

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06583

研究課題名(和文) 未知巨大遺伝子クラスターの特異的配列取得法の確立

研究課題名(英文) Establishment of specific sequence mining method for unknown giant gene clusters

研究代表者

岡村 好子 (Okamura, Yoshiko)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80405513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：難培養性細菌の遺伝子資源を標的遺伝子特異的に入手する手法の開発を行った。重要創薬ターゲット遺伝子であるリボソーム非依存型ペプチド合成酵素(NRPS)やポリケチド合成酵素(PKS)は、巨大遺伝子クラスターにコードされているため、全ゲノム解読してその全長配列を入手することが最も近道である。標的遺伝子のmRNAの30bp程度の既知配列をプロ-ピングするRNase H assisted RCA法を開発した。これにより標的遺伝子を発現した細菌のみを蛍光標識することに成功し、1細胞全ゲノム解析の道が拓けた。

研究成果の概要(英文)：The methods for drug screening using genomic resources from VBNC (visible but non-culturable) bacteria are demanded. In this study, the method for target-specific detection, RNase H assisted Rolling Circle Amplification, was established toward whole genome sequence mining. Only target gene-expressed bacteria were labeled by fluorescence probe successfully with this method. This method opens the way to single cell genomics and mining of drug discovery target encoded in giant gene cluster.

研究分野：微生物ゲノム工学

キーワード：遺伝子特異的検出 難培養微生物 メタゲノム シングルセルゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

リボソーム非依存型ペプチド合成酵素(NRPS)やポリケチド合成酵素(PKS)は、抗菌、抗腫瘍、抗炎症、抗アミロイド作用、免疫抑制剤などを産生する重要な創薬シーズである。これらの酵素は巨大遺伝子クラスターにコードされている。

微生物の99%以上は未知・難培養であるため、これまではメタゲノム解析でその遺伝子資源を入手する努力がなされてきたが、数十~百 kb に及ぶ巨大遺伝子クラスターは、メタゲノムライブラリーからのスクリーニングでは全長取得が困難である。

近年、次世代シーケンサーの普及を背景に、メタゲノムも配列決定に供されるようになった。しかし、環境中には莫大な数の微生物種が存在するため、難培養性微生物のゲノム全配列が決定される可能性は低い。そこで難培養性微生物を1個体ずつ分取し、これをシングルゲノミクスで決定する試みが行われ、巨大遺伝子クラスターの全配列が取得できたという報告がなされている。この際、非標的個体も全て分取され、全ゲノム増幅までは行われた。この手法では、時間やコストの面で効率的ではない。そこで本研究では、環境中の夾雑微生物の中から、標的細胞だけを特異的に認識し、分取することによって、シングルゲノミクスをさらに効率化することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、NRPS や PKS の巨大遺伝子クラスターを保持する細菌のみを、夾雑系の中で特異的に認識し、その全ゲノムを増幅する方法を開発することを目的とした。これを達成するために2つのアプローチを用いた。1つめは、夾雑細菌があるなかでも、特異的プライマーを使用して、標的遺伝子をもつ細菌のゲノムのみを Rolling Circle Amplification (RCA)で増幅し、得られた1本鎖を2本鎖DNAに再合成する方法、2つめは、標的遺伝子にハイブリするプローブで細菌を標識し、FACSでラベルされた細菌を分取し、全ゲノム増幅する方法である。

3. 研究の方法

シングルプライミングによる全ゲノムRCA

先行研究(平成24年度基盤研究(C))で開発したシングルプライミングによる全ゲノム増幅法により、大腸菌とシュドモナスの混合系に対し、シュドモナスのNRPSに対するプライマーを使用してRCAを行った。シングルプライミングRCAによって増幅した1本鎖DNAを鋳型に、2段階目としてランダムプライマーを使用した Multiple Displacement Amplification (MDA)によって2本鎖化したのち、S1ヌクレアーゼを用いて、残存する1本鎖DNAを消去した。生成した2本鎖DNAはQbitのdsDNA定量アッセ

イキットを用いて定量した。全ゲノム増幅の確認は、PacBio RSII配列を決定し、そのカバレッジで評価した。

パッドロックプローブによる標的細胞のラベル化

遺伝子特異的かつ生細胞のみを細胞丸ごと取得するために、GFP発現大腸菌モデルを用いて、mRNAの特異的標識と検出について検討した。

パッドロックプローブは、GFP mRNAの全長に渡って5カ所にハイブリダイズするように設計し、ハイブリダイズ後に生じるニックは、SplintR ligaseで環状化した。さらに、mRNA-プローブDNAのハイブリッド鎖のRNAにニックを入れるため、RNase Hで消化した。生じたRNAの3'末端からRCA反応を行い、増幅したプローブ配列(ssDNA)を認識するSYBR Green IIで染色した。定量はリアルタイムPCR装置を用いた。

全ゲノム増幅のためのノーコンタミネーション環境の構築

本研究では、 ϕ 29DNAポリメラーゼを用いて、RCA、MDAを行うが、 ϕ 29DNAポリメラーゼの鋭敏な活性のため、操作中のコンタミネーションDNAの増幅がこれまで不可避だった。そこで、ラミナーフローによって浮遊するDNAをベンチ外に追い出すことの出来るベンチトップクリーンベンチ(KOACH, 興研株式会社)を改良して、浮遊DNAを完全に除去するコンタミネーションフリーの環境を確保できるか検討した。

また、従来のクリーンベンチを使用した場合、鋳型無しのネガティブコントロールで増幅されるコンタミネーションDNAについて、シーケンスによりその正体を明らかにした。

4. 研究成果

シングルプライミングによる全ゲノムRCA

シングルプライミングによる1本鎖DNAを合成し、さらにランダムプライミングで2本鎖化した。Qubitによる定量では、400Gb程度の2本鎖DNAの存在が確認できた。ところが、PacBio次世代シーケンサーで解読することにより、リードのカバレッジを評価したところ、2本鎖の合成量と相関しないカバレッジであった。シーケンスケミストリーでは、20kbに断片化後、末端にループプライマーを連結して環状化する手順であるが、サンプル中の残存1本鎖が断片化効率およびライゲーション効率を阻害することがわかった。

パッドロックプローブによる標的細胞のラベル化

パッドロックプローブの設計は、mRNA分子内の任意の配列、任意のポジションで検出

可能であった。大腸菌が発現している全 mRNA が夾雑していても、標的の GFPmRNA のみ特異的に検出することが出来た。その感度は 1 fmol/20 μ L であり、細菌の細胞体積あたりで換算すると、1 細胞当たり数コピーの mRNA が検出可能であることが示唆された。さらに、細胞破碎を伴わない in situ RCA にも成功し、標的 mRNA が発現している細胞を蛍光標識することが出来た。これにより、FACS による標的細胞のソーティング、シングルゲノミクスが可能となった。

全ゲノム増幅のためのノーコンタミネーション環境の構築

Φ 29 DNA ポリメラーゼは鋭敏に 1 分子鋳型でも増幅することが可能なことから、反応調製時の実験空間を ISO クラス 1 の清浄度で行うことが必要であること、また、通常のクリーンベンチでは実験者由来のヒト DNA がコンタミネーションすることを配列解析から明らかにした。これらの知見を踏まえて、ISO クラス 1 のスーパークリーンゾーン生成装置において、コンタミネーションフリーの信頼性の高い DNA 合成を達成した。

以上の結果を総括すると、次世代シーケンサーによって決定された 30bp 程度の遺伝子内部配列があれば、その遺伝子本体を発現している細菌を蛍光標識し、FACS ソーティングで分取し、コンタミネーションフリーの MDA によって全ゲノム増幅し、全ゲノム配列を決定することができようになった。これにより、モジュール型酵素の全配列をマイニングが可能になったことから、in vitro クローニングの道が拓けた。

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 3 件)

1. Hirokazu Takahashi, Masahiko Ohkawachi, Kyohei Horio, Toshiro Kobori, Tsunehiro Aki, Yukihiko Matsumura, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura. “RNase H-assisted RNA-primed rolling circle amplification for targeted RNA sequence detection”, *Scientific Reports*, 8, 7770. (2018)
2. Hirokazu Takahashi, Takahiro Satoh, Hiroko Kanahara, Yuji Kubota, Tamaki Hirose, Hiroyuki Yamazaki, Kimiko Yamamoto, Yoshiko Okamura, Taketo Suzuki, Toshiro Kobori. “Development of a bench-top extra-cleanroom for DNA amplification.” *Bio Techniques*, 61, 42-46. (2016)
3. 高橋宏和、岡村好子、小堀俊郎. 「1 細胞ゲノミクスの為の試薬と環境」. *THE CHEMICAL TIMES*. 238, 22-27. (2015)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. (招待講演)岡村好子, 標的 RNA の新規な高精度識別方法, 第 15 回アカデミックフォーラム, 2018.6.28, 東京ビッグサイト, 東京
2. 堀尾京平、大川内雅彦、高橋宏和、小堀俊郎、秋庸裕、松村幸彦、中島田豊、岡村好子. mRNA 直接検出のための RNase H-assisted RCA 法の開発, 第 20 回マリンバイオテクノロジー学会大会. 2018.5.27. フェニックス・シーガイア・リゾート, 宮崎県.
3. (招待講演)岡村好子, ノーコンタミネーションのゲノム増幅・稀少未知微生物の遺伝子探索に向けて. 第 13 回アカデミックフォーラム, 2016.5.11, 東京ビッグサイト, 東京
4. Yoshiko Okamura, Hirokazu Takahashi, Shogo Suzuki, Masahiko Ohkawachi, Takahiro Nomura, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yukihiko Matsumura. Valuable substances production using marine biomass wastewater. PACIFICHEM 2015, December 18, 2015, Hawaii, USA.
5. Hirokazu Takahashi, Takahiro Satoh, Hiroko Kanahara, Yuji Kubota, Yoshiko Okamura, Taketo Suzuki, Toshiro Kobori. Development of a bench-top extra-cleanroom for single cell genomics. PACIFICHEM 2015, December 17, 2015, Hawaii, USA.

〔図書〕(計 1 件)

1. Hirokazu Takahashi, Yoshiko Okamura, Toshiro Kobori. Chapter 4. Use of DNA CircLigase for direct isothermal detection of microbial mRNAs by RNA-primed rolling circle amplification and preparation of ϕ 29 DNA polymerase not contaminated by amplifiable DNA. In Vadim Demidov (ed), *Rolling Circle Amplification (RCA): Toward New Clinical Diagnostics and Therapeutics*. pp. 37-46, Springer (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: RNA 検出法
発明者: 高橋宏和、岡村好子、中島田豊、秋庸裕、松村幸彦、大川内雅彦
権利者: 広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-085299
出願年月日: 2017 年 4 月 24 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

岡村 好子 (OKAMURA, Yoshiko)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・准
教授

研究者番号：80405513