

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850077

研究課題名（和文）X線結晶構造解析によるイネ由来生理活性タンパク質の機能発現に関わる分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms involved in the expression of function of rice-derived bioactive proteins by X-ray crystallographic analysis

研究代表者

落合 秋人 (Ochiai, Akihito)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：40588266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、過去の研究において、ヒト生体防御機能に関与する生理活性タンパク質としてイネタンパク質から  $\alpha$ -アミラーゼやディフェンシン様タンパク質を見出した。本研究課題においては、これらの生理活性タンパク質を新奇な医薬品として提案するために、ヒトに対するこれらタンパク質の生体防御機能をさらに探索するとともに、それらの機能発現に関わる構造要因を構造生物学的手法や分子間相互作用解析などを利用して明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In previous research, we found an  $\alpha$ -amylase and defensin-like proteins from rice proteins as bioactive proteins involved in activating biophylactic function in human. In this research project, in order to propose these bioactive proteins as novel medicines that may enhance immune function, we further explored the biophylactic function of these proteins in humans. Furthermore, we analyzed structural factors involved in expression of their functions by analyzing their three-dimensional structures and intermolecular interaction between the proteins and their target molecules.

研究分野：タンパク質工学

キーワード： $\alpha$ -アミラーゼ ディフェンシン イネ 生理活性タンパク質 免疫亢進

## 1. 研究開始当初の背景

米には、ヒトに対する様々な生理活性をもつタンパク質が存在する。タンパク質分解酵素の阻害作用を持つオリザシスタチン、免疫賦活作用や癌細胞の増殖抑制作用をもつレクチン、血圧降下作用を示すアンジオテンシン変換酵素の阻害タンパク質、血清コレステロール濃度の低下作用をもつ  $\alpha$ -グロブリンなどがこれまでに報告されている。一方で、いまだ機能が未知の生理活性タンパク質が多数存在すると考えられている。

研究代表者は、イネ由来の生理活性タンパク質を探索し、構造生物学的な視点からそれらの構造と生理機能との相関解析を進めてきた。これまでに、イネ種子由来の2種類のタンパク質 OsHsp70N と AmyI-1 が様々な生理活性を有することを見出している。OsHsp70N は、Heat Shock Protein 70 の N 末端 ATPase ドメインと高い相同性を示す機能未知タンパク質であり、抗菌活性を示すタンパク質として同定された。一方、AmyI-1 はイネ種子の発芽段階において最も主要な機能を果たす  $\alpha$ -アミラーゼである。AmyI-1 は、可溶性デンプンの共存下で、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の生育を強力に阻害することを見出した。この知見は、歯周病菌に対する  $\alpha$ -アミラーゼのもつ抗菌性を示した初めての報告である (ochiai *et al.* *J. Periodont. Res.* 49 (2014) 62-68)。さらに、Biacore を用いた生体分子間相互作用解析により、AmyI-1 は細菌内毒素 (Lipopolysaccharide (LPS) および Lipoteichoic acid (LTA)) と結合することを見出した。また、X線結晶構造解析により、AmyI-1 の立体構造を決定した (ochiai *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (2014) 989-997)。得られた構造的知見から、AmyI-1 は分子表面の2つの糖結合部位(SBS)に内毒素を結合する可能性を示した。これらの結果は、AmyI-1 が感染防御や抗炎症などのヒト生体防御機能に寄与できる可能性を示す。

## 2. 研究の目的

上述の研究背景により、イネ種子由来の2種類のタンパク質が、感染防御や抗炎症などのヒト生体防御機能に関与することを生理学的・構造生物学的手法により部分的に明らかにした。

一般に、食品や医薬品の成分として応用するには、熱安定性の高いものが適している。AmyI-1 は 80℃、30 分の処理でも失活しない熱安定性を有する。さらに申請者は、イネのディフェンシン様タンパク質に着目した。ディフェンシンは、分子内に複数のジスルフィド結合を有することから、一般に極めて高い熱安定性を有する。さらに、ヒトやネズミ由来のディフェンシンは、抗腫瘍活性を示すなど多機能性タンパク質としても知られている。データベース解析により、少なくとも6種類のディフェンシン様タンパク質がイネ

ゲノムに存在することを見出した。協力研究機関(農研機構 北海道農業研究センター)において、そのうちの1種類 OsAFP1 がイネいもち病菌などに対して抗菌活性を有することが既に報告されている。それらの一次構造は多様性を示すことから、抗菌活性(抗菌スペクトル)や熱安定性などにおいて異なる特性を有することが推測される。

本研究課題においては、これまで研究対象としてきた AmyI-1 および新しく着目したイネディフェンシンを新奇な医薬品として提案するために、ヒトに対するこれらタンパク質の生体防御機能をさらに探索するとともに、それらの機能発現に関わる構造要因を構造生物学的手法や分子間相互作用解析などにより明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) AmyI-1/Acarbose、AmyI-1/LPS、および AmyI-1/LTA の各複合体の X 線結晶構造解析

デンプンのアナログ基質である Acarbose、LPS、もしくは LTA と AmyI-1 との複合体結晶の X 線結晶構造解析を以下に行った。上述の通り、アポ型 AmyI-1 の立体構造は既に決定しており、結晶化条件も確立済みである。まず、アポ型 AmyI-1 結晶に Acarbose をソーキングすることにより AmyI-1/Acarbose 複合体結晶を調製した。次に、溶液に LPS もしくは LTA をあらかじめ添加して AmyI-1 との共結晶化を行い、さらに得られた結晶に LPS もしくは LTA をソーキングすることによりそれぞれの複合体結晶を調製した。共結晶化は、Hampton Research 社などで販売されているタンパク質結晶化スクリーニングキットなどを使用して、1000 以上の網羅的な結晶化条件のスクリーニングを行うことにより実施した。結晶の X 線回折データの収集には、主に放射光科学研究施設(Photon Factory、つくば市)を利用した。位相の決定は、既に立体構造決定済みのアポ型 AmyI-1 の構造情報を用いた分子置換法により行った。

### (2) in vitro による AmyI-1 の抗炎症作用の解析と内毒素中和メカニズムの解明

AmyI-1 の抗炎症作用は、LPS を処理したマウス RAW264 細胞における NO 産生の抑制試験により評価した。あらかじめ AmyI-1 とインキュベートした LPS を用いて RAW264 細胞を処理し、産生した NO 量を Griess 試薬を用いて定量した。LPS のみで処理したコントロールと比較し、AmyI-1 が LPS 処理による NO 産生をどの程度抑制するか検証した。

(1)の実験において得た複合体結晶の立体構造情報に基づいて、LPS もしくは LTA と相互作用する AmyI-1 のアミノ酸残基を明らかにし、当該アミノ酸残基に部位特異的の変異を導入した変異体を作製して生体分子間相互作用解析を行うことにより、それぞれの結合に関わるアミノ酸残基を特定した。

(3) イネ由来ディフェンシンのヒト病原菌に対する抗菌活性の評価

ディフェンシタンパク質は、農業・食品産業技術総合研究機構から供与された大腸菌発現系を利用して大量生産した。生産させたタンパク質は、2段階のクロマトグラフィーにより精製した。

各種ヒト病原性微生物に対する抗菌活性は、最小栄養培地で生育させた被験菌とディフェンシタンパク質溶液を混合し、一定時間培養後の波長 650 nm における濁度を測定することにより評価した。

(4) イネ由来ディフェンシンの抗真菌活性に関わる構造要因の同定

OsAFP1 の立体構造をホモロジーモデリングソフト MODELLAR を利用して構築した。テンプレートとして、構造類似性が高いと推測されるムギ由来  $\gamma$ -Thionin (PDB ID: 1GPT)、ウマゴヤシ由来ディフェンシン (PDB ID: 2LR3)、タバコ由来ディフェンシン (PDB ID: 4CQK) の構造を使用した。

OsAFP1 とその断片ペプチドの真菌細胞膜に対する相互作用は、核酸蛍光色素 (PI) を用いた Flow cytometry 解析によって評価した。OsAFP1 の各変異体は、PCR 法を用いて野生型 OsAFP1 発現プラスミドに部位特異的変異を導入し、野生型 OsAFP1 と同様のプロセスを経て調製した。

4. 研究成果

(1) AmyI-1 の内毒素中和作用の解析と内毒素捕捉メカニズムの解明

背景に記述したように、生体分子間相互作用解析により AmyI-1 が内毒素 LPS および LTA と結合することが明らかになったため、内毒素により誘発される炎症を抑制することが期待される。

そこで、NO 産生抑制試験により AmyI-1 の抗炎症作用を検証した。その結果、LPS により誘導された NO 産生量が AmyI-1 の濃度依存的に減少したことから、AmyI-1 は *in vitro* において抗炎症作用を示すことを明らかにした(図 1)。

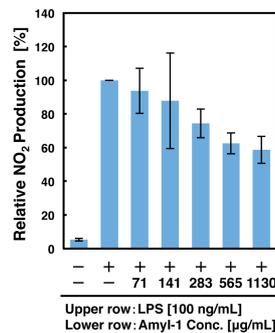


図1 AmyI-1 の NO 産生抑制作用

LPS はその構造中に多くの糖鎖領域を含むことから、AmyI-1 はこの領域を認識して LPS と結合することにより中和すると考えられる。そこで、まず低分子糖鎖である Acarbose との複合体 AmyI-1/Acarbose の立体構造を解析して、糖結合部位を同定した。その結果、D203, E228, D314 などのアミノ酸で構成される活性部位、W301, W302 などから構成され

る部位、または Y403, H418 などから構成される部位に Acarbose が結合していた(図 2)。この結果から、活性部位以外の前者の結合部位を Sugar Binding Site 1 (SBS1)、後者の結合部位を SBS2 と定義した。

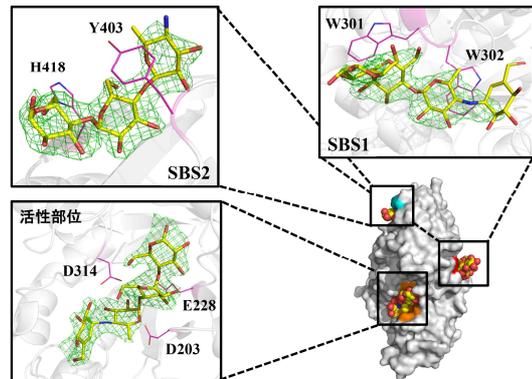


図2 AmyI-1 における糖結合部位

次に、LPS との複合体 AmyI-1/LPS または LTA との複合体 AmyI-1/LTA の立体構造を解析した。その結果、AmyI-1/LPS 複合体において、SBS1 の周辺に LPS 由来の電子密度が確認された(図 3)。電子密度マップの形状から、LPS の lipid A 部もしくは O 抗原中の糖鎖部が AmyI-1 に結合していると推測された。また、AmyI-1/LTA 複合体において、SBS1 付近に LTA 由来の電子密度マップが確認された。さらに、LTA の N-アセチルグルコサミン部が AmyI-1 の活性中心部位(D203, E228, D314 の周辺部)に埋め込まれるように結合していた(図 4)。

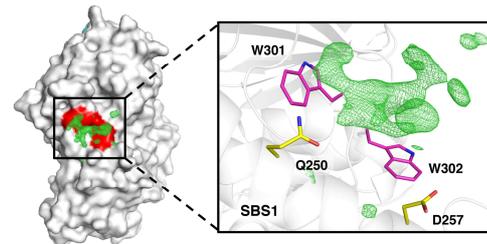


図3 AmyI-1 における LPS の結合

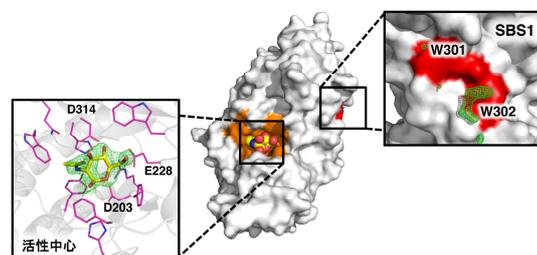


図4 AmyI-1 における LTA の結合

そこで、AmyI-1 の SBS1 および SBS2 を構成するアミノ酸残基における変異体 W302A および Y403A、活性中心を構成するアミノ酸残基における変異体 D314A を作製し、LPS および LTA に対する相互作用を解析した。その結果、それぞれに対する解離定数が 5-1000 倍増大し、結合

能力が大きく低下することが明らかになった。Amy1-1 の内毒素への結合には、これらの糖結合部位が関与していることが立証された。

## (2) イネ由来ディフェンシンの抗真菌活性の解析とそれに関わる構造要因の同定

2 種類のイネ由来ディフェンシン OsAFP1 および OsDEF3 の組換えタンパク質を調製し、大腸菌やニキビ菌など合計 8 種の真菌もしくは細菌に対して抗菌(抗真菌)活性を測定した。その結果、日和見感染真菌である *Candida albicans* に対して特異的な活性を示し、その最小生育阻止濃度(MIC)は 4  $\mu$ M (OsAFP1)および 64  $\mu$ M

(OsDEF3)であった(図 5)。また、2 つのディフェンシンに対して 100, 10 分間の熱処理、もしくは 24 時間の血清処理を行ったところ、活性を失うことなく高い耐性を示した。

以上の結果から、真菌に対して特異的な抗菌活性を示す 2 種類のディフェンシンを見出したが、その活性強度の比較から OsAFP1 について以下の研究を進めた。

次に、ホモロジーモデリングにより OsAFP1 の立体構造を作製した。この構造をもとに、二次構造などの特徴からディフェンシンの部分配列を有する複数の断片ペプチドを合成し、抗真菌活性および真菌細胞膜に対する相互作用を解析した。その結果、C 末端側の約 8 残基のアミノ酸(Region-7、図 6)がディフェンシンの抗真菌活性に重要であることが示唆された。そこで、当該領域に含まれる側鎖の大きいアミノ酸残基に対してアラニン変異を導入した 5 種類のディフェンシン変異体を作製した。それらの変異体全てにおいて、野生型 OsAFP1 と比較して 1/8 以下に活性が低下したことから、当該領域がこのディフェンシンの抗真菌活性に重要な機能を果たすことが明らかになった。

Region-7部分の構造  
( $\beta$ -hairpin構造)

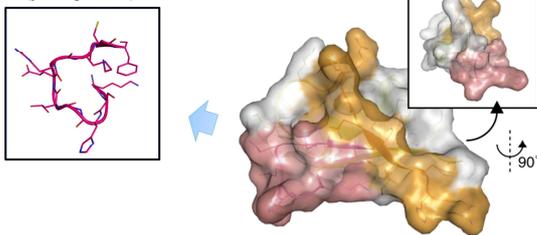


図 6 OsAFP1 と Region-7 領域の立体構造

以上の研究により、イネ由来生理活性物質 Amy1-1 および OsAFP1 のヒトに対する生体防御機能について更なる理解を深めること

ができ、それらの機能発現に関わる分子メカニズムの一端を明らかにした。これらの成果は、ヒト免疫の亢進に繋がる新奇な医薬品の開発に繋がることが期待される。

## 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 1 件)

落合 秋人、谷口 正之、三ツ井敏明．イネ由来  $\alpha$ -アミラーゼの立体構造と多機能性の解析  
応用糖質科学 5 (2015) 162-164 . 査読無 .  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009987568>

[学会発表](計 8 件)

落合 秋人、金岡 巧、提箸 祥幸、田中 孝明、谷口 正之．イネ由来ディフェンシンのヒト病原菌に対する抗菌効果とその特性  
日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

落合 秋人、菅井 寛、伊東 孝祐、内海 利男、田中 孝明、谷口 正之、三ツ井敏明．イネ由来  $\alpha$ -アミラーゼの立体構造とその熱安定性に関与する構造要因の解析  
第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会議場(京都府・京都市)

Sugai H, Ochiai A, Taniguchi M, Mitsui T. Structure-based functional analysis of  $\alpha$ -amylase from rice (*Oryza sativa*)  
KAAB International Symposium 2014, 2014 年 9 月 29 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

落合 秋人、谷口 正之、三ツ井敏明．イネ由来  $\alpha$ -アミラーゼの立体構造とその多機能性の解析  
第 3 回応用糖質フレッシュシンポジウム、2014 年 9 月 23 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
落合 秋人(OCHIAI, Akihito)  
新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：40588266

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

菅井 寛 (SUGAI, Hiroshi)

新潟大学・自然科学研究科・大学院生

渡邊 和史 (WATANABE, Kazuhito)

新潟大学・自然科学研究科・大学院生

金岡 巧 (KANAOKA, Takumi)

新潟大学・自然科学研究科・大学院生

大堀 正裕 (OHORI, Masahiro)

新潟大学・自然科学研究科・大学院生