

## 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25年5月30日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22603012

研究課題名（和文） 蛍光イメージングによる高活性抗菌ペプチドの細胞内導入の評価

研究課題名（英文） Fluorescence imaging analysis of cell-penetrating antimicrobial peptide with potentiated activity

## 研究代表者

橋本 茂樹 (HASHIMOTO SHIGEKI)

東京理科大学・基礎工学部・講師

研究者番号：10287477

## 研究成果の概要（和文）：

ミツバチ由来の抗菌ペプチドであるアピデシンは、大腸菌のようなグラム陰性細菌に対して静菌的に作用する事が知られている。本研究では、アピデシンの抗菌活性及び作用スペクトルを改変するため、ペプチド中の特定のアミノ酸に注目して、アミノ酸置換の効果を調べた。興味深い事に、改変されたアピデシンは、本来アピデシンに感受性を示さない種類の細菌の増殖を強く阻止するようになった。この知見は、アピデシンの抗菌作用のしくみを理解する上で重要な意味をもつ。

## 研究成果の概要（英文）：

Apidaecin is an antimicrobial peptide produced by honey bee. This peptide selectively inhibits the growth of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. In this study, the key amino acids in apidaecin sequence were substituted with other amino acids to improve the bacteriostatic activity and target selectivity of wild-type peptide. Interestingly, the resultant mutant peptides have shown potent activities for Gram-positive bacteria, which is originally insensitive to apidaecin. This finding has important implications for clarification of the action mechanism of apidaecin.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：抗菌ペプチド，アピデシン，抗菌活性，グラム陽性菌，グラム陰性菌，大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

|

アピデシンは、ミツバチ由来の18アミノ酸残基から成る抗菌ペプチドである。このペプチドは、大腸菌のようなグラム陰性菌に作用して抗菌活性を発揮する。このペプチドの作用機構は、i) 標的細菌の細胞膜透過とii) 細胞内標的分子への結合の二つの過程に分けて考える事ができる。しかし、これら過程の詳細な機構は、ほとんど解明されていない。

田口らは、アピデシンの可変領域1 (図1, GNN 残基) に、ランダム変異を導入する事により、高活性アピデシン変異体 (変異体 I) を創製した。この変異体 I は、大腸菌に対して野生型ペプチドの約10倍強い抗菌活性を示した。また細胞内導入の測定から、変異体 I の可変領域に含まれるアルギニンのような塩基性アミノ酸とバリンのような疎水性アミノ酸は、変異体の効率的な細胞膜透過に関与する事が示唆された。従って、細胞内導入量と抗菌活性の関係から、変異体 I の抗菌活性の発揮には、上記 i) と ii) 過程のうち、i) の過程が大きく寄与する事が示唆された。

**GNNRPVYIPQPRPPHPRL**

可変領域1      可変領域2      保存領域

被検菌	グラム陽性菌		グラム陰性菌
	<i>M. luteus</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
MIC (μM)	>100	>100	25

図1 アピデシン野生型のアミノ酸配列と抗菌活性

## 2. 研究の目的

本研究では、アピデシンの可変領域2 (図1, VYI 残基) に注目して、この領域のアミノ酸を置換した変異体 II を作製する。この変異体 II の抗菌特性を調べる事により、アピデシンが抗菌活性を発揮する際における可変領域2の役割を推定する。更に変異体 II を高

活性な変異体 I と掛け合わせる事によって、より有用で新規な変異体 III の創製も行う。このような新たに作製される変異体 II と変異体 III の抗菌特性を、野生型と既存の変異体 I の特性と比較・検討する。そして抗菌特性の解析を通じて、高活性化や抗菌スペクトル改変のための指針を確立するとともに、アピデシンの作用機構の解明に迫る。

## 3. 研究の方法

アピデシンの変異体ペプチドは、Fmoc 固相合成法に従って化学合成した。変異体のアミノ酸配列を固相上で伸長した後、固相からの切り出しと脱保護を行って、粗ペプチドを得た。最終的に、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により、純粋な変異体ペプチドを得た。目的ペプチドの構造は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析により確認した。

変異体ペプチドの抗菌活性は、グラム陽性菌として *Micrococcus luteus* (ルテウス菌) と *Corynebacterium glutamicum* (コリネ菌)、グラム陰性菌として *Escherichia coli* (大腸菌) を用いて、最小生育阻害濃度 (MIC) 検定により評価した。段階希釈した変異体ペプチドを、タイタープレート上で被検菌に対して加えて、一定時間振とう培養した後、MIC 値を決定した。

変異体ペプチドの細胞内導入のようすは、蛍光顕微鏡を用いて評価した。ペプチドのN末端にリシン残基を結合して、リシンのN末アミノ基をカルボキシフルオレセイン (FAM) で蛍光標識したペプチドを、被検菌に作用させた。その後、菌体を洗浄・回収して、被検菌における蛍光の局在を、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

細胞内に導入された変異体ペプチドの量は、MALDI-TOF 質量分析により測定した。一

定時間、ペプチドを被検菌に作用させた後、被検菌を超音波により溶菌化して遠心分離した。続いて、分離した溶液の上清をMALDI-TOF 質量分析にかけて、ピーク面積からペプチド量を見積もった。

#### 4. 研究成果

まず、可変領域2に含まれるアミノ酸を他のアミノ酸（フェニルアラニン、アルギニン等）に置換して、**変異体II**ペプチドを新たに作製した。**変異体II**の各種被検菌に対する抗菌活性を測定したところ、大腸菌に対する活性は、野生型ペプチドと比べて低下した。一方グラム陽性菌では、本来アピデシンに感受性のないルテウス菌に対する活性が見られた。この結果は、可変領域2のアミノ酸置換によって、アピデシンの抗菌スペクトルを改変できる可能性を示すものであった。

次に、抗菌スペクトルが反転した**変異体II**の可変領域2と、高活性化した**変異体I**の可変領域1の組み合わせ効果を調べるため、これら変異体のアミノ酸配列を可変領域としてもつ**変異体III**を新たに作製した。**変異体III**の各種被検菌に対する抗菌活性を測定したところ、大腸菌に対する抗菌活性は、ほとんど見られなかった。対照的に、グラム陽性菌に対する活性は、野生型と比べて著しく増大した。特にルテウス菌に対しては、非常に強い活性が見られた。この結果は、アピデシンの可変領域1と可変領域2のアミノ酸置換によって、抗菌スペクトルはグラム陰性菌からグラム陽性菌に反転してかつ、高活性化される事を示すものであった。

顕著な抗菌特性を有する**変異体III**の抗菌作用機構を推定するため、**変異体III**の被検菌細胞内への導入を検討した。FAM で標識した**変異体III**ペプチドを大腸菌細胞に作用させたところ、意外にも**変異体III**は野生型ペプチ

ドと同じように、細胞内へ導入される事が観察された。そこで、**変異体III**の導入量を質量分析により見積もった。その結果、野生型に比べて多くの**変異体III**が大腸菌内に導入される事が判明した。同様な蛍光観察によって、**変異体III**のコリネ菌（グラム陽性菌）細胞内への導入も検討した。その結果、野生型はほとんど導入されなかったのに対して、**変異体III**は細胞内へ導入される事が明確に観察された。質量分析により、大腸菌に対する導入量よりも少ないが、有効な量の**変異体III**がコリネ菌に導入される事が確認された。これらの結果より、**変異体III**は大腸菌だけでなく、本来アピデシンが活性を示さないグラム陽性菌の内側にも導入される事が示された。

更にアピデシンの細胞内標的分子の同定も試みた。野生型ペプチドをカラムに固定化して、親和性クロマトグラフィーを行ったところ、分子シャペロンとして知られる DnaK タンパク質以外にも、標的タンパク質の存在が示唆された。現在、標的候補を単離して、シーケンス解析及び質量分析を行い、同定を進めている。今後は、**変異体III**などの改変型ペプチドを所有している強みを生かして、これをプローブ的に用いて、野生型との差が浮き出るような現象を見出す事により、アピデシンの抗菌作用機構の完全解明を目指す予定である。

以上の実験結果をまとめると、高活性変異体のアミノ酸配列を掛け合わせる形で、新たなアミノ酸置換が施されたアピデシン変異体は、抗菌作用スペクトルが反転して、本来アピデシンが不活性なグラム陽性菌に強い活性を示すようになった。この変異体ペプチドは、活性を示さなくなったグラム陰性菌にも導入される事から、本研究で注目した可変領域2は、アピデシンの細胞内標的との結合において重要な役割を果たすと考えられる。

本研究のように、野生型抗菌ペプチドのアミノ酸を部位特異的に置換する事によって、特殊な変異体を作製し、その抗菌特性を解析して得られる有用な情報を、作用機構の解明に繋げる研究は、これまで抗菌ペプチドの研究分野では行われていない。本研究を通じて得られた知見は、新規抗菌薬の創製に向けた改変型アピデシンの重要な設計指針になると期待される。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計5件)

(1) N末分子デザインによる抗菌ペプチド「アピデシン」の高活性体創出；山形享子，橋本茂樹，折笠善丈，松本謙一郎，田口精一；第62回 日本生物工学会大会；宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット；2010年10月29日

(2) 抗菌ペプチド「アピデシン」のN末端領域分子デザインによる高活性変異体の作製と抗菌スペクトル評価；若林雅明，岩村雄太，松本謙一郎，橋本茂樹，大井俊彦，田口精一；日本農芸化学会 2011年度大会；京都女子大学；2011年3月26日

(3) アミノ酸残基置換による抗菌ペプチド「アピデシン」の抗菌スペクトルの改変；岩村雄太，山形享子，若林雅明，松本謙一郎，橋本茂樹，大井俊彦，田口精一；日本農芸化学会北海道支部学術講演会；北海道大学農学部；2011年11月4日

(4) 抗菌ペプチド「アピデシン」の可変領域への変異導入とその抗菌活性への影響；三宅政裕，岩村雄太，松本謙一郎，橋本茂樹，大井俊彦，田口精一；日本農芸化学会年度大会；京都女子大学；2012年3月25日

(5) 可変領域への変異導入とその組み合わせ

せによる抗菌ペプチド「アピデシン」の抗菌スペクトル改変；三宅政裕，岩村雄太，松本謙一郎，橋本茂樹，大井俊彦，田口精一；日本農芸化学会北海道支部平成24年度講演会；北海道大学農学部；2012年11月3日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 茂樹 (HASHIMOTO SHIGEKI)

東京理科大学・基礎工学部・講師

研究者番号：10287477

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：