

令和元年5月30日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01814

研究課題名(和文) ネットイツメガエル皮膚ペプチドを用いたスキンケア素材への可能性追求

研究課題名(英文) Possibility of skin care material using Pxt peptides from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin

研究代表者

茂里 康 (Shigeri, Yasushi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90357187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ネットイツメガエルの皮膚から、ゲノム解析とトポロジカルマス(皮膚組織をそのままMALDI-MS解析を実施する)のデータを組み合わせて、12種類の新規ペプチド(Pxt-1～12)を単離した。Pxt-1～12はカエルを刺激すると分泌した事から、分泌性ペプチドであった。ペプチド合成を実施し、表面張力を調べたところ、Pxt-2, Pxt-5が強い泡立ち活性を示した。さらに逆配列のペプチド等を合成して調べたところPxt-2, Pxt-5, reverse Pxt-5はミセルを形成した。RT-PCRの結果から、Pxt-5は精巢に、Pxt-12は筋肉にも発現していたが、Pxt-2は皮膚のみに発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カエル等の両生類は、皮膚を湿った状態に保ち、捕食者や微生物等の外敵から身を守るために、皮膚に多くの粘液腺を有し、抗菌や毒素を含んだ生体分子を積極的に分泌している。そこで独自に開発したトポロジカルマスを駆使した事により、両生類(ネットイツメガエル)皮膚由来の新たな機能性生体分子(Pxtペプチド)を発見した。カタツムリの粘液由来のカタツムリクリーム、毒蛇由来の蛇毒クリーム(シンエイク, Syn-ake)なるものが最近の流行である事から、Pxtペプチドはこれまで知られていないコスメの添加成分として製品化研究に繋がり、コスメロジーにおける新分野の開拓に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Twelve novel peptides (Pxt-1-12) were isolated from the skin of *Xenopus tropicalis*, using topological mass spectrometry analysis. Several ion peaks corresponding to all identified Pxt peptides, were observed with MALDI-MS analysis of *X. tropicalis* secretory fluids, collected after in vivo stimulation suggesting that Pxt peptides were definitely secretory molecules. The remarkable foaming properties of Pxt-2 and Pxt-5 were observed. We further characterized Pxt-related peptides (Pxt-2, Pxt-5, Pxt-12, reverse Pxt-2, reverse Pxt-5, and reverse Pxt-12). All Pxt-related peptides formed significant amphiphilic alpha-helices. Moreover, Pxt-2, Pxt-5, and reverse Pxt-5 produced the micelle-like assemblies. Pxt-5 possessed the most potent hemolytic activity, while reverse Pxt-5 exhibited the most remarkable cytotoxicity in HaCaT cells. RT-PCR analysis confirmed the gene expressions of Pxt-5 in testis and Pxt-12 in muscle, in addition to skin, while Pxt-2 was only in skin.

研究分野：生化学

キーワード：ペプチド 表面張力 ミセル 溶血 ナノディスク 両生類 抗菌 立体構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バイオサーファクタント(生物界面活性物質)とは、生物が細胞の内外に産生する界面活性機能を有する物質で、従来の合成界面活性剤には見られない構造・機能を有している。また高い生分解性・安全性を有する事も期待され、遺伝子工学・発酵生産技術を駆使すれば、大量生産も可能である。本研究開始以前に、ネットアイツメガエル皮膚から、ゲノム解析情報と質量分析法を利用した微量解析・検出技術を駆使することにより、両親媒性を有する各種ペプチド Pxt ペプチドを単離した。これらのペプチドは、高い界面活性作用を有する事が判明していた。

### 2. 研究の目的

申請者がネットアイツメガエル皮膚から単離したPxtペプチドは、高い界面活性機能を示すことから、(i)Pxtペプチドの物理化学・界面化学的特性の詳細な解析。(ii)アミノ酸配列改変やアミノ酸変異導入。(iii)機能性化粧品への展開を模索するための、各種評価試験(抗酸化作用評価試験、抗老化作用評価試験、毒性評価試験、起泡力評価試験)を実施し、有効性・安全性・機能性の多彩な角度から機能性化粧品への可能性を追求する。

### 3. 研究の方法

(i)ネットアイツメガエル皮膚由来ペプチドの生物学的分析:

申請者がネットアイツメガエルから単離した12種類のペプチド(Pxt-1~Pxt-12)について、詳細な抗菌活性(抗菌スペクトル)を測定する。酵母(*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*等)、カビ(*Aspergillus oryzae*等)、皮膚に関係する菌(アクネ菌等)、枯草菌(*Bacillus subtilis*等)、その他の主要なグラム陽性及び陰性細菌を用い、ペーパーディスク法、微量液体希釈法を用い、MIC(最小発育阻止濃度)を決定する。

(ii)ネットアイツメガエル皮膚分泌液の成分分析:

ネットアイツメガエルは、接触刺激等の軽度のストレスを負荷する事により、粘性を有した泡状の分泌液を放出し、その主要原因物質は12種類のペプチド(Pxt-1~Pxt-12)であることが推察できた。しかし一般的に広く知られている事であるが、シャボン玉等の合成界面活性剤に糖質を添加する事により、泡の粘度や耐久性が増すことが知られている。そこで、各種分析手法を駆使し、ネットアイツメガエル皮膚分泌液中の、ペプチド以外の成分分析(脂質、炭水化物等の糖類、無機イオン、有機酸等)を実施する。

(iii)12種類のペプチドの内、2種類のペプチド(Pxt-2, Pxt-5)について、高い界面活性機能を示すことから、これらの界面活性機能の詳細な物理化学的・コロイド化学的解析を実施する。そこでまず、Pxt-2, Pxt-5の表面張力測定や光散乱測定により、界面活性剤の基盤物性となる臨界形成濃度(CMC)やミセルの会合数を決定する。リン脂質等の細胞膜成分とネットアイツメガエル皮膚由来ペプチドとの相互作用や高次構造解析を、円二色性分散計(CD)、各種 NMR(溶液及び固体 NMR)等で実施する。

### 4. 研究成果

ネットアイツメガエル皮膚から単離されたPxtペプチドの内、特に泡立ち活性の強いPxt-2, Pxt-5, Pxt-12とその逆配列のreverse Pxt-2, reverse Pxt-5, reverse Pxt-12について、性質解明を実施した。まず固相合成法を用い、6つの上記ペプチドを合成し、その純度についてHPLC及びMALDI-MSにより確認した。その後、物理化学的特性を円二色性分散計(CD)で調べたところ、50% TFE中でいずれも有意なアルファヘリックス構造形成を示した。6つのペプチドの内Pxt-5とreverse Pxt-5は、最も強い表面張力低下能を示した。さらにPxt-2, Pxt-5, reverse Pxt-5は、高濃度ではミセル形成を示し、限界ミセル濃度を求めることができた。生物化学的性質としては、Pxt-5は赤血球に対し、最も強い溶血活性を示した。また6つのペプチドの中でreverse Pxt-5は、ヒト培養皮膚細胞のHaCaT細胞に対し、炎症マーカー及びストレスマーカーであるIL-8とHMOX-1(heme oxygenase)の、最も強い発現誘導作用と細胞毒性作用を示した。一方Pxt-12とreverse Pxt-12はグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に対し弱い抗菌作用、赤血球に対して弱い溶血作用、HaCaT細胞に対して弱い細胞毒性作用を示した。すべての6つのペプチドは、 $10^{-5}$  Mの濃度で肥満細胞に対し、20%-50%のヒスタミンの遊離活性が認められた。またreal-time PCRを用いてPxt peptidesの各種臓器での発現を調べたところ、皮膚以外にもPxt-5は精巢に、Pxt-12は筋肉にも発現していた。14アミノ酸からなるPxt-5 (FIGALLGPLLNLLK-NH<sub>2</sub>)ペプチドの、50% TFE存在下での立体構造を調べた。測定は500Mzのブルカー社製NMRで行いDQF-COSY, TOCSY, NOESY等の多次元NMRを用いて、構造解析を実施した。構造計算はCNSプログラムを利用し、シミュレートッド・アニーリング(SA法)を用いた。得られたペプチドの構造から、本ペプチドはN末から7アミノ酸程度は明確な構造を取らないランダムコイル様の構造を取るが、8番目のプロリンからC末端まで典型的なアルファヘリックス構造を取る事が判明した。このアルファヘリックス構造は、ロイシンが周囲を取り囲む非常に疎水性の高いヘリックスであった。TFE等の有機溶媒は、膜等の疎水環境を模倣するために良く用いられる。このことから、膜存在下では、本ペプチドのC末端のヘリックスが膜に突き刺さると考えられる。あるいは水溶液中ではこのヘリックスを利用したバンドル構造を形成することで、規則的な会合(凝集)を起こすと想定される。

一方、脂質ナノディスクとは、主にアポリポrotein A-I (apoA-I)と各種リン脂質から形

成されるディスク状のナノ粒子であり、生体内において脂質輸送を担うHDLを再構成したものである。そこで、通常用いられるapoA-Iではなく、Pxtペプチドに注目した。特にアルファヘリックス構造形成を行うPxt-5に注目した。その結果、臨界面合体形成濃度(CAC)以上の濃度のPxt-5とDMPCリポソームを直接混合すると、わずか2分程度で濁度が低下し、脂質を速やかに可溶化させて脂質ナノディスクを形成することが明らかになった。ナノディスクは、血中の高密度リポタンパク質(HDL)粒子を人工的に再構成したディスク状の形態を持つナノ粒子であり、通常はHDLの主要タンパク質であるアポリポタンパク質A-I(ApoA-I)とリン脂質から構成される。生体内におけるHDL粒子は、脂質輸送、特にコレステロールの逆輸送(RCT)において重要な役割を担っており、肝臓外組織からコレステロールを除去するように機能し、多くの細胞の構造及び機能を維持することに寄与する。実際に、HDL粒子の血清レベルが高いと、冠動脈心疾患を抑制するだけでなく、アテローム性動脈硬化症のプラークの退縮を促すとされている。このような生体内における作用を有することから、HDL粒子に結合したコレステロールは一般に「善玉コレステロール」と呼ばれている。これに対して、低密度リポタンパク質(LDL)粒子の血清レベルの上昇は、心血管リスクの増加と相関しており、LDL粒子に結合したコレステロールは「悪玉コレステロール」と呼ばれている。従って、血中のHDLを模倣したナノディスクは、高脂血症、高コレステロール血症、冠動脈心疾患、アテローム性動脈硬化などの心血管疾患を含む、脂質代謝異常障害に対して有効であり、これらを治療または予防する医薬品として注目されている。ナノディスクの形成にはApoA-Iの両親媒性の部分配列が有効であることが知られているが、今回独自に発見したネッタイツメガエル皮膚由来Pxtペプチドの内、両親媒性・界面活性性を強力に有するPxt-5(FIGALLGPLLNLLK-NH<sub>2</sub>)とそのアナログペプチド(FIQALLQWLLELLK-NH<sub>2</sub>)を合成し、詳細に調べたところ、ナノディスク形成能を有することが判明した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

- (1) **Shigeri, Y.**, Horie, M., Yoshida, T., Hagihara, Y., Imura, T., Inagaki, H., Haramoto, Y., Ito, Y., and Asashima, M. (2016) Physicochemical and biological characterizations of Pxt peptides from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin. *J. Biochem.*, 159, 619-629
- (2) Kawakami, H., Goto, S., Murata, K., Matsuda, H., **Shigeri, Y.**, Imura, T., Inagaki, H., and Shinada, T. (2017) Isolation of biologically active peptides from the venom of Japanese carpenter bee, *Xylocopa appendiculata*. *J. Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23, 29. DOI: 10.1186/s40409-017-0119-6
- (3) Tamaki, S., Yagi, M., Nishihata, Y., Yamaji, H., **Shigeri, Y.**, Uno, T., and Imaishi, H. (2018) Modification of N-terminal amino acids of fungal benzoate hydroxylase (CYP53A15) for the production of p-hydroxybenzoate and optimization of bioproduction conditions in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotech.*, 28, 439-447
- (4) Ikeda, Y., Taira, T., Sakai, K., Sakai, H., **Shigeri, Y.**, and Imura, T. (2018) Lipid nanodisc formation using Pxt-5 peptide isolated from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin, and its altered form, modify-Pxt-5. *J. Oleo Sci.*, 67, 1035-1041
- (5) Tani, N., Kazuma, K., Ohtsuka, Y., **Shigeri, Y.**, Masuko, K., Konno, K., and Inagaki, H. (2019) Mass spectrometry analysis and biological characterization of the venom and venom sac components of the predatory ant *Odontomachus monticola*. *Toxins*, 11, E50

### 〔学会発表〕(計3件)

- (1) **茂里康**。両生類(ネッタイツメガエル)皮膚由来、機能性ペプチドの網羅的探索 第32回 関西地区ペプチドセミナー(2015)
- (2) 池田ゆり、**茂里康**、井村知弘。熱帯ツメガエルの分泌ペプチドを利用した脂質ナノディスクの調製。日本化学会第97春季年会(2017)
- (3) 谷直紀、数馬恒平、大塚幸雄、**茂里康**、増子恵一、紺野勝弘、稲垣英利。アギトアリ毒液成分のペプチドーム及びプロテオーム解析。第三回京都生体質量分析研究会シンポジウム(2019)

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：界面活性ペプチドから短時間で形成する巨大ナノディスク

発明者：井村知弘、**茂里康**、遠藤明、平敏彰

権利者：産業技術総合研究所

種類：知的財産

番号：特願 2015-163190

出願年：2015年

国内外の別：国内

名称：カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素I由来ポリペプチド、リン酸化剤、および製造方法

発明者：千賀由佳子、秋月一駿、片山将一、茂里康、亀下勇、石田敦彦、末吉紀行

権利者：産業技術総合研究所

種類：知的財産

番号：特願 2016-095770

出願年：2016年

国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：両生類ネツタイツメガエル皮膚由来機能性ペプチド

発明者：茂里康、萩原義久、渡部邦彦、井村知弘、原本悦和、伊藤弓弦、浅島誠

権利者：産業技術総合研究所

種類：知的財産

番号：特許第 6338899

出願年：2014年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：井村知弘

ローマ字氏名：Tomohiro Imura

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：化学プロセス研究部門

職名：グループリーダー

研究者番号（8桁）：10371022

研究分担者氏名：堀江祐範

ローマ字氏名：Masanori Horie

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：健康工学研究部門

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：30514591

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。