

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560725

研究課題名(和文) 米由来抗菌タンパク質のプロテオーム解析と  
その歯周病菌に対する殺菌作用機構の解明研究課題名(英文) Proteomic analysis of antimicrobial proteins from rice grain  
and clarification of their action mechanisms against periodontal  
pathogenic bacteria

研究代表者

谷口 正之 (TANIGUCHI MASAYUKI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00163634

研究成果の概要(和文)：米由来タンパク質から歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌性を示すペプチドを見出した。このペプチドを構成するアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸の抗菌性に対する寄与を検討した結果、C末端のアルギニンとリジンが重要であることが明らかとなった。また、抗菌作用機構を細胞膜脱分極アッセイと単一ジャイアントベシクルの顕微鏡観察によって検討した結果、このペプチドは細胞膜を破壊することによって抗菌性を発揮することがわかった。したがって、この米由来ペプチドは歯周病を予防するための医薬品や食品の素材として有用であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the partial peptide CH 14-25 (RRLMAAKAESRK), identical with aa 14-25 of rice cyanate hydratase, has an antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis*. We examined not only the contribution of cationic amino acid residues (R and K) of this peptide to the antimicrobial activity but also the action mechanisms of these CH peptides by the membrane depolarization assay and the microscopic observations of giant unilamellar vesicles. The results obtained indicate that the R24 and K25 residues are important for the CH peptides to exert their antimicrobial activity. The results obtained also indicate that the CH peptides depolarized the cytoplasmic membrane, resulting in the antimicrobial action. Our observations indicate that the CH peptides will be useful to develop preventive drugs and foods against periodontal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：歯周病、抗菌ペプチド、米タンパク質、食品素材

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、米糠タンパク質画分に歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の増殖阻害因子が存在するを見出した。そこで、米のシスタチン(オリザシスタチン)の抗菌作用に着目

し、3種類のオリザシスタチンを組換えタンパク質として調製し、その性質と歯周病菌に対する抗菌活性を測定した。しかし、それらの成分は歯周病菌のプロテアーゼ(Arg-gingipain)活性を阻害したが、抗菌

活性を示さなかった。そこで、米糠から抗菌タンパク質を精製した結果、陽イオン交換樹脂に吸着する成分および非吸着成分はともに抗菌活性を示した。また、精白米から Arg-gingipain に結合するタンパク質を精製し、質量分析計で解析した結果、研究開始当初に 6 種類のタンパク質を同定できていた。それらのタンパク質中の予想共通(類似)配列 (RRLMAAKAESRK) を合成し、抗菌活性を測定した結果、濃度に依存した抗菌活性を確認できていた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果に基づいて、米の抗菌タンパク質・ペプチドの網羅的な解析と歯周病菌に対する抗菌活性の発現機構の解明に焦点を絞って、次の 4 点を明らかにすることを目的とした。

(1) 歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* に対する米由来抗菌タンパク質を、各種クロマトグラフィーと電気泳動および飛行時間型質量分析計 (TOF/MS) を用いて網羅的に検索・同定する。

(2) 歯周病菌の濃度が低い場合でも、高感度に抗菌活性を測定できる DNA 蛍光ラベル法または ATP 化学発光法を確立し、抗菌タンパク質間の活性と構造の関係を解明する。

(3) 米糠と精白米中の複数の抗菌タンパク質について、活性発現に不可欠な共通アミノ酸配列を決定する。また、構成する主要アミノ酸の抗菌活性に対する寄与を解明する。

(4) 各種抗菌ペプチドの *P. gingivalis* に対する殺菌作用機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) LC-AutoSpotter と TOF/MS を用いた米糠由来の抗菌タンパク質の網羅的検索と同定

米糠抽出液を 90°C で 10 分間加熱した後、主に透析→ゲル濾過→分取用等電点電気泳動→陽イオン交換クロマトグラフィーによって、部分精製を行った。その後、最近開発した高感度二次元電気泳動によって分離した後、スポットをゲル内消化し、MS 分析を行った。または、液体クロマトグラフィー (LC) で分画しながら自動的に MS 用ターゲットにスポットし、TOF/MS 分析を行った。得られた結果をデータベース (Mascot) 検索し、データ解析 (Biotools) を行った。

(2) LC-AutoSpotter と TOF/MS を用いた精白米由来の抗菌タンパク質の網羅的検索と同定

精白米の緩衝液 (中性) 抽出液を、主にゲル濾過した後に Arg-gingipain をリガンドとした磁気ビーズを用いてアフィニティ精製を行った。溶離液をトリプシンで消化し、MS 分析を行った。また、分取 LC システムでさらに精製した後に TOF/MS 分析を行い、同定を行った。

(3) 高感度な抗菌活性測定法の確立と天然型成分のアミノ酸配列と抗菌活性の関係の解明

大腸菌の増殖を測定できる DNA 蛍光ラベル法を参考に、蛍光色素 (acridine orange, ethidium bromide, DAPI, SYBR green, PicoGreen など) の種類、グルタルアルデヒドと還元試薬を用いた染色固定方法、rRNA の妨害反応などについて検討し、歯周病菌 *P. gingivalis* JCM 8525<sup>1</sup> に対する抗菌活性を高感度に測定する方法を確立することを試みた。DNA 蛍光ラベル法による高感度化が達成されなかったため、濁度法に比べて高感度な ATP 化学発光法を用いた抗菌活性測定法を確立することを試みた。これらの高感度な抗菌活性測定法を用いて、天然型の抗菌タンパク質・ペプチド間で活性を比較し、アミノ酸配列や二次構造などの類似性を検討した。

(4) 天然型抗菌ペプチドとそれをアラニン (Ala) で置換した合成ペプチドの抗菌活性の比較解析

既に活性を見出している抗菌ペプチド (RRLMAAKAESRK) を含めて、代表的な抗菌タンパク質に共通するアミノ酸配列 (例えば 12-15 mer) を選択し、構成するアミノ酸の抗菌活性に対する寄与を解明するために、塩基性アミノ酸を Ala で置換した合成ペプチド (外部に委託して合成) を用いて抗菌活性を測定した。特に、塩基性アミノ酸であるアルギニン (Arg) と リジン (Lys) の役割について、他の抗菌ペプチドのアミノ酸組成と比較しながら検討した。

(5) 抗菌ペプチドの歯周病菌に対する殺菌作用機構の解明

代表的な抗菌ペプチドの *P. gingivalis* に対する殺菌作用機構を、細胞膜への作用と細胞内容物への作用に分けて検討した。前者の細胞膜への直接的な作用は、①グラム陰性菌の細胞膜のモデルである POPC/POPG からなる

単層ベシクルを調製し、抗菌ペプチドによるベシクル内からの蛍光色素 (Calcein) の放出を測定することによって評価した。また、②EDTA で処理した *P. gingivalis* に取り込ませた膜電位感受性プローブ (diSC<sub>3</sub>(5)) の漏出を測定することによって評価した。細胞内容物との相互作用は、電気泳動法を用いて抗菌ペプチドと DNA との結合について検討した。これらの結果から、抗菌ペプチドのアミノ酸組成・配列と殺菌作用機作の関係について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 歯周病菌のプロテアーゼを阻害する米由来ペプチドが、抗菌活性を有することを発見した。また、碎米から抽出したタンパク質溶液から各種クロマトグラフィーや電気泳動を用いて、歯周病菌に対して抗菌性を示す1種類のタンパク質成分を、図1に示すように単一にまで精製できた。

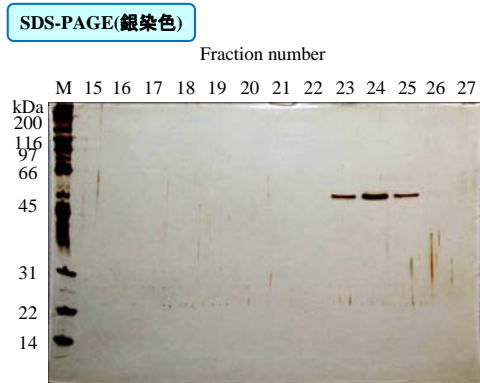


図1 抗菌タンパク質の精製結果

(2) 歯周病菌の濃度が低い場合でも、高感度に抗菌活性を測定するための方法を確立するために、DNA 蛍光ラベル法または ATP 化学発光法について測定条件を最適化し、従来の濁度法とその性能を比較検討した。その結果、ATP 化学発光法は他の方法に比べて、比較的広い濃度範囲で再現性よく抗菌活性を測定できることがわかった。

(3) Arg-ジンジパインに結合する14種類の精白米由来タンパク質のアミノ酸配列を比較検討し、Arg と Lys に富んだ12残基のアミノ酸から構成されるペプチド [CH(14-25)] を抗菌ペプチドの候補として選択した。このペプチドを化学合成(外注)し、歯周病菌に対する抗菌活性を、本研究で確立した ATP

化学発光法を用いて測定した。その結果、50%増殖を阻害する濃度は、図2に示すように145  $\mu$ g/mLであることがわかった。

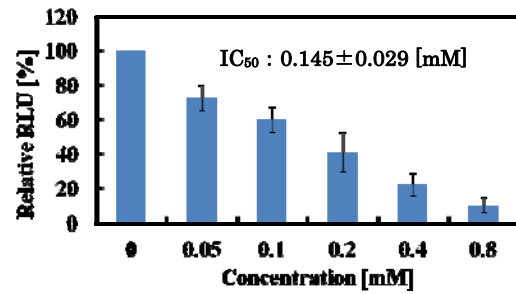


図2 ペプチド CH(14-25)の抗菌活性

(4) CH(14-25)のC末端の Arg と Lys の2残基を Ala に置換した場合に、それぞれの抗菌活性が、図3に示すように大幅に低下した。したがって、C末端の Arg と Lys の2残基が特に抗菌活性に大きく寄与していることを明らかにした。さらに、抗菌作用機構を明らかにするために、細菌の細胞膜を模倣した単一ジャイアントベシクル(GUV)を調製し、次に CH(14-25)を添加したときの GUV の形態変化を、顕微鏡を用いて直接観察した。その結果、図4に示すように、CH(14-25)は GUV を破裂することが明らかとなった。

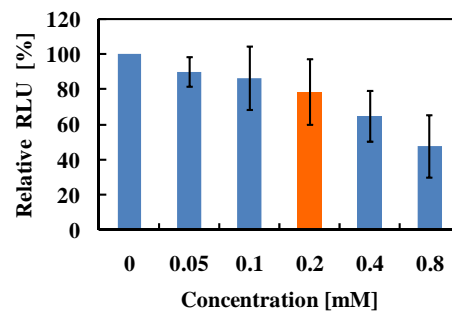


図3 アラニン置換ペプチドの抗菌活性

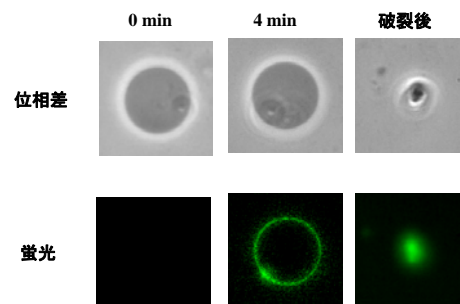


図4 ペプチドによる GUV の破壊作用

したがって、CH(14-25)ペプチドは、細胞膜を破壊することによって、歯周病菌を殺菌することが示唆された。

#### 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 1 件)

- ① M. Taiyoji, Y. Shitomi, M. Taniguchi, E. Saitoh, and S. Ohtsubo : Identification of Proteinaceous Inhibitors of a Cysteine Proteinase (an Arg-specific Gingipain) from *Porphyromonas gingivalis* in Rice Grain, Using Targeted-proteomics Approaches. *J. Proteome Res.*, 査読有, Vol. 8, No. 11, 5165- 5174 (2009).

[学会発表] (計 13 件)

- ①武井教展、米タンパク質由来 CH ペプチドとそのアラニン置換体の抗菌活性およびその機構、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都。
- ②N. Takei, A partial peptide and its analogs of rice cyanate hydratase inhibit growth of a periodontal pathogenic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), 2010年12月18日、Honolulu, Hawaii, USA.
- ③落合秋人、*Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌活性を有する新規米由来タンパク質の検索と同定、日本生物工学会、2010年10月29日、宮崎。
- ④谷口正之、米タンパク質由来 CH ペプチドの口腔細菌に対する抗菌作用とその機構の解明、日本生物工学会、2010年10月29日、宮崎。
- ⑤高橋信輝、米タンパク質由来 CH ペプチドの歯周病菌に対する抗菌作用とその機構の解明、日本食品工学会、2010年8月5日、東京。
- ⑥池田丈一郎、米由来抗菌タンパク質の精製とその病原性微生物に対する抗菌作用、日本食品工学会、2010年8月5日、東京。
- ⑦高柳智博、米タンパク質由来 CH ペプチドの抗菌活性に及ぼす構成アミノ酸の影響、日本食品工学会、2010年8月5日、東京。

- ⑧武井教展、*Porphyromonas gingivalis* に対する米タンパク質由来 CH ペプチドの抗菌活性とその作用機構、2010年3月29日、日本農芸化学会、東京。
- ⑨T. Kouya, Growth inhibitory activity of antimicrobial peptides from rice against oral pathogenic bacteria and clarification of their action mechanism. Asia Pacific Biochemical Engineering Conference, 2009年11月25日、Kobe.
- ⑩高橋信輝、米タンパク質由来ペプチドのヒト病原菌に対する抗菌作用とその機構の解明、日本生物工学会、2009年9月23日、名古屋。
- ⑪小磯裕介、抗菌活性測定法の高感度化とそれを用いた植物由来抗菌タンパク質の検索、日本生物工学会、2008年8月28日、仙台。
- ⑫高屋朋彰、歯周病菌に対する米由来抗菌タンパク質の検索および分離同定、日本生物工学会、2008年8月28日、仙台。
- ⑬高屋朋彰、米由来抗菌タンパク質の検索とその抗菌作用の解明、日本食品工学会、2008年8月5日、東京。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：プロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤  
発明者：太養寺真弓、大坪貞視、谷口正之  
権利者：新潟県、新潟大学  
種類：特許公開  
番号：特開 2009-84161  
出願年月日：2009年4月23日(公開日)  
国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷口 正之 (TANIGUCHI MASAYUKI)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：00163634

##### (2) 連携研究者

大坪 貞視 (OHTSUBO SADAMI)  
新潟県農業総合研究所・食品研究センター・専門研究員  
研究者番号：10503625