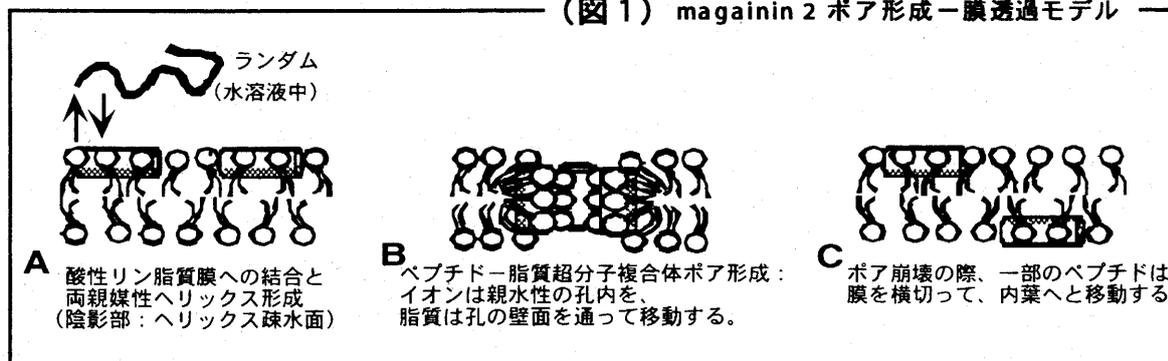


氏名	こばやし さと え 小林 聖 枝
学位(専攻分野)	博士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 481 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Biophysical studies on the diversity of structure and function of anti-microbial peptides (抗菌性ペプチドの構造及び機能の多様性に関する生物物理学的研究)
論文調査委員	(主 査) 助教授 松崎勝巳 教授 半田哲郎 教授 藤井信孝

### 論 文 内 容 の 要 旨

抗菌性ペプチドは様々な生物種から現在500種類以上も単離されており、ヒトを含めたあらゆる生物に共通の先天的免疫機構を担っていることが明らかとなってきた。これら抗菌性ペプチドの主な機能は、細菌膜の脂質部分に作用し膜バリア機能を破壊することと考えられており、代表的な膜作用性抗菌ペプチドであるアフリカツメガエル皮膚由来・ $\alpha$ ヘリックス構造の magainin 2 (以下 MG2) の膜作用機構については、さらに分子レベルでのメカニズムが詳細に研究されている(図1)。抗菌性ペプチドは、アミノ酸数十残基程度までの大きさであり、強塩基性、両親媒性という点では共通しているが、脂質膜に結合して示す二次構造については、 $\alpha$ ヘリックス構造、 $\beta$ シート構造、ループ構造などの多様性がみられる。しかし多様な構造を持つ抗菌性ペプチドが存在する意義は明らかでなく、膜破壊活性以外の機能を有している可能性も予測されるところであった。そこで申請者は、天然に存在する抗菌性ペプチドのなかで特徴的な構造を持つ、アジアヒキガエル由来・屈曲ヘリックス構造の buforin 2 (以下 BF2)、カプトガニ由来・環状 $\beta$ シート構造の tachyplesin I (以下 T-SS)、そして MG2等を用い(図2)、各ペプチドに特徴的な二次構造とそれに起因する機能の多様性という観点から、モデル膜および細菌を用いた実験系により抗菌性ペプチドの作用を検討した。

(図1) magainin 2 ポア形成—膜透過モデル

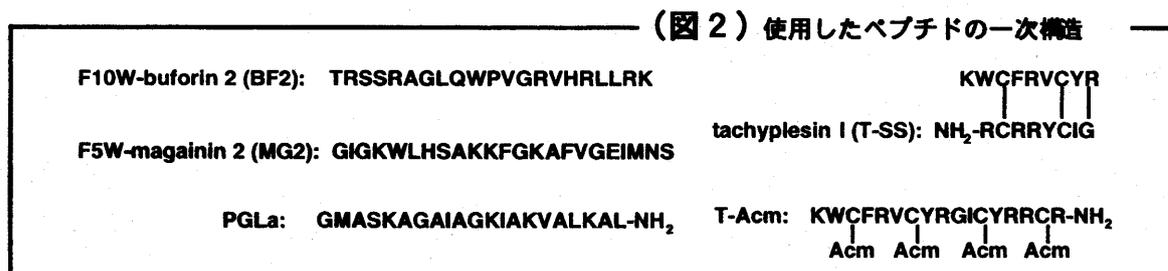


#### 第一章

抗菌性ペプチド bufoin 2 と脂質二分子膜との相互作用：ペプチドの膜透過促進因子としての Pro 残基

BF2は、トリフルオロエタノールのような疎水性環境では配列中央の Pro により屈曲したヘリックス様二次構造をとる点が特徴的である。CD 測定の結果、他の抗菌性ペプチドと同様酸性脂質選択的に結合すること、および膜中で両親媒性屈曲ヘリックス構造をとることがわかった。しかし人工脂質小胞を用いて MG2 と比較検討した結果、他の多くの抗菌性ペプチドとは異なり、BF2は膜バリア機能をほとんど損傷することなく非常に効率よく膜を透過し内在化することがわかった。よって BF2 の作用点が膜ではなく細胞内にある可能性が示唆された。また、その膜透過機構は脂質分子の flip-flop を伴わないという点で MG2 とは異なった新規のものであると推察された。ここで、BF2 に特徴的な Pro 残基に着目し、Pro を

Ala に置換した誘導体の膜挙動も検討した結果、その構造が MG2 様の規則正しい  $\alpha$  ヘリックス型に近づき、膜挙動は MG2 型に変わることがわかった。つまり BF2 の新規膜透過機構において、Pro 残基が構造上の重要な鍵となっていることを見いだした。



## 第二章

環状  $\beta$  シート抗菌性ペプチド tachypleisin I とリポポリサッカライドとの特異的相互作用

T-SS はそのシステイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成することにより安定な環状の  $\beta$  シート構造をとることが特徴的な膜作用性抗菌ペプチドである。この特徴的な構造により T-SS が細胞膜破壊以外の機能を発揮するのではないかと考え、グラム陰性細菌の外膜構成脂質であるリポポリサッカライド (LPS) 識別能を検討した。すなわち、ペプチドの正電荷と LPS の負電荷との静電的相互作用により結合するのか、それとも何か特異的な結合なのかを、同じ負電荷をもったリン脂質であるホスファチジルグリセロール (PG) への結合能と比較することで検討した。その結果、T-SS は LPS に対して 280 倍もの強い選択性を示した。また、LPS の lipid A 部分のみを用いても LPS に対する場合と同等の結合性を示したことから、T-SS が LPS の lipid A 部分を認識して選択結合性を発揮していることが示唆された。比較のため用いた MG2 では LPS と PG に対する親和性に差は見られなかった。さらに、T-SS のシステイン側鎖のチオール基をアセトアミドメチル (Acm) 基で保護した直鎖状の誘導体 (T-Acm) を用いたところ、LPS への結合性が MG2 と同程度までに減少したことから、T-SS の LPS 選択能においてその環状構造が必須であることが示唆された。また、グラム陰性菌を用いて外膜破壊活性を検討したところ、T-SS はその環状構造により非常に速やかな外膜破壊活性を発揮することが明らかとなった。

## 第三章

$\alpha$  ヘリックス抗菌性ペプチド magainin 2 と環状  $\beta$  シート抗菌性ペプチド tachypleisin I の細菌選択的相乗効果：カクテル療法に向けて

これまでに抗菌性ペプチドと抗生物質間の相乗効果は多数報告されているが、抗菌性ペプチド間については例が少なく、しかもアフリカツメガエル由来の MG2-PGLa 間のように同じ生物種から単離された同じ二次構造を持つペプチド間についてのみであった。本研究において申請者は、由来も構造も異なった抗菌性ペプチド、MG2 と T-SS とが、抗菌活性において強い相乗効果を示すことを世界に先駆けて見いだした。さらに、MG2-PGLa ペアは抗菌活性だけでなく溶血活性においても相乗効果を示してしまうが、MG2-T-SS ペアでは溶血活性における相乗効果は見られなかった。そこで、MG2-T-SS ペアの細菌選択的相乗効果発揮のメカニズムを探るため、細菌膜、赤血球膜の脂質組成の相違に着目し、各々の脂質組成を模した脂質小胞を用いて膜バリアー能破壊活性における相乗効果を検討した。その結果、抗菌活性、溶血活性の結果と良く対応した結果が得られ、よって、MG2-T-SS にみられる細菌選択的相乗効果が、酸性リン脂質含有膜 (細菌膜) に特異的な膜作用で起こることが示唆された。またその際、各々のペプチドを単独で用いた場合と比較して、両者を併用した場合にはより大きな膜障害 (ポア) が形成されるようになることも分かった。また、T-SS の直鎖状の誘導体、T-Acm を用いたところ、抗菌活性における相乗効果は弱まり、また膜バリアー能破壊活性における相乗効果も消失した。よって、MG2 との相乗効果発現における T-SS の環状構造の重要性が示唆された。

以上本研究により、抗菌性ペプチドの新たな性質、1) BF2 は分子中央の Pro に由来する屈曲したヘリックス構造によって膜バリアー能を破壊することなく効率的に膜を透過すること、および 2) T-SS はその環状構造によって高い LPS 選択性が付与されていることが見いだされた。さらに、多様に存在する抗菌性ペプチド間の関係として 3) MG2 と T-SS と

が細菌選択的に相乗効果を発揮すること、またその際 T-SS の環状構造が重要であることが見いだされた。これらの結果は、抗菌性ペプチドがその特徴的構造により多様な性質を付与されていることを例示し、BF2 は細胞内薬物導入、T-SS はエンドトキシンショック治療剤、あるいは MG2-T-SS のように抗菌性ペプチドを組み合わせたカクテル療法、といった薬学的応用への可能性を示すとともに、自然界に多様な抗菌性ペプチドが存在する意義を理解する上でも興味深い知見を与えるものである。

## 論文審査の結果の要旨

ヒトを含めたあらゆる生物に共通の先天的免疫機構を担っている抗菌性ペプチドの主な機能は、細菌膜の脂質部分に作用し膜バリアー能を破壊することであると考えられている。抗菌性ペプチドは、強塩基性、両親媒性という点では共通しているが、膜に結合して示す二次構造については、 $\alpha$ ヘリックス構造、 $\beta$ シート構造、ループ構造などの多様性がみられる。しかし多様な構造を持つ抗菌性ペプチドが存在する意義は明らかでなく、膜破壊活性以外の機能を有している可能性も予測されるところであった。そこで著者は、天然に存在する抗菌性ペプチドのなかで特徴的な構造を持つ、アジアヒキガエル由来・屈曲ヘリックス構造の buforin 2 (BF2)、カプトガニ由来・環状 $\beta$ シート構造の tachyplesin I (T-SS)、アフリカツメガエル皮膚由来・ $\alpha$ ヘリックス構造の magainin 2 (MG2)、等を用い、各ペプチドに特徴的な二次構造とそれに起因する機能の多様性という観点から、モデル膜および細菌を用いた実験系により抗菌性ペプチドの作用を検討した。

BF2 は、酸性脂質選択的に結合し、両親媒性屈曲ヘリックス構造をとることを明らかにした。しかし MG2 と異なり、膜バリアー能をほとんど損傷することなく非常に効率よく膜を透過し内在化することから、BF2 の作用点が膜ではなく細胞内にある可能性が示唆された。また、膜透過機構は脂質分子の flip-flop を伴わないという点で MG2 とは異なった新規のものであると推察され、分子中央の Pro 残基が構造上の重要な鍵となっていることを見いだした。

T-SS は、その環状構造によって高いリポポリサッカライド認識能を付与されていること、および認識部位が lipid A 部分であることを明らかにした。これに対し、MG2 では単に静電相互作用のみでリポポリサッカライドに結合することを見いだした。さらに、T-SS は非常に速やかな外膜破壊活性を発揮することも明らかにした。

続いて、著者は抗菌性ペプチド間の相乗効果について検討し、由来も構造も異なった抗菌性ペプチド、MG2 と T-SS とが、抗菌活性において強い相乗効果を示すことを世界に先駆けて見いだした。これまでの数少ない相乗効果の報告例は、アフリカツメガエル由来の MG2-PGLa 間のように同じ生物種から単離された同じ二次構造を持つペプチド間についてのみであった。しかも著者は、MG2-PGLa ペアは抗菌活性だけでなく溶血活性においても相乗効果を示すが、MG2-T-SS ペアでは溶血活性における相乗効果は見られないことを見いだした。さらに、この細菌選択的相乗効果が、酸性リン脂質含有膜（細菌膜）に特異的な膜作用で起こることを明らかにした。さらに、MG2 との相乗効果発現における T-SS の環状構造の重要性も指摘した。

以上本研究により、抗菌性ペプチドの新たな性質、1) BF2 の Pro 由来屈曲ヘリックス構造による効率的膜透過、2) T-SS の環状構造による高い LPS 選択性、3) MG2 と T-SS の細菌選択的相乗効果が見いだされた。これらの結果は、抗菌性ペプチドがその特徴的構造により多様な性質を付与されていることを例示し、細胞内薬物導入、エンドトキシンショック治療剤、カクテル療法、などの薬学的応用への可能性を示すとともに、自然界に多様な抗菌性ペプチドが存在する意義を理解する上でも興味深い知見を与えるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成14年2月22日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。