

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23102004

研究課題名（和文）オミクス技術による生理活性化合物の生物学的評価

研究課題名（英文）Evaluation of biological activities of natural ligands by the use of omics technology

研究代表者

渡辺 肇（Watanabe, Hajime）

大阪大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80212322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,300,000円

研究成果の概要（和文）：天然物リガンドおよび超活性単純化アナログの評価を様々なレベルで行うために、培養細胞やマウスやDaphniaに天然物リガンド等の投与を行い、これら化学物質の生物活性について、DNAマイクロアレイを用いたゲノミクス解析などを用いて評価し、リガンドの標的遺伝子を導入し可視化可能にしたトランスジェニック動物を作製し、効率的なリガンドの評価系の構築を行った。

研究成果の概要（英文）：Cultured cells, mice and daphnia were exposed to natural ligands and expressed RNAs were analyzed. Based on the transcriptome profiles, biological activities of the natural ligands were evaluated. To facilitate the evaluation, transgenic animals that can visualize these ligand activities were also established.

研究分野：分子生物学

キーワード：オミクス 天然物リガンド トランスジェニック動物

1. 研究開始当初の背景

天然物リガンドの多くは生体内での標的分子や作用機構については十分な理解がされないまま残されてきているが、高機能な化合物の開発には標的分子および作用機構の理解が不可欠である。一方で、近年のオミクス解析技術の発展により、生体内での応答を遺伝子発現レベルから評価することが可能になってきた。そこでこのオミクス技術を天然物リガンドの生物学的な評価、作用機構の解明および超活性単純化アナログの評価に適用することにより、新規アッセイ法の開拓を行うこととした。

2. 研究の目的

本領域では、天然物リガンド(天然物有機化学)をもとに超活性単純化アナログ(有機合成化学)の創製を目指している。この一連の過程において、本研究の目的はトランスクリプトミクスをはじめとするオミクス技術を用いることにより、本来の天然物リガンドおよびこれをもとに創出した超活性単純化アナログの生物活性を的確に評価し、さらに評価のためのその方法論を開発することにある。申請者は培養細胞やマウス、微小甲殻類(Daphnia)を対象として、遺伝子情報を含む網羅的な解析(オミクス解析)を通じて化学物質の生物影響解析を手がけてきている。天然物リガンドおよび超活性単純化アナログの評価を個体レベルで行うために、培養細胞やマウスや Daphnia に天然物リガンド等の投与を行い、これら化学物質の生物活性について、DNA マイクロアレイを用いたゲノミクス解析などを用いて評価する。これにより天然物リガンドの分子標的の妥当性を検証すると同時に、新たに設計された超活性単純化アナログの生物活性と比較検討を行い、その評価を行う。必要に応じてメタボロミクスなどのオミクス技術も導入し、一連のオミクス解析を統合することにより、効率的な評価法の確立を目指す。特に新たな超活性単純化アナログを創製した場合には、目的とした生物活性が維持されていることを確認するだけでなく、想定外の機能が付加されていない点などを検証する必要がある。一般に想定外の影響を評価することは困難であるが、網羅的な解析を得意とするオミクス技術を利用しフィードバックすることにより、本来の目的とは異なる影響を含めて一連の解析・評価が可能となる。したがって本研究により、天然物有機化学と有機合成化学を生物活性の観点から結びつけることが可能となり、従来にない効率的な化学物質を創製するための新たなツールとなりえる。

3. 研究の方法

天然物リガンドをはじめとする生理活性化合物について生物学的評価を行うために、いくつかのモデル化合物と対象生物を設定した。生理活性物質としては、(1)心不全やガンに有効性のあるキノン誘導体、(2)モデル化合物としては生理活性がよく知ら

れており、標的となる受容体もよく知られているホルモンの1つであるエストロゲンと人工的に開発されたエストロゲンであるジエチルstilbestrol、(3)セスキテルペンおよび類似化合物を選択した。生物学的評価を行うための対象生物としては、ヒト由来の培養細胞、マウスおよび化学物質等に感受性の高い微小甲殻類(Daphnia)を用いた。

基本的には、モデルとなる生理活性化合物等を培養細胞、マウスまたは微小甲殻類に投与し、指標とする組織における影響についてDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の解析から評価した。特に継時的な変化を解析することにより、一連の遺伝子発現変化の誘起に重要な働きを担っている因子について明らかにした。単に生理活性化合物の直接的な標的分子を明らかにするだけでなく、その後発現が誘起される一連の遺伝子について解析・評価することで、生理活性化合物の全体的な評価をめざした。

微小甲殻類(Daphnia)は昆虫とも近縁で哺乳類とは大きく異なる生体システムを有していることから、マウスなどでは見出しにくい化合物の影響を見出せる可能性があり、生理活性化合物を総合的に評価するために、評価系への導入を試みた。一方で、この微小甲殻類(Daphnia)については、遺伝子操作技術が開発されたばかりの状態であり、生理活性物質の最終的な作用点を明らかにするために必要な遺伝子改変技術が十分ではなかった。天然物リガンドのターゲットを検証するためにも、この微小甲殻類(Daphnia)についての遺伝子操作技術の開発とリガンドの評価系の構築を目指すこととした。こうした系を構築できれば、すべての評価をオミクスに依存せずに簡便な評価系を構築できる可能性が開ける。

共同研究では、セスキテルペンおよび類似化合物における生理活性の評価を行う。セスキテルペンの一部の構造は微小甲殻類において特徴的な影響を示すことから、ゲノミクスによるアプローチにあわせて個体レベルでの評価も行い、総合的な評価を目指した。

4. 研究成果

生理活性化合物の in vivo における評価を行うために、マウスや培養細胞を用いて生理活性化合物の投与を行い、その影響についてDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の解析から評価した。共同研究による一連の解析では心不全やガンに有効性のあるキノン誘導体が同時に有する無果粒球症について、主としてヒト培養細胞を用いてその作用メカニズムについて解析した。キノン誘導体をビーズに固定化し、標的分子を同定したところ、Valosin-containing Protein が結合することが明らかになった。一方で遺伝子発現プロファイルを解析したところ、NF- κ B により転写が促進されるはずの TNF- α 遺伝子などの活性化が誘導されていないことが明らかになった。一連の解析からこのキノン誘導体

は Valosin-containing Protein に結合し、Valosin-containing Protein が有する本来の活性、I B の分解を阻害することが明らかになった。I B は通常 TNF などの刺激によりリン酸化を受けた後に、ユビキチン化されプロテアソームで分解される。I B は NF B の活性を阻害しているために、この分解により NF B が活性化されることになる。Valosin-containing Protein はこの I B がプロテアソームで分解される際の重要な因子となっているが、興味深いことにキノン誘導体が結合した Valosin-containing Protein は、ユビキチン化された I B をプロテアソームへ運び込むことができなくなることが明らかになった。その結果、I B は TNF などの刺激にもかかわらず分解されずに残り、NF B の活性化が阻害され、TNF 遺伝子をはじめとする一連の遺伝子発現の活性化が起きないことが明らかになった。これはビーズを用いて標的分子を同定し、さらに転写プロファイルからその機能について明らかにした1つの例となる。この研究から心不全やガンに対して有効性を示す場合と、無果粒球症を誘発する場合とでその作用メカニズムが異なり、標的分子も異なることが示唆されたことから、今後このキノン誘導体の開発において、副作用の少ない設計の指針となることが期待される。このキノン誘導体の解析では、アフィニティ精製した標的分子とトランスクリプトミクス解析から推定される作用点から、整合性のある作用メカニズムを明らかにすることができた。こうした成果はまだすべての天然物リガンドにも適用できるというわけではなく、重要な成果ではあるが、同時に多数の天然物リガンドに対しても同様のアプローチを可能にするために、総合的な知見の集積が望まれる。

また幅広く生理活性を評価するために、異なった生体システムを有する微小甲殻類である Daphnia も対象として、個体レベルとゲノミクスレベルの双方からの評価系の構築を進めている。個体レベルの評価系と特に微小プレート上で個体レベルの生理活性評価を行うためのシステムの構築を進めている。

また人工生理活性化合物の in vivo における評価を行うために、エストロゲンとして知られるジエチルstilbestrol をモデル生理活性化合物として選択肢、新生仔期のマウスに投与を行い、その長期的な影響について、雌性生殖器官をはじめとして指標とする組織における影響について解析した。DNA マイクロアレイを用いた組織化学的な解析に加え遺伝子発現変化の解析から評価したを行うことにより、エストロゲン様活性の総合的な評価を行った。特に新生仔期から成体までの継時的な変化を解析することにより、一連の遺伝子発現変化の誘起に重要な働きを担っている関連する因子について明らかにした。単に生理活性化合物の直接的な標的分子を明らかにするだけでなく、その後

発現が誘起される一連の遺伝子についてその変動を解析・評価することで、生理活性化合物の全体的な評価を可能にした長期的な影響について評価できる可能性を示したさらに生理活性化合物の長期的な影響を評価するためのモデルとして、幼若期にエストロゲンの投与を行い、成熟期に至るまでの影響について解析した。その結果、成熟期においてもエストロゲンの受容体が活性化されている可能性を見出した。本来はリガンドの存在下のみで活性化されるはずの受容体が、リガンド非存在下でも活性化されている可能性を示しており現在、詳細な検討を進めている。これは、生理活性化合物の効果を生物のライフサイクルを通じて総合的に評価するための重要な指針となると思われる。加えてマウスにおいてステロイド骨格を有する化学物質応答してレポーター遺伝子の発現が誘導されるトランスジェニックマウスを導入し、ゲノミクス解析と統合した解析を行う基盤を構築した。

さらにセスキテルペンの誘導体については、微小甲殻類(Daphnia)を対象として応答を解析し、遺伝子発現変化に及ぼす影響およびその表現型について解析を進めた。この Daphnia については遺伝子編集技術の開発を行い、トランスジェニック個体を作製し、リガンド依存的な遺伝子応答を可視化するための技術開発もおこなった。一連の解析の中で、methoprene resistance と呼ばれる遺伝子がセスキテルペン誘導体に対する応答に関して重要な機能をしていることが明らかになり、この methoprene resistance 遺伝子の産物とセスキテルペンの結合を検知するトランスジェニック個体も作製し、解析を続けている。微小甲殻類の遺伝子編集技術の開発は世界で初めての例であり、天然物リガンドの評価への利用をふくめて前例がない。個体を簡単に維持でき殖やせること、リガンドに対して高感度に応答する可能性もあることから、今後さらに汎用されることが期待される。

【今後の課題・展望】

天然物リガンドをはじめとする種々の生理活性物質の評価において、遺伝子レベルから解析することは重要であり、その作用メカニズムの解明にもつながることが示された。一方でトランスクリプトミクス解析を実施するには時間と労力を要することも確かである。リガンドの標的がある程度明らかになってきた場合には、リガンドの標的遺伝子の動きを可視化できるようなトランスジェニック個体を利用するのも有効な方法である。本研究では、こうした可視化用の遺伝子をマウスや微小甲殻類に導入をして、リガンドの生理活性評価の効率化を進めてきたが、今後これらの技術を効率的に発展させることにより、天然物リガンドをはじめとして種々の生理活性物質や化学物質の効果を効率的に

評価できることが期待できる。近年、胎児期、乳幼児期の栄養環境等が、後々の成人期や老年期の生活習慣病、糖尿病などの種々の疾患の原因となっている可能性が示唆される中、本研究の成果、すなわち転写カスケードの解析からの生理活性化化合物評価法、およびモデル生理活性化化合物を用いた長期的影響評価法については、エストロゲン様化学物質を新生仔期のマウスに曝露した際に成体に誘起される一連の現象は、格好のモデルとなるものであり、単に生理活性化化合物の活性評価にとどまらず、長期的な視野にたつて生理活性物質を評価するための有用な指針となる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

Peerakietkhajorn S, Kato Y, Kasalicky V, Matsuura T, Watanabe H (2016) Betaproteobacteria Limnohabitans strains increase fecundity in the crustacean *Daphnia magna*: symbiotic relationship between major bacterioplankton and zooplankton in freshwater ecosystem. *Environ Microbiol* (in press)

Suzuki A, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H (2015) Growth evaluation method by live imaging of *Daphnia magna* and its application to the estimation of an insect growth regulator. *J Appl Toxicol* 35: 68-74

Peerakietkhajorn S, Tsukada K, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H (2015) Symbiotic bacteria contribute to increasing the population size of a freshwater crustacean, *Daphnia magna*. *Environ Microbiol Rep* 7: 364-372

Nakanishi T, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H (2015) TALEN-mediated homologous recombination in *Daphnia magna*. *Sci Rep* 5: 18312

Naitou A, Kato Y, Nakanishi T, Matsuura T, Watanabe H (2015) Heterodimeric TALENs induce targeted heritable mutations in the crustacean *Daphnia magna*. *Biol Open* 4: 364-369

Uyeda A, Watanabe T, Kato Y, Watanabe H, Yomo T, Hohsaka T, Matsuura T (2015) Liposome-based in vitro evolution of aminoacyl-tRNA synthetase for enhanced pyrrolysine derivative incorporation. *Chembiochem* 16: 1797-1802

Torner K, Nakanishi T, Matsuura T, Kato Y, Watanabe H (2014) Optimization of mRNA design for protein expression in the crustacean *Daphnia magna*. *Mol Genet Genomics*

Nakanishi T, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H (2014) CRISPR/Cas-Mediated Targeted Mutagenesis in *Daphnia magna*. *PLoS One* 9: e98363

Asada M, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H

(2014) Early Embryonic Expression of a Putative Ecdysteroid-Phosphate Phosphatase in the Water Flea, *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae). *J Insect Sci* 14: 181

Asada M, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H (2014) Visualization of ecdysteroid activity using a reporter gene in the crustacean, *Daphnia*. *Mar Environ Res* 93: 118-122

Toyota K, Kato Y, Miyakawa H, Yatsu R, Mizutani T, Ogino Y, Miyagawa S, Watanabe H, Nishide H, Uchiyama I, Tatarazako N, Iguchi T. (2014) Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*, *J Appl Toxicol.*, May;34(5):537-44.

Soga H, Fujii S, Yomo T, Kato Y, Watanabe H, Matsuura T (2014) In vitro membrane protein synthesis inside cell-sized vesicles reveals the dependence of membrane protein integration on vesicle volume. *ACS Synth Biol* 3: 372-379

Toyota, K., Kato, Y., Sato, M., Sugiura, N., Miyagawa, S., Miyakawa, H., Watanabe H, Oda, S., Ogino, Y., Hiruta, C., Mizutani, T., Tatarazako, N., Paland, S., Jackson, C., Colbourne, J. K., and Iguchi, T. (2013) Molecular cloning of doublesex genes of four cladocera (water flea) species, *BMC Genomics* 14, 239.

Toyota, K., Kato, Y., Miyakawa, H., Yatsu, R., Mizutani, T., Ogino, Y., Miyagawa, S., Watanabe H, Nishide, H., Uchiyama, I., Tatarazako, N., and Iguchi, T. (2013) Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*, *J Appl Toxicol.* 34: 537-544

Hotta, K., Nashimoto, A., Yasumura, E., Suzuki, M., Azuma, M., Iizumi, Y., Shima, D., Nabeshima, R., Hiramoto, M., Okada, A., Sakata-Sogawa, K., Tokunaga, M., Ito, T., Ando, H., Sakamoto, S., Kabe, Y., Aizawa, S., Imai, T., Yamaguchi, Y., Watanabe H., and Handa, H. (2013) Vesnarinone suppresses TNF α mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein, *Mol Pharmacol* 83, 930-938.

Kato, Y., Matsuura, T., and Watanabe H (2012) Genomic integration and germline transmission of plasmid injected into crustacean *Daphnia magna* eggs, *Plos One* 7, e45318.

Tazaki, J., Jinnai, T., Tada, T., Kato, Y., Makiyama, T., Ikeda, T., Yamane, K., Naruse, Y., Takahashi, K., Watanabe H., Kimura, T., and Horiuchi, H. (2012) Prediction of clopidogrel low responders by a rapid CYP2C19 activity test, *J Atheroscler Thromb* 19, 186-193.

Taylor, J. A., Richter, C. A., Suzuki, A.,

Watanabe H., Iguchi, T., Coser, K. R., Shioda, T., and vom Saal, F. S. (2012) Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells, *Plos One* 7, e48311.

Nakamura, T., Miyagawa, S., Katsu, Y., Watanabe H., Mizutani, T., Sato, T., Morohashi, K., Takeuchi, T., Iguchi, T., and Ohta, Y. (2012) Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice, *Toxicology* 296, 13-19.

Kakuta, H., Tanaka, M., Chambon, P., Watanabe H., Iguchi, T., and Sato, T. (2012) Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice, *Reprod Toxicol* 33, 35-44.

Kato, Y., Shiga, Y., Kobayashi, K., Tokishita, S., Yamagata, H., Iguchi, T., and Watanabe H. (2011) Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*, *Dev Genes Evol* 220, 337-345.

Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe H., and Iguchi, T. (2011) Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway, *PLoS Genet* 7, e1001345.

Taneda, T., Zhu, W., Cao, Q., Watanabe H., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Wada, T. (2011) Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through gata1 gene regulation, *Genes Cells* 16, 231-242.

Oda, S., Kato, Y., Watanabe H., Tatarazako, N., and Iguchi, T. (2011) Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog, *Environ Toxicol Chem* 30, 232-238.

[学会発表](計25件)

Hitoshi Kumagai, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime WATANABE Use of the bicistronic expression involving viral T2A peptide in *Daphnia magna* 第63回日本生態学会大会 2016年3月20日~2016年3月24日 仙台国際センター(宮城・仙台)

Yasuhiko KATO, Takashi NAKANISHI, Tomoaki MATSUURA, Hajime WATANABE Development of transgenic *Daphnia* Pacificchem 2015 2015年12月15日-20日 ハワイ(米国)

Takashi Nakanishi, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Efficient DNA integration into germ line genome via

TALEN in *Daphnia magna* Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 2015年11月17日-1月20日 奈良(奈良)

Syafiqah Ishak, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Analysis of Transcription Activation of the Environmental Sex Determining Gene Doublesex1 in *Daphnia magna* 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日-2月4日 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe An lncRNA regulates an environmental sex determination in *Daphnia magna* 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日-2月4日 神戸国際会議場(兵庫・神戸) 招待講演

Nur Izzatur Binti Ismail, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Eye Color Gene Scarlet as a Visible Marker for *Daphnia magna* Transgenesis 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日-12月4日 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

Hitoshi Kumagai, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Use of the bicistronic expression involving viral T2A peptide in *Daphnia magna* 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日~2015年12月4日 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

岡村昂典、渡邊肇、松浦友亮 ジャイアントリポソーム内無細胞翻訳系を用いたヒト由来トランスポーターLetm1の合成およびその脂質依存性 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日-12月4日 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

太田直樹、渡邊肇、松浦友亮 リポソーム内タンパク質合成系へのSectoransロコンの再構成による膜タンパク質局在の効率化 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日~2015年12月4日 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe A long noncoding RNA regulates a sex-determining gene doublesex1 in the crustacean *Daphnia magna* EMBL Symposia "Noncoding Genome" 2015年10月18日-10月21日 ハイデルベルグ(ドイツ)

Takashi Nakanishi, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe Efficient DNA integration into germ line genome via programmable nucleases in *Daphnia magna* Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program "GENOME ENGINEERING: THE CRISPR/CAS REVOLUTION" 2015年9月24日-9月27日 コールドスプリングハーバー(米国)

渡邊肇 ミジンコの生殖戦略 単為生殖から有性生殖への転換点の解析 日本動物学会第86回大会 2015年9月17日-9月19日 朱鷺メッセ(新潟・新潟)

Peerakietkhajorn S, Kato Y, Watanabe H オオミジンコを用いた毒性試験における共生菌の影響 第42回日本毒性学会学術年会 2015年6月29日-7月1日 金沢音楽堂(石川・金沢)

中西 貴士, 浅田 実希, 加藤 康彦, 渡邊肇 ホルモン活性検出用のトランスジェニックミジンコの創出 第24回環境化学討論会 2015年6月24日-6月26日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

中西 貴士, 浅田 実希, 加藤 康彦, 渡邊肇 Development of transgenic Daphnia for monitoring hormonal activities of chemicals SETAC Europe 25th Annual Meeting 2015年5月3日-5月7日 バルセロナ(スペイン)

内藤彰子, 中西貴士, 加藤泰彦, 松浦友亮, 渡邊肇 Establishment of gene knock out technology using TALEN in D.magna. EMBO Daphnia Genomics Consortium MEETING 2014 2014年1月22日 バーミンガム(英国)

中西貴士, 加藤泰彦, 渡邊肇 Development of CRISPR/Cas9-mediated genome editing technique in Daphnia magna. Daphnia Genomics Consortium 2014. 2014年1月22日バーミンガム(英国)

渡邊肇 Comparative Ecotoxicogenomics Using Medaka, Daphnia and Algae. International Environmental Omics Synthesis Conference. 2013年9月日-9月13日 カーディフ(英国)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 肇 (WATANABE Hajime)

大阪大学・大学院工学研究科教授

研究者番号：80212322

(2)研究分担者

なし