

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22294

研究課題名（和文）共生ゲノミクスによる新規抗菌ペプチドの革新的探索法の開発

研究課題名（英文）Innovative method development to screen novel antimicrobial peptides by evolutionary genomics approach

研究代表者

重信 秀治（Shigenobu, Shuji）

基礎生物学研究所・超階層生物学センター・教授

研究者番号：30399555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：私は、昆虫と微生物が共生する「菌細胞」のトランスクリプトーム解析の過程で新規の抗菌ペプチドを偶然発見したことをきっかけとし、本研究では昆虫＝微生物共生系に着目した新たな抗菌ペプチドの探索パイプラインの開発と、その手法を用いた新規抗菌ペプチドの発見を目指した。その結果、アブラムシのBCRペプチドをはじめとする新しいクラスの抗菌ペプチドを昆虫から発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌ペプチドは、多細胞生物がもつ生体防御のための物質で、自然免疫反応によって、侵略してくる病原性微生物を攻撃するための分子である。既存の抗生物質と比べて耐性を獲得しにくいいため、新規抗菌ペプチドの開発には大きな関心が寄せられている。本研究では、これまで注目されてなかった昆虫・微生物共生系に焦点を当て、新規抗菌ペプチドの探索パイプラインを開発し、その手法を用いた新規抗菌ペプチドの発見を成功させた。これらの新規抗菌ペプチドは、新規医薬品や農薬の開発に応用できる大きなポテンシャルを秘めているとともに、本研究で示したアプローチは、ゲノム時代の天然物創薬の新たな方向性を示している。

研究成果の概要（英文）：Motivated by my earlier fortuitous discovery of novel antimicrobial peptides through a transcriptome analysis of bacteriocytes (insect cells specialized for symbiosis with endosymbionts), this study aimed to establish a pipeline for identifying new antimicrobial peptides, particularly within the framework of insect-microbe symbiotic systems. Our innovative method enabled the identification of a novel class of antimicrobial peptides derived from insects, including aphid BCR peptides. This research signifies a pivotal stride towards understanding and harnessing the potential of antimicrobial peptides from insect-microbe interactions.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：抗菌ペプチド RNA-seq トランスクリプトーム解析 昆虫 共生

1. 研究開始当初の背景

抗菌ペプチドは、多細胞生物がもつ生体防御のための物質で、自然免疫反応によって、侵略してくる病原性微生物を直接殺すために用いられる分子である。既存の抗生物質と比べて耐性を獲得しにくく、薬剤耐性菌が問題となっている昨今、新規の抗菌ペプチドの開発やスクリーニングに大きな関心が寄せられている(Yeung et al, 2011 CMLS; Guralp et al., 2013)。私は、昆虫と微生物の共生系の基礎研究に長年従事してきたが、その過程で、偶然に、「機能未知」とされていた宿主昆虫遺伝子の中に新規の抗菌ペプチドを発見した(Shigenobu & Stern 2013 Proc Roy Soc B)。さらに、他の共生系においても抗菌ペプチド様遺伝子が存在する事が報告されはじめており、最近私たちは従来の枠組みに入りきれない新しいクラスの抗菌ペプチドとして「共生的抗菌ペプチド (symbiotic AMP)」と呼ぶことを提唱した (Mergaert, Shigenobu et al. 2017 Trends in Microb)。これらの研究の過程で、たとえゲノムやトランスクリプトーム情報が存在しても、従来の遺伝子予測プログラムでは共生的抗菌ペプチドの同定は困難であることも分かった。従って、共生系には従来の技術では同定が困難な未開拓の抗菌ペプチドが多数眠っていると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、昆虫=微生物共生系に着目した革新的な抗菌ペプチドの探索法の開発と、その手法を用いた新規抗菌ペプチドの発見である。

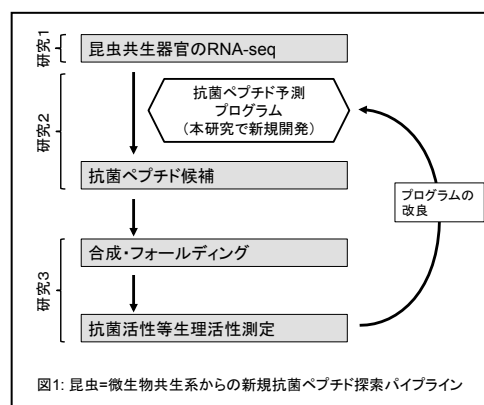
上記の通り、共生系は新しいタイプの抗菌ペプチドを発掘する格好の材料であると言えるが、これまでの研究の過程で、たとえゲノムやトランスクリプトーム情報が存在しても、従来の遺伝子予測プログラムでは共生的抗菌ペプチドの同定は困難であることも分かった。一方で、私たちが新規に同定した抗菌ペプチド群はシステイン残基の数や charge の偏りなど、ある程度の特徴を共有していることにも気づき、それらを目安にして新たな抗菌ペプチドを発見することもできた。本研究では、そのような、なんとなく気付いてきた経験則をバイオインフォマティクスのパイプラインとして実装することによって、昆虫=微生物共生系のゲノム・トランスクリプトームデータから新規抗菌ペプチドを推定する方法を開発することを第一の目的とする。さらに、proof of concept として、このパイプラインで予測された抗菌ペプチド候補分子が実際に抗菌活性をもつかどうかを実験的に検証することを第二の目的とする。本研究では基盤技術を開発することが目的なので、小規模なスクリーニングにとどめ、実験上また法令上扱いやすい材料を使う。将来的に大規模スクリーニングに展開できるよう基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

研究(1) 昆虫共生器官の RNA-seq データ収集

昆虫の共生器官の RNA から RNA-seq 用ライブラリを作製した。微量サンプルから RNA-seq が可能な SMART 法 (TaKaRa 社) を利用した。

研究構想時点では、RNA-seq データのみを利用する予定であったが、研究期間中にゲノム解読技術が急速に発展したため、ゲノムを解読した上で共生的抗菌ペプチドを探索する戦略も追加した。また研究期間中にアブラムシの約 20 種のゲノム情報も公開されたため、これらも探索対象に利用した。



研究(2) RNA-seq データから抗菌ペプチドを探索するプログラムの開発

RNA-seq データを de novo アセンブリすることにより発現遺伝子のリファレンスを構築する。

そこから抗菌ペプチドを探索するプログラムを以下の5ステップに分解して開発した。① ORF 予測、② 分泌シグナル予測、③ 配列類似性に基づいた高感度検索、④ 配列類似性に依存しない抗菌ペプチド探索、⑤ フィードバックによる改良。

研究(3) 新規抗菌ペプチド候補を合成し抗菌活性を調べる

研究(2)で予測された抗菌ペプチド候補を化学合成(民間の受託合成サービスを利用)した。合成ペプチドは、Refolding CA Kit (TaKaRa 社)を用いてリフォールディングした。抗菌活性を、培養阻害や Kirby-Bauer テストで測定した。バクテリアの代表として大腸菌、真菌の代表としてボーマリアを選択し、それぞれの微生物に対しての抗菌性を先述の方法で検討した。

4. 研究成果

(1) BCR ペプチドの抗菌活性

エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) の BCR ペプチドは、研究構想提案時点ですでに私たちが抗菌ペプチド様遺伝子として見出していたものであったが、本課題の研究期間中に、その抗菌活性を実験的に証明することができ、またそのメカニズムの一端も説明することができ、これらを論文として報告した (Uchi et al. 2019 Microb Environ)。なお、本論文は当該雑誌に2019年に掲載された最も優れた論文として、MVPを受賞した。

BCR1、BCR2、BCR3、BCR4、BCR5 及び BCR8 を化学合成した。BCR ペプチド群はシステイン残基を多数有しそれらのジスルフィド結合が機能的に重要と考えられたため、適切な高次構造を取るよう人工シャペロンを利用したリフォールディング操作を行った。それらのペプチドを大腸菌 MG1655 株と3時間インキュベーションし、コロニー形成能を定量した(図2)。その結果、BCR1、BCR3、BCR5、BCR8は大腸菌がほとんどもしくは全く生育しないほどの強い抗菌効果を、BCR4はマイルドな抗菌効果を持つことがわかった。

BCR で処理した大腸菌をフローサイトメトリーで調べたところ、細胞サイズの増加と DNA シグナルの増加が見られた(Uchi et al. 2019 Microb Environ)。これは BCR によって polyploid 化が引き起こされていることを示唆している。BCR ペプチドで処理した大腸菌を DAPI と PI で染色し、蛍光顕微鏡で観察したところ、BCR1、BCR3、BCR8によって、PIのシグナルが顕著に増加しており、これは BCR ペプチド処理によって膜の透過性が高まったことを意味する。

(2) 抗菌ペプチドを探索するプログラムの開発

RNA-seq データを *de novo* アセンブリすることにより発現遺伝子のリファレンスを構築する。そこから抗菌ペプチドを探索するプログラムを以下の5ステップに分解して開発した。

① ORF 予測: コドン利用パターンのマルコフモデルによる ORF 予測の際、抗菌ペプチドは短いことを考慮に入れてパラメータの最適化を行なった。② 分泌シグ

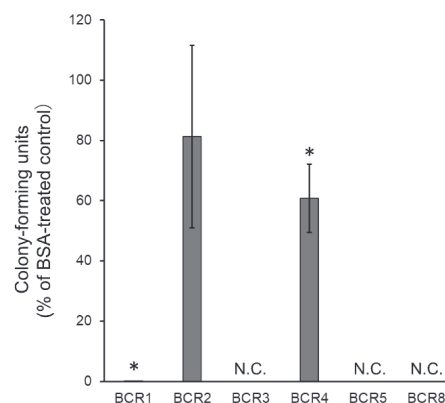


図2: アブラムシBCRペプチドの大腸菌に対する抗菌活性。5 μ MのBCR1、BCR2、BCR3、BCR4、BCR5、BCR8をそれぞれ大腸菌MG1655株と3時間インキュベーションし、コロニー形成能を定量した(Y軸)。比較対照としてBSAで処理した大腸菌を用いた。N.C.はno colonyつまり全くコロニーが形成されなかったことを示す。アスタリスク(*)は対照群に対して有意にコロニーの数が異なることを示す。このように、BCR1、BCR3、BCR5、BCR8は強い抗菌効果を、BCR4はマイルドな抗菌効果を持つことが明らかとなった。

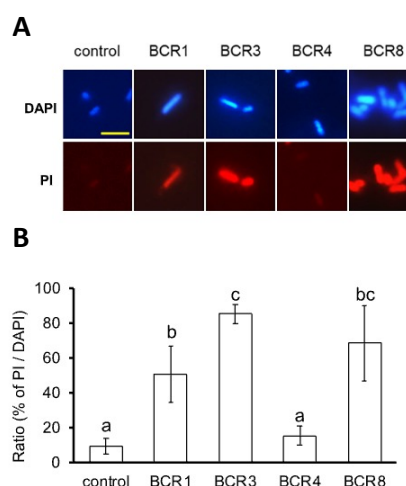


図3: BCRペプチドが大腸菌の細胞膜に及ぼす影響。図2と同様にBCRペプチドで処理した大腸菌をDAPIとPIで染色し、蛍光顕微鏡で観察し(A)、PI/DAPIの比率を定量した(B)。BCR1、BCR3、BCR8によって、PIのシグナルが顕著に増加しており、これはBCRペプチド処理によって膜の透過性が高まったことを意味する。

ナル予測: N 末の分泌シグナルは SignalP (Armenteros et al. 2019) のアルゴリズムで予測した。
 ③ 配列類似性に基づいた高感度検索: 既知のアブラムシ BCR については BLAST 検索を行なった。ただし、抗菌ペプチドは進化速度が速いことが多いので、より感度高く探索できるよう、隠れマルコフモデル(HMM)によるモチーフサーチ (具体的には HMMER を利用) も併用した。④ 配列類似性に依存しない抗菌ペプチド探索: 等電点、分子量、アミノ酸残基の出現頻度 (抗菌ペプチドにはシステインやグリシンなど特定のアミノ酸の組成が偏っているものが多い)、推定 2 次構造等の特徴量として、機械学習やベイズ推定で抗菌ペプチドを探索することを試みた。⑤ 予測された抗菌ペプチドで実際に抗菌活性を測定し、実験による抗菌活性の有無・強さの情報を上記①～⑤のステップにフィードバックし改良することを試みた。これら 5 ステップのうち①～③は実装に成功した。しかし、④については効果的なアルゴリズムの開発までには至らなかった。⑤については実際に生理活性を定量できたペプチドが少なすぎたため、十分な N 数のトレーニングデータを得ることができなかった。ただ、④については、研究期間中に AlphaFold2 をはじめとする AI による立体構造予測など、AI 技術の驚くべき進歩があり、これらの技術を抗菌ペプチド探索・予測パイプラインに組み込む試行を継続しており、新たな可能性が広がった。

(3) 新たな抗菌ペプチドの探索・同定

上記 (2) で開発したパイプラインを用いて、新たな抗菌ペプチドを探索した。探索に先駆けて、まず、昆虫の菌細胞の RNA-seq データを新たに取得した。ササコナフキツノアブラムシ (*Ceratovacuna japonica*)、エゴノネコアシアブラムシ (*Ceratovacuna nekoashi*)、クリオオアブラムシ (*Lachnus tropicalis*)、ソラマメヒゲナガアブラムシ (*Megoura crassicauda*)、アブラゼミ (*Graptosaltia nigrofusca*) など多数の半翅目昆虫の菌細胞トランスクリプトームデータを取得し、それらを de novo アセンブルすることによりリファレンス配列を構築した。これらを対象に上記開発パイプラインで抗菌ペプチドを探索し、BCR に類似した配列を得ることができた。

研究期間中にゲノム解読技術が急速に発展したため、ゲノムを解読した上で共生的抗菌ペプチドを探索する戦略も追加した。また研究期間中にアブラムシの約 20 種のゲノム情報も公開されたため、これらも探索対象に利用した。その結果、アブラムシ類にさらに BCR ファミリー遺伝子を同定しただけでなく、シロアリのゲノムから全く新しい抗菌ペプチドの可能性のある遺伝子を見出した (後述)。

(4) TY ペプチド: シロアリゲノムから発見された新たな抗菌ペプチド候補

私たちはヤマトシロアリのゲノムを解読し報告したが (Shigenobu et al. 2022 PNAS)、その過程でシロアリ系統特異的な分泌性ペプチドをコードする新規の遺伝子ファミリーを同定し、この遺伝子群を TY ペプチドと命名した。N 末に分泌シグナルを持ち、C 末側は異常なほどチロシン残基が多い特徴的な構造を示す (図 4)。また予備実験ながら TY ペプチドの 1 つがある糸状菌に対して抗菌活性を持つことを見出した。今後、TY ペプチドの機能の解明が望まれる。

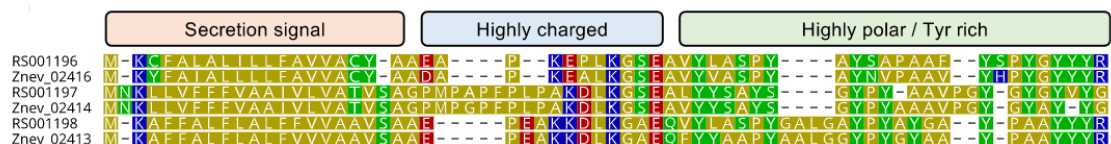


図4: シロアリのTY遺伝子。ヤマトシロアリ(RS-)、ネバダオオシロアリ(Znev-) のTYペプチドホモログのマルチプルアライメント。N末の分泌シグナルと、C末側のY(チロシン)残基の多さが特徴。予備的な実験ながら糸状菌に対する抗菌活性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shigenobu Shuji, Hayashi Yoshinobu, Watanabe Dai, Tokuda Gaku, Hojo Masaru Y., Toga, K., Saiki, R., Yaguchi H., Masuoka, Y., Suzuki, R., Suzuki S., Kimura, M., Matsunami M., Sugime Y., Oguchi K., Niimi, T., Gotoh, H., Hojo Masaru K., Miyazaki Satoshi, Toyoda Atsushi, Miura Toru, Maekawa Kiyoto	4. 巻 119
2. 論文標題 Genomic and transcriptomic analyses of the subterranean termite <i>Reticulitermes speratus</i> : Gene duplication facilitates social evolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2110361119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2110361119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shigenobu Shuji, Yorimoto Shunta	4. 巻 50
2. 論文標題 Aphid hologenomics: current status and future challenges	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 100882 ~ 100882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cois.2022.100882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchi Nahoko, Fukudome Mitsutaka, Nozaki Narumi, Suzuki Miyuzu, Osuki Ken-ichi, Shigenobu Shuji, Uchiyumi Toshiki	4. 巻 34
2. 論文標題 Antimicrobial Activities of Cysteine-rich Peptides Specific to Bacteriocytes of the Pea Aphid <i>Acyrtosiphon pisum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.me18148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Hologenomics of aphids: an integrative view of the insect and symbionts
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Genetics Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 によるエンドウヒゲナガアブラムシのゲノム編集
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 共生ゲノミクス - 昆虫とバクテリアの細胞内共生から学ぶこと
3. 学会等名 日本共生生物学会第4回大会(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 NGSが切り拓く昆虫研究のフロンティア
3. 学会等名 九州大学昆虫科学・新産業創生研究センター設立記念 キックオフシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Genomic Revelations of a Mutualism: Aphids and the Endosymbiont
3. 学会等名 The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Ortholog Analyses Reveal Genomic Basis of Evolutionary Novelty - Lessons from Insect Genomes
3. 学会等名 The 67th NIBB Conference "Quest for Orthologs" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Genome editing in the pea aphid
3. 学会等名 19th Annual Workshop at Bellairs - Emerging Model Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	HHMI	Janelia Research Campus	