

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550191

研究課題名(和文)1ナノメートルの分子空間を活用した細菌膜傷害性抗菌ペプチドのモデル化研究

研究課題名(英文)Antimicrobial peptide model constructed on a nano molecular space

研究代表者

山村 初雄(Yamamura, Hatsu)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80220440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗菌ペプチドの活性発現における構造の役割について明らかにし、人工抗菌物質開発へと展開するためにシクロデキストリンを利用したモデル化研究を行った。ペプチドではプラス電荷をもつアミノ基がマイナス電荷を帯びている細菌膜脂質と相互作用し、その後、疎水性基が細菌膜脂質のアルキル鎖と相互作用することで、細菌膜傷害を引き起こす。そこで、種々のアミノ基と疎水性基をシクロデキストリンに導入する合成法を研究した。そして、これら誘導体の活性を調べて考察した。

研究成果の概要(英文)：An antimicrobial peptide model was studied by use of cyclodextrin. Amino groups and alkyl groups those interact with lipid molecules of a microbial membrane to disrupt the membrane was introduced onto the cyclodextrin molecule. Antimicrobial activities of the derivatives were examined and discussed.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：シクロデキストリン ペプチド

1. 研究開始当初の背景

従来の抗生物質は、細菌“内部”の生命維持機構を破壊することで細菌を死滅させる。しかし細菌は、それを無効にするしくみを自らの中に作り出し、薬剤耐性を獲得する。一方、自然界には細菌の“外”から細胞膜を傷害する抗菌ペプチドがある。これに対して耐性は生じにくい。なぜなら細胞膜は本質的なものであり、その構成脂質を他に変更するのは容易ではないからである。それゆえ、これら膜傷害性抗菌ペプチドを理解するための研究がなされてきている。しかし作用とアミノ酸の種類と配列・構造の相関の詳細についてはいまだよくわからない部分があり、「これがあれば抗菌性が現れる」という一般的知見は確立できていない。研究代表者は、抗菌ペプチドであるグラミシジンSについて、その構造・活性相関研究に携わり、それを合成化学的に構造変換することで抗菌性を増強できることを明らかにした。一方、1ナノメートルの直径を持つ環状糖質シクロデキストリンの研究も行い、その分子上に官能基を合理的に配置して高機能化する有機化学手法を確立した。その有効性は、合成したシクロデキストリン誘導体が他の物質と精緻な分子間相互作用・分子認識を達成することで実証した。ここでは、それらの知見を融合させ、細菌膜傷害性官能基をシクロデキストリン上にサブナノレベルで配置集積させることで細菌膜脂質に作用する抗菌ペプチド様の人工分子をつくりあげる。ペプチドとは異なり、この糖質は剛直であるため官能基を導入しても全体構造は乱れず、官能基の効果のみを評価できる。これによって新規な抗菌構造の創造へとつながる基盤情報を得る。

2. 研究の目的

本研究ではグラミシジンSを参考に、シクロデキストリンを利用したモデル化による研究を実施し、抗菌ペプチドの活性発現における構造の役割について明らかにし、そしてそれを凌駕する活性を持つ人工抗菌物質開発へと展開するために基盤となる研究を行った。グラミシジンSは、その平面構造の表側にオルニチン由来のアミノ基を持ち、裏側にバリンなどの疎水性基を持つ。生理条件でプラス電荷をもつアミノ基がマイナス電荷を帯びている細菌膜脂質と相互作用することが引き金となり、その後、疎水性基が細菌膜脂質のアルキル鎖と相互作用することで、細菌膜傷害を引き起こす。そこで、グラミシジンSのアミノ酸官能基を模倣して、それらをシクロデキストリン内に配置する方法を研究した。まず、アミノ基の種類を変化させた類縁体について。天然ペプチドの主鎖とアミノ基は3個の炭素で隔てられており、その距離・自由度は活性に影響するというペプチド研究がある。そこでシクロデキストリンにおけるその関係を再現するために炭素数が異なるアミノ基を合成した。さらにグラ

ミシジンSに代表されるシート型ペプチドが細菌膜を攪乱・傷害するためには陽イオンになるアミノ基(親水性基)と疎水性基のバランスが重要であることが示唆されている。そこで種々の疎水性基を導入することで、官能基の配置と両親媒性構造をシクロデキストリン内に構築するための合成法を研究した。そして、これら誘導体の活性、性能を調べて、それぞれの相互作用との関係を考察し、活性発現に必要な官能基の構造の知見を得た。

3. 研究の方法

(1) 7個のグルコースが円筒状につながったシクロデキストリンには、その円筒構造の両側にグルコースの一級ヒドロキシ基7個が集まる部分と二級ヒドロキシ基14個が集まる部分がある。そのシクロデキストリン中の隣り合うグルコースの一級ヒドロキシ基の距離は0.5ナノメートルであることを利用し、二級ヒドロキシ基をメチル化したシクロデキストリンの一級ヒドロキシ基を特異的に2個、スルホン酸エステル化した誘導体を合成した。

まず原料となる2、3-ジメチル化シクロデキストリンを合成した。シクロデキストリンをピリジンに溶解させ、t-ブチルジメチルクロロシランと室温で23時間反応した。順相シリカゲルクロマトグラフィーにより得た粗製生物をDMFに溶解させ、これに水素化ナトリウム、ヨードメタンを加え、17時間、室温で攪拌した後に順相シリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、6-シリル化-2、3-ジメチル化シクロデキストリン(70%、2段階)を得た。これをメタノールに溶解させ、フッ化アンモニウムを加え、65℃で3日攪拌した。順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、2、3-ジメチル化シクロデキストリン(99%)を得た。

この一級ヒドロキシ基を特異的に2個、スルホン酸エステル化した誘導体を合成した。2、3-ジメチル化シクロデキストリンをピリジンに溶解させ、塩化トシルを加え、室温で攪拌した。2時間45分反応を行い、得られた反応混合物を逆相および順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、目的物である3つの異性体(AD体、AC体、AB体)を得た。それらの構造決定はNMRによって行った。

(2) 炭素数が異なる一級アミノ基を持つシクロデキストリン誘導体を合成した。まずアミノメチル基を持つ誘導体について。DMSO水溶液中でアセチル化ヘプタアジ化シクロデキストリンに硫酸銅五水和物とアスコルビン酸ナトリウム、そしてBocグリシルプロパルギルアミドを加え、マイクロ波加熱(120℃)下で10分反応した。得られた反応混合物を順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、生成物(93%)を得

た。これにナトリウムメトキシド/メタノール溶液を加え、10時間攪拌した。中和後、溶媒を減圧留去して白色固体を得た。これにトリフルオロ酢酸を加え、室温で1時間攪拌した。減圧留去して目的物(94%、2段階)を得た。これらの構造決定はNMRおよび質量分析によって行った。

アミノプロピル基およびペンチルアミノ基を持つ誘導体についても同様に合成し、それらの構造決定はNMRおよび質量分析によって行った。

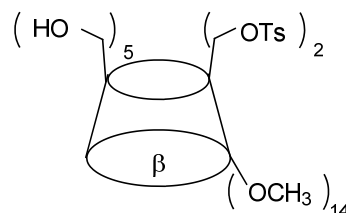
(3) 2つのアミノ基を持つリジンを結合した誘導体について。まずは、その原料になる二級ヒドロキシ基をアセチル化したシクロデキストリンの合成を記す。DMSO水溶液中でアセチル化アジ化シクロデキストリンに、硫酸銅、アスコルビン酸ナトリウム、Boc-Lys(Boc)-プロパルギルアミドを加え、マイクロ波加熱(120℃)下で10分反応した。これを順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、白色固体(69%)を得た。これにトリフルオロ酢酸を加え、30分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、目的物(100%)を得た。これらの構造決定はNMR、質量分析および元素分析によって行った。次に、二級ヒドロキシ基をイソブタノイル化したシクロデキストリンについて。アセトン水溶液中でイソブタノイル化アジ化シクロデキストリンに、硫酸銅、アスコルビン酸ナトリウム、Boc-Lys(Boc)-プロパルギルアミドを加え、マイクロ波加熱(120℃)下で10分反応した。これを順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、白色固体(68%)を得た。これにトリフルオロ酢酸を加え、30分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、目的物(100%)を得た。これらの構造決定はNMR、質量分析および元素分析によって行った。そして、二級ヒドロキシ基をn-ブタノイルおよびアセチル化したシクロデキストリンについても同様の法により目的物を得た。これらの構造決定はNMR、質量分析および元素分析によって行った。

(4) 抗菌活性試験について。まず最小発育阻止濃度を測定した。細菌として枯草菌および大腸菌を用いた。96穴プレートに、Mueller Hinton培地、菌液、そして濃度が異なるようにシクロデキストリン誘導体溶液を加えて培養液とした。これを37℃でインキュベーションし、20時間後、目視によってコロニー形成が見られないシクロデキストリンの最小濃度を求めた。次に併用抗生物質の作用増強性能について。併用抗生物質としてノボピオシンおよびエリスロマイシンを用いた。96穴プレートに、培地、菌液、シクロデキストリン誘導体溶液、そして濃度が異なるようにノボピオシンまたはエリスロマイシンの溶液を加えて培養液と

した。これを37℃でインキュベーションし、20時間後、目視によってコロニー形成が見られない抗生物質の最小濃度を求めた。ここでシクロデキストリン誘導体は8-32μg/mLとした。

4. 研究成果

(1) 本研究では、細菌膜を傷害する天然抗菌ペプチドであるグラミシジンSをモデルとして抗菌物質を研究した。グラミシジンSは0.5ナノメートルの距離で隔てられた2個のオルニチンを持つ。このアミノ基が生理条件ではプラス電荷を帯びて、細菌膜脂質のリン酸部のマイナス電荷と静電相互作用する。そこで、まず、このアミノ基の配置をシクロデキストリン上に再現することを研究した。シクロデキストリンは7個のグルコースが円筒状につながっている。その円筒構造の両側にグルコースの一級ヒドロキシ基7個が集まる部分と二級ヒドロキシ基14個が集まる部分がある。また、シクロデキストリン中の隣り合うグルコースの一級ヒドロキシ基の距離は約0.5ナノメートルである。この構造を利用してアミノ基を配置すればグラミシジンS構造をシクロデキストリン上にモデル化できる。そこでアミノ基導入を可能にするために二級ヒドロキシ基をメチル化したシクロデキストリンの一級ヒドロキシ基を特異的に2個、スルホン酸エステル化した誘導体を合成した。ここで二級ヒドロキシ基をメチル化したのは、グラミシジンSなどの膜傷害性抗菌ペプチドではアミノ基に併せて疎水基を持つことに基づく。そこでアミノ基を導入した反対側を疎水部とし、全体で両親媒性構造をつくりあげるデザインである。合成ではまず、シクロデキストリンをピリジン中でt-ブチルジメチルクロロシランを加えて6位ヒドロキシ基をシリル化した。順相シリカゲルクロマトグラフィーによる精製で得た粗製生物を水素化ナトリウム存在下、ヨードメタンと反応させ、順相シリカゲルクロマトグラフィーによって精製して6-シリル化-2,3-ジメチル化シクロデキストリンを得た。これをフッ化アンモニウムと反応させることで脱シリル化し、順相シリカゲルクロマトグラフィーにて2,3-ジメチル化シクロデキストリンを得た。これを原料に、一級ヒドロキシ基を特異的に2個、スルホン化した誘導体を合成した。スルホン基にはp-トシル基を用いた。



2, 3-ジメチル化 シクロデキストリンをピリジン中で塩化トシルと反応させ、得られた反応混合物を逆相および順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製して目的物であるジトシラートの3つの位置異性体(AD体、AC体、AB体)を得た。

それらの置換位置決定はNMRによる構造解析によって行った。まず、1D-H-NMRによってシクロデキストリン上に二つのトシル基が存在すると決定した。次に、COSYおよびTOCSYスペクトルによりシクロデキストリンの7つのグルコースそれぞれについてプロトンを帰属した。さらにROESYによってグルコース残基間NOEを観測した。隣り合うグルコース残基のH1とH4は十分に近い距離にあるためにNOEが生じる。そこでROESYを用いて、それぞれのグルコース中のH1とH4の相関を調べることで、グルコースの配列を決定した。図1にAB異性体のNMRスペクトルを示す。各シグナルの詳細な帰属はTOCSYスペクトル上に示す。以上のように、二級ヒドロキシ基をメチル化したシクロデキストリンの一級ヒドロキシ基を特異的に2個、スルホン酸エステル化した誘導体を得た。これはシクロデキストリン上の反応点を特定することで引き続く誘導体化反応によってオルニチン側鎖に相当するアミノプロピル基等を導入することを可能にするこれらを用いれば分子上のアミノ基の距離と活性の関係を調べることができ、グラミシジンSのモデル化とともに、その構造の理解を深める研究に発展できる。

(2) 次に、炭素数が異なる一級アミノ基を持つシクロデキストリン誘導体について記す。天然ペプチドであるグラミシジンSの主鎖とアミノ基は3個の炭素で隔てられており、その距離・自由度は活性に影響するという研究がある。そこでシクロデキストリンにおけるその関係を調べるために炭素数が異なるアミノ基を持つ誘導体を合成した。まずアミノメチル基を持つ誘導体について。DMSO水溶液中でアセチル化ヘプタアジ化シクロデキストリンに硫酸銅とアスコルビン酸ナトリウムの存在下、Bocグリシルプロパルギルアミドを加え、マイクロ波加熱(120)下で10分反応した。マイクロ波加熱によるこの反応はシクロデキストリン上の7個の反応部位に対する多点反応であるにもかかわらず、高効率で進んだ。得られた反応混合物を順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製することで生成物を得た。アセチル基とBoc基の脱保護については、それぞれナトリウムメトキシド/メタノール溶液による反応、トリフルオロ酢酸による反応でほぼ定量的に目的物を得た。これらの構造決定はNMR(図2)および質量分析によって行った。

同様に、アミノプロピル基を持つ誘導体、

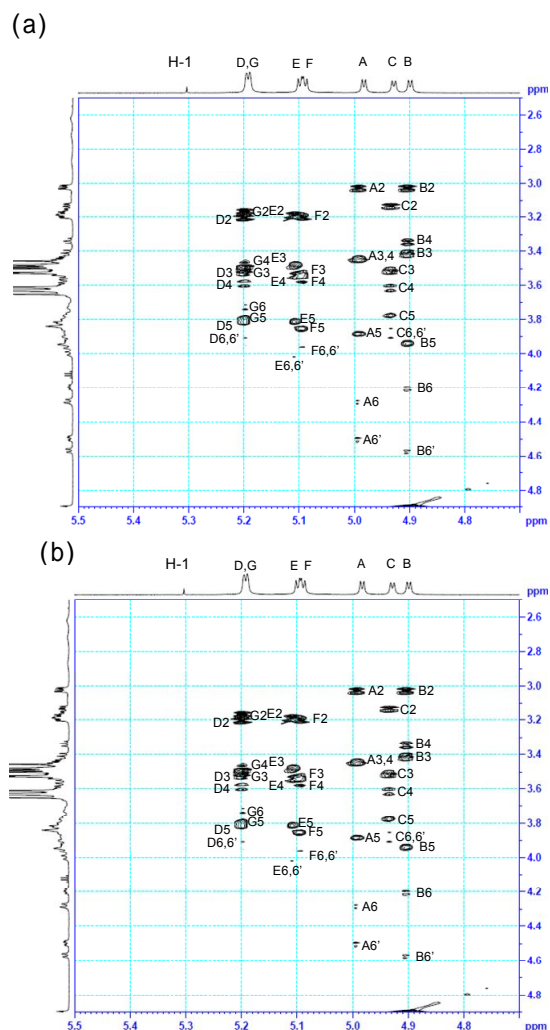


図1 6位ジトシル化2, 3-ジメチル化シクロデキストリンのNMRスペクトル。(a) TOCSY、(b) ROESY

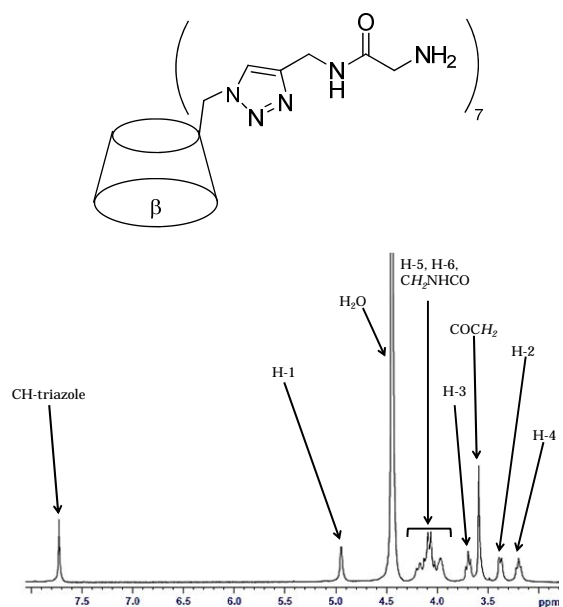


図2. アミノメチル基を持つ誘導体シクロデキストリン誘導体の¹H NMRスペクトル(400 MHz, DMSO-d₆)

そして、ペンチルアミノ基を持つ誘導体を合成した。これら置換基の導入は両者とも高収率であり、シクロデキストリンへの多点化学修飾にマイクロ波支援クリック反応が有用であることが確認された。

(3) 2つのアミノ基を持つリジンを結合した誘導体について。

アミノ基は中性条件下では陽イオンとなり、細菌膜の負電荷を帯びたリン脂質と静電的な相互作用をする。より多くのアミノ基を持つ誘導体ほど、より強い親和性が期待できる。そこで2つのアミノ基を持つリジンをシクロデキストリン上に導入した。一方、細菌膜を攪乱・傷害するためには細菌膜を構成する脂質分子のアルキル鎖と相互作用する疎水性基も重要であることが示唆されている。そこでグラミシジンSがイソプロピル基を持つことに注目し、これをシクロデキストリンに導入した。さらに分枝の有無が活性にどう影響するかを調べるために直鎖プロピル基を導入し、同時に炭素数の効果を調べるためメチル基を持つ誘導体を用意した。

イソプロピル基の導入した誘導体の原料としてイソブタノイル化アジ化シクロデキストリンを採用した。これにリジンを結合するためにBoc-Lys(Boc)-プロパルギルアミドをマイクロ波支援クリック反応させ、得られた固体のIR、HNMRスペクトル上のトリアゾール環、Boc保護リジンのピークからシクロデキストリン1分子に対して7個のリジンの存在を確認し、高収率でリジンの導入に成功した。引き続きBoc基を脱保護して定量的に目的物を得た。そのHNMR(図3)ではBoc基シグナルの消失と同時にリジンとシクロデキストリンの該当するシグナルが観察された。また、質量分析でも、分子イオンピーク(m/z 3594.02, $M+Na$)が観察された。さらに元素分析から目的物が純粋に得られたことを確認した。同様にn-ブタノイル化およびアセチル化したシクロデキストリンについても高収率で目的物を得た。

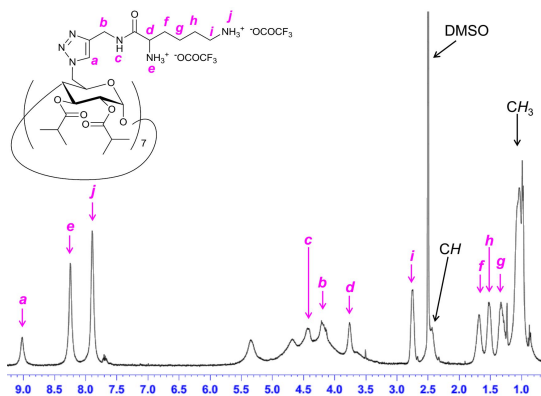
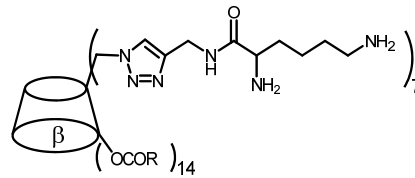


図3. リジンを結合したイソブタノイル化シクロデキストリン誘導体の¹H-NMRスペクトル(400 MHz, DMSO-*d*₆)



R	MIC (μg/mL)	
	大腸菌	枯草菌
CH ₃	>128	128
CH(CH ₃) ₂	128	32
CH ₂ CH ₂ CH ₃	>128	64

表1. CD誘導体の最小発育阻止濃度

(4) こうして得られたリジンを結合したシクロデキストリン誘導体について抗菌活性試験を実施した。化学物質の抗菌性は、細菌の生育を阻止するのに必要な最小濃度(最小発育阻止濃度、MIC)で評価した。実験対象としてはグラム陽性細菌として枯草菌、グラム陰性菌として大腸菌を用いた。その結果を表1に示す。

ここで、グラミシジンSと同じイソプロピル基を持つ誘導体が最も顕著な抗菌性を示した。それはグラム陽性菌である枯草菌、グラム陰性菌である大腸菌に共通していた。同じ炭素数を持つn-プロピル基を持つ誘導体は、おおむね2倍の濃度を発育阻止に必要とした。これは天然ペプチドに見られる分枝アルキル構造が効果的な活性を現すために必要なことを示唆する。また、全ての物質に共通して大腸菌よりも枯草菌に対する値が小さかった。これはグラム陽性菌とグラム陰性菌の膜構造の違いと考えられる。グラム陽性菌は細胞質膜のみを持つのに対して、グラム陰性菌はその外側に、外膜と呼ばれるもう1つの脂質膜が存在し、通常、これが抗生物質に対する物理的障壁となるからである。

さらに、最小発育阻止濃度が1000 μg/mLを上回る場合には、その物質には抗菌性はない、10~1000 μg/mLの場合には中程度、そして10 μg/mL以下のものは有効な抗菌性ありと一般に評価される。それに基づけば今回合成された誘導体はおおむね中程度の抗菌性を持つと評価できる。興味深いことに、以前に当研究室で合成されたアミノメチル基を持つ誘導体では、疎水性アルキル基についての抗菌性の順位は、n-プロピル基<イソプロピル基<メチル基であった。今回の結果との対比から、抗菌活性においては、細菌膜に結合するための静電相互作用の源となる陽イオン性アミノ基(親水性基)の数の多寡だけでなく、それと疎水性基のバランスが重要であることがあらためて示された。

次に併用抗生物質の作用増強性能につい

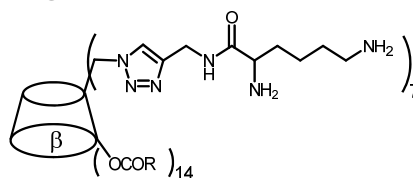
て。先に記したようにグラム陰性菌は、その外膜を抗生物質に対する物理的障壁とすることで抵抗性を示す。もし、外膜を傷害することで物質透過性を増すことができれば、無効であった抗生物質が抗菌性を示すことができる。そこで今回構成したシクロデキストリン誘導体がそのような活性回復・増強作用を持つかどうかの試験を行い、外膜傷害性を評価した。

併用抗生物質として大腸菌の外膜の影響が大きいことが知られているノボピオシンおよびエリスロマイシンを用いた。前述の最小発育阻止濃度試験において、所定のシクロデキストリン誘導体を共存させ、そして濃度が異なるようにノボピオシンまたはエリスロマイシンの溶液を加えて、両抗生物質それぞれの最小発育阻止濃度を求めた。その結果を表2に示す。

これについては非常に興味深い結果となった。先の最小発育阻止濃度実験において、最も高活性であったのはイソプロピル基を持つ誘導体であった。これに対し、単独では大腸菌に対する最小発育阻止濃度が128 $\mu\text{g/mL}$ であったノボピオシンの効果を最大に増強したのは、メチル基を持つシクロデキストリンであった。一方、イソプロピル基およびn-プロピル基を持つ誘導体が増強活性を示したのは32 $\mu\text{g/mL}$ になってようやくであった。エリスロマイシンに対する効果ではその程度は小さいが、同様にメチル基を持つシクロデキストリンが最大の増強活性を示した。これはメチル基を持つ誘導体が最も効果的に大腸菌の外膜を傷害し、その結果としてノボピオシンおよびエリスロマイシンの活性が現れたことを示す。一方、この誘導体単独での抗菌性はイソプロピル基およびn-プロピル基を持つ誘導体より弱い。これは内膜（細胞質膜）に対する作用の弱さを反映していると考えられる。グラム陰性菌の外膜はリポドAを主とする糖脂質からなり、一方、内膜（細胞質膜）はホスファチジルグリセロールアミンおよびホスファチジルグリセロールを主成分とする。これら脂質の違いをシクロデキストリン誘導体は認識し、ここで観察された特異な活性を示したと考察する。

本研究ではシクロデキストリンを利用して抗菌ペプチドをモデル化し、その活性発現における構造の役割について知見を得て、そして人工抗菌物質開発へと展開するために基盤となる研究を行った。ここではマイナス電荷を帯びている細菌膜脂質と相互作用するアミノ基、そして膜脂質のアルキル鎖と相互作用する疎水性基シクロデキストリン内に配置する方法を研究した。そして、これら誘導体の活性を調べて、それぞれの相互作用と活性発現に必要な構造との関係についての重要な知見を得た。

表2. シクロデキストリン存在下でのノボピオシン、エリスロマイシンの大腸菌に対するMIC



R	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	ノボピオシン			
	シクロデキストリン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)			
	32	16	8	0
CH_3	<1	2	8	128
$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	4	128	128	
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	32	128	128	

R	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	エリスロマイシン			
	シクロデキストリン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)			
	32	16	8	0
CH_3	16	16	32	64
$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	32	32	32	
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	32	32	32	

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

石原由加里、宮川淳、山村初雄、6位にトシル基を有する2,3-ジメチル化シクロデキストリンの合成と構造決定、2011年9月8日、第28回シクロデキストリンシンポジウム(秋田)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山村 初雄(YAMAMURA HATSUO)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：820220440

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし