

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05410

研究課題名（和文）イネ由来生体活性ペプチドをベースとした新奇抗真菌ペプチドの開発

研究課題名（英文）Development of novel antifungal peptide based on rice-derived bioactive peptide

研究代表者

落合 秋人 (Akihito, Ochiai)

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：真菌症は、5-10人に1人が罹患しているとされる重大疾患である。近年の多剤耐性菌の増加に伴い、真菌症の治療にはさらなる有効な新薬が求められている。本研究では、新規な作用メカニズムを有するイネ由来の抗真菌ペプチドから新たな抗真菌剤を開発することを目的とし、高活性かつ化学合成が容易な短鎖ペプチドを得た。また、トランスクリプトーム解析および遺伝子欠失酵母を用いた解析により、新奇抗真菌メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の学術的意義は、既存薬の作用機構とは異なる新しい抗真菌薬の開発を進め、真菌症に対する新たな治療法を提供することである。本研究において着目した短鎖ペプチドは、化学合成が容易であり、製造コストを抑えつつ耐性菌問題に対処できる。社会的意義としては、国民の医療コストの削減や生活の質の向上が期待される。このように本研究は、真菌感染症治療の新たな選択肢を提供し、広範な社会的貢献に繋がることが見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Mycosis is a serious disease that affects one out of every 5 to 10 people. With the recent increase in multidrug-resistant fungi, there is a need for more effective drugs for the treatment of fungal infections. In this study, we aimed to develop new antifungal agents from rice-derived antifungal peptides with novel mechanisms of action and obtained short peptides with high potency and easy chemical synthesis. We also elucidated one aspect of the novel antifungal mechanism by transcriptome analysis and gene deletion yeast analysis.

研究分野：生物有機化学

キーワード：抗真菌ペプチド ディフェンシン 作用メカニズム 抗真菌薬 分子改変

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

口腔は、咀嚼(かみ砕く)や嚥下(飲み込む)に関わることから、ヒトが健康な生活を営むための原点ともいうべき機能を果たす。一方で、外部からの異物を運ぶ主要器官であり、常に感染症のリスクに晒されている。代表的な感染症として、う蝕菌による虫歯、歯周病菌による歯周病、そして *Candida* 属真菌によるカンジダ症が知られている。特に真菌感染症においては、真菌の細胞構造が動物細胞と類似することから有効な抗菌薬が絶対的に不足しており、さらなる対抗手段が必要とされている。

研究代表者らは、新しい抗真菌薬の候補として、イネの自然免疫系において機能するディフェンシン OsAFP1 に注目した。OsAFP1 は、アポトーシスを誘導することにより *Candida* 属真菌を強力に殺菌した(図1)。この作用メカニズムは、既存の抗真菌薬には認められない。さらに、OsAFP1 は真菌細胞膜内に著量含まれるイノシトールリン脂質の一種に結合することを見出し、細胞膜への作用を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。一方で、リン脂質との結合からアポトーシス誘導に至る経路は殆ど明らかにできていない。

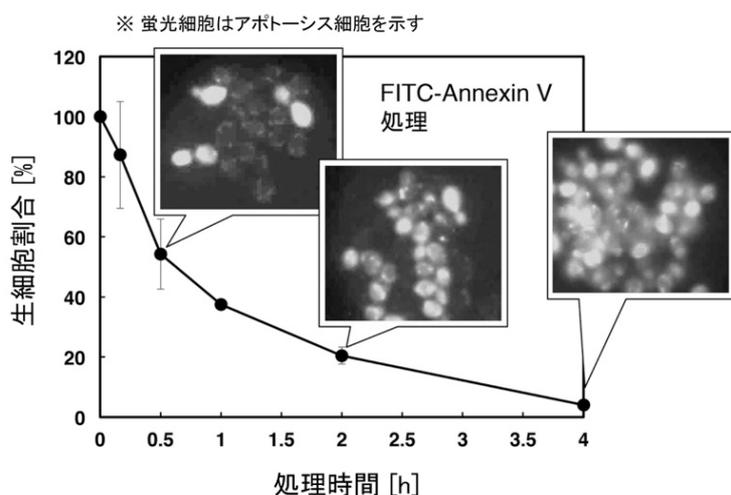


図1. OsAFP1 の *Candida* 属真菌に対する殺菌効果とアポトーシス誘導作用

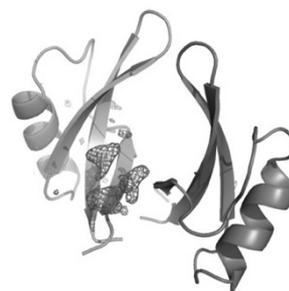


図2. OsAFP1 の X 線結晶構造

また、研究代表者らは OsAFP1 の立体構造を決定した(図2)。決定した立体構造の二次構造に基づいて、8種類の断片ペプチドを設計した結果、2種類の断片ペプチド(peptide-1,-8)に抗真菌活性が確認された。さらに、その一つである peptide-8 は、OsAFP1 と同様にアポトーシスを誘導することにより活性を示すことを見出した。

2. 研究の目的

口腔は外部からの異物を体内へ運ぶ主要な器官であることから、常に感染症のリスクに晒されている。特に、真菌の細胞構造は動物細胞の構造と類似することから、新規な抗生物質の開発が困難とされている。現在、アゾール系もしくはポリエン系の3種類の抗真菌薬が主に使用されている。いずれも効果的な抗真菌薬であるが、膜に作用する抗菌メカニズムが似通っており、近年の耐性菌の出現を考慮するとさらなる選択肢が必要とされている。研究代表者は、これらの治療のため、新たな抗真菌薬の開発を目指してイネ由来ディフェンシン OsAFP1 とその断片ペプチド peptide-8 に着目した。これらは、既存の抗真菌薬とは異なる作用メカニズムを発揮することから、新たな抗真菌薬の候補として有力である。また、いくつかの植物ディフェンシンにおいて同様の抗菌メカニズムが報告されているものの、peptide-8 のような10アミノ酸残基程度の短鎖ペプチドがアポトーシス誘導により抗真菌活性を示す報告はない。その生産性などを考慮すると、化学合成可能な peptide-8 は極めて有望と考えられる。

本研究では、OsAFP1 とその関連ペプチドの抗真菌活性の発現メカニズムの詳細を明らかにするとともに、これらペプチド、特に peptide-8 を利用した新しい真菌感染症治療法の開発に向けた基盤研究を目的とする。具体的には、[1]OsAFP1 ペプチドの抗真菌作用メカニズムの解析および[2]peptide-8 をベースにした新奇抗真菌ペプチドの創生の2つの研究計画について進めた。

3. 研究の方法

[1] OsAFP1 ペプチドの抗真菌作用メカニズムの解析

本項目では、抗菌作用の初期段階であるターゲット分子との相互作用からアポトーシス誘導に至る経路を解析することを主題とした。解析には、[2]で開発したより高活性な OsAFP1 由来ペプチドを主に使用する。OsAFP1 は *Saccharomyces* 属真菌(出芽酵母)にも抗菌活性を示す。そこで、まず酵母の GeneChip Arrays (Fisher Scientific (affymetrix) 社) を使用してトランスクリプトーム解析を行い、OsAFP1 ペプチド処理によって発現が増減した遺伝子を探索した。また、出芽酵母非必須遺伝子破壊株 6000 株 (Horizon Discovery 社) の全株をプールし、OsAFP1 を処理することにより耐性株を取得する。変異遺伝子(即ち OsAFP1 の作用経路に関与する遺伝子)を次世代シーケンサなどで網羅的に同定し、抗真菌メカニズム発現に関わる経路の特定を進めた。

[2] peptide-8 をベースにした新奇抗真菌ペプチドの創生

本項目では、peptide-8 をベースに改良を行い、高活性型新奇ペプチドを創出することを主題とした。まず、peptide-8 の N 末端側領域の配列を延長した派生体を作製した。20 アミノ酸残基程度までのペプチドの化学合成は容易であることから、その鎖長を目安に検討を行った。

また、X 線結晶構造解析を用いて、OsAFP1 の直接的なターゲット分子である PI(3)P との相互作用を解析した。OsAFP1 のアポ型の X 線結晶構造を報告済みであるため、アポ型結晶へ PI(3)P をソーキングもしくは共結晶化を行うことにより、PI(3)P との複合体結晶を調製して X 線結晶構造解析を進めた。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構の放射光を用いた。この解析により、PI(3)P との相互作用に関わるアミノ酸残基を特定できる。これら同定した残基に対して変異を導入し、抗真菌活性が向上した変異体の獲得を進めた。具体的には、PI(3)P のリン酸部の認識に静電的相互作用が、また PI(3)P のイノシトール部位の認識には疎水性相互作用が重要と考えられることから、それらの相互作用を強化する変異体を設計した。

過去に行った OsAFP1 の部位特異的変異体を用いた解析により、K35, H37, L39, K41, R42 などのアミノ酸残基が、抗真菌活性に重要な役割を果たすことが明らかにされている。PI(3)P の結合との直接の関連性は不明であるが、これらの残基は活性に大きく寄与することから、本研究の変異導入の対象に含めて解析を進めた。

これらの変異導入により、ターゲット分子との相互作用を向上させた高活性型ペプチドの設計を進めた。

4. 研究成果

[1] OsAFP1 ペプチドの抗真菌作用メカニズムの解析

初年度の早い段階で、実験計画[2]においてより高活性な短鎖ペプチド OsAFP1-8L を得た。まず、アポトーシス細胞検出および殺菌活性試験を行った結果、ペプチド処理 4 時間後におけるアポトーシス細胞の割合は 49%であり、死細胞割合は 55%であった(図 3)。アポトーシス細胞の増加に伴って死細胞が増加したことから、このペプチドが OsAFP1 同様にアポトーシスを誘導することによって抗真菌活性を示すことを明らかにした。ペプチドの真菌における標的部位を調査した結果、FITC 標識ペプチドは細胞膜表面に蓄積した。また、ペプチドは細胞膜に存在する脂質成分のうち、PI(3)P に最もよく結合した。これは OsAFP1 の標的分子であることから、このペプチドが OsAFP1 の作用機序を保持していることを示唆している。

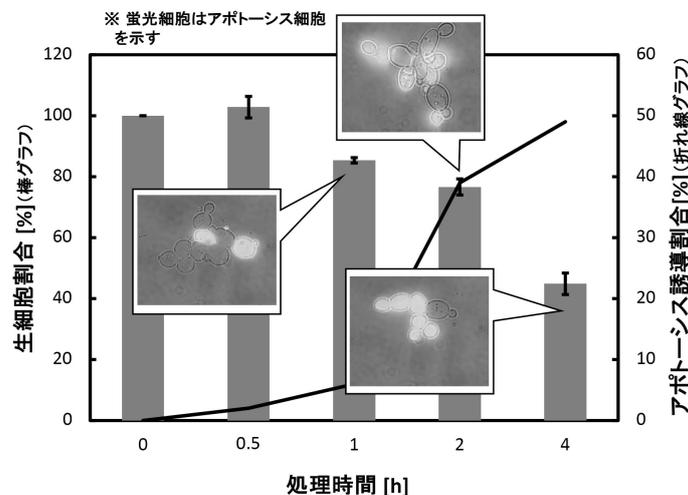


図3. OsAFP1-8L の *Candida* 属真菌に対する殺菌活性とアポトーシス誘導作用

そこで、OsAFP1-8L ペプチドの抗菌作用の初期段階からアポトーシス誘導までの経路を解析するため、ペプチドを処理した酵母細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、64 個の遺伝子で発現が 2 倍以上増加し、34 個の遺伝子で発現が 1/2 倍以下に減少した (図 4)。Gene Ontology 解析を用いて、遺伝子全体と比較して有意に多く観測される遺伝子を抽出した。その結果、イオン輸送や細胞形態維持に関わる遺伝子の発現が促進されることが判明した。殺菌活性試験などの結果から、このペプチドは細胞膜の不安定化を引き起こし、何らかの経路を通じてアポトーシスを誘導することが示唆された。

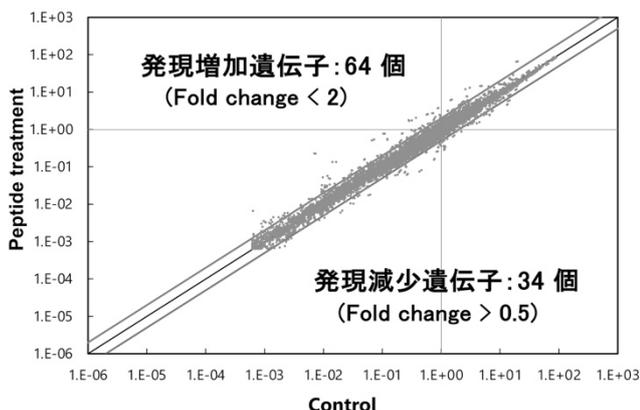


図 4. トランスクリプトーム解析によって明らかにされた OsAFP1-8L 処理による発現変動遺伝子

さらに詳細に解析を行うため、発現変動が大きい遺伝子における遺伝子欠損酵母を用いた抗真菌活性試験を行った。その結果、MIC が大きく変動した遺伝子は発現増加が 8 個、発現減少が 2 個だった。その中で、金属イオン輸送に関わる遺伝子は 2 個、酸化ストレスシグナル伝達に関わる遺伝子は 4 個含まれ、その翻訳産物の一部は細胞膜周辺に局在していた。さらに、OsAFP1-8L を処理した *C. albicans* 細胞内における ROS 蓄積を H₂DCFDA 蛍光プローブを用いて観察した。ペプチド処理 1~2 時間後における ROS 蓄積細胞の割合は、ポジティブコントロールである H₂O₂ 処理細胞における割合と同等であった。これにより、このペプチドは細胞膜への相互作用をきっかけに、金属イオンの取り込みや ROS 産生を通じてアポトーシスを誘導することが示唆された。

また、各金属イオン存在下でのペプチドの活性を解析した結果、それらの影響は観察されなかった。一方で、金属イオントランスポーターを欠失させた変異体酵母では、鉄および亜鉛イオン存在下で活性が上昇し、これらイオンの蓄積がアポトーシス誘導に関与することが示唆された。

[2] peptide-8 をベースにした新奇抗真菌ペプチドの創生

peptide-8 をベースに改良を行い、高活性型ペプチドを創出することを主題として研究を進めた。peptide-8 の前後領域を付加および削除した合計 10 種類のペプチドを設計して解析した結果、peptide-8 より 4 倍高い活性を保持した短鎖ペプチド OsAFP1-8L を得ることができた。顕微鏡観察および殺菌活性試験の結果から、OsAFP1-8L は OsAFP1 同様の抗真菌メカニズムを有していることが示唆された。

また、X 線結晶構造解析を用いて、PI(3)P との相互作用に関わるアミノ酸残基の特定を進めた。期待に反して、高分解能のデータを得ることができなかつたため、不鮮明な PI(3)P の電子密度からいくつかの相互作用残基の特定を進めた。これら残基に対して相互作用を強化する部位特異的変異を導入して解析したが、さらなる高活性型ペプチドは得られなかった。

そこで、OsAFP1-8L について研究を進めた。まず、ヒツジ赤血球に対する溶血活性試験により、OsAFP1-8L は MIC の 8 倍濃度まで溶血作用を示さず、安全性に優れることが期待された。また、脂質結合試験により、このペプチドは OsAFP1 同様に細胞膜内に存在するリン脂質の一種である PI(3)P に結合することがわかった。この PI(3)P と直接相互作用するアミノ酸残基が活性の向上に重要であると考え、*in silico* による OsAFP1 の立体構造と PI(3)P の相互作用解析を足がかりとして様々な派生ペプチドを設計した結果、ペプチド配列内の酸性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸残基に置換したペプチドが 2 倍程度高い活性を示すことを見出した。このアミノ酸残基は、PI(3)P に直接的に作用すると考えられ、その相互作用を高めることが活性の向上に寄与したと考えられた。

今後は、引き続き抗真菌活性の向上を試みるとともに、ペプチドの安定化を進める予定である。N 末端のアセチル化や C 末端のアミド化により、分解酵素に対する耐性の向上が期待できる。さらに、疎水性アミノ酸の導入や脂肪酸の修飾を行うことによりペプチドの脂溶性を高め、細胞膜透過性を向上させることが可能と考えられる。これらの改変により、ペプチドの効果が増強され、治療効果が高まることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ochiai Akihito	4. 巻 87
2. 論文標題 Discovery of new functions of food proteins and their structural development for multifunctional applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1102 ~ 1110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad098	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芦原紗喜、三井田篤志、谷口正之、田中孝明、提箸祥幸、落合秋人
2. 発表標題 イネ由来ディフェンシンの配列を基にしたアポトーシス誘導型抗真菌ペプチドの設計
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芦原紗喜、三井田篤志、大橋一登、谷口正之、田中孝明、提箸祥幸、落合秋人
2. 発表標題 イネディフェンシン由来抗真菌ペプチドのアポトーシス誘導機序に関する研究
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東海林裕翔、芦原紗喜、大橋一登、谷口正之、提箸祥幸、田中孝明、落合秋人
2. 発表標題 イネディフェンシン由来アポトーシス誘導型抗真菌ペプチドの機能性評価
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠藤めい、東海林裕翔、鈴木優飛、谷口正之、田中孝明、落合秋人
2. 発表標題 イネ由来多機能性ペプチドの機能性向上に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 落合秋人、東海林裕翔、芦原紗喜、大橋一登、谷口正之、提箸祥幸、田中孝明
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析によるイネディフェンシン由来ペプチドの作用メカニズムの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 落合秋人
2. 発表標題 抗真菌ペプチドの活用によるマイコバイオーム改善への可能性
3. 学会等名 バイオインダストリー協会「4大学+1企業アグリ食品セミナー」
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 落合 秋人, 谷口 正之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 8
3. 書名 米の機能性食品化と新規利用技術・高度加工技術の開発 「第4節 第2項 米糠由来ペプチドの美容への応用」	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------