

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006 ~ 2008
課題番号：18390569
研究課題名 (和文) デザインペプチドライブラリー構築による細菌付着阻止分子探索と感染性心内膜炎予防
研究課題名 (英文) Search for inhibitory structures against adhesions of bacteria: construction and application of designed peptide libraries intended for prevention of infective endocarditis.
研究代表 伊藤 博夫 (ITO HIRO-O) 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 研究者番号：40213079

研究成果の概要：抗生物質全盛の現代においても、感染症は依然として人類の脅威である。薬物耐性菌克服のための新たな方法論として、微生物を殺すのではなく、それらの定着を阻止することで感染を防御するという報告者らの独創的発想は実用化されると極めて有用となる。コンビナトリアルライブラリー技術は、有用物質の探索のための優れた先端テクノロジーとして期待されているが、方法論的に未完の部分が多い。本研究では、感染性心内膜炎の発症に関与する口腔細菌と生体組織との間の分子認識をモデル実験系として、この種のライブラリーを用いた細菌定着抑止物質の探索法とその効率を確保するための種々の用件を同定し、本方法論の実用化への道筋をつけた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2007 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学、感染症、ペプチド、ライブラリー、定着抑制、口腔細菌、fibronectin、phosphorylcholine

1. 研究開始当初の背景

健康なヒトの口腔には500種類とも言われる細菌が常在しているが、そのうちのビリダンス連鎖球菌は感染性心内膜炎の原因としても重要視されている。*Granulicatella adiacens* は口腔常在のビリダンス連鎖球菌の仲間であり、細菌性心内膜炎の起因菌とし

てもしばしば分離されるものである。我々はこれまでに、本菌の宿主フィブロネクチンに対する付着性が心内膜誘発能と関連することを示し、その生化学的特徴を解析してきた。これまでに、モノクローナル抗体技術とコンビナトリアルケミカルライブラリー技術を融合させて、*G. adiacens* とフィブロネクチ

ンとの結合の分子認識のメカニズムを明らかにし、これらの相互作用を阻害する低分子化合物を探索・同定するための方法論の最適化を試みてきた。すなわち、One Peptide on One Bead (OPOB) タイプのペプチドライブラリーや、6-mer ならびに 9-mer の Positional Scanning ペプチドライブラリー (PSL) の高純度で高効率な合成法を考案し、バイオアッセイを繰り返しながら、標的分子を模倣する低分子化合物の探索に取り組み、より長鎖の、均一でバイアスの少ないライブラリーを用いることによって、非連続エpitepopeの特徴である立体構造のより優れた模倣が可能であることを明らかにした。しかしながら、これまでの研究で導き出された分子は、医療 (予防、治療) への応用を考えた時には、まだ実用性の観点からは距離があると考えられたため、より優れた模倣を示す分子を探索・創製することを目指し本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) 純度を犠牲にすることなく、より安定に立体的構造を表現するペプチドライブラリーを設計し、これを合成する。具体的には、①ペプチドのコンフォメーションの安定化により、ライブラリー構成の分子構造をリジッドにする。

②同時に、アミノ酸全種を用いるようなライブラリー構成では、構築のコストと使用するアミノ酸の量、およびそれらに伴うアッセイの手間の増大によって非実用的なライブラリーになってしまうので、これを避けるために、構築に使用するアミノ酸の種類 (ビルディングブロック) を、推定分子構造と理論 (文献情報の活用) に基いて絞り込む。

(2) ペプチドの機能評価のためのアッセイ法を改善し、ハイスループット化と高感度化に取り組み、少量サンプルを用いて短時間で判定が可能になるようにする。具体的には、ピオチン化や蛍光標識を用いることで、測定系の単純化と感度の向上に取り組む。

(3) 構築したライブラリーのスクリーニング結果に基いて 2 次ライブラリーを作製し、バイオアッセイを繰り返して標的分子候補を絞り込む。

(4) *G. adiacens* とフィブロネクチンとの結合をモデル系として、一般に病原微生物の特定物質への特異的付着を阻害することを作用機序とする感染症の発症を抑制を目的とした受動ワクチン的な低分子化合物による感染症予防の、方法論的基礎を確立することを申請期間内の達成目標とする。

最終的には、標的分子を模倣する分子構造を特定し、創薬へと導く準備を行う。すなわち、薬物候補分子の化学合成法・合成経路を確立し、Phase I-II 試験へ進めるための基盤

とする。

3. 研究の方法

(1) 化合物ライブラリーの構築

① OPOB ライブラリー

Lam らは、多種品目同時固相合成法による分割混合法で膨大な数のペプチド群を調製するためのパラレルアプローチである Selectide 法を (図 1) を提唱している。この手法は、極めて多種 (10 万から 1000 万種) のペプチドを迅速に合成でき、反復合成を行わないシングルプロセスであるため、異なるマルチリガンドも効率よく検出できることに特徴がある。タンパク質を構成している天然アミノ酸は 20 種である。この中で側鎖副反応の多い Cys を除き 19 種を用いてライブラリーにすることが一般的である。生物アッセイに有利な水にも良く膨潤する TentaGel を固相に用いて、一粒ずつレジンに 19 種のアミノ酸からなるペプチド鎖を固定化したライブラリーすなわち、one bead 上に一種のペプチドのみが結合したライブラリー混合レジンを合成した。

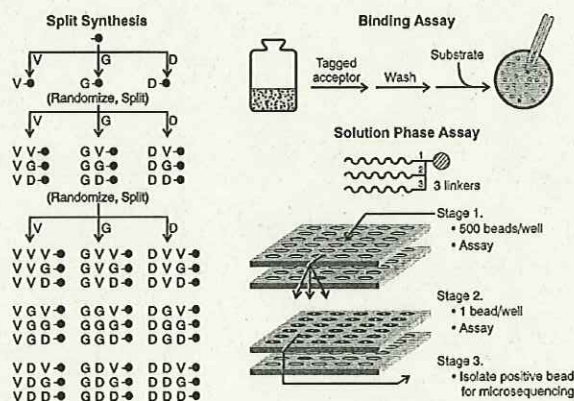


図 1 Selectide 法 (One beads one compound) の手法

② ポジションスキヤニングライブラリー (Position Scanning Library: PSL)

このライブラリーは定められた位置に固定された異なる特定のアミノ酸を含み、その他すべての位置に等量 (モル) のアミノ酸混合物を含んでいる。このためすべての混合物のスクリーニングにより、各位置での好ましいアミノ酸が明らかになり、その結果、最も活性の高い配列から“モチーフ”決定が可能となると理論的に期待できる。我々はこの方法による N 末端アセチル化そして C 末端アミドの 6 残基からなるヘキサペプチドライブラリーを構築した (図 2)。一般にはアミノ酸誘導体を混合したままビーズに反応させる方法が広く取られているが、各アミノ酸誘導体により反応性が異なり、量的に均一な混合物ライブラリーの構築は不可能である。手間がかかり複雑ではあるが、我々は N 末端にくるアミノ酸導入を個別に行い、19 分割による

Split&Combine 法を繰り返して合成を進めた。クリーベージにも工夫を行い、純度と各アミノ酸の当量性にフォーカスをおいた、質の高いライブラリーを作製した。

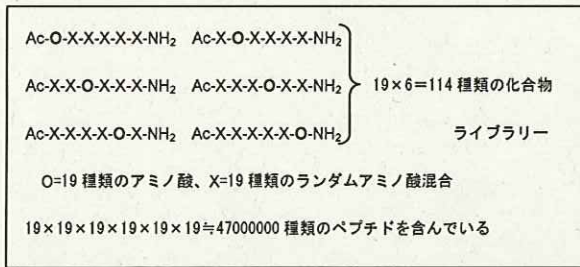


図2 合成したポジションスキャンペプチドライブラリー

(2) ライブラリーのスクリーニング

①抗フィブロネクチン・モノクローナル抗体 Fynit-I01 (IgG1, kappa) は、フィブロネクチンのポリペプチド鎖の中央部分のエピトープを認識するもので、細菌のフィブロネクチンに対する結合を阻害することで選択されたものである (Ito H-O et al., Biochem Biophys Res Commun 320, 2004)。したがって当モノクローナル抗体は、細菌の結合に関与するフィブロネクチン分子の局所構造を調べるためのツールとして使用することができる。

②TEPC15 (T15) はホスホリルコリン (phosphorylcholine: PC) に特異的に反応することで知られるマウスのみエローマ由来モノクローナル抗体 (IgA, kappa) である (Potter M, Ann. N.Y. Acad. Sci. 190, 1971)。Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, Missouri) より購入した。PC は、口腔細菌を含む種のレンサ球菌の細胞壁に在って、血管内皮細胞表面の血小板活性化因子受容体 (PAF-R) を介する細菌の生体付着・組織内侵入に関連していることから、当モノクローナル抗体、および PC 分子は、口腔細菌の結合に関与する生体分子構造を調べるためのツールとして使用することができる。

③ビオチン標識 PC ペイト

PC に関する分子認識の機構を直接的に解析する目的で、ビオチンで標識された PC を合成して用いた。本研究では、PC とビオチンの間に飽和炭化水素リンカーが挿入された分子量 453.51 の化合物と、9 個分のプロリンが挿入されたタイプ (分子量 1553.87) の化合物を作製した。

④蛍光標識物質および酵素標識物質
最良の検出系を探索する目的で、ストレプトアビジン (SAV) で標識された Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®594, Qdot®525, Qdot®655 (インビトロジェン、東京)、FITC-SAV (Dojindo, 熊本)、およびアルカリホスファターゼ (ALP)-SAV (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を使用した。染色さ

れた OPOB ビーズは倒立蛍光顕微鏡 (Nikon エクリプス TE2000) を用いて観察を行った。

(3) 粘膜ワクチン法

①アジュバント

本研究で粘膜免疫に用いるアジュバントとしては、動物実験において最も広く用いられている完全分子コレラ毒素 (Cholera Toxin: CT) と、樹状細胞を選択的に活性化する新しいアジュバントである Flt3 リガンドを発現する DNA プラスミド (pORF9-mFlt3L: pFL, Kataoka K et al., J Immunol 172, 2004) を用いた。

②経鼻免疫法

マウスは 6~8 週齢の C57BL/6 雌を使用した。マウス 1 匹につき PC-KLH (BioSearch Technology, Novat, CA) 50 µg と CT 1 µg もしくは pFL 50 µg を含む 10 µL の PBS 溶液を鼻腔に週 1 回、4 回投与した。

③抗体の測定

免疫マウスから経時的に、血漿、唾液、糞抽出液のサンプルを採取した。鼻腔洗浄液、鼻咽喉関連リンパ組織のサンプルは最終投与後 7 日 (最初の投与から 28 日) に採取した。これらに含まれる抗 PC 抗体の抗体価とアイソタイプを、ELISA 法により PC-BSA を抗原として測定した。

4. 研究成果

(1) PSL を用いた細菌のフィブロネクチン認識モチーフの探索

9-mer の PSL を構築し、細菌のフィブロネクチンに対する結合を特異的に阻害するモノクローナル抗体 Fynit-I01 の反応モチーフの探索を行った。網羅的なスクリーニングの結果 (図 3) に基づき、2 次ライブラリーとして KAKHRRRPG, KAKRRRRPG, KAKKHRRPG, KAKHRRRPG の 4 種類の 9-mer ペプチドを個別合成した。

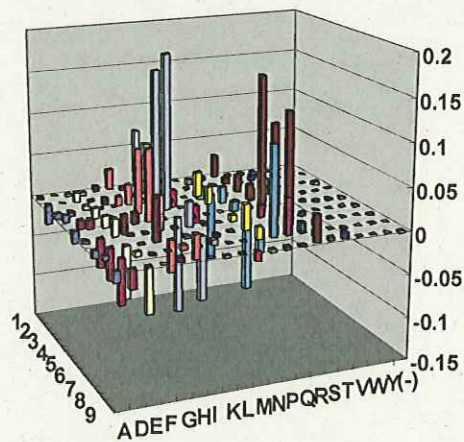


図3 PSL を用いた Fynit-I01 結合モチーフの探索
これらのペプチドと Fynit-I01 の反応性を検

討したところ、うち3種のものの特異的な結合性が示唆された。またN末端のLysを欠く8-merペプチドには反応が見られなかった。これらのペプチドには陽性荷電アミノ酸が非常に多く含まれており、これらの結合抑制性を期待して使用すると、細胞膜上での競合ではなく、細胞膜を通過して細胞内に侵入することが予想されるため、目標薬物のリード化合物としては用いにくいと判断された。

(2) OBOPによる細菌のフィブロネクチン認識モチーフの探索

PSLを用いたスクリーニング法では、異なる配列の可溶性ペプチドの混合物による競合阻害の活性で標的モチーフを探索するが、PSL法の結果を検証・補完することを目的に、全く異なる理論で構築されるOPOBライブラリーを使用したスクリーニングを実施した。OPOBを用いた方法では、ライブラリー中の合成ペプチドの阻害活性ではなく、リガンド(今回の場合はFynit-I01)との結合性を指標にヒットを探索することになる。OPOBライブラリーを用いた第1次スクリーニングから得られた30個余りの強陽性反応ビーズをプールしてエドマン分析法でアミノ酸配列を決定したところ、dominantなアミノ酸残基として第2番目位置A, Y, Q、第3番目位置A, V、第4番目位置E, R、第5番目位置Yの重要性が示唆された。一方、強陽性ビーズのいくつかを個別にエドマン分析した結果は、GQVDRG, GSTIVG, GTFVPGなどの配列が得られた。すなわちプールシーケンスと個別シーケンスの結果には一定のコンセンサスは認められるものの、プールシーケンスにおける各ポジションの最優勢アミノ酸を選択して繋いだペプチドは配列としては必ずしも最良のものにならないことが示唆された。このことは、PSLのみを用いた探索では最適なヒットを得ることが困難である可能性を示唆している。

(3) ポジション固定型改良 OPOB ライブラリー

PSLとOPOBの各ライブラリーの起案となる理論は異なっており、以上の実験結果から、それぞれに長所と短所があり、示唆される標的アミノ酸配列にも違いがみられることが明らかになった。そこで理想的には2種類のライブラリーを同時平行的に使用して補完しあいながらスクリーニングを行うことが望ましいが、これは労力的にも経済的にも非効率かつ非現実的である。そこで、両者の特徴を兼ね備えたものとして、新しく改良型のOPOBライブラリーを考案した。

新しいOPOBライブラリーは、配列の第1ポジションと第2ポジションは既知のアミノ酸が配置されており、第3ポジション以降の配列は均等にランダム化された構造をとつ

ており、381種類のサブライブラリーで構成されるランダムペプチドライブラリーである。既存のOBOPライブラリーの理論では、このサブライブラリー全体を混合したものでスクリーニングを開始することになるが、今回と同様のペプチド鎖6-mer、ビーズ直径130 μ mを用いた場合には全アミノ酸配列を包含するために $19^6 \approx 4.7 \times 10^7$ 個以上のビーズが必要になり、容量にして約300 mLのビーズと1 L以上のリガンド溶液でアッセイをすることになり、現実的ではない。

新しい改良ライブラリーでは、全ライブラリーを同時に用いるのではなく、サブライブラリーを系統的にアッセイすることにより、高効率に網羅的なスクリーニングが可能になると期待される。すなわち、第1段階のスクリーニングとしては、第1ポジションにGly, Alaのような干渉の少なく特異性の低いアミノ酸配列を配置したサブライブラリーのスクリーニングから開始して、ランダムポジションのアミノ酸配列を段階的に絞り込むという理論である。詳細は以下において、実際の結果とともに述べる。

(4) PC 認識モチーフの探索

①改良 OPOB ライブラリー構築におけるパイロットスタディーにおいて、モノクローナル抗体の認識モチーフの探索を行うと、非特異的な結合が必ず付随することが明らかになった。これは巨大タンパク質分子である抗体が、Fc受容体結合部位や補体結合部位などの抗原以外の物質との特異結合領域を保有することによって由来している。この種の特異的な結合は、将来的にはコントロール抗体を利用したサブトラクションを行うことで解決可能と考えられるが、新しいライブラリーの設計方略や反応系の最適化という今回の研究課題の主題を遂行するためには、よりシンプルな分子認識をモデル反応系に利用することが必要と判断され、PC分子が選択された。

② 標識 PC ベイトの設計

ビーズへのPCの結合を検出するために、ビオチンによる標識を行った。PCとビオチンを定法に従い飽和炭化水素鎖でリンクさせた分子は、各々単独の生理活性は保持していたものの、目的とするbifunctionalityを発揮できなかった。そこでSatoらの報告(J Am Chem Soc 129, 2007)を参考に、両者の分子間距離を確保したpoly-prolineでリンクした分子を作製したところ、目的どおりのbifunctionalityを発揮することが示され、これを用いたPC認識モチーフの探索が可能になった。PC部分はペプチドとの反応に先立ってmultimerizeしておくことが効率的な結合に必要なことも明らかにされた。

③ 光学的検出法の選択と至適化

最良の検出系を探索する目的で、蛍光標識

物質および酵素標識物質を比較検討した。ストレプトアビジン (SAV) で標識された Alexa Fluor®488、Alexa Fluor®594、Qdot®525、Qdot®655、FITC-SAV、および ALP-SAV を用いた検出系を比較検討したが、酵素によるビーズ染色が、いずれの蛍光色素よりも良好な感度を示した。

(5)改良 OPOB ライブラリーと PC-polyproline rod-biotin (PC-pProBiot) を用いた PC 認識モチーフの探索

第 1 段階のスクリーニングとして、第 1 ポジションを Ala で固定した 19 種と Gly で固定した 19 種の、計 38 種のサブライブラリーを用いて、PC-pProBiot および ALP-SAV を用いてスクリーニングを実施した。ビーズ BCIP と NBT を含む発色試薬を用いて染色した。ビーズの染色の程度は倒立顕微鏡下で観察し判定を行った。両サブライブラリー群の分析の結果、高い反応性を示す第 2 ポジションのアミノ酸として、Trp, Tyr が示唆された。第 2 段階として、第 2 ポジションを Ala で固定した 18 種類のサブライブラリーを用いてアッセイを実施し、第 1 ポジションの案のアミノ酸として Met, Thr, Val, Trp が示唆された。第 3 段階として、第 2 ポジションを Trp で固定したサブライブラリー群をアッセイした結果、第 1 ポジションのアミノ酸として Met, Thr, Val の重要性が確認されるとともに、第 1 ポジションの Trp は却下された。

以上の結果を統合し、第 1 ポジションが Met, Thr, Val, 第 2 ポジション Trp, Tyr のサブライブラリーが選択された。各サブライブラリーの染色像を再度倒立顕微鏡下で観察し、濃染ビーズを選別し、個別ビーズのアミノ酸シーケンシングを行った(図 4)。

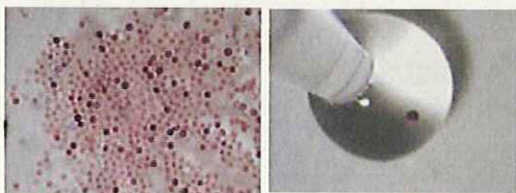


図 4 OPOB ライブラリーの染色ビーズの選択

その結果得られた、PC 認識モチーフ候補配列を表 1 に示す。これらの候補ペプチドを

表 1 PC 認識モチーフの候補として合成されたペプチド

1	Val-Trp-Ile-Thr-Asn-Glu-PEG
2	Thr-Trp-Asn-Glu-Ala-Val-PEG
3	Met-Tyr-Met-Trp-Gln-Glu-PEG
Cont1 ^a	Tyr-Ser-Ala-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe Ile-Val-Ser-PEG
Cont2 ^b	Asp-Arg-Ile-Pro-Met-Asp-PEG

^aHarris SL et al. (Infect Immun 68, 2000) によって PC との相互作用が示されている配列。陽性対照ペプチドとして使用した。

^b同じく PC との相互作用が否定されている配列。陰性対照ペプチドとして使用した。

ポリエチレングリコール (PEG) との結合物として合成し、各ペプチドの活性を競合阻害 ELISA で測定を試みたが、活性を確認することはできなかったが、競合阻害試験ではなく、各ペプチドを ELISA プレートに直接コートして、PC-pProBiot を直接結合させるアッセイ系において、1 番目の配列のペプチドに、比較的強い陽性反応を認めることができた(図 5)。

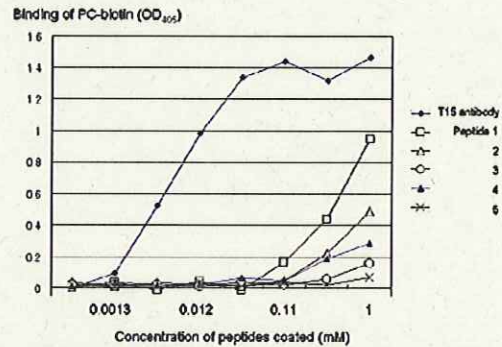


図 5 合成ペプチドに対する PC の結合反応 Peptide1, 2, 3 は表 1 の番号と対応、4, 5 はそれぞれ Control 1 と 2 に対応。コントロールとして合成した phosphorylacetylethanolamine-pPro-biotin はいずれのペプチドにも有意な反応を示さなかった。

以上の結果より、改良型のポジション部分固定型 OPOB ライブラリーを用いた新規のスクリーニングシステムが、生体分子認識を阻害する有用物質探索のために有用であることが示唆された。

(6) PC を介した感染防御免疫の誘導

PC に対する分子認識を基盤とした感染症予防法の開発を目的とした戦略のひとつとして、PC の分子模倣による粘膜ワクチン技術の基盤確立に着手した。DNA プラスミド pORF9-mFlt3L をアジュバントとして経粘膜免疫を行うことで、PC に特異的な抗体を、初期感染が成立する場である粘膜上において、誘導できることが示された(図 6)。

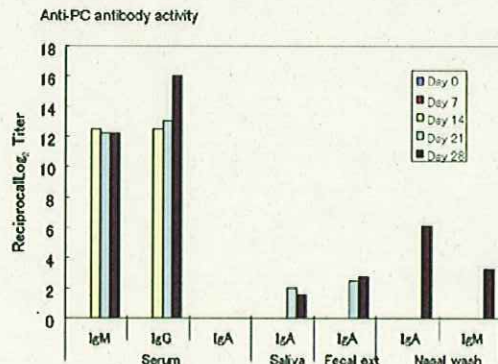


図 6 pORF9-mFlt3L:アジュバントを用いた経鼻疫による PC に対する粘膜抗体誘導

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4件)

- ①伊藤博夫 歯科治療と感染性心内膜炎の予防. 四国歯学誌 20: 191-198, 2008、査読有
- ②Fukuiwa T, Sekine S, Kobayashi R, Suzuki H, Kataoka K, Gilbert RS, Kurono Y, Boyaka PN, Kreig AM, McGhee JR, Fujihashi K. A combination of Flt3 Ligand cDNA and CpG ODN as nasal adjuvants elicits NALT dendritic cells for prolonged mucosal immunity. Vaccine 26: 4849-4859, 2008、査読有
- ③ Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, Kawabata M, Sagara Y, Ito, H-O, Miwa Y, Nagatake T, Kiyono H, Kurono Y. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. Vaccine 25: 2680-2687, 2007、査読有
- ④ Ito H-O. Infective endocarditis and dental procedures: evidence, pathogenesis, and prevention. J. Med. Invest. 53:189-198, 2006、査読有

[学会発表] (計5件)

- ①Kataoka K, Fujihashi K, Sekine S, Fukui M, Kawabata S, McGhee JR, Ito H-O, Fujihashi K. Mucosal DCs activated by nasal cholera toxin induce innate B1-B cells to undergo IgA CSR. 第38回日本免疫学会(京都), 2008年12月3日
- ②Fukui M, Baatarjav T, Kataoka K, Hinode D, Ito H-O, Salivary cortisol and Th1/Th2 cytokines of patients with complaint halitosis. 56th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research (Nagoya, Japan) 2008年11月30日
- ③片岡宏介、関根伸一、福井誠、金川裕子、Tselmeg Baatarjav、伊藤博夫. 粘膜アジュバント・コレラ毒素の経鼻投与は唾液腺B1-B細胞のIgAクラススイッチングを誘導する. 第57回日本口腔衛生学会総会(さいたま市), 2008年10月3日
- ④Ito, H.-O. Infective endocarditis and

dental procedures. The National Scientific Meeting of The 47th Anniversary of Faculty of Dentistry Gadjadara University (Yogyakarta, Indonesia), 2006年12月8日

- ⑤伊藤博夫 口腔常在菌のホスホリルコリン抗原決定基に対する免疫応答の誘導と抗肺炎球菌応答の修飾について. 第55回日本口腔衛生学会総会シンポジウム「口腔保健の免疫学的展開」(大阪), 2006年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 博夫 (ITO HIRO-O)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 40213079

(2) 研究分担者

片岡 宏介 (KATAOKA KOSUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 50283792

横山 正明 (YOKOYAMA MASAOKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 10314882

増田 かなめ (MASUDA KANAME)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 30243710

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福井 誠 (FUKUI MAKOTO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

バータルジャフ・ツェルメグ (BAATARJAV TSELMEG)
徳島大学・大学院口腔科学教育部博士課程

軒原 清史 (NOKIHARA KIYOSHI)
(株)ハイベップ研究所・最高研究責任者/CEO