

機関番号：47124

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780148

研究課題名（和文）魚類補体成分由来の抗菌ペプチドを利用した細菌コントロール

研究課題名（英文）The bacterial controls using antimicrobial peptides from complement components of fish

研究代表者

無津呂 淳一 (MUTSURO JUNICHI)

福岡女子短期大学・食物栄養科・講師

研究者番号：40399100

研究成果の概要（和文）：コイ C3 アイソタイプ（C3-Q1）の C3a 領域の部分アミノ酸配列（KVFLECCNLMKTHKNMKTE）を基に合成したペプチドに抗菌作用があり、*S. Enteritidis*、及び *E. coli* (XL1-blue mrf、O157:H7 (VT1&VT2)) などのグラム陰性菌に対して作用することを明らかにした。また、上記のアミノ酸配列を部分的に置換することにより、抗菌作用を増強することに成功した。一方、抗菌作用の増強と共に細胞障害作用も強まる傾向が観察されたため、さらに本研究で得られた知見を基により副作用の少ない抗菌ペプチドの開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：Our results revealed that the synthetic peptide corresponding to partial amino acid sequence (KVFLECCNLMKTHKNMKTE) of C3a region of carp C3 isotype (C3-Q1) was antibacterial, and acted on Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. (XL1-Blue mrf and O157:H7 (VT1 and VT2)) and *S. Enteritidis*. We successfully enhanced antibacterial activity, by partially replacing amino acids of above-mentioned sequence. However, it was found that enhancement of antibacterial activity led to high cytotoxic activity. Hereafter, we aim to create antimicrobial peptides with low side effects on the basis of observation in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病、生体防御、補体、抗菌ペプチド、食品保存

## 1. 研究開始当初の背景

補体は、感染初期に働く自然免疫機構として、生体内に侵入した異物を破壊する一方、補体成分から白血球活性化作用（C3a、C5a）や白血球誘引活性（C5a）を有する活性化断片（アナフィラトキシン）を放出することによって炎症反応を誘導する。近年、哺乳類にお

いてこれら補体の活性化断片（C3a、C4a）がグラム陽性、グラム陰性、真菌などに対して直接抗菌作用を示すことが報告され、補体の新機能として注目されている（Andersson E. *PNAS* 2004, Sonesson A. *Biochem. Biophys. Acta.* 2006, Pasupuleti M. *J. Biol. Chem.* 2007）。補体は硬骨魚類にも存在するが、特

に興味深いことに申請者らの研究によって、コイやニジマスなどの多くの硬骨魚類が複数コピーの補体遺伝子をもつことが分かっている (Nakao M. *Dev. Comp. Immunol.* 2003)。ヒトで抗菌作用が証明された C3a、C4a、C5a の親分子 (C3、C4、C5) をコードする遺伝子も魚類で高度に多様化しており、それらの異物に対する結合性に大きな違いがあることを突き止めている (Nakao M. *Eur. J. Immunol.* 2000, Mutsuro J. *J. Immunol.* 2005, Kato Y. *Immunogenetics* 2003)。したがって、魚類で多様化している C3a、C4a、および C5a は、抗菌活性においても機能的多様性を持つことが予測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、補体活性化断片 (C3a、C4a、C5a) の新機能である抗菌活性に着目し、コイで多様化しているこれらペプチドの魚病細菌、腐敗菌、食中毒菌などに対する抗菌活性を分析することにより、コイ C3a、C4a、および C5a アイソタイプが多様な抗菌スペクトルを獲得しているかどうかを検討する。第二に、各ペプチド中で多様な抗菌活性を担う機能部位を特定し、それを元に特に抗菌活性の高い短鎖抗菌ペプチドのデザインを試みる。申請者は、本研究でデザインした抗菌ペプチドの魚病薬、および食品の保存技術としての利用を考えている。抗生物質と比べて、抗菌ペプチドは作用が現れるのが早く、耐性菌が生じにくいことが知られている。また、生物に本来備わっている生体防御能を利用するため環境にかかる負荷も小さいと思われる。また、「食の安全性」の面からも、食材そのものに含まれる抗菌成分が食品の保存に利用可能となれば非常に大きなメリットになることは間違いないと思われる。

## 3. 研究の方法

(1) コイ補体活性化断片 (C3a、C4a、C5a) の抗菌作用の確認

### ① コイ補体活性化断片の分離・精製

加藤ら (Kato Y. *Immunogenetics.* 54; 807-815. 2003) により分離・精製されているコイ補体活性化断片 C3a-H1 を分与頂いた。

### ② 合成ペプチドの作成

ペプチドは、北海道システムサイエンスに合成を委託し、純度 90% 以上のものを得た。

### ③ 抗菌作用の測定

抗菌作用の測定は Radial Diffusion Assay (RDA) 法を用いて行った。菌株には XL1-blue mrf を用い、3% trypticase soy broth (TSB) (Becton Dickinson) にて培養し、指数期のものを使用した。10 mM Tris-HCl (pH7.4) で 3 回洗浄した後、懸濁液を  $5 \times 10^6$  cfu / ml となるように下層寒天培地 (0.03% TSB, 1% low electroendosmosis type (EE0) agarose

(Sigma), 0.02% Tween 20 (Sigma)) に加え、ペトリディッシュ上に固めた。寒天が凝固した後、直径 4 mm の穴をあけ、6  $\mu$ l の試料を加え、37°C、3 時間インキュベートした。試料が寒天培地に完全に浸透したことを確認した後、上層寒天培地 (6.0% TSB, 1% Low-EE0 agarose) を重層し、37°C で 24 時間培養した。寒天はエタノールで脱水後、アルカリ性メチレンブルー染色にて菌体を染色、可視化し、出現した阻止円から最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。

(2) コイ補体 C3-Q1 ペプチドの抗菌スペクトルの検討

*Staphylococcus aureus* (IF03060)、*Listeria monocytogenes*、*Bacillus cereus* JCH2152、*Salmonella*. Enteritidis、*Escherichia coli* (O157:H7 (VT1&VT2)) は、九州大学農学研究院食品衛生化学研究室から分与頂いた。抗菌作用の測定は RDA 法を用いて行い、(1)-(3) と同様の条件にて行った。

(3) CarpC3a-Q1-p の改変ペプチドの抗菌作用、及び抗菌作用発現に関与するアミノ酸残基の特定

### ① 改変ペプチドの設計、及び合成

CarpC3a-Q1-p のアミノ酸配列を基に、2~8 残基アミノ酸置換した改変ペプチド (14 種類) を設計した。ペプチドは、北海道システムサイエンスに合成を委託し、純度 90% 以上のものを得た。

### ② 抗菌作用の測定

抗菌作用の測定は RDA 法を用いて行い、(1)-(3) と同様の条件にて行った。

(4) 改変ペプチドの細胞障害作用の検討

### ① 緬羊赤血球懸濁液の調整

緬羊保存血は、(株)日本バイオテスト研究所から入手し、5% グルコースを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2)、又は 150 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で 4 回洗浄した後、同緩衝液に再懸濁 ( $1.0 \times 10^9$  cells/ml) した。

### ② 改変ペプチド希釈溶液の調整

5% グルコースを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2)、又は 150 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) で希釈し、100、25、6.3、1.6、0.4、0.1  $\mu$ M の希釈溶液を調整した。

### ③ 細胞障害作用の測定

緬羊赤血球懸濁液、及び改変ペプチド希釈溶液を 100  $\mu$ l ずつ混合し、4°C で 16 時間反応させた。反応終了後、3000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清の 405 nm での吸光度を測定した。また、100% 溶血区には試験区と同数の緬羊赤血球を含む懸濁液に 9 倍量の蒸留水を加え、溶血させたものを使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) コイ補体活性化断片 (C3a, C4a, C5a) の抗菌作用の確認

コイ補体活性化断片の抗菌作用を確認するためにコイ補体 C3 の主要なアイソタイプである C3-H1 タイプの精製タンパク質 (C3a-H1) を用いて抗菌作用の有無を検討したが、1.1-8.8  $\mu\text{M}$  の試験区において抗菌作用は観察されなかった。そこで、コイ補体成分 C3、C4、C5 のアイソタイプである C3-H1、C3-Q1、C4-2、及び C5-1 のアミノ酸配列を基に 17-20 残基のペプチドを合成し (Table-1)、抗菌作用の有無について検討した。Fig.1 にその結果を示すが、CarpC3a-Q1-p においてのみ明らかな阻止円が観察され、抗菌作用を持つことが判明した。また、希釈系列を作成し、MIC を検討したところ 25-50  $\mu\text{M}$  に MIC が観察され、ヒト C3a (Human C3a-p) のおよそ 2 分の 1 程度の強さを持つことが判明した (Table-II)。

Table-1 Synthetic peptides based on amino acid sequences from carp C3a, C4a, and C5a, and Human C3a.

Peptide name	Amino acid sequence	Length	Purity (%)	MW	pI
CarpC3a-H1-p	KAFVDCNKKIKDRNKTE	19	91.7	2242.56	8.02
CarpC4a-2-p	KVFQECCEFATKLRDKKRKE	20	98.6	2488.95	9.24
CarpC3a-Q1-p	KVFLECCNLMKTHKNMKTE	19	93.2	2297.81	9.31
CarpC5a-1-p*	YAFMKCCVQAIKLRQEN	17	95.0	2045.48	8.86
Human C3a-p	KVFLDCCNVITELRRQHAR	19	95.7	2365.77	8.90
Nc-p**	IKEANCDTKFKRVCNEKT	19	99.9	2242.56	8.02

\* Insoluble.

\*\* The amino acid composition of negative control peptide (Nc-p) corresponded to that of CarpC3a-H1-p.

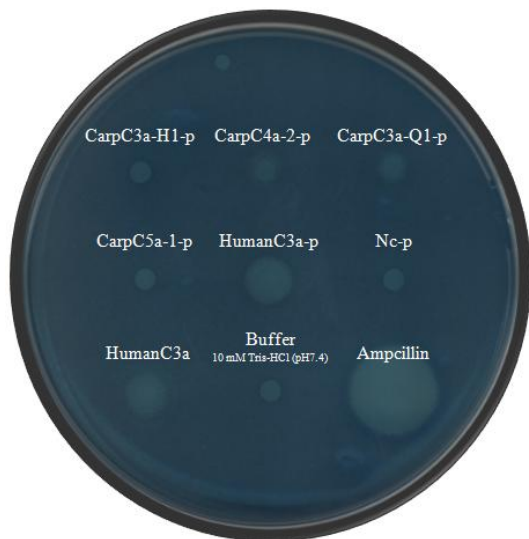


Figure 1. Antimicrobial activities of synthetic peptides from carp C3a, C4a, and C5a. Each 4-mm-diameter well was loaded with 6  $\mu\text{l}$  of the peptides at 50  $\mu\text{M}$ .

Table-II Minimum inhibitory concentration (MIC) of synthetic peptides against *E. coli* (XL1-Blue mrf).

Peptide name	MIC (TSB)	MIC (TSB + 150 mM NaCl)
CarpC3a-H1-p	800-1600 $\mu\text{M}$	-
CarpC4a-2-p*	(400-800 $\mu\text{M}$ )	(800-1600 $\mu\text{M}$ )
CarpC3a-Q1-p	25-40 $\mu\text{M}$	400-800 $\mu\text{M}$
CarpC5a-1-p	-	-
HumanC3a-p	10-20 $\mu\text{M}$	-
Nc-p	-	-

\* Growth was incompletely suppressed in high concentration of C4a-2-p.

##### (2) コイ補体 C3-Q1 ペプチドの抗菌スペクトルの検討

CarpC3a-Q1-p が抗菌作用を示す菌種を明らかにするために *S. aureus* (IF03060)、*L. monocytogenes*、*B. cereus* JCH2152、*S. Enteritidis*、*E. coli* (O157:H7 (VT1&VT2)) に対する抗菌作用を調査した。Fig.2 にその結果を示すが、本ペプチドは、*S. Enteritidis*、*E. coli* (O157:H7 (VT1&VT2)) に対して抗菌作用を有していることが判明した。一方、*Staphylococcus aureus* (IF03060)、*Listeria monocytogenes*、及び *Bacillus cereus* JCH2152 のグラム陽性菌に対しては抗菌作用を示さなかったことから、主としてグラム陰性細菌に対して抗菌作用を発揮することが推測された。

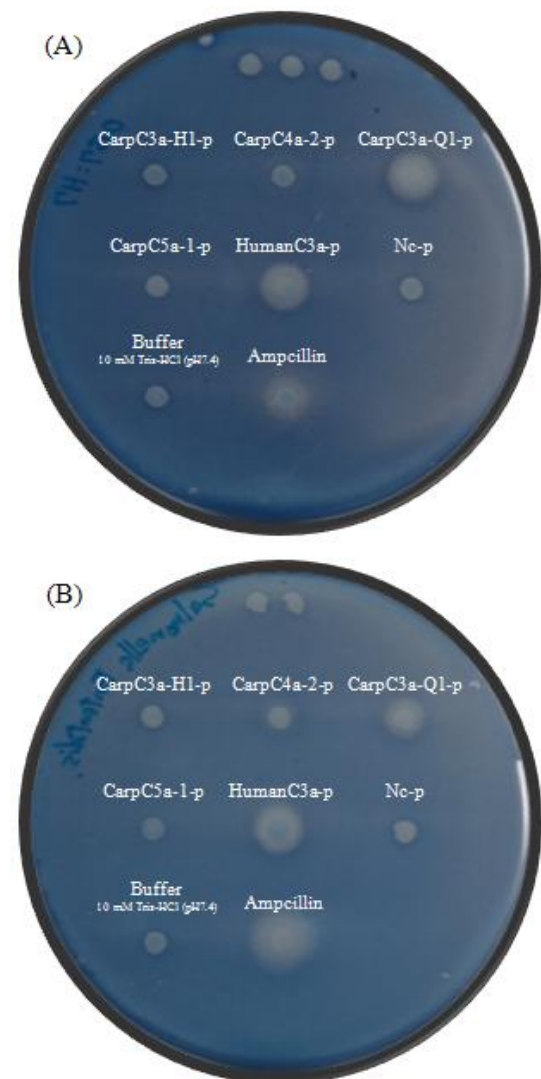


Figure 2. Antibacterial effect of Carp C3a-Q1-p peptide against *E. coli* (O157:H7 (VT1&VT2)) (A) and *Salmonella* Enteritidis (B). Each 4-mm-diameter well was loaded with 6  $\mu\text{l}$  of the peptides at 100  $\mu\text{M}$ .

##### (3) CarpC3a-Q1-p の改変ペプチドの抗菌作用、

及び抗菌作用発現に関与するアミノ酸残基の特定

これまでに見つかっている抗菌ペプチドは、1) 十から数重アミノ酸残基からなり、分子中に塩基性アミノ酸を含んでいることから、生理的条件下では正電荷を帯びている、2)  $\alpha$ -ヘリックス構造、あるいは $\beta$ -シート構造をもち、両親媒性の立体構造をとる、などの共通の特徴が見出されている。そこで、 $\alpha$ -ヘリックス構造の安定化に寄与すると予想される部位(6、13、14、17 残基目)にはロイシン(CarpC3-Q1-AAS1、3、4、5、6、11、12、13、14、15)を、正電荷の偏在性を高めると予測される部位(4、8、12、15 残基目)にアルギニン(CarpC3-Q1-AAS7-15)をそれぞれ1~4 残基導入した改変ペプチドを作成し、抗菌活性を比較した。Table-III に改変ペプチドのアミノ酸配列、及びそれらのMICを示す。ロイシンのみを導入したCarpC3-Q1-AAS1、3、及び4は、MICで比較するとCarpC3a-Q1-pよりも約8倍、また150 mMのNaClを添加した条件では32~64倍に抗菌作用が増強されることが明らかとなった。一方、6、13、及び14 残基目にロイシンを導入したCarpC3-Q1-AAS5は、抗菌作用を示さず、また、6、13、14、17 残基の全てにロイシンを導入したCarpC3-Q1-AAS6は、バッファーに対して不溶性となった。おそらく、13及び14 残基にロイシンを導入したことにより、疎水性が強まり、また、 $\alpha$ -ヘリックス構造に変化をもたらしたものと推測される。アルギニンのみを導入したCarpC3-Q1-AAS7~10は、CarpC3a-Q1-pと比べて塩なしの場合には抗菌作用は大きく改善されるが、一方、150 mM、NaCl存在下ではアルギニンを導入する位置により抗菌作用に違いが現れることが明らかとなった。共通して12 残基目にアルギニンを導入したCarpC3-Q1-AAS9、及び10は、CarpC3a-Q1-pよりも抗菌作用が2~4倍抗菌作用が増強されおり、塩存在下での抗菌作用の発現に関与する部位であることが推測される。CarpC3-Q1-AAS11~15は、ロイシンとアルギニンを組み合わせて導入したものであるが、全ての改変ペプチドで塩の有無に関わらず1.6-3.1  $\mu$ MでMICを示し、抗菌作用の増強、及び塩存在下での安定性が増すことが明らかとなった。特に、13、14 残基目にロイシンを導入したCarpC3-Q1-AAS13、14についてはCarpC3-Q1-AAS5とは異なり、抗菌作用を失わないことが判明した。

#### (4) 改変ペプチドの細胞障害作用の検討

改変ペプチドの細胞障害作用について検討するために緬羊赤血球を標的細胞に用いた溶血活性を測定した。5%グルコースを含む10 mMリン酸緩衝液(pH7.2)を用いて測定した場合、全ての改変ペプチドがMICである

Table-III Amino acid sequences and antimicrobial activity (MIC) of modified peptides

Peptide name	Amino Acid sequence	MIC TSB	MIC TSB + 150 mM NaCl
CarpC3-Q1-AAS1	KVFLELCNLMKTLKNMKTE	3.1-6.3 $\mu$ M	12.5-25 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS3	KVFLELCNLMKTLKNMITE	3.1-6.3 $\mu$ M	12.5-25 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS4	KVFLELCNLMKTLKNMLTE	3.1 $\mu$ M <	6.3 $\mu$ M <
CarpC3-Q1-AAS5	KVFLELCNLMKTLNMLTE	-	-
CarpC3-Q1-AAS6*	KVFLELCNLMKTLNMLTE	-	-
CarpC3-Q1-AAS7	KVFLECCRLMKTHKRMKTE	3.1-6.3 $\mu$ M	800 $\mu$ M <
CarpC3-Q1-AAS8	KVFECCRLMKTHKRMKTE	12.5 $\mu$ M <	800-1600 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS9	KVFLECCRLMK <sup>R</sup> HKRMKTE	3.1-6.3 $\mu$ M	100-200 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS10	KVFECCRLMK <sup>R</sup> HKRMKTE	3.1-6.3 $\mu$ M	200-400 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS11	KVFR <sup>E</sup> ELCRLMKTLKRMITE	1.6-3.1 $\mu$ M	1.6-3.1 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS12	KVFR <sup>E</sup> ELCRLMKTLKRMITE	1.6-3.1 $\mu$ M	1.6-3.1 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS13	KVFR <sup>E</sup> ELCRLMKTLRLMITE	1.6-3.1 $\mu$ M	1.6-3.1 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS14	KVFR <sup>E</sup> ELCRLMKRLKRMITE	1.6-3.1 $\mu$ M	1.6-3.1 $\mu$ M
CarpC3-Q1-AAS15	KVFR <sup>E</sup> ELCRLMKRLRLMITE	1.6-3.1 $\mu$ M	1.6-3.1 $\mu$ M

\*Insoluble

1.6-3.1  $\mu$ Mでも溶血活性が現れ、抗菌作用が増強される一方で細胞障害作用も強く表れる可能性が示唆された。150 mM NaClを含む10 mMリン酸緩衝液(pH7.2)を用いて測定した場合には、CarpC3-Q1-AAS11、12、及び14では100  $\mu$ Mでも溶血が観察されなかった。 $\alpha$ -ヘリックスの安定化を目的として導入したロイシンの数に比例して溶血作用も強まる傾向があり、今後の検討課題と考えられる。

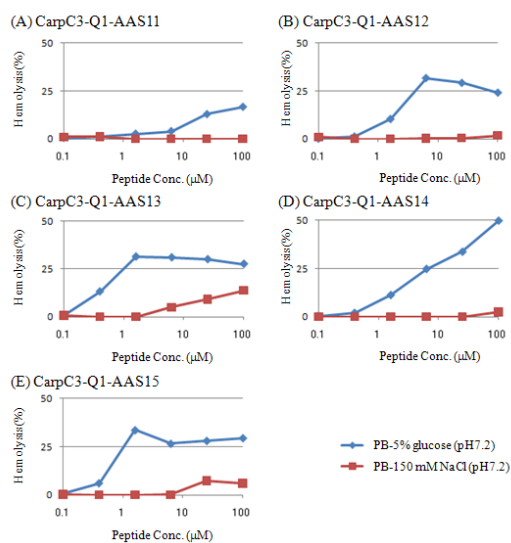


Figure 3. Hemolysis of synthetic peptides against sheep erythrocyte. 100  $\mu$ l of sheep red blood cells ( $1 \times 10^9$  cells/ml) and dilution series of synthetic peptides were mixed and incubated at 4 degrees C for 16 hours. The samples were then centrifuged at 3000 rpm, for 5 min. the absorbance of supernatant was measured at  $\lambda$  405 nm and is in the plot expressed as % of H<sub>2</sub>O induced hemolysis.

#### 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)

[学会発表] (計 1件)

①無津呂 淳一. コイ補体 C3a に由来するペプチドの抗菌作用. 平成 22 年度 日本水産学会九州支部大会. 2010. 01. 22. 鹿児島

大学（鹿児島）

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

無津呂 淳一 (MUTSURO JUNICHI)  
福岡女子短期大学・食物栄養科・講師  
研究者番号：40399100