

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560964

研究課題名(和文) マリンメタゲノム由来の生理活性ペプチド探索およびシーズ遺伝子特異的濃縮法の開発

研究課題名(英文) Screening of bioactive peptide from marine metagenome and specific amplification methods for potential genes for drug discovery

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：難培養性細菌の遺伝子資源を創薬に利用する手法の開発を行った。従来のメタゲノムライブラリーを用いたスクリーニング方法で、オーファンGPCRの代替リガンド探索を行い、リガンド候補とその遺伝子を同定することが出来た。このことは、難培養性細菌の遺伝子ソースが創薬ターゲットになり得る可能性を示唆している。さらに、重要創薬ターゲット遺伝子を持つ細菌のみを、夾雑細菌中から見分けて特異的に全ゲノム増幅する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The methods for drug screening using genomic resources from VBNC (viable but non-culturable) bacteria were developed. The surrogate ligand of orphan GPCR was screened among metagenomic library and we successfully found the candidate and its gene cluster. This result suggests that the gene resources from VBNC bacteria would be applicable to drug discovery. Moreover, we established the method that the whole genome harboring target genes for drug discovery were amplified specifically among the majority of non-target.

研究分野：微生物ゲノム工学

キーワード：メタゲノム GPCR 創薬ターゲット

1. 研究開始当初の背景

カイメン共生細菌から分離された生理活性物質・ペプチドは、治療に多大に貢献している製剤も多いが、その細菌をカイメンから分離培養することが不可能である。現在、メタゲノムライブラリーを構築して寒天平板上に展開するスクリーニング方法が用いられているが、多大なマンパワーを必要とする。研究代表者はオリゴペプチドを生成するポテンシャルのあるクローンを *in silico* スクリーニングにより選択した。この中から創薬シーズ候補が取得できれば、今後、単純計算で1000倍にリソースが増大し、より有用な医薬品開発につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オーファン受容体のサロゲートリガンド探索ツールの開発である。選択したペプチド生成クローンのメタゲノムライブラリーから、アゴニストあるいはアンタゴニストを探索することを目的とした。さらに、環状ペプチドの場合、その生合成遺伝子は巨大遺伝子クラスターを形成しているためライブラリーではクローニングは不可能であるため、大多数の環境細菌の中から環状ペプチド合成遺伝子特異的にゲノムを増幅し、その配列をマイニングする方法を開発することで、メタゲノムライブラリーの欠点を補う基盤技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

ボンベシン受容体3 (BRS3) のリガンド探索

オーファン GPCR である BRS3 を導入した哺乳類細胞 HEK293T にメタゲノムライブラリーの培養上清を反応させ、Ca²⁺ の細胞内動員量を測定して1次スクリーニングを行った。また候補クローンの培養上清を HPLC 精製した画分でアッセイし、活性本体を分離同定した。

環状ペプチド生合成遺伝子(NRPS)の特異的増幅法の開発

NRPS の高度保存領域から変性プライマーを作製し、single priming RCA (rolling circle amplification)法を検討した。NRPS モデル細菌と大腸菌を混合して、特異的増幅が可能なプライマーとその条件を検討した。

4. 研究成果

ボンベシン受容体3 (BRS3) のリガンド探索

カイメン共在バクテリアメタゲノムライブラリー、およそ10万クローンの中から、アミノ酸リガーゼのモチーフを保持する120クローンを *in silico* 解析で選択し、アッセイに供した。その結果2クローンが BRS3 と反応した。培養上清を濃縮、C18 カラムで精製・分画し、各画分を用いて、活性本体を含む画分を探索したところ、#42 株が再現よく顕著な反応を示した。#42 株が持つプラスミ

ド中にクローニングされたメタゲノム断片の全長シーケンスを決定したところ、活性に必要な領域には少なくとも3つの ORF がコードされており、そのうち2つはオペロンを形成していることが分かった。オペロンの領域のみをクローニングし、#42 株オリジナルと比較した結果、オペロンのみでも GPCR を刺激することが出来るが、全長を保持していた方が高活性であることが分かった。

以上の結果から、オーファン GPCR のリガンドスクリーニングのプラットフォームとしてメタゲノムライブラリーは適用できることが示唆された。また同時に、そのポテンシャルリガンドをコードする遺伝子も分離可能なツールといえる。

環状ペプチド生合成遺伝子(NRPS)の特異的増幅法の開発

既報の NRPS ユニバーサルプライマーは、培養確立株には有用であるが、カイメン共在バクテリア由来の NRPS に対しては有効でないことを確認した。そこで、変性パラメーターを最大にした場合でもメタゲノムに対して有効なプライマーをデザインした。

このプライマーで増幅された領域から、single priming RCA 用のプライマーをデザインした。モデル系で夾雑細菌が存在する中、NRPS 陽性細菌のみを特異的に、全ゲノム増幅することに成功した。陽性細胞を希釈して感度を調べた結果、数細胞でも増幅可能であることが明らかになった。これにより、環境中から、環状ゲノムを無傷で抽出するという条件付きであるが、標的遺伝子特異的にメタゲノムソースを利用できる基盤技術ができたと言える。

以上の結果から本研究を総括すると、従来のメタゲノムライブラリーによるスクリーニングは創薬探索ターゲットになり得ることが分かったが、より高活性の候補を増やすためにはライブラリーの母数を増やすより手立てがない。一方、ターゲット合成酵素遺伝子のみを特異的に増幅する技術は、候補の濃縮につながる故、ライブラリーの母数は小さいままヒット率を引き上げることが出来る。本研究では最も困難な課題である巨大遺伝子クラスターを標的にして特異的増幅法を開発したが、すべてのモチーフ既知の遺伝子に対して適用可能であり、次世代のメタゲノムライブラリースクリーニングツールの開発につながることは間違いない。99.9%を超える海洋の難培養性細菌の遺伝子ソースは大変ポテンシャルが高いものであり、その利用手法の開発は今後の医薬探索分野に大きく貢献できる可能性を示すことが出来た。

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 6 件)

1. Kobayashi Y, Hamamoto A, Hirayama Y, Saito Y. Molecular cloning, expression, and signaling pathway of four melanin-concentrating hormone receptors from *Xenopus tropicalis*. Gen. Comp. Endocrinol. (2015) 212, 114-123. **査読あり**
2. Hamamoto A, Kobayashi Y, Saito Y. Identification of amino acids that are selectively involved in Gi/o activation by the rat melanin-concentrating hormone receptor 1. (2015) Cellular Signaling, 27, 818-827. **査読あり**
3. Saito Y, Hamamoto A, Kobayashi Y. Regulated control of melanin-concentrating hormone receptor 1 through glycosylation and phosphorylation. Frontiers in Endocrinol. (2013) 4, 154. **査読あり**
4. Nagata A, Hamamoto A, Horikawa M, Yosimura K, Takeda S, Saito Y. Characterization of ciliary targeting sequence of rat melanin-concentrating hormone receptor 1. Gen. Comp. Endocrinol. (2013) 188, 159-165. **査読あり**
5. 岡村好子, バイオメディア 小さな生き物の大きな仕事, 日本生物工学会誌, (2013), 91, 155. **査読あり**
6. Hamamoto A, Horikawa M, Saho T, Saito Y. Mutation of Phe318 within the NPxxY(x)5,6F motif in melanin-concentrating hormone receptor 1 results in an efficient signaling activity. Frontier Endocrinology. (2012) 3_147, 1-10. **査読あり**

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 高橋和宏, 椎田敦之, 鈴木克彦, 竹山春子, 岡村好子, メタゲノムアプローチを

用いた好中球活性化ペプチド生合成遺伝子の同定, 第17回マリンバイオテクノロジー学会, 2015年5月30日, 東京海洋大学

2. 斎藤祐見子 Signaling specificity on the melanin-concentrating hormone receptor 1 第 88 回日本薬理学会シンポジウム (**招待講演**) (2015) 3月20日 名古屋
3. 斎藤祐見子 Structure-function insight on the melanin-concentrating hormone receptor 1 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会(**招待講演**) (2015) 3月23日 神戸
2. 徳丸雄一、岡村好子、斎藤祐見子, ポンベシン様ペプチド受容体 BRS-3のアンタゴニスト探索-マリンメタゲノムライブラリーの適用-,第11回GPCR研究会, 2014年5月9日, 日本未来科学館
3. 椎田敦之, 鈴木克彦, 竹山春子, 岡村好子, カイメン共在バクテリアメタゲノムライブラリーを用いた抗炎症ペプチドのin silicoスクリーニング, 第15回マリンバイオテクノロジー学会, 2013年6月2日, 沖縄県市町村自治会館
4. 椎田敦之, 高橋和宏, 鈴木克彦, 竹山春子, 岡村好子, カイメン共在バクテリアメタゲノムライブラリーを用いた好中球調節ペプチドの高効率スクリーニング, 第65回日本生物工学会大会, 2013年9月19日, 広島国際会議場
5. Okamura Y., Screening of a Bioactive Compounds and Their Genes from a Metagenomic Library of Sponge-Associated Bacteria. BIT's 3rd Annual World Congress of Marine Biotechnology (**招待講演**), Sep. 24, 2013, Hanzou, China.

6. 徳丸雄一、岡村好子、斎藤祐見子、オーファン受容体 bombesin receptor subtype-3 (BRS-3)の代替リガンド探索, 日本動物学会第84回岡山大会, 2013年9月27日, 岡山大学
7. 岡村好子, 高橋宏和, 非リボソーム合成酵素遺伝子を有する細菌特異的なゲノム増幅法の開発, 第15回マリンバイオテクノロジー学会, 2013年6月1日, 沖縄県市町村自治会館
8. 岡村好子, 特異的プライマーを用いた環状DNAの増幅, 第7回日本ゲノム微生物学会年会, 2013年3月9日, 長浜バイオ大学
9. 徳丸雄一、益田恵子、岩越栄子、浮穴和義、岡村好子、斎藤祐見子、オーファン受容体BRS-3の代替リリガンド及びBRS-3.5の内在性リガンド探索, 2013年度日本動物学会中国四国支部広島県例会 2013年3月2日, 広島大学
10. Suemitsu M, Takahashi H, Okamura Y., Study of Specific Gene Amplification with Rolling Cycle Amplification. Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2012, July 15, 2012, Kochi, Japan.
11. 斎藤祐見子, GPCRを介した情報伝達-古典的概念から新しい概念へ-, 日本神経化学会公開シンポジウム (**招待講演**), 2012年9月30日, 神戸国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

1. 斎藤祐見子, 実践治療薬, 金芳社, 2012年, 376 ページ。

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 「標的 DNA の特異的増幅法」
 発明者: 岡村好子
 権利者: 広島大学
 種類: 特許

番号: 特願 2012-261404、特開 2014-103948
 出願年月日: 2012 年 11 月 29 日
 国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔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: 8 0 4 0 5 5 1 3

(2) 研究分担者

斎藤 祐見子 (Saito, Yumiko)
 広島大学・大学院総合科学研究科・教授
 研究者番号: 0 0 2 1 5 5 6 8

(3) 連携研究者

なし