

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780122

研究課題名(和文) イネ由来新規抗菌タンパク質の生理学的・構造生物学的解析

研究課題名(英文) Physiological and Structural analysis on novel anti-microbial proteins from rice

研究代表者

落合 秋人(Ochiai, Akihito)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：40588266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は近年、イネの種子から歯周病菌の増殖阻害に関与する2種類のタンパク質成分 OsHsp70N (Hsp70ホモログ)とAmyl-1 (α-アミラーゼ)を見出した。本研究課題では、ヒト病原菌に対するこれらのタンパク質の増殖阻害活性の効果範囲(スペクトル)を明らかにした。また、X線結晶構造解析によりそれぞれのタンパク質の立体構造を決定した。得られた構造生物学的知見と分子間相互作用解析などにより、Amyl-1はグラム陰性菌細胞壁外膜を構成するリポ多糖(LPS)と相互作用することを明らかにするとともに、Amyl-1と可溶性デンプンの分解物が協奏的に作用して歯周病菌の増殖を阻害する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In a recent study, we identified two proteins from rice (*Oryza sativa*) seed, OsHsp70N (Hsp70 homolog) and Amyl-1 (alpha-amylase), that show significant cell growth-inhibitory activity against periodontal pathogenic bacteria. In this study, we investigated the spectrum of activity of these proteins against the bacteria, and the crystal structures of the proteins were also determined. Crystallographic and intermolecular interaction analysis showed that Amyl-1 interacts with lipopolysaccharide, a component of the cell wall of gram-negative bacteria, and suggested that Amyl-1 and starch hydrolysate have a synergistic effect on the inhibition of cellular growth in these bacteria.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：歯周病菌 増殖阻害 α-アミラーゼ Hsp70 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

環境にやさしく安全性が高い天然の生理活性タンパク質は、様々な用途で大きな潜在的需要を有する。研究代表者は近年、イネ *Oryza sativa* の種子(精白米)から歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* JCM 8525 株の増殖阻害に關する 2 種類のタンパク質成分 OsHsp70N (Heat shock protein と高い相同性) と Amyl-1( -アミラーゼ)を見出した。OsHsp70N のアミノ酸部分配列を化学合成して *P. gingivalis* に対する増殖阻害活性を測定した結果、3 種類のペプチド(アミノ酸番号; 158-170, 241-258, 306-319)において高い活性が確認された。Amyl-1 と OsHsp70N の増殖阻害活性のメカニズムは不明であったが、これらタンパク質の特定の部位が *P. gingivalis* の何らかのターゲットに作用し、増殖阻害に關わることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、次の 3 点を目的とした。(1) タンパク質 OsHsp70N および Amyl-1 について、ヒト病原菌(真菌や細菌)に対する増殖阻害活性の効果範囲(スペクトル)を解明する。(2) 構造生物学的解析とそれに基づく部位特異的変異導入および部分配列に対応する合成ペプチドによる解析から、OsHsp70N と Amyl-1 の *P. gingivalis* に対する増殖阻害活性に關わる構造要因を推定する。(3) これらタンパク質の *P. gingivalis* 細胞表層における標的分子を探索し、同定を試みる。以上の結果を踏まえて、増殖阻害メカニズムの解明と抗菌性の食品・医薬品素材の開発へと発展させる。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗菌スペクトルの解明

OsHsp70N および Amyl-1 について、様々なヒト病原菌を用いて増殖阻害活性のスペクトルを解析した。病原性細菌として、歯周病菌(*P. gingivalis* W50 株, W83 株, ATCC 33277 株), 日和見感染菌(*Propionimicrobium lymphophilum*, *Candida albicans*), ニキビ菌(*Propionibacterium acnes*), 肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*), 化膿菌(*Staphylococcus aureus*)などを用いた。また、グラム陰性細菌のモデル系として大腸菌 *Escherichia coli* についても同様に行った。抗菌活性は、濁度法に比べて高感度な、生菌に由来する ATP の発光強度を指標とした ATP 化学発光法を用いて評価した。

(2) 大腸菌を用いた組換え OsHsp70N および Amyl-1 の調製と X 線結晶構造解析

大腸菌を用いて OsHsp70N および Amyl-1 の組換えタンパク質の大量発現系を構築した。発現系の構築には、Novagen 社で販売されている pET15b もしくは pET21b ベクターを使用して、それぞれのタンパク質の cDNA を組み込んだ発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドと BL21(DE3)、HMS174(DE3)などの

様々な宿主を用いて発現条件の最適化および精製を進め、結晶化に必要なタンパク質の大量調製法を確立した。

精製した組換え OsHsp70N および Amyl-1 は、Hampton Research 社などで販売されているタンパク質結晶化スクリーニングキットなどを使用して、1000 以上の網羅的な結晶化条件のスクリーニングを行うことにより結晶化した。得られた結晶の X 線回折データの収集には、新潟大学自然科学系設置の X 線構造解析装置(X 線発生装置: リガク RA-Micro 7HF; 検出器、リガク R-AXIS IV<sup>++</sup>)、もしくは放射光実験施設(放射光科学研究施設 Photon Factory)を利用した。主に結晶のスクリーニングには本学の実験室系装置を、高分解能データの取得には放射光施設の装置を使用した。位相の決定は、既に報告されているヒト由来 Hsp70 (PDB ID: 1ATS)や大麦由来 -アミラーゼ (PDB ID: 2QPU)の構造情報をもとに、分子置換法により行った。

(3) *P. gingivalis* の細胞表層における標的分子の探索

主に Amyl-1 に関して *P. gingivalis* の細胞表層における標的分子を探索するため、グラム陰性菌細胞壁外膜を構成するリポ多糖(Lipopolysaccharide, LPS)との結合性を分子間相互作用解析により検証した。また、決定した Amyl-1 の立体構造情報に基づいて、細菌の細胞表層と相互作用する領域を推定した。さらに、Amyl-1 のデンプン分解活性に關わる触媒残基は、Asp-203, Glu-228, Asp-314 であると推測される。そこで、これらの部位に変異を導入した変異体を作製し、増殖阻害活性との関係も検証する。分子間相互作用解析は GE ヘルスケア社製の Biacore X を使用して行い、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて Amyl-1 に対する部位特異的変異導入を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 抗菌スペクトルの解明

OsHsp70N は、4 種類の *P. gingivalis* 菌株(JCM 8525 株, W50 株, W83 株, ATCC 33277 株)に対して約 0.1-0.5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で増殖阻害を示した。一方、Amyl-1 はこれらの 4 菌株に対して 4-40  $\text{ng/ml}$  の低濃度で増殖阻害を示した。この結果により、見出した 2 つのタンパク質が歯周病菌 *P. gingivalis* に対する増殖阻害剤として高い汎用性を有し、Amyl-1 がより高い効果を示すことを明らかにした。また、他のヒト病原性細菌に対しては、有意な増殖阻害を示さなかった。

(2) 大腸菌を用いた組換え OsHsp70N および Amyl-1 の調製と X 線結晶構造解析

組換え大腸菌においてそれぞれのタンパク質を発現させ、金属アフィニティー、ゲルろ過、陰イオン交換の各クロマトグラフィーにより精製を行った。それぞれ 1 L の組換え大腸菌培養液から、10.6 mg および 0.83 mg

の精製タンパク質を得た。この精製タンパク質を用いて、PEG6000 もしくは PEG3350 を含む条件においてそれぞれの単結晶を調製し(図1)、X線結晶構造解析を進めた。

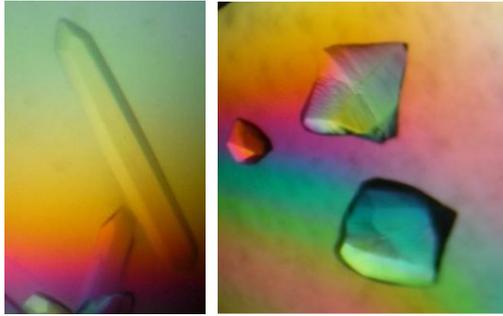


図1. OsHsp70N(左)および Amyl-1(右)の単結晶

(3) 立体構造情報に基づく歯周病菌の増殖阻害メカニズムへの考察

X線結晶構造解析により、1.9 Å 分解能においてOsHsp70Nの立体構造を決定した(図2)。OsHsp70Nは、5枚の $\beta$ -シートを形成する18本の $\beta$ -ストランドと19本の $\alpha$ -ヘリックスから構成されていた。また、OsHsp70Nと補酵素ADPとの結合様式を明らかにした(図3)。ADPのアデニン部とリボース部に対して、それぞれ2本および3本の水素結合が観察された。これに対して、リン酸部分には15本の水素結合が確認された。この結果から、OsHsp70Nがリン酸部位を特異的に認識することによってADPと結合していると考えられた。また、抗菌活性を示すOsHsp70N由来の3種類のペプチドは、タンパク質の分子表面に位置することを明らかにした。

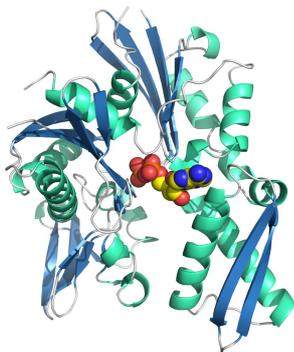


図2. 決定したOsHsp70Nの立体構造

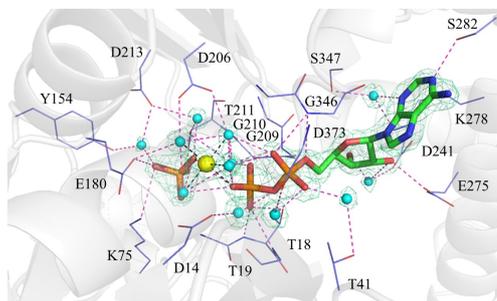


図3. OsHsp70Nとリガンドとの相互作用

X線結晶構造解析により、2.2 Å 分解能においてAmyl-1の立体構造を決定した(図4)。Amyl-1は $\alpha$ -アミラーゼに典型的な(1/2)- $\beta$ -バレル構造を有していた。また、立体構造既知の $\alpha$ -アミラーゼとの構造比較から、2つの糖結合モジュール(CBM)に存在するいくつかの残基が高度に保存されていることがわかった。一方で、生体分子相互作用解析により、Amyl-1はグラム陰性菌細胞壁外膜を構成するリポ多糖(LPS)と相互作用することを明らかにし、細菌に対する結合能力を有する可能性を示した(図5)。Biacore センサーグラムのさらなる解析により、LPSはAmyl-1の親和性の異なる2つの部位に結合することが示唆されたことから、LPSを構成する糖構造がAmyl-1の2つのCBMに結合する可能性を示した。

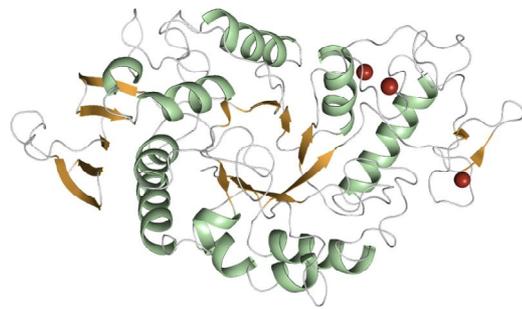


図4. 決定したAmyl-1の立体構造

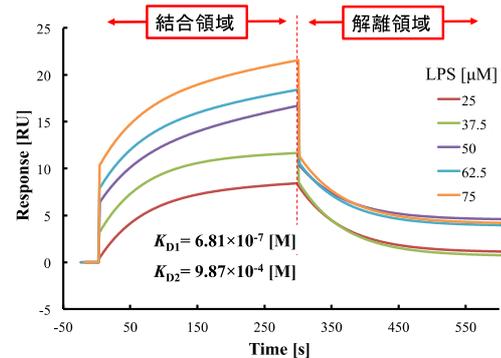


図5. Amyl-1とLPSとの相互作用解析

一方で、培地中にAmyl-1と可溶性デンプンが共存する場合のみ、*P. gingivalis*の増殖阻害が確認されることがわかった。予めAmyl-1を用いて可溶性デンプンを糖化した液を培地中に添加した場合にも、*P. gingivalis*の増殖が阻害された。また、推定される触媒残基Asp-203をAlaに置換して糖化活性を喪失させた変異体を用いても増殖阻害は起こらなかったことから、糖化酵素によるデンプンの分解物が直接的に歯周病菌の増殖阻害を引き起こすことが示唆された。市販のデンプン分解物には抗菌活性が認められなかったため、Amyl-1と可溶性デンプンの分解物が協奏的に*P. gingivalis*の増殖阻害に関与していることが示唆された。

以上の結果により、イネ種子由来の2種類のタンパク質の、歯周病菌 *P. gingivalis* の増殖阻害とそのメカニズムの一端を、生理学的・構造生物学的手法により明らかにした。また、決定した OsHsp70N の立体構造は植物由来の Hsp70 として、Amyl-1 はイネ由来 - アミラーゼとして初めての報告である。

#### 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2件)

(1) Ochiai A, Sugai H, Harada H, Tanaka S, Ishiyama Y, Ito K, Tanaka T, Uchiyama T, Taniguchi M, Mitsui T. Crystal structure of  $\alpha$ -amylase from *Oryza sativa*: molecular insights into enzyme activity and thermostability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2014) 印刷中. 査読有り

doi: 10.1080/09168451.2014.917261

(2) Ochiai A, Harada K, Hashimoto K, Shibata K, Ishiyama Y, Mitsui T, Tanaka T, Taniguchi M.  $\alpha$ -Amylase is a potential growth inhibitor of *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogenic bacterium. *J. Periodont. Res.* 49 (2014) 62-68. 査読有り

doi: 10.1111/jre.12079

[学会発表](計3件)

(1) 落合 秋人, 菅井 寛, 原田 計, 田中 孝明, 谷口 正之. 低温ストレスに应答するイネ由来熱ショックタンパク質 Hsp70 の X 線結晶構造解析

日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学

(2) 菅井 寛, 落合 秋人, 原田 計, 田中 孝明, 谷口正之. イネ由来熱ショックタンパク質 Hsp70 の構造と機能の解析

第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 20 日、広島国際会議場

(3) 柴田 一駿, 石山 洋平, 原田 計, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之. 糖化酵素によって生成する抗菌物質を用いた歯周病菌の増殖阻害

第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 24 日、神戸国際会議場

[産業財産権]

出願状況(計2件)

(1)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 01 月 16 日

国内外の別: 国内

(2)名称: イネ由来成分を含有する感染防御用組成物

発明者: 谷口正之、落合 秋人、築野 卓夫、山中 崇

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-157202

出願年月日: 2012 年 07 月 13 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

落合 秋人 (OCHIAI AKIHITO)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号: 40588266

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし