

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22357

研究課題名(和文) 昆虫由来抗菌ペプチドを用いた新規乳房炎防除法の開発を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Development of a novel strategy toward bovine mastitis using an insect antimicrobial peptide

研究代表者

米山 裕 (Yoneyama, Hiroshi)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10220774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：畜産領域で経済的損失の甚大なウシ乳房炎の予防・治療戦略の構築は喫緊の課題である。乳房炎起因菌の中でも黄色ブドウ球菌は根治が困難であることからその対策が求められている。そこで本研究では、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性が既存の抗生物質や抗菌ペプチドに比べ強いマダニ由来の抗菌ペプチド persulcatusin (IP) に注目し、カルモデュリンをタグとしたIPの大腸菌を宿主とする高発現系を構築した。次いで、アフィニティー精製による部分精製標品のリンカーをTEVプロテアーゼで切断後、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を評価した結果、キメラ型IPより切断処理後の遊離IPの抗菌活性が強いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畜産生産現場で多量に使用されている抗生物質は、病原細菌に対する選択圧として作用するため、薬剤耐性菌出現の温床となることが危惧されている。本研究課題は抗生物質に頼らない家畜生産システムの構築を目標とし、薬剤耐性菌出現頻度が既存の抗生物質よりも低い昆虫由来抗菌ペプチド persulcatusin に注目し、その微生物を宿主とした高発現系の構築と実用化に向けた基礎微生物学的解析を行っている。本研究において persulcatusin の安価な生産システムの構築とその生物学的特性の詳細が解明された暁には、現在公衆衛生上の大きな問題となっている薬剤耐性菌問題に対処するための一助になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus is the most important etiologic agent of bovine mastitis. To develop a novel strategy to control mastitis, we focused on an antimicrobial peptide, persulcatusin derived from Ixodes persulcatus, a vector for human tick-borne diseases in Japan, and constructed its high microbial expression system. For this, we employed calmodulin as a tag to construct a chimeric protein in which TEV protease recognition sequence was inserted between calmodulin and persulcatusin. The chimeric protein obtained by an affinity chromatography purification was treated with TEV protease to release free persulcatusin. Subsequently, its antimicrobial activity was determined by a bioassay using *S. aureus* 209P as the test strain. Consequently, we found that TEV-treated chimeric protein, in which free persulcatusin was present, showed stronger antimicrobial activity than the chimeric persulcatusin.

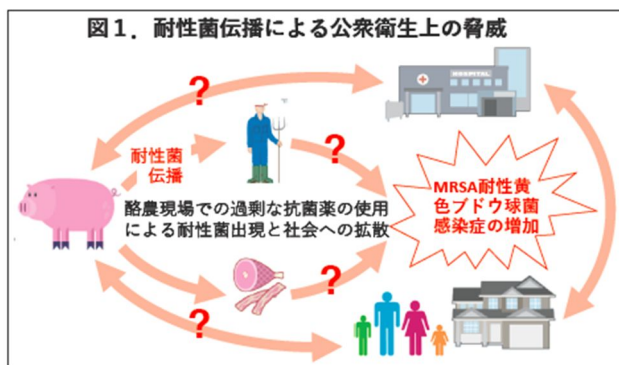
研究分野：動物微生物学

キーワード：抗菌ペプチド 乳房炎 黄色ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 今日の畜産が抱える抗生物質使用と薬剤耐性菌出現に関する社会的問題

ペニシリンが世に出て間もない1946年以降、低濃度の抗生物質を動物飼料に添加することによって成長が促進されることが偶然発見され(J Biol Chem, 165: 437-441, 1946)、抗生物質の飼料添加は近代の集約的家畜生産システムの発展を支える重要な技術となり今に至っている。この抗菌性飼料添加物(抗生物質)は、安全な食品の安定供給のために欠かすことのできない重要な資材であり、今では家畜生産のために使用される抗生物質の量は、人の医療用としての用途よりも多く、全世界での生産量の50%以上に達している。しかし、抗生物質は細菌の生存にとって選択圧として働くため、その飼料添加により選択される薬剤耐性菌が、人の健康に影響を及ぼすことが懸念されている。実際、家畜に与えた抗生物質が原因となって出現したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が人に感染する事例が報告され、人の社会での蔓延が危惧されている(Appl Environ Microbiol, 80: 7275-82, 2014)(図1)。



この薬剤耐性菌の脅威に対抗するためには新規抗生物質の開発が強く求められているが、1980年代以降新規抗菌薬の開発は著しく滞っているのが現状である。加えて既存のアプローチで新規抗菌薬が開発されても、それに対する耐性菌の出現は時間の問題であって避けることができないという大きな課題がある。

(2) 家畜生産現場で使用される抗生物質のリスクとその使用量削減の必要性

前述の薬剤耐性菌による感染症の脅威から、家畜生産に使用する抗生物質を削減する社会的圧力が高まっている。しかしながら、経済発展に伴う全世界での食肉需要の高まりから、今後さらに家畜生産現場で使用される抗生物質の増加が見込まれ、2010年から2030年の間に家畜生産のために使用される全世界での抗生物質の量は67%も増え、105,596トンに達すると予測されている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112: 5649-5654, 2015)。この家畜生産現場での過剰な抗生物質の使用は薬剤耐性菌出現の温床となることから、治療目的の抗生物質はもとより、その使用量の低減化は、食の安全は言うまでもなく畜産業界の持続的な発展のみならず、人類社会のために解決しなければならない喫緊の課題である。

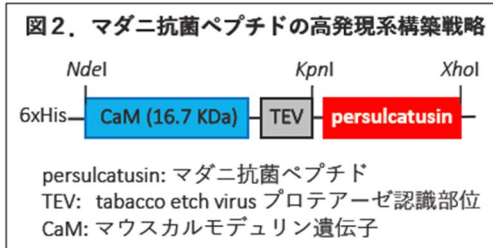
2. 研究の目的

家畜生産現場で特に問題となるウシ乳房炎は、罹患しやすく極めて治りにくい疾病のため世界的に家畜の最難治疾病の一つとされ、その経済的損失は甚大である(我が国で年間800億円以上、アメリカで20億米ドル以上)。乳房炎の防除は畜産(酪農)業の健全な経営のためには最重要課題であり、抗生物質による治療が現在一般的に行われている。しかし、乳房炎起因菌の中でも特に問題となる黄色ブドウ球菌は、バイオフィーム形成等が一因となり、抗生物質によって一旦治癒しても再発を繰り返すため根治することが困難である。結果として抗生物質の頻回投与による経済的負担はもちろんであるが、前述したように薬剤耐性菌、中でもMRSAの出現するリスクが高まる恐れがあり問題となっている。そこで本研究において、抗生物質に比べ耐性菌出現頻度が非常に低い抗菌ペプチドを用いた家畜の細菌感染症に対する新規な防除・治療戦略の構築を目指し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性が非常に強い、近年見いだされたマダニの抗菌ペプチド persulcatusin の微生物を宿主として用いた安価な製造方法の確立と、野生型ペプチドより抗菌力の増強した誘導体の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 組換え型 persulcatusin 高発現系の構築

多くの標的タンパク質と相互作用することが知られている真核生物のカルシウムセンサーであるカルモデュリン(CaM)をタグとして用い、そのC末端側に persulcatusin を融合させたキメラタンパク質遺伝子は大腸菌のコードンユーセッジを考慮に入れて設計した。この人工合成遺伝子(ユーロフィン社)をもつプラスミドから *NdeI/XhoI* 断片を切り出し、大腸菌の発現ベクターである pET15b のマルチクローニング部位 (*NdeI/XhoI* 処理) に組み込んだ persulcatusin 高発現ベクターを構築した。なお、CaM 遺伝子と persulcatusin 遺伝子の間には基質特異性の高い tobacco etch virus (TEV) のプロテアーゼ遺伝子を挿入した(図2)。この組換えプラスミドを導入した形質転換体から分離したプラスミドを鋳型とし、融合遺伝子の塩基配列をサンガー法で決定した。



(2) 組換え型 persulcatusin の発現と精製

前項において構築した persulcatusin 高発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) 株に塩化カルシウム法により導入し、高発現株を取得した。その後、高発現株を 1.5 L の LB 培地にて振とう培養を行い (37 °C, 2.5 h, 120 rpm) 終濃度 0.2 mM となるように IPTG を添加することでタンパク質発現誘導を行った。その後、振とう培養を 4 時間行い遠心分離 (5,000 × g, 10 min, 4 °C) して回収した菌体ペレットを滅菌生理食塩水で洗浄し、Ni-NTA カラム精製用の Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0) に再懸濁して凍結保存 (-80 °C) した。菌体懸濁液を室温にて 3 回凍結融解を繰り返すことによって菌体の一次破碎を行った破碎液を、超音波破碎 (15 s / 45 off × 20 cycles) にかけて再度の破碎を行い、遠心分離 (30,000 × g, 40 min, 4 °C) して上清を回収した。上清にプロテアーゼ阻害剤 (PMSF 1 mM) を添加し、常法に従い Ni-NTA agarose を用いたアフィニティー精製を行った。キメラタンパク質の溶出は、100-300 mM imidazole を含む溶液でステップワイズに溶出した。回収した各サンプルは 16% SDS-PAGE 電気泳動に供した。

(3) 組換え型 persulcatusin の抗菌活性の評価

Ni-NTA agarose を用いて精製したキメラタンパク質 (CaM-persulcatusin) を recombinant TEV protease (rTEVp) (Funakoshi) を 30 °C にて一晩反応させることで切断分離し、ペプチド画分を遊離させた。酵素処理後の混合物および未切断のキメラタンパク質を SDS-PAGE 電気泳動により解析し、ペプチドの遊離を検証した。その後、遊離したペプチド画分(組換え型 persulcatusin) の抗菌活性を以下に記載する方法により評価した。被験菌である *S. aureus* 209p 株を TSB 培地で 37 °C、一夜振とう培養し、その培養液を 50 °C に保温した TSA 培地に対して 1% (v/v) となるように混釈して評価プレートを作製した。固化した寒天培地表面にペーパーディスクを置き、その上にキメラタンパク質溶液、rTEVp 処理混合液、buffer (コントロール) をそれぞれ浸潤させた後、37 °C 一夜静置培養した後、ディスクの周囲に形成される発育阻止円を測定することで抗菌活性を評価した。

(4) ディフェンシンファミリーの抗菌ペプチドに特有のシステイン残基置換誘導体の構築と活性評価

前記の項目(1)において構築した persulcatusin 高発現ベクターを鋳型として、persulcatusin の配列中に含まれるシステインをアラニンに置換するため、オーバーラップ・インバース PCR 法を用い塩基置換を行った。PCR 酵素 KOD One Mix (TOYOBO) および persulcatusin の N 末端から 4, 11, 25, 33 および 35 番目のシステインをアラニンに置換したプライマーを設計し、それらを用いて温度勾配 PCR 法により至適アニーリング温度を決定した。その後、30 μl スケールにて PCR を行い、PCR 精製キット (日本ジェネティクス社) を用いて精製し (20 μl 回収)、塩化カルシウム法により *E. coli* JM109 株に導入した。取得したコロニーを新たに LB 培地にて 37 °C 一夜振とう培養した培養液 3 ml からプラスミド抽出キット (日本ジェネティクス社) を用いてプラスミドを抽出した (50 μl)。各プラスミドについて、サンガー法に基づき persulcatusin をコードする遺伝子内のシステインがアラニンに置換されていることを検証した。シーケンス解析の結果、設計通りに正しく塩基配列が置換されているシステイン残基置換誘導体の各発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) に塩化カルシウム法により導入し、高発現株を構築した。その後、高発現株に対して項目(2)および(3)に記載した方法に基づき、キメラタンパク質の精製、抗菌活性評価を実施した。

4. 研究成果

(1) 組換え型 persulcatusin 高発現系の構築

CaM と persulcatusin が融合したキメラ遺伝子をもつ組換えプラスミドを導入した形質転換体からプラスミドを分離し、それらの制限酵素解析を行った結果、*NdeI* と *XhoI* による切断をしたサンプルにおいて、キメラ遺伝子に相当する約 600 bp の断片が認められた。また、TEV 領域に 1 カ所ある *KpnI* による切断の結果、約 6.3 kbp の一本鎖 DNA 断片が認められ、設計した組換え型プラスミドの構築を検証することができた (図 3)。次に、塩基配列を決定し構築した発現ベクターに組み込んだ CaM-persulcatusin キメラ遺伝子の配列を確認することができた (data not shown)。

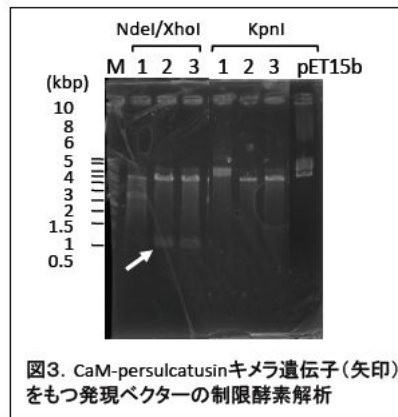


図3. CaM-persulcatusinキメラ遺伝子(矢印)をもつ発現ベクターの制限酵素解析

(2) 組換え型 persulcatusin の発現と精製

組換え型 persulcatusin 発現ベクターを有する形質転換体を IPTG 誘導後、細胞を破碎して得た培養上清試料を Ni-NTA レジンでアフィニティー精製した結果、キメラタンパク質 (CaM-persulcatusin) に相当する約 24.4 kDa のバンドが観察された (図 4)。次に、溶出したサンプルを TEV プロテアーゼ処理する目的で溶媒交換した後、TEV 切断したところ、融合タンパク質のバンドがほぼ消失し、CaM に相当する分子量が約 1.8 kDa に低下したバンドが認められた (図 4)。このことから、高発現させた組換え型 persulcatusin の部分精製に成功したことが明らかとなった。

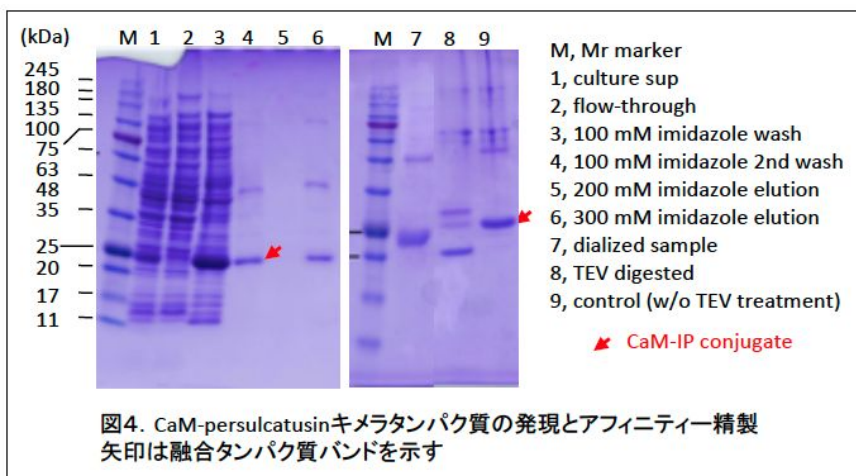


図4. CaM-persulcatusinキメラタンパク質の発現とアフィニティー精製
矢印は融合タンパク質バンドを示す

(3) 組換え型 persulcatusin の抗菌活性の評価

組換え型 persulcatusin の抗菌活性を評価するために、キメラ遺伝子をもつ個々の異なる 3 つの形質転換クローンを IPTG 存在下で培養し部分精製した後、TEV プロテアーゼ切断に供するためにバッファー交換した。この各試料を TEV プロテアーゼ切断した結果、図 5 に示すように、試料 1 と試料 3 において未切断の CaM-persulcatusin 融合タンパク質が残っていたが、切断後遊離した CaM と分子量が約 4,000 kDa の persulcatusin のバンドが認められた (図 5)。試料 2 については発現が弱いことが分かった (図 5)。

上記の部分精製した persulcatusin を TEV プロテアーゼで 30 分、一夜処理した試料を分離操作をせず直接ペニシリンカップに添加し、*S. aureus* 209P 株に対する抗菌活性を評価した結果、生産量の多かったクローン #1 と #3 において TEV 無処理試料に比べ明らかな生育阻止ゾーンの増強が認められた。この結果は、TEV プロテアーゼによってタグである CaM から遊離した persulcatusin の抗菌活性が発揮されたためと考えられる。興味深いことに、TEV プロテアーゼで切断していない融合タンパク質の状態でもクローン #1 と #3 はフリーの persulcatusin ほどではないが抗菌活性を示した。一方、産生量の少なかったクローン #2 の試料については抗菌活性がクローン #1 と #3 より弱く、用量依存的な抗菌活性を示した。

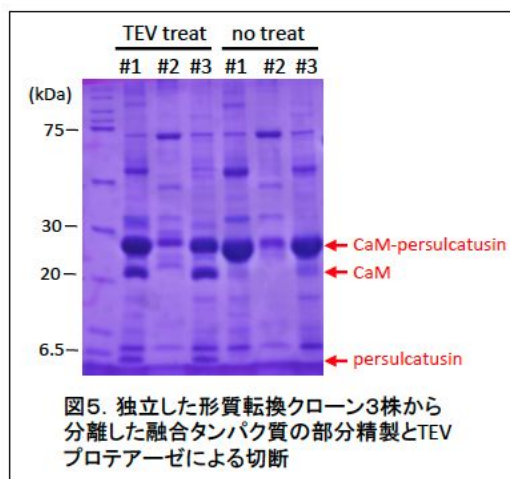
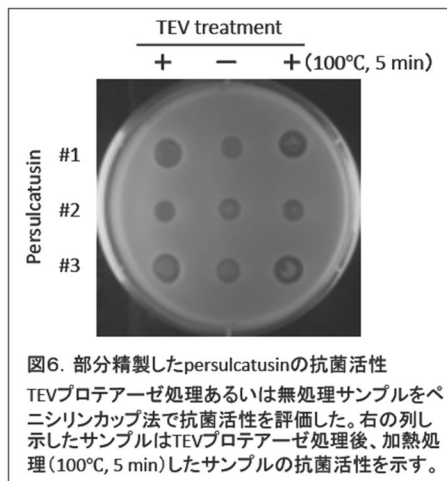


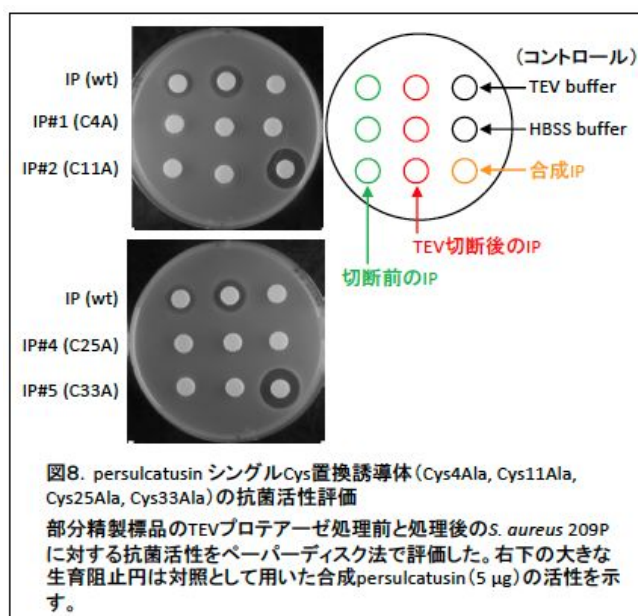
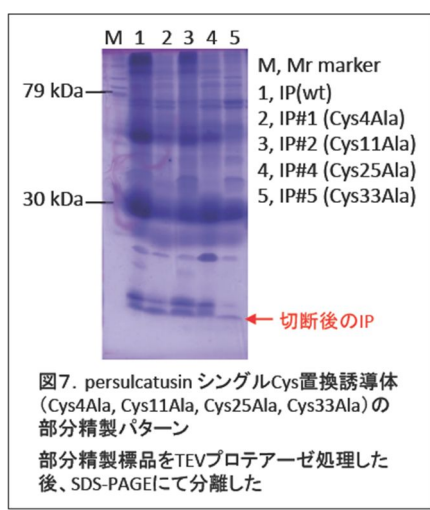
図5. 独立した形質転換クローン3株から分離した融合タンパク質の部分精製とTEVプロテアーゼによる切断

また、persulcatusinの熱に対する安定性について検討するために TEV プロテアーゼ処理した各サンプルの抗菌活性を評価した結果、著しい抗菌活性を示し加熱処理していない試料をほぼ同等の活性を有していた(図6)。



(4) ディフェンシンファミリーの抗菌ペプチドに特有のシステイン残基置換誘導体の構築と活性評価

ディフェンシンファミリーの抗菌ペプチドはその特徴として分子内に 6 個のシステイン残基をもちそれぞれが特徴的な 3 組のジスルフィド結合をすることが知られている。そこでディフェンシンファミリーに属する persulcatusin のシステインの構造と活性に及ぼす影響を調べるために、個々のシステインをアラニンに置換した置換誘導体を構築しそれらの抗菌活性を評価することにした。6 個のシステイン残基のうち、置換誘導体の構築に成功した 4 種類のシングル誘導体 (Cys4Ala, Cys11Ala, Cys25Ala, Cys33Ala) を誘導発現させ Ni-NTA レジンで部分精製したところ、図7に示すように各置換誘導体の高発現が認められた。次いで、これらの置換誘導体の部分精製標品を TEV プロテアーゼで分解後、ペーパーディスク法で抗菌活性を評価した結果、野生型 persulcatusin は TEV プロテアーゼで抗菌活性の増強が認められたが、4 種類すべての置換誘導体は TEV プロテアーゼ処理後の抗菌活性が認められなかった(図8)。このことは、persulcatusinのそれぞれのCys残基は分子内でジスルフィド結合を形成することが抗菌活性の発現に重要であることが明らかとなった。今後、Cys15とCys35のシングル置換誘導体、そして、予想される3組のジスルフィド結合に相当する二重置換誘導体を構築し、それらの抗菌活性を評価することによって persulcatusin 内の各 Cys 残基の構造と活性に及ぼす影響について検証する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 下田 蒼、米山 裕	4. 巻 56
2. 論文標題 昆虫の自然免疫を担う抗菌ペプチド	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 36-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下田 蒼、伊藤隼哉、仲川清隆、安藤太助、米山 裕
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌に対するマグニ由来抗菌ペプチドPersulcatusinの抗菌活性評価
3. 学会等名 第65回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下田 蒼、安藤太助、米山 裕
2. 発表標題 大腸菌を宿主とした昆虫デフェンシン生産系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第155回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下田 蒼、伊藤隼哉、仲川清隆、安藤太助、米山 裕
2. 発表標題 昆虫由来抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性の特性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下田 蒼、宮澤亮太、櫻庭大騎、松田敬一、安藤太助、米山裕
2. 発表標題 牛乳房炎罹患牛由来黄色ブドウ球菌に対するマダニ由来抗菌ペプチドの抗菌活性評価
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下田 蒼、伊藤隼哉、仲川清隆、安藤 太助、米山 裕
2. 発表標題 マダニ由来抗菌ペプチドPersulcatusinに対する耐性機構の解明
3. 学会等名 第15回細菌学会若手コロッセウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下田 蒼、伊藤隼哉、仲川清隆、安藤太助、米山裕
2. 発表標題 Identification of the genes associated with the resistance to antimicrobial peptide from hard tick
3. 学会等名 第95回日本細菌学会 若手コロッセウム
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	安藤 太助	東北大学・農学研究科・助教	
	(Ando Tasuke)		
	(40250732)	(11301)	

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
---------	---------