

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24860030

研究課題名(和文)米由来新規抗菌ペプチドの細胞内標的分子の精製と同定およびその作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of action of novel antimicrobial peptides from rice and purification and identification of their target compounds in cells.

研究代表者

石山 洋平 (Ishiyama, Yohei)

新潟大学・産学地域連携推進機構・研究員

研究者番号：50634854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗菌ペプチドの細胞内標的分子への作用メカニズムを解明することを目的として、タンパク質合成に対する抗菌ペプチドの影響を定量的に測定する手法の確立を目指した。従来の抗生物質を用いた結果から、今回実施した無細胞タンパク質合成系を用いた手法は、妥当性の高い測定方法であることが確認できた。また、細胞内作用が未知である抗菌ペプチドについては、本測定法を用いることにより、タンパク質合成阻害能を定量的に評価できただけでなく、タンパク質合成のどの過程を阻害するかを特定することができた。また、未知の標的物質の精製については抗菌ペプチドを固定化した磁性ビーズを用いた方法が有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to reveal modes of action of antimicrobial peptides in cells. Several methods using cell-free protein synthesis system were developed for achieving this purpose. By using our methods, we could confirm the known modes of action of conventional antibiotics, such as streptomycin, fosfomycin and BLEOCIN. We were also able to not only assess the unknown abilities of antimicrobial peptides to inhibit protein synthesis, but also elucidate the inhibitory steps in protein synthesis process, including transcription, translation and refolding. Moreover, we found that a purification method using antimicrobial peptide-immobilized magnetic beads was effective to isolate target compounds in cells.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗菌ペプチド 抗生物質 無細胞タンパク質合成 微生物 作用機構

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 抗菌ペプチドによる生体防御機構は、ヒトをはじめとするあらゆる生物に共通の先天性免疫機構であり、既に約 1,500 種類の抗菌ペプチドが報告されている。抗菌ペプチドは、細菌、真菌、原虫、ウイルスなどに幅広く作用し、宿主(ヒトを含む)に対して毒性が低い、耐性菌を生じにくいなどの共通した特徴を有する。そのため、従来の抗生物質に代わる医薬品として、またヘルスケアや機能性食品の素材として注目され、国内外で活発に研究されている。

(2) 抗菌ペプチドの抗菌作用メカニズムとしては、標的の細胞膜と静電的相互作用によって結合し、細胞膜を破壊することによって致死効果を示す場合と、細胞膜を透過し DNA や酵素などの細胞内分子を標的とする場合が報告されている。しかし、後者の場合の報告例は少なく、その作用メカニズムはほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では抗菌ペプチドの細胞内標的分子への作用メカニズムを解明することを目的に、以下の検討を行った。

(1) タンパク質生合成の各ステップ(転写、翻訳、フォールディング)に対する抗菌ペプチドの影響を、無細胞タンパク質合成系を用いて定量的に測定する手法の確立を目指した。

(2) 抗菌ペプチドのタンパク質生合成の阻害作用を明らかにするために、抗菌ペプチドの細胞内標的分子を精製・同定した。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用した抗菌ペプチド

抗菌ペプチドとして米由来新規抗菌ペプチド CL(K20A, K25A)と Amyl-1-18 を用いた。また、測定手法の妥当性を確認するためのモデル抗菌ペプチドとして、ピロコリシン(昆虫由来)、プフォリン II(カエル由来)、およびインドリシジン(牛由来)を、モデル抗生物質として 16S rRNA を標的としてタンパク質合成を阻害するストレプトマイシン、DNA を標的とするプレオシン(プレオマイシン系抗生物質)、および細胞壁合成酵素を標的とするホスホマイシン(すなわち、タンパク質合成を阻害しない)をそれぞれ用いた。

### (2) 実験方法

#### 合成プロセス阻害の測定

緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするベクターから GFP を合成する無細胞タンパク質合成システム(RTS)に抗菌物質を添加し、30 で 6 時間 GFP を発現させた。その後、成熟した GFP の発現量を蛍光強度を測定することによって定量し、抗菌物質の GFP 合成プロ

セスに対する作用を検討した。

#### 転写ステップの阻害

実験と同様に RTS を用いて GFP を発現させた。そのとき、1,3,6 時間目にそれぞれ反応液をサンプリングし、Total RNA を精製した。その後、含まれる GFP の mRNA を RT-PCR を用いて定量することによって、抗菌物質の転写ステップに対する作用を検討した。

#### 翻訳ステップの阻害

GFP をコードする DNA から mRNA を予め調製した。調製した mRNA から GFP を合成する RTS 反応系に抗菌物質を添加し、30 で 6 時間 GFP を発現させた。また、発現した GFP のタンパク質量を評価するために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を用いて発現したタンパク質を分離し、ImageJ を用いてバンド強度を解析することによって、合成された GFP のポリペプチドを定量した。

#### フォールディングステップの阻害

グアニジン塩酸塩によって変性させた酵素ルシフェラーゼを、DnaK と DnaJ を用いてリフォールディングするステップに抗菌物質を添加し、抗菌物質のフォールディングステップに対する作用を検討した。

#### 標的物質の精製・同定

磁性ナノビーズに固定化したピロコリシンを調製した後、RTS 反応液に添加し、4 で一晩ゆるやかに混合した。次に、磁性スタンドを用いてナノビーズを回収・洗浄した後、ビーズ上に固定化したピロコリシンに結合した標的タンパク質を、塩化カリウム溶液を用いて溶出させた。溶出液は SDS-PAGE で分離した後、ゲルを銀染色した。出現したバンドを MALDI-TOF/MS に供し、該当タンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

(1) 実験方法 では、タンパク質合成プロセスに対する阻害作用を検討した。この実験では、GFP をコードする DNA を含む GFP ベクターと同時に抗菌物質を添加し、タンパク質合成プロセスに対する抗菌物質の影響を検討した(図 1)。

まず、モデル抗生物質を用いて、方法の妥当性を評価した。その結果、細胞内に標的分子を有するストレプトマイシンおよびプレオシンは、程度に差はあったが、両者とも阻害作用を示した。一方、ネガティブコントロールとして用いた細胞壁合成酵素阻害剤であるホスホマイシンは、阻害作用を示さなかった。すなわち、抗生物質の作用様式に応じた阻害挙動を確認できた。このことから、本手法によってタンパク質合成阻害能の有無を評価できることを確認できた。また細胞内に標的分子を持つ 3 種類のモデル抗菌ペプチドも、程度に差はあるが、タンパク質合成

プロセスを阻害することを確認できた。さらに、Amy1-18はプフォリンIIよりも低い濃度において、タンパク質合成プロセスを阻害することがわかった。一方、CL(K20A, K25A)は5 mMの添加濃度においてもGFPの合成を阻害しなかったことから、タンパク質合成阻害能を有していないことが示唆された。

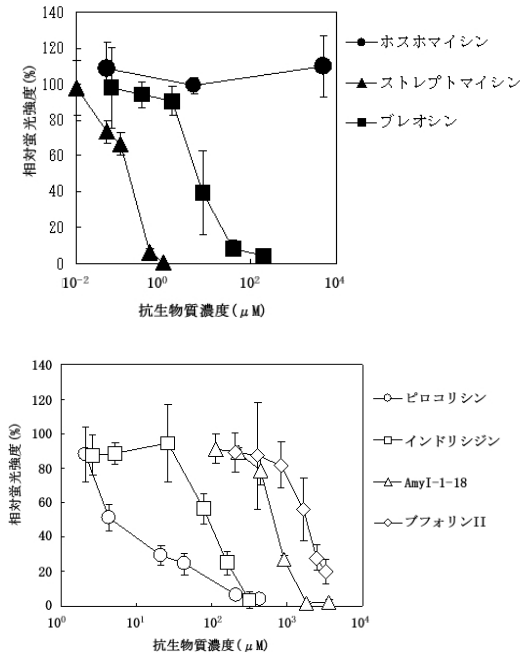


図1 各抗菌物質のタンパク質合成阻害

(2) 方法 では、転写ステップに対する抗菌物質の阻害作用を検討した。この実験では、方法 と同様な方法を用いて、タンパク質合成を行い、その過程で反応液をサンプリングし、mRNAを抽出した後、RT-PCRによってmRNA量を定量した(図2)。

モデル抗菌物質を添加した場合、16S rRNAをターゲットに持つストレプトマイシンおよびネガティブコントロールであり、細胞壁合成酵素阻害剤であるホスホマイシンは阻害作用を示さず、DNAをターゲットに持つプレオシンは早い段階からmRNAの合成を阻害することを確認できた。さらに、3種類のモデル抗菌ペプチドについても同様の実験を行った結果、分子シャペロンであるDnaKをターゲットに持つピロコリシンは転写ステップを阻害せず、DNAに作用することが報告されているプフォリンIIは経時的に転写ステップを阻害することを確認できた。また同時に、DNAに作用することが報告されているインドリシジンは、プレオシンと同様に、早い段階でmRNAの発現を阻害することがわかった。一方、米由来抗菌ペプチドAmy1-18は転写ステップを阻害しないことがわかった。

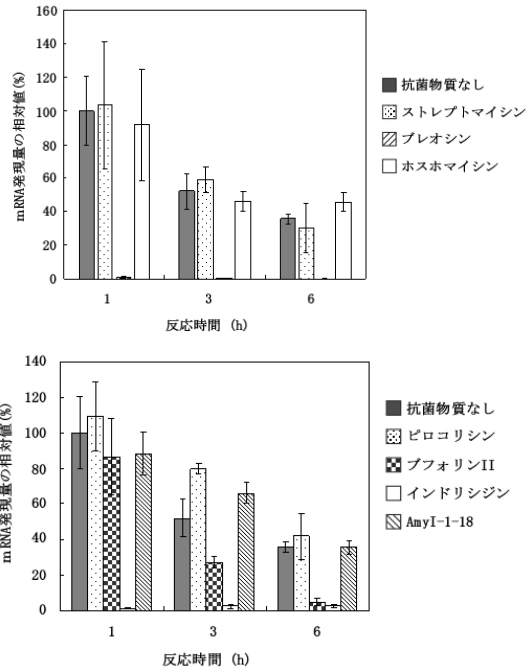


図2 各抗菌物質による転写ステップの阻害

(3) 方法 では、翻訳ステップに対する抗菌物質の阻害作用を検討した。すなわち、RTSキットにあらかじめ調製したGFPのmRNAを添加し、翻訳ステップから合成を開始した。また、発現したタンパク質量を評価するために、SDS-PAGEを用いて発現したタンパク質を分離し、ImageJを用いてバンド強度を解析することによって、合成されたポリペプチドを定量した(図3)。

まず、モデル抗菌物質を用いて方法 の妥当性を評価した結果、ネガティブコントロールであり、細胞壁合成酵素阻害剤であるホスホマイシンは阻害を示さず、16S rRNAをターゲットに持つストレプトマイシンは、阻害を示すことを確認できた。また、DNAをターゲットに持つプレオシンを添加した際、高濃度領域において弱い阻害作用を確認した。これはプレオシンが、DNAばかりでなく周囲のタンパク質も酸化的に切断するため、mRNAにも何らかの影響を与えた結果であると考えられる。しかし、これは非常に高濃度で添加した際に観察された結果であり、プレオシンは翻訳ステップを直接阻害することはないと考えられる。

次に、3種類のモデル抗菌ペプチドを用いて同様の実験を行った結果、mRNAに作用すると報告されているプフォリンIIは、翻訳ステップを阻害することを確認できた。また、DNAや細胞内膜に作用すると報告されているインドリシジン、DnaKをターゲットにすることが報告されているピロコリシンは、新たに翻訳ステップを阻害することが明らかになった。さらに、Amy1-18については、プフォリンIIよりも低濃度において翻訳ステッ

プを阻害することが明らかになった。

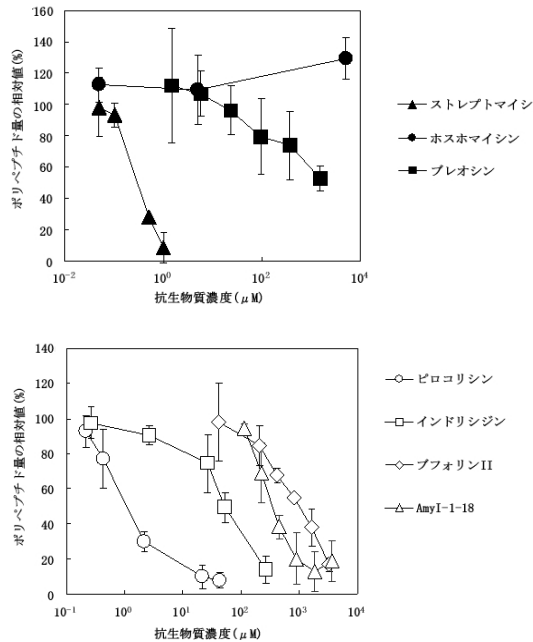


図3 各抗菌物質の翻訳ステップの阻害

(4) 方法 では、フォールディングステップに対する抗菌物質の阻害作用を検討した。フォールディングステップ阻害を評価するための実験には、GFP ではなく酵素ルシフェラーゼを用いた。

モデル抗菌物質を用いて方法 の妥当性を評価した結果、16S rRNA をターゲットに持つストレプトマイシン、ネガティブコントロールであり、細胞壁合成酵素阻害剤であるホスホマイシンは阻害作用を示さなかった。また DNA をターゲットに持つプレオシンは、高濃度において弱い阻害作用を示した。しかし、これは方法 において述べた理由と同様に、DnaK など何らかの影響を及ぼした結果であると推察される。したがって、プレオシンはフォールディングステップを直接阻害することはないと考えられる。

次に、3 種類のモデル抗菌ペプチドを用いて、同様の実験を行った結果、分子シャペロンの DnaK をターゲットにすることが報告されているピロコリシンは、フォールディングステップを阻害した。また、既に報告されている DNA をターゲットにするインドリシジンおよび DNA と RNA をターゲットにするプフォリン II に関して、新たにフォールディングステップも阻害することが明らかになった。さらに、Amy I-1-18 はフォールディングステップを阻害することが知られているピロコリシンよりも低い濃度において、フォールディングステップを阻害することがわかった。

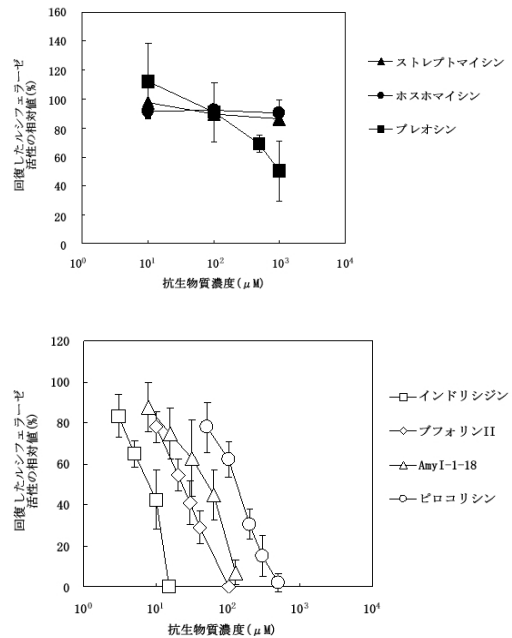
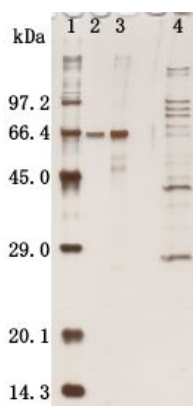


図4 各抗菌物質のフォールディング阻害

(5) 以上の結果から、RTS プロセスを用いた抗菌物質のタンパク質合成阻害能を測定する方法は、十分に妥当性があるといえる。また、前述したように、本測定法に未知の抗菌ペプチドを供することで、タンパク質合成阻害能を定量的に評価できたばかりでなく、タンパク質合成のどの段階を阻害するかを網羅的に特定できた。この点は、抗菌ペプチドの細胞内の作用機構を解明する上で、画期的であると考えられる。

(6) これまでに述べてきた結果から、モデルペプチドであるピロコリシンは、従来の報告にあるフォールディングの阻害様式のみならず、翻訳段階も阻害することが明らかとなった。このことから、ピロコリシンは DnaK 以外に未知の標的物質が存在することが示唆された。

そこで方法 において、磁性ビーズを用いてピロコリシンの新規標的タンパク質の精製を試みた (図 5)。その結果、SDS-PAGE によって 6 つのバンドが得られた。そのうち、27 kDa 付近および 40 kDa のバンドについて MALDI-TOF/MS による PMF 解析を行った。その結果、UMP phosphatase と fused histidinol-phosphatase と同定された。これらの分子はピロコリシンの標的分子候補である可能性が示唆された。今後は、残る 4 つのバンドについて同様に解析することで、ピロコリシンのタンパク質合成阻害作用メカニズムをより詳細に解明できると考えられる。また、米由来抗菌タンパク質である Amy I-1-18 についても同様の手法を用いて標的分子を明らかにしたいと考えている。



1 : 分子量マーカー  
 2 : 5 ng/ml BSA  
 3 : 25 ng/ml BSA  
 4 : ピロコリシン結合タンパク質

図5 ピロコリシン結合タンパク質の分離

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石山 洋平 (ISHIYAMA, Yohei)

新潟大学・産学地域連携推進機構・研究員

研究者番号：50634854

## 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 3 件)

発表者： 石山洋平、近藤裕志、落合秋人、谷口正之

発表表題：抗菌ペプチドの活性評価およびその作用機構の解明

学会名等：平成 25 年度 CFIL 研究員研究成果報告会

発表日：2014 年 3 月 7 日

発表場所：新潟大学、新潟

発表者： 近藤裕志、石山洋平、落合秋人、谷口正之

発表表題：無細胞タンパク質合成システムを用いた抗菌ペプチドのタンパク質合成阻害作用の評価

学会名等：第 65 回日本生物工学会大会

発表日：2013 年 9 月 18 日～2013 年 9 月 20 日

発表場所：広島国際会議場、広島

発表者： 石山洋平、近藤裕志、落合秋人、谷口正之

発表表題：無細胞タンパク質合成システムを用いたタンパク質合成に対する抗菌ペプチドの阻害効果

学会名等：日本農芸化学会

発表日：2013 年 3 月 24 日～2013 年 3 月 28 日

発表場所：東北大学、仙台