuro S, Machida, T. Demonstration of the proopiomelanocortin signalling system in the primary immune organ, the bursa of Fabricius, of the quail. *Annals NY Acad Sci*, 2009, in press.
- 4) Kawasaki H, Iwamuro S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infectious Disorder-Drug Targets* 8, 195-205, 2008.
- 5) Kawasaki H, Koyama T, Conlon JM, Yamakura F, Iwamuro S. Antimicrobial action of histone H2B in *Escherichia coli*: evidence for membrane translocation and DNA-binding of a histone H2B fragment after proteolytic cleavage by outer membrane proteinase T. *Biochimie* 90, 1693-1702, 2008.
- 6) Koyama T, Iwamuro S. Molecular cloning of a cDNA encoding atypical antimicrobial and cytotoxic brevinin-1Ja from the skin of the Japanese brown frog, *Rana japonica*. *Zool Sci* 25, 487-491, 2008.
- 7) Kawasaki H, Iwamuro S, Goto Y, Nielsen Per F, Conlon JM. Characterization of a hemolytic protein, identified as histone H4, from the skin of the Japanese tree frog *Hyla japonica* (Hylidae). *Comp Biochem Phys B* 149, 120-125, 2008.
- 8) Suzuki H, Conlon JM, Iwamuro S. Evidence that the genes encoding the melittin-related peptides in the skins of the Japanese frogs *Rana sakuraii* and *Rana tagoi* are not orthologous to bee venom melittin genes: developmental- and tissue-dependent gene expression. *Peptides* 28, 2061-2068, 2007.
- 9) Conlon JM, Kokodziejek J, Nowotny N, Leprince J, Vaudry H, Coquet L, Jouenne T, Iwamuro S. Cytolytic peptides belonging to the brevinin-1 and brevinin-2 families isolated from the skin of the Japanese brown frog, *Rana dybowskii*. *Toxicon* 50, 746-756, 2007.
- 10) Hayashi H, Nishimoto A, Oshima N, Iwamuro S. Expression of the estrogen

receptor a gene in the anal fin of Japanese medaka, *Oryzias latipes*, by environmental concentrations of bisphenol A. J Toxicol Sci 32, 91-96, 2007.

〔学会発表〕(計 17 件、うち国際学会 3 件)
国際学会

- 1) Iwamuro S, Oeda S, Miyazaki N, Conlon JM, Ohnuma A. Molecular cloning and developmental expression of genes encoding antimicrobial peptide precursors in *Rana ornativentris*. The 24th Conference of European Comparative Endocrinologists 2008, Genoa, Italy, 1-6 Sept, 2008, Centro Congressi Magazzini del Cotone.
- 2) Kobayashi T, Takaso A, Tanaka S, Amano M, Takahashi A, Iwamuro S, Machida T. Identification of Des-acetyl-alpha-melanocyte-stimulating hormone in the quail bursa of Fabricius. The 24th Conference of European Comparative Endocrinologists 2008, Genoa, Italy, 1-6 Sept, 2008, Centro Congressi Magazzini del Cotone.
- 3) Conlon JM, Iwamuro S. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in amphibians. The 24th Conference of European Comparative Endocrinologists 2008, Genoa, Italy, 1-6 Sept, 2008, Centro Congressi Magazzini del Cotone.

国内学会

- 1) 秋葉貴久、安藤麻理、Conlon JM、岩室祥二。対馬産*Rana*属皮膚抗菌ペプチドの遺伝子クローニング。日本動物学会関東支部第 61 回大会、2009 年 3 月 20 日、埼玉大学。
- 2) 小西健司、蓮沼至、小林哲也、岡田令子、中野真樹、白間一彦、菊山榮、岩室祥一。ウシガエルハダ腺における抗菌ペプチド遺伝子の発現。日本動物学会関東支部第 61 回大会、2009 年 3 月 20 日、埼玉大学。
- 3) 宮崎希、太枝志帆、竹山留美子、大沼彩、岩室祥一。ゲノム情報から両生類抗菌ペプチド遺伝子の発現調節機構を探る。日本動物学会関東支部第 61 回大会、2009 年 3 月 20 日、埼玉大学。
- 4) 丸橋佳織、岩室祥一。無尾目両生類皮膚腺の形態学的解析。日本動物学会関東支部第 61 回大会、2009 年 3 月 20 日、埼玉大学。
- 5) 椿 卓、小林哲也、稲嶺由羽、菊山榮、岩室祥一。鳥類血球系及び免疫系からの Cathelicidin 遺伝子のクローニング。日本動物学会関東支部第 61 回大会、2009 年 3 月 20 日、埼玉大学。
- 6) 岩室祥一、川崎広明、山倉文幸、Conlon JM. : ヒストン H2B の抗大腸菌作用機序の解

析。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 10 日、神戸国際展示場。

- 7) 岩室祥一、太枝志帆、鈴木啓恵、大沼彩。両生類皮膚抗菌ペプチドの遺伝子発現とその甲状腺ホルモンによる関与。第 33 回日本比較内分泌学会大会、2008 年 12 月 4 日、広島大学。
- 8) 岩室祥一、小山卓己。ニホンアカガエル新規抗菌ペプチド Brevenin-1Ja。第 60 回日本動物学会関東支部大会、2008 年 3 月 22 日、東京大学。
- 9) 小山卓己、岩室祥一。ニホンアカガエル抗菌ペプチドの遺伝子クローニングとその解析。第 60 回日本動物学会関東支部大会、2008 年 3 月 22 日、東京大学。
- 10) 岩室祥一。微生物を撃て！ -カエルの抗菌ペプチド。日本動物学会第 78 回大会シンポジウム「両生類はワンダーランド」、2007 年 9 月 22 日、弘前大学。
- 11) 大沼彩、鈴木啓恵、Conlon JM、岩室祥二。ヤマアカガエル抗菌ペプチドの遺伝子クローニングとそのステージ依存的な発現。日本動物学会第 78 回大会、2007 年 9 月 20 日、弘前大学。
- 12) 川崎広明、Conlon JM、小林哲也、岩室祥一。組換え体ヒストン H2B の抗大腸菌作用機構。日本動物学会第 78 回大会、2007 年 9 月 20 日、弘前大学。
- 13) 小山卓己、Conlon JM、岩室祥一。ニホンアカガエル由来抗菌ペプチド Japonicin の遺伝子クローニング及び局在解析。日本動物学会第 78 回大会、2007 年 9 月 20 日、弘前大学。
- 14) 太枝志帆、大沼彩、竹山留美子、Conlon JM、岩室祥一。アカガエル属抗菌ペプチド Temporin の遺伝子解析。日本動物学会第 78 回大会、2007 年 9 月 20 日、弘前大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩室 祥一 (IWAMURO SHAWICHI)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：70221794

(2) 研究分担者

菊山 榮 (KIKUYAMA SAKAE)
早稲田大学・教育・総合科学術院・名誉教授
研究者番号：20063638

小林 哲也 (KOBAYASHI TETSUYA)
埼玉大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：00195794

(3) 連携研究者

なし