

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460179

研究課題名(和文) 内毒素などの細菌由来生物活性物質の低毒性誘導体生合成システム創出

研究課題名(英文) Creation of a low toxic derivative biosynthesis system for biologically active substances derived from bacteria such as endotoxin

研究代表者

川崎 清史 (Kawasaki, Kiyoshi)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60270641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌はヒト免疫系を活性化する成分を含有している。その類縁体は医薬品シーズになり得る。細菌の生合成・代謝系を改変して類縁体を細菌内で生合成する系の創出が有効である。Achromobacter xylosoxidansにはオルニチン含有脂質が存在する。オルニチン含有脂質をはじめアミノ酸含有脂質にはアジュバント活性が知られている。そこでアミノ酸含有脂質のマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計による分析法を確立して、水酸化オルニチン含有脂質の検出と精製を行った。水酸化型オルニチン含有脂質と非水酸化型オルニチン含有脂質の生物活性比較を行ったが、調べた限りでは違いはなかった。

研究成果の概要(英文)：Bacteria contain components that activate the human immune system. The analog can be a pharmaceutical seed. It is effective to create a system in bacteria by modifying the biosynthesis / metabolic system. Achromobacter xylosoxidans has ornithine-containing lipids. Adjuvant activity is known for amino acid-containing lipids including ornithine-containing lipids. Therefore, an analytical method using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer of amino acid-containing lipids was established. Detection and purification of hydroxylated ornithine-containing lipids were carried out using the analytical method. The bioactivity of hydroxylated ornithine-containing lipids and nonhydroxylated ornithine-containing lipids was compared, but there was no difference as far as it was investigated.

研究分野：生化学

キーワード：エンドトキシン 脂質 質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

細菌はヒト免疫系を活性化する成分を含有している。そして、その成分類縁体はワクチンアジュバントや抗がん剤などの医薬品シーズになり得る。そのために細菌の生合成・代謝系を改変して類縁体を細菌内で生合成する系の創出が有効だと考えられる。エンドトキシンの本体であるリポ多糖のリピド A 部位と、アミノ酸含有脂質と呼ばれる脂質群について類縁体生合成系の創出および創出のための基盤研究を行うことは現代社会のニーズに合うと考えられる。

## 2. 研究の目的

細菌の生合成・代謝系を改変して、免疫賦活作用のある細菌成分の誘導体生合成系を創出する。関連研究として免疫賦活作用のある細菌成分であるリポ多糖に結合する抗菌ペプチドの作用に関する研究、マクロファージ活性化を阻害する化合物の作用に関する研究を行う

## 3. 研究の方法

アジュバント活性を有する細菌由来成分として *Achromobacter xylosoxidans* のオルニチン含有脂質に着目した。これらを脂質抽出の定法で抽出し、主に薄層クロマトグラフ

ィーを活用して精製した。同定にはマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI TOF MS) を利用した。

## 4. 研究成果

### 4 - 1. アミノ酸含有脂質のマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計による分析法確立

グラム陰性菌の一部にはアミノ酸含有脂質と命名された脂質が主要リン脂質と同程度のレベルで豊富に存在する。セリン、オルニチン、グリシン等を含むアミノ酸含有脂質が知られているが、このうち *A. xylosoxidans* にはオルニチン含有脂質が存在することが知られている。オルニチン含有脂質をはじめアミノ酸含有脂質にはアジュバント活性が知られている。この脂質群の誘導体生合成に関する研究は本課題の研究テーマであるが、アミノ酸含有脂質の研究はあまりされていないので、まず分析法の開発から着手した。質量分析計によるアミノ酸含有脂質分析法を確立して、効率的な同定を可能にすることを本年度の目標とした。*A. xylosoxidans* のオルニチン含有脂質をマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間

型質量分析計 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI TOF MS) を利用して分析する方法の確立を試みた。まず、*A. xylosoxidans* のオルニチン含有脂質を定法に従い精製した。精製したオルニチン含有脂質を MALDI TOF MS を用いてポジティブイオンモードで分析したところ、オルニチン含有脂質に相当すると考えられる質量ピークを検出することができた。そのピークがオルニチン含有脂質であることを裏付けるために、MALDI TOF/TOF MS 分析してフラグメントイオンの分析を行った。その結果、オルニチン含有脂質であることを支持する質量ピークが得られた。以上の結果から、オルニチン含有脂質を MALDI TOF MS を利用して分析する方法の確立ができた。

#### 4 - 2 . 水酸化オルニチン含有脂質の検出と精製

確立したオルニチン含有脂質のマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) による分析法を用いて、*A. xylosoxidans* 由来のオルニチン含有脂質を分析したところ、通常のもの(オルニチン脂質)に加えて水酸化されたものも(水酸化オルニチン脂質)が存在することが明らかになった。そこで水酸化オルニチン脂

質とオルニチン脂質を精製することを次の目標とした。精製の暁には生物活性の比較を視野に入れている。オルニチン脂質の精製はこれまでに報告があるので、水酸化オルニチン脂質の精製が新規の研究に相当する。薄層クロマトグラフィーを用いた分離により水酸化オルニチン脂質とオルニチン脂質を共に二次元薄層クロマトグラフィーでシングルスポットにまで精製することができた。

#### 4 - 3 . 水酸化型と非水酸化型オルニチン含有脂質の生物活性比較

ここまでの研究でこの細菌が保有するオルニチン脂質の水酸化型と非水酸化型の2種類の精製を行った。それを用いて生物活性の比較を行った。マウスマクロファージ様培養細胞に対してサイトカイン分泌誘導活性は水酸化型と非水酸化型で同じであった。従って両者に活性の違いは無いと考えられた。一方、リポ多糖の活性の本体であるリピドA、モノホスホリルリピドA、オルニチン含有脂質の三者で、マウスマクロファージ様培養細胞に対してサイトカイン分泌誘導活性を比較した。その結果オルニチン含有脂質はリピドAよりは活性が弱いがモノホスホリルリピドAよりも活性が強かった。オルニチン含有脂質の活性の詳細を知るためにサイトカインレスポンスの詳細、細胞内シグナル伝達

の詳細、細胞表面受容体、についてリポド A ,  
モノホスホリルリポド A と比較しながら解  
析を進めていく研究の方向性が大切である  
ことがはっきりとしてきた。

#### 4 - 4 . 抗菌ペプチドの標的としてのリポ 多糖に関する研究

エンドトキシンの本体であるリポ多糖は  
抗菌ペプチドの標的になる。抗菌ペプチドの  
アミノ酸を D 体アミノ酸で合成した D - 抗  
菌ペプチドは L - 抗菌ペプチドよりも活性  
が強い場合がある。その原因として、リポド  
A と D - 抗菌ペプチドの親和性が強い場合  
があることがわかった。

#### 4 - 5 . リポ多糖刺激を阻害す薬剤イミダ ゾリン化合物の作用機序

リポ多糖刺激を阻害する薬剤であるイミ  
ダゾリン化合物の作用機序の解析を行った。  
その結果一部のイミダゾリン化合物は、その  
作用機序は不明である が、オートファジー  
を誘導する作用があることがわかった。この  
作用とリポ多糖刺激を阻害する作用との関  
連を明らかにすることが今後の課題である  
と考えられた。

#### 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 )

Takayuki Manabe and Kiyoshi Kawasaki: D-form  
KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub> peptide exerts higher  
antimicrobial properties than its L-form  
counterpart via an association with bacterial cell  
wall components. *Scientific reports* (2017)

7:43384 DOI:10.1038/srep43384

Shiori Nakagawa, Takayuki Ueno, Takayuki

Manabe, and Kiyoshi Kawasaki: Imidazolines

increase the levels of the autophagosomal marker  
LC3-II in macrophage-like RAW264.7 cells. *Can.*

*J. Physiol. Pharmacol.* (2018) In press

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

安藤美菜子、多田絢夏、由岡麻衣香、川崎清  
史; *Achromobacter xylosoxidans* からの水酸  
化オルニチン脂質精製、日本薬学会 第 136  
年会、2016 年 03 月 29 日、パシフィコ横浜  
( 神奈川県横浜市 )

安藤美菜子、橋村咲良、川崎清史 ;  
*Achromobacter xylosoxidans* 由来水酸化オ  
ルニチン脂質の免疫刺激活性、日本薬学会第  
137 年会、2017 年 03 月 27 日、仙台国際セ  
ンター ( 宮城県仙台市 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

川崎 清史（KAWASAKI KIYOSHI）

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60270641