

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770156

研究課題名(和文) ペプチドーム解析より得られた内在性ペプチド群からの新規抗菌ペプチドの探索

研究課題名(英文) Peptidomics-based mining of novel antimicrobial peptides

研究代表者

尾崎 司 (OSAKI TSUKASA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子薬理部・特任研究員

研究者番号：60380565

研究成果の概要(和文)：

近年、薬剤耐性菌の院内感染が問題となっている。この耐性菌に対する抗菌薬候補として抗菌ペプチドが挙げられる。本研究では新規抗菌ペプチドの同定を目的として、ペプチドーム解析で同定したペプチドに対して抗菌活性を指標にスクリーニングを行い、AMP-IBP5 を含め 2 種の新規ペプチドを発見した。AMP-IBP5 は 2 つの Cys 残基が分子内架橋し、C 末端がアミド化された 22 残基のペプチドで、 $\beta$ -ディフェンシン-2 より強い抗菌活性を示し、新薬候補となりえる。

研究成果の概要(英文)：

Recently, it has been an increasing problem of drug-resistant bacteria in a hospital. One of candidates effective against these bacteria is an antimicrobial peptide. This study was aimed at discovery of novel antimicrobial peptides from identified peptides using peptidomic analysis. We screened them based on antimicrobial activity and found two novel antimicrobial peptides including AMP-IBP5. AMP-IBP5 is an intramolecular disulfide-linked 22-residue amidated peptide. This peptide showed antimicrobial activity stronger than  $\beta$ -defensin-2 and could become candidates for new drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホルモンと生理活性物質、抗菌ペプチド、ペプチドーム

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、医療現場において、従来の抗菌薬に対する薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。この薬剤耐性菌の蔓延を防ぐためには、耐性菌に有効な新薬(抗菌薬)を開発することが必要である。この新薬候補として、抗菌ペプチドが挙げられる。抗菌ペプチドは①多くの微生物に効果を示し、②安全性が高

く、③耐性菌を生じにくいといった優れた特性をもち、国外では臨床試験段階にまで進んでいるものもある(Zaslouff, M. *Nature*, 415, 389-395 (2002))。

(2) 従来、抗菌ペプチドは抗菌活性を指標に生化学的に単一に精製後、部分アミノ酸配列を取得、必要に応じて遺伝子のクローニング

を実施することで発見されてきた。実際、研究代表者も無脊椎動物カプトガニから新規抗菌ペプチドを単一に精製後、全アミノ酸配列を決定した(Osaki, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274, 26172-26178 (1999))。しかし、この方法での同定には多量の生体試料が必要である。

(3) 最近、バイオインフォマティクス技術を利用して、様々な生物のゲノム情報からコンピュータ解析により抗菌ペプチド候補を見出し、実験によってその機能を確認するという新たなアプローチが提案されている。この方法では候補ペプチドを化学合成することで量的な問題を解決できる。しかし、抗菌ペプチドには共通して保存される配列がないので、既知の抗菌ペプチドと配列類似性の低い新規抗菌ペプチドの予測は困難である。

(4) 研究代表者の研究室では、タンパク質やペプチドの分解を抑制して組織や細胞からペプチドを回収する方法、質量分析計を活用して微量なペプチドを構造決定する方法を開発してきた。この手法を用いて、哺乳類の組織、細胞に存在するペプチドの網羅的解析(ペプチドーム解析)を行うことで、既知の生理活性ペプチドを含めて1,000種類以上の内在性ペプチド(単なるタンパク質の分解物でなく、プロセッシングによって生体内で生成、存在するペプチド)の同定に成功した。これら内在性ペプチドから構造的特徴(抗菌ペプチドの特徴である塩基性アミノ酸を多数含む)を基準に候補ペプチドを選定し、抗菌ペプチドのスクリーニングを行った。

## 2. 研究の目的

(1) 新規抗菌ペプチドの同定を第一目標とする。内在性ペプチドから構造的特徴と生物種間での保存性を基準に候補ペプチドを選定する。候補ペプチドから抗菌活性を指標にスクリーニングを行い、多種類の新規抗菌ペプチドを同定する。

(2) 以下3項目を明らかにしてペプチドの機能、生理的意義を推定する。

① 抗菌スペクトル

② 細胞傷害性

③ 組織分布、実在

推定されたペプチドの機能、生理的意義などの情報を基に実用化を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 新規抗菌ペプチドの同定を第一目標として、具体的には、次の2項目実施した。

① 候補ペプチドの選定

抗菌ペプチドは低分子ペプチド(12~100アミノ酸残基)で塩基性アミノ酸を多く含む

(正味の電荷は+2~+9)、両親媒性の構造をとるという共通の特徴がある。したがって、ペプチドーム解析で同定した内在性ペプチドから、正味の電荷が+2以上のものを候補ペプチドとして選定した。選定に当たっては、a) 電荷が高いもの、b) 動物実験を考慮して、生物種間での配列類似性が高いペプチドを優先させた。

② 抗菌ペプチドのスクリーニング

①で選定した候補ペプチドを用いてグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌に対する抗菌活性を指標にスクリーニングを行った。スクリーニングにはアラマブルーをもちいて生菌の還元活性を指標に抗菌活性を調べた。この方法は、従来の抗菌活性測定的主流であった寒天培地に塗布し、コロニー数を数える方法よりも、簡便で誤差も少なく、スクリーニングには適している。生菌の生存率はGoeganらの算出法にしたがい、570 nmと600 nmの吸光度より算出した(Goegan, P. *et al. Toxic. In Vitro.*, 9, 257-266 (1995))。

(2) ペプチドの機能、生理的意義の解明を目指して次の3項目実施した。

① 抗菌活性の測定

活性が検出されたペプチドに関して、濃度を変えて活性を測定するとともに、様々な細菌、真菌に対する抗菌活性を測定し、抗菌スペクトルを明らかにした。

② 赤血球溶血活性の測定

抗菌活性が検出されたペプチドに関して、様々な濃度で溶血活性を測定した。溶血活性を細胞傷害性の評価の指標とした。溶血活性(%)は2%ヒツジ赤血球と等量のペプチド溶液を37°Cで4時間反応させ、遠心後上清の546 nmの吸収(ヘモグロビン量に比例)を測定して算出した。ペプチドなしを0%、完全溶血を100%とした。

③ 組織分布の測定、実在の確認

活性が検出されたペプチドに対する特異抗体を作成し、活性ペプチドの各組織での含量をラジオイムノアッセイ(RIA)で測定し、分布を調べた。免疫活性の検出された組織についてはさらにゲルろ過、逆相カラムを用いて分離後、免疫活性を測定し、目的のペプチドと同じ溶出位置に免疫活性が検出されるか確認を行った。さらに、特異抗体を用いた免疫沈降物の質量分析を行い、実在の確認を行った。

## 4. 研究成果

(1) 新規抗菌ペプチドの同定

① 候補ペプチドの選定

ペプチドの網羅的解析(ペプチドーム解析)

析) で同定した内在性ペプチド (単なるタンパク質の分解物でなく、プロセッシングによって生じるペプチド) から構造的特徴や生物種間での保存性を基準に 60 種の候補ペプチドを選定した。

## ② 抗菌ペプチドのスクリーニング

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* 209P)、グラム陰性菌である大腸菌 (*E. coli* K12)、真菌 (*P. pastoris* GS115) に対する抗菌活性を指標に、60 種の候補ペプチドについてスクリーニングを行った。その結果、2 種の新規抗菌ペプチドが 10  $\mu$ M のペプチド濃度で真菌に対して 50%以上の成長阻害活性を示した。

(2) 50%以上の成長阻害活性を示す 2 種の新規抗菌ペプチドのうち、1 種はインスリン様成長因子結合タンパク質 5 (IGFBP5)由来のペプチドで AMP-IBP5 と命名した。もう 1 種については現在検討を始めたところである。

### ① AMP-IBP5 の抗菌活性の測定

抗菌活性を測定したところ、検討した 8 種の菌のうち、6 種の菌に対して既知の抗菌ペプチド  $\beta$  ディフェンシン-2 より強く、カテリシジンに匹敵する強い抗菌活性を示した(表 2.)。

表 1. AMP-IBP5 の抗菌活性

Bacteria	AMP-IBP5	BD-2	CATH
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>			
Gram-positive bacteria			
<i>E. hirae</i>	>10	2.4	0.3
<i>M. luteus</i>	0.5	0.7	1.3
<i>S. aureus</i> 209P	0.8	8.6	0.3
<i>S. saprophyticus</i> KD	>10	>10	0.6
Gram-negative bacteria			
<i>E. coli</i> B	8.8	>10	0.5
<i>E. coli</i> K12	0.9	6.3	0.6
<i>E. coli</i> kp	4.2	7.4	1.7
Fungi			
<i>P. pastoris</i> GS115	1.3	2.6	3.1

<sup>a</sup> 50% growth inhibitory concentration.

BD-2,  $\beta$ -defensin-2; CATH, cathelicidin; *E. hirae*, *Enterococcus hirae*; *M. luteus*, *Micrococcus luteus*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *S. saprophyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *P. pastoris*, *Pichia pastoris*.

### ② AMP-IBP5 の赤血球溶血活性の測定

AMP-IBP5 は 20  $\mu$ M でも 0.3%と、殆ど溶血活性を示さなかった。一方、カテリシジンは 10  $\mu$ M で 4.1%の溶血活性を示した。以上の結果から、AMP-IBP5 は殆ど細胞傷害性を持たないことが判明した。したがって、このペプチドは抗菌薬として用いても、生体内への影響は比較的少ないと考えられ、新薬候補となりえる。

### ③ 組織分布の測定、実在の確認

AMP-IBP5 は 2 個の Cys 残基を含み、分子内架橋されている。また、C 末端がアミド化された 22 残基のペプチドである。AMP-IBP5 に対する特異抗体を作製したところ、この抗体は AMP-IBP5 のアミド基を含む C 末端領域を認識し、Cys 残基の分子内架橋は認識しなかった。この特異抗体を用いた RIA の結果、AMP-IBP5 の免疫活性はラットの脳、下垂体、小腸で検出された。

免疫活性が検出された脳、小腸の抽出物をゲルろ過、逆相 HPLC で分離し、それぞれの画分の免疫活性を測定した結果、目的のペプチドと同じ溶出位置に主要な免疫活性が検出された。さらに、特異抗体を用いてこの画分の免疫沈降を行い、免疫沈降物の質量分析により、ラット脳と小腸で Cys 残基が分子内架橋して C 末端がアミド化された 22 残基の AMP-IBP5 の実在が確認できた。

また、AMP-IBP5 は IGFBP5 からプロセシング酵素によって切断を受け、生成すると考えられる。このプロセシング部位も含め、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシで完全に保存されているので動物実験に用いることが可能であるという利点もある。

以上の成果を国際的学術雑誌 (Journal of Proteome Research, 10, 1870-1880 (2011)) に報告し、1 件特許申請を行った。

## 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 1 件)

- ① T. Osaki, K. Sasaki, N. Minamino: Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5. Journal of Proteome Research, 10, 1870-1880 (2011) 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 尾崎 司、佐々木 一樹、南野 直人: 「Secretopeptidome mining for novel bioactive peptides」第 46 回ペプチド討論会、北九州 (福岡)、2009 年 11 月 4 日発表
- ② Tsukasa Osaki, Kazuki Sasaki, and Naoto Minamino: 「Secretopeptidome mining for novel biologically active peptides」第 14 回国際内分泌会議 ICE2010、京都、2010 年 3 月 30 日発表

〔図書〕 (計 1 件)

- ① T. Osaki, K. Sasaki, N. Minamino:  
Secretopeptidome mining for novel  
bioactive peptides. Peptide Science,  
143-144 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ペプチド及びその用途

発明者：尾崎司、佐々木一樹、南野直人、  
南祇利実

権利者：独立行政法人国立循環器病研究  
センター・総長、武田薬品工業株式  
会社

種類：特許

番号：特願 2009-142232 (国内)

特願 PCT/JP2010/060136 (国外)

出願年月日：2009 年 6 月 15 日 (国内)

2010 年 7 月 6 日 (国外)

国内外の別：国内、国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 司 (OSAKI TSUKASA)

独立行政法人国立循環器病研究センタ  
ー・分子薬理部・特任研究員

研究者番号：60380565