

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440072

研究課題名(和文) 抗菌ペプチドの膜中での構造変化と相互作用の解析

研究課題名(英文) Structural change and interaction analysis of antimicrobial peptides in membrane conditions

研究代表者

相沢 智康 (AIZAWA, TOMOYASU)

北海道大学・先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：40333596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物に対して抗菌活性を持つペプチド性の分子である抗菌ペプチドは、幅広い動物や植物の自然免疫の主要な因子の1つとして生体防御において重要な役割を担っている。抗菌ペプチドの抗菌活性発現機構は、微生物の膜構造の破壊が主要とされるが、その詳細には未知の点が多く残されている。本研究では、毒性や分解のために困難がある抗菌ペプチドの遺伝子組換え発現系の検討を進め、効率的な安定同位体標識試料の調製法を確立することにより、NMR法を活用した抗菌ペプチドと膜との相互作用解析の技術確立を進めた。安定同位体標識抗菌ペプチドを用いることで、グラム陰性菌の外膜を構成するLPSとの相互作用を明確に解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial peptides are considered an essential part of the innate immune response of plants, invertebrates and vertebrates as they provide host defenses and can target a wide range of pathogenic microorganisms, including bacteria, fungi, yeast, parasites and viruses. Antimicrobial peptides are thought to kill bacteria by breaking their cell membranes, although the exact mechanisms are still unclear. In this study, we investigated efficient way to prepare isotopically labelled antimicrobial peptides for NMR studies. By using an isotopically labelled antimicrobial peptide, we obtained structural information for LPS-bound form.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：ペプチド 抗菌ペプチド 遺伝子組換え NMR LPS 大腸菌 酵母

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子再構成に基づく抗体の多様性を利用し、異物を特異的に認識する極めて巧妙なメカニズムである適応免疫に対して、自然免疫は補助的なものと考えられてきたため、適応免疫と比較するとその研究が遅れていたが、近年その機構の解明が急速に進んでいる。興味深い事に、地球上の生物種の大半を占める無脊椎動物においては、実は適応免疫は存在しておらず、すなわち自然免疫のみで、様々な環境に適応し、異物からの攻撃に対応している。無脊椎動物の進化の頂点に立つ昆虫は、脊椎動物の進化の頂点に立つ哺乳類と同様かそれ以上に極めて複雑に、巧みに進化しており、その生物が自然免疫のみで繁栄していることを考えると、自然免疫は優れた生体防御のメカニズムであるのは間違いない。自然免疫の担い手の一つである抗菌ペプチドは、微生物の膜に対して相互作用し、その膜を破壊する殺微生物分子として発見された。ヒトをはじめとする脊椎動物から、無脊椎動物、植物までの様々な生物種から現在までに1,500種類以上が発見されており、一次配列及び立体構造上の特徴から幾つかのグループに分類される。

多くの抗菌ペプチドにおいて、そのターゲットとなる膜環境中での立体構造解析や相互作用解析により、その作用機構を明らかにする試みが続けられているが、多くの未知の点が残されている。興味深いことに、一次配列または立体構造において、高い相同性を有する抗菌ペプチド分子であっても、活性の強さや抗菌スペクトラム、すなわち標的となる微生物の種類が、グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌、ウイルスなど、大きく異なることが知られている。抗生物質に対する耐性菌の出現が問題となっている現代において、抗菌ペプチドの抗菌活性の強さや抗菌スペクトラムを決定する要因の解明は、抗生物質に変わる次世代の新薬の開発につながる可能性もあることから、大きな研究テーマの一つとなっている。

## 2. 研究の目的

抗菌ペプチドの活性発現機構の解明には、その相互作用ターゲットとなる膜中で立体構造変化や多量体構造形成の理解が重要であると考えられている。近年、安定同位体標識された大型の遺伝子組換え膜蛋白質に対し、生体膜により近い膜模倣環境である、バイセルやナノディスクを用いた溶液NMR法による解析が報告されているが、化学固相合成法での試料調製が一般的である抗菌ペプチドの解析への応用は、限定的にとどまっている。そこで本研究の目的は、遺伝子組換え抗菌ペプチド発現技術の検討により安定同位体標識抗菌ペプチドの効率的な調製技術の検討を行い、その活用により高度な膜模倣環境での抗菌ペプチドの構造とその活性発現メカニズムについて構造生物学的解析を進める

ための研究基盤を確立することにある。

## 3. 研究の方法

研究代表者が中心に開発を進めてきた新規の組換えペプチド調製技術の各種抗菌ペプチドの調製への応用を検討し、NMR法への応用に有効な安定同位体標識抗菌ペプチドを作製した。また、大腸菌や酵母を宿主とした、新規の抗菌ペプチド調製技術の検討も進めた。さらに、これらの技術を利用し、種々の膜模倣環境での溶液NMR法による測定を行い、相互作用解析、立体構造解析などを進め、その有用性の検証をおこなった。

## 4. 研究成果

研究代表者は、抗菌ペプチドを始めとする各種ペプチドを不溶性キャリア蛋白質との融合蛋白質としての発現する際にキャリア蛋白質との切断に化学的手法を用いる必要があるという問題を回避し、より簡便な調製技術として、封入体形成能の高い蛋白質を融合させずに共発現をすることにより、ターゲットとなるペプチドの封入体形成を促進する手法の検討を進めてきた。この手法でジスルフィド結合を有する抗菌ペプチドを得た場合には、リフォールディングが必要となるが、種々の検討の中で、マウス由来抗菌ペプチド cryptdin-4 (Crp-4)の生産において、可溶化過程でのジスルフィド結合の形成という興味深い方法で天然型構造を有するペプチドの調製に成功した(雑誌論文業績)。Crp-4はマウスの消化管で発現する6種類のアイソフォームの1つで、強い抗菌活性を有している。6個のシステインがジスルフィド結合を形成した構造をもつ  $\alpha$ -defensin に分類される。封入体として得たジスルフィド結合を有する組換え蛋白質のリフォールディングでは、一般に、変性剤存在下で完全還元したペプチドから、透析などにより変性剤と還元剤の両者を除去し立体構造を形成させる手法が良く用いられる。しかし、Crp-4の場合にはパートナーとの共発現により得た封入体に還元剤を加えずに酸化的条件下において単に尿素により可溶化するのみで、この可溶化の過程で正しくフォールディングしたCrp-4を得ることに成功した。菌体内から可溶化した直後のCrp-4では、まだジスルフィド結合は形成していないことが確認されたことから、ジスルフィド架橋は変性剤存在下の可溶化の過程で進んだと推定された。Crp-4と同じ  $\alpha$ -defensin ファミリーに属する抗菌ペプチドである human neutrophil peptide-1でも、化学合成したペプチドのフォールディングの際に分子間相互作用などを低減する効果が期待される変性剤存在下でのフォールディングが適していることが報告されていることなどから、Crp-4においても変性剤存在下においても天然型の立体構造を形成しやすい性質があるため、このようなリフォールディング工程が可能となると考えられ

る。Crp-4 ではこの方法を利用することで、通常の精製後にフォールディングを行う手法と比較して約2倍程度の効率で最終精製ペプチドを得ることに成功した。

また、ジスルフィド結合に富む、植物由来抗菌ペプチド snakin-1 (SN1) を対象として、翻訳後修飾の能力が高い酵母 *Pichia pastoris* を発現宿主として活用した抗菌ペプチド調製法の検討を進めた(雑誌論文業績)。SN1 はジャガイモから発見された抗菌ペプチドであり、全長 63 アミノ酸残基のペプチドでありながら、12 個ものシステインを含み、それらがジスルフィド結合を形成しているという特徴を持つ。抗真菌活性も有し、幅広い植物から相同性の高いペプチドが発見されていること、植物で過剰発現させることで耐病性が向上することなどから注目されている。SN1 については、大腸菌発現系や固相化学合成による生産の報告はあったが、より効率的な生産の可能性の検討として *P. pastoris* を宿主とした分泌系での発現を試みた。AOX1 遺伝子のプロモーターと酵母由来の分泌シグナルであり分泌発現の成功例の多い  $\alpha$ -ファクタープレプロ配列を利用し、分泌型での発現を検討した。バツフルフラスコを用いた試験培養においてメタノールによる発現誘導を行うことで、培養上清中への目的ペプチドの分泌が確認できたため、5L のジャーファーマンターを用いた高密度培養を行い、48 時間のメタノールでの誘導を行った。最終的な菌体の湿重量は 300g/L 程度に到達した。等電点 8.97 の SN1 を陽イオン交換クロマトグラフィーにより培地上清より回収し、逆相クロマトグラフィーにより最終精製を行い、培地 1L あたり約 40mg の SN1 を得た。得られた SN1 が天然と同様のジスルフィド結合により正しい立体構造を形成しているかを確認するために、天然から精製した SN1 と *P. pastoris* で発現した SN1 の NMR スペクトルの比較を行った。この結果、両者の間で良い一致が見られたことから、得られた組換えペプチドは天然型の構造を有していると判断した。SN1 は抗真菌活性を有し、*P. pastoris* に対しても活性を有するが、培地中に分泌されている濃度が MIC 以下であることや培地中に含まれる高濃度の塩などが活性を阻害することなどから活性による悪影響を受けずに生産に成功していると考えられる。

さらに、海外の研究グループと共同で calmodulin (CaM) が抗菌ペプチドの可溶性発現のためのキャリア蛋白質として特に有用であることを報告した(雑誌論文業績)。CaM は、真核生物に広く存在する約 17kDa の酸性の  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質で、 $\text{Ca}^{2+}$  結合部位を持つ相同性の高い 2 つの球状ドメインが、フレキシブルな領域でつながれたダンベル様の構造を有している。 $\text{Ca}^{2+}$  の濃度変化に応答し構造変化を起こした CaM は、2 つの球状ドメインに存在する標的結合部位で多様なターゲ

ット蛋白質に含まれる標的配列を包み込むような構造を形成することが知られている。標的配列は特定のコンセンサス配列は持たないが、抗菌ペプチドと類似した塩基性に富み両親媒性構造を有するという特徴を有しており、表面プラズモン共鳴法を用いた実験でも CaM が多様な抗菌ペプチドに対して高いアフィニティーを有することが確認できた。そこで、CaM と抗菌ペプチドの相互作用による毒性や分解の回避を期待して、大腸菌を宿主とし T7 プロモーターを用いて N 末端側に CaM をキャリア蛋白質として付加する融合発現系を構築した。この発現系を用いることで、melittin、fowlicidin-1、indolicidin、tritrpticin、puroA、magainin II F5W、lactoferrampin B、MIP3 51-70、human  $\alpha$ -defensin 3 といった極めて多様な抗菌ペプチドの効率的な生産に成功しており、CaM が広範な抗菌ペプチドの生産に活用可能な可溶性キャリア蛋白質であることを証明することに成功した。

一連の遺伝子組換え技術による抗菌ペプチド生産技術を応用し、各種の安定同位体標識抗菌ペプチドを生産し、そのターゲットとなる細菌由来の分子との相互作用の検討を進めた。抗菌ペプチドの標的となる微生物のうち、グラム陰性細菌は外膜と内膜を持つため、抗菌ペプチドがグラム陰性菌に作用する際には、まず外膜を透過しその後内膜に作用する必要があるが、その透過機構には不明な点が多い。外膜の外側はポーリンなどの蛋白質以外は、リポ A と呼ばれる脂質部分とコア糖鎖と末端の O 抗原部分から成る LPS で構成されている。抗菌ペプチドが LPS に結合した複合体形成時の情報を直接 NMR 法で解析することは、LPS は水溶液中で会合しミセル分子量が数十万以上の構造を形成するため、分子量増大に伴う NMR シグナルのブロードニングにより困難となる。このため、LPS 結合状態の抗菌ペプチドの NMR 解析には転移 NOE 法が応用されてきた。この手法では、NMR で観測可能な濃度の抗菌ペプチドの水溶液に LPS ミセルを加えた試料を用意し、LPS 遊離の抗菌ペプチドと LPS 結合状態の抗菌ペプチドが平衡で存在した状態で NMR 測定を行う。このような混合状態で 2 つの状態の交換速度が遅い場合には、遊離のシグナルは観測されるが結合のシグナルはブロードニングして観測されない。しかし、遊離と結合の 2 つの状態の交換速度が十分に速い場合には、観測される 1 つのシグナルに 2 つの状態の情報が平均化して含まれる状態となる。このような速い交換速度を持つ場合に、LPS ミセルと抗菌ペプチドの比を 1:100 程度にすることで、溶液中には遊離の抗菌ペプチドが大過剰に含まれた状態となり、観測されるシグナルの化学シフトは、ほぼ遊離の抗菌ペプチドのものとなり、ブロードニングの影響をあまり受けずに、複合体形成時の NOE などの情報を転移 NOE として得ることが可能となる。この手法を利用

して多くの抗菌ペプチドの LPS ミセル結合状態の構造解析が報告されている。さらに転移 NOE 法の一般的なメリットの一つとして、遊離状態のシグナルを利用して解析を行うため、結合状態での帰属が不要な点があげられる。しかし逆に、水溶液中ではランダム構造をとる ヘリックス型の抗菌ペプチドでは、シグナルの重なり合いのため水溶液中での帰属や解析が非常に困難となる。実際、線虫由来の抗菌ペプチドである cecropin P1 (CP1) は、水溶液中ではランダム構造であり、固相合成ペプチドを用いた未標識試料の  $^1\text{H}$  NMR 測定では、シグナルの重なり合いが激しく、信号帰属や転移 NOE の正確な解析は困難であった。そこで安定同位体試料を調製し、信号帰属の困難な高分子量の蛋白質の解析に用いられる三重共鳴実験を行うことで、水溶液中での CP1 の信号帰属と転移 NOE の解析を行った (雑誌論文業績)。その結果、過去に疎水性溶媒を用いた膜模倣環境中で解析された CP1 の立体構造は、ペプチド全長に渡ってヘリックス構造を形成していたのに対して、LPS との相互作用時には全長の約半分の C 末端側の 15 残基のみがヘリックス構造を形成することが明らかになった。この領域の N 末端側には 3 残基の塩基性残基が連続する領域が、また中央部には 6 残基の疎水性残基が連続する領域があり、それぞれ、リポド A のリン酸基及び脂肪酸のアシル基と相互作用することで、外膜に対して作用すると予想された。CP1 と同じ cecropin ファミリーに属する sarcotoxin IA や papiliocin においてリポド A や LPS との相互作用解析結果が他のグループから報告されているが、いずれも N 末端側が相互作用部位とされている。そのためこれらのペプチドは同一のファミリーに属しながら異なる機構で外膜と相互作用すると考えられ、抗菌ペプチドの相互作用様式の多様性という点から興味深い結果を得ることに成功した。

#### 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 4 件)

Ishida H, Nguyen LT, Gopal R, Aizawa T, Vogel HJ, Overexpression of antimicrobial, anticancer, and transmembrane peptides in *Escherichia coli* through a calmodulin-peptide fusion system, *J Am Chem Soc*, 138, 2017, doi: 10.1021/jacs.6b06781. 査読有  
Baek MH, Kushibiki T, Nakazumi T, Tomisawa S, Abe C, Kumaki Y, Kikukawa T, Demura M, Kawano K, Aizawa T, Lipopolysaccharide-bond structure of the antimicrobial peptide cecropin P1 determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Pept Sci*, 22,

2016, doi: 10.1002/psc.2865. 査読有  
Kuddus MR, Rumi F, Tsutsumi M, Takahashi R, Yamano M, Kamiya M, Kikukawa T, Demura M, Aizawa T, Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 122, 15-22, 2016, doi: 10.1016/j.pep.2016.02.002. 査読有  
Tomisawa S, Sato Y, Kamiya M, Kumaki Y, Kikukawa T, Kawano K, Demura M, Nakamura K, Ayabe T, Aizawa T, Efficient production of correctly folded mouse  $\alpha$ -defensin, cryptdin-4, by refolding during inclusion body solubilization, *Protein Expr Purif*, 112, 21-28, 2015, doi: 10.1016/j.pep.2015.04.007. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Yamano M, Kuddus MR, Rumi F, Kikukawa T, Kumeta H, Kumaki Y, Kamiya M, Kikukawa T, Demura M, Aizawa T, Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 derived from potato, The 2017 annual meeting of the Japanese society for bioscience, biotechnology and agrochemistry, 2017.3.17-20, Kyoto women's university (Kyoto, Kyoto)  
Hiramane R, Kumeta H, Kumaki Y, Kikukawa T, Demura M, Nakamura K, Ayabe T, Aizawa T, Mutation analysis of cryptdin-4, antimicrobial peptide from mouse, The 2017 annual meeting of the Japanese society for bioscience, biotechnology and agrochemistry, 2017.3.17-20, Kyoto women's university (Kyoto, Kyoto)  
山野めぐみ、神谷昌克、熊木康裕、菊川峰志、出村誠、相沢智康、ジャガイモ由来抗菌ペプチド snakin-1 の安定的な発現・精製系の構築と NMR による構造解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.27-30、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)  
桑畑佳奈、神谷昌克、菊川峰志、出村誠、相沢智康、抗菌ペプチド antibacterial factor-2 (ABF-2) が持つ特徴的な C 末端領域の特徴的な役割、日本生物物理学会北海道支部年会、2016.3.14、北海道大学 (北海道・札幌市)  
相沢智康、組換え抗菌ペプチドの安定生産技術とその解析への利用、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015.6.24-26、あわぎんホール (徳島県・徳島市)  
Abe C, Nakazumi T, Baek M, Kamiya M, Kikukawa T, Kawano K, Demura M, Aizawa

I, Elucidation of influential factor for heterologous productivity of the antimicrobial peptide, cecropin P1 using *Escherichia coli*, 第 51 回ペプチド討論会, 2014.10.22, 徳島大学 (徳島県・徳島市)

橋本革、富澤聡、神谷昌克、菊川峰志、熊木康裕、中村公則、綾部時芳、相沢智康、出村誠、抗菌ペプチド human defensin 5 の NMR による多量体形成機構の解析、日本生物物理学会第 52 回年会、2014.9.27、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

阿部千春、中住太一、神谷昌克、菊川峰志、河野敬一、出村誠、相沢智康、抗菌ペプチド cecropinP1 の大腸菌発現系における発現効率に影響を与える要因の解明、日本生物物理学会第 52 回年会、2014.9.27、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

櫛引崇弘、神谷昌克、相沢智康、熊木康弘、菊川峰志、水口峰之、出村誠、川畑俊一郎、河野敬一、NMR およびドッキングによる抗菌ペプチドとリポ多糖の複合構造解析、日本生物物理学会第 52 回年会、2014.9.25、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

富澤聡、神谷昌克、菊川峰志、出村誠、相沢智康、再構成無細胞系を用いた抗菌ペプチドの直接発現、日本生物物理学会第 52 回年会、2014.9.25、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

富澤聡、神谷昌克、菊川峰志、出村誠、相沢智康、再構成無細胞系を用いた短鎖ペプチドの直接発現、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014.6.27、ワークピア横浜・横浜産貿ホール (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

長岡功監修、相沢智康他、『抗菌ペプチドの機能解明と技術利用』、シーエムシー出版、2017、pp83-95、217-225

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相沢 智康 (AIZAWA TOMOYASU)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：40333596