

氏名	井村雄一
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第635号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Elucidation of modes of membrane permeabilization by antimicrobial peptides in bacterial and mammalian cells and control of their cell selectivity (細菌細胞と哺乳類細胞における抗菌性ペプチドの膜透過性亢進様式の解明と細胞選択性の制御)
論文調査委員	(主査) 教授 松崎勝巳 教授 半田哲郎 教授 加藤博章

論文内容の要旨

抗菌性ペプチドはヒトを含む様々な生体内で先天性免疫機構を担う。1987年に脊椎動物初の抗菌性ペプチド magainin 2 がアフリカツメガエルから単離されて以来、その作用機構が精力的に研究されている。塩基性残基を多く含み、親水性と疎水性のアミノ酸のクラスターを併せ持つ両親媒性構造が特徴で、ペプチドの多くが酸性リン脂質に富む細菌細胞膜を標的とすることを初期の研究が示唆した。その後、人工膜を用いた研究が多く行われ、当研究室は、magainin 2が膜に結合して α ヘリックス構造を取り、周囲の脂質分子と直径2～3 nm程のtoroidal poreを形成し、続くイオンの流出入により抗菌作用を発揮することを示した。また、この過程で脂質のflip-flopやペプチドの脂質膜内葉へのtranslocationが起きる。耐性菌にも作用し、新規抗菌剤として期待されているが、生きた細菌・哺乳類細胞との相互作用は、医薬への応用に重要であるにも関わらず、殆ど分かっていない。本研究は抗菌性ペプチドと生体膜との相互作用を調べ、その細胞選択性の制御を目的とする。

第一章では、magainin 2の生体膜透過性亢進活性を調べた。同等の活性を持つF5W-magainin 2 (MG)に、そのN末端を蛍光色素TAMRAで標識したペプチドを2%混合し、細菌細胞としてBacillus megaterium、哺乳類細胞としてChinese hamster ovary (CHO)-K1細胞を選び、これらに対する膜透過性亢進を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。MGは細菌と哺乳類細胞の両細胞膜の膜透過性を異なる様式で亢進した。細菌細胞膜では、MGは人工膜での実験結果によく対応する直径2.8 nm (< 6.6nm)の大きさのポアを明け、ペプチドは細胞質内へtranslocationした。一方、哺乳類細胞膜においては、MGはbuddingやflip-flopを伴う直径23nm以上の大きな膜破壊を引き起こした。MGの膜透過性亢進はATPや細胞外マトリックスの構成要素glycosaminoglycanに影響を受けず、細胞膜の脂質二重層との物理化学的な相互作用によることが示唆された。以上の様に、MGの細菌細胞と哺乳類細胞に対する異なった膜透過性亢進の様式を初めて詳細に検証し、可視化した。

抗菌性ペプチドは医薬として期待されているが、血中投与時の低い治療係数が問題であり、細菌選択性を上げることが必要である。タンパク質・ペプチド性薬の体内挙動の改善を目的に、それらをpolyethyleneglycol (PEG)で修飾する手法PEGylationがこれまでC型肝炎治療薬インターフェロン等で汎用されているが、抗菌性ペプチドでこのような研究例は無い。そこで、第二章ではPEG修飾で細胞毒性の低減を狙い、細菌選択性の向上を試みた。親ペプチドとしては、細菌細胞膜への親和性を高めるためにMGの負電荷を減らしたE19Q-MG-NH₂を選び、このN末端を平均分子量5 kDaのPEG分子で修飾した。Ac-E19Q-MG-NH₂とMGをコントロールとして用いた。PEG修飾により抗菌活性は1/4に低下したものの、親ペプチドの強い細胞毒性を殆ど失わせることが出来た。また、PEG修飾ペプチドは細菌細胞膜を模倣した人工膜に対しても低い膜透過性亢進活性を示したが、脂質のflip-flop、ペプチドのtranslocationを引き起こしたことから、PEG修飾自体は親ペプチドの作用機構を変化させないことが明らかとなった。

第三章では、PEG 修飾の影響がペプチドの二次構造に依存するかどうかを調べるため、環状 β シート構造を有すカプトガニ由来の tachypleisin I のN末端を平均分子量 5 kDa の PEG 分子で修飾した。PEG 修飾によって細胞毒性が大きく減少したものの、抗菌活性も 1/32 と MG の時よりも大きく減少した。PEG 修飾による活性の低下の程度はペプチドによって異なるということが分かった。また、抗菌活性の低下は、PEG 分子が菌の外膜とペプチドグリカン層を透過しにくいことに起因すると示唆された。さらに、親ペプチドの DNA への結合性が PEG 修飾により減少したことも抗菌活性の低下に寄与している可能性がある。以上の様に、PEG 修飾体の抗菌剤への応用は容易ではないが、敗血症の原因物質である lipopolysaccharide (LPS) に強く結合する親ペプチドの性質を保持したまま毒性を低減できれば、未だに治療法の無い敗血症の治療薬としての応用への道が開ける。FITC 標識された LPS を用いて LPS 結合性を調べたところ、両ペプチドはほぼ同等の結合性を示し、細胞毒性の低い治療薬へつながる可能性が示された。一方、PEG 修飾体は細菌細胞を模倣した人工膜に対し、親ペプチドとほぼ同等の膜透過性亢進活性を示した。両ペプチドが共に脂質の flip-flop、ペプチドの translocation を引き起こしたことから、tachypleisin I も magainin 2 と同様に toroidal pore を形成することが初めて明らかとなり、その機構は PEG 修飾により変化しなかった。

複数の抗菌性ペプチドの相乗効果も細胞選択性を上げ、治療係数の改善につながる可能性がある。当研究室は、同じ生物由来の magainin 2 と PGLa が平行型ヘテロダイマー形成を通じて高い膜透過性亢進活性を示すことを示した。第四章では、さらにその機構を詳細に探るため、両ペプチドの C 末端に GGC という配列を付加し、ジスルフィド結合により架橋したハイブリッドペプチドを作製し、細菌、赤血球、脂質二重層との相互作用を両モノマーペプチドの等モル混合物と比較した。ハイブリッドペプチドは細菌やその模倣人工膜に対しては、混合物と同等もしくはより高い活性を示したが、赤血球やその模倣人工膜に対しては、混合物に比べ著しく高い活性を示した。この様に、架橋により、天然のペプチドの選択毒性が失われ、生物はこれらのペプチドを別々に産生する事で、細胞選択性を保っていると考えられる。

以上の様に、本研究は抗菌性ペプチドの生体膜透過性亢進機構を初めて詳細に明らかにした。また、PEG 修飾ペプチドやハイブリッドペプチドを用いて、抗菌性ペプチドの細胞選択性の制御に関する重要な知見が得られた。本研究は、抗菌性ペプチドと膜との相互作用の完全な解明、さらには医薬への応用に価値ある貢献をすると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ヒトを含む様々な生体内で先天性免疫機構を担う抗菌性ペプチドは多剤耐性菌にも作用し、新規抗菌剤として期待されているが、生きた細菌・哺乳類細胞との相互作用は、医薬への応用に重要であるにも関わらず、殆ど分かっていない。本研究は抗菌性ペプチドと生体膜との相互作用を調べ、その細胞選択性の制御を目的としている。

まず、代表的な α ヘリックス性の抗菌性ペプチドである F5W-magainin 2 (MG) の生体膜透過性亢進活性を、細菌細胞として *Bacillus megaterium*、哺乳類細胞として Chinese hamster ovary (CHO)-K1 細胞を選び、蛍光標識体を用いて調べた。その結果、MG は細菌と哺乳類細胞の両細胞膜の膜透過性を異なる様式で亢進することが明らかとなった。すなわち、細菌細胞膜では、MG は人工膜での実験結果によく対応する直径 2.8nm (< 6.6nm) の大きさのポアをあけ、ペプチドは細胞質内へ translocation した。一方、哺乳類細胞膜においては、MG は budding や flip-flop を伴う直径 23nm 以上の大きな膜破壊を引き起こした。

次に、細胞選択性の制御を目的とし、polyethyleneglycol (PEG) で修飾する手法 PEGylation を抗菌性ペプチドにはじめて適応した。親ペプチドとしては、細菌細胞膜への親和性を高めるために MG の負電荷を減らした E19Q-MG-NH₂ を選び、この N 末端を平均分子量 5 kDa の PEG 分子で修飾した。PEG 修飾により抗菌活性は 1/4 に低下したものの、親ペプチドの強い細胞毒性を殆ど失わせることが出来た。また、PEG 修飾自体は親ペプチドの作用機構を変化させないことが明らかとなった。

さらに、PEG 修飾の影響がペプチドの二次構造に依存するかどうかを調べるため、環状 β シート構造を有すカプトガニ由来の tachypleisin I の N 末端を平均分子量 5 kDa の PEG 分子で修飾した。PEG 修飾によって細胞毒性が大きく減少したものの、抗菌活性も 1/32 と MG の時よりも大きく減少した。これは、PEG 分子が菌の外膜とペプチドグリカン層を透過しにくいこと、および DNA への結合性が PEG 修飾により減少したことによると考えられた。しかし、敗血症の原因物質である

lipopolysaccharide (LPS) への結合性は、PEG 修飾により変化しなかったため、敗血症の治療薬としての応用が示唆された。また、tachyplesin I も magainin 2 と同様に toroidal pore を形成することが初めて明らかとなり、その機構は PEG 修飾により変化しなかった。

最後に、抗菌性ペプチド magainin 2 と PGLa の間の相乗効果を利用した細胞選択性の向上を試みた。両ペプチドの C 末端に GGC という配列を付加し、ジスルフィド結合により架橋したハイブリッドペプチドを作製し、細菌、赤血球、脂質二重層との相互作用を両モノマーペプチドの等モル混合物と比較した。ハイブリッドペプチドは細菌やその模倣人工膜に対しては、混合物と同等もしくはより高い活性を示したが、赤血球やその模倣人工膜に対しては、混合物に比べ著しく高い活性を示した。この様に、架橋により、天然のペプチドの選択毒性が失われ、生物はこれらのペプチドを別々に産生する事で、細胞選択性を保っていると考えられた。

以上の様に、本研究は抗菌性ペプチドの生体膜透過性亢進機構を初めて詳細に明らかにした。また、PEG 修飾ペプチドやハイブリッドペプチドを用いて、抗菌性ペプチドの細胞選択性の制御に関する重要な知見が得られた。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。