

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07134

研究課題名(和文)細胞外ヒストンの光と影 - 抗微生物作用並びに細胞毒性に関わる分子内配列の探索と応用

研究課題名(英文) Dual functions of extracellular histones in host defense: Detection, characterization, and the mode of action of antimicrobial and cytotoxic region within histone H3

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外ヒストンは、抗微生物作用や真核細胞に対する細胞毒性物質であることが報じられている。本研究では、ヒストンH3に着目し、その抗菌スペクトラムや種々の動物細胞に対する毒性、ならびにそれらの作用機序の検証、及び活性を發揮する分子内領域の特定を行った。その結果、ヒストンH3は広くグラム陰性菌・陽性菌、真菌、動物培養細胞に対しその細胞膜破壊を起こし、抗菌性や細胞毒性を發揮すること、及びその作用に関わるヒストンH3分子の領域は異なることを明らかにした。また、低濃度の細胞外ヒストンには細胞膜透過能も報じられていることから、本研究ではヒストンH2Bの細胞膜透過に必要な配列の探索を行い、領域を特定した。

研究成果の概要(英文)：Recent reports have demonstrated the existence of extracellular histones. Extracellular histones have been shown to explicitly display antimicrobial properties and are known to be the major mediators of death during sepsis. In this study, we investigated antimicrobial and cytotoxic effects and the mode of action of histone H3 on various bacterial, fungal, and mammalian cells and identified functional region(s) within histone H3. The following results were obtained: (1) histone H3 exhibits growth-inhibitory effects against gram-negative and -positive bacteria and fungi through cell membrane destruction; (2) histone H3 exhibits strong cytotoxic effects on normal, immortal, and tumor cell lines through cell membrane destruction, but a lower cell density is required for immortal and tumor cells than for normal cells; (3) antimicrobial and cytotoxic functions are derived from different regions within histone H3.

研究分野：分子生理学

キーワード：ヒストン 生体防御ペプチド 細胞膜透過ペプチド 細胞毒性 抗微生物活性 リュウキュウアカガエル

### 1. 研究開始当初の背景

ヒストンは細胞核内においてヌクレオソームを形成し、遺伝子の発現制御に深く関わるタンパク質として広く認識されているが、実際には細胞外にも存在し、抗微生物作用や細胞毒性、細胞膜透過性などを発揮している。本研究開始時にはすでに、特に細胞毒性について、多くの文献が発表され、活発な研究が行われていた。しかし、ヒストンは核内タンパク質としてあまりに有名であるため、核外ヒストンの存在やその機能についての一般的な認知度は低かった。本研究では、細胞毒性に比して情報が極めて少ない、抗微生物作用にまず着目した。実際、5種類のヒストンサブタイプの個々について、どのような抗微生物スペクトラムが存在するのか、また作用機序がどうなっているかは明確ではなく、データ量も十分ではなかった。また、細胞毒性についても、抗微生物作用と同様、サブタイプ個々での知見は少ないまま、すべてのサブタイプが同じ機能や作用機序をもつかのようによび扱われていた。そこで本研究では、抗微生物作用に関する報告が最も少なく、かつ細胞毒性の研究が活発に行われているヒストン H3 に着目した。また、ヒストン H2B は大腸菌細胞膜を透過することにより抗菌性を発揮することが代表者らによって報告されていたが、膜透過に必要な配列は不明のままであった。

### 2. 研究の目的

(1)ヒストン H3 の抗微生物スペクトラムの測定：ヒストン H3 の抗微生物活性は代表者らが世界で初めて報じたが、そのとき対象とした菌は大腸菌と黄色ブドウ球菌のみであった。その後も抗微生物スペクトラムや作用機序に関する論文がどこからも発表されていないことから、複数種類の病原性グラム陰性菌、グラム陽性菌、および真菌を対象に、その増殖抑制作用を検証するとともに、細胞の形態的な観察による作用機序の解析を行うことを目的とした。

(2)ヒストン H3 の細胞毒性の測定：ヒストン H3 は細胞毒性を有し、過剰投与は敗血症を引き起こすことが報じられているが、細胞に対する直接的な作用についてはあまり検証されていない。そこで、正常細胞、不死化細胞、がん化細胞を対象に、その毒性を検証するとともに、細胞の形態的な観察による作用機序の解析を行うことを目的とした。

(3)ヒストン H3 の活性領域の特定：ヒストン H3 の抗微生物活性および細胞毒性がその分子内配列のどの領域に由来するのかを検証し、特定することを目的とした。

(4)ヒストン H2B の細胞膜透過に必要な配列の検証：低濃度のヒストンには細胞膜透過能が報告されている。代表者はヒストン H2B

が大腸菌細胞膜を傷つけることなく透過し、細胞内で菌の核酸と結合することで増殖を抑制することを報告している。以上のことから、本研究ではヒストン H2B が細胞膜透過を行うために必要な配列を特定することを目的とした。

(5)両生類皮膚生体防御ペプチドの探索：本研究の原点は、両生類の皮膚から多機能性生体防御ペプチド(抗菌ペプチド)の単離の過程でヒストン H2B を抗菌物質として得たことである。したがって、両生類生体防御ペプチドを用いた研究は、各種作用のアッセイ系の確立などにおいて、常に本研究に先行している。これまで確立した手法を維持し発展させ、ヒストンの研究に応用するため、本研究ではリュウキュウアカガエル皮膚から生体防御ペプチドの cDNA クローニングを行い、新規性の高いペプチドについて抗菌活性と細胞毒性の解析を行うことも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)抗微生物活性の測定：被検体として大腸菌、緑膿菌、腸炎菌、アエロゲネス菌(以上グラム陰性菌)、黄色ブドウ球菌、ミュータンス菌、セレウス菌(以上グラム陽性菌)、カンジダ菌(真菌)を使用し、通常の微量液体希釈法により測定した。

(2)細胞毒性の測定：被検体として COS7(アフリカミドリザル腎由来不死化細胞)、HepG2(ヒト肝癌由来細胞)、CPAE(ウシ肺動脈血管内皮細胞)、HUVEC(正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)、HAEC(ヒト動脈内皮細胞由来)を使用し、通常の MTT アッセイ法により測定した。

(3)細胞の形態観察：ヒストン H3 処理後数時間の微生物細胞ならびに哺乳類培養細胞を固定し、走査型電子顕微鏡で細胞の形態を観察した。

(4)ヒストン H3 の活性領域の特定：ヒトヒストン H3 のアミノ酸配列に基づき、異なる 4 種類のペプチドを合成し、上記(1)~(3)に準じた方法で活性の有無や作用機序を検証した。

(5)ヒストン H2B の細胞膜透過部位の検証：一般的な細胞膜透過ペプチドのもつ配列の特徴に合致する領域をヒストン H2B のアミノ酸配列から抽出した。その配列に応じた蛍光標識ペプチドを合成して、COS7、HepG2、HUVEC、LAH1(カエル皮膚由来)などの各種脊椎動物培養細胞に作用させ、その局在を蛍光顕微鏡で観察した。

(6)リュウキュウアカガエル皮膚生体防御ペプチドの cDNA クローニングと活性測定：リュウキュウアカガエル皮膚 Total RNA を鋳型に、生体防御ペプチド前駆体タンパク質遺伝子に特異性の高いプライマーを用いた

RT-PCR 法によりその cDNA を増幅した。塩基配列を解析し、新規性の高い配列をもつペプチドを合成して、上記(1)~(3)に準じて各種活性の測定を行なった。

#### 4. 研究成果

(1)ヒストン H3 の抗微生物活性：3-(1)及び(3)に示したすべての細菌ならびに真菌に対し、有効濃度には違いはあるもの、増殖抑制効果が検出され、その作用は細胞破壊であることが走査型電子顕微鏡観察により明らかになった。

(2)ヒストン H3 の細胞毒性：3-(2)及び(3)に示したすべての細胞株に対し、細胞毒性が検出され、その作用は細胞破壊であることが走査型電子顕微鏡観察により明らかになった。また、被検体として細胞を使用する際、不活化細胞・腫瘍細胞の場合は、細胞密度を正常細胞の半分程度に設定しないと MTT アッセイでは毒性が検出できないことが示された。

(3)ヒストン H3 の活性領域の特定：ヒストン H3 の全長を N 末端側からほぼ同数のアミノ酸残基数となるように 4 分割したペプチドを合成し、それぞれについて 3-(1)~(3)に示した方法で活性の測定を行なった。その結果、抗微生物活性を示す領域と細胞毒性を示す領域は異なることを明らかにした。

(4)ヒストン H2B の細胞膜透過性：ヒストン H2B の N 末端側寄りの配列に即して合成した複数種類のペプチドから、3-(4)に示したいずれの細胞に対しても膜透過を行うものを得た。膜透過の効率率はペプチドならびに細胞によって差異があることが示された。

(5)リュウキュウアカガエル生体防御ペプチドの探索：3-(5)に示した方法により 12 種類の生体防御ペプチド前駆体 cDNA をクローン化した。このうち配列の新規性が最も高く、計算上の等電点が最も高かった Brevinin-1ULf と Ulmin-1ULa の 2 種類について合成ペプチドを作製し、抗微生物活性と細胞毒性を検出した。両ペプチドにおいては各活性に差異があることが示された。

#### 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)

Yamanaka N, Iwamuro S. Antimicrobial and cell-membrane-penetrating activities of a histone H2B-derived fragment peptide. PEPTIDE SCIENCE 2017, P-141, 2018. 査読有

Ogawa D, Mochitate M, Furukawa M, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S, Iwamuro S. Molecular cloning and

functional characterization of antimicrobial peptides brevinin-1ULf and ulmin-1ULa in the skin of the newly classified Ryukyu brown frog *Rana ulma*. Zool Sci. 34, 523-531, 2017. doi: 10.2108/zs170084. 査読有

岩室祥一、小林哲也：魔弾の射手：両生類の先天的防御機構、比較内分泌学、第 43 巻 161 号、85-86 ページ、2017 年 [https://doi.org/10.5983/nl2008jsce.43.85\\_2](https://doi.org/10.5983/nl2008jsce.43.85_2). 査読有

岩室祥一：細胞外ヒストンの抗菌作用。比較内分泌学 42, 112-113, 2016. <https://doi.org/10.5983/nl2008jsce.42.112>. 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

山中菜々子、田中夕理、小谷野泉、岩室祥一：ヒストン H3 において抗微生物作用を示す分子内領域の特定とその作用機序。第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会 [ConBio2017])、2017 年、神戸。

田中夕理、山中菜々子、松村幸枝、小谷野泉、岩室祥一：ヒストン H3 において細胞毒性を示す分子内領域の特定とその作用機序。第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会 [ConBio2017])、2017 年、神戸。

山中菜々子、岩室祥一：Antimicrobial and cell-membrane-penetrating activities of a histone H2B-derived fragment peptide. 第 54 回ペプチド討論会、2017 年、大阪。

岩室祥一：膜にせかるるヒストンのわれても末に逢はむとぞ。日本動物学第 88 回大会シンポジウム「両生類はワンダーランド(5)セレンディピティーワンダーランドへの入り口」、2017 年、富山。

ファムディン・ユイ、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ニホンウズラの腎臓における -Defensin-9 と -10 の発現。日本動物学会第 88 回大会、2017 年、富山。

中野真樹、小林浩志、杉山恵利香、藤澤静香、小林哲也、菊山榮、蓮沼至、岩室祥一：ウシガエル脳内における Catesbeianalectin の発現とその変態との関連性について。日本動物学会第 88 回大会、2017 年、富山。

田中夕理、小谷野泉、山中菜々子、岩室祥一：抗菌性ならびに細胞毒性を発揮する領域を特定する。日本動物学会第 88 回大会、2017 年、富山。

小川大輔、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：サドガエル皮膚生体防御ペプチドの探索とその機能解析。日本動物学会第 88 回大会、2017 年、富山。

鶴澤未羽、小川大輔、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：ツシマアカガエル皮膚抗菌ペプチドの探索。日本動物学会第 88

回大会、2017年、富山。  
持立真希、小川大輔、古川真帆、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：新規に分類されたリュウキュウアカガエルの抗菌ペプチドとその活性ならびに細胞毒性。日本動物学会第88回大会、2017年、富山。  
小林哲也、岩室祥一：抗菌ペプチドとその様々な生理的役割、日仏生物学会第186回例会、2017年、東京。  
小川大輔、古川真帆、持立真希、小林哲也、菊山榮、蓮沼至、岩室祥一：リュウキュウアカガエル (*Rana ulma*) 皮膚の生体防御ペプチド。第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016年、神奈川。  
岩室祥一、小林哲也：魔弾の射手：両生類の先天的防御機構。第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、「内分泌現象から見た生物の不思議 - 時・継・愛・恒・巡・守 -」(招待)、2016年、神奈川。  
ファミン・ユイ、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) における -Defensin の遺伝子発現。第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016年、神奈川。  
中野真樹、小林浩志、杉山恵利香、藤澤静香、小林哲也、菊山榮、蓮沼至、岩室祥一：ウシガエル生体防御ペプチド catesbeianalectin の脳内発現解析。第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016年、神奈川。  
小谷野泉、山中菜々子、松村幸枝、岩室祥一：ヒストン H3 のもつ抗菌性ならびに細胞毒性とその活性部位の探索。第39回日本分子生物学会年会、2016年、横浜。  
榎本峻秀、山中菜々子、清水瑠夏、岩室祥一：ヒストン H2B 分子内において細胞膜透過を行う領域を特定する。第39回日本分子生物学会年会、2016年、横浜。  
池田拓実、近藤洋匡、布村大樹、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ウズラのファブリキウス囊における fowlicidin-1, -2, -3 mRNA の発現。第40回鳥類内分科学研究会、2016年、愛媛。  
Okada R, Yamamoto K, Hasunuma I, Asahina J, Kikuyama S. Arginine vasotocin, but not authentic corticotropin-releasing factor, acts as the major factor for inducing the corticotropin release from the bullfrog pituitary. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and 87th meeting of Zoological Society of Japan. Okinawa, 2016。  
中野真樹、小林浩志、杉山恵利香、藤澤静香、岩室祥一、蓮沼至：ウシガエル脳内に発現する抗菌ペプチドは何のために存在しているのか？第2回次世代両生類研究会、2016年、岡崎。

②1 Yamanaka N, Matsumura Y, Iwamuro S. Dual functions of histones in the host defense: Histone H3 exhibits its

antimicrobial and cytotoxic properties by cell membrane destruction. RegPep2016 (International Regulatory Peptide Society), Rouen, France, 2016。  
②2 Ikeda T, Kondo H, Nunomura D, Furudate H, Yamanaka N, Hasunuma I, Iwamuro S, Kikuyama S, Kobayashi T. Regulation of mRNA expression and biological effects of fowlicidin-1, -2, -3 in the quail (*Coturnix japonica*) bursa of Fabricius. RegPep2016 (International Regulatory Peptide Society), Rouen, France, 2016。  
②3 山中菜々子、森田愁、多賀井千尋、岩室祥一、岩室祥二：ヒストン H2B に由来する抗菌性ならびにその細胞膜透過性ペプチドとしての研究と応用。第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年、神戸。  
②4 岩室祥一、小林哲也：抗菌戦線異状アリ？ All quiet on the defensive front in amphibians? 日本動物学会第86回新潟大会シンポジウム「両生類はワンダーランド(4)」、2015年、新潟。  
②5 岩室祥一：Antimicrobial and cytotoxic activities of histones. 第40回日本比較内分泌学会大会・第37回日本比較生理生化学会合同大会 (CompBioI2015 広島大会) 本部企画シンポジウム「動物における価値評価の比較生物学」、2015年、広島。  
②6 山中菜々子、稲田豊里、松村幸枝、岩室祥一、岩室祥二：Antimicrobial and cytotoxic activities of histone H3: Effects of dexamethasone on the bacterial toxin-inducible changes of intracellular localization patterns of histone H3 in a hamster sebocyte cell line. 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会、2015年、広島。  
②7 水田啓介、宇梶紗祐里、齋藤明、立里晶露、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：Molecular cloning and expression analysis of genes encoding host defense peptide in amphibian skin cell lines with special reference to acyclic brevinin-1. 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会、2015年、JMS アステールプラザ、広島。  
②8 池田拓実、布村大樹、近藤洋匡、古舘宏之、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：Fowlicidin 1-3 mRNA expression in the quail (*Coturnix japonica*) bursa of Fabricius. 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会、2015年、広島。  
②9 川名夏未、山中菜々子、岩室祥一：ヒストン混合物の抗菌性および細胞毒性。日本動物学会第86回大会、2015年、新潟。  
③0 池田拓実、近藤洋匡、布村大樹、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ウズラのフ

アプリキウス囊における fowlicidin-3 の  
発現日本動物学会第 86 回大会、2015 年、  
新潟。

〔図書〕(計 2 件)

岩室祥一：両生類の抗菌ペプチドとその多  
機能性、抗菌ペプチドの機能解明と技術利  
用』、pp. 15-27、シーエムシー出版、2017。  
岩室祥一、小林哲也：生体防御ペプチドに  
よる両生類の先天的防御機構、「ホルモン  
から見た生命現象と進化シリーズ第 7 巻、  
生体防御・社会性、pp. 148-159、裳華房、  
2016。

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

小林 哲也 (KOBAYASHI, Tetsuya)  
埼玉大学・理工学研究科・教授  
研究者番号：00195794

菊山 榮 (KIKUYAMA, Sakae)  
早稲田大学・教育・総合科学学術院・名誉  
教授  
研究者番号：20063638

蓮沼 至 (HASUNUMA, Itaru)  
東邦大学・理学部・講師  
研究者番号：40434261

岡田 令子 (KOBAYASHI, Tetsuya)  
静岡大学・理学部・講師  
研究者番号：50386554

中野真樹 (NAKANO, Masaki)  
東邦大学・理学部・博士研究員  
研究者番号：20646195

(3) 連携研究者

該当者なし ( )  
研究者番号：

(4) 研究協力者

該当者なし ( )