

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月19日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780137

研究課題名（和文）バイオフィルムの形成を阻害する新規糖付加ペプチドの機能解析と利用

研究課題名（英文）Function and application of a new glycosylated peptide with anti-biofilm effect

## 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）：

これまでに黄色ブドウ球菌のバイオフィルム（BF）の形成を阻害する LK(Glc)G（K の ε-アミノ基に Glucose を付加）を見出した。LK(Glc)G は細胞増殖を阻害し、BF 形成時の接着様式を変化させることを明らかにした。一方、LK(Glc)G の BF 阻害作用は K の ε-アミノ基をアルキル基で修飾した場合には消失し、また、L や G の欠失によって減弱した。

## 研究成果の概要（英文）：

LK(Glc)G has shown to have an inhibitory effect on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* cells. LK(Glc)G decreased cell proliferation and appeared to alter the behavior of cell adhesion. The inhibitory effect was disappeared by alkylation of ε-amino residue instead of the glycation with sugars, and was weakened by depletion of L or G.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	36,000,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：糖付加 ペプチド バイオフィルム

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィルム（BF）とは、微生物が固体表面に接着後、より強固に固定化された膜状微生物集落のことであり、自然界におけるほとんどの微生物がこの BF を形成して生息している。BF 内の微生物は熱・乾燥・薬剤に対する耐性が高く、一度 BF を形成すると殺菌や洗浄による除去が非常に困難となる（*Science*, 284, 1318, 1999）。そのため近年、医療現場や食品産業等で BF が重篤な感染症や食中毒を引き起こす原因として問題視されている。現在までに BF の形成を阻害する作用を示す物質として抗生物質（*Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 3117, 2007）やクオラムセンシング（細胞濃度依存性細胞間情報伝

達）阻害剤（*Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 2226, 2007）等が報告されている。しかし、これらは安全性や価格の面から問題が多い。そこで食品由来タンパク質から BF 形成阻害ペプチドを探索することにした。

ペプチドを得る一般的な手法として、タンパク質のプロテアーゼ分解がある。しかし、この手法で得られたペプチドについてはすでに活発に研究されている。一方、予め修飾したタンパク質をプロテアーゼ分解した場合では、修飾基による立体障害が生じ、プロテアーゼの切断認識部位が制限されるため、本来生成されることのない鎖長のペプチドを得る事が出来る。この時、生成したペプチドのうち、修飾を受けているペプチドは、新

規のペプチドであると言える。そこで、あらかじめ修飾を施した食品由来のタンパク質から新規ペプチドを得ることとした。

タンパク質の修飾法としてメイラード反応による糖付加を採用した。メイラード反応とは、タンパク質のアミノ基に還元糖のカルボニル基が付加する反応であり、加熱により促進される事が知られている。メイラード反応で乳清タンパク質に Glucose (Glc) を付加した後、パパインにより分解することで、糖付加ペプチドを得た。このような手法で生成された糖付加ペプチドは、メイラード反応が食品の加熱や保藏中に一般的に起きる反応であること、そしてプロテアーゼ分解は体内で一般に生じる反応であることから、安全性が高いと言える。また、糖の付加によりペプチドの水溶性が向上することから、用途の拡大も期待される。

これまでの研究で、上記のような手法で得られた糖付加ペプチドの中から、*Staphylococcus aureus* の BF 形成阻害活性を有する糖付加ペプチドとして、K の  $\epsilon$ -アミノ基に Glucose が付加した LK(Glc)G を見出している。また、その作用は Glc を付加して初めて得られるものであった。さらに、当該ペプチドは、*S. aureus* の生育を阻害したことから、これが BF 形成阻害作用の一要因であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、LK(Glc)G による *S. aureus* の BF 形成阻害作用についてさらなる検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ペプチドの合成と Glc の付加

糖付加ペプチドは Fmoc 固相合成法を基本として調製した。まず、ペプチドの  $\alpha$  位のアミノ基を Fmoc 基で保護した LKG を合成した。この状態で、リジンの  $\epsilon$  位のアミノ基にメイラード反応を用いて糖を付加させた。ここで、LC-MS により、糖がアマドリ転位体として付加していることを確認した。その後、Fmoc 基を脱離させ、逆相クロマトグラフィーおよびフェニルホウ酸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 LK(Glc)G を精製した。Glc の代わりに Maltose や Fructose を付加した LK(Mal)G、LK (Fru) G、LK(Glc)G の L や G を欠失させた LK(Glc) および K(Glc)G も同様の手法で合成および精製した。

一方、LKG における K の  $\epsilon$  位をアセチル化したペプチドについては、N- $\alpha$ -Fmoc-N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine を用いた Fmoc 固相合成法によって調製し、逆相クロマトグラフィーによる精製を行った。

### (2) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

まず、マイクロタイタープレートへ LK(Glc)G 及び菌懸濁液を添加し、30°C で静置培養した。その際、細断した濾紙 (Anodisk, 0.2  $\mu\text{m}$ , ミリポア) を浸漬した。培養後、濾紙を取り出し、生理食塩水により洗浄した。

濾紙上の生理食塩水を除去後、2.5% グルタルアルデヒド溶液を適量載せた。1 時間静置後、濾紙上の 2.5% グルタルアルデヒド溶液を除去した。

続いて、50% エタノール溶液 200  $\mu\text{l}$  を濾紙に載せ、5 分間放置後、濾紙からエタノール溶液を除いた。この操作を 60、70、80、90% エタノール溶液についても同様に行った。そして、100% エタノール溶液 200  $\mu\text{l}$  を載せ、30 分間放置後、濾紙から溶液を除いた。この操作をもう一度行った後、*t*-ブタノール溶液を適量載せて 5 分間放置後、濾紙から溶液を除き、濾紙を 10 分間真空乾燥させた。最後に濾紙を Au 蒸着し、SEM 観察 (1,000 倍、加速電圧 10 kV) を行った。

### (3) 細胞増殖試験

*S. aureus* を TSB 培地中で一次培養した。さらに同培地中で OD<sub>600</sub> が 1.2 に到達するまで二次培養を行った。この培養液 100  $\mu\text{l}$  を 2 倍濃度の TSB 培地 5 ml と混合し、菌懸濁液とした。この菌懸濁液及び LK(Glc)G 溶液を 50  $\mu\text{l}$  ずつマイクロプレートに分注し、1 時間ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。また、同様にして、プレートへ菌懸濁液及び LK(Glc)G、クロラムフェニコール (CP) を添加し、30°C で静置培養した。その後、経過時間ごとに OD<sub>600</sub> を測定することで増殖挙動を調べた。なお、CP の濃度は、0.5  $\mu\text{g/ml}$  とした。

### (4) エチジウムブロマイド (EB) 染色

まず、*S. aureus* を TSB 培地中で一次、二次培養した。次に、20 mM glucose 含有生理食塩水で菌を洗浄し、同溶液中で 30°C、30 分間インキュベートした。その後、遠心分離 (7,000 $\times$ g、10 分間) して上清を除き、LK(Glc)G 及び glucose 含有リン酸緩衝液 (pH 7.0) を添加して 30°C で 30 分間インキュベートした。再び遠心分離 (7,000  $\times$ g、10 分間) 後、上清を除き、EB 溶液を添加して 30°C、30 分間インキュベートした。最後に、遠心分離 (7,000 $\times$ g、10 分間) して上清を除き、20 mM glucose 含有生理食塩水で洗浄した菌を蛍光顕微鏡で観察した。

### (5) 表面張力測定

LKG、LK(Glc)G 水溶液 (0.5~2 mM) を調整した。その後、ガラス細管を各溶液に接触させ、細管内を上昇する液面の高さおよび接触角を測定した。得られた測定結果は以下の式に代入し、表面張力を算出した。

$$S = \rho g h r / 2 \cos \theta$$

$S$ , 表面張力 (mN/m);  $\rho$ , 液体の密度 (kg/m<sup>3</sup>);  $r$ , 管の内半径 (m);  $\theta$ , 接触角;  $h$ , 液面上昇高さ (m);  $g$ , 重力加速度 (m/s<sup>2</sup>)

#### (6) BF 形成阻害試験

(3) の細胞増殖試験菌懸濁液及び濃度調整したペプチドを 50  $\mu$ l ずつマイクロプレートに入れ、16 時間静置培養を行って BF 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  $\mu$ l でウェル底部に付着した細胞 (BF) 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  $\mu$ l 分注し、色素を抽出した。各ウェルの抽出液 100  $\mu$ l を別のマイクロプレートに移し、590 nm における吸光度を測定した。BF 形成量は、ペプチド未添加時を 100%として表した。

### 4. 研究成果

#### (1) LK(Glc)G 添加下で形成させた BF の SEM 観察

これまでの研究で、*S. aureus* の BF 形成阻害活性を有する糖付加ペプチドとして、K の  $\epsilon$ -アミノ基に Glucose が付加した LK(Glc)G を見出した。本ペプチドは *S. aureus* の増殖を阻害することをすでに明らかにしているが、それが BF 形成阻害作用の主要因なのかを調べる必要がある。

まず、BF 形成阻害作用を明らかにしている 2 mM LK(Glc)G 添加下での BF 形成の様子を SEM を用いて経時的に観察した (図 1)。BF 形成開始 4 時間後、ペプチド未添加においては白く見える *S. aureus* 細胞が濾紙上に付着していることが観察され、BF の形成が開始されていると考えられた。また、細胞が付着後に増殖したのか、増殖後に付着したのかは不明であるが、濾紙上に平面状に広がっていく傾向が認められた。一方、LK(Glc)G においては、まず細胞数が少なく、それらが付着し始めた段階であると考えられた。

8 時間後、ペプチド未添加においては、細胞が平面状にさらに広がるとともに、厚さも増している様子が見えられた。一方 LK(Glc)G 添加下では全く様子が異なり、数個ずつの塊を形成している細胞が大部分を占めた。またこれらの細胞は立体的に重なる傾向が認められた。

BF 形成開始 12 時間後、ペプチド未添加においては濾紙が平面状の BF に完全に覆われていた。一方で、LK(Glc)G 添加下においては、BF の形成に十分な量にまで細胞が増殖していたが、各細胞が立体的に重なっていた。

以上より、LK(Glc)G の BF 形成阻害作用は、細胞の増殖を阻害する作用に加え、担体への

付着様式を変化させることに起因していると考えられた。

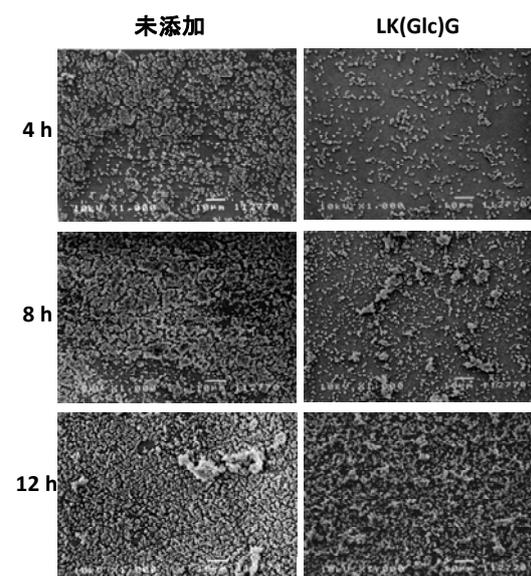


図 1. LK(Glc)G 添加下、未添加下で形成させた BF の SEM 写真 (1,000 倍)

#### (2) LK(Glc)G が *S. aureus* の Efflux Pump や細胞膜損傷に及ぼす影響

Efflux Pump (EP) とは細菌の細胞膜表層に存在する排出ポンプのことであり、薬剤や老廃物を細胞外へ排出する機能を示す。また、EP 関連遺伝子欠損株では BF 形成能が低下することや、EP の阻害剤が細菌の増殖及び BF 形成を阻害すると報告されている (*Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 7376)。そこで、LK(Glc)G の増殖抑制が、*S. aureus* の EP 阻害に起因しているのかを調べるために、EP で排出されるクロラムフェニコール (CP) 感受性を調べた (図 2)。同時に、EP で排出されるエチジウムブロマイド (EB) による染色性の評価も行った (図 3)。

LK(Glc)G と CP は *S. aureus* の増殖を阻害

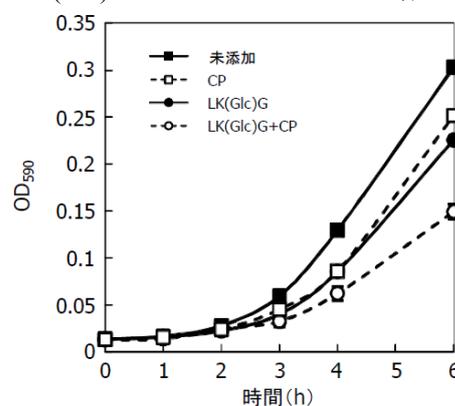


図 2. LK(Glc)G が *S. aureus* の CP の感受性に及ぼす影響。LK(Glc)G と CP の濃度はそれぞれ 2 mM、1.6  $\mu$ M とした。

した。LK(Glc)G と CP を共添加した結果、これらが相乗ではなく相加効果を示したと考えられる程度の阻害作用が認められた (図 2)。さらに LK(Glc)G が EB 染色性に及ぼす影響を調べた (図 3) 結果においても、LK(Glc)G による EB 染色性の増加は認められなかった。これらの結果から、LK(Glc)G は EP に作用していないことが示唆された。また、LK(Glc)G は細胞膜損傷作用も持たないと考えられた。

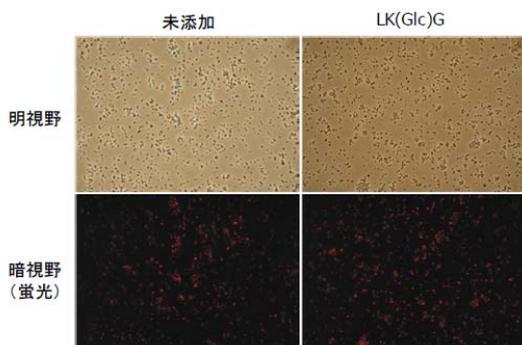


図 3. LK(Glc)G が *S. aureus* の EB 染色性に及ぼす影響。

### (3) LK(Glc)G の界面活性作用

界面活性作用は *S. aureus* の付着に影響を及ぼすと考えられる。そこで BF 形成阻害作用を有する LK(Glc)G と作用を示さない LKG の界面活性作用を比較するため、両水溶液の表面張力を測定した (図 4)。その結果、両者に顕著な違いは認められなかった。したがって、LK(Glc)G の界面活性作用はその BF 形成阻害作用には寄与していないと考えられた。

(1) ~ (3) の結果から、LK(Glc)G は *S. aureus* 細胞の増殖を阻害し、接着様式を変化させることが明らかになったが、これらが生じる要因についてはさらなる検討が必要である。

次に、BF 形成阻害作用に影響を及ぼす LK(Glc)G の構造を調べた。

### (4) 糖付加、アセチル化が LKG の BF 形成阻害活性に及ぼす影響

Glc の付加が BF 形成阻害作用に及ぼす影響を調べるため、LKG と LK(Glc)G について BF 形成阻害活性試験を行った。その結果、Glc を付加していない LKG では有意な BF 形成阻害作用が認められなかったが、LK(Glc)G では濃度依存的な形成阻害作用が認められた (図 5)。

そこで次に、K の  $\epsilon$ -アミノ基に糖 (Fructose, Maltose) を付加した時の BF 阻害活性を調べた (図 5)。その結果、Fructose、Maltose を付加しても、Glucose を付加した場合と同等の BF 形成阻害作用が認められた。

さらに、Glc 付加時の BF 阻害作用が、K の

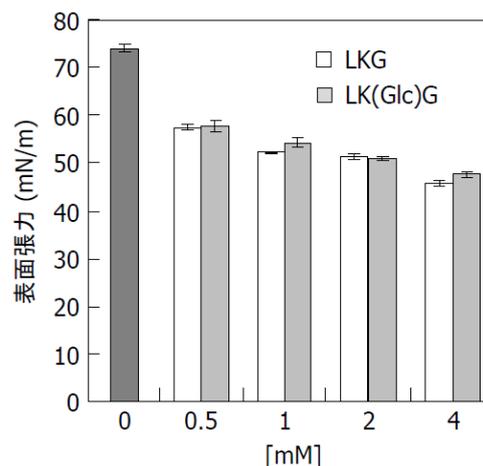


図 4. LK(Glc)G、LKG 水溶液の表面張力

$\epsilon$ -アミノ基の修飾に伴う等電点の変化に起因しているのかを調べるために、当該アミノ基をアセチル化した LK(Ac)G の BF 阻害作用を調べた。その結果、BF 形成阻害作用は認められなかった。一方、データには示していないが、L の  $\alpha$ -アミノ基をアセチルした場合、L の  $\alpha$ -アミノ基と K の  $\epsilon$ -アミノ基の両方をアセチルした場合についても、BF 形成阻害作用は認められなかった。

以上の結果より、LKG の BF 阻害作用が発現するためには K の  $\epsilon$ -アミノ基が糖類によって修飾されていることが重要であることが示唆された。

### (5) LK(Glc)G の鎖長が BF 形成阻害活性に及ぼす影響

糖付加ペプチドの L と G が BF 形成阻害活性に及ぼす影響を調べた (図 6)。すなわち、

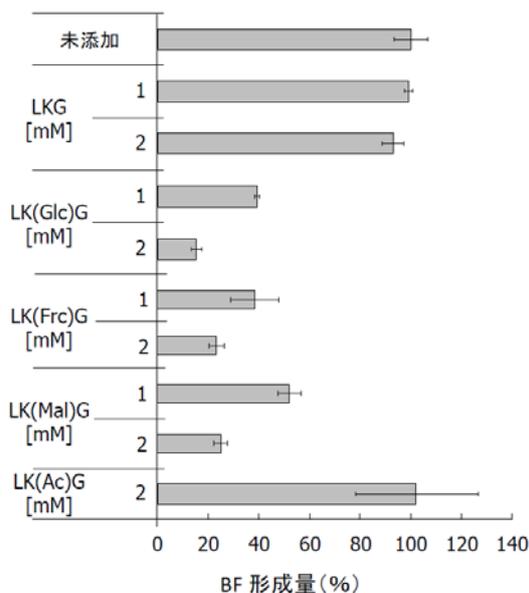


図 5. LKG に対する糖付加、アセチル化が BF 形成阻害作用に及ぼす影響。

LK(Glc)G を基本として、L を欠落させた K(Glc)G、G を欠落させた LK(Glc) を固相合成法で調製し、各々のペプチドについて BF 形成阻害活性試験を行った。

その結果、LK(Glc)G だけでなく、K(Glc)G と LK(Glc) にも BF 形成阻害活性が認められた。3 者を比較すると、BF 形成阻害活性は LK(Glc)G、LK(Glc)、K(Glc)G の順に強いことが明らかとなった。したがって、糖付加だけでなくペプチドの鎖長も BF 形成阻害活性に重要であることが明らかになった。また、L はイソブチル基を有することから、ここに疎水性基が存在することで作用が高くなる可能性が考えられた。

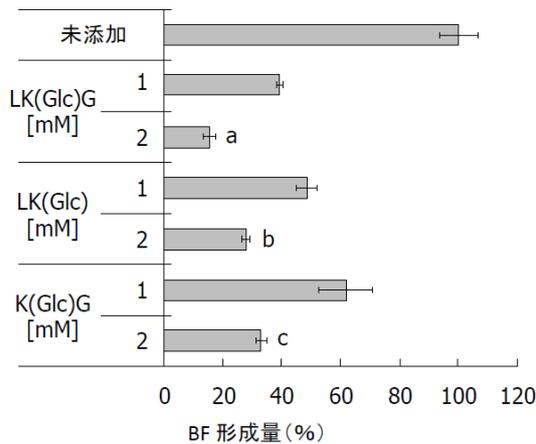


図 6. G と L の欠失が BF 形成阻害活性に及ぼす影響

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 清原和樹、友實美香、野間誠司、井倉則之、下田満哉  
糖付加ペプチドによるバイオフィーム形成阻害作用機構の検討  
日本食品科学工学会第 59 回大会  
2012 年 08 月 29 日  
藤女子大学北 16 条キャンパス
2. 清原和樹、友實美香、野間誠司、井倉則之、下田満哉  
黄色ブドウ球菌バイオフィーム形成阻害能を有する糖付加ペプチド  
第 48 回化学関連支部合同九州大会  
2011 年 07 月 09 日  
北九州国際会議場

## 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