

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570068

研究課題名（和文）：両生類の皮膚にみる生き残り戦略-感染防御における外分泌系と
内分泌系の相互作用研究課題名（英文）：Studies of the functional roles of amphibian skin antimicrobial
peptides as the first barrier against infection by environmental
microorganisms.

研究代表者：岩室 祥一（IWAMURO SHAWICHI）

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：70221794

研究成果の概要（和文）：

日本産アカガエル属の皮膚から種々の抗菌ペプチド遺伝子の cDNA クローニングを行うとともに、脳やハーダー腺など、皮膚以外の器官における抗菌ペプチド遺伝子の発現を検出した。さらに、これらペプチドの抗腫瘍細胞作用やマスト細胞刺激作用なども検出し、生体防御におけるその重要性を示唆した。また、ヒストン H2B, H3, H4 における抗菌活性を検出し、さらにそのメカニズムを走査型電子顕微鏡による細胞形態学的な手法を用いて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have cloned and characterized cDNAs encoding multiple antimicrobial peptide precursors from total RNA samples prepared from the skin and some extradermal tissues such as brain and the Harderian gland of the Japanese Ranid frog species. The synthetic replicates of some of these peptides showed anti-tumor cell activities and/or mast cell-stimulating activities as well as antimicrobial activities. We investigated anti-*Escherichia coli* activities of the Lys-rich histone H2B and Arg-rich histones H3 and H4 as antimicrobial agents and showed that the mode of their antimicrobial actions depended on their basic amino acid residue contents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，形態・構造

キーワード：比較内分泌，抗菌ペプチド，免疫内分泌，生体防御，両生類，抗菌性ヒストン

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。広い範囲の微生物に殺菌または静菌効果を示し、また抗生物質と異なり耐性菌を生じにくいことから、医薬品としての潜在性に高

い期待が寄せられている。中でも、両生類の皮膚は抗菌ペプチドの単離源として群を抜く成果が報告されていた。長く世界における両生類の抗菌ペプチド研究の主流は、「単離・cDNA クローニングによる抗菌ペプチドの網羅的探索」であるが、抗菌ペプチドの遺伝

子発現の発生段階依存性や組織特異性、体内外の因子による制御等が「その次の研究」として注目されていた。また、特定の抗菌ペプチドには絞られるものの「抗菌作用機序の解析」においても詳細な研究が行われていた。特筆すべきは、細胞核のヌクレオソームの構成因子として知られるヒストンの抗菌活性の存在とその作用機序に関するものであり、いずれも優れた研究成果が報告されていた。しかし、その成果は Lys-rich 型ヒストンである H2A と H2B に集中しており、Arg-rich 型ヒストンである H3 と H4 については抗菌活性の検出も殆どなされていない状況であったことから、その解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本課題では、両生類の抗菌ペプチドについて、合成や分泌、遺伝子発現等を制御する内分泌学的要素を探求し、その生理学的な意味を検討することを主目的に、皮膚だけでなく種々の器官も研究対象とした。さらに、両生類の抗菌ペプチド研究から発展したヒストンの抗菌性についても着目し、種々のヒストンの活性とメカニズムを解析することも目的とした。

(1) 両生類の変態は甲状腺ホルモン (TH) に支配されており、その作用は副腎皮質ホルモンの共存下で増強される。両生類抗菌ペプチドの遺伝子発現における大腸菌毒素 (LPS) や TH、副腎皮質ホルモンの影響を解析する。

(2) これまでに抗菌ペプチドの単離やその遺伝子クローニングが行われていない日本産アカガエル属について、ペプチドの単離を行うとともに、両生類の抗菌ペプチド遺伝子に特徴的な塩基配列を利用したショットガン法により、cDNA クローニングを行う。クローニングにより新規配列が見つかった場合は、それに相当する配列をもつペプチドを合成し、活性を測定することで、新規の活性ペプチドの探索を行う。

(3) 皮膚以外の器官からの抗菌ペプチド遺伝子の発現の検出ならびにそのクローニングを行うことにより、その部位における生理学的な意義を検証する。

(4) 抗菌ペプチドの抗菌活性以外の作用、特に抗腫瘍細胞作用やマスト細胞刺激作用を検出し、抗菌ペプチドの多機能性を検証する。

(5) Arg-rich 型ヒストンであるヒストン H3 と H4 の抗菌活性並びのそのメカニズムを、Lys-rich 型ヒストンであるヒストン H2B と比較しながら解析する。

3. 研究の方法

上記 2 の各番号に対応した研究方法を同じ番号に対応させて以下に記載する。

(1) 両生類皮膚由来培養細胞 LAH-1 及び LAH-2 から抗菌ペプチドの cDNA をクローニングし、研究対象とする抗菌ペプチドを探索する。次いでその培養上清に、大腸菌由来 LPS, TH, 合成副腎皮質ホルモン (DEX) などを添加し、上記ペプチドの合成や遺伝子発現の誘導を免疫染色や RT-PCR 法にて検証する。

(2) オキタゴガエルからは皮膚抗菌ペプチドの単離が行われていないので、共同研究者である UAE 大学の Conlon 教授等のグループとともに、HPLC によるペプチドの単離とアミノ酸配列の決定、種々の菌に対する抗菌活性の測定、ショットガン法を用いた RT-PCR による cDNA クローニングを行う。ニホンアカガエルについては、皮膚抗菌ペプチドを得ているが、本種にユニークなペプチドである Japonicin-1, Japonicin-2 を対象に、特異的なプライマーを用いた RT-PCR により cDNA のクローニングを行う。Japonicin-2 については分子内 SS 架橋の有無が抗菌活性に影響をおよぼすかどうかを検証するため、架橋型と非架橋型のペプチドを合成する。

(3) オキタゴガエル, ヤマアカガエル, ニホンアカガエル, ウシガエルから皮膚, 脳, 内臓諸器官, 骨格筋, 心臓, 精巣, ハーダー腺等の Total RNA を抽出し、半定量的な RT-PCR またはリアルタイム PCR 法を用いて、各種抗菌ペプチド遺伝子の発現量を測定する。ニホンアカガエルの Japonicin-2 については皮膚腺における遺伝子発現部位の同定を、ウシガエルについてはハーダー腺における複数の抗菌ペプチドの局在の確認を、*in situ* hybridization 法により行う。

(4) 合成した抗菌ペプチドをマウスマスト細胞腫 P-815 の培養上清に加え、顆粒中の成分の一つである NAG の放出を指標に、そのマスト細胞放出作用の有無を検証する。さらに、作用後のマスト細胞腫 P-815 に対し、MTT アッセイを行うことにより、NAG の放出が脱顆粒に由来するのか、細胞膜破壊による漏出に由来するのかを検証する。

(5) 微量液体希釈法を用いてヒストン H3 と H4 の抗大腸菌活性, 抗黄色ブドウ球菌活性を測定する。また、これらヒストンの大腸菌膜に対する作用を検証するため、ヒストン H2B と対比させながら、作用後の菌を走査型電子顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

上記2, 3の各番号に対応した研究方法を同じ番号に対応させて以下に記載する。ただし、(2)と(3)については関連性が高いため、同一項目として記載する。

(1) ①LAH-1細胞及びLAH-2細胞の双方から、brevinin-1に属する抗菌ペプチドのcDNAをクローニングした。②この配列に基づく抗原ペプチドを合成し、ウサギに注射して、抗血清を得た。両細胞に対し、LPS処理を行った後、免疫染色したところ、濃度や処理時間に依存して、細胞質にペプチド量の増加が確認された。また、この作用は合成副腎皮質の共存により抑制された。③同様に、THの添加によってもペプチドの合成が促進された。

両生類は捕獲採集の時期や生息数の問題もあることから、研究への培養細胞の使用が可能となったことは、この分野の研究において画期的である。現在、論文執筆中であるが、現時点では両生類の培養細胞を用いた抗菌ペプチド研究の報告はなく、研究者に与えるインパクトは高い。

(2)および(3) ①オキタゴガエル皮膚抽出物中から、Temporin, Brevinin-1, Ranatuerin-2に属する抗菌ペプチドを合計5種類、単離した。②オキタゴガエルの皮膚から①のcDNAをそれぞれクローニングし、また脳、心臓、小腸、腎臓、肝臓、肺、骨格筋、胃、精巣における発現をRT-PCR法により検出した。また、皮膚からブラジキニンのcDNAもクローニングした。③ヤマアカガエル成体皮膚から抗菌ペプチドBrevinin-2, Palustrin-2, Ranatuerin-2のcDNAのクローニングを行った。④ヤマアカガエル幼生および成体の皮膚、ならびに成体胃、小腸、肝臓、腎臓、骨格筋官におけるこれらmRNAの発現量を、同一サンプルを用いて測定し、各抗菌ペプチド遺伝子の発現量にはそれぞれ発生ステージ特異性や組織特異性があることを明らかにした。⑤ニホンアカガエル皮膚Total RNAからTemporin, Japonicin-1, Japonicin-2のcDNAをクローニングした。Japonicin-2については完全長の塩基配列を決定した。⑥Japonicin-2特異的なリアルタイムPCR法を開発し、皮膚におけるmRNAの発現量が、骨格筋、腎臓、精巣、小腸、胃での発現量の $10^5 \sim 10^6$ 倍であることを示した。⑦ニホンアカガエルの皮膚腺は少なくとも3種類が存在し、そのうち顆粒腺にJaponicin-2のmRNAの発現を検出した。⑧Japonicin-2の分子内SS架橋を破壊した場合、抗菌活性、特に抗黄色ブドウ球菌活性が著しく低下することを明らかにした。⑨ウシガエルハーダー腺を含む組織から抗菌ペプチド様配列をコードする6種類のcDNAをクローニングし、そのうち2種類に

ついて、mRNAのハーダー腺における局在を立証した。

両生類の抗菌ペプチドに関する研究は皮膚に偏重しており、本研究がその他の器官、特に神経系やハーダー腺に着目したことが非常に意義深い。脳や筋など非上皮性の組織や器官での抗菌ペプチド遺伝子の発現は、抗菌活性以外の生理学的作用も担っていることを強く示唆する成果である。これらの成果はいずれもすでに学術論文として発表しているが、抗菌ペプチドのmRNA量をリアルタイムPCRで行った報告や、あらゆる動物を通じたハーダー腺における抗菌ペプチドの存在の報告は、いずれも世界で初となっている。また、抗菌ペプチドの分子内架橋の有無と抗菌活性との関係に関する成果は、今後、抗菌ペプチドの組換え体タンパク質としての合成を検討するうえで、貴重なデータを提供している。

(4) ①ウシガエルハーダー腺からクローニングした抗菌ペプチドcDNAのうち、新規の配列を有するものについて、Temporin-CBgとした。この合成ペプチドは、グラム陽性菌に対する活性はなく、グラム陰性菌に活性を有していた。これは通常のTemporinと正反対の性質であり、現時点でこのようなTemporinの存在に関する報告は見当たらない。②マウス由来マスト細胞腫P-815を使った脱顆粒実験では、Temporin-CBgは脱顆粒作用を有するが腫瘍細胞溶解作用を示さないことを明らかにした。

マスト細胞腫を使用したため、マスト細胞刺激作用と抗腫瘍細胞作用を同時に検出できるようになった点が意義深く、今後の有用性が高い。また、ハーダー腺にはマスト細胞が散在しており、抗菌ペプチドが実際にハーダー腺におけるマスト細胞を介した生体防御に寄与している可能性を示唆する成果となっている。これらの発見は学術論文として投稿目前の状態である。

(5) ①市販品のウシヒストンH2B, H3, H4を用いた抗菌アッセイにより、いずれも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対し、抗菌作用が検出された。②Lys-richであるヒストンH2Bは大腸菌細胞膜を透過し抗菌作用を示すが、Arg-richであるヒストンH3とH4はともに細胞膜破壊により抗菌作用を示すことが明らかになった。③②の抗菌作用において、いずれも大腸菌外膜に存在するプロテアーゼ(OmpT)がヒストンを切断した結果生じることが示された。④OmpTを欠損させた大腸菌に対しては、細胞外膜LPSへのヒストンの結合を介して抗菌作用を発現することが明らかになった。

本成果により、世界で最初にヒストンH3

の抗菌性とその作用機序が報告された。ヒストンは近年、抗菌活性や敗血症の原因因子として着目され、特にヒストン H3 はその中心的な役割を果たしていることが示唆されている。本研究の成果は、今後の抗菌性ヒストンの研究の展開において、貴重な情報を提供する存在である。

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 7 件)

- ① Koyama T, Conlon JM, Iwamuro S. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding biosynthetic precursors for the antimicrobial peptides japonicin-1Ja, japonicin-2Ja, and temporin-1Ja in the Japanese brown frog, *Rana japonica*. *Zool Sci.* 2011, 28, 339-347. doi:10.2108/zsj.28.339. 査読付
- ② Tagai C, Morita S, Shiraishi T, Miyaji K, Iwamuro S. Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions. *Peptides* 2011, 32, 2003-2009. doi:10.1016/j.peptides.2011.09.005. 査読付
- ③ Hasunuma I, Iwamuro S, Kobayashi T, Shirama K, Conlon JM, Kikuyama S. Expression of genes encoding antimicrobial peptides in the Harderian gland of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010, 152, 301-305. doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.005. 査読付
- ④ Tazato S, Conlon JM, Iwamuro S. Cloning and expression of genes encoding antimicrobial peptides and bradykinin from the skin and brain of Oki Tago's brown frog, *Rana tagoi okiensis*. doi: 10.1016/j.peptides.2010.04.031. 査読付
- ⑤ Ohnuma A, Conlon JM, Iwamuro S. Differential expression of genes encoding preprobrevinin-2, preproalustrin-2, and preproranatuerin-2 in developing larvae and adult tissues of the mountain brown frog *Rana ornativentris*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010, 151, 122-130. doi:10.1016/j.cbpc.2009.09.004. 査読

付

- ⑥ Conlon JM, Coquet L, Jouenne T, Leprince J, Vaudry H, Iwamuro S. Evidence from the primary structures of dermal antimicrobial peptides that *Rana tagoi okiensis* and *Rana tagoi tagoi* (Ranidae) are not conspecific subspecies. *Toxicon* 2010, 55, 430-435. doi:10.1016/j.toxicon.2009.09.010. 査読付
- ⑦ 岩室祥一. 抗菌ペプチドによる先天性生体防御機構と内分泌系の接点を探る. 比較内分泌 2009 年 35 号 71-92. http://www.jstage.jst.go.jp/article/n12008jsce/35/133/35_71/_article/-char/ja. 招待執筆. 査読なし

[学会発表] (計 25 件)

- ① 小西裕己, 蓮沼至, 小原祥恵, 寒河江望, 小林哲也, 菊山榮, 岩室祥一: ウシガエルハーダー腺由来Temporin-CBgの機能解析. 日本動物学会第 64 回関東支部大会, 2012 年 3 月 17 日, 千葉.
- ② 岩室祥一, 森田愁, 白石貴如, 多賀井千尋: Studies of antimicrobial activities and the mode of actions of histones H2B, H3, and H4. 日本分子生物学会第 34 回年会, 2011 年 12 月 16 日, 横浜.
- ③ 岩室祥一: 多機能型生体防御ペプチドーその生物学的特性は放射線科学に役立てられるか?. NIRSテクノフェア 2011-放射線科学に役立つ技術交流のために-, 2011 年 12 月 9 日, 放射線医学総合研究所, 千葉.
- ④ 森田愁, 多賀井千尋, 白石貴如, 宮地和幸, Conlon JM, 岩室祥一: 細菌細胞膜におよぼすヒストンH2Bの作用とその抗菌活性について. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川.
- ⑤ 武田あすな, 椿卓, 奥村和男, 小林哲也, 持田弘, 菊山榮, 岩室祥一: ファブリキウス嚢由来DT40 細胞における細菌毒素異存的cathelicidin遺伝子の発現上昇. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川.
- ⑥ 多賀井千尋, 森田愁, 白石貴如, 宮地和幸, 岩室祥一: ウシ胸腺由来Arg-rich型ヒストンH3 とH4 の抗菌作用並びにそのメカニズムの解析. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川.
- ⑦ 小林浩志, 蓮沼至, 岩室祥一: アカハライモリ皮膚における抗菌ペプチド遺伝子のクローニング. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川.
- ⑧ 小西裕己, 川崎はるな, 蓮沼至, 小林哲也, 菊山榮, 岩室祥一: ハーダー腺による抗菌ペプチドを介した両生類眼の生体防御. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9

- 月 22 日, 旭川.
- ⑨ 岩室祥一: 被災者の感染予防における抗菌ペプチドの応用. 千葉エリア産学官連携オープンフォーラム 2011 未来を創る/震災を超えて-from千葉, 2011年9月16日, 千葉.
 - ⑩ 岩室祥一, 藤澤静香, 小西裕己, 蓮沼至, 小林哲也, 菊山榮: ウシガエル抗菌ペプチド遺伝子のクローニング. 第35回日本比較内分泌学会大会, 2010年11月18日, 静岡.
 - ⑪ 多賀井千尋, 森田愁, 白石貴如, 宮地和幸, 岩室祥一: ヒストンの抗菌作用に関する研究. 第35回日本比較内分泌学会大会, 2010年11月18日, 静岡.
 - ⑫ 森田愁, 多賀井千尋, 白石貴如, 川崎広明, 岩室祥一: ヒストン群タンパク質の抗菌活性に関する研究. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京.
 - ⑬ 武田あすな, 椿卓, 奥村和男, 持田弘, 菊山榮, 小林哲也, 岩室祥一: 鳥類培養細胞を用いた抗菌ペプチドcathelicidinの研究. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京.
 - ⑭ 小西裕己, 蓮沼至, 小西健司, 小林哲也, 白間一彦, Conlon JM, 岩室祥一, 菊山榮: ウシガエルハーダー腺における抗菌ペプチド遺伝子の発現. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京.
 - ⑮ 藤澤静香, 立里晶露, 小林哲也, Conlon JM, 岩室祥一: アカガエル属の脳抗菌ペプチド. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京.
 - ⑯ Iwamuro S, Yoneda Y, Hasunuma I, Oeda S, Miyazaki N, Kobayashi T, Shirama K, Conlon JM, Kikuyama S. Frog antimicrobial peptide genes: Gene expression in the Harderian gland and thyroid-hormone dependency of gene transcription. 25th Conference of European Comparative Endocrinologists 2010. 31 Aug-4 Sept, 2010, Pecs, Hungary
 - ⑰ 白石貴如, 川崎広明, 岩室祥一: Antibacterial activities of histones H3 and H4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月12日.
 - ⑱ 立里晶露, 岩室祥一: 両生類皮膚由来培養細胞系を用いた抗菌ペプチド遺伝子のクローニング. 日本動物学会第80回大会, 静岡グランシップ, 2009年9月17日.
 - ⑲ 岩室祥一: 抗菌じかけのヒストン, 細胞外への旅. 日本動物学会第78回大会シンポジウム, 2009年9月17日, 静岡.
 - ⑳ 岩室祥一, 小林哲也, 菊山榮: Sequence captureに基づく両生類抗菌ペプチド遺伝子の効率的なクローニング法. 日本動物学会第80回大会, 静岡, 2009年9月17日.

[図書] (計1件)

- ① Iwamuro S, Kobayashi T. An efficient protocol for DNA amplification of multiple amphibian skin antimicrobial peptide cDNAs. PEPTIDOMICS -Methods Mol Biol. 2010, 615, Part 2, 159-176.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩室 祥一 (IWAMURO SHAWICHI)
東邦大学・理学部・准教授
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