

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860080

研究課題名(和文)3重らせん型抗菌ペプチドの開発

研究課題名(英文)Development of triple-helical antimicrobial peptides

研究代表者

増田 亮 (Masuda, Ryo)

早稲田大学・理工学術院・その他

研究者番号：90632159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌ペプチドは広い抗菌スペクトルと細菌に対する選択性から魅力的な抗菌剤ではあるが、ペプチドは生体内で容易に分解されてしまう。近年、報告者の研究室では、生体内でも安定なペプチドとして3重らせんペプチドを報告した。3重らせんペプチドのコンビナトリアルライブラリから抗菌活性を有するペプチドをスクリーニングし、活性物を構造活性相関することで抗菌ペプチドRR4を開発した。RR4は薬剤耐性菌を含む菌に対して抗菌活性を示した。その作用機序は、ペプチドが菌内に移行し、核酸と相互作用することで細菌の分裂を阻害していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial peptides (AMPs) are promising alternatives for treating infections because of their broad antimicrobial spectra and their high selective toxicity against bacteria. However, the instability of peptides in bodily fluids is one of the major drawbacks that limit their in vivo use. Previously, we found peptides forming collagen-like triple-helical structures were stable in bodily fluid, because their rigid structures contributed to resistance against proteolytic enzymes. Herein, we constructed a combinatorial library composed of triple-helical peptides. Screening of the peptide pools and the following structure-activity relationship study, we developed more potent peptide RR4. RR4 exhibited antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, including multidrug resistant strains. Further study revealed RR4 exhibited antimicrobial activity by interaction with intercellular molecules such as DNA/RNA that inhibited cell division.

研究分野：ペプチド創薬

キーワード：コラーゲン 抗菌ペプチド 多剤耐性菌 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

これまでの抗菌剤の濫用により、薬剤耐性菌の出現が問題になっており、薬剤耐性菌に有効な抗菌剤を開発しても、それらに対する耐性菌が再び出現するという、いたちごっこの状況が続いている。一方で抗菌ペプチドは、薬剤耐性菌に対して有効な薬剤として考えられている。抗菌ペプチドの作用は、細菌膜を破壊したり、細菌内の分子に非特異的に相互作用したりすることによって生じる。そのため、既存の薬物とは作用機序が異なり、細菌がこれらの作用に対応して耐性を獲得しにくい、と考えられる。しかしながらペプチドの問題点として、生体内に投与すると酵素によって分解されてしまう点が挙げられる。

近年、報告者の研究室では、生体内でも安定なペプチドとして3重らせんペプチドを報告した[1]。3重らせんペプチドは3本のペプチド鎖が縊り合わさった剛直な構造を取っている。それらが3重らせん構造を形成するために必要な一次配列は Xaa-Yaa-Gly の繰り返し構造である (Xaa, Yaa は任意のアミノ酸)。3重らせんペプチドを静脈内あるいは消化管内に投与すると、それらは代謝を受けることなく定量的に尿中あるいは糞便中に排泄されることを見出している。

2. 研究の目的

本研究は、抗菌性の3重らせんペプチドを開発することを目的とした。3重らせん構造を有する抗菌ペプチドは、生体内でも安定と考えられるため、*in vivo* でも抗菌活性を発現することが期待される。

3. 研究の方法

(1)抗菌性の3重らせんペプチドを効率的に探索するために、3重らせんペプチドのコンビナトリアルライブラリを構築することとした。3重らせんペプチドが3本のペプチド鎖から形成される性質を利用し、以下に示すような配列を持つペプチド鎖を混合することで、3重らせんペプチドのコンビナトリアルライブラリとした (図1)。C末端にはジスルフィド架橋によって3重らせん構造安定化のために Cys を、紫外領域の吸光度を測定することで濃度を定量するために Tyr を導入した。ペプチド鎖の合成は Fmoc 固相合成法により行った。酸性条件下でペプチドを混合後、加熱し放冷することで3重らせん構造を形成させた。その後、塩基性条件下で数日間放置することで、ライブラリを調製した。

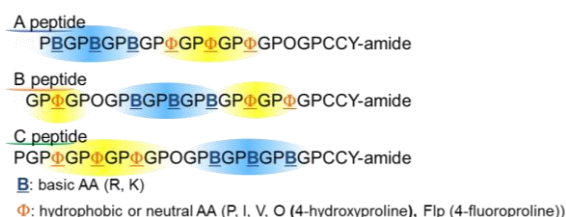


図1 デザインした3種類のペプチド

(2)抗菌活性の評価は CFU assay および微量液体希釈法によって行った。各菌を $OD_{600} = 2.5 \times 10^4$ となるように調製後、ペプチド溶液と混合し、ミュラーヒントン培地中で 37°C 、10時間振盪培養した。CFU assay の場合、培養液を希釈後、LB プレート上に播種し、一晚 37°C で静置した後に生じたコロニー数を計数した。微量液体希釈法の場合、培養液を目視で確認し、沈殿あるいは濁りが生じなかった際のペプチド溶液の最小濃度を MIC(最小発育阻止濃度)とした。

(3)脱分極誘導活性は、大腸菌のスフェロプラストに $0.4 \mu\text{M}$ の Disc3[5] を添加し 90 分間静置後、ペプチドを添加してから 10 分経過した際の蛍光 (励起 622 nm , 蛍光 670 nm) を測定することで評価した。

(4)大腸菌の形態変化の様子は、ペプチドを大腸菌に 37°C 、1時間作用させた後、グラム染色を行い観察した。

(5)蛍光ペプチドの観察は、蛍光ペプチドを大腸菌に 37°C 、1時間作用させた後、 $5 \mu\text{g/mL}$ の FM4-64 で細菌膜を染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

(6)ペプチドと核酸の相互作用は、ゲルシフトアッセイにより行った。ペプチドと核酸を混合後、3時間室温で放置した。その後、DNA は 1%アガロースゲル、RNA は 5%アクリルアミドゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色した。

(7)ペプチドの血清中での安定性は、ヒト血清中(最終濃度 90%)にペプチドを混合後、 37°C で規定時間放置後、TFA による除タンパクを行い、その上清中に含まれるペプチドの量を定量することで評価した。

4. 研究成果

まず、A, B, C 全てのペプチド鎖を含む各アミノ酸の組み合わせごとのプールの抗菌活性を評価した (図2)。すると、(Arg/Hyp)あるいは(Arg/Flp)の組み合わせを持つプールで特に強い抗菌活性を確認した。つづいて、活性本体を絞り込むために、A, B, C を含む (Arg/Hyp)あるいは(Arg/Flp)のプールから構成アミノ酸を減らしたものの抗菌活性を評価した。その結果、A ペプチドのみを含むプールで最も強い抗菌活性が確認された。この結果は、(Arg/Hyp)あるいは(Arg/Flp)の A ペプチドのホモライマーが抗菌活性を有していることを示唆するものであった。

が知られている。そこで、大腸菌のスフェロプラストに **RR4** を作用させた際に膜構造が変化しているかを、脱分極の指示薬となる Disc3[5]をもちいて評価した。その結果、膜構造を破壊するペプチドとして知られている **magainin 2** や **melittin** と比較して、**RR4** のその度合いは弱い結果となった。各菌に対する **RR4** と **magainin 2** の MIC を比較すると、**RR4** の抗菌活性の方が強い傾向にあることから、**RR4** には別の作用メカニズムがあることが示唆された。

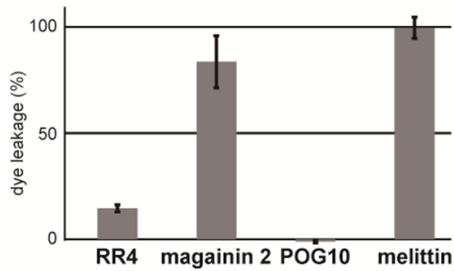


図4 各ペプチドの脱分極誘導活性

RR4 が作用した大腸菌を顕微鏡で観察すると、異常に伸びた大腸菌を観察した(図5)。一方で、**magainin 2** を作用させた大腸菌ではほとんど変化がなかった。このような伸張現象は、細菌内の分子と抗菌ペプチドが相互作用し、分裂を阻害することで観察されることが知られている[2]。

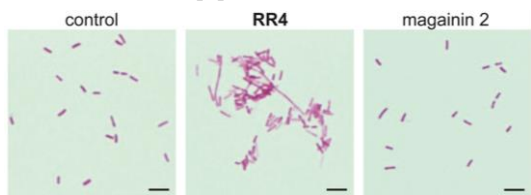


図5 各ペプチドを作用させた際の大腸菌

そこで、蛍光標識した **RR4** を合成し、大腸菌に作用させ、その後に共焦点顕微鏡で観察を行った。その結果、ペプチドが菌内に移行していることがわかった(図6)。

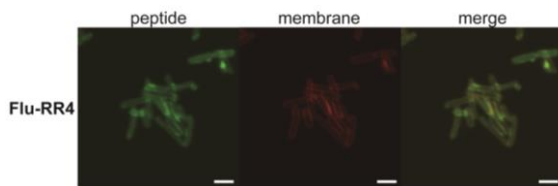


図6 蛍光標識 **RR4** を作用させた際の大腸菌

つづいて、**RR4** を DNA あるいは RNA と混合後、電気泳動を行い、泳動の阻害の有無で、**RR4** の核酸に対する相互作用能を評価した(図7)。その結果、**magainin 2** と比較して **RR4** が有意に核酸と相互作用している様子が観察された。これらの結果から **RR4** は細菌の内部に移行し、核酸と相互作用することで細菌の分裂を阻害していることが示唆された。

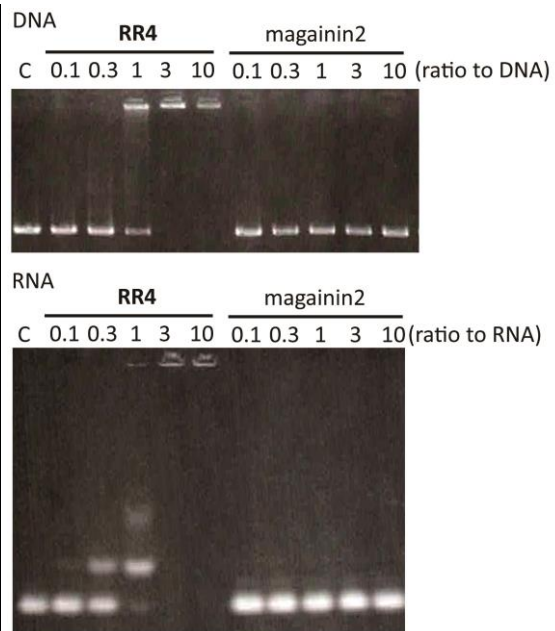


図7 **RR4** と核酸の相互作用

最後に、**RR4** の血清中での安定性を評価した(図8)。**RR4** は血清中で24時間放置しても約40%程度残存した一方で、**magainin 2** は1時間でそのほぼ全ては分解されていた。これらの結果から、3重らせん構造を形成する **RR4** は血清中で安定であることが示された。くわえて、**RR4** の細胞毒性および溶血活性を評価したところ、それらはほとんど観察されなかった。

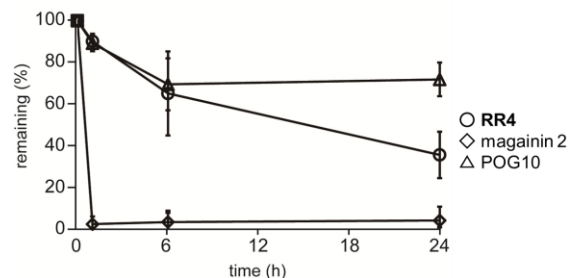


図8 **RR4** の血清中での安定性

以上の結果より、血清中でも安定な抗菌性の3重らせんペプチド **RR4** を開発することに成功した。**RR4** は細菌の内部に移行し、核酸と相互作用することで抗菌活性を発現していることが示唆された。今後は **RR4** がどのような病態に対して有効か、*in vivo* 試験を行っていく予定である。

<引用文献>

1. a) H. Yasui, C. M. Yamazaki, C. Awada, H. Nose, T. Takao, T. Koide, Biopolymers (Pept. Sci. 100, 705-713 (2013). b) T. Koide, N. Yamamoto, K. B. Taira, H. Yasui, Biol. Pharm. Bull., 39, 135-137 (2016).
2. a) R. L. Alfred, E. A. Palombo, J. F. Panozzo, M. Bhave, PLoS One 8, e75488 (2013). b) J. Yuzenkova, M. Delgado, S. Nechaev, D. Savalia, V. Epshtein, I. Artsimovitch, R. A. Mooney, R.

Landick, R. N. Farias, R. Salomon, K. Severinov,
J. Biol. Chem. 277, 50867-50875, (2002).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Ryo Masuda, Masakazu Kudo, Yui Dazai, Takehiko Mima, Takaki Koide. “Collagen-like Antimicrobial peptides.” Biopolymers (Pept. Sci.) in press (2016) 査読有.

〔学会発表〕（計 2 件）

① 増田亮、太宰結、工藤正和、美間健彦、小出隆規「抗菌性 3 重らせんペプチドの開発と作用機序の解明」、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月 29 日

② 増田亮、工藤正和、太宰結、美間健彦、小出隆規「コンビナトリアル 3 重らせんペプチドライブラリを用いた抗菌ペプチドの探索」、第 52 回ペプチド討論会、平塚、2015 年 11 月 18 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗菌性 3 重らせんペプチド

発明者：小出隆規、増田亮、工藤正和、太宰結、美間健彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特許出願 2015-130295 号

出願年月日：2015 年 6 月 29 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 亮 (MASUDA, Ryo)

早稲田大学・先進理工学部・助教

研究者番号：90632159