

氏 名	すぎ した けん いち 杉 下 憲 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 398 号
学位授与の日付	平成 9 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 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	Biophysical Studies on Interactions of a Host Defense Peptide, Magainin 2, with Lipid-and Bio-Membranes (生体防御ペプチド Magainin 2 と脂質膜および生体膜との相互作用 に関する生物物理学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 宮 嶋 孝 一 郎 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 多 賀 徹

論 文 内 容 の 要 旨

近年、昆虫からヒトまでの広範囲の生物より抗菌活性を有するペプチドが次々に単離され、生体防御系の一部として使われていることが広く認識されるようになってきている。これらのペプチドはグラム陰性・陽性菌をはじめ真菌類にも広く抗菌作用を示し、さらには腫瘍細胞にも殺細胞作用を示すが、興味深いことに正常な動物細胞にはほとんど作用しない。一方、天然にはハチ毒の主成分である Melittin のようにいずれの細胞にも強く作用するペプチドも存在しており、選択性の原因について興味の持たれるところである。このように生体防御ペプチドは選択毒性が高い・耐性菌が生じにくい等の優れた特性を有しており、医薬品への応用が期待され、臨床試験が開始されている。これらのペプチドの作用機序は標的細胞の細胞膜脂質に結合し、透過性を上昇させることにより細胞を致死させるものであると考えられている。当研究室ではアフリカツメガエル皮膚由来の塩基性ペプチド Magainin の脂質膜への作用機構について研究を行い、ペプチド-脂質複合体ポア形成による膜電位と脂質非対称性の同時消失であり、酸性リン脂質との静電的相互作用が重要であることを明らかにしてきた。しかし、赤血球膜や細菌細胞膜などの生体膜との相互作用については未だに詳細は明らかになっていない。そこで著者は Magainin をベースにより有効な抗菌性ペプチドを創製することを目的として、生体膜との相互作用を調べ、高い選択毒性の原因、抗菌力を高める因子について考察した。

Magainin 2: GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS

第 I 章 Magainin 2 の膜選択性の分子論

Magainin の選択毒性の原因を明らかにするために、赤血球膜と細菌細胞膜とで大きな違いがある脂質組成・膜電位に着目し、いずれの膜にも強い活性を示す Melittin と生体膜モデルであるリポソームや赤血球膜への作用性を比較検討した。その結果、次の 3 つの要因が組み合わされて選択毒性が発現している

ことが明らかとなった。(1) 正常な真核細胞膜の外葉はホスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリンなどの双イオン性リン脂質から成るが、疎水性の低い Magainin の作用はこれらの脂質に対して非常に弱い。他の各種抗菌性ペプチドの溶血性も PC 膜への作用性に対応しており、疎水性度の高いペプチドほど強かった。これに対して、細菌細胞膜ではホスファチジルグリセロール (PG) ・カルジオリピンなどの酸性リン脂質が豊富に存在しており、静電的相互作用が有効に働くため、Magainin も強く結合することができる。(2) 真核細胞膜にはコレステロールが多く含まれるが、このコレステロールにより Magainin の作用は抑制される。(3) 細菌では非常に大きな膜電位がかかっており、この膜電位が Magainin の作用を促進する。

第Ⅱ章 Magainin 2 と脂質二分子膜との相互作用におけるペプチドの電荷の効果

第Ⅰ章で、Magainin の選択毒性の原因が明らかになった。しかし、より優れた抗菌剤を開発するためには低毒性を保持したまま、さらに抗菌力を高める必要がある。Magainin の作用では静電的相互作用が重要な役割を果たしているため、正電荷を増加させることが有効ではないかと考え、電荷の異なる ($\pm 0 \sim +6$ 価) 4 つの Magainin 誘導体を合成し、脂質二分子膜との相互作用におけるペプチドの電荷の効果について検討した。

負電荷を持つ PG 膜への結合性は、ペプチドの正電荷を増加させることにより強くなっており、静電的相互作用が重要な役割を果たしていることが示された。これに対して、ヘリックス形成を誘起するトリフルオロエタノール／バッファー中でのヘリックスの安定性やペプチド-脂質複合体ポアの寿命は減少した。これはペプチドの側鎖間の静電的反発によるものと考えられる。また、最も電荷の大きな +6 価の誘導体では、ポアの寿命が非常に短く、効果的な膜透過性亢進は観察されなかった。このため、天然に存在する +4 価の Magainin は、最も効率的に膜透過性を上昇させるように、膜への結合性やポアの安定性が調節されたデザインであるものと考えられる。

第Ⅲ章 Magainin 2 とグラム陰性菌外膜および内膜との相互作用

次に、グラム陰性菌外膜および内膜と Magainin との相互作用について検討した。Magainin を大腸菌に作用させたところ、菌の生存率が低下すると同時に細胞質内 K^+ イオンの漏出が観察された。内膜透過性亢進能は膜の酸性リン脂質含量とペプチドの正電荷に依存し ($0 \sim +4$)、静電的相互作用が重要な役割を果たしていたが、ペプチド電荷を +4 から +6 に増加させても、もはや内膜透過性は上昇せず、第Ⅱ章の結果に対応した。これに対して、外膜の透過性は電荷が大きなペプチドほど亢進されており、抗菌力と相関した。このときの大腸菌の表面状態を走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ顕著な突起が見られた。そこで外膜で負電荷を有するリボ多糖への作用に注目した。リボ多糖を含有するリポソームを作り、CD スペクトルを測定したところ α -ヘリックス構造をとっており、また透過性も亢進されていた。このため、Magainin はまず外膜のリボ多糖部位に作用しているものと考えられる。

一方、ペプチドの疎水性度を増大させることは、抗菌力・外膜および内膜の透過性亢進に有効であったが、溶血性も上昇しており選択性が低下していた。

以上、著者は Magainin の膜作用選択性が細胞表面の構成脂質に対する親和性に依存することを示し、低毒性を保持するためには疎水性度を低く保つ必要があることを明らかにした。一方、抗菌力を増強するためにはグラム陰性菌外膜のバリアー能を低下させるためにペプチドの正電荷を大きくすることが有効であることを見いだした。これらの知見は低毒性で効果的な抗菌性ペプチドの開発に有用な情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

近年種々の生物から抗菌活性を有するペプチドが単離され、これらが生体防御系の一翼を担っていると考えられるようになった。これらペプチドはグラム陽性・陰性菌をはじめ真菌類にも抗菌作用を示すが、正常な動物細胞には殆んど作用しない。一方ハチ毒の主成分であるメリチンはいずれの細胞にも作用する。このような選択性の原因は明らかではない。このような生体防御機能をもつペプチドは選択毒性が高く、耐性菌が生じにくい等優れた特性を有しており、医薬品への応用が検討されている。これらペプチドの作用機序としてはペプチドが標的細胞の細胞膜に結合し、膜透過性を上昇させ、細胞を致死させるものと考えられており、当研究室でアフリカツメガエル皮膚由来のマガイニンを用い、細胞モデルとしてリポソームを用いて、その作用機序を明らかにして来た。しかし赤血球膜や細菌細胞膜などの生体膜とこれらペプチドとの相互作用の詳細は明らかではない。この点を明らかにし、マガイニンをリード化合物としてより有効な抗菌性ペプチドを創製する目的で、生体膜との相互作用を調べ、選択毒性の原因、抗菌力を高める因子について考察した。

マガイニンの選択毒性の原因究明のために、赤血球膜と細菌細胞膜の構成脂質組成と膜電位について、いずれの膜にも作用を示すメリチンと比較検討した。その結果、(1)中性の双イオン脂質からなる真核細胞膜は疎水性が強いため、親水性で塩基性の強いマガイニンとの相互作用は弱い。これに対し細菌膜は酸性リン脂質を多量に含むため、静電相互作用が有効に働く。(2)真核細胞膜は多くのコレステロールを含むためマガイニンとの相互作用は弱い。(3)細菌は大きな膜電位がかかっているためマガイニンの作用を促進する。

ついでマガイニンのもつ電荷の影響を調べた。静電的相互作用の観点からマガイニンの電荷を 0 から +6 価までかえ、脂質膜との相互作用を調べた。正電荷の増加に伴い、負電荷をもつ脂質膜への結合性は増加したが、ヘリックスの安定性や膜に結合したヘリックスより形成されるポアの寿命は短くなり、透過性は亢進されず、+4 価の天然体が最も有効であった。

ついで細胞外膜をもつグラム陰性菌との相互作用を検討した。マガイニンを大腸菌に作用させた所、菌の生存率の低下とともに K^+ の流出が見られあ。一方内膜の透過性は正電荷に比例したが、+4 価から +6 価に増加させても変化はなかった。一方外膜ではマガイニンの電荷に比例した。外膜を構成するリポ多糖との相互作用を CD スペクトルで調べたところ、 α -ヘリックス構造をとっており、透過性も亢進されていた。このためマガイニンはまず外膜のリポ多糖部位に作用するものと考えられる。

以上著者はマガイニンの膜作用選択性が細胞表面の構成脂質に対する親和性に依存し、低毒性を保つためには疎水性を弱くする必要があること、またグラム陰性菌外膜のバリアー能を低下させるため、ペプチ

ドの正電荷を大きくすることの有用性を明らかにした。これらの知見は低毒性で効果的な抗菌ペプチドの開発に有用な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。更に平成9年3月3日論文とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。