

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2012～2012  
 課題番号：24651263  
 研究課題名（和文）ヒト抗菌性ペプチドの機能発現に対する病原細菌分泌アウターメンブランベシクルの関与  
 研究課題名（英文）Outer membrane vesicles (OMVs) mediated protection of *E. coli* against effects of human antimicrobial peptides.  
 研究代表者  
 和田 昭裕 (WADA AKIHIRO)  
 長崎大学・熱帯医学研究所・講師  
 研究者番号：70253698

研究成果の概要（和文）：生体内にてグラム陰性細菌の外膜がバディングして、アウターメンブランベシクル(OMV)が分泌することが知られている。外膜構成物のみならず病原因子も含まれるOMVは、ヒト抗菌性ペプチドが病原細菌を攻撃するときのトラップとして働くのかどうか調べた。ヒト抗菌性ペプチドであるhuman  $\beta$ -defensin-2(hBD-2)による大腸菌への抗菌活性はアッセイ系にOMVを添加した結果、OMVの濃度依存的に大腸菌への抗菌活性の阻害が認められた。このような阻害作用は、OMVがhBD-2と直接相互作用をおこなっているのかどうか、蛍光標識hBD-2とOMVの相互作用を蛍光相関分光法にて調べた結果、hBD-2とOMVの直接の結合が認められた。以上の結果は、ヒト抗菌性ペプチドhBD-2とOMVが直接結合することによりOMVが抗菌活性に対して防御的に働くことがわかった。

研究成果の概要（英文）： Gram-negative bacteria produce outer membrane vesicles (OMVs), and OMVs have proposed roles in virulence, inflammation, and the response to envelope stress.

We studied human antimicrobial effects against *E. coli* to evaluate whether OMVs-mediated antimicrobial protection occurs. Human antimicrobial peptides, human  $\beta$ -defensin (hBD-2) showed antimicrobial effects against *E. coli* by radial diffusion assay, and supplementation with purified OMVs provided protection of *E. coli* against antimicrobial effects of hBD-2.

To examine direct interaction of OMVs to hBD-2, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was used for this study with fluorescence-labeled hBD-2. By FCS, direct interaction of OMVs to hBD-2 was detected. These findings offer direct binding of bacterial OMVs to hBD-2 neutralized its antimicrobial activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ディフェンシン、抗菌性ペプチド、アウターメンブランベシクル、OMV

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌の外膜が生体内にてバディングして OMV (Outer Membrane Vesicles) が分泌することが知られている。OMV は外膜構成物のみならず、病原因子(ピロリ菌の空胞化毒素 VacA、ETEC の下痢毒素 LT、赤痢菌の志賀毒素など)が菌本体より濃縮された状態で存在することが知られている。このような毒素の宿主への輸送に関わっているという報告がある(EMBO J, 2004)。OMV があることにより、宿主のプロテアーゼなどにより分解を受けることなく宿主細胞に到達できるというメリットがある。また、興味深いことに病原性を示さない大腸菌に比べて、病原性を示す大腸菌 ETEC においては OMV の分泌量が 10 倍以上あることも知られており(JBC, 2002)、OMV が病原細菌の病原性と関わりがあることが指摘されているが OMV の機能の詳細は明らかではない。

ヒトの生体防御の自然免疫をつかさどる抗菌性ペプチドとしては、LL-37、ディフェンシン、ヘプシジンなどが良く知られている。中でもディフェンシンは大きなファミリーを形成しているヒト抗菌性ペプチドで、3つのジスルフィド結合が分子内に認められ、塩基性アミノ酸に富んだ構造を持っている。ディフェンシンファミリーの一員である human  $\beta$ -defensin-2 (hBD-2) は、上皮細胞に広範囲に発現しており、病原細菌に刺激により発現が誘導される抗菌性ペプチドである。

こうしたヒト抗菌性ペプチドの抗菌活性に対するグラム陰性菌の OMV の防御的作用は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

これまでに病原細菌の感染に伴うヒト抗菌性ペプチドの発現誘導の作用機序および活性に関する研究をおこなってきた。それらの抗菌性ペプチドの研究の一環として、ヒト抗菌性ペプチドの病原細菌に対する抗菌活性の発現する場において、グラム陰性病原細菌が OMV を分泌することにより、防御的作用を示すのではないかと考えた。

ヒト抗菌性ペプチドは病原細菌に直接結合することにより抗菌活性を示す。このことから恐らく抗菌性ペプチドは菌体表面膜を含む OMV にも直接結合することが予想され、OMV の分泌量の多さと抗菌性ペプチドへの耐性とは相関関係があることが考えられた。

そこで、本研究においては OMV の新規な機能として、抗菌性ペプチドへの耐性に関わっていることを考え、実験的に明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

グラム陰性細菌の分泌する OMV を調製するために、まず細菌の液体培養をおこない、そ

の後に培養液の遠心分離をおこない培養上清を分取した。培養上清は 0.25 $\mu$ m のフィルターを用いてフィルトレートをおこなった。限外濾過により溶液の濃縮をおこなった後に、超遠心をおこない OMV を遠心分取し、PBS で 2 回洗い OMV を調製定量した。

ヒト抗菌性ペプチドの細菌に対する抗菌活性は申請者らが既に報告している (Antimicrob. Agents Chemother., 1996) 少量の抗菌性ペプチドで抗菌活性が測定可能なラジアルディフュージョンアッセイを用いて解析をおこなった。この細菌に対する抗菌性ペプチドのアッセイ系に、種々の濃度の OMV の添加をおこない、濃度依存的に抗菌活性が阻害されるかどうかを調べ、OMV がヒトの抗菌性ペプチド活性の阻害に関わっているかどうか評価をおこなった。

調製した OMV に抗菌性ペプチドが結合するかどうか、まず、蛍光標識したヒト抗菌性ペプチドを化学合成により調製した。蛍光標識した抗菌性ペプチドと OMV を混合して、蛍光相関分光法により相互作用を評価した。

蛍光相関分光法は蛍光標識ペプチドだけでは蛍光のゆらぎがなくシグナルは検出されないが、蛍光標識ペプチドが OMV と結合した場合は分子量が大きくなったことで移動速度が遅くなり、蛍光のゆらぎが見られ、相互作用のシグナルが検出できる方法である。

## 4. 研究成果

(1) OMV を良く分泌する遺伝子欠損大腸菌株から OMV の調製

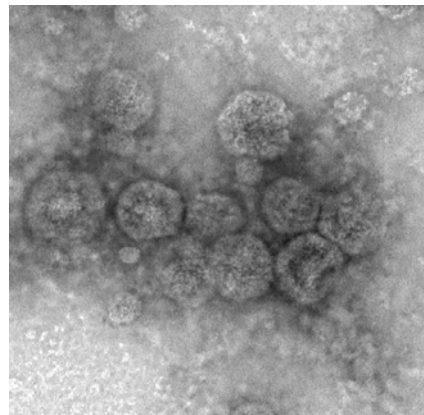


図 1 : 分取調製した OMV の電顕観察

ヒト抗菌性ペプチドが病原細菌に作用するときの OMV の役割を調べるために、まず OMV の調製をおこなった。

そのため、OMV をより多く分泌する遺伝子欠損大腸菌株を調べた結果、*nlpI* の遺伝子欠損大腸菌株が OMV を良く分泌しており、透過型電子顕微鏡にて OMV が観察された。この *nlpI* 遺伝子欠損大腸菌株の液体培養をおこない、培養上清から OMV を分取および調製した。調製した OMV を透過型電子顕微鏡で観察

した結果、OMVのサイズは約50nmほどの大きさであった(図1)。

(2) OMVの存在下非存在下におけるヒト抗菌性ペプチド human  $\beta$ -defensin-2(hBD-2)の効果

ヒト抗菌性ペプチドであるhBD-2による大腸菌への抗菌活性は、既報にあるラジアルディフュージョンアッセイ法により確かめた。抗菌活性が強いほどより大きな阻止円の形成が認められる。抗菌活性の実験結果から、hBD-2の濃度依存的に大腸菌に対する抗菌活性が確認された。

この抗菌活性のアッセイ系に調製したOMVの濃度を変化させてアッセイ系に添加し、ラジアルディフュージョンアッセイ法により抗菌活性を調べた。その結果、OMVの濃度依存的に大腸菌へのhBD-2の抗菌活性の阻害が認められた(図2)。このことから、OMVはhBD-2による抗菌作用に防御的に働くことが明らかになった。

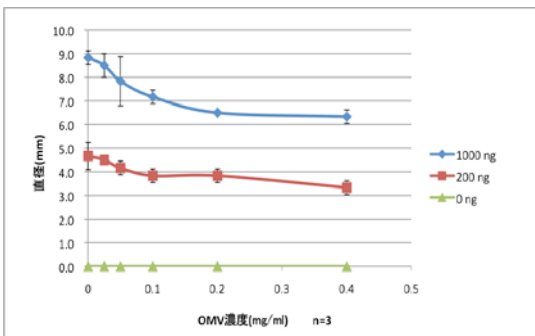


図2: OMVの添加によるhBD-2の抗菌活性への影響

(3) 蛍光標識hBD-2の調製

OMVによる大腸菌へのhBD-2の抗菌活性の阻害作用は、OMVがhBD-2と直接相互作用をおこない、OMVがhBD-2のトラップとして作用しているのかどうか調べるために、蛍光標識hBD-2を調製した。

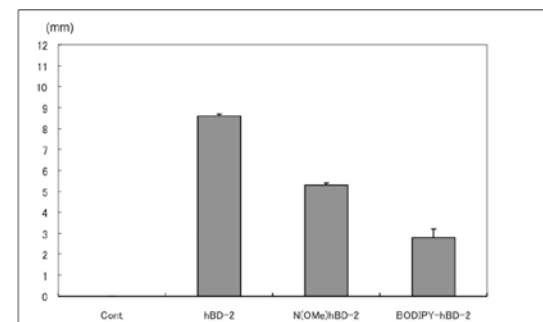


図3: 蛍光標識hBD-2の抗菌活性

まず、Fmoc基をアミノ基の保護基とする固

相合成法によりhBD-2のN末端にBoc-N(OMe)Glyを付加させたhBD-2を合成し、TFA処理によりBoc基を除去し、N(OMe)hBD-2を合成した。さらにBODIPYを化学反応によりN末端に付加させたBODIPY-hBD-2(蛍光標識hBD-2)を調製した。科学合成により調製した蛍光標識hBD-2の抗菌活性はラジアルディフュージョンアッセイ法により確認された(図3)。

(4) OMVとヒト抗菌性ペプチドhBD-2との相互作用の解析

hBD-2の抗菌活性に対するOMVによる阻害作用は、OMVがhBD-2と直接相互作用をおこない、OMVがhBD-2のトラップとして作用しているのかどうか調べることにした。そのため、蛍光標識hBD-2とOMVの相互作用を蛍光相関分光法にて調べた。

その結果、蛍光標識hBD-2のみでは観察されない蛍光のゆらぎが、調製したOMVを添加することにより濃度依存的に蛍光のゆらぎが観察され、hBD-2とOMVは直接相互作用をおこなっていることが認められた(図4)。

以上の結果は、ヒト抗菌性ペプチドの病原細菌への抗菌作用に対してOMVが直接抗菌性ペプチドと結合することにより防御的に働くことがわかった。

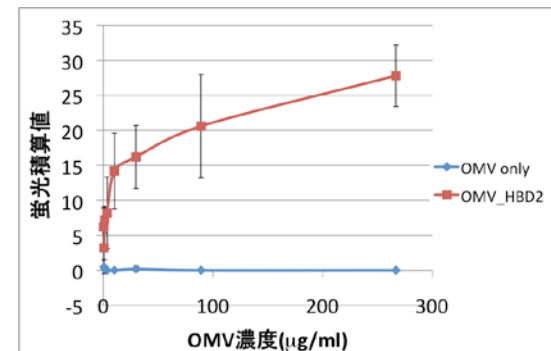


図4: OMVとhBD-2の相互作用

## 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1件)

① Wada A. et al., Alarin but not its alternative-splicing form, GALP (Galatin-like peptide) has antimicrobial peptide. (2013) Biochem. Biophys. Res. Commun., 434, 223-227. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

① 和田昭裕ら、摂食亢進ペプチドAlarinの新規な生物活性、日本熱帯医学会、帯広、2012年9月5日～9月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 昭裕 (WADA AKIHIRO)

長崎大学・熱帯医学研究所・講師

研究者番号：70253698