

学位論文要旨

氏名 横山 勢也

題目 ソテツ種子由来抗菌ペプチドの構造と抗菌活性に関する研究
(Studies on antimicrobial activity and structure of antimicrobial peptides from the seeds of *Cycas revoluta*)

抗菌ペプチドは様々な病原菌の感染に対する自己防御として機能する重要な物質である。これらは動物、植物、微生物など様々な原料より単離され、特徴付けが行われている。植物由来の抗菌ペプチドは動物由来の抗菌ペプチドの Defensin family と類似した一次構造、アミノ酸配列を示すことから、Plant defensin family と呼ばれる。抗菌ペプチドの作用機作の分子メカニズムはまだ不明瞭なままである。本研究では、新規抗菌ペプチドをソテツ種子より単離・精製を行い、分子メカニズムを研究するために変異体の作成を行った。

- (1) 新規抗菌ペプチド Cy-AMP1、Cy-AMP2 および Cy-AMP3 をソテツ(*Cycas revoluta*)種子より単離・精製を行った。各々の分量は Cy-AMP1 が 4583.2 Da、Cy-AMP2 が 4568.9 Da、Cy-AMP3 が 9275.8 Da であった。Cy-AMP1 および Cy-AMP2 においては、二つの一次構造は類似していた。Cy-AMP3 は lipid transfer proteins (LTP) と高い相同性を示した。Cy-AMP1 および Cy-AMP2 は植物病原性菌の成長 50% 阻害濃度は 7.0~8.9 $\mu\text{g/ml}$ と強い抗菌活性を示したが、Cy-AMP3 は弱い抗菌活性しか示さなかった。Cy-AMP1 および Cy-AMP2 は、構造的特徴から plant defensin family の新規タイプであると考えられる。
- (2) Cy-AMP1 の発現系構築のために、Cy-AMP1 の 44 アミノ酸配列をコードする cDNA を pGEX-4T1 Vector に導入し pGEX-CyAMP1 expression vector を構築した。最終収量は、湿重量 10g の大腸菌より約 1mg の recombinant Cy-AMP1 (rCy-AMP1) を得た。2次構造を比較したところ、rCy-AMP1 と Cy-AMP1 は同様の構造を示した。また、抗菌活性においても同等の活性を示した。
- (3) キチン結合能と抗菌活性の関係を調べるために、Cy-AMP1 の変異体作成を行った。変異体 Cy-AMP1 はキチン結合能を完全に無くしており、その抗真菌活性は著しく低下していた。しかしながら、抗細菌活性においては、同等の活性を示した。この結果により、抗真菌活性においてキチン結合能は重要な役割を果たしていることと示唆される。

本研究において、ソテツ種子中に新規抗菌ペプチド Cy-AMP1 および Cy-AMP2、nsLTP family に属する Cy-AMP3 の存在を確認した。加えて、抗真菌活性においてキチン結合能が重要な役割を果たしており、抗真菌活性と抗細菌活性は作用機作において違いがあることを示した。キチン結合能を有する抗菌ペプチドの抗真菌活性において、抗菌ペプチドと真菌表面のキチンが結合することが活性機作の初期相互作用であると考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Seiya Yokoyama
題 目	Studies on antimicrobial activity and structure of antimicrobial peptides from the seeds of <i>Cycas revoluta</i> (ソテツ種子由来抗菌ペプチドの構造と抗菌活性に関する研究)

Antimicrobial peptides are important substances functioning of self-defense against infection by various pathogens. They are isolated from various sources of animals, plants, and bacteria, and have been characterized. Plant antimicrobial peptides having primary structures similar to those of the defensin family, most of which are found in animals, are called the plant defensin family. One of the actions of Antimicrobial peptides is thought to exert their activity through destruction of the cell membrane of infections pathogens, but the molecular mechanism still remains unclear. In this study, the novel antimicrobial peptides well purified from cycad seed and it were constructed mutants to investigate the molecular mechanism.

(1) Novel antimicrobial peptides (AMP), designated Cy-AMP1, Cy-AMP2, and Cy-AMP3, were purified from the seeds of cycad (*Cycas revoluta*). They had molecular masses of 4583.2 Da, 4568.9 Da and 9275.8 Da on MALDI-TOF MS analysis, respectively. Cy-AMP1 and Cy-AMP2 had similar sequence. The sequence of Cy-AMP3 showed high homology to various lipid transfer proteins (LTP). For the Cy-AMP1 and Cy-AMP2, the concentrations of peptides required for 50% inhibition (IC_{50}) of the growth of plant pathogenic fungi, Gram-positive and -negative bacteria were 7.0 to 8.9 $\mu\text{g/ml}$. The Cy-AMP3 held feeble antimicrobial activity. The structural and antimicrobial characteristics of Cy-AMP1 and Cy-AMP2 indicated that they are a novel type of antimicrobial peptides belonging to *plant defensin family*.

(2) To construct Cy-AMP1 expression system, the gene encoding 44 amino acid sequence of Cy-AMP1 was cloned into pGEX-4T1 to construct a GST-fusion expression plasmid, pGEX-CyAMP1, which was transformed into *E.coli* BL21(DE3) for expression. The recombinant Cy-AMP1 (rCy-AMP1) was purified with the yield of approximately 1 mg from 10 g of wet weight cells. Circular dichroism (CD) spectrum of native Cy-AMP1 and rCy-AMP1 revealed that secondary structures of rCy-AMP1 in water solution had the same folding with that of native Cy-AMP1. Furthermore, rCy-AMP1 showed equivalent antimicrobial activity against plant pathogenic fungi and Gram-negative and -positive bacteria, compared with native Cy-AMP1.

(3) To investigate the relationship between chitin binding capability and antifungal activity, creation of mutant Cy-AMP1 was performed. The mutants of Cy-AMP1 lost chitin binding ability completely, and its antifungal activity was markedly decreased in comparison with native Cy-AMP1. However, the antimicrobial activities of the mutant peptides are nearly identical to that of native one. It was suggested that the chitin binding domain plays an essential role in antifungal, but not antimicrobial, activity of Cy-AMP1.

In this study, we showed the existence of new antimicrobial peptide, Cy-AMP1 and Cy-AMP2, and new *nsLTP*-like peptide, Cy-AMP3. In addition, it is suggested that the chitin binding capability of Cy-AMP1 plays a crucial role in its antifungal activity. The antifungal mechanism might be differing from the antibacterial mechanism. In the antifungal mechanism of antimicrobial peptide which have chitin binding capability, it is considered that binding to chitin at a fungus surface serves as first interaction of antifungal activity.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	横山 勢也
審査委員	主査 鹿児島 大学 八木史郎
	副査 鹿児島 大学 南 雄二
	副査 佐賀 大学 渡邊啓一
	副査 鹿児島 大学 杉元康志
	副査 佐賀 大学 光富 勝
審査協力者	
題 目	ソテツ種子由来抗菌ペプチドの構造と抗菌活性に関する研究 (Studies on antimicrobial activity and structure of antimicrobial peptides from the seeds of <i>Cycas revoluta</i>)
<p>本研究は抗菌ペプチドの機能の解明を試みたものである。抗菌ペプチドは動物、植物、微生物に広く分布し、免疫系をもたない生物においても防御系として働くことが知られている。また近年、抗生物質に対する耐性菌の増加が社会的な問題となっているが抗菌ペプチドは、抗生物質とは全く異なる作用で効果をもたらすため、こうした耐性菌に対する効果も期待され、かつ農業分野でも使用可能な物質であると言える。</p> <p>本研究では、ソテツ種子より新規抗菌ペプチドを精製し、その作用を明らかにするとともに構造を解明した。ついで発現系を構築し、活性をもつ抗菌ペプチドの生産の試みを行なった。さらに構造を改変した抗菌ペプチドを生産し、構造と機能の関係がどのように変化するかを検討した。詳細な研究結果は、以下のとおりである。</p> <p>1) ソテツ種子の胚乳部からタンパク質ペプチドを抽出し、SP-Cosmogelカラム、Mightysil RP-4カラム等を用いて抗菌活性をもつ3種のペプチドを精製し、それらをCy-AMP1, 2, 3と命名した。それぞれの収量は100gの胚乳から1mg、</p>	

0.75mg、0.67mgであった。3種のCy-AMPの構造をリジルエンドペプチダーゼ、アルギニルエンドペプチダーゼ酵素消化後、アミノ酸配列を決定した。

Cy-AMP1, 2は8個のシステインをもち構造上ほとんど同じで分子量は4583.2Daと4568.9Daであった。システインはジスルフィド結合をしていると判断される。これらの一次構造はこれまで報告されているHevein、Knottin型のplant defensinのどちらの特徴も併せ持ち、新規のdefensinと考えられた。Cy-AMP3は8個のシステインをもち分子量9275.8Daで植物の非特異的lipid transfer protein (nsLTP)と高い相同性を示した。いずれのペプチドも真菌、グラム陽性菌、グラム陰性菌の生育を阻害し、Cy-AMP1, 2では試みた8種の微生物の50%生育阻害濃度は6-8.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であった。Cy-AMP3は前2者と比較すれば1/30程度の活性しか示さなかった。

2) Cy-AMP1の発現系構築のために、Cy-AMP1の44アミノ酸配列をコードするcDNAをpGEX-4T1ベクターに導入しpGEX-CyAMP1発現ベクターを構築した。湿重量10gの大腸菌より得られたGST-Cy-AMP1をThrombin消化後、SP-Sepharose、Mightysil RP-4カラムで精製し1mgのrecombinant Cy-AMP1(rCy-AMP1)を得た。rCy-AMP1はN末端側に2残基アミノ酸が付加しているが、2次構造、抗菌活性ともにCy-AMP1と差は認められなかった。

3) HeveinやKnottinタイプと同様Cy-AMP1はキチン結合部位をもつが、この部分の抗菌活性における役割りが不明であった。そこで、31-42番目のいくつかのアミノ酸残基の変異体を作成しキチン結合能と抗菌活性の関係を検討した。変異体はいずれもキチン結合能を失い、抗真菌活性は低下したが、グラム陰性、および陽性菌に対する活性は上昇する場合も見られた。キチン結合能は抗真菌活性において重要な役割を果していた。

本研究においてソテツ種子より新規抗菌ペプチドCy-AMP1, 2およびnsLTPに属するCy-AMP3の存在を確認し、裸子植物においても抗菌ペプチドが含まれることを明らかにした。そのうちCy-AMP1の発現系の構築から変異体を作成し、抗真菌活性がキチン結合能と関連しており、抗真菌活性と抗細菌活性が作用機作の上で違いがあることを示した。本論文は抗菌ペプチドの今後の利用についての基礎的知見を与えるもので、博士(農学)の学位として十分な価値があると判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	横山 勢也
審査委員	主査 鹿児島 大学 八木史郎
	副査 鹿児島 大学 南 雄二
	副査 佐賀 大学 渡邊啓一
	副査 鹿児島 大学 杉元康志
	副査 佐賀 大学 光富 勝
審査協力者	
実施年月日	平成 21 年 7 月 31 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
(<input checked="" type="radio"/>) 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年7月31日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行なった。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	横山勢也
<p>(質問1) 抗菌ペプチドのゲノム情報はどうなっているか？また、長い遺伝子がプロセッシングされて発現するのか。</p> <p>(解答1) 抗菌ペプチドの遺伝子情報に関する論文は、ほとんどない。mRNA についての報告が僅かながらある程度である。</p> <p>(質問2) 今回単離したソテツ種子抗菌ペプチドの特徴と、類似した構造を持つペプチドの報告はあるのか。</p> <p>(解答2) ソテツ種子 Cy-AMP 1 および 2 に相同性を示すようなペプチドはデータベース検索では見つからなかった。また、今回のペプチドは、分子内に CC の連続配列を N 端側と C 端側に 2 つ持つという点でも、新規ペプチドであると考えている。</p> <p>(質問3) 提唱されている 3 つの作用機作モデルにおいて、抗菌ペプチドはいずれも分子同士で重合して細胞膜に潜り込む。その場合、SS 結合の架替えが分子間で起こるのか。</p> <p>(解答3) 分子間での SS 結合の架替えは起こらないと考えている。ある程度量的にペプチドが集まると、分子同士が重合し膜に潜り込むのではないか。また、膜表面には、様々な多糖が存在するので、単なる膜との相互作用だけでなく、β-グルカンなどの糖との相互作用もあるのではないかと考えている。</p> <p>(質問4) Cy-AMP1 とキチン結合能と抗菌活性との関係については、どう考えるのか。</p> <p>(解答4) 今回はキチン結合能を消失すると、抗真菌活性が低下したが、それがどのようなメカニズムによるものかについては分からない。</p> <p>(質問5) キチン結合に関与する 4 つのアミノ酸の部位特異的変異体は劇的にキチン結合能が低下しているが、それぞれの変異体でキチンへの結合能に差があるのか。</p> <p>(解答5) 結合能の差はあるかもしれない。今回の実験では、キチンに吸着させて一気に溶出しているので、結合能の差についてはグラジエントを架けるなどの操作により差が確認出来るかもしれない。今後の検討課題である。</p> <p>(質問6) 発現誘導後の可溶性画分には 2 本のメインバンドが見られる。何故、2 つのバンドが見られるのか。また、どちらが目的バンドか。</p> <p>(解答6) ストップコドンが上手く機能していない可能性が考えられる。しかし、分子量的には下のバンドが目的タンパク質だと考えている。また、スロンビン消化において、きちんと目的ペプチドが回収出来るので問題ないと考えている。</p> <p>(質問7) 各病原菌によって生育速度が違うが、どのようにして活性を測定しているのか。</p>	

(解答 7) 各病原菌によって生育速度が違うので、それぞれの菌について 24-48 時間と測定時間を変えている。

(質問 8) 抗菌活性を評価する上で、誤差を表に入れたほうが良いのではないか。そうすれば各菌における活性の差ははっきりするのではないか。

(解答 8) その通りだと思う。

(質問 9) キチン結合部位の部位特異的変異体において、確かに抗真菌活性は低下しているが、グラム陰性菌については活性が上がっているものがある。これは、どのような理由によると考えているか。また、測定誤差ではないのか。

(解答 9) グラム陰性菌への活性が上がっている理由については分からないが、少なくとも 3 回活性測定を行なってその平均値を算出している。各測定においてそれほど値が変わっていないので誤差とは考えていない。

(質問 10) 今回は pGEX ベクターを用いているが、他の発現系は試したのか。

(解答 10) pET、His-Tag および pMAL などのベクターを用いて、発現系の構築を試みたが、pET、His-Tag 系では発現が見られなかった。一方、pMAL では発現が確認出来たが、今回のような高収量は得られなかった。

(質問 11) キチン結合部位の Tyr 残基を Val または Asn に替えた理由は何か。また、Tyr 残基を Trp 残基に替えるとスタッキング力が上がると思うが、それは試したのか。

(解答 11) Val 残基は疎水度を考慮し、Asn 残基の場合は親水度を考慮して置換体を作成した。また、Trp 残基への置換体を作成したところ、活性およびキチン結合能に変化は見られなかった。

(質問 12) 活性測定時に、 β -グルカンを共存させた場合、競合阻害は起こるのか。

(解答 12) 今回の実験においては試していないが、もし競合がおこるとすれば非常に面白い。今後の検討課題である。

(質問 13) このペプチドの活性は、静菌なのか殺菌なのか。また、本当に膜に孔を開けているのか。

(解答 13) 静菌・殺菌どちらとも考えられる、しかし、蛍光物質内包リポソームを用いた蛍光漏出実験では、ペプチドを加えることでリポソームから蛍光が漏出してくるので、実際に膜に孔を開けていると考えられる。