

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550168

研究課題名（和文）抗菌ペプチドの細菌外膜への結合機構の単一分子感度解析に基づく
高活性抗菌剤の開発研究課題名（英文）Action of antimicrobial peptides into the bacterial outer membrane,
activity enhancement, and the technology for single molecular evaluation

研究代表者

福岡 聡(FUKUOKA SATOSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：40357885

研究成果の概要（和文）：抗菌ペプチドや胆汁酸類を腸内細菌のリポ多糖やリピド A に作用させたときの機能変化を、分光スペクトル測定や熱分析など物理化学的検討、及びサイトカイン生産への影響により調べた。ペプチドの結合によりリポ多糖の疎水性部分リピド A が再配列し、高次構造と共に相転移挙動や生物活性が変化した。これの結果から、活性高度化に向けた構造要素が明らかになった。また、ナノサイズの金属微粒子の電磁場増強に基づく表面増強ラマン分光によりリポ多糖が評価可能と示された。

研究成果の概要（英文）：The interaction of lipopolysaccharide (LPS) and its hydrophobic part lipid A with antimicrobial peptides or bile acids was studied. We elucidated the conformation of their phosphate groups due to peptide binding, and the profile of the secondary structure of the peptides by physicochemical analyses. The thermodynamics of binding between peptides and lipid A showed that the acidic amino acid substituted peptides improved the binding activity. The conformation change of the peptide enhanced the ability of incorporation into the lipid A aggregates, along with changes in biochemical and biophysical parameters. The surface enhanced Raman scattering spectroscopy study indicated the applicability of that to the LPS evaluation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：抗菌ペプチド、リポ多糖、リピド A、胆汁酸、表面増強ラマン分光、単一分子解析、高次構造、生物活性

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌類による感染症の治療には各種の抗菌剤が投与されている。しかし、細菌が死滅しても外膜のリポ多糖が血中に溶出するため、サイトカイン類が誘導生産さ

れ敗血症の原因となる、などの問題があった。敗血症の治療法は未確立で致死率が非常に高い。ペプチド系抗菌剤は抗敗血症性が知られており有用な候補となる。しかし、活性や標的選択性が低く実用化は限定的である。抗

敗血症性抗菌剤関連の研究は社会ニーズが高いことから重要な課題である。

抗菌ペプチドはアミノ酸数十個が鎖状に結合したもので、アミノ酸の種類により荷電性、疎水性、水素結合性が異なる。また、その配列によって、ペプチドの高次構造や細胞膜など標的結合性が変化する。細菌を標的とする抗菌ペプチドの場合、同ペプチドは細菌表層を経て内部に進入することから、細菌外膜の主要成分であるリポ多糖との相互作用機構解明と共に、リポ多糖が示す生物活性などへの影響の系統的検討が必要である。

それにも関わらず、従来の抗菌ペプチド類の活性や作用機構に関する研究は、実験のモデル物質にリン脂質を用いたものが多く、リポ多糖類での研究は限られていた。この理由として、リポ多糖の化学構造が複雑で分離精製困難なために高純度試料が得られにくいことがあげられる。

また、細菌感染症などでは極微量のリポ多糖が問題となることから、その測定評価技術の開発は重要である。現在はリムルス試薬を用いたゲル化法などにより計測されているが、操作は煩雑で高感度測定しようとするとう測定時間が長くなる、などの多くの問題があった。金属ナノ粒子の電磁場増強現象に基づく表面増強ラマン分光法によって極微量の有機分子の機能が解析されている。リポ多糖など複合糖類の分子レベル評価は従来技術では困難であり、新規計測技術の開発が重要である。

2. 研究の目的

本研究ではグラム陰性細菌類による感染症の治療に重要な、抗敗血症性の高活性抗菌剤開発を推進する。抗菌作用を示すマガイニン2やNK-リシンとそのアミノ酸の部分置換ペプチドや胆汁酸など細菌の表層に結合する生体関連物質が膜物性及び生物活性への影響を調べ、活性抑制の指針を得る。

細菌外膜リポ多糖の脂質部分で生物活性発現の本体であるリポドAに、抗菌ペプチド類を作用させたときの高次構造や膜機能の変化を、物理化学的・生化学的に測定し、系統的に分子レベルで解明する。また、リポ多糖の評価を、ナノサイズの金属微粒子に固有の電磁場増強現象に着目し、生体関連物質のラマンスペクトル信号の増幅作用に着目し、その応用可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験試料

細菌外膜の成分として、分子構造と基本的性質が明らかな *Salmonella* 菌と *Erwinia* 菌の高純度リポ多糖を調製して用いた。リポドAは *Erwinia* 菌のリポ多糖から脂肪酸6個、リン酸基2個の薄層クロマトグラフィーによ

ってほぼ単一バンドとなるまで精製を進めた。抗菌ペプチドにはマガイニン2とNK-リシンとそのアミノ酸を修飾した誘導体に着目した。実験には、マガイニン2のアミノ酸の一部をバリンやフェニルアラニンなど疎水性アミノ酸、アルギニンやリジンなど荷電性アミノ酸、及びアニオン性アミノ酸と置換した合成ペプチドを使用した。また、胆汁酸は主要成分であるコール酸やデオキシコール酸を用いた。表1にNK-リシンと修飾ペプチドのアミノ酸配列を、図1に代表的な胆汁酸であるコール酸の構造式を示す。

表1 NK-リシンとその誘導体のアミノ酸配列

| | | |
|-------|---------------------|-----------------------------|
| NK-2 | KILRGVCKKIMRTFLRRIS | KDILTGKK-NH ₂ |
| NK-19 | KILRGVSKKIM | RR ILTGKK-NH ₂ |
| NK-15 | KILRGVSK | R ILTGKK-NH ₂ |
| NK-11 | KI | SK R ILTGKK-NH ₂ |

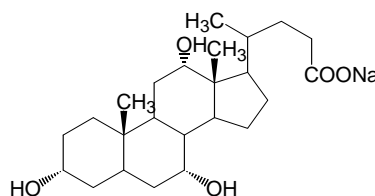


図1 コール酸

(2) 実験方法

抗菌ペプチドとそのアミノ酸修飾物及び胆汁酸をリポドAに結合させたときの相転移挙動などの物理化学的な性質は赤外分光法 (FT-IR) 及び溶液走査熱量計による相転移エンタルピーの測定やゼータ電位の変化を調べた。高次構造の変化はシンクロトロン放射光を用いる小角X線散乱分析により系統的に解析した。生物活性は免疫細胞を用いて、リポ多糖やリポドAによるサイトカイン生産への影響を検討した。

リポ多糖の分子レベル解析は、ナノサイズの金属微粒子にリポ多糖と相互作用するタンパク質を吸着させ、増強電磁場でのラマン散乱スペクトル測定により、高感度計測を検討する。

4. 研究成果

(1) 複合糖リポドAの膜状会合体の高次構造は、ペプチドの結合によりキュービック相からマルチラメラ相に転移し、相転移温度は低温側にシフトした。免疫細胞を用いたサイトカイン生産に及ぼす影響は、顕著ではなかったが抑制を認めた。図1に小角X線散乱測定の結果を示す。リポ多糖の分子配列はペプチドの結合により、キュービック等からラメラ構造への転移が認められた。

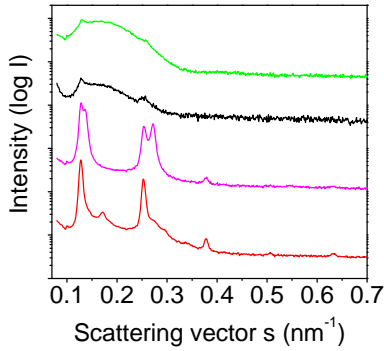


図1 リポ多糖の高次構造に及ぼすNK-リンとそのアミノ酸修飾誘導体
 緑色：リポ多糖，黒色：リポ多糖+NK-11，桃色：+NK-19，赤色：+NK-2

FT-IR 測定により調べた相転移挙動を図2に示した。高次構造と類似した傾向を示し、天然型を元にアミノ酸の結合数が少なくなると、相転移変化も小さくなった。

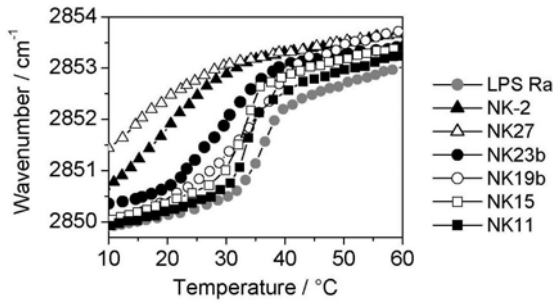


図2 リポ多糖脂肪酸の温度による相転移

これらの結果から、アミノ酸置換によるペプチドのコンフォメーション改変で細菌外膜との相互作用が変化した。このことから、ペプチドの抗菌活性の向上には、膜結合性を高めることが重要と示唆される。

(2) 胆汁酸類との相互作用によるリポドAの高次構造や機能変化は、ペプチドとの比較では顕著ではなかったが、生物活性に関しては異なる効果を認めた。ペプチドの場合とは逆に活性は向上していた。これは、生物活性の発現には膜構造変化が重要との仮説を支持している。図3に相転移挙動を、図4に相転移の熱量変化を示す。

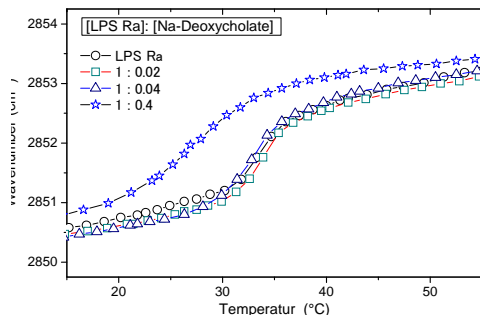


図3 胆汁酸による相転移挙動の変化

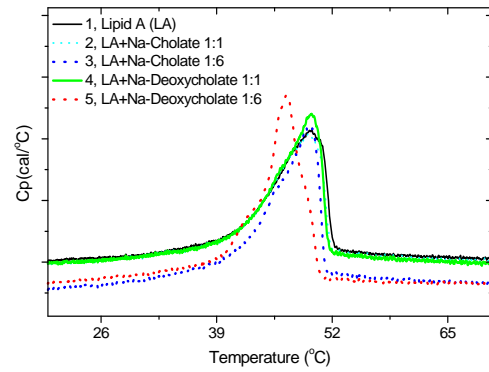


図4 相転移における熱量の変化

生物活性はサイトカイン TNF- α の生産に及ぼす影響を調べた。結果は図5a, b に示したように胆汁酸の割合が高いときに、生産量は顕著に増加した。

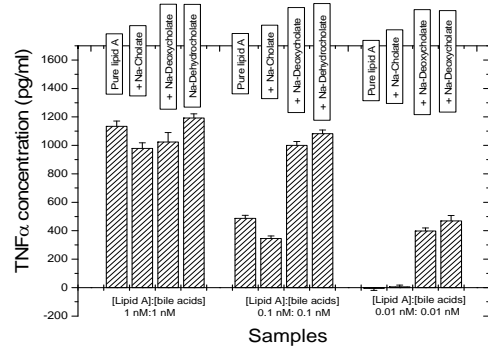


図5a リポドAと胆汁酸の混合比1:1

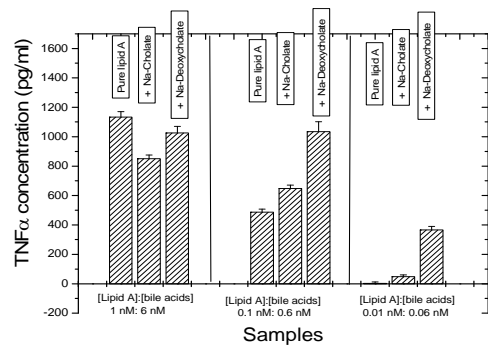


図5b リポドAと胆汁酸の混合比1:6

以上により、細菌外膜の主要構成物であるリポ多糖とペプチドや胆汁酸類との相互作用によって、分子配列状態が変化し、このためにリポ多糖の生物活性が抑制・向上しており、配列変化に着目して制御可能と示唆された。表2に生体関連物質による変化を、リポ多糖に結合するタンパク質類での結果と合わせて示す。

表 2 リポ多糖に及ぼす生体関連物質の効果

| 化合物 | 生物活性 | 高次構造変化 |
|---------|------|--------|
| ペプチド | 低下 | マルチラメラ |
| 抗菌タンパク質 | 低下 | マルチラメラ |
| アルブミン | 変化無 | 変化無 |
| ヘモグロビン | 増強 | キュービック |
| 胆汁酸 | 増強 | キュービック |

(3) 表面増強ラマンスペクトル分光によるリポ多糖の高感度測定に関しては、金属微粒子凝集体とタンパク質を組合せ、ラマンスペクトル測定で評価可能なことが分かった。

以上の結果は、国内外の研究集会及び国際専門雑誌で論文発表され、抗菌剤開発の基盤的知見としての意義が認められている。今後、実用的観点からの検討を進めることで、応用価値の提示が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Satoshi Fukuoka, Walter Richter, Jörg Howe, Jörg Andrä, Manfred Rössle, Christian Alexander, Thomas Gutschmann and Klaus Brandenburg, Biophysical investigations into the interactions of endotoxins with bile acids, *Innate Immunity*, 査読有り, Vol.18, 2012, pp. 301-317.

DOI:10.1177/1753425911404093

② Klaus Brandenburg, Patrick Garidel, Satoshi Fukuoka, Jörg Howe, Michel H. J. Koch, Thomas Gutschmann, and Jörg Andrä, Molecular basis for endotoxin neutralization by amphipathic peptides derived from the α -helical cationic core-region of NK-lysin, *Biophysical Chemistry*, 査読有り, Vol.150, 2010, pp. 80-87.

DOI:10.1016/j.bpc.2010.01.009

[学会発表] (計 8 件)

① 福岡 聡, Walter Richter, Jörg Howe, Jörg Andrä, Manfred Rössle, Christian Alexander, Thomas Gutschmann, and Klaus Brandenburg, リポ多糖の膜構造や生物活性を変化させる生体関連分子、日本化学会第92春季年会, 2012年3月25日, 神奈川県・慶応義塾大学

② 伊藤民武, 金属ナノ構造体とプラズモン

共鳴の解析に基づく SERS 電磁理論の定量的検証、北海道大学電子研講演会(招待講演), 2011年4月22日, 北海道・北海道大学

③ 伊藤民武, 単一ナノ粒子分光を用いた表面増強ラマン散乱メカニズムの解明と生体サンプルへの応用, 岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科セミナー, 2011年1月19日, 岡山県・岡山理科大学

④ Satoshi Fukuoka, Walter Richter, Jörg Howe, Jörg Andrä, Manfred Rössle, Christian Alexander, Thomas Gutschmann, and Klaus Brandenburg, Incorporation of bile acids into *Erwinia carotovora* lipid A aggregates and influence on their biological activity and phase behaviors, International Endotoxin and Innate Immunity Society Conference (IEIIS2010), 2010年10月8日, カナダ・バンクーバー・フェアモントホテル

⑤ 北濱康孝, 伊藤民武, 石堂智美, 平野研, 石川満, 単一大腸菌表面に光還元合成した銀ナノ粒子からの表面増強ラマン散乱, 第71回応用物理学会学術講演会, 2010年9月16日, 長崎県・長崎大学

⑥ 伊藤民武, 表面増強ラマン散乱分光による疾病関連分子や細胞表面タンパク質分子の超高感度識別, 第2回環境・生体の関わる物理・化学の研究会, 2010年6月3日, 沖縄県・琉球大学

⑦ 福岡 聡, Jörg Howe, Jörg Andrä, Thomas Gutschmann, and Klaus Brandenburg, アミノ酸置換抗菌ペプチドの細菌外膜への結合と抗菌活性, 日本化学会第90春季年会, 2010年3月28日, 大阪府・近畿大学

⑧ Klaus Brandenburg, Patrick Garidel, Satoshi Fukuoka, Jörg Howe, Michel H. J. Koch, Thomas Gutschmann, and Jörg Andrä, エンドトキシンの両親媒性ペプチドによる活性中和の分子機構, 平成21年度産技連LsBt合同発表会, 2010年2月4日, 茨城県・産業技術総合研究所

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 聡 (FUKUOKA SATOSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号: 40357885

(2) 研究分担者

伊藤 民武 (ITO TAMITAKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号: 00351742