

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570077

研究課題名(和文) 抗菌ペプチドの有する生体防御の多機能性とその生理学的意義の解析

研究課題名(英文) Studies of multiple functions of antimicrobial peptides and their physiological roles in the host innate immune system.

研究代表者

岩室 祥一 (IWAMURO, Shawichi)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：70221794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：両生類ならびに鳥類から抗菌ペプチド遺伝子のクローン化を行い、得られた配列情報をもとに合成したペプチドを用いて抗菌活性とその作用機序を明らかにした。また、これらペプチドにはマスト細胞の走化性や脱顆粒作用、細菌毒素への結合作用、レクチン様作用などが存在することを明らかにし、生体防御において多様な作用を有することを示した。さらに、細菌毒素が抗菌ペプチドの遺伝子発現を促進することを示した。また、ヒストン H2B, H3, H4におけるグラム陽性菌に対する抗菌活性とメカニズムの検証を行った結果、H2Bは細菌の形態変化を伴わずに、H3とH4は細胞膜を破壊することにより、それぞれ作用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have cloned cDNAs encoding antimicrobial peptide (AMP) precursors from total RNA samples prepared from amphibian skin, Harderian gland, and brain and cells of the avian cell line DT40 using RT-PCR techniques. We detected chemotactic and degranulation against mastocytoma, bacterial surface substance-binding, and/or lectin-like activities as well as antimicrobial activities in the synthetic replicates of these AMPs such as bullfrog catesbeianalectin (CL) and chicken cathelicidin-B1 (chCATH-B1). We also detected the bacterial toxins-inducible chCATH-B1 gene expression in DT40 cells. In addition, we showed directed antimicrobial activities and properties of Arg-rich histones (H3 and H4) and Lys-rich histone (H2B) against Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. While the Arg-rich histones disrupted the bacterial cell membrane by forming blebs, the Lys-rich histone inhibited the bacterial cell growth without morphological changes.

研究分野：分子生理学

キーワード：抗菌ペプチド 生体防御ペプチド 両生類 ハーダー腺 カセリシジン ヒストン

1. 研究開始当初の背景

抗菌ペプチドは、細菌から動物・植物にわたる生物種に存在する先天的防御機構である。本研究グループでは両生類ならびに鳥類の抗菌ペプチド cDNA の効率的なクローニング法を開発し、数多くの抗菌ペプチド様配列を見つけてきた。それらのなかには抗菌活性のないペプチドをコードしているものがあることや、脳や肝臓など微生物との接触のあまりない器官でも抗菌ペプチドの遺伝子発現があることがわかり、必ずしも抗菌目的だけで抗菌ペプチドがつくられているのではないことを予測した。実際、抗菌ペプチドの多様な活性の報告も増えていることから、単に活性を検出するだけでなく、生理学的な意義を検証することが重要な状況であった。また、真核細胞のヌクレオソーム成分として知られるヒストンが抗菌作用を有すること、一方で血液中ヒストンを原因とする敗血症の発症なども報告されており、ヒストンの生体防御に関する研究にも注目されていた。代表者には両生類皮膚から抗菌物質としてヒストンを単離した経緯もあり、ヒストンも本研究の対象とした。

2. 研究の目的

抗菌ペプチドとは、細菌等微生物に対し文字通り殺菌・静菌作用を示すペプチドであるが、近年、細胞溶解性や抗腫瘍細胞作用、抗酸化作用、抗炎症作用、サイトカイン様作用など、特に宿主の生体防御において多様な作用を示すことも明らかになっており、「多機能型生体防御ペプチド」という呼称に移行しつつある。そこで本研究では、本研究グループがこれまでに見出して来た両生類ならびに鳥類の抗菌ペプチド、およびヒストンについて、その生体防御面での多機能性を検証することにより、抗菌ペプチドのもつ生理学的かつ総合的な生体防御機構の解明を行うとともに、これら物質の分泌や発現調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 両生類皮膚・脳・ハーダー腺等の器官から抗菌ペプチド様配列をもつ cDNA のクローニングを行い、その配列に基づくペプチドを化学合成した。抗菌活性、マスト細胞脱顆粒活性、マスト細胞誘引活性、細胞毒性、レクチン様活性、抗酸化活性、大腸菌凝集活性などの測定法の確立を行い、合成したペプチドを用いてそれぞれの活性を検証した。また、そのペプチド抗体を作製し、組織切片を用いて免疫組織化学法による局在解析を行った。

(2) 鳥類特有の免疫器官であるファブリキウス嚢(BF)からは数種類の抗菌ペプチド cDNA がクローン化されている。そこでニワトリ BF の B リンパ球に由来する培養細胞株 DT40 から抗菌ペプチド cathelicidin-B1 (CATH-B1) の cDNA クローニングを行い、その発現に関

わる物質の探索を、リアルタイム PCR 法により行った。また、合成 CATH-B1 ペプチドの抗菌活性を測定し、作用後の菌の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。さらに、(1)で確立した各種バイオアッセイも行った。

(3) 高 Lys 型であるヒストン H2B と高 Arg 型であるヒストン H3 をグラム陰性菌である大腸菌とグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に作用させ、微量液体希釈法で抗菌活性を測定した。また、その作用メカニズムを解明するため、ヒストンを作用させた菌の走査型電子顕微鏡観察を行うとともに、蛍光物質標識したヒストンやタグ付ヒストンも作用させ、細菌膜との作用の状況を形態学的に観察した。さらに、ヒストンと細菌の細胞壁成分との結合親和性をゲルモビリティシフトアッセイ法により検出した。さらに、ヒストン H3 に着目し、種々の病原性微生物に対する抗菌スペクトラムの測定を行い、走査型電子顕微鏡による菌細胞の観察を介して、ヒストンの抗菌作用機序を解析した。

4. 研究成果

(1) ウシガエル皮膚・脳・ハーダー腺の各サンプルから RT-PCR 法により Catesbeianalectin (CL) をコードする前駆体の cDNA クローンを得た。CL の配列は既知の抗菌ペプチドと同一または類似するものがなく、新規の配列であった。この配列に基づき合成した CL には大腸菌に対し弱い増殖抑制作用を示したが黄色ブドウ球菌に対しては抗菌的な作用は見られなかった。バクテリアキリングアッセイにより、CL で数時間処理した大腸菌を寒天プレートに蒔き、コロニー形成を調べたところ、コントロールと有意差がなかったことから、CL による抗菌作用は殺菌的ではなく静菌的であることが示された。

培養マスト細胞腫 P-815 の培養液に CL を添加したところ、脱顆粒を誘導し、培養液中の物質である N アセチルグルコサミン (NAG) が放出され、また P-815 細胞に対する誘引作用も検出された。脳や皮膚にはマスト細胞が数多く存在することから、特に脳における CL の機能の一つとしてマスト細胞への関与が予測された。

さらに CL には赤血球や大腸菌を凝集させる作用が検出され、赤血球に対する凝集作用はグルコースや NAG により阻害されることを明らかにした。

そのほか、ウシガエルハーダー腺からは Ranacyclin-CB, Ranatuerin-1CBa, Ranatuerin-2CBa 及び 2CBb の前駆体をコードする cDNA クローンを得た。その成熟ペプチドの予想アミノ酸配列はいずれも既知抗菌ペプチドの配列に一致または類似しており、ソフトウェアによる計算上の等電点や予測二次構造は抗菌活性の存在を示唆するものであった。

CL に対する特異的抗体を用いてウシガエ

ル皮膚ならびにハーダー腺の組織切片に対する免疫染色を行ったところ、皮膚においては顆粒腺を中心に、またハーダー腺においては腺構造を形成する細胞の細胞質に、シグナルを検出したことから、ペプチドレベルでのCLの存在が確認できた。

(2)ニワトリファブリキウス囊から得られたCATH-B1前駆体cDNAの塩基配列をもとに作製したオリゴDNAをプライマーに用いたRT-PCR法により、DT40細胞からCATH-B1前駆体cDNAを増幅した。その塩基配列を決定したところ、既知のニワトリCATH-B1と完全に一致した。この配列をもとにリアルタイムPCR法によるCATH-B1 mRNAの定量系を開発した。この系を用いて、細菌毒素であるリポ多糖(LPS)やリポテイコ酸(LTA)で処理したDT40細胞のCATH-B1 mRNA量を半定量的に測定したところ、濃度や処理時間に依存して増加することを明らかにした。

合成CATH-B1を作製し、大腸菌と黄色ブドウ球菌に作用させた結果、両菌株に対し強い抗菌活性を検出した。CATH-B1で1時間処理した菌を走査型電子顕微鏡で観察したところ、いずれも細胞構造が破壊されていたことから、CATH-B1は膜破壊を伴う殺菌型の抗菌作用を示すことを明らかにした。また、CATH-B1にはLPSやLTAに対する結合能も検出されたことから、細菌の外層にあるこれら負電荷の物質に、正電荷であるCATH-B1が静電的に引き寄せられ、抗菌活性を発現することが予測された。

さらに、ケモタキセル(クラボウ社)を用いた走化性アッセイを行ったところ、CATH-B1は10 µg/mlをピークとするマスト細胞誘引作用が検出された。MTTアッセイにより細胞毒性を検証したところ、少なくとも40 µg/mlまでは毒性を示さなかった。

(3)ヒストンの抗菌活性に関する報告は高Lys型(H1, H2A, H2B)を用いたグラム陰性菌に対するものに集中しており、高Arg型(H3, H4)の活性を、しかもグラム陽性菌を用いて検証したものは非常に少なかった。本研究では、ウシ由来ヒストンH2B, H3, H4の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を測定した。その結果、いずれも60 µg/mlを超える濃度において顕著な活性を検出することができた。ヒストンH3のグラム陽性菌に対する抗菌活性の検出はおそらく世界初のことである。

これらヒストンを作用させた黄色ブドウ球菌の形態を走査型電子顕微鏡で観察したところ、H2Bで処理した細胞は変化が見られなかったが、H3とH4で処理した細胞は、いずれもプレブを形成したり、顕著な膜破壊を起こしていた。さらにヒストンもしくは蛍光標識したヒストンを作用させた菌細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、いずれも菌体内には到達せず、細胞壁もしくは細胞膜で留まっていることが明らかになった。

そこで、グラム陽性菌の細胞壁の主成分の一種であるLTAとこれらヒストンとの結合の有無をゲルモビリティシフトアッセイ法により検証したところ、いずれも明確な結合が示されたことから、ヒストンがLTAを介して黄色ブドウ球菌の細胞壁に結合することが示された。

さらに、ヒストンH3の抗菌スペクトラムの測定を試みた。その結果、グラム陰性菌であるアエロゲネス菌、緑膿菌、腸炎菌、グラム陽性菌であるセレウス菌、ミュータンス菌、真菌であるカンジダ菌のいずれに対しても明確な抗菌作用を示し、特に真菌に対して顕著な作用を検出した。さらに走査型電子顕微鏡観察により、ヒストンH3がこれらの菌のいずれに対しても膜破壊を起こしていることを明らかにした。

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3件)

- Takeda A, Tsubaki T, Sagae N, Onda Y, Inada Y, Mochizuki T, Okumura K, Kikuyama S, Kobayashi T, Iwamuro S. Bacterial toxin-inducible gene expression of cathelicidin-B1 in the chicken bursal lymphoma-derived cell line DT40: Functional characterization of cathelicidin-B1. Peptides 59, 94-102, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.peptides.2014.06.012.
- Konishi Y, Iwamuro S, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S. Molecular cloning and multifunctional characterization of host defense peptides from the bullfrog Harderian gland with special reference to catesbeianalectin. Zool. Sci. 30, 185-191, 2013. 査読有 doi: 10.2108/zsj.30.185.
- Morita S, Tagai C, Shiraishi T, Miyaji K, Iwamuro S. Differential mode of antimicrobial actions of arginine-rich and lysine-rich histones against Gram-positive *Staphylococcus aureus*. Peptides 48, 75-82, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.peptides.2013.07.025.

[学会発表](計36件)

- 1 池田拓実、近藤洋匡、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也 . ファブリキウス囊における抗菌ペプチド fowlicidin-3 の発現解析 . 日本動物学会第 67 回関東支部大会、2015 年 3 月 14 日、早稲田大学・先端生命医科学センター(東京都・新宿区)
- 2 岩室祥一、川名夏未、山中菜々子、稲田豊里、白石貴如、森田愁、多賀井千尋、

- 川崎広明. Differential modes of antimicrobial action of histones against Gram-negative and Gram-positive bacteria. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- 3 山中菜々子、松村幸枝、岩室祥一. Antimicrobial and cytotoxic effects of extracellular histone H3 that are mediated by membrane destruction. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
 - 4 稲田豊里、岩室祥一: Extranuclear histone H3 in the hamster sebocyte cell line Ha-SE: Analyses of its expression and localization in response to inflammatory stimuli. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
 - 5 Iwamuro S, Konishi Y, Uchiyama E, Mochizuki T, Sugiyama E, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S. Molecular cloning and multifunctional characterization of catesbeianalectin from the bullfrog Haredrian gland. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptalian Endocrinology and Neurobiology, Okazaki, Aichi, Japan, 7-9 Nov, 2014.
 - 6 Shishido S, Omori S, Kondo H, Konishi Y, Sagae N, Hasunuma I, Iwamuro S, Kikuyama S, Kobayashi T. Molecular cloning, localization analysis and multifunctional characterization of host defense peptides in the tongue of *Rana catesbeiana*. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptalian Endocrinology and Neurobiology, Okazaki, Aichi, Japan, 7-9 Nov, 2014.
 - 7 Kobayashi T, Nakao M, Minagawa A, Iwamuro S, Yamamoto K, Hasunuma I, Kikuyama S. Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor mediating the prolactin secretion in the bullfrog pituitary. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptalian Endocrinology and Neurobiology, Okazaki, Aichi, Japan, 7-9 Nov, 2014.
 - 8 近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、古館宏之、小林哲也: Tissue expression and biological effects of fowlicidin-2 in the quail Bursa of Fabricius. 第39回日本比較内分泌学会大会、2014年11月8日、基礎生物学研究所(愛知県・岡崎市).
 - 9 岩室祥一、多賀井千尋、森田愁、白石貴如、川崎広明: Histones as antimicrobial agents. 第51回ペプチド討論会、2014年10月22-24日、徳島大学(徳島県・徳島市).
 - 10 山中菜々子、岩室祥一: ウシ胸腺由来 Histone H3 の抗菌スペクトラムと作用機序の解析. 日本動物学会第85回大会、2014年9月13日、東北大学(宮城県・仙台市).
 - 11 稲田豊里、岩室祥一: 生体防御分子としてのヒストンH3の発現調節機構の解明. 日本動物学会第85回大会、2014年9月13日、東北大学(宮城県・仙台市).
 - 12 近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、古館宏之、小林哲也. ファブリキウス嚢における fowlicidin-2 の生理的役割. 日本動物学会第85回大会、2014年9月11日、東北大学(宮城県・仙台市).
 - 13 穴戸駿、大森聖也、近藤洋匡、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、小林哲也. ウシガエル舌における抗菌ペプチド遺伝子の発現. 日本動物学会第66回関東支部大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏市).
 - 14 齋藤朗、川崎はるな、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一. トノサマガエル皮膚由来細胞株 LAH2 の生体防御ペプチド. 日本動物学会第66回関東支部大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏市).
 - 15 内山愛里、望月拓也、小西裕己、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一. ウシガエルの生体防御における Catesbeianalectin の多機能性. 日本動物学会第66回関東支部大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏市).
 - 16 松村幸枝、多賀井千尋、稲田豊里、宮地和幸、岩室祥一. 生体防御における細胞外ヒストンの二面性. 日本動物学会第66回関東支部大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(千葉県・柏市).
 - 17 稲田豊里、岩室祥一. Effects of bacterial endotoxins on the expression and intracellular localization of histone H3 in Ha-SE cells. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市).
 - 18 近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、古館宏之、小林哲也. ファブリキウス嚢における fowlicidin-2 の生理機能の解析. 第38回日本比較内分泌学会大会、2013年10月25日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市).
 - 19 稲田豊里、岩室祥一. 生体防御分子としてのヒストンの転写・翻訳調節機構の解明. 日本動物学会第84回大会、2013年9月28日、岡山大学(岡山県・岡山市).
 - 20 寒河江望、小西裕己、森田愁、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一. 生体防御

- ペプチドにおける多機能性の測定法の確立．日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)．
- 21 近藤博匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、小林哲也．ファブリキウス嚢における fowlicidin の発現と生理機能の解析．日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 12 日、岡山大学(岡山県・岡山市)．
- 22 近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、小林哲也．鳥類固有の免疫器官における生体防御ペプチド fowlicidin の遺伝子発現とその機能解析．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 23 森田愁、多賀井千尋、白石貴如、宮地和幸、岩室祥二．細胞膜構造に応じたヒストン H2B の多様な抗菌メカニズムに関する研究．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 24 多賀井千尋、森田愁、白石貴如、宮地和幸、岩室祥二．Arg-rich 型ヒストン H3 と H4 の抗菌メカニズムならびに細胞障害性の研究．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 25 小林浩志、寒河江望、小西裕己、藤澤静香、岩室祥二、蓮沼至．ウシガエル脳内の Temporin ファミリー遺伝子発現の局在．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 26 寒河江望、津田礼乃、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥二．ペプチドを介した両生類皮膚の防御機構に関する研究．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 27 津田礼乃、寒河江望、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥二．エゾアカガエル生体防御ペプチドの cDNA クローニングとその機能解析．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 28 稲田豊里、多賀井千尋、岩室祥二．生体防御分子としてのヒストンの転写・翻訳調節機構の解明．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 29 武田あすな、椿卓、奥村和男、小林哲也、菊山榮、岩室祥二．鳥類免疫器官特異的抗菌ペプチド Cathelicidin-B1 の研究．日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学(東京都・目黒区)．
- 30 小林浩志、藤澤静香、小西裕己、寒河江望、蓮沼至、岩室祥二．ウシガエル脳における Temporin ファミリー遺伝子の発

- 現．第 37 回日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 30 日、福井大学(福井県・福井市)．
- 31 近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥二、菊山榮、小林哲也．ウズラのファブリキウス嚢における fowlicidin-2 の発現とその機能解析．第 37 回日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 30 日、福井大学(福井県・福井市)．
- 32 多賀井千尋、森田愁、白石貴如、宮地和幸、岩室祥二．Arg-rich 型ヒストン H3 と H4 の抗菌性とそれに伴う細胞毒性の研究．日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学(大阪府・豊中市)．
- 33 森田愁、多賀井千尋、白石貴如、宮地和幸、J. Michael Conlon、岩室祥二．ヒストン H2B は細菌細胞膜構造に応じて異なる抗菌作用を示す．日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学(大阪府・豊中市)．
- 34 武田あすな、椿卓、奥村和男、小林哲也、持田弘、菊山榮、岩室祥二．鳥類免疫器官特異的抗菌ペプチド Cathelicidin-B1 の研究．日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学(大阪府・豊中市)．
- 35 小林浩志、藤澤静香、小西裕己、寒河江望、蓮沼至、岩室祥二．ウシガエル脳における抗菌ペプチド遺伝子の発現．日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学(大阪府・豊中市)．
- 36 津田礼乃、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥二．Sequence capture に基づくエゾアカガエル抗菌ペプチド遺伝子の効率的なクローニング．日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学(大阪府・豊中市)．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東邦大学理学部生物学科生体調節学研究室
(<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/regl/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩室 祥一 (IWAMURO, Shawichi)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：70221794

(2) 研究分担者

菊山 榮 (KIKUYAMA, Sakae)

早稲田大学・教育・総合学術院・名誉教授

研究者番号：20063638

小林 哲也 (KOBAYASHI, Tetsuya)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：00195794

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：40434261

(3) 連携研究者

該当者なし ()

研究者番号：