

平成22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20780098
研究課題名 (和文) 糖修飾したタンパク質を分離源としたバイオフィーム形成阻害ペプチドの探索と機能解析
研究課題名 (英文) Screening of peptide inhibiting biofilm formation from glycated protein
研究代表者 野間 誠司 (NOMA SEIJI) 九州大学・大学院農学研究院・助教 研究者番号：40392071

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、メイラード反応により糖修飾した食品由来タンパク質を分離源として得た新規ペプチドの中から、黄色ブドウ球菌バイオフィームの形成を阻害するペプチドを探索・特定し、その機能を解析することを目的とした。目的の作用を示すペプチド LKG を得ることができ、その作用は糖を付加して初めて得られるものであった。また、当該ペプチドは、黄色ブドウ球菌の生育を阻害することで作用を示すと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Since microorganisms show high resistance to chemical and physical stresses when forming biofilm, inhibition of biofilm formation is important for their effective inactivation. We screened a novel peptide inhibiting biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from α -lactalbumin glycated by glucose. The peptide without glycation did not show the inhibitory effect. The glycated peptide inhibited the proliferation of *S. aureus* cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸科学・食品化学

キーワード：① 食品、② 衛生、③ 蛋白質、④ 糖、⑤ 細菌

1. 研究開始当初の背景

メイラード反応はアミノ酸のアミノ基と還元糖のカルボキシル基との縮合反応であり、加熱により触媒される。本反応は食品の調理や加熱殺菌の過程でごく一般的に見られる反応であるため、コスト、簡便性に優れている。申請者はこれまでメイラード反応による糖付加を利用してタンパク質の機能改

変を図ってきた。その中で、オボアルブミン (OVA) にグルコース (Glc) を付加すると、抗 OVA 抗体に対する反応性が顕著に低下する結果を得ている。この結果は、タンパク質の相互作用が Glc の付加に伴う立体障害により阻害されたことに起因すると考えられる。そこで申請者は、糖を付加することによりプロテアーゼの作用が制限され、通常では

決して出現しない全く新しいペプチド断片を得ることができると考えた。実際に、Glc を付加すると、ウシ血清アルブミンのトリプシン消化プロファイルが変化することを確認している。本着想は、研究し尽くされた食品由来タンパク質であっても、新たな機能性を有するペプチドの分離源として利用できることを意味している。

一方、バイオフィームとは吸着担体上の微生物フィルムのことであり、一旦形成されて成熟化してしまうと、洗浄・殺菌が困難になる。したがって、食品製造機械の配管中にバイオフィームが形成されれば、食品衛生上深刻な問題を引き起こす恐れがある。この問題を解決する手段として、洗浄液にバイオフィームの形成を阻害する活性を有する物質を添加することが考えられる。現在までにそのような作用を示す物質として抗生物質やクオラムセンシング阻害剤等が報告されている。しかし、これらを食品と直接接する製造装置の洗浄に用いるには安全性や価格の面から問題が多い。そこで申請者は、上記の着想に基づいて得られるペプチドの中からバイオフィームの形成を阻害するペプチドをスクリーニングしたいと考え、研究を開始した。

食品由来タンパク質 (OVA、ホエー) に Glc を付加した後、パパインで加水分解して得られたペプチドの中から Glc が付加したものを選択的に分取した。これをゲルろ過クロマトグラフィーにより 5-10 程度ずつのペプチドプールに分け、バイオフィーム形成に及ぼす影響を調べた。その結果、あるペプチドプールを添加した場合、バイオフィームの形成が阻害された。このプール中にはバイオフィームの形成を阻害するペプチドが含まれていると考えられた。

2. 研究の目的

得られた候補プール中のペプチドの単離・特定を目指す。さらに、得られたペプチドを合成し、その性質やペプチドの作用機構について解析する。

3. 研究の方法

(1) プール中のペプチド単離のための分離メソッドの検討

① 逆相クロマトグラフィー

カラムは Atlantis T3 (2.1×50 mm, 3 μm, Waters) を使い、溶離液は A 液を水+0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)、B 液をアセトニトリル+0.1%TFA とし、グラジエント分析 (0分, B2%; 5分, B10%; 70分, B35%; 75分, B100%) を行った。検出は UV 検出器を用いて 220 nm で行った。

② 親水性クロマトグラフィー

カラムは Atlantis HILIC Silica Column, 2.1 ×

150 mm, 3 mm (Waters) を用いた。移動相組成 (アセトニトリル、メタノール、水、TFA の濃度) および流速 (0.05 mL/min から 0.3 mL/min) を検討した。なお、検出は UV 検出器を用いて 220 nm で行った。

(2) 質量分析

ESI-IT MS (HCT-Ultra System, Bruker Daltonics) を用いて糖付加ペプチドの質量分析を行った。

(3) ペプチドの合成と Glc の付加

ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成した。ペプチドの α 位のアミノ基を Fmoc 基で保護した状態で、リジンの ε 位のアミノ基にメイラード反応を用いて Glc を付加させた。その後、Fmoc 基を脱離させ、フェニルボロネートをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーにより、Glc 付加ペプチドを精製した。

(4) バイオフィーム形成阻害試験

Staphylococcus aureus を TSB 培地により一次培養した。さらに TSB 培地により OD₆₀₀ = 1.2 まで二次培養を行った。この培養液 100 μl を 2 倍濃度の TSB 培地 5 ml と混合し、菌懸濁液とした。菌懸濁液及びペプチド画分を 50 μl ずつマイクロプレートに入れ、16 時間静置培養を行ってバイオフィームを形成させた。培養液を捨て、0.1% クリスタルバイオレット 150 μl でウェル底部に付着した細胞 (バイオフィーム) を染色した。染色液を捨て、ウェルを洗浄した後、乾燥させた。これに 70% エタノールを 200 μl 分注し、色素を抽出した。各ウェルの抽出液 100 μl を別のマイクロプレートに移し、590 nm または 600 nm における吸光度を測定し、バイオフィーム形成量とした。

(5) 細胞増殖試験

バイオフィーム形成阻害活性試験と同様に調製した菌懸濁液及び上記糖付加ペプチド溶液を 50 μl ずつマイクロプレートに分注し、1 時間ごとの OD₆₀₀ を測定した。

(6) アミノ酸分析のためのサンプル調製 (ペプチドの標識と分析)

スクリーニングで得た候補サンプルプールを PITC で標識した後、逆相クロマトグラフィーに供した。カラムは Jupiter C4 (2.0×150 mm, 5 μm, Phenomenex) を使い、溶離液は A 液を水+0.1%TFA、B 液をメタノール+0.1%TFA としてグラジエント分析 (0分, B1%; 5分, B5%; 20分, B60%; 22分, B100%) を行った。検出は UV 検出器を用いて 254 nm で行った。

4. 研究成果

(1) プール中のペプチド単離のための分離メソッドの検討

① 逆相クロマトグラフィー

まず、Glc を付加したホエーをプロテアーゼ消化したものを逆相クロマトグラフィーで分析した。その結果、一部カラムに保持できずに溶出したものの、保持されたものについてはある程度分離が可能であることが分かった。そこで、プロテアーゼ消化物をフェニルボロネートをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーに供し、Glc 付加ペプチドを選択的に分取し、これを同様に逆相クロマトグラフィーで分析した。その結果、ほぼ全てのペプチドがカラムに保持されずに溶出した (図 1)。これらの結果から、Glc 付加ペプチドは極性が非常に高く、逆相クロマトグラフィーによる分離・分析は困難であると考えられた。

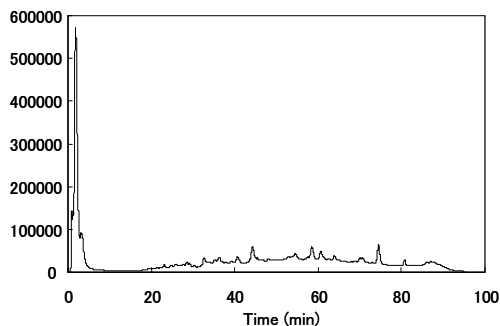


図 1. Glc 付加ペプチドの逆相クロマトグラフィー分析

② 親水性クロマトグラフィー

Glc 付加ペプチドは親水性が高いため、逆相カラムでの分離・分析は困難であった。そこで hydrophilic interaction chromatography (HILIC) による分離を行った。HILIC カラムは親水性相互作用により分離するもので、逆相で保持が困難な高極性化合物を保持することができる。また、溶離液中の有機溶媒濃度が高いため、ESI-MS の感度改善が可能である。本実験では、HPLC による分離後、ESI-MS による質量分析を行うことを想定し、このカラムを用いた分離・分析条件の最適化を行った。その結果、移動相に acetonitrile : methanol : aceton = 95 : 2 : 3、TFA 0.01% を使い、流速 0.1 mL/min で行うことが望ましいと考えられた。

(2) 質量分析

本実験の Glc 付加ペプチドは、フェニルボロネートをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーで分取したものであるため、アマドリ化合物と考えられる。また、ESI-MS で得られる質量数はプロトンが付加

した値であるため理論値より 1 だけ大きくなる。そのため、糖付加ペプチドのアミノ酸配列部の分子量は、得られた質量数より $162 + 1 = 163$ 小さい値である。一方、ペプチドの分離限として用いたホエーは、その大部分が β -lactoglobulin 及び α -lactalbumin である。そのため、これらの配列から、上記のように得られたアミノ酸配列部の分子量と等しい分子量をもち、かつ塩基性アミノ酸を含む配列を検索することにより、本実験で活性を示した糖付加ペプチドのアミノ酸配列を推定できると考えられる。

最適化した親水性クロマトグラフィー条件を用いて、候補プール中の Glc 付加ペプチド画分を HPLC-ESI-MS 分析に供した。得られたトータルイオンクロマトグラムから HILIC ではペプチドの分離が完全ではないと考えられた。しかし、得られた質量の中から、0.1% 以下の誤差で一致する配列を検索したところ、 β -lactoglobulin 及び α -lactalbumin から 1 種類ずつ仮説に合致する配列 (KVA、LKG) が見出された。

(3) バイオフィーム形成阻害試験

得られた 2 種類の配列を Fmoc 固相合成法により合成し、Glc を付加しない状態でバイオフィームの形成を阻害するのかが調べた。その結果、ほとんど影響を及ぼさず、ペプチドの配列はバイオフィームの形成に関与していないことが明らかとなった (図 2)。

そこで次に、配列中に含まれるリジンの ϵ 位に Glc を付加したものを調製し、バイオフィーム形成阻害試験に供した。その結果、特に LKG において濃度依存的にバイオフィームの形成を阻害した (図 3)。これらの結果から、バイオフィーム形成阻害ペプチドがその作用を示すためには、Glc の付加が必須であると考えられた。これらのバイオフィーム形成阻害ペプチドは、Glc を付加した後にプロテアーゼ処理したからこそ得られたものであると考えられた。

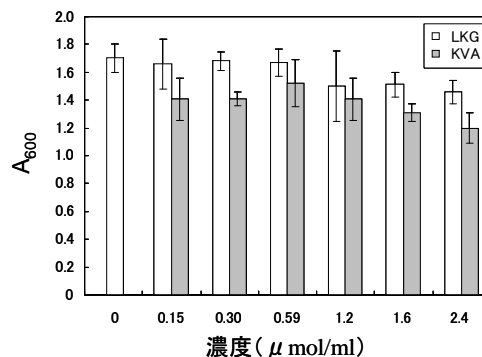


図 2. LKG および KVA がバイオフィーム形成に及ぼす影響

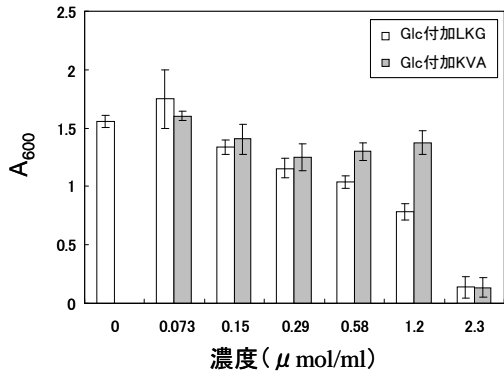


図 3. Glc の付加が LKG および KVA のバイオフィーム形成阻害作用に及ぼす影響

(4) 細胞増殖試験

生育に影響を及ぼさない場合、固体表面への付着阻害やクオラムセンシング阻害による細胞外多糖の分泌阻害がバイオフィーム形成阻害の一因となっていることが推察できる。一方、生育を阻害している場合では、菌数が少ないためバイオフィームを形成するには至らないと考えられる。

そこで、Glc 付加ペプチドの生育阻害活性について検討した。その結果、Glc 付加 LKG は 6 時間培養後において、濁度の増加はコントロールと比べ半分程度に抑えられた (図 4)。すなわち、生育阻害活性を有すると考えられた。この結果から、Glc 付加 LKG は菌数の増加を抑えた結果、バイオフィーム形成阻害を行っていると考えられた。Glc 付加 LKG が濃度依存的にバイオフィーム形成阻害を示したことから、生育阻害が濃度依存的に起きており、Glc 付加 LKG 濃度のより高い場合ではより増殖が抑えられ、バイオフィームの形成を阻害していることが考えられた。

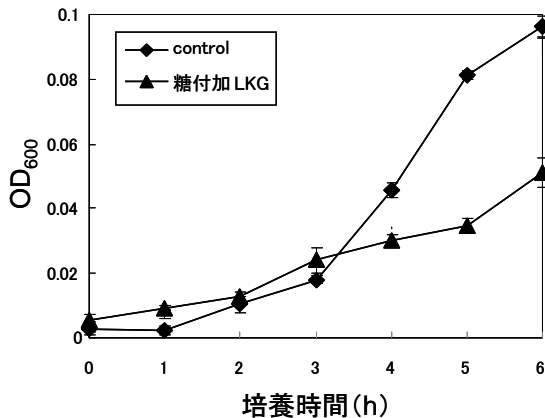


図 3. Glc 付加 LKG が *S. aureus* の増殖に及ぼす影響

(5) アミノ酸分析のためのサンプル調製 (ペプチドの標識と分析)

これまでに候補ペプチドを合成し、一定の成果を挙げてきた。しかし、これ以外の候補ペプチドについても決定を目指すことにした。ここでは直接的にアミノ酸組成を調べることによって特定を目指すことにした。バイオフィームの形成を阻害したプール中の Glc 付加ペプチドの α 位のアミノ基を PITC により標識して疎水性を低下させた上で逆相クロマトグラフィーにより分離・分取し、プレカラム法を用いたアミノ酸組成分析を行うべく基礎検討を行った。

分析にはペプチドプール番号 57、62、64 を用いた。バイオフィーム形成阻害活性は 62 > 64 > 57 の順である。PITC 標識したペプチドの分析結果を図 5 に示す。まず、PITC で標識することにより、逆相カラムへの保持が劇的に改善されることが確認された。高い阻害活性を示すプールには、その作用を示す Glc 付加ペプチドが多く含まれていると考えられる。各ピークについて面積比を計算したところ、矢印で示すピークが活性の強度とよく一

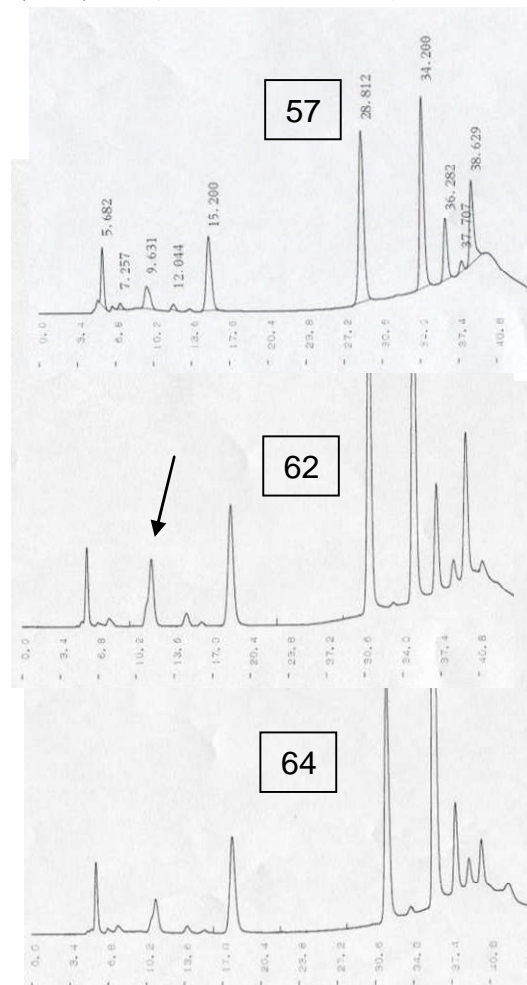


図 5. PITC 標識したペプチドプールの逆相クロマトグラフィー分析

致した。しかし、目的のピークはなお親水性が非常に高く、カラムとの相互作用がごく弱いと推測される時間に溶出している。現在、このピークを単離の上、分取し、アミノ酸分析に供するべく、分離条件を検討中である。

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 2 件)

1. S. Noma, M. Sumikawa, Y. Tsubokura, T. Inoue, M. Tomozane, N. Igura, M. Shimoda
Comparison of Solid-State Glycation of Whey Proteins through Maillard Reaction between Microwave and Conductive Heating
Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University 査読無、Vol.54、No.1、2009、pp 191-194.
2. Y. Tsubokura, S. Fukuzaki, S. Noma, M. Sumikawa, N. Igura and M. Shimoda
Glycation of Ovalbumin in Solid-State by Conductive and Microwave Heating
Food Science and Technology Research 査読有 Vol. 15、No. 4、2009、pp 377-380

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野間 誠司 (NOMA SEIJI)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：40392071

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：