

2P-241 米由来抗菌ペプチドのアミノ酸置換体の病原微生物に対する抗菌活性の比較

○高橋 清志, 中道 俊一, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
pfzzz2i3ik8jd3rzlent@yahoo.co.jp

【目的】当研究室では米の α -Amylase の部分配列である AmyI-1-18 ペプチドが、病原微生物に対して抗菌活性を発揮することを見出している。そこで、本研究では、本ペプチド中のアミノ酸の抗菌活性への寄与を明らかにするために、10 種類のアミノ酸置換変異体を化学合成し、それらの菌周病菌、ニキビ (アクネ) 菌、日和見感染真菌に対する抗菌活性を、それぞれ比較検討した。

【実験方法】本研究では、アラニンに置換した 5 種類の変異体、アルギニンに置換した 3 種類の変異体、およびロイシンに置換した 2 種類の変異体を化学合成した。また、菌周病菌 *Porphyromonas gingivalis*、ニキビ菌 *Propionibacterium acnes*、日和見感染真菌 *Candida albicans* などを被験菌として用いた。各ペプチドの抗菌活性は、生菌数に由来する ATP を測定することによって評価し、50% 増殖阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。

【結果】AmyI-1-18 ペプチド中の塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体の抗菌活性は、親ペプチド (AmyI-1-18) の場合に比べて、菌周病菌、ニキビ菌、日和見感染真菌のいずれの被験菌に対しても低下した。アルギニンに置換した変異体およびロイシンに置換した変異体の抗菌活性は、高くなる傾向が観察された。現在、それぞれの IC_{50} を算出し、抗菌活性の強さを比較検討中である。

Effect of substituting amino acids on antimicrobial activity of peptide derived from rice against pathogenic microorganisms.

○Kiyoshi Takahashi, Shun-ichi Nakamichi, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, amino acid-substitution, *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium acnes*

2P-243 米 α -アミラーゼ由来抗菌ペプチドのタンパク質合成阻害作用の解析

○福田 駿¹, 石山 洋平², 近藤 裕志¹, 落合 秋人¹, 田中 孝明¹, 谷口 正之¹
(¹新潟大・自然研, ²新潟大・人材教育セ)
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】抗菌ペプチドの作用機構として、これまでに「細胞膜の破壊」が提唱されている。また、細胞膜を破壊せずに「細胞内標的分子へ作用」して抗菌活性を発揮する抗菌ペプチドも報告されている。そこで本研究では、タンパク質合成阻害作用を解析するために、大腸菌の無細胞タンパク質合成系を用いたアッセイ系、および分子シャペロン DnaK と DnaJ によるフォールディングプロセスを用いたアッセイ系を開発した。これらのアッセイ系を用いて、当研究室で見出している米 α -アミラーゼ由来抗菌ペプチド (AmyI-1-18) の抗菌作用機構を解明することを目的とした。

【実験方法】大腸菌の無細胞タンパク質合成系として Rapid Translation System (RTS) を用いて、His-tagged Green Fluorescent Protein (GFP) を合成した。タンパク質の合成量は、成熟 GFP の蛍光強度を測定することによって評価した。また、転写ステップと翻訳ステップの阻害は、mRNA 合成量と SDS-PAGE における GFP のバンド強度をそれぞれ測定することによって評価した。さらに、グアニジン塩酸塩によって変性させたリソフェラーゼを DnaK と DnaJ によってフォールディングするアッセイ系に AmyI-1-18 を添加し、フォールディングステップに対する阻害作用を評価した。

【結果】開発したアッセイ系を用いた結果、AmyI-1-18 は翻訳ステップおよびフォールディングステップを阻害することによって、タンパク質合成を阻害することが明らかになった。

Inhibitory effect of an antimicrobial peptide (AmyI-1-18) derived from α -amylase of rice on protein synthesis.

○Shun Fukuda¹, Yohei Ishiyama², Hiroshi Kondo¹, Akihito Ochiai¹, Takaaki Tanaka¹, Masayuki Taniguchi¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., ²CFIL, Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, cell-free protein synthesis, GFP

2P-242 米 α -アミラーゼ由来抗菌ペプチドのヒト病原微生物に対する作用機構の解明

○中道 俊一
(新潟大・自然研)
mtaning@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】

当研究室では、米の α -Amylase (AmyI-1) の部分配列である 18 残基のアミノ酸からなるペプチド (AmyI-1-18) が、幅広い抗菌スペクトルを有することを見出している。そこで本研究では、本ペプチドのグラム陰性菌、グラム陽性菌、および真菌などの病原微生物に対する抗菌作用機構を解明することを目的とした。特に、本ペプチドの病原微生物の細胞膜に対する破壊作用と細胞膜透過性を中心に検討を行った。

【実験方法】

本研究では、病原微生物としてグラム陰性の菌周病菌 *Porphyromonas gingivalis*、グラム陽性のニキビ (アクネ) 菌 *Propionibacterium acnes*、および日和見感染真菌 *Candida albicans* を用いた。細胞膜への作用は、diSC₃₋₅ を用いた細胞膜脱分極アッセイ、Calcein-AM を用いた細胞膜損傷アッセイ、および核酸染色蛍光色素 (PI) を用いたフローサイトメトリーによって解析した。また、細胞膜透過性は、フローサイトメトリーを用いて FITC 標識 AmyI-1-18 の細胞内部移行を解析することによって評価した。

【結果】

各病原微生物に対する細胞膜への作用を検討した結果、AmyI-1-18 の細胞膜破壊作用は、ハチ毒のペプチドである Melittin と比べて弱いことがわかった。また、FITC 標識 AmyI-1-18 は、フローサイトメトリーによって細胞内部へ移行していることが示唆された。

Elucidation of action mechanism of an antimicrobial peptide derived from α -amylase of rice against human pathogens.

○shunichi Nakamichi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial, peptide, *Candida albicans*, propionibacterium

2P-244 米 α -アミラーゼ由来抗菌ペプチドとそのアミノ酸置換体の抗炎症作用の解析

○金子 陽徳, 田嶋 幸司, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】当研究室では米 α -アミラーゼ由来ペプチド (Amy I -1-18) が、抗菌作用や抗炎症作用などの生体防御機能を有することを見出している。そこで本研究では、本ペプチド中の各アミノ酸の抗炎症作用への寄与を明らかにするために、10 種類のアミノ酸置換変異体を化学合成し、リポ多糖 (LPS) 刺激によって誘導されるマクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生に対する抑制効果を検討した。また、これらのペプチドが有する LPS の作用を抑制する機構を解明するために、リムルステストを用いて各ペプチドと LPS の相互作用を解析した。

【実験方法】本研究では、18 残基のアミノ酸からなる AmyI-1-18 中の 1 残基のアミノ酸をアラニン、アルギニン、またはロイシンに置換した 10 種類の変異体を化学合成した。マウスマクロファージ細胞 (RAW264 細胞) をコンフルエントな状態まで培養した後、*Escherichia coli* 由来の LPS を 100 ng/ml とするように添加し、Griess 試薬を用いて産生される NO 量を測定した。また、本ペプチドのエンドトキシン中和活性を、リムルステスト (生化学工業 (株)) を用いて測定し、50% 有効濃度 (EC_{50}) を求めた。

【結果】アラニンに置換した変異体の抗炎症作用は、親ペプチド (Amy I -1-18) の場合に比べて低下する傾向が観察された。また、アルギニンに置換した変異体およびロイシンに置換した変異体の抗炎症作用は、高くなる傾向が観察された。現在、リムルステストを用いて各ペプチドの EC_{50} を算出し、LPS との相互作用を解析中である。

Elucidation of anti-inflammatory action of an antimicrobial peptide derived from α -amylase of rice and its amino acid-substituted analogs.

○Akinori Kaneko, Koji Tajima, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, anti-inflammation, nitric oxide