

両生類皮膚由来機能性生体分子の網羅的探索

国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門

茂里 康

Twelve novel peptides (Pxt-1 - Pxt-12) were isolated from the skin of *Xenopus tropicalis* using topological mass spectrometry analysis. Among them, Pxt-8, Pxt-9, and Pxt-10 were N-terminus of Pxt-1, N-terminus of Pxt-3, and C-terminus of Pxt-11, respectively. The Pxt-3 and Pxt-11 peptides shared significant sequence homologies with magainin 1, 2 and levetide, respectively that were all isolated from *X. laevis*. Pxt-12 was identical to the *X. tropicalis* XT-6-like precursor previously isolated by ESI-MS/MS. None of the Pxt peptides contained any Cys, Asp, Tyr or Trp, while Ile, Leu and Lys were frequently found as typical frog-skin peptides. RT-PCR analysis confirmed the gene expressions of Pxt-2, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-5, Pxt-7 and Pxt-11 in *X. tropicalis* skin. Several ion peaks corresponding to all identified Pxt peptides, were observed with MALDI-MS analysis of *X. tropicalis* secretory fluids, collected after *in vivo* stimulation which suggested that Pxt peptides were definitely secretory molecules. Circular dichroism studies and the Schiffer-Edmundson helical wheel projections suggested that Pxt-5, as well as mastoparan, at least, could form a typical amphiphilic α -helix without a phospholipid or a membrane-mimetic solvent. Moreover, Pxt-2 showed growth inhibitory effects on both *E. coli* (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive), at MIC values of 50 and 9.7 ($\mu\text{g/ml}$), respectively. Measurements of dynamic light scattering and the surface tensions of Pxt peptides solutions suggested that both Pxt-2 and Pxt-5 could form associations as micelles and behave like a general surfactant, affording critical association concentrations (CAC) of 38.1 and 57.3 μM , with γ_{CAC} of 46.9 and 38.3 mN/m.

1. 緒言

両生類の代表格であるカエルは乾燥に弱いため、水辺等の湿った環境が生息の中心である。産卵場所は多様であるが、幼生はえら呼吸を行い、水中で生活している。成体になると肺呼吸を開始し、陸上の生活が可能となり、陸上・水中を行き来しながら生活している。このように陸上及び水中の両方の環境が生息に必要であるが、カエルツボカビ病をはじめとする感染症等により、近年生息数は激減している。

一方、生体適応・防御・内分泌系の観点から、カエルは絶好の研究材料として用いられてきた。陸上・水中の異なる生活環境を行き来することから、微生物等の攻撃に曝され易いと考えられる。その様な環境にも関わらず生き続けていることから、特殊な能力を保持していると考えられてきた。特にカエルは皮膚の分泌腺や毒腺が多いことから、これまで各種機能性分子(抗菌ペプチド等)が皮膚から単離されてきた。これらの機能性分子は、皮膚組織の破碎、抽出、バイオアッセイ、精製を繰り返し、単離、同定、遺伝子配列解読等が行われてきた¹⁾。一方1990年代になり新たな分析ツールとしてマトリックス支援レーザー脱離イオン化

質量分析計(MALDI-MS)やElectrosprayイオン化質量分析計(ESI-MS)が登場した。そこで、これら分析機器の応用を試行錯誤しているうちに、組織切片を用いMALDI-MSを行うと、細胞内分泌顆粒の中に存在しているペプチド等の生体成分を分子量プロファイルとして選択的に検出できることを見出し、「Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS)」と命名した²⁾。本手法は質量分析法を駆使し、バイオアッセイや余計な精製プロセス無しに機能性分子の単離を可能とした。その結果、希少な動物からの生体分子の単離や不安定な生体成分の分析が可能である。

そこで本申請において、両生類を代表するカエルの皮膚を用いて、Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS)を駆使し、ペプチド等の新規生体分子を網羅的に探索することを実施した。

2. 実験

2.1. カエル

実験に使用したカエル(トノサマガエル、ヌマガエル)については、大阪府池田市、箕面市周辺の田畑で捕獲した。またアマガエルについては、広島大学両生類研究施設 高瀬稔先生から供与して頂いた。ネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)は東京大学・産業技術総合研究所が維持しているNigerian系統を使用した。

2.2. Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS)

トリス緩衝液、リン酸緩衝液、生理食塩水など生化学



Global exploration of functional biomolecules from amphibian skin

Yasushi Shigeri

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Health Research Institute

や組織学の実験でよく使われる緩衝液は、MALDI-MSにおいて試料のイオン化を阻害する。一方、質量分析法で推奨されるギ酸や酢酸溶液を組織切片に応用すると、浸透圧の関係で細胞形態が維持できない。そこで切片調製法として、生理食塩水による凍結包埋を試みた。摘出した皮膚組織（カエル及びオタマジャクシ）を0.4%食塩水で凍結包埋し、 -20°C でクリオスタット（CM1850 cryostat, Leica Microsystems, Germany）を用い、 $30\sim 40\mu\text{m}$ の厚さの切片を作成した。作成した切片はMALDI-MS用サンプルプレートに置き、マトリックス溶液（ 10mg/ml CHCA in 50% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid）を添加した後、直ちに吸い取った。次にマトリックス溶液を再度添加し、真空下で素早く結晶化し、MicroflexAI mass spectrometer（Bruker Daltonics）を用い、リニア、ポジティブイオンモードでMALDI-MS測定を行った。

2. 3. ネットイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) 皮膚由来ペプチドのアミノ酸配列決定

前述の Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を用いて、得られた分子量を指標に、ネットイツメガエルの皮膚から、抽出、ゲル濾過クロマトグラフィー、HPLCによる精製、ESI-MS/MS解析、データベース検索 (<http://www.xenbase.org/genomes/blast.do>)、プロテインシークエンサーによるアミノ酸配列決定を行った。

ネットイツメガエルの皮膚を、クリオスタット (CM1850 cryostat) を用い $10\mu\text{m}$ にスライスした後、 50% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid 溶液で、 4°C 、5時間抽出を行った。その後上清を、 30% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid 溶液で平衡化した Superdex-30 カラムクロマトグラフィー (GE Healthcare, $500\times 3\text{mm}$ i.d.) で分離した。 $500\sim 3000\text{Da}$ の分子量の mid fraction をさらに逆相 HPLC (Gilson HPLC system, 東ソー, TSK gel ODS 120T, $5\mu\text{m}$ particle size, $250\times 4.6\text{mm}$ i.d.) で 0.1% trifluoroacetic acid を含む acetonitrile のグラジエントを用いて精製を行った。精製したフラクションは随時、MALDI-MS (MicroflexAI mass spectrometer) で分子量の確認を行った。また ESI-MS/MS 解析は、HPLC で精製したサンプル、あるいは精製したサンプルをトリプシン消化した物を使用し、LCQ Fleet (Thermo Scientific, MA) を用いて行った。LCQ Fleet には、LC-10 ADVP μ ポンプ (島津製作所) を使用して、 0.05 (ml/min) の流速で 50% acetonitrile + 0.1% formic acid 溶液でサンプルを負荷した。イオンスプレーの電圧は 5000V 、MS/MS の分析の際の衝突エネルギーは 30V で3価の前駆イオンの検出のために固定し、ポジティブイオンモードで測定を行った。プロテインシークエンサーは PPSQ-21 (島津製作所) を用い、常法であるエドマン分

解法で分析した。プロテインシークエンサー及び質量分析から得られたアミノ酸予想配列データは、データベース検索 (<http://www.xenbase.org/genomes/blast.do>) 及び (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を随時実施して、アミノ酸配列を確定した。

2. 4. 同定されたペプチドの固相合成

同定されたペプチドの性質解明のため、化学合成する事を試みた。ペプチドの化学合成は Fmoc 固相合成を利用し、PSSM8 自動ペプチド合成装置 (島津製作所) を用いて行った。合成ペプチドの精製は逆相 HPLC (Waters 600) を使用し、カラムは 5C18-AR-II (Cosmosil, nacalai tesque) を使用し、 0.1% trifluoroacetic acid に acetonitrile のグラジエントを用いて精製を行った。精製品の確認は MALDI-MS (MicroflexAI mass spectrometer) を用い、マトリックスは (10mg/ml CHCA in 50% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid) を使用した。

2. 5. 円二色性分散計 (Circular Dichroism, CD) を用いたペプチドの性質解明

同定されたペプチドの溶液中での二次構造を測定するために、日本分光円二色性分散計 J-820 を用いて測定を行った。合成ペプチドを 10mM Tris-HCl (pH 7.2) の緩衝液に $50\mu\text{M}$ の濃度に希釈し、光路長が 1mm の角型石英セルを用いた。測定条件のバンド幅は 1nm 、レスポンスは 4sec 、測定範囲は $190\sim 255\text{nm}$ 、データ取込間隔は 0.5nm 、走査速度は 20nm/min 、積算回数は4回に固定して測定した。測定温度は $10, 25, 37^{\circ}\text{C}$ の三つの異なる温度で測定を行った³⁾。

2. 6. 同定されたペプチドの抗菌及び溶血活性の測定

Escherichia coli DH5 α (グラム陰性) と *Staphylococcus aureus* JCM2151 (グラム陽性) を用いて同定されたペプチドの抗菌活性の測定を行った。まず 5ml の LB (Luria-Bertani's broth) 培地で 37°C 、15時間、 160rpm で前培養を行った。その後 $100\mu\text{l}$ の培地溶液を取り、本培養の培地 (5ml LB 培地) に植菌した。 37°C 、2~3時間、 160rpm で培養し、 $\text{OD}_{610\text{nm}}$ が 0.5 付近にまで培養した。その培養液を生理食塩水で 100 倍希釈し、その内 $50\mu\text{l}$ をあらかじめペプチドを希釈して $50\mu\text{l}$ ずつ入れてあった 96well plate に添加して 37°C 、24時間培養した。ペプチドは最終濃度 $150\mu\text{g/ml}$ の8段階の2倍希釈、最小濃度 $0.6\mu\text{g/ml}$ に調製した。培養後の生菌数はマイクロプレートリーダーを使用し、 $\text{OD}_{595\text{nm}}$ の吸光度で測定した。

ラットの全血に対する同定されたペプチドの溶血活性は、稲垣らの方法に従って行った⁴⁾。

2. 7. 同定されたペプチドの界面物性測定

固相合成したそれぞれのペプチドを約 15mg 測り取り、超純水 15ml を添加した後、弱く攪拌することにより溶解させた。次に、この水溶液を適宜希釈することによって、各種濃度のペプチド水溶液を得た。各種ペプチド水溶液の表面張力は、協和界面科学株式会社製の DropMaster500 を用いて、ペンダントドロップ法を用い、25 度で測定した。なお、この方法では、キャピラリーに形成させた液滴の形状を解析して、表面張力値を得るが、解析には Young-Laplace 法を用いた。

3. 結果・4. 考察

3. 1. ペプチドの配列決定

大阪府池田市、箕面市周辺の田畑で捕獲したトノサマガエル、ヌマガエル及び、広島大学両生類研究施設から供与して頂いたアマガエルの皮膚組織を用いて Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を実施した。その結果、トノサマガエルでは (1611.2, 2811.4, 3105.9, 3769.4, 4601.1, 5149.8, 5652.5, 6952.5,

7717.5 m/z)、ヌマガエルでは (2174.0, 4998.3 m/z)、アマガエルでは (1101.9, 1845.8, 2327.2, 3265.9, 4977.7, 6537.4 m/z) 等の分子イオンピークが検出された。しかしながらいずれの国産カエルもゲノム解析が行われておらず、それぞれのピークのアミノ酸配列を解析するのは困難が予想された。そこで、両生類で唯一ゲノム解析が完了しているネットアイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) (図 1)⁵⁾ の皮膚を用いて Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を実施することにした。

図 2 に示すように、ネットアイツメガエルのオタマジャクシ (tadpole, stage49-51) を用いて Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を行っても、有意な分子イオンピークはほとんど検出されなかった。

一般的にカエルから得られた抗菌ペプチド等の生理活性ペプチドは、成体に由来するものである⁶⁾。カエルの皮膚は幼生 (オタマジャクシ) と成体では大きく異なっており、皮膚腺 (顆粒腺) は変態が進まないと形成されない。そこで成体のネットアイツメガエルの皮膚組織を使用して、



Fig. 1 *Xenopus tropicalis*

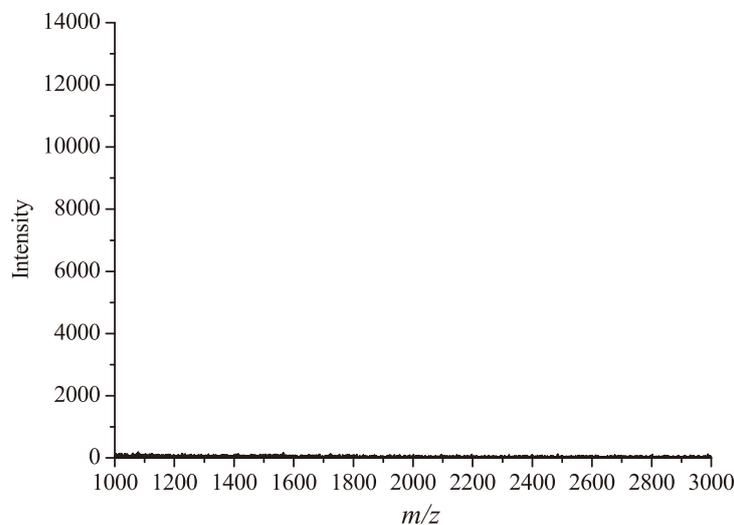


Fig. 2 Direct tissue MALDI-TOF MS spectrum of the hormones from the skin in *Xenopus tropicalis* tadpoles

Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) (リニア、ポジティブイオンモード) を行った。その結果、ネッタイツメガエルでは 1000 ~ 3000 付近の m/z に各種分子イオンピークが検出された(図3)。

次に Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) で得られた分子イオンピークを指標に、ネッタイツメガエルの皮膚から、有機溶媒による抽出、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex-30)、逆相 HPLC による精製、ESI-MS/MS 解析、データベース検索を実施した。その結果、Pxt-1, Pxt-2, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-5,

Pxt-7 の 6 つの新規ペプチドを同定した。また Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) とエドマン分解法を併用し、Pxt-6 の新規ペプチドを決定した。Pxt-6 についてはデータベース検索でもヒットしないことから、ゲノム解析でも DNA 配列が解読されていない配列であることが示唆された (Table1)。また RT-PCR を用いて、各ペプチドの遺伝子発現を検討したところ、顕著に皮膚に遺伝子発現が認められた。またネッタイツメガエルは、接触刺激等により粘性かつ泡状の分泌液を出すことが知られている。その分泌液を直接

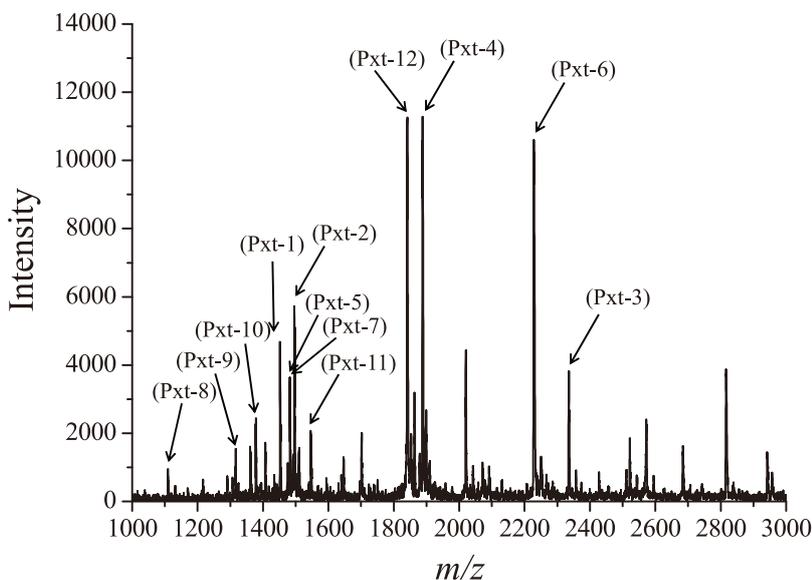


Fig. 3 Direct tissue MALDI-TOF MS spectrum of the hormones from the skin in *Xenopus tropicalis* adults

Table 1 Sequence, monoisotopic mass, and molecular charges of Pxtpeptides from *X. tropicalis* skin

Peptide	Sequence	Monoisotopic mass	Molecular charge at pH 7
Pxt-1:	<u>IRPIPIPRGGKT</u> -NH ₂	1449.8	3.0
Pxt-2:	FIGALLRPALKLLA-NH ₂	1493.9	2.0
Pxt-3:	<u>GLKEVAHSAKKFAKGFISGLTGS</u>	2332.2	3.0
Pxt-4:	LKGASKLIPHLLPSRQQ	1885.1	3.0
Pxt-5:	FIGALLGPLLNLLK-NH ₂	1479.9	1.0
Pxt-6:	IRPVFFPPVHAKKVFLPH	2225.2	3.1
Pxt-7:	Pyr-GLIGTLTAKQIKK-NH ₂	1479.9	3.0
Pxt-8:	<u>IRPIPIPR</u>	1107.6	2.0
Pxt-9:	<u>GLKEVAHSAKKF</u>	1313.7	2.0
Pxt-10:	<u>LMGTLISKQMKK</u> -NH ₂	1375.8	3.0
Pxt-11:	Pyr-GLMGTLISKQMKK-NH ₂	1543.8	3.0
Pxt-12:	NLLGSLKLTGLKVGSNLL-NH ₂	1839.1	2.0

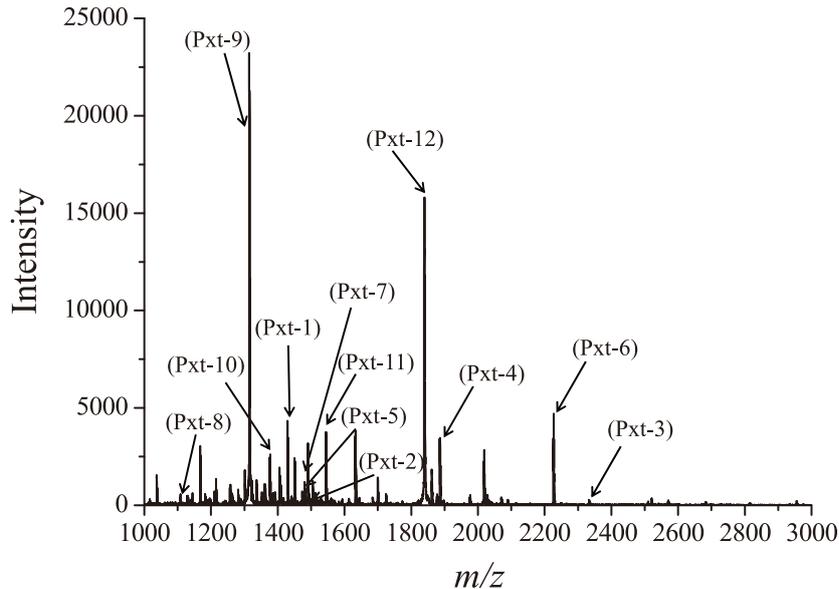


Fig. 4 MALDI-TOF MS spectrum of *Xenopus tropicalis* secretory fluids

MALDI-TOF MS で解析したところ、Pxt peptides が同様に検出出来た(図4)。つまり Pxt peptides は何れも分泌されていることが確認できた。

3. 2. 同定されたペプチドの固相合成

同定されたペプチドの固相合成は、Fmoc 固相合成法を使用した(PSSM8 自動ペプチド合成装置、島津製作所)。逆相 HPLC で精製後、MALDI-MS (MicroflexAI mass spectrometer) を用いて精製品の確認を行ったところ、ほぼ純品であることを確認した。

3. 3. 同定されたペプチドの2次構造解析

同定されたペプチド及び、比較のために、Pxt-5 の逆配列の ReversePxt-5、アフリカツメガエル皮膚より単離された抗菌ペプチドで有名な Magainin 1^{7,8)} 及びスズメバチ毒素の一種で典型的な両親媒性ペプチドである Mastoparan⁹⁾ を合成し、均一にまで精製した。これらのペプチドの二次構造解析を詳細に実施するために、円二色性分散計 J-820 (日本分光) を用いて測定を行った。その結果 Pxt-2 及び Pxt-5 は両親媒性のアルファヘリックスを形成することが判明した(data not shown)。

3. 4. 同定されたペプチドの抗菌活性測定

Escherchia coli DH5 α (グラム陰性・大腸菌) と *Staphylococcus aureus* JCM2151 (グラム陽性・黄色ブドウ球菌) の微生物を用いて、Pxt-1, Pxt-2, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-5, Pxt-6, Pxt-7, ReversePxt-5, Magainin 1, Mastoparan に対する抗菌活性を測定した^{10,11)}。その結果、Pxt-1, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-6, Pxt-7, Magainin 1 については、150 μ g/ml

の濃度まで微生物の生育阻害は認められなかった。また Pxt-5 については、培地に添加したところ顕著な沈殿が認められたことから、抗菌活性の測定は出来なかった。ただし、Pxt-5 は純水や Tris 等の緩衝液には溶解した。一方 Pxt-2 の大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する MIC (最小発育阻止濃度, Minimum Inhibitory Concentration) は 50 μ g/ml, 9.7 μ g/ml であった。また ReversePxt-5 は、150 μ g/ml の濃度まで大腸菌に対する生育阻害は認められなかったが、黄色ブドウ球菌に対する MIC は 150 μ g/ml であった。最後に Mastoparan については、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する MIC はそれぞれ、9.7 μ g/ml, 19.3 μ g/ml であった。またラット血球に関する溶血活性は 0.1% (Pxt-1), 0.4% (Pxt-2), 0.2% (Pxt-3), 0.1% (Pxt-4), 10.5% (Pxt-5), 0.3% (Pxt-6), 0.4% (Pxt-7), 0.3% (Pxt-11) であった。

3. 5. 同定されたペプチドの界面物性測定

同定されたペプチドの界面物性を測定するために、ペンダントドロップ法を用い、表面張力の測定を行った。その結果、Pxt-2, Pxt-5 及び ReversePxt-5 については、顕著な表面張力の低下が認められ、有力なバイオサーファクタントとして機能することが示唆された(図5, 6)。

5. 総括

今回両生類では唯一ゲノム解析されているネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の皮膚を使用して、Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) で解析を行った。その結果7種類の新規ペプチド (Pxt1, 2, 3, 4, 5, 6, 11) を発見し、その物理的特性及び生物

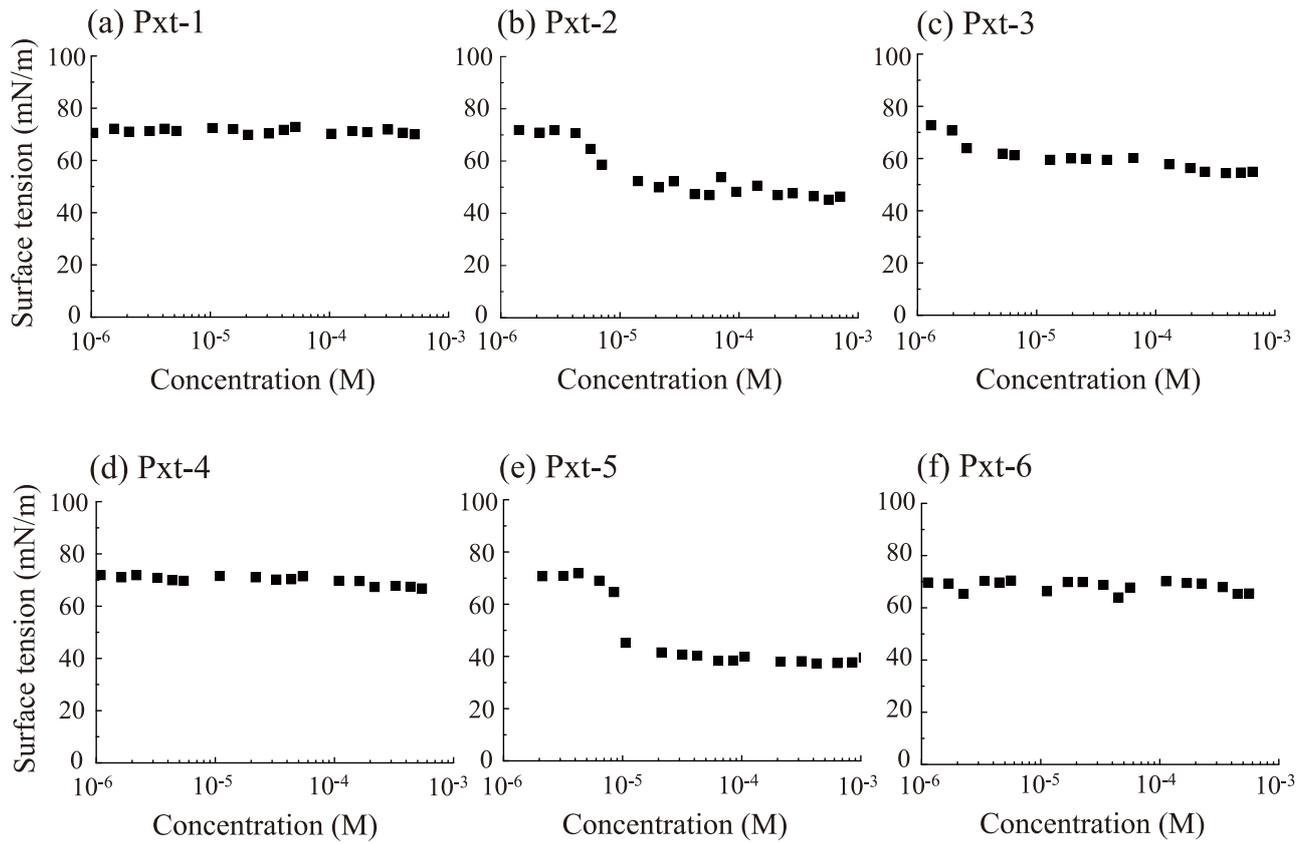


Fig. 5 Surface tension of Pxtpeptides (I)

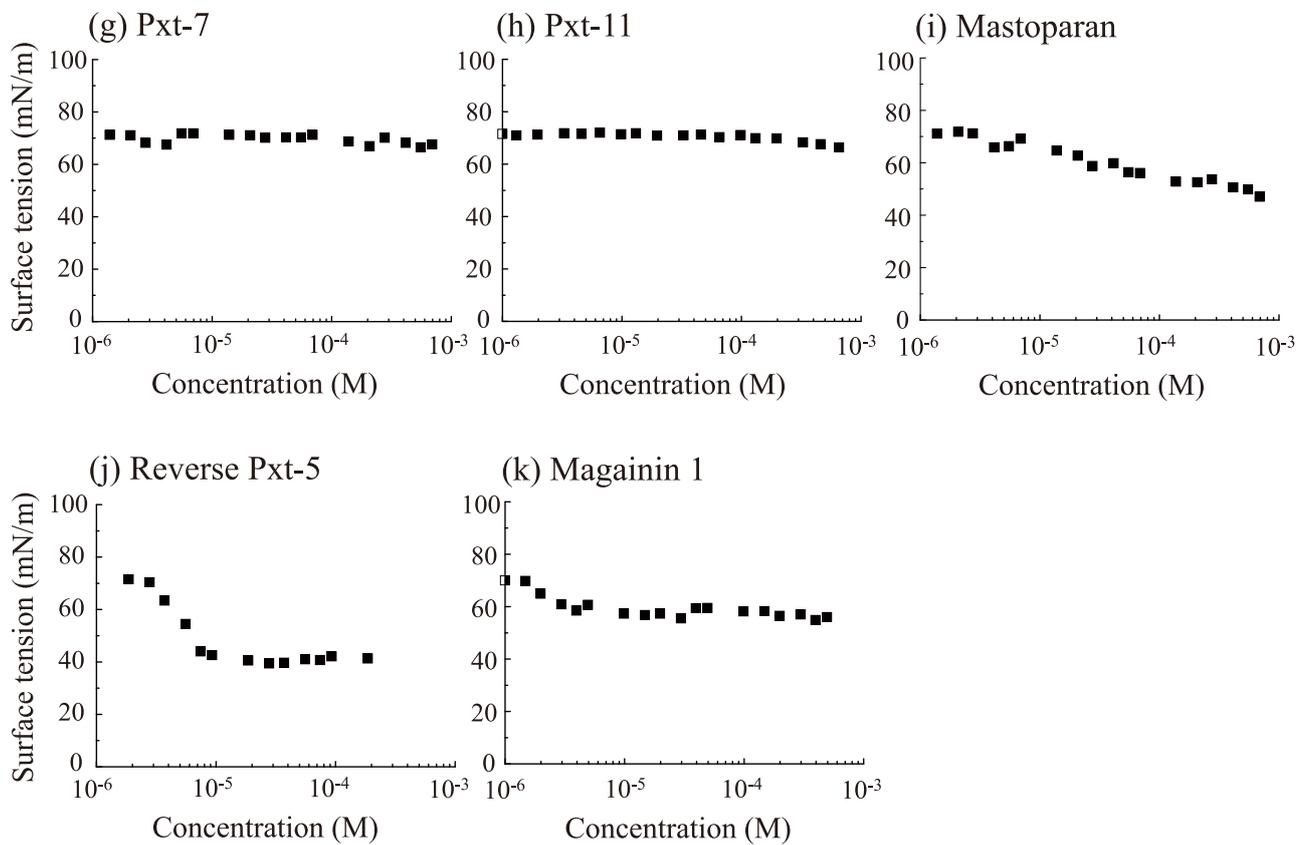


Fig. 6 Surface tension of Pxtpeptides (II)

学的な活性の測定を実施した。特にその界面活性剤としての特性や泡特性からスキンケア素材への可能性が示唆される。今後はどのような組織に発現されているか。またどのような生育時期から機能発現するのか、さらに物理特性を詳細に解析したいと考えている。本成果は文献 12 として印刷中である。

謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団に深く感謝します。

(引用文献)

- 1) Conlon M, Mechkarska M, King J.: Host-defense peptides in skin secretions of African clawed frogs (*Xenopodinae*, *Pipidae*), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 176, 513-518, 2012.
- 2) 安田明和, 茂里康: Topological Mass Spectrometry Analysisによる翻訳後修飾された脳下垂体ホルモンの分子多型の新発見, *生化学*, 84, 582-587, 2012.
- 3) Scholtz JM, Qian H, York EJ, Stewart JM, Baldwin RL.: Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water, *Biopolymers*, 31, 1463-1470, 1991.
- 4) Inagaki H, Akagi M, Imai H, Taylor R, Kubo T.: Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 428, 170-178, 2004.
- 5) Hellsten U, ほか 47 名: The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*, *Science*, 328, 633-636, 2010.
- 6) 岩室祥一: 抗菌ペプチドによる先天性生体防御機構と内分泌系の接点を探る, *比較内分泌学*, 35, 71-92, 2009.
- 7) Zasloff M.: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two forms and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5449-5453, 1987.
- 8) Zasloff M, Martin B, Chen H.: Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 910-913, 1988.
- 9) Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T, Fujino M, Kitada C, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 1942-1944, 1979.
- 10) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告: 微量液体希釈による MIC 測定 (微量液体希釈法), *Chemotherapy.*, 38, 102-105, 1990.
- 11) National committee for clinical laboratory standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-second edition, tentative standard, NCCLS, Villanova, 1988
- 12) Shigeri Y, Yasuda A, Hagihara Y, Nishi K, Watanabe K, Imura T, Inagaki H, Haramoto Y, Ito Y, Asashima M.: Identification of novel peptides from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin by direct tissue MALDI-MS analysis, *FEBS J*, doi: 10.1111/febs.13107, 2014.