

1P-273 米タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性抗菌ペプチドの精製と同定

○川部 純弥, 亀田 光裕, 平塚 裕也, 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】これまでに米タンパク質由来の抗菌・抗炎症・創傷治癒作用を有する複数の生体防御ペプチドについて報告している。それらのペプチドに共通する特徴として、分子量が1,000~3,000 Daであること、正味の正電荷を有すること、等電点が8以上のカチオン性であることが挙げられる。そこで本研究では、米胚乳タンパク質を酵素加水分解し、等電点電気泳動によってカチオン性ペプチド画分を分離した。また、得られた画分の抗菌活性を測定し、活性を確認できた画分に含まれるペプチドを同定した。

【方法】プロテアーゼを用いて米胚乳タンパク質を加水分解し、ペプチドサンプルを調製した。得られたサンプルを、調製用等電点電気泳動装置 (BioRad, Rotofor) を用いて20の画分に分離した。各画分の菌周病菌、アクネ菌、日和見感染真菌などに対する抗菌活性を測定した。活性を検出できた画分から逆相クロマトグラフィーを用いてペプチドを精製し、各画分に含まれるペプチドをMALDI TOF-MSを用いて同定した。

【結果】米胚乳タンパク質を加水分解した後、等電点電気泳動によって20画分に分離した。用いた酵素の種類によって各画分のpHと収量が異なっており、各画分の抗菌活性も異なっていた。いくつかのカチオン性の画分に、強い抗菌活性が確認された。そこで、現在、それらの画分に含まれるペプチドを精製し、同定している。また、各画分の抗菌活性ばかりでなく抗炎症作用についても検討する予定である。

Purification and identification of cationic antimicrobial peptides from enzymatic hydrolysates of rice protein

○Jun-ya Kawabe, Mitsuhiro Kameda, Yuya Hiratsuka, Akihito Ochiai,
Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, rice endosperm protein, cationic peptide

1P-274 イネ由来組換えディフェンシンの調製とその機能の解析

○大堀 正裕¹, 金岡 巧¹, 落合 秋人¹, 提箸 祥幸², 田中 孝明¹,
谷口 正之¹
(¹新潟大・自然研,²農研機構・北農研)
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】各種生物由来のディフェンシンは、生体防御において重要な役割を有する低分子タンパク質である。このタンパク質は分子内に複数のジスルフィド架橋を含むことから、分解酵素や熱に対する高い耐性を有することがよく知られている。当研究室では、長い食経験を持つイネ (*Oryza sativa*) 由来ディフェンシン (Defensin) に着目した。本研究では、それらの一つである OsDef3 を組換え大腸菌を用いて調製し、その機能を解明することを目的とした。

【方法と結果】OsDef3の遺伝子を組み込んだ発現ベクターによって形質転換した大腸菌 Rosetta-gami B(DE3) pLysS 株 (農研機構より提供) を作製し、OsDef3の大量発現系を構築した。OsDef3の最適な発現条件を検討した結果、LB培地を使用して、16℃で48時間培養したときにOsDef3が最も高発現した。口腔内における病原性真菌 *Candida albicans* に対するOsDef3の抗真菌活性は、次のようにして測定した。まず、濁度 (OD₆₀₀) を0.01に調整した被験菌とOsDef3を含むPDB培地を、96穴マイクロプレートに100 μLずつ分注した。次に12~24時間培養後、OD₆₀₀を測定して抗真菌活性を評価した。抗真菌活性を測定した結果、OsDef3は *C. albicans* の増殖を濃度依存的に抑制した。50%生育阻害濃度 (IC₅₀) は5.47 μMであり、*C. albicans* の増殖を完全に抑制する最小発育阻止濃度 (MIC) は62.5 μMであった。また、100℃において加熱処理を10分間行なったOsDef3のIC₅₀は9.16 μMであり、加熱処理後も抗真菌活性は低下しないことがわかった。

Preparation of recombinant defensin from *Oryza sativa* and analysis of its functions

○Masahiro Ohori¹, Takumi Kanaoka¹, Akihito Ochiai¹, Yoshiyuki Sagehashi²,
Takaaki Tanaka¹, Masayuki Taniguchi¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., ²NARO Hokkaido Agr Res Cent)

Key words defensin, *Candida albicans*, antifungal activity, heat stability

1P-275 ペプチドの生体吸収を担う腸管輸送体 cePEPT1 の基質多選択性

○伊藤 圭祐¹, Vu Thi Tuyet Lan¹, 河合 駿², 本山 貴康³,
加藤 竜司³, 河原崎 泰昌¹
(¹静大院・薬食生命, ²名大院・創薬, ³不二製油)
sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp

【目的】プロトン共役型オリゴペプチド輸送体 (POT) を介したペプチドの生体吸収システムは全生物に保存されており、窒素源の高効率な取り込みに重要な役割を担っている。POTは8400種類のジ・トリペプチドや類似構造の各種医薬品を認識・輸送するユニークな“基質多選択性”を有するが、その詳細は不明な点が多い。そこで本研究では、生体吸収性に優れた食品・医薬品開発への基盤情報の取得を目的として、モデル動物 *Caenorhabditis elegans* の腸管へ発現する cePEPT1 について、基質多選択性を解析した。

【方法と結果】我々はハイスループット POT 解析システムを開発し、*Saccharomyces cerevisiae* Ptr2p の基質多選択性の全貌を明らかにした。本研究では、本システムを cePEPT1 へ適用した。cePEPT1 は蛍光性トレーサー基質である βAla-Lys (AMCA) を濃度依存的に輸送し、*K_m* 値は0.20 mMと算出された。338種類のジペプチドについて cePEPT1 親和性を解析した結果、*K_i* 値は0.047 mMから>2.0 mMまで幅広く分布しており、平均的なジペプチドの *K_i* 値は0.41 mMであった。基質親和性の傾向を解析した結果、cePEPT1 親和性の高いジペプチドには塩基性アミノ酸や芳香族アミノ酸が多く、低いジペプチドには酸性アミノ酸残基が多く含まれていることが明らかとなった。現在、多基質認識の分子メカニズムについて、詳細な解析を進めている

※ Ito* *et al. Nature Commun.* 2013

Substrate multispecificity of cePEPT1 from *Caenorhabditis elegans*

○Keisuke Ito¹, Lan Vu Thi Tuyet¹, Shun Kawai², Takayasu Motoyama³,
Ryuji Kato², Yasuaki Kawarasaki¹
(¹Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ³Fuji Oil Co., Ltd.)

Key words peptide, transporter, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*

1P-276 ABC トランスポーター EnkT による多成分バクテリオシン分泌機構の解明

○須志田 浩稔¹, 石橋 直樹¹, 善藤 威史¹, 園元 謙二^{1,2}
(¹九大院・農, ²九大・バイオアーク)
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

【目的】*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が有する ABC トランスポーター EnkT は、配列の異なる4種のバクテリオシン、enterocin NKR-5-3A、C、D、Z (Ent53A、C、D、Z) の菌体外分泌を担う (Ishibashi *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2014)。本研究は、EnkT による多成分バクテリオシン分泌機構の解明を目的とした。

【方法】*enkT* と *enkC* 及び *enkIc* (Ent53C) の構造遺伝子及び自己耐性遺伝子を導入したプラスミドを基に前駆体のリーダーペプチドに変異を加え、Ent53Cの分泌能を評価した。同時に、EnkT が本来分泌しない enterocin A (EntA) または lactococcin Q (LaqQ) の構造遺伝子と自己耐性遺伝子を *enkT* と共発現させ、分泌を試験した。また、*in vitro* での機能解析に向けて、*Escherichia coli* BL21 を用いた EnkT ペプチダーゼドメイン (PD) 及び Ent53C 前駆体 (pre-C) の発現系の構築と、GST タグによる精製を試みた。

【結果】リーダーペプチド C 末端から13番目の Lys、14番目の Glu が分泌に重要である一方で、他のアミノ酸配列と残基数は分泌に大きく影響しないことが示唆された。また、EntA 及び LaqQ の分泌が確認され、それぞれ固有のリーダーペプチドを Ent53C のものに置換した場合には分泌量が増加した。以上の結果から、EnkT はリーダーペプチドのアミノ酸配列と長さに限らず、前駆体のアミノ酸配列全体に対し高い寛容性を有し、Ent53C のリーダーペプチドは EnkT による基質認識に適した構造を有すると推測された。また、*E. coli* BL21 における GST-PD 及び GST-pre-C の発現と粗精製に成功し、*in vitro* での PD の酵素活性を確認した。

Elucidation of the secretory mechanism of multiple bacteriocins by an ABC transporter, EnkT

○Hirotooshi Sushida¹, Naoki Ishibashi¹, Takeshi Zendo¹, Kenji Sonomoto^{1,2}
(¹Fac. Agric., Kyushu Univ., ²Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, ABC transporter