ラクトフェリンのジャガイモそうか病菌に対する抗菌作用のメカニズム解明

中村正幸

鹿児島大学農学部食料生命科学科植物病理学研究室
〒890-0065 鹿児島市郡元１－２１－２４
TEL:099-285-8683

要旨

本研究では、多機能性タンパク質であるラクトフェリン(LF)のジャガイモそうか病菌(*Streptomyces scabiei*)に対する抗菌効果の調査とそのメカニズム解明を行った。その結果、牛由来 LF に高い抗菌効果が認められ、本効果は生育抑制ではなく、殺菌効果であることが分かった。抗菌メカニズムとしては、牛由来 LF のN末端側に位置するラクフェリシン B (LFcinB)領域が、*S. scabiei* の細胞壁に電気的に結合することで、LFcinB 内のトリプトファンが細胞膜破壊を引き起こし、抗菌効果を生み出していることが予想された。

1. 緒言

ラクトフェリン(LF) (Fig. 1)は、哺乳類の乳、涙液、唾液、血液等に含まれ、抗菌作用、免疫促進作用，抗がん作用、創傷治癒促進効果などの多くの機能を持つ多機能性タンパク質である [1-3]。LF の抗菌効果については、医学細菌に関する研究報告が多数あり [4-6]、植物病原体に関しても、*Tobacco mosaic virus*[7], *Pseudomonas syringae* [8]、*Fusarium graminiearum*[9]など各種病原体に対する抗ウイルス効果および抗菌効果が報告されている。しかし、これまで医学細菌も含め放線菌に対する LF の抗菌効果の報告はない。そこで、本研究では、本国でも問題となっている放線菌の 1 種であるジャガイモそうか病菌に対する LF の抗菌作用についての調査とそのメカニズム解明を行った。

ジャガイモそうか病は、アメリカ、インド、アジア、アフリカなど世界各地で発生している重要病害であり、日本でも主要なジャガイモ産地である北海道、長崎県、鹿児島県で大きな問題となっている。本国では、*Streptomyces scabiei*、*S. turgidiscabies*、*S. acidiscabies* の 3 種の発生が認められていが [10,11]。本研究では、いずれの地域でも分布が確認されている *S. scabiei* に対する LF の抗菌効果について調査を行った。

2. 材料と方法

2.1 菌株の培養

ジャガイモそうか病菌 *S. scabiei* S58 株の胞子形成には、STA 培地 (デンプン 10g、スクロース 1g、酵母エキス 1g、$NaNO_3$ 0.1g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、KH_2PO_4 01g、寒天 15g、蒸留水 1000ml)を用い、1 週間以上培養したものから胞子の採取を行った。

2.2 抗菌試験

試験には牛由来およびヒト由来 LF(和光純薬株会社)、ラクトフェリシン B (LFcinB)および牛由来 LF 加水分解物を用いた。また、ペプチド(RRWQWR、RRWQRR、RRRQRR、RRWWWR)は、メルク株式会社(シグマ)に合成を依頼し、試験に用いた。

抗菌試験には、TSB 培地 (BD Difco)を 12 ウェルプレートに 1ml ずつ分注し、それぞれの抗菌物質を各濃度で添加した。胞子の濃度は、各ウェルに 2×10^5 個/ml になるように添加し、プレートは 28℃で 72 時間保温後、菌体の増殖量を吸光度計(OD600)で計測した。

2.3 LFcinB と mCherry の融合タンパク質発現

25 アミノ酸から成る LFcinB は、長鎖プライマーの LfcinB-F (AAGGAGATATACATATGTTCAAATGCCGCCGTTGGCAGTGGCGTATGAAAAAACTGGGTG) と LfcinB-R (GGTGGTGGTGCTCGAGGAACGCGCGACGCACGCAGGTAATAGACGGCGCACCC AGTTT)を用いてお互いをアニールさせ合成した。赤色蛍光タンパク質mCherryのコード領域は、pmCherry (Takara Bio)を鋳型にプライマー mCherry-pET23-F (AAGGAGATATACATATGGTGA GCAAGGGCGAGGAGGA) と mCherry-LFcinB-B (ACGGCGGCATTTGAACTTGTACAGCTC GTCCATGC)で増幅した。LFcinBは、mCherry と 連 結 さ せ る た め mCherry-LFcinB-C (GACGAGCTGTACAAGTTCAAATGCCGCCGTTGGCA) と LfcinB-pET23-R (GGTGGTGGTGCTC GAGGAACGCGCGACGCACGCAGG)で増幅し、mCherry断片とfusion PCRにより連結した。連結させた断片を発現ベクターpET23にIn-Fusion cloning kit (Takara Bio)で挿入した。得られた発現ベクターは大腸菌BL21(DE3)に導入し、LFcinB-mCherry融合タンパク質を発現させ、発現タンパク質は、Caputurem His-Tagged Purification Kit (Takara Bio)を用いて精製した。

3. 結果と考察

3.1 牛由来LFとヒト由来LFの*S. scabiei*に対する抗菌効果

牛由来LFは*S. scabiei*に対し、0.1mg/mlの濃度で高い抗菌効果を示し、1mg/mlでは完全に生育を抑えた(Fig. 2a)。一方、ヒト由来LFは、牛由来LFと比較し 、抗菌効果が低く、1mg/mlでもその効果は僅かであった(Fig. 2b)。

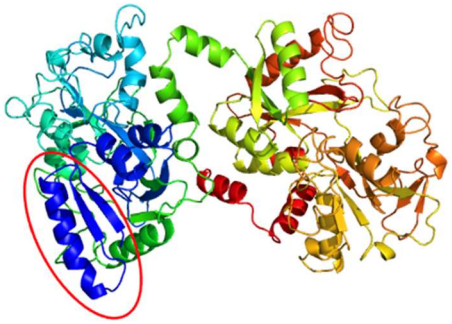


Fig. 1 Protein structure of bovine-derived lactoferrin (PDB ID: 1BLF). Lactoferricin B is circled.

次に、本抗菌効果が生育抑制効果であるのか、殺菌効果であるのかを明らかにするため、まず、LFの鉄結合能が生育に与える影響を調査した。LFは高い鉄結合能を持ち、微生物のシデロフォアによる鉄の取り込みを阻害することで、生育を抑制することが知られている[12]。そこで、鉄が結合していないアポ型LFと鉄結合が飽和状態にあるホロ型LFを用いて、*S. scabiei*に対する抗菌効果を調査したところ、効果に全く差がなかったことから(Fig. 3)、LFの鉄結合能は抗菌効果に関与していないことが分かった。そこで、*S. scabiei* に対し牛由来LF(1mg/ml)を作用させ、経時的にコロニーの形成数を計測したところ、作用5時間後には、コロニー形成数が1/3程度に減少し、48時間後には、ほとんどコロニーが形成されなくなった(Fig. 4)。以上の結果から、LFの*S. scabiei*に対する効果は、生育抑制ではなく、殺菌効果であることが分かった。また、牛由来LFの*S. scabiei*に対す

る最少殺菌濃度は、0.3mg/mlであった(Fig. 5)。

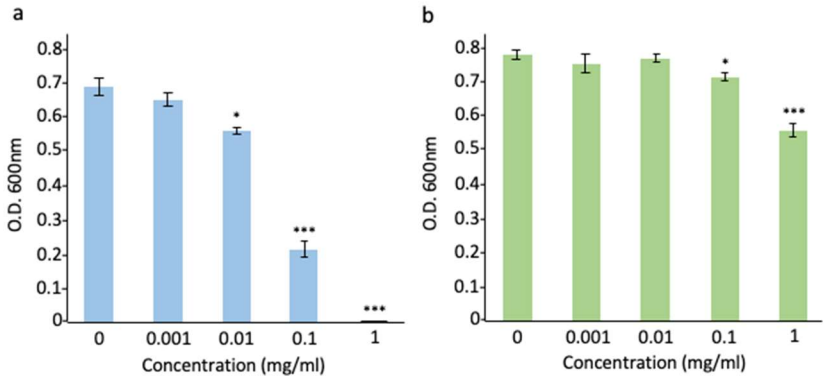


Fig. 2. Antimicrobial activity of bovine-derived lactoferrin (a) and human-derived lactoferrin (b) against *S. scabiei*. **p*>0.05 ****p*>0.001

牛由来LFとヒト由来LFに抗菌効果の差が見られた理由として、鉄結合能が関与していなかったことを考え合わせると、両者のアミノ酸配列の相同性が69%であることから、31%の違いが影響していると考えられる。LF内には、抗菌作用を示すLFcin (Fig. 1)やLFampinの様なペプチド領域の存在が知らており[13,14]、LFcinB(牛由来)とLFcinH(ヒト由来)の相同性は、39%とさらに低い。この違いが抗菌効果の差を生んでいる可能性を考え、次の実験では、LFcinBを用いた抗菌効果の実験を行った。

3.2　LF加水分解物とLFcinBの*S. scabiei*に対する抗菌効果

ペプチドでの*S. scabiei*に対する抗菌効果を調べるために、牛由来LFをペプシンで加水分解した物とその中に含まれるLFcinBを精製したものを用いて試験を行った。その結果、LF加水分解物では、0.1mg/mlで完全な抗菌効果が認められ(Fig. 6a)、LFcinBは、さらに低い濃度の0.01mg/mlでも完全な抗菌効果を示した(Fig. 6b)。以上の結果から、牛由来LFの*S. scabiei*に対する抗菌効果は、ペプチド単位で関与していることが明らかとなった。LFcinBは、25個のアミノ酸から成り、LFのN末端側に位置し、タンパク質の表面に露出していることから(Fig. 1)、LFそのものでも効果を示すと考えられる。LFcinBの抗菌効果には、内部に存在する6アミノ酸から成るRRWQWR領域が関わっているとする報告があり[15]、特にW(トリプトファン)が細胞膜の破壊に重要であることが言

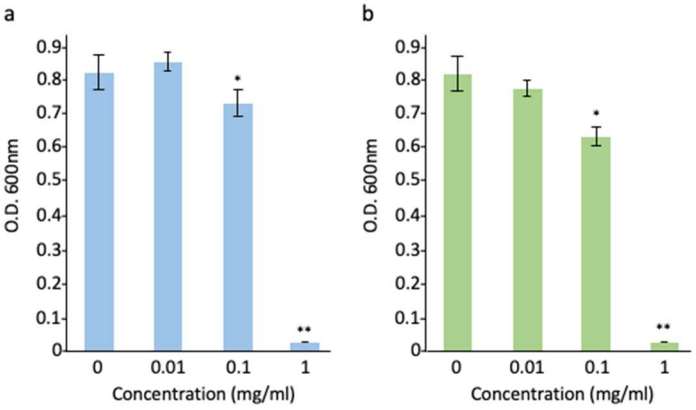


Fig. 3. Antimicrobial activity of apo-lactoferrin (a) and holo-lactoferrin (b) against *S. scabiei*. **p*>0.05 ***p*>0.01

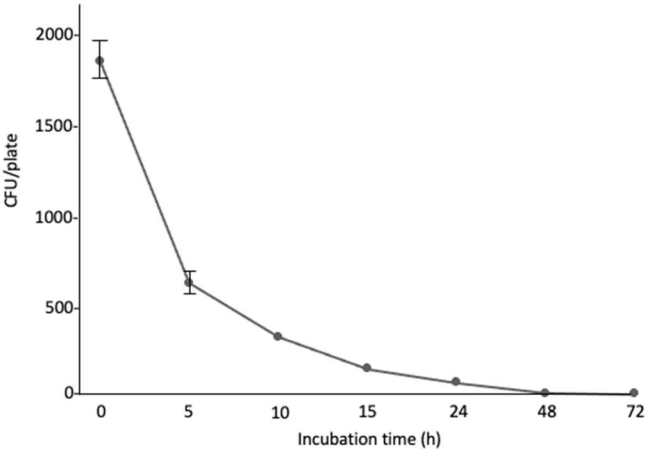


Fig. 4. Bactericidal activity of bovine lactoferrin against *S. scabiei*.

われている。そこで、次の実験では、この6アミノ酸の配列をベースに、Wの数を変えたペプチドを合成し、抗菌効果の調査を行った。

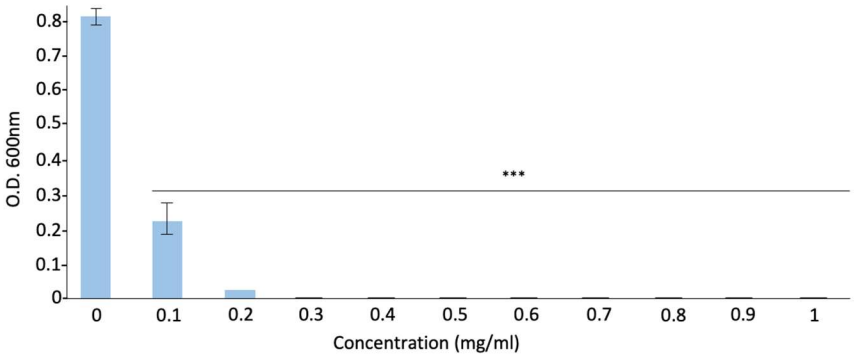


Fig. 5. Minimum inhibitory concentration of bovine lactoferrin against *S. scabiei*. ***p>0.001

3.3 合成ペプチドの*S. scabiei*に対する抗菌効果

本実験では、LFcinB内に存在するRRWQWRの Wの数を変えたペプチド、RRWQRR、RRRQRR、RRWWWRを合成し、それぞれの合成ペプチドの*S. scabiei*に対する抗菌効果を調査した。その結果、Wを全く含んでいないRRRQRRは、完全に抗菌作用を消失し、Wを3つに増やしたRRWWWRは、オリジナルの配列であるRRWQWRよりもより高い抗菌効果を示すことが分かった(Fig. 7)。以上の結果は、Wが*S. scabiei*に対する抗菌効果に極めて重要な役割を果たしていることを示している。細胞膜の破壊には、Wに存在するインドール環が関わっていると予想されている[16,17]。グラム陽性細菌の細胞壁は、タイコ酸とリポタイコ酸が主要成分となっており、いずれも負に帯電している。R(アルギニン)は、正に帯電しており、Wは正にも負にも帯電していない。つまり、正に帯電したRが負に帯電している細胞壁に結合することで、それと同時にWが細胞膜へ届き、Wのインドール環が細胞膜に穴を開けると考えられる。今後は、RをA(アラニン)などに置換したAAWWWAの抗菌効果を見ることでRの役割がより明らかになると思われる。

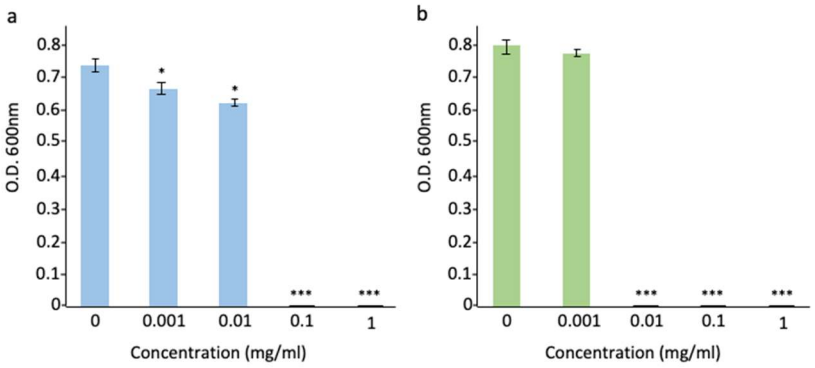


Fig. 6. Antimicrobial activity of lactoferrin hydrolysate (a) and lactoferricin B (b) against *S. scabiei*. *p>0.05 ***p>0.001

3.4 LFcinBの*S. scabie*細胞壁への結合能

上記の研究結果から、ペプチドの細胞壁結合が、抗菌効果に重要であることが推察された。そこで、本実験では、LFcinBのC末端側に赤色蛍光タンパク質であるmCherryを結合させた融合タンパク質を大腸菌で発現させ、*S. scabiei*の細胞壁への結合能を調査した。LFcinB-mCherryを*S. scabiei*の偽菌糸に直接作用させたところ、瞬時に偽菌糸が赤色に発光する様子が観察された(Fig. 8)。mCherryのみでは偽菌糸は全く発光しなかったことから、LFcinBが*S. scabiei*の細胞壁に結合したことを示している。

LFcinB- mCherryを添加した直後に発光し始めたことから、やはり正に帯電したRが負に帯電している細胞壁に対し、電気的結合を起こしたと考えられる。

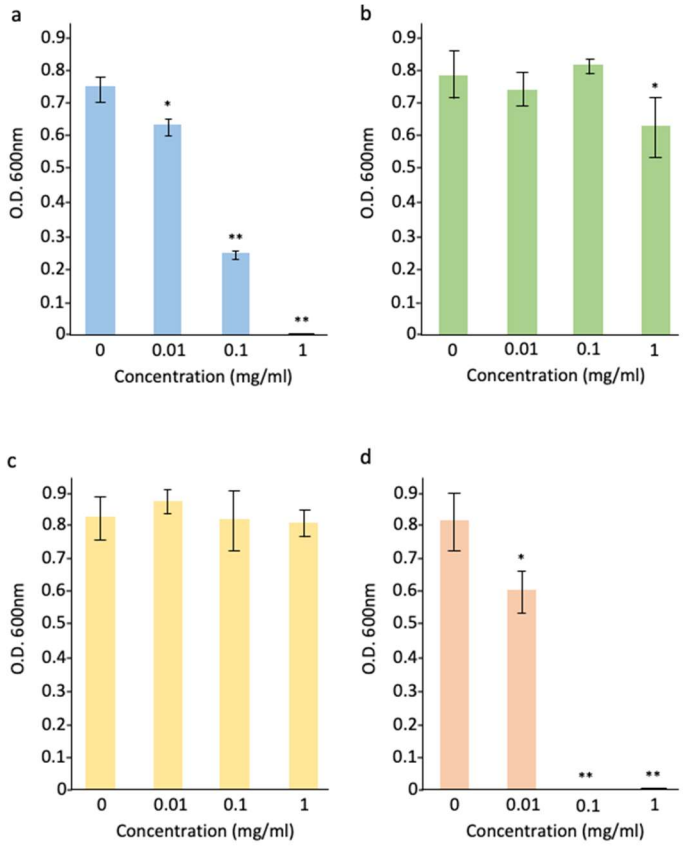


Fig. 7. Antimicrobial activity of synthesized peptides RRWQWR (a), RRWQRR (b), RRRQRR (c) and RRWWWR (d) against *S. scabiei*. **p*>0.05 ***p*>0.01

4. 結論

牛由来LFは、*S. scsbiei*に対し高い抗菌効果を示し、その効果は殺菌効果であった。抗菌メカニズムとしては、LFのN末端側に位置するLFcinBが電気的に*S. scsbiei*の細胞壁に結合することで、LFcinB内のW(トリプトファン)が細胞膜を破壊することが考えられた。

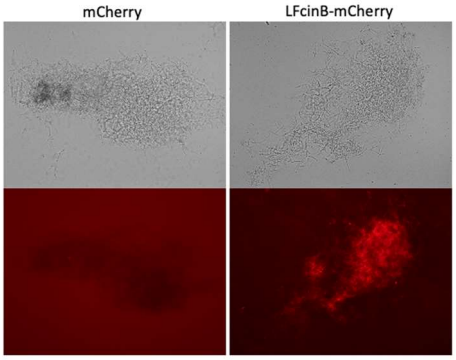


Fig. 8. *S. scabiei* cell wall-binding assay using lactoferricin B-mCherry fusion proteins.

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、*S. scabiei* S58株を分譲していただいた鹿児島県農業開発総合センターの西八束博士、LFおよびLFcinBを提供していただいた鹿児島大学農学部食品科学研究室の宮田健博士に深謝申し上げます。

6. 引用文献

1. Gibbons JA, Kanwar JR, Kanwar RK. (2018) Correction to: Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. BMC cancer 18:749
2. Cutone A, Rosa L, Lepanto MS, Scotti MJ, Berlutti F, di Patti MCB, Musci G, Valenti P. (2017) Lactoferrin Efficiently Counteracts the Inflammation-Induced Changes of the Iron Homeostasis System in Macrophages.

Front Immunol 8:705
3. Takayama Y, Aoki R. (2013) Roles of lactoferrin on skin wound healing. Biochem Cell Biol 90:497-503
4. Chan C, Andisi VF, Ng D, Ostan N, Yunker WK, Schryvers AB. (2018) Are lactoferrin receptors in Gram-negative bacteria viable vaccine targets? BioMetals 31:381-398
5. Andreotti CS, Baravalle C, Sacco SC, Lovato M, Pereyra EAL, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE. (2017) Characterization of immune response in *Staphylococcus aureus* chronically infected bovine mammary glands during active involution. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 54:51-60
6. Rybarczyk J, Kieckens E, Vanrompay D, Cox E. (2017) In vitro and in vivo studies on the antimicrobial effect of lactoferrin against *Escherichia coli* O157:H7. Vet Microbiol 202:23-28
7. Wang J, Wang HY, Xia XM, Li PP, Wang KY. (2013) Inhibitory effect of esterified lactoferin and lactoferrin against tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco seedlings. Pestic Biochem Physiol 105:62-68
8. Fukuta S, Kawamoto K, Mizukami Y, Yoshimura Y, Ueda J, Kanbe M. (2012) Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. Plant Biotechnol 29:383-389
9. Lakshman DK, Natarajan S, Mandal S, Mitra A.(2013) Lactoferrin-derived resistance against plant pathogens in transgenic plants. J Agric Food Chem 61:11730-11735
10. Miyajima K, Tanaka T, Kuninaga S. (1998) *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 48:495-502
11. Tashiro N, Manabe K, Saito A, Miyashita K. (2012) Identification of popato scab-causing *Streptomyces* sp. occurring in strongly acidic soils in Saga Prefecture in Japan. J Gen Plant Pathol 78:353-359
12. Ostan NKH, Moraes TF, Schryvers AB.(2021) Lactoferrin receptors in Gram-negative bacteria: an evolutionary perspective. Biochem Cell Biol 99:102-108
13. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J Appl Bacteriol 73:472–479
14. van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV. (2004) Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. Peptides 25:177–183
15. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J Appl Bacteriol 73:472–478
16. Bi C, Wang C, Ma L, Sun Y, Shang D. (2013) Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action. J Appl Microbiol 115:663-672
17. Haug BE, Svendsen JS. (2001) The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide. J Pept Sci 7:190-196

Antimicrobial activity and mechanism of action of lactoferrin against the potato common scab pathogen

Masayuki Nakamura
Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

In this study, the author investigated the antibacterial effect of lactoferrin (LF), a multifunctional protein, against the potato common scab pathogen, *Streptomyces scabiei* and elucidated the mechanism. As a result, a high antibacterial effect was observed in bovine-derived LF, and it was found that this is a bactericidal effect. As an antibacterial mechanism, it was predicted that the lactoferricin B (LFcinB) region located on the N-terminal side of bovine-derived LF electrically binds to the cell wall of *S. scabiei*, causing cell membrane disruption by tryptophan present in LFcinB.