

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05768

研究課題名（和文）サンゴ抗菌ペプチドの立体構造解析による膜作用機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of structure-function relationship of antimicrobial peptides from the coral *Acropora digitifera*

研究代表者

岡井 公彦（OKAI, Masahiko）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：00596562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：ココビミドリイシサンゴ *Acropora digitifera* のゲノム情報から2つの抗菌活性を示すペプチド（AMP0027、AMP0252）を取得した。AMP0027はグラム陽性菌 *Bacillus subtilis* に対して最も高い抗菌活性を示した。AMP0027で処理した *B. subtilis* を走査型電子顕微鏡（SEM）で形態観察したところ、細胞膜に孔をあけていた。構造予測の結果より、2つの抗菌ペプチドはそれぞれ脂質二重膜の疎水領域と酸性領域に結合する領域を持つことが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ココビミドリイシサンゴ *Acropora digitifera* のゲノムから推定して得た2つの抗菌ペプチド（AMP）は、これまで知られているAMPと一次構造の相同性がなく、サンゴ独自のAMP遺伝子であることが示唆され、新たなAMPファミリーの提案につながるというのが学術的意義である。サンゴや貝類など海産無脊椎動物の病原菌、魚類等の養殖業における病原性細菌や水産加工分野における新たな抗菌治療薬として期待できるのが社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：We discovered two antimicrobial peptides from the coral *Acropora digitifera*. AMP0027 exhibited the highest antimicrobial activity against a gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. As a result of direct observation of AMP0027-treated *B. subtilis* using scanning electron microscopy (SEM), large dimples formed on cell surfaces of *B. subtilis*. A structural prediction showed that the two antimicrobial peptides can be divided into potentially neutral and positive regions, respectively. They are predicted to interact with the core and surface of bacterial cell membranes.

研究分野：構造生物学

キーワード：サンゴ 抗菌ペプチド 抗菌作用 立体構造

1. 研究開始当初の背景

「海のゆりかご」とも呼ばれるサンゴ礁には全海洋生物の約 25%が生息しており、生物多様性の保全上、極めて重要な生態系である。刺胞動物であるサンゴは、褐虫藻と共生して光合成産物を提供させているが、体表・体内に細菌などの様々な微生物を共在させて一つの生物のように振る舞う生命体は、まとめて「ホロビオント」と言い表される。しかし、このホロビオントは様々なストレスを受けると崩壊し、褐虫藻が離脱して白化状態に陥り、やがてサンゴは死滅する。2016年には国内最大規模を誇る沖縄県石西礁湖のサンゴ礁の約 70%が死滅するという壊滅的な被害が報告された。さらに海水温上昇によりサンゴの免疫力が低下したり、病原細菌の毒性が強くなったりすることで、共生している褐虫藻やサンゴが病気になるという観察例が多く報告されている。このペースが続くと 30 年後には世界のサンゴ礁は消滅してしまうと考えられている。

サンゴの感染症はサンゴ礁減少の大きな一因であり、減少の 6%ほどが細菌感染症によるものとされている。感染症の種類や感染が確認された宿主、地理的分布は 1970 年代後半のカリブ海での報告を皮切りに年々増えてきているが、病原が特定されている感染症はまだ数種類と少ない。最も重篤なサンゴの病気の一つに、病原細菌 *Vibrio coralliilyticus* (以下 VC) が引き起こすピブリオ感染症がある。サンゴに侵入して増殖した VC は、サンゴ体内に共生している褐虫藻の破壊 (細菌性白化) や組織分解によるサンゴの壊死 (ネクローシス) を引き起こす。これらの外敵に対し、サンゴなどの無脊椎動物は脊椎動物が持つ獲得免疫を持たず、自然免疫機構のみで自己防御しなければならない。この自然免疫機構は「病原細菌の認識」、「細胞内シグナル伝達」、「抗菌ペプチド (Antimicrobial peptide; AMP) 生産による免疫応答」の三段階に分けることができる (Fig. 1)。細菌を認識する Toll 様受容体やシグナル伝達に関わる遺伝子については生物間で高度に保存されており、モデル生物であるショウジョウバエと類似な遺伝子がサンゴにおいても見つかっている。しかし、生物が生息環境に合わせて様々に進化させてきた AMP は、太平洋・インド洋のサンゴ礁で最も数の多い優占種であるミドリイシサンゴにおいて一つも同定されておらず、新規な AMP の特徴を備えていることが予想されたことから以下の本研究を行った。

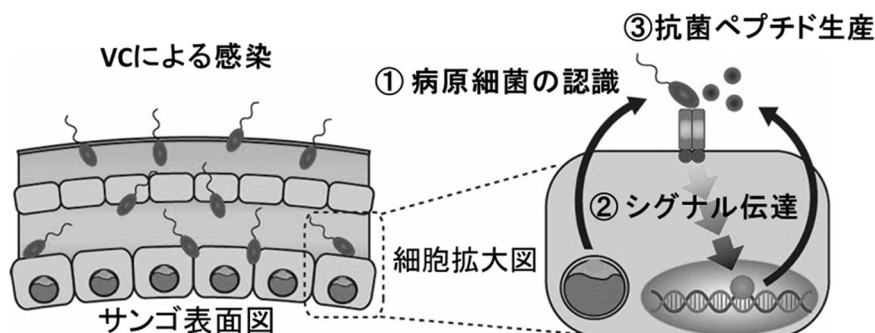


Fig. 1 VC に対するサンゴ自然免疫機構モデル

2. 研究の目的

本研究では、サンゴ AMP の構造と機能を解明して生体防御物質としての役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、ココビミドリイシサンゴ *Acropora digitifera* の AMP を対象として、組換えペプチドを生産して立体構造を決定し、膜作用機序の結果と組み合わせる解析する。AMP はヒトを含めた哺乳類、植物、昆虫などあらゆる多細胞生物が先天的に備えている生体防御システムである。しかしながら、全ゲノム解読されているココビミドリイシサンゴ *A. digitifera* では AMP 遺伝子がアノテーションされていない。これはサンゴが独自の AMP 遺伝子を進化させてきたことを示唆している。細胞膜は進化が起ころづらく、細胞膜に孔を開けて殺菌する AMP は耐性菌が出現しづらい。従って、サンゴ AMP の立体構造と膜作用機序機構が明らかにされ、さらにより抗菌活性を高めた AMP を創出できれば、サンゴや貝類など海産無脊椎動物の病原菌 VC や世界中に蔓延して感染症を引き起こす生物に対する新たな抗菌治療薬として期待できる。また、魚類等の養殖業において細菌性疾病が発生した場合や水産加工分野における抗菌薬としての応用も可能であり、医療や医薬、水産分野への波及が大きい。

3. 研究の方法

本研究では *A. digitifera* の幼ポリプを実験に使用して VC 感染実験を行い、VC 感染状態と非感染状態の比較トランスクリプトーム解析からサンゴに VC 感染時特異的に発現変動する約 3500 遺伝子を特定した。この 3500 遺伝子からバイオインフォマティクスによって選抜した 2

つ (AMP0027、AMP0252) を対象とした。AMP は全 RNA の逆転写を行い合成された cDNA を用いて PCR 増幅し、組換えペプチド発現用ベクターに挿入後、発現用大腸菌宿主 *Escherichia coli* Rosetta2(DE3)へ導入し、発現確認を行った。その際、N 末端側にチオレドキシシンと His タグを付加される発現ベクターを用いた。発現用大腸菌宿主には細胞外に放出されることから細胞内を酸化状態にした Rosetta-gami2(DE3)も用いた。また、AMP が宿主として用いる大腸菌の生育を阻害する可能性も考慮し、酵母宿主 *Pichia pastoris* を用いた分泌発現も検討した。組換え融合ペプチドはアフィニティーカラムで精製した後、プロテアーゼ処理をしてチオレドキシシンと His タグを除去し、再度アフィニティーカラムで精製した。精製した AMP は市販の結晶化解析スクリーニングキット (Crystal ScreenHT、Wizard I&II、III&IV、IndexHT) を用いて結晶のスクリーニングを行った。さらに得られた結晶化条件の近傍で pH、沈殿剤濃度、塩濃度を变化させることで 2 次スクリーニングを行った。2 つのペプチド (AMP0027、AMP0252) は一次構造から Alphafold2 による構造予測を行った。抗菌活性試験はグラム陰性菌 (*E. coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Serratia marcescens*)、グラム陽性菌 (*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*)、サンゴ病原性細菌 (*V. coralliilyticus*、*Serratia marcescens*) を対象に最小発育阻止濃度 (MIC)、最小殺菌濃度 (MBC) 及び新たに定義した最小凝集成濃度 (MAC) を測定した。最も抗菌活性の高い細菌に対しては抗菌ペプチドを添加して走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態の観察を行った。

4. 研究成果

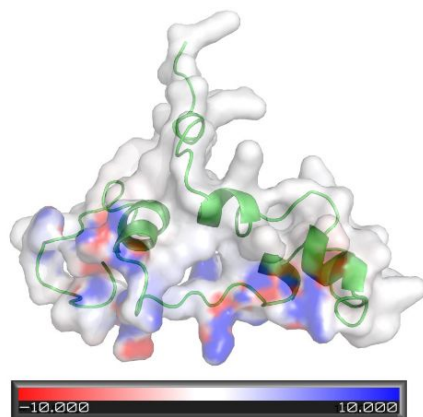
(1). AMP0027

2 回のニッケルアフィニティーカラムとプロテアーゼ処理により、SDS-PAGE で単一バンドになるまで精製した。抗菌活性試験ではグラム陰性の *E. coli* とグラム陽性の *S. aureus* に対して MAC が 5 μ M を示し、グラム陽性の *B. subtilis* に対しては MIC と MBC が 10 μ M、MAC が 5 μ M の抗菌活性を示した。さらに海洋由来の *Vibrio* 属細菌に対する抗菌活性の評価方法を検討し、サンゴの主要な病原細菌 *V. coralliilyticus* に対して殺菌効果を持つことを見出した。抗菌ペプチド処理前後における *B. subtilis* 細菌の細胞形態の変化を SEM で観察したところ、細胞のサイズが 2 μ m から 1 μ m 程度まで収縮していた。このことから AMP0027 は *B. subtilis* の細胞膜に孔をあけ、内容物を流出させて細胞収縮を引き起こす抗菌ペプチドであることが明らかになった。構造解析においてはグリセロール-3-リン酸を添加して結晶化を行った結果、1 条件で微結晶が得られたが、結晶構造を決定するには至らなかった。Alphafold2 により得られた予想構造モデルでは N 末端側と C 末端側で疎水性領域を形成し、中央部で塩基性領域を形成していたことから、それぞれ脂質二重膜の疎水領域と酸性領域に結合することが推定された (Fig. 2A)。

(2). AMP0252

ペプチド発現用ベクターに pColdI を使用して大量発現させ、精製初期段階にプロテアーゼインヒビターを加えた後、Co アフィニティーカラムと Ni アフィニティーカラムの 2 つを用いて精製することで、SDS-PAGE で単一バンドになることを確認した。抗菌活性試験では終濃度 5 μ M で多剤耐性菌 *E. coli* hfa7 を 80% 殺菌し、コンピテントセル *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS を 100% 殺菌した。AMP0252 にプロテアーゼ阻害剤を添加して *E. coli* hfa7 への抗菌活性試験を行ったところ、97% の殺菌を示したことから、AMP0252 はプロテアーゼによる影響を受けやすいことが明らかになった。構造予測より N 末端側に静電ポテンシャルが正の環境にある細菌膜結合領域を推定した (Fig. 2B)。

(A)



(B)

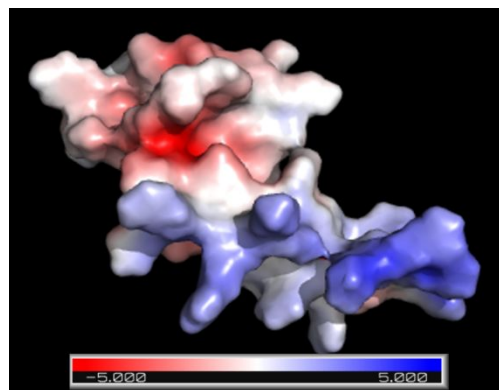


Fig. 2 構造予測モデル(A) AMP0027 の構造予測モデル. (B) AMP0252 の構造予測モデル. 下のバーは静電ポテンシャルを示しており、正の場合は青、負の場合は赤で表されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Nagashima Yuji, Fujimoto Kenta, Okai Masahiko, Kitani Yoichiro, Yoshinaga-Kiriake Aya, Ishizaki Shoichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Primary Structure and Conformation of a Tetrodotoxin-Binding Protein in the Hemolymph of Non-Toxic Shore Crab <i>Hemigrapsus sanguineus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 181 ~ 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jmse11010181	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 -

1. 著者名 Yoda Kotaro, Takagi Toshiyuki, Koito Tomoko, Okai Masahiko, Makita Hiroko, Mitsunobu Satoshi, Yoshida Takao, Inoue Koji	4. 巻 89
2. 論文標題 Heterologous expression and functional characterization of cysteamine dioxygenase from the deep-sea mussel <i>Bathymodiolus septemdirum</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-023-01674-w	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青山 華子, 岡井 公彦, 小川 展弘, 福丸 璃子, 石田 真巳, 井上 広滋, 高木 俊幸
2. 発表標題 Acropora digitifera由来抗菌ペプチドDigitiferinの作用機序予測
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会 第26回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青山 華子, 岡井 公彦, 小川 展弘, 福丸 璃子, 石田 真巳, 井上 広滋, 高木 俊幸
2. 発表標題 サンゴ由来抗菌ペプチドの発見とVibrio属細菌に対する抗菌活性評価
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青山華子, 高木俊幸, 福丸璃子, 岡井公彦, 井上広滋
2. 発表標題 コクビミドリイシに由来する新規抗菌ペプチドの機能解析
3. 学会等名 東京大学生命科学ネットワーク
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山華子, 高木俊幸, 福丸璃子, 岡井公彦, 井上広滋
2. 発表標題 Vibrio属細菌に対するコクビミドリイシ抗菌ペプチドの活性評価
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山華子, 高木俊幸, 福丸璃子, 岡井公彦, 井上広滋
2. 発表標題 コクビミドリイシ由来の新規抗菌ペプチドの発見と異種発現系を用いた抗菌スペクトル評価
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会
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	高木 俊幸 (Takagi Toshiyuki) (00814526)	東京大学・大気海洋研究所・助教 (12601)	

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