

# 植物抗菌ペプチド直鎖型変異体の発現系の構築

南 雄二

鹿児島大学農学部生物資源化学科生分子機能学研究室

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

TEL : 099-285-8632

## 要旨

本研究では、植物抗菌ペプチドの高度利用に向けて、より高収量で、高い活性を持った抗菌ペプチドの開発を目的とし、著者が単離した中で最も強力な活性を有するアメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*)種子由来抗菌ペプチド(*Pa*-AMP1)の6つのシステイン残基全てを除去した直鎖型変異体(*Pa*-C.omit)を発現・精製し、諸性質を解析した。まず、グルタチオン-Sトランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現される目的プラスミドを構築した。菌体を破碎後、アフィニティーおよび逆相クロマトグラフィーに供し、最終精製物を得た。*rPa*-AMP1 と *Pa*-C.omit の最終精製物の収量は、それぞれ 0.6mg/1L、2mg/1L であった。また、*rPa*-AMP1 および *Pa*-C.omit は、どちらもキチン結合能を保持しており、*Pa*-C.omit は、今回用いた全ての真菌および細菌に対して *rPa*-AMP1 とほぼ同等の抗菌活性を有していることを確認した。CD スペクトル測定の結果、*rPa*-AMP1 は *Pa*-AMP1 と同様に、親水環境でも疎水環境でも  $\beta$ シート構造を保持していた。一方、*Pa*-C.omit は、親水環境でランダムコイル、疎水環境で規則的な構造( $\alpha$ ヘリックス構造)を示しており、*rPa*-AMP1 の構造とは異なっていることを示した。これらのことから、*Pa*-AMP1 のシステイン残基を全て除去すると、立体構造を保持することができなくなるが、*Pa*-AMP1 とは異なる様式で膜に作用し、抗菌活性を示すものと推察した。

## 1. 緒言

抗菌ペプチドは、高等動物である哺乳類から無脊椎動物、植物、一部の微生物にいたる広範な生物種に見出される生体防御物質である。抗菌ペプチドとは、細菌、糸状菌、さらに一部の酵母、およびウイルスの生育を静止あるいは阻害する生理活性を持つペプチドである。抗菌ペプチドは、一般的に、十～数十アミノ酸残基からなり、分子中に多くの塩基性アミノ酸残基を含んでいることから、生理的条件下で正電荷を帯びる。そのため負に帯電した細菌の膜表面に静電的相互作用により近づくと考えられている。また、分子内に多くの疎水性アミノ酸残基を含み、両親媒性となる。両親媒性という性質は、微生物細胞膜の透過処理に関連していると考えられている。膜透過処理メカニズムには、「barrel-stave」及び「troidal」メカニズムによる細胞膜へのポア形成による細胞内成分溶出と、「carpet」メカニズムによる細

胞膜の溶解および破壊があるとされている(Fig.1)。

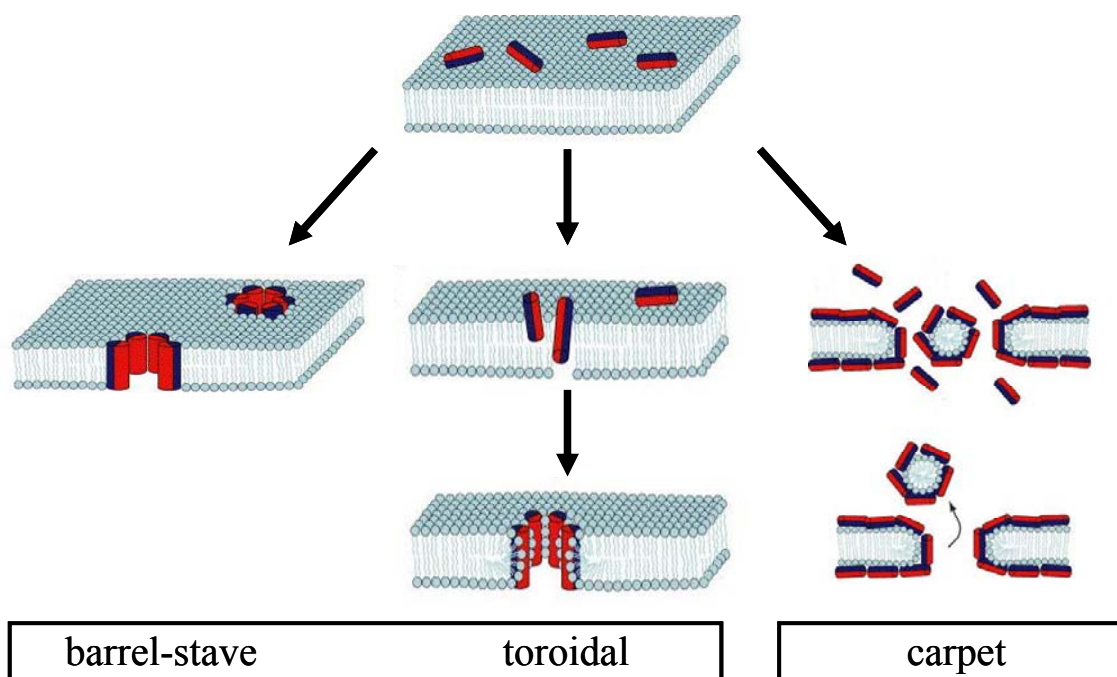


Fig.1. Membrane permeabilization model.

近年、MRSA や VRE など抗生物質や消毒薬に対する耐性菌が出現し、薬物に対する耐性の情報がある菌種から他の菌種へと伝搬されることが明らかとなってきた。このような各種薬剤に対する耐性菌の出現に伴い、従来の抗生剤あるいは抗真菌剤に代わる抗菌物質の必要性が非常に高まっており、特に抗菌性だけでなく、これまでの抗真菌剤の大きな問題点であった副作用あるいは細胞毒性というものがなるべく小さい抗菌物質が望まれるようになっている。抗菌ペプチドは、生物が自ら産生しているものであるため、生体に対しての副作用あるいは害作用は極めて小さく、抗生物質の代わり得るものとして期待されている。そのため、細胞毒性の低い抗菌ペプチドの開発をテーマにし、抗菌メカニズムや分子内ジスルフィド結合の重要性などの研究が広く行われている。

抗菌ペプチドの抗菌活性において、完全なジスルフィド結合が重要であるといくつかの論文では論じられている。β-defensins の機能において、ジスルフィド結合が必要不可欠な役割を担っていることが証明されている。しかし、ジスルフィド結合の有無や分布の活性に対する影響はペプチドに依存している。この基準で、陽イオン性のジスルフィド結合をもつペプチドを分類した場合、2つのグループに分けることができる。1つは、ジスルフィド結合の有無が活性に影響を与えない抗菌ペプチドである。human β-defensin 3やbovine β-defensin 2、bovine β-defensin BNBD-12がこのグループに属する。human β-defensin 3に関しては、還元型と酸化型のどちらも低濃度の NaCl 存在下でも活性を示しており、還元型のほうがより高い塩耐性をもっていることが示されている。2つめのグループは、ジスルフィド結合が欠如す

ることで抗菌活性が低下するグループである。例えば、還元型 murine  $\beta$ -defensin Defr1 は酸化型に比べ著しく活性が低下している。また、他の研究では、human  $\alpha$ -defensin HD-5 は、酸化型と還元型どちらも *E.coli* に対しては同等の活性を示したものの、*S.saureus* に対する活性は野生型の構造を必要とするということが示されている。human neutrophil defensins HNP-1 の直鎖型変異体は、抗菌活性を保持していたが、酸化型の 10 分の 1 の活性であったということが示されている。また、還元型の human  $\beta$ -defensin 2 の膜透過処理能力は、野生型のものより低いものであり、分子内ジスルフィド結合が抗菌活性を示すのに必要だということが示されている。最後に、カプトガニから単離された抗菌ペプチドである tachyplesin は、直鎖化することで活性が低下するということが示されている。

抗菌ペプチドの分子内ジスルフィド結合の重要性に関する研究の多くは、動物由来の抗菌ペプチドを対象にしたものが多く、植物由来抗菌ペプチドについてはあまり報告がない。以前、当研究室でアメリカヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)種子から分離・精製されたアメリカヤマゴボウ種子由来抗菌ペプチド (*Pa*-AMP1)は真菌やグラム陽性菌、グラム陰性菌などの細菌に対して幅広い抗菌・抗真菌作用を示す。 $\beta$ シート構造を示す抗菌ペプチドで、分子内に 6 つのシステイン残基をもち、これら全てが分子内ジスルフィド架橋を形成している (Fig.2)。また、*Pa*-AMP1 は他の多くの植物 Defensin 型抗菌ペプチドと同様にキチン吸着ドメインを持っている。*Pa*-AMP1 等、植物 Defensin 型抗菌ペプチドのような、分子内に多くのジスルフィド結合をもつ抗菌ペプチドは、生産するのが難しくコストがかかることから、実用化が困難であると考えられている。

抗菌ペプチドの実用化に向けて、より高収量で、高い活性を持った抗菌ペプチドの開発を目的とし、本研究では、アメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*)種子由来抗菌ペプチド (*Pa*-AMP1)の 6 つのシステイン残基全てを除去した直鎖型変異体(*Pa*-C.omit)を発現・精製し、諸性質を調べた (Fig.3)。

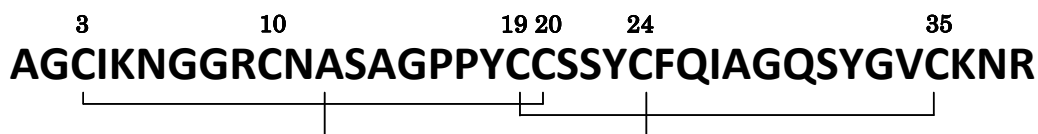


Fig.2 *Pa*-AMP1 の配列とジスルフィド結合の位置

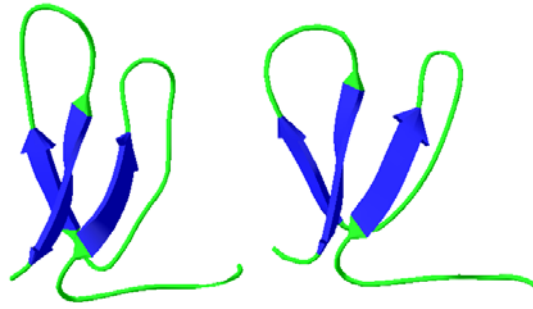


Fig.3 Pa-AMP1(左)を鋳型にした Pa-C.omit(右)の立体構造モデル

## 2. 材料と方法

### 2.1 使用菌株

#### (1) 発現宿主 大腸菌

発現用 vector の増幅、及び目的タンパク質発現には *E.coli* JM109 株を使用した。

#### (2) 糸状菌

*Fusarium oxysporum cucumerium* NBRC 6384 は National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center (NBRC)から譲渡していただいたものを使用した。*Geotrichum candidum* NBRC 4597 は鹿児島大学農学部植物病理学研究室より譲渡していただいたものを使用した。

#### (3) 病原性細菌

*Lactococcus lactis subsp.lactis* (NBRC 12007), *Streptococcus mutans* (NBRC 13955), *Clavibacter michiganensis* (NBRC 13763), *Enterobacter cloacae* (NBRC 12935), *Salmonella enterica* (NBRC 12529), *Pectobacterium carotovorum* (NBRC 14082)は、National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center (NBRC)より分譲していただいたものを使用した。

### 2.2 native Pa-AMP1

Pa-AMP1 は、以前当研究室で精製されたものを使用した。

### 2.3 Pa-AMP1 cDNA

Pa-AMP1 cDNA 及びプライマーは、以前当研究室で決定したアミノ酸配列をもとに、大腸菌における使用頻度の高いコドンを用いて設計し、シグマジェノシス社に依頼し作成した (Fig.4)。

```

gct ggt tgc atc aag aat ggt ggt cgt tgt
A   G   C   I   K   N   G   G   R   C
aac gcg agt gca ggt ccg ccg tac tgt tgt
N   A   S   A   G   P   P   Y   C   C
tct agc tat tgt ttc caa atc gct ggt caa
S   S   Y   C   F   Q   I   A   G   Q
tcc tac ggt gtc tgc aaa aac cgt
S   Y   G   V   C   K   N   R

```

Fig.4 The synthetic DNA sequence of *Pa*-AMP1 and corresponding amino acid sequence.

## 2.4 *Pa*-AMP1 の発現系の構築

作成した *Pa*-AMP1 cDNA を鋳型として、5'末端側に BamH1 認識部位を含む Forward primer と 3'末端側に EcoR1 認識部位を含む Reverse primer を用いた PCR により *Pa*-AMP1 の Insert cDNA を増幅した。PCR には TOYOBO 社製、KOD<sup>+</sup>を用いた。primer 及び反応条件は以下に示す(Table 1)。

Table 1. Primer set

Primer name	Sequence
Forward primer	5'-AGAGGATCCGCTGGTTGCATCAAG-3'
Reverse primer	5'-AGGAGAATTCTTA <u>ACGGTTTTTGCAGA</u> -3'
太文字部：制限酵素消化部位 下線部：終止コドン	

## 2.5 組換えタンパク質の発現と精製

### (1) 組換えタンパク質の発現

*E.coli*(JM109)を前培養:シングルコロニーを 5ml の LB 培地で 37°C一晩振とう培養した。1L の LB 培地に 1ml 前培養液を加え、OD<sub>600</sub>=0.5~0.8 に達するまで 37°Cで振とう培養を行った。最終濃度 0.5mM IPTG を加え 16h, 27°Cで発現の誘導を行った。この培養液を遠心分離(3500 ×g, 20min.,4°C)で集菌した。

### (2) 組換えタンパク質の精製

回収した菌体を wet cell weight 1mg あたり 10mg の 1×PBS に完全に懸濁し、懸濁液を 30ml ずつ水中にて超音波処理(Intensity 7、15min.)により大腸菌の膜破碎を行った。超音波処理により懸濁液が半透明になったところで超音波処理を終了し、遠心分離(12000rpm、20min.、4°C)により上澄みを回収した。その後、Glutation S-sepharose 4B カラムで融合タンパク質を回収

し、Thrombin 消化、キチンカラムおよび逆相 HPLC により精製した。

## 2.6 発現抗菌ペプチドの諸性質決定

### (1) SDS-PAGE による分子量測定

Tricine SDS-PAGE は Schgger 等の方法に従い、4% stacking gel、10% spacer gel、16.5% resolving gel で行った。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。また、タンパク質マーカーには Sigma 社の SDS-PAGE molecular weight marker を用いた。

### (2) 飛行時間型質量分析計 MALDI-TOF MS による質量分析

抗菌ペプチドの質量分析は Perseptive Biosystems 社の Voyager DE-RP, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS)を用いて行った。マトリックスには、50% MeCN、0.1% TFA を含む 10mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid を用いた。抗菌ペプチドサンプルが 1000pmol/ $\mu$ l になるよう希釈し、サンプル：マトリックスを 1：9 の割合で混合した。このサンプルを計測プレート上で完全に風乾し、計測を行った。

### (3) CD スペクトル解析

円二色分散計 (J-820、日本分光株式会社)、ペルチェ式恒温キュベットホルダー (PTC-423L 日本分光株式会社)、分光光度計用キュベット (合成石英、光路長 0.2mm) を使用し 20°C で測定した。

### (4) 抗菌活性測定

96well のマイクロタイタープレートに、糸状菌または細菌をそれぞれ 2000spore/well、 $1 \times 10^6$ cfu/ml になるように培地で希釈した溶液を 80  $\mu$ l 添加した。これに連続 2 倍希釈で濃度勾配をつけたペプチド溶液を 20  $\mu$ l 加え、30°C で 24 時間培養した。培養後、マイクロプレートリーダー (InterMed 社 ImmunoMini NJ-2300) を用いて、490nm における吸光度で濁度を測定し、生育阻害率を算出した。ペプチド溶液の代わりに滅菌水を加えたものをコントロールとし、以下の計算式に基づいて生育率を百分率で算出した。抗菌活性は、濃度依存曲線から、微生物の成長を 50% 阻害する濃度 IC50 値を求めた。

算出式：生育率(%) =  $A_{490}(\text{peptide}) / A_{490}(\text{control}) \times 100$

## 3. 結果

### 3.1 組換えタンパク質の発現と精製

#### (1) 組換えタンパク質の発現

Fig.5 に示したように、形質転換した *E.coli* JM109 株を用いて目的蛋白質の過剰発現を行った結果、目的タンパク質が発現していることが分かった。

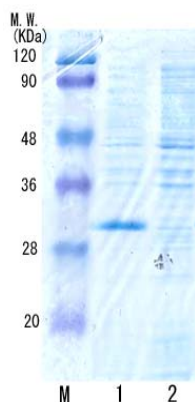


Fig.5 *E.coli* JM109 pGEX-*Pa*-AMP1 の total protein のグリシン SDS-PAGE

M : protein molecular weight marker

1 : IPTG 誘導した *E.coli* JM109 の total protein

2 : IPTG 誘導していない *E.coli* JM109 の total protein

## (2) 組み換えタンパク質の精製

目的蛋白質の精製を行うために、発現誘導を行った形質転換大腸菌株由来の可溶性画分を、Glutathion Sephalose 4B column に供し、カラム内で thrombin による消化を行った。消化後、C18 RP-HPLC カラムに供し単一に精製を行った(Fig.6)。得られた目的ペプチドを *Pa*-C.omit とした(Fig.7)。

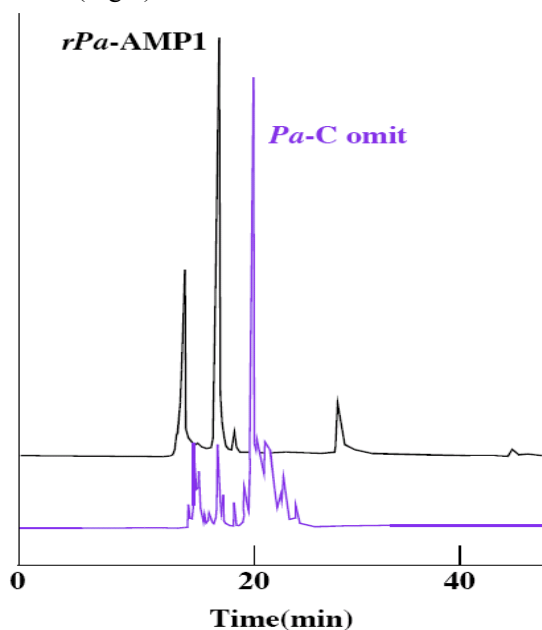


Fig.6 Reverse-phase HPLC column chromatogram.

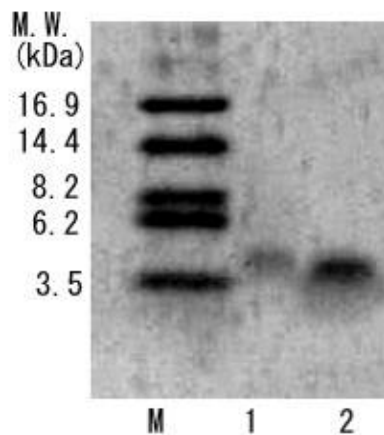


Fig.7 精製した *Pa-C.omit* の Tricine SDS-PAGE

M : protein molecular weight marker

1 : r*Pa-AMP1*

2 : *Pa-C.omit*

### 3.2 発現抗菌ペプチドの諸性質決定

#### (1) 発現 *Pa-C.omit* の分子量の確認

目的ペプチドである *Pa-C.omit* の MALDI-TOF-MS による分子量の測定を行った結果、*Pa-C.omit* の計算上の分子量と一致した(Fig.8)。

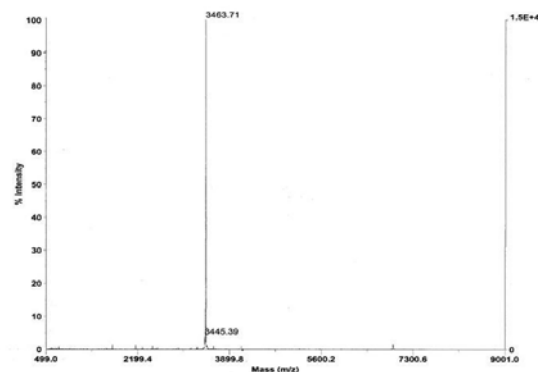


Fig.8 MALDI-TOF-mass spectra of purified *Pa-C.omit*.

#### (2) 2次構造解析

*Pa-AMP1* と r*Pa-AMP1*、*Pa-C.omit* の CD スペクトルの測定を行った(Fig.9)。

r*Pa-AMP1* や *Pa-AMP1* は親水環境でも疎水環境でも  $\beta$  シート構造を保持していたが、*Pa-C.omit* は、環境により構造が変化していた。50% TFE における各ペプチドのスペクトルを用い2次構造解析を行ったところ、*Pa-C.omit* は *Pa-AMP1* や r*Pa-AMP1* と比較して、 $\beta$  シート構造や  $\alpha$  ヘリックス構造などの規則正しい構造が減少していることが示唆された。(Table 2)



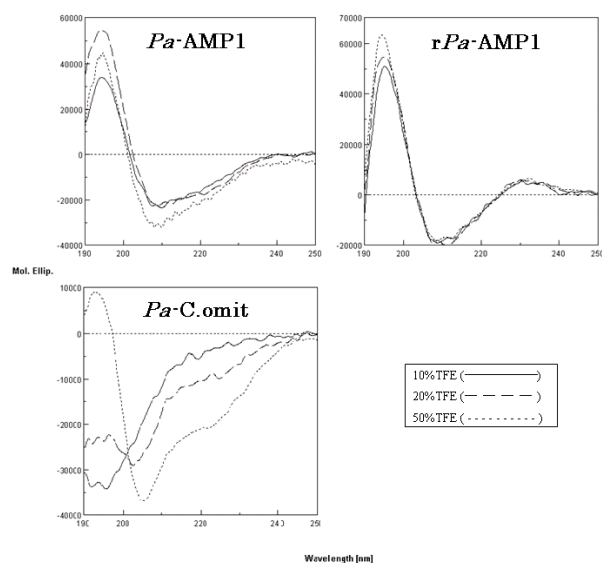


Fig.9 circular dichroism spectra of peptides.

Table 2. Secondary structure content of peptides by circular dichroism in 50%TFE.

	<i>Pa-AMP1</i>	<i>rPa-AMP1</i>	<i>Pa-C.omit</i>
ヘリックス(%)	<b>66.5</b>	<b>72.5</b>	<b>25.3</b>
シート(%)	<b>32.8</b>	<b>17.8</b>	<b>0</b>
ターン(%)	<b>0</b>	<b>9.7</b>	<b>7.9</b>
ランダム(%)	<b>0.7</b>	<b>0</b>	<b>66.8</b>

### (3) 抗菌活性測定

*Pa-C.omit* の抗菌活性を各種病原性真菌、細菌に対して測定した。抗菌活性は、試験菌の成長を 50%阻害する濃度を IC50 として評価した。*Pa-C.omit* の IC50 濃度は Table 3 に示したとおり、*Pa-AMP1* とほぼ同等の力価を示した。

Table 3. Antimicrobial activity of *rPa-AMP1*

Micro-organisms		IC50(μM)		
		<i>Pa-AMP1</i>	<i>rPa-AMP1</i>	<i>Pa-C.omit</i>
<i>Fungi</i>	<i>F.oxysporum</i>	0.6	0.5	1.7
	<i>G.candidum</i>	1	0.5	2.3
<i>Gram-positive</i>	<i>L.lactis</i>	1	0.7	1
	<i>S.mutans</i>	1.5	1.3	1.7
	<i>C.michiganensis</i>	1.5	1.2	2.2
<i>Gram-negative</i>	<i>E.cloacae</i>	1.4	1	1.9

<i>S.enterica</i>	1.6	0.8	1.4
<i>P.carotovorum</i>	0.8	0.8	2.5

#### (4)キチン結合能の確認

*rPa-AMP1*、*Pa-C.omit* ともに溶出画分に目的ペプチドのバンドが見られ、キチン結合能を保持していることが示された(Fig.10)。

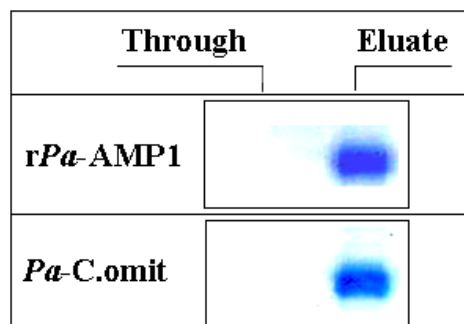


Fig.10 SDS-PAGE analysis of chitin binding capability.

#### 4. 考察

構築した発現系を用い、*rPa-AMP1* 及び *Pa-C.omit* を可溶性ペプチドとして産出することができた。*rPa-AMP1* と *Pa-C.omit* の最終精製物の収量は、それぞれ 0.6mg/1L、2mg/1L であった。この収量の違いは、システイン残基を除去することで、封入体の形成を抑えられたためだと考えられる。キチン吸着ドメイン内にあるシステイン残基も除去してある *Pa-C.omit* も、*Pa-AMP1* と同様にキチン結合能を保持しており、真菌に対する抗菌活性にもあまり大きな影響が見られなかった。そのため、*Pa-AMP1* においてキチン吸着ドメインは、あまり重要ではないのかもしれない。

以前、当研究室で *Pa-AMP1* は分子量 4000Da ほどの小さなポアを形成するということが示されていることから、*Pa-AMP1* は「barrel-steave」「toroidal」モデルのようなポアを形成し、*Pa-C.omit* は「carpet」モデルのように膜に結合し負荷を与え、膜破壊を誘発していると考えられる。

CD スペクトル測定の結果、*rPa-AMP1* は *Pa-AMP1* と同様に、親水環境でも疎水環境でも  $\beta$  シート構造を保持していた。一方、*Pa-C.omit* は、親水環境でランダムコイル、疎水環境で規則的な構造( $\alpha$  ヘリックス構造)を示しており、*Pa-AMP1* の構造とは異なっていた。また、*Pa-C.omit* をトリプシン消化後に SDS-PAGE 分析を行ったところ、バンドの消失が見られ、*Pa-C.omit* はプロテアーゼ耐性を持っていないことが示唆された(data not shown)。これらのことから、*Pa-AMP1* のジスルフィド結合は構造安定性やプロテアーゼ耐性など、*Pa-AMP1* の安定性を保持する役割があると考えられる。*Pa-AMP1* のように種子に多く含まれる抗菌ペプチドは、貯蔵ペプチドとして安定性を保つためにジスルフィド結合により構造を強固にして

いるのかもしれない。

*Pa*-AMP1 においてジスルフィド結合は、構造を安定化するのに必要だが、抗菌活性を示すのには必要がないということが示された。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費助成をして頂いた公益社団法人 サンケイ科学振興財団に深く御礼申し上げます。

## 6. 参考文献

1) Yeaman M.R, Yount N.Y: Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 27-55.

2) 村上康洋

鹿児島大学農学部生物資源化学科生分子機能学講座 平成 17 年度修士論文

3) Yuji M, Shinichiro H, Fumio Y, Kenjiro T: Isolation and some properties of the antimicrobial peptide(*Pa*-AMP) from the seeds of pokeweed(*Phytolacca Americana*). *Biosci, Biotechnol, Biochem* 1998; 62(10): 2076-2078.

4) Ayyalusamy R, Sathiah T, Anmin T, Kiran G, Sreeja S, Deborah L.H, Florence Y.P.A, Charles E.S: Deletion of All Cysteines in Tachyplesin I Abolishes Hemolytic Activity and Retains Antimicrobial Activity and Lipopolysaccharide Selective Binding. *Biochemistry* 2006; 45: 6529-6540

5) Peng W, Jeong K.B, Hak J.K, Jin K.K, Yangmee K, Song Y.S: Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides* 2009; 30: 2144-2149

6) A. Gururaj R: Conformation and Antimicrobial Activity of Linear Derivatives of Tachyplesin Lacking Disulfide Bonds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999; 361: 127-134

7) Jonathan R.L, Bayard R.H, Bernard W, Samuel H.G: Design of Non-Cysteine-Containing Antimicrobial  $\beta$ -Hairpins: Structure-Activity Relationship Studies with Linear Protegrin-1 Analogues. *Biochemistry* 2002; 41: 12835-12842

8) Timothy D, Alan J.W, Mei H: Peptide-lipid interactions of the  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptide

tachyplesin and its linear derivatives from solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1758: 1285–1291

9) Agnes H, Benoit O, Charlotte C, Abdelmajid N, Wilfrid D, Gilles J, Caroline L, Milen M, Stephane C, Jean M.S, Stephane C, Xavier S, Erick J.D, Marc B, Bertrand G, Patricia C: Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides* 2010; 31: 58–66

10) Sylvia S.L.H, Alan W, Hye J.Y, Yoon C, Leonie T: Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *Eur. J. Biochem* 1996; 240: 352-357

11) Gang H, Yong H.S , Ya L.T, Guo W.L: The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides* 2009; 30: 1421–1427.

12) Cheng P, Chunxia D, Qiaomin H, Chunyu X, Jindong Z: The hydrophobic surface of *PaAMP* from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal membrane lipids and the antifungal activity. *FEBS Letters* 2005; 579: 2445–2450

**Expression and characterization of the linear analog of *Pa*-AMP1  
from the seeds of pokeweed.**

Yuji MINAMI

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University  
1-21-24, Korimoto, Kagoshima, Japan  
Tel/Fax +81-99-285-8632; E-mail : minami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

Antimicrobial peptides are important components of the host innate immune responses by exerting broad-spectrum microbicidal activity against pathogenic microbes. *Pa*-AMP1 found in the pokeweed seeds has the chitin-binding ability, and the chitin-binding domain was conserved in knottin-type and hevein-type antimicrobial peptides. The recombinant *Pa*-AMP1 and *Pa*-C.omit (linear analog of *Pa*-AMP1) were expressed in *Escherichia coli* and purified to study the antimicrobial activity of its. The yields of r*Pa*-AMP1 and *Pa*-C.omit were 0.6mg/1L and 2mg/1L, respectively. The *Pa*-C.omit had the chitin-binding ability completely, and its antimicrobial activities were nearly identical to that of native and recombinant one. The CD spectra of *Pa*-C.omit was random coil structure in an aqueous environment but was partially  $\alpha$ -helix structure in a hydrophobic environment. It was suggested that the mechanism of action of *Pa*-C.omit is different with that of *Pa*-AMP1 and r*Pa*-AMP1.