

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01944

研究課題名(和文)多機能性タンパク質を用いた歯周病治療法の開発に向けた基盤構築

研究課題名(英文)Construction of basic technique using multifunctional protein for periodontal disease treatment

研究代表者

落合 秋人(Ochiai, Akihito)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40588266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、過去の研究において、ヒトおよびイネ由来の生理活性タンパク質が歯周病の重症化に關与する日和見感染真菌に対して、既存の抗生物質とは異なる機構で抗真菌活性を示し、さらには細菌由来内毒素を中和する活性を有することを見出した。本研究課題においては、これらタンパク質の内毒素結合メカニズムの解析とin vitroにおける抗炎症作用を検証し、同時に抗真菌作用メカニズムの解明を進めた。これにより、天然物由来の素材を利用した新たな歯周病治療法を開発するための基盤技術の構築を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、これまでにヒト唾液およびイネ由来の生理活性タンパク質(-アミラーゼおよびディフェンシン)が内毒素と結合することを発見した。とりわけ -アミラーゼにおいては、口腔内においてデンプン分解を担うだけでなく、免疫賦活にも關与する新たな可能性を示した。また、見出したディフェンシンは、既存の抗真菌薬とは異なるメカニズムにより抗真菌活性を発揮する。この抗生物質としての使用は、社会問題となっている薬剤耐性菌の出現リスクを抑えることが可能と考えられる。本研究により解明したこれら生理活性タンパク質の分子メカニズムの一端は、新たな抗歯周病・抗炎症治療法の開発に波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In previous research, we found that bioactive proteins derived from human saliva and rice show antifungal activity against pathogenic fungi, which are involved in the severity of periodontal disease, by a mechanism different from existing antibiotics, and have the activity of neutralizing the endotoxin from pathogens. In this research project, we analyzed the endotoxin binding mechanism of these proteins and verified their anti-inflammatory action in vitro and the antifungal action mechanism. Based on this research, we tried to establish the basic technology for developing a new treatment method for periodontal disease using biomaterials derived from natural products.

研究分野：生体分子科学

キーワード：抗真菌 抗炎症 ディフェンシン -アミラーゼ イネ 歯周病治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内は、常に病原性微生物の攻撃に晒されている。この攻撃による最も典型的な疾病は、歯周病やカンジダ症として知られる細菌や真菌による感染症である。これらの感染症は、単に口腔内の炎症を引き起こすだけにとどまらず、病原性微生物の細胞壁成分に由来する炎症性物質(内毒素)を介して心筋梗塞や狭心症などの原因となる動脈硬化症やがんなどの様々な疾患のリスクを高めることも報告されている。現在までに、一定の効果を示す抗菌薬や抗真菌薬が開発されている一方で、耐性菌の出現や副作用の側面を考慮するとさらなる効果的かつ安全な新薬が必要とされている。また、病原微生物の死滅に成功したとしても、内毒素による影響への対応が必須であり、その対策法の開発が急がれている。

米には、ヒトに対する様々な生理機能をもつタンパク質が存在する。研究代表者は、これまでにイネ由来のタンパク質成分に着目して、美白効果を有するチロシナーゼ阻害ペプチドや抗菌性あるいは抗炎症性のタンパク質を見出し、その機能解析を進めてきた

そのタンパク質の一つである  $\alpha$ -アミラーゼ AmyI-1 は、イネの発芽段階において最も主要な機能を果たすデンプン分解酵素であるが、可溶性デンプンとの共存下において歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の増殖を強力に阻害することを見出した。また、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。マウス RAW264 細胞を使用した一酸化窒素(NO)産生抑制試験においては、LPS によって誘導された NO 産生量を濃度依存的に減少させたことから、AmyI-1 は抗炎症(内毒素中和)作用を有することを発見した(図1)。さらに、X線結晶構造解析およびアミノ酸置換変異体解析の手法を用いて、AmyI-1 はデンプンと結合する糖鎖結合部位において内毒素をトラップすることにより抗炎症作用を示すことを明らかにした(図2)。

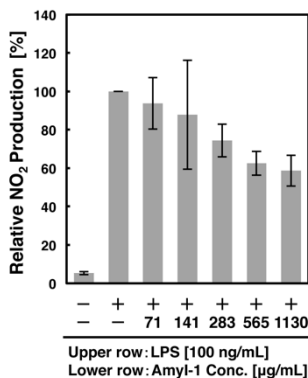


図1. AmyI-1 の NO 産生抑制効果

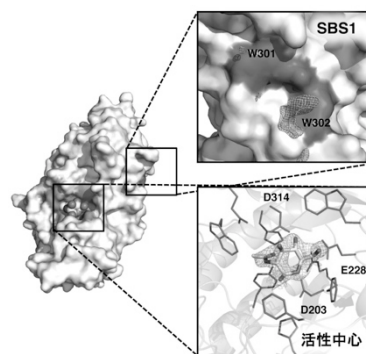


図2. AmyI-1 の LTA 認識機構の解明

一方で、ヒトもデンプン消化を目的として、口腔内などに  $\alpha$ -アミラーゼを分泌する。ヒト唾液  $\alpha$ -アミラーゼ(HsAmy)と AmyI-1 との配列同一性は 30%以下と低いが、HsAmy も AmyI-1 とは異なる構造のデンプン結合部位を有する。そこで、HsAmy も AmyI-1 同様の内毒素中和機能を有する可能性があるとして着想した。予備的に生体分子間相互作用解析を行った結果、HsAmy は nM のオーダーで LPS と強く結合することを見出した。この結果は、HsAmy が口腔内においてデンプン分解とは異なる新たな機能を持つ可能性を示す。

また、研究代表者はイネ由来のディフェンシンタンパク質の機能にも注目している。ディフェンシンは数十アミノ酸残基からなる抗菌タンパク質である。研究代表者らが見出したイネ由来ディフェンシン OsAFP1 は、日和見感染真菌 *Candida albicans* の生育を 4  $\mu$ M の濃度において完全に阻害し、高い耐熱性を示した(図3)。*C. albicans* は、口腔カンジダ症の原因菌として知られている一方で、歯周ポケットにおいて歯周炎を重症化させることが知られている。既往の研究において、LPS の酸性領域に結合して中和する多数の塩基性ペプチドやタンパク質が報告されている。そこで、生体分子間相互作用解析を行った結果、塩基性タンパク質である OsAFP1 も同様に LPS と結合することを明らかにした。以上の結果は、HsAmy と OsAFP1 がヒト口腔内において多機能的に抗炎症作用を示すことを示唆する。

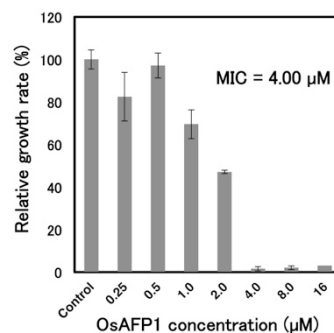


図3. OsAFP1 の抗真菌活性

### 2. 研究の目的

本研究課題では、HsAmy と OsAFP1 の抗炎症作用を検証する。特に HsAmy においては、口腔内における新たな生理機能の解明につなげる。また、それぞれの内毒素結合メカニズムの解明および OsAFP1 の *C. albicans* に対する抗真菌活性メカニズムの解明を行うことにより、歯周病に起因する疾病を含む新たな歯周病治療法を開発するための基盤技術の構築を目指した。具体的には、以下の 2 点について進めた。

[1] HsAmy および OsAFP1 の内毒素結合メカニズムの解析と *in vitro* における抗炎症作用の検証

様々な手法を用いて、HsAmy および OsAFP1 の内毒素(LPS もしくは LTA)との結合能を詳

細に解析する。特に、それらの立体構造情報をもとにアミノ酸置換変異体を設計して解析することにより、HsAmy および OsAFP1 の内毒素に対する分子認識メカニズムを明らかにする。また、マウス RAW264 細胞を用いて NO 産生の抑制能や各種サイトカイン発現の抑制能を解析することにより、*in vitro*における抗炎症作用を検証する。

#### [2] OsAFP1 の抗真菌作用メカニズムの解明

OsAFP1 の局在性解析、生体分子間相互作用解析などを利用してターゲット分子を同定し、X 線結晶構造解析を用いてそのターゲット分子の作用・認識機構を解析することにより OsAFP1 の抗真菌作用メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### [1] HsAmy の内毒素結合メカニズムの解析と *in vitro*における抗炎症作用の検証

アミノ酸置換変異体を用いた解析には、組換えタンパク質の調製が必須である。現在までに、*Phichia* 酵母やバキュロウイルスを使用したヒト  $\alpha$ -アミラーゼの生産法は報告されているが、本申請課題では、より Native 型に近い修飾糖鎖を有する組換え HsAmy の取得を目指して、ヒト HEK293 細胞を利用した Expi293™ Expression System Kit を使用して調製を試みた。本研究では、この組換え HsAmy の X 線結晶構造解析を行い、得られた構造的知見に基づいてその結合メカニズムを解析した。

また、マウス RAW264 細胞を使用した NO 産生抑制試験を行った。LPS 刺激による過剰な NO 産生に対して、添加した HsAmy の影響を Griess 試薬を用いて評価した。この結果により、HsAmy や OsAFP1 が単に内毒素と結合するだけでなく、*in vitro*において抗炎症活性を有するかどうかを検証した。

#### [2] OsAFP1 の抗真菌作用メカニズムの解明

ヒトを含む他の生物種由来のディフェンシンとは異なり、ダイコンなどの植物由来のディフェンシンは、真菌の膜構造の一部(グルコシルセラミド)と結合してアポトーシスを引き起こすことにより抗真菌活性を示す。OsAFP1 においては、これまでの予備的な検証の結果、OsAFP1 処理菌体にアポトーシスが誘導されたことを示す DNA のフラグメント化が確認された一方で、グルコシルセラミドを持たない真菌に対しても活性を示した。従って、グリコシルセラミド様の異なる膜ターゲットを刺激してアポトーシスを誘導することが推定される。本研究においては、まず抗 OsAFP1 抗体を用いた免疫染色を利用してその局在性を明らかにし、ターゲット領域を同定した。その後、特定の膜脂質との結合性を解析する PIP Strips などを利用して OsAFP1 のターゲット分子の同定を進めた。また、アポトーシス誘導の指標であるアネキシン V の結合やカスパーゼ活性の増大を測定することにより、OsAFP1 処理とアポトーシスとの関連を詳細に解析した。

一方で、OsAFP1 の立体構造は不明である。OsAFP1 の抗真菌作用メカニズムの解明や内毒素結合能の解析にはその構造情報は必須である。本研究では、X 線結晶構造解析により OsAFP1 の立体構造を決定し、ターゲット分子との結合様式を考察した。さらに部位特異的な変異体を設計し、その活性発現に関わる構造要因を明らかにした。

### 4. 研究成果

まず HsAmy について、内毒素結合メカニズムの解析を進めるために組換えタンパク質を調製した。より天然型に近い修飾糖鎖を有する組換え体が解析には必須である。そこで、まず HsAmy の全長 DNA を発現プラスミド pcDNA3.4 に導入し、ヒト胎児腎細胞 Expi293 にトランスフェクションした。37°C、8%CO<sub>2</sub> 雰囲気下において 3 日間培養した培養上清を用いて、アフィニティクロマトグラフィーにより組換え HsAmy を精製した。最終的に、60 mL 培養液から 1.94 mg の精製タンパク質を得た。

次に、60% w/v MPD, 100mM Sodium Acetate pH4.6, 10 mM Calcium Chloride の条件において長径 0.5 mm 程度の柱状 HsAmy 結晶を得た。最大分解能 1.6 Å において HsAmy の立体構造を決定した。HsAmy は、15 本の  $\beta$ -ストランドと 12 本の  $\alpha$ -ヘリックス、およびそれらを繋ぐ複数のループから構成されており典型的な  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel 構造を形成していた。これは、一般的な  $\alpha$ -アミラーゼにおいてよく保存されている構造である。過去の研究において、イネ由来  $\alpha$ -アミラーゼ AmyI-1 の糖鎖結合部位(SBS1 と SBS2)が内毒素と結合することを明らかにしている。HsAmy の X 線結晶構造解析の結果、AmyI-1 の SBS1 と SBS2 に類似した糖鎖結合モチーフを HsAmy の分子表面に二ヶ所見出した。これらの部位が内毒素と結合することが示唆された(図 4)。

さらに、マウス RAW264 細胞を使用した NO 産生抑制試験を行った。その結果、HsAmy を処理した細胞において NO 産生が抑制される傾向が観察された。一方で有意差に乏しかったた

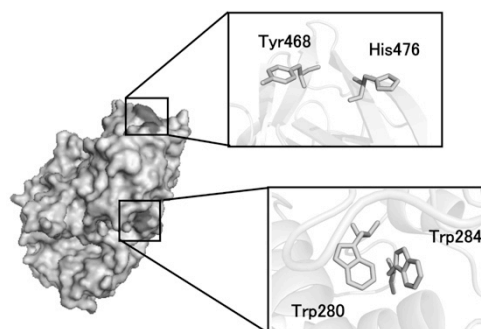


図4. HsAmy における内毒素結合領域の推定

め、さらなる追試が必要であると考えられた。

次にディフェンシン OsAFP1 について以下の結果を得た。

殺菌活性試験の結果、処理時間に伴い生菌数が減少した(図5)。同時に行った蛍光観察では、アポトーシス誘導を示す FITC-AnnexinV 蛍光が観察された細胞にのみ細胞死を示す PI 蛍光が観察されたため、OsAFP1 はアポトーシス誘導により殺菌的に抗菌活性を示すことがわかった(図5)。また、アポトーシスは、Cas-9 を介して Cas-3 を活性化することにより導かれる内因性経路と Cas-8 を介して Cas-3 を活性化することにより導かれる外因性経路がある。この3種類の Cas の活性化を観察した結果、Cas-9 および Cas-3 の蛍光が強く観察されたため、OsAFP1 は内因性アポトーシスを誘導することにより活性を示すことが明らかになった(図5)。

免疫細胞化学染色の結果、OsAFP1 は細胞膜もしくは細胞壁に存在する何らかの成分を標的とする可能性が示唆された。次に、真菌の細胞膜を構成する様々な脂質との結合を PIP Strips を用いて評価した結果、OsAFP1 はホスファチジルイノシトール3リン酸(PI(3)P)に強く結合したことから、ホスファチジルイノシトールリン酸の3位のリン酸基に作用して抗真菌活性を示す可能性が示唆された(図6)。さらにホスファチジルコリン(PC)には結合せず、ヒツジ赤血球に対して溶血活性を示さなかったことから、動物細胞の細胞膜には作用せず、高い安全性を有することが期待される。

過去の研究において、OsAFP1 の N 末端 Region-1 および C 末端 Region-7 に相当する断片ペプチドが *C. albicans* に対して OsAFP1 同様の抗真菌活性を示すことが見出された。そこでこれらの領域内のアミノ酸残基を置換した変異体 R1A, H2A, L4A, Q6A, H8A, R9A, F10A, K35A, H37A, L39A, R41A, K42A を設計し、抗真菌活性を測定した。いずれの変異体においても OsAFP1 野生型(MIC : 8  $\mu$ M)と比べて 1/2 以下に活性が低下した。特に、R1A, H2A, L4A, R9A, F10A, L39A, R41A 変異体の活性が顕著に低下したことから、OsAFP1 におけるこれらの領域が抗菌活性に寄与すると考えられる。さらに、Region-7 において、K35R, H37R, H37K, L39V, L39I, L39F, L39W, E40Q, K42R の変異体を設計してその抗真菌作用を解析した。その結果から、野生型 OsAFP1 における K35, H37, K42 の塩基性、L39 の疎水性の強さは抗真菌活性との関連性が低いと考えられた。特に、Leu の側鎖の構造が重要であることが示唆された。

次に、0.2 M  $K_2PO_4$ , 20% PEG3350 の条件下において OsAFP1 の結晶を蒸気拡散法により調製した。また、アポ型結晶に PI(3)P をソーキングすることにより OsAFP1/ホスファチジルイノシトール3リン酸(PI(3)P)複合体の結晶を調製した。OsAFP1 の立体構造を決定した結果、 $\beta$ 1 シートの相互作用により結晶中で二量体を形成していた。これまでに、OsAFP1 は溶液中で二量体を形成することが示唆されており、さらに *C. albicans* の細胞膜リン脂質である PI(3)P と結合することがわかっている。これらの情報から、二量体化が OsAFP1 の抗真菌活性ひいては PI(3)P との結合に重要である可能性が考えられた。そこで、BS<sup>3</sup> を用いた架橋試験を行った結果、PI(3)P が OsAFP1 のオリゴマー化を促進することを明らかにした。次に OsAFP1/PI(3)P 複合体の立体構造を解析した。その結果、OsAFP1 二量体の相互作用部位に PI(3)P 由来とされる電子密度が確認され、塩基性アミノ酸である分子 A の His-2 と分子 B の His-8 の間に PI(3)P のリン酸部がトラップされることが示唆された(図7)。

以上の研究において、特にディフェンシン OsAFP1 の研究において当初の想定を上回る進展がみられた。歯周病に起因する疾病を含む新たな歯周病治療法を開発するための基盤技術の構築ができたと考えられる。

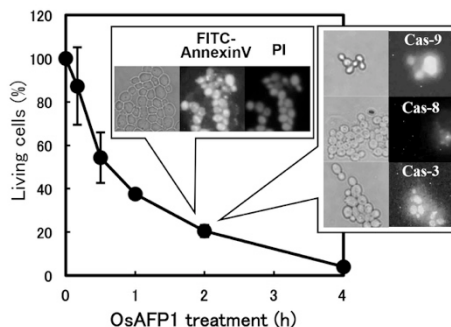


図5. OsAFP1 の殺菌活性とアポトーシス誘導高価

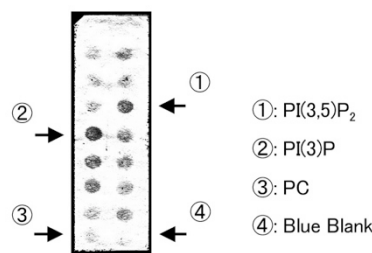


図6. OsAFP1 の膜脂質への結合性の解析

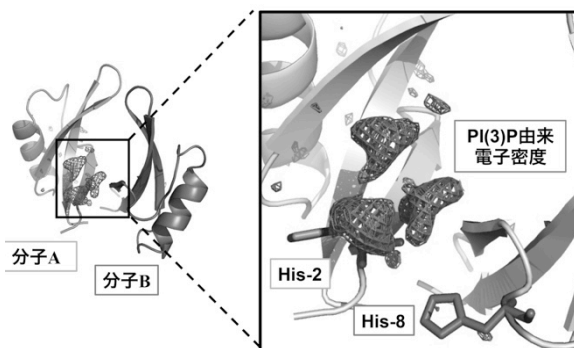


図7. OsAFP1 の立体構造とリン脂質への結合メカニズムの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ochiai Akihito, Ogawa Kodai, Fukuda Minami, Suzuki Masami, Ito Kosuke, Tanaka Takaaki, Sagehashi Yoshiyuki, Taniguchi Masayuki	4. 巻 130
2. 論文標題 Crystal structure of rice defensin OsAFP1 and molecular insight into lipid-binding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 6~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Akihito, Ogawa Kodai, Fukuda Minami, Ohori Masahiro, Kanaoka Takumi, Tanaka Takaaki, Taniguchi Masayuki, Sagehashi Yoshiyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Rice defensin OsAFP1 is a new drug candidate against human pathogenic fungi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29715-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitsui Toshiaki, Ochiai Akihito, Yamakawa Hiromoto, Kaneko Kentaro, Kitajima-Koga Aya, Baslam Marouane	4. 巻 2
2. 論文標題 Novel molecular and cell biological insights into function of rice $\alpha$ -amylase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Amylase	6. 最初と最後の頁 30~38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/amyase-2018-0004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 落合 秋人、小川 広大、田中 孝明、提著 祥幸、谷口 正之
2. 発表標題 抗真菌性ディフェンシンにおけるアポトーシス誘導機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 小川 広大、落合 秋人、田中 孝明、提箸 祥幸、谷口 正之
2. 発表標題 イネディフェンシンのCandida albicansに対するアポトーシス誘導効果の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三井田 篤志、落合 秋人、田中 孝明、提箸 祥幸、谷口 正之
2. 発表標題 イネにおける新規な抗真菌タンパク質の探索
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合 秋人、福田 美南海、小川 広大、提箸 祥幸、田中 孝明、谷口 正之
2. 発表標題 抗真菌性ディフェンシンにおけるターゲット分子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 広大、落合 秋人、福田 美南海、田中 孝明、提箸 祥幸、谷口 正之
2. 発表標題 イネディフェンシンのCandida albicansに対するアポトーシス誘導効果の解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 大貴, 落合 秋人, 荻原 寛和, 田中 孝明, 三ツ井 敏明, 谷口 正之
2. 発表標題 イネ由来 -アミラーゼの糖鎖結合部位に対する機能解析
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田 美南海, 落合 秋人, 大堀 正裕, 提箸 祥幸, 田中 孝明, 谷口 正之
2. 発表標題 イネ由来ディフェンシンの抗真菌作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minami Fukuda, Akihito Ochiai, Masahiro Ohori, Takumi Kanaoka, Takaaki Tanaka, Yoshiyuki Sagehashi, Masayuki Taniguchi
2. 発表標題 RICE PROTEIN AS AN ANTIFUNGAL DRUG CANDIDATE
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Fusion Technology (ISFT2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 落合 秋人, 菅井 寛, 田中 孝明, 谷口 正之, 三ツ井 敏明
2. 発表標題 イネ由来 -アミラーゼの触媒反応機構に対する構造的洞察
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂上吉一、小藤田久義、辻村舞子、中山素一、宮本敬久、中野宏幸、落合秋人 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 233
3. 書名 天然系抗菌・防カビ剤の開発と応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----