

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560939

研究課題名(和文) 抗菌米タンパク質成分のヒト病原菌に対する殺菌作用機構の解明と食品医薬品への応用

研究課題名(英文) Elucidation of action mechanisms against human pathogenic microorganisms of protein components from rice grain and their application to food and drug

研究代表者

谷口 正之(Taniguchi, Masayuki)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00163634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：米由来タンパク質から歯周病菌、日和見感染真菌、ニキビ菌などのヒト病原菌に対して抗菌性を示す6種類のペプチドを見出した。これらのペプチドを構成するアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸が抗菌活性を発揮するために重要であることが明らかとなった。また、抗菌作用機構を細胞膜への作用とタンパク質合成の阻害に分けて検討した結果、2種類のペプチドは細胞膜を破壊することによって抗菌性を発揮することがわかった。したがって、これらの米由来ペプチドはヒトの疾病を予防するための医薬品や食品の素材として有用であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the six kinds of components (peptides) of rice proteins, have an antimicrobial activity against human pathogenic microorganisms, including periodontal pathogens, opportunistic infectious agents, and acne bacteria. The cationic amino acid (arginine and lysine) residues of these peptides were found to be important for expression of their antimicrobial activity. We investigated the mode of action of antimicrobial peptides with regard to not only disrupting action of cell membranes but also inhibition of protein synthesis. Our observations indicate that the antimicrobial peptides from rice proteins will be useful to develop preventive drugs and foods against human diseases.

研究分野：食品工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗菌ペプチド 米タンパク質 ヒト病原菌 細胞膜破壊 タンパク質合成阻害

1. 研究開始当初の背景

病原菌の侵入に対して抗菌性のタンパク質・ペプチドによって生体を防御する機構は、ヒトをはじめとするあらゆる生物に共通の先天性免疫機構であり、既に約 1,500 種類のペプチドが発見されている。これらの抗菌成分は、それらの構造から、 β -sheet, α -helical, loop, および extended の 4 つのタイプに分類され、その分子中に塩基性アミノ酸 (K:リジン, R:アルギニン, H:ヒスチジン) を多く含んでおり、負に帯電した生体膜と静電的相互作用によって結合する。これらの抗菌成分は、生体膜の破壊作用によって殺菌効果を示す場合と DNA や酵素などの細胞内物質を標的とする場合が報告されているが、後者の場合の作用機構はほとんど解明されていない。また抗菌成分は、①グラム陰性菌, グラム陽性菌, 真菌, 原虫, ウイルスなどに広く作用し、②宿主 (ヒトを含む) に対して毒性が低い、③耐性菌を生じにくいなどの特徴から、耐性菌の出現と蔓延が危惧される従来の抗生物質に代わる医薬品として注目され、国内外で研究されている。

2. 研究の目的

米中のタンパク質由来のペプチドに、ヒトの病原菌 (特に歯周病菌) に対して抗菌活性を有することに着目し、それらの構造と活性の相関、およびその食品・化粧品・医薬品などの産業への利用に関して、これまで研究を展開してきた。これまでの研究成果に基づいて、米のタンパク質由来の抗菌ペプチドの探索と同定、およびそれらのヒト病原微生物に対する作用機構の解明に焦点を絞って、次の 4 点を明らかにすることを、本研究の目的とした。

(1) 代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (グラム陰性菌) を指標菌として、米由来抗菌ペプチドを検索し、同定する。

(2) 米由来 CL (Cyanate lyase) ペプチド [RRLMAAKAESRK] とその変異体をモデル抗菌成分として、殺菌作用機構を解明するための評価手法を確立する。

(3) 同定した抗菌成分のヒト病原菌 (*Porphyromonas gingivalis* 以外の歯周病菌, 日和見感染菌, 虫歯菌, ニキビ菌, 化膿菌など) に対する抗菌スペクトルと殺菌作用機構を解明する。

(4) 抗菌成分の活性と構造の相関および主要アミノ酸の抗菌活性に対する寄与を解明し、機能性食品素材用の天然型ペプチドと疾病予防・治療用の高活性合成ペプチドを開発する。

3. 研究の方法

(1) 米のタンパク質の部分配列から、タンパク質表面に分布していること、 α -ヘリックス

構造を有すること、正味の正電荷を有すること、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が含まれていることを条件として、抗菌ペプチドを探索した。見出したペプチドを化学合成し、歯周病菌をはじめとする 10 種類のヒト病原菌に対する抗菌活性を測定した。抗菌活性は、ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光法を用いて、生菌に由来する ATP を定量し、生菌数を測定することによって評価した。

(2) 見出した抗菌ペプチドの抗菌作用を細胞膜への作用とタンパク質合成系への作用に分けて検討した。細胞膜への作用は、① 蛍光プローブである diSC₃-5 を用いた細胞膜脱分極法、② 細胞膜透過性を付与した蛍光色素である Calcein-AM を用いた方法、③ フローサイトメーターなどを用いた方法によって、それぞれ評価した。一方、タンパク質合成系への作用を解明するために、無細胞合成系を用いた緑色蛍光タンパク質の合成阻害およびその転写ステップと翻訳ステップの阻害、さらに変性酵素を用いたリフォールディングの阻害を、それぞれ評価するアッセイ系を確立し、抗菌ペプチドの細胞内標的のステップについて検討した。

4. 研究成果

(1) 酵素 (Cyanate lyase) 由来抗菌ペプチド

精白米抽出液から歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) が分泌するプロテアーゼ (Arginine gingipain: Rgp) 結合タンパク質を精製し、同定した結果、Cyanate lyase などの 17 種類のタンパク質を見出した。また、Cyanate lyase の部分配列 [RRLMAAKAESRK] (分子量 1416.709) である塩基性アミノ酸 (R:アルギニン, K:リジン, H:ヒスチジン) を多く含むペプチド CL-12 が Rgp の活性を阻害すること、および歯周病菌に対して抗菌活性を発揮することを見出した (図 1)。また、蛍光色素を封入したリン脂質二重層からなるベシクルを用いたアッセイ、巨大単一ベシクル (直径 10~20 μ m) を用いた顕微鏡観察 (図 2)、および蛍光プローブを用いた細胞膜脱分極アッセイによって、CL-12 は歯周病菌の細胞膜に作用して、殺菌活性を発揮することを解明した。

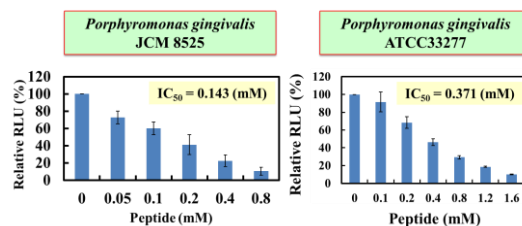


図 1 CL-12 の歯周病菌に対する抗菌作用

CL-12 は、2 種類の歯周病菌に対して抗菌活性を示した。

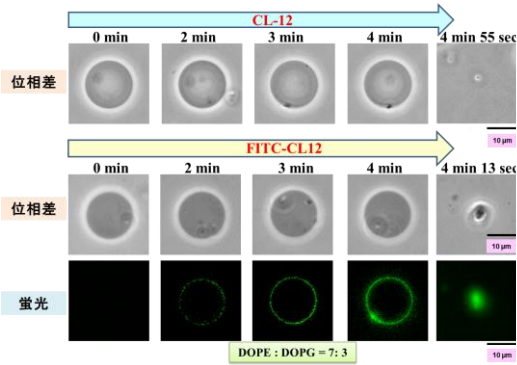


図2 CL-12 のグラム陰性菌細胞膜模倣ベシクルの破壊作用

CL-12 は、グラム陰性菌細胞膜模倣ベシクル(巨大単一ベシクル)の表面に集積した後、ベシクルを破壊した。CL-12 は、歯周病菌の細胞膜を破壊することによって、抗菌活性を発揮することが明らかになった。

(2) Heat shock protein 由来抗菌ペプチド
米タンパク質の部分配列から、タンパク質表面に分布していること、 α -ヘリックス構造を有すること、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が含まれていることなどを条件として、さらに抗菌ペプチドを探索した。その結果、Heat shock protein 70 から、3種類の抗菌ペプチド候補 Hsp70-13[SQRQATKDAGVIS], Hsp70-18 [DNRMVNHVFQEFKRKHK], および Hsp70-14[RAFEEELNMDLFR]を見出した。これらのペプチドを化学合成し、歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) やニキビ菌 (*Propionibacterium acnes*) をはじめとする 10 種類のヒト病原菌に対する抗菌活性を測定した結果、いずれのペプチドも歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) に対して抗菌活性を発揮した。また、Hsp70-18 はカンジタ性口内炎の原因菌(日和見感染真菌)である *Candida albicans* に対しても抗菌活性を有していた(図3)。また、膜透過性を付与した蛍光プローブ (Calcein-AM) を用いた細胞膜損傷アッセイ (図4), およびフローサイト

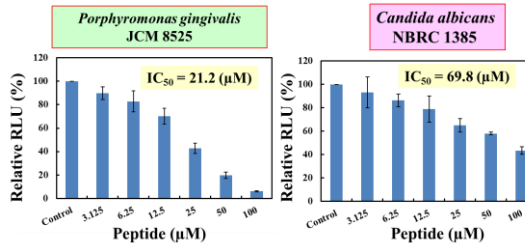


図3 Hsp70-18 の歯周病菌と日和見感染真菌に対する抗菌作用

Hsp70-18 は、歯周病菌と日和見感染真菌に対して抗菌活性を示した。Hsp70-18 の歯周病菌に対する抗菌活性は、CL-12 に比べて高かった。

メーターを用いて核酸染色蛍光プローブ (Propidium iodide) で染色される細胞数を測定する細胞膜損傷アッセイ (図5) によって、ポジティブコントロールとして用いたハチ毒由来の Melittin と同じように、Hsp70-18 は歯周病菌および日和見感染真菌の細胞膜に主に作用して、殺菌活性を発揮することを解明した。

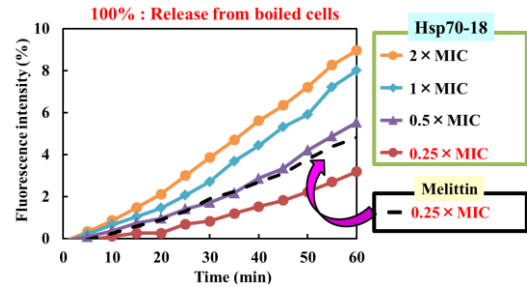


図4 Hsp70-18 による日和見感染真菌からの Calcein の放出

Hsp70-18 は、ポジティブコントロールとして用いたハチ毒由来の Melittin と同じように、日和見感染真菌から濃度に依存して、Calcein を放出した。Hsp70-18 は、細胞膜に対して作用することによって抗菌活性を発揮することが明らかとなった。

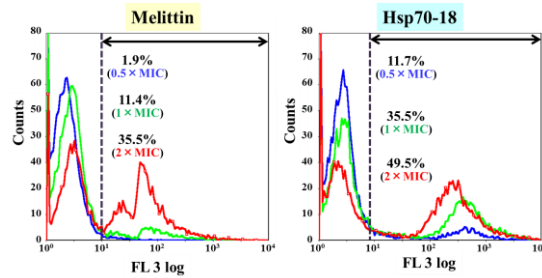


図5 Hsp70-18 処理によって染色された細胞数のフローサイトメーターによる計測

Hsp70-18 を用いて処理することによって、ポジティブコントロールとして用いたハチ毒由来の Melittin と同じように、核酸が染色された日和見感染真菌の数が濃度に依存して徐々に増大した。Hsp70-18 は、日和見感染真菌の細胞膜を損傷することによって、抗菌活性を発揮することが明らかとなった。

(3) α -アミラーゼ由来抗菌ペプチド
新たに米タンパク質から抗菌ペプチド候補を探索した結果、 α -アミラーゼ (AmyI-1) から、2種類の抗菌ペプチド候補 Amy1-1-18 および Amy1-1-17 を見出した。これらのペプチドを化学合成し、10種類のヒト病原菌に対する抗菌活性を測定した結果、どちらのペプチドも歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) に対して抗菌活性を発揮した。また、Amy1-1-18 の *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌活性は、CL-12 の約 26 倍、Hsp70-18

の約5倍であった。さらに Amy1-1-18 は、虫歯菌、日和見感染真菌、ニキビ菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌などに対しても抗菌活性を示し、抗菌スペクトルが広いことを明らかにした。一方、Amy1-1-18 の *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌作用メカニズムを解明するために、細胞膜脱分極アッセイを実施した結果、細胞膜への作用は CL-12 や Hsp70-18 に比べて弱いことがわかった。また、膜透過性を有する蛍光プローブ (Calcein-AM) を用いた細胞膜損傷アッセイ、およびフローサイトメーターを用いて核酸染色蛍光色素 (Propidium iodide) で染色される細胞数を測定する細胞膜損傷アッセイによって、Amy1-1-18 の日和見感染真菌の細胞膜に対する作用を解析した。その結果、細胞膜への作用は Hsp70-18 に比べて弱いことがわかった。そこで、無細胞タンパク合成系を用いて、タンパク質合成への影響を検討した結果、Amy1-1-18 はタンパク質合成を阻害することが示唆された。

(4) 米タンパク質由来抗菌ペプチドに共通する特徴

抗菌活性を有するペプチドに共通する特徴は、10-20 残基のアミノ酸から構成されている点、アルギニン(R)、リジン(K)、ヒスチジン(H)などの塩基性アミノ酸を多く含む点、および疎水性アミノ酸(L:ロイシン, I:イソロイシン, V:バリン)を含む点であることを見出した。また、CL-12 の欠失体ペプチドや塩基性アミノ酸をアラニンに置換したペプチド変異体を化学合成し、それらの歯周病菌に対する抗菌活性を比較することによって、抗菌活性に対する塩基性アミノ酸(アルギニンとリジン)の寄与を明らかにした。また、現在、Amy1-1-18 の塩基性アミノ酸をアラニンで置換した5種類のペプチド変異体、および極性を有するアミノ酸を疎水性アミノ酸で置換した5種類のペプチド変異体を化学合成し、それらの抗菌活性を測定している。以上のように、抗菌活性を有する化学合成ペプチドに共通する性質を詳細に解明する基盤研究にも取り組んだ。

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 3 件)

- ① Masayuki Taniguchi, Nobuteru Takahashi, Tomohiro Takayanagi, Atsuo Ikeda, Yohei Ishiyama, Eiichi Saitoh, Tetsuo Kato, Akihito Ochiai, and Takaaki. Tanaka : Effect of substituting arginine and lysine with alanine on antimicrobial activity and the mechanism of action of a cationic dodecapeptide (CL(14-25)), a partial sequence of cyanate lyase from rice. *Peptide Science*, 査読有, Vol.102, No.1,

2014, pp.58-68.

DIO:10.1002./bip.22399

- ② Masayuki Taniguchi, Atsuo Ikeda, Shunichi. Nakamichi, Yohei Ishiyama, Eiichi Saitoh, Tetsuo Kato, Akihito Ochiai, and Takaaki Tanaka : Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic α -helical octadecapeptide derived from heat shock protein 70 of rice. *Peptides*, 査読有, Vol.48, 2013, pp.147-155. DOI: org/10.1016/j.peptides.2013.08.011
- ③ Norihiro Takei, Nobuteru Takahashi, Tomohiro Takayanagi, Atsuo Ikeda, Kenji Hashimoto, Masahiro Takagi, Tsutomu Hamada, Eiichi Saitoh, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, and Masayuki Taniguchi : Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic α -helical dodecapeptide, a partial sequence of cyanate lyase from rice. *Peptides*, 査読有, Vol.42, 2013, pp.55-62. DOI:org/10.1016/j.peptides.2012.12.015

[学会発表] (計 10 件)

- ① 谷口 正之, 田嶋 幸司, 松嶋 健太, 高橋 清志, 中道 俊一, 落合 秋人, 田中 孝明
米タンパク質由来ペプチドの抗菌・抗炎症・創傷治癒作用の解析とその機構の解明
日本農芸化学会
2014年3月29日
明治大学生田キャンパス
- ② 柴田 一駿, 中道 俊一, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
米由来新規ペプチドの病原微生物に対する抗菌活性とその作用機構の解明
日本生物工学会
2013年9月19日
広島国際会議場
- ③ 近藤 裕志, 石山 洋平, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
無細胞タンパク質合成システムを用いた抗菌ペプチドのタンパク質合成阻害作用の評価
日本生物工学会
2013年9月19日
広島国際会議場
- ④ 中道 俊一, 池田 篤夫, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
米由来 Hsp ペプチドの病原微生物に対する抗菌活性とその作用機構の解明
日本生物工学会
2013年9月19日
広島国際会議場
神戸国際会議場
- ⑤ 石山 洋平, 近藤 裕志, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
無細胞タンパク質合成システムを用いたタンパク質合成に対する抗菌ペプチドの阻害効果

日本農芸化学会

2013年3月25日

東北大学川内キャンパス

- ⑥池田 篤夫, 石山 洋平, 落合 秋人,
田中 孝明, 谷口 正之
新規米由来ペプチドの病原微生物に対する
抗菌活性とその作用機構の解明

日本生物工学会

2012年10月25日

- ⑦近藤 裕志, 石山 洋平, 落合 秋人,
田中 孝明, 谷口 正之
無細胞タンパク質合成系を用いた抗菌ペ
プチドの作用機構の解析

日本生物工学会

2012年10月25日

神戸国際会議場

- ⑧落合 秋人, 原田 計, 柴田 一駿,
三ツ井 敏明, 田中 孝明, 谷口 正之
イネ由来抗菌タンパク質の同定とヒト病
原菌に対する抗菌活性の評価

日本農芸化学会

2012年3月23日

京都女子大学

- ⑨原田 計, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口
正之

歯周病菌に対して抗菌活性を発揮する米
由来タンパク質の精製と同定

日本生物工学会

2011年9月27日

東京農工大学小金井キャンパス

- ⑩池田 篤夫, 高橋 信輝, 武井 教展,
濱田 勉, 高木 昌宏, 落合 秋人, 田中
孝明, 谷口 正之
米タンパク質由来 CL ペプチドの歯周病菌
に対する抗菌作用機構の解明

日本生物工学会

2011年9月27日

東京農工大学小金井キャンパス

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：生体防御用組成物及びその用途, 並び
にペプチド

発明者：谷口 正之, 落合 秋人

権利者：新潟大学

種類：特許

番号：特願2014-005625

出願年月日：2014年1月16日

国内外の別：国内

名称：口腔用抗菌剤, 口腔内の殺菌方法,
及び口腔内疾患治療薬

発明者：谷口 正之, 落合 秋人

権利者：新潟大学

種類：特許

番号：特願2012-039051

出願年月日：2012年2月24日

国内外の別：国内

〔その他〕

- ①2013年度キャンパスイノベーションセン
ター新技術説明会

谷口 正之

穀類由来ペプチドの生体防御機能とその
食品・化粧品への応用

2013年11月7日

キャンパスイノベーションセンター東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 正之 (TANIGUCHI MASAYUKI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00163634