

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591170

研究課題名(和文)肺炎起因菌に対する抗菌ペプチドの細胞死誘導機構の解析と治療戦略の基盤研究

研究課題名(英文) Studies on antimicrobial peptide-mediated death of bacteria associated with pneumonia

研究代表者

桑野 剛一 (KUWANO, KOICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60215118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌ペプチドの抗菌機構について解析した。抗菌ペプチドは大腸菌に対して、その抗菌活性と膜透過性亢進がほぼ相関した。ある抗菌ペプチドは、活性酸素のみを誘導した。一方、抗菌ペプチドは黄色ブドウ球菌の膜透過性を亢進し、活性酸素の産生を誘導した。さらに、抗菌ペプチドはマイコプラズマに対して膜透過性を亢進しないが、活性酸素を誘導した。hydroxyl radical除去剤は大腸菌、マイコプラズマにおける抗菌ペプチドの活性を阻害した。以上より、抗菌ペプチドには、膜透過性亢進、およびhydroxyl radicalによる抗菌機構が存在し、菌種により抗菌活性における活性酸素依存度は異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We examined the mechanisms by which antimicrobial peptides cause cell death of bacteria. For *E. coli*, the levels of antimicrobial activity by the peptides were associated with the levels of increment of cell permeability induced by the peptides. Treatment of some antimicrobial peptides induced only reactive oxygen species (ROS) in *E. coli*. In contrast, the peptides caused increment of cell permeability as well as production of ROS in *S. aureus*. Furthermore the peptides induced the production of ROS, but not increment of cell permeability in mycoplasma. Scavengers of hydroxyl radical inhibited the activity of antimicrobial peptides against *E. coli* and mycoplasma. Collectively, the antimicrobial peptides possess the two distinct mechanisms in the induction of bacterial cell death: increment of cell permeability and ROS production. Selection of the mechanism for the cell death was dependent on bacterial species.

研究分野：病原細菌と宿主の相互作用の解析

キーワード：塩基性抗菌ペプチド 抗菌活性 過酸化水素 膜透過性 ヒドロキシラジカル 抗菌剤 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

市中肺炎の起因菌として、肺炎球菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマ等が分離されている。しかし、薬剤耐性菌が近年増加の傾向にあり、ときには治療が遷延化することもある。そこで、本研究では、宿主の自然免疫機構の一つである抗菌ペプチドによる細胞死誘導機構の解析とその治療応用について検討する。

細菌感染が起こると、まず宿主は非特異的感染防御機構で侵入してきた病原菌を排除する。感染初期の防御機構の一つとして、デフェンシン、カテリシジン等の抗菌ペプチドが機能することが知られている。これら抗菌ペプチドの特徴として、抗菌スペクトラムが広いことが挙げられる。即ち、一般病原細菌、薬剤耐性菌である MRSA、VRE を含む多くの細菌等に対して抗菌活性を示すことが知られている。抗菌活性の発現には、ペプチドの塩基性アミノ酸の陽性電荷と細菌表面の陰性電荷の静電的相互作用が重要であるとされる。その相互作用の結果、膜透過性が亢進し、ポアが形成された後、細胞死が誘導される機序が提唱されているが、膜透過性と細胞死が必ずしも相関しない結果を我々は観察している。このように、抗菌ペプチド・膜相互作用の後の細胞死へ至る機序は、完全に解明されていない。

一般に、細胞壁合成阻害剤、タンパク質合成阻害剤、DNA・RNA 合成阻害剤等、それぞれの特異的な作用機構により、殺菌的あるいは静菌的な細菌の増殖阻害、細胞死が誘導される。ところで、近年、抗菌剤による一般的な抗菌機構とは別の機構（酸化ストレス等）により、細菌の細胞死が誘導されることが報告された（*Cell* 130, 797-810, 2007）。即ち、殺菌的抗菌剤が標的分子と相互作用し、TCA 回路依存的に電子伝達系が強く活性化されるとスーパーオキシド O_2^- が産生され、次いで膜に存在する Fe-S クラスターより Fe^{2+} が誘起される。さらに、Fenton 反応によって、 Fe^{3+} およびヒドロキシラジカル $OH\cdot$ が産生され、遂にはこのヒドロキシラジカルによって細菌の細胞死が誘導される。

また、DNA の切断を誘導するキノロン系薬剤、およびラクタム剤等では、この DNA の傷害により SOS 反応および活性酸素が誘導される。このように、抗菌剤による細菌の標的分子との相互作用の後、酸化ストレス、SOS 反応等の反応が相互作用しながら細菌の細胞死が誘導されることが次第に明らかになってきた。

ところで、当教室では、長年にわたり抗菌ペプチドの活性（*Current Microbiology* 52:435-438, 2006）、抗菌作用機序（*Int J*

Antimicrob Agents, 26(5):396-402, 2005) 等について研究してきた。その成果の中で、抗菌ペプチドに抵抗性、感受性菌が存在することを観察している。この感受性の違いが細胞内の酸化ストレス、SOS 反応の違いに起因することを示唆するデータを得ている。

このような背景から、本研究では、抗菌ペプチドで誘導される活性酸素産生、SOS 反応の検証、および抗菌ペプチドの抗菌機構の解析等を行う。

2. 研究の目的

非特異的感染防御において重要な働きをする抗菌ペプチド（デフェンシン、カテリシジン等）の特徴は、抗菌スペクトルが広く、また薬剤耐性菌にも抗菌活性を示すことにある。しかし、その抗菌作用機序は、完全に解明されていない。近年、 β -ラクタム、キノロン薬剤等の抗菌剤による細菌細胞死の機序として、SOS 反応、酸化反応由来ヒドロキシラジカル $OH\cdot$ 等の関与が示唆されている。

本研究において、抗菌ペプチドによる細胞死の誘導機構を細胞内反応シグナルの観点から解明し、その細胞死誘導を外因的に制御を試み、抗菌ペプチドの活性を増強する方法を探り、臨床的に感染症治療の効率化を図る基盤的なデータを得ることを目的とする。

本研究において、非特異的感染防御において重要な働きをする抗菌ペプチド（デフェンシン、カテリシジン等）の抗菌作用機序の解明、とりわけ、抗菌ペプチドの膜へ作用した後、細胞死へ至る機序の解明をする。さらに、*in vitro*, *in vivo* における抗菌ペプチドの活性を増強する方法を探り、臨床的に感染症治療につながるような基盤的成果を生み出すことを目的とする。

本課題における主な研究項目は次のとおりである。

抗菌ペプチドの抗菌機構における活性酸素産生および酸化ストレス反応の役割の解析。

酸化反応、SOS 反応の制御物質（modulator）による抗菌ペプチドの抗菌活性の増強の検討。

3. 研究の方法

抗菌ペプチドの主要な抗菌機構である膜透過性亢進と活性酸素誘導産生の相関について検討する。

使用ペプチド：

KWW: KWWKWWKW

KWF: KWFKWFKW

KFW: KFWKFWKF

L-peptide: RVCRTGRSRWR

注：下線は塩基性アミノ酸

抗菌活性実験

標的細菌を培養後、 1×10^5 CFU/ml に調整し、抗菌ペプチドと種々の濃度で、37、2 時間インキュベーションする。普通寒天培地上で一晩培養後、出現コロニー数を定量する。

膜透過性亢進実験

細菌を培養後、 1×10^5 CFU/ml に調整し、0.25mM Disc₃(5) で標識する。その後、抗菌ペプチドを添加後、蛍光プレートリーダーで、励起 627nm 蛍光 670nm を測定する。

過酸化水素産生実験

細菌を培養後 1×10^5 CFU/ml に調整し、抗菌ペプチドを添加する。経時的に上清中の過酸化水素を Hydrogen Peroxide Assay kit で定量する。

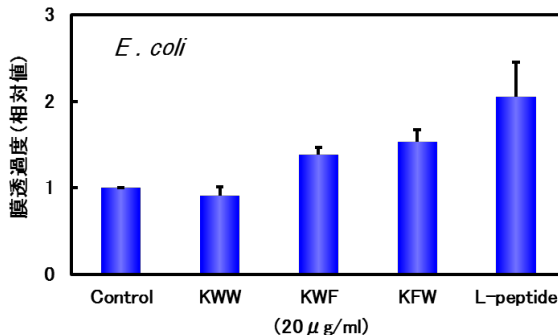
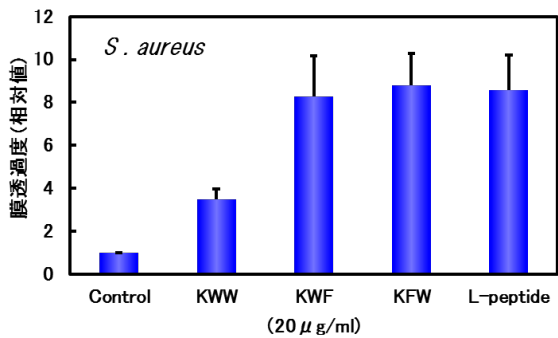
8-OHdG 誘導実験

細菌を培養後 2×10^9 CFU/ml に調整し、抗菌ペプチドを添加する。37、1 時間インキュベーション後、DNA を抽出して、検出キットで 8-OHdG を定量する

hydroxyl radical 阻害剤による阻害実験
上記の標的細菌と抗菌ペプチドの系に 25mM チオウレア、5mM 2,2'-bipyridyl を添加し、抗菌活性、膜透過性、8-OHdG 産生への影響を検討する。

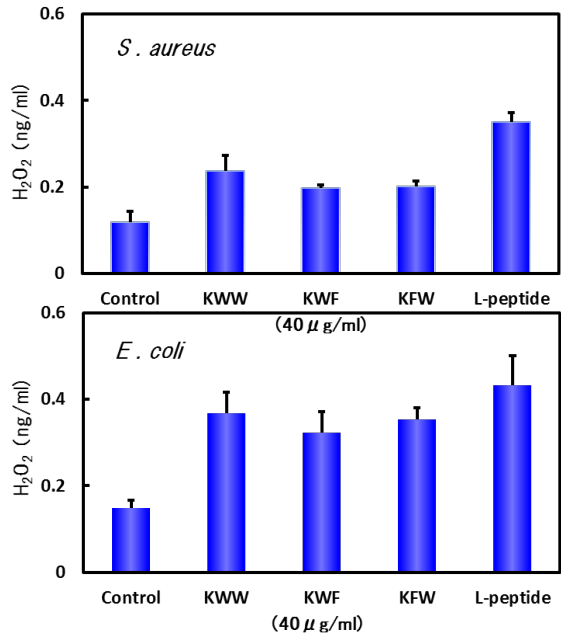
4. 研究成果

(1) 膜透過性の亢進



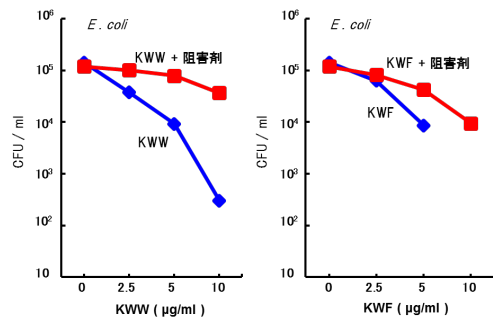
S. aureus ではほぼすべての抗菌ペプチドが膜透過性を亢進した。一方、E. coli においては、L-peptide が最も膜透過性を亢進した。KFW, KWF ではその透過性亢進レベルは低下した。ところが、KWW は全く膜透過性亢進を誘導しなかった。また、抗菌ペプチドは Mycoplasma pneumoniae の膜透過性を亢進しなかった。

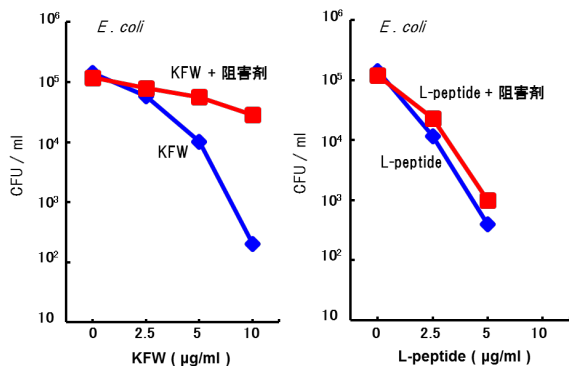
(2) 過酸化水素の産生誘導



全てのペプチドが過酸化水素の産生を誘導した。その産生は大腸菌に比べて黄色ブドウ球菌の方が低い傾向にあった。興味あることに、大腸菌で KWW は膜透過性を亢進しなかったが、過酸化水素の誘導をした。また、抗菌ペプチドは Mycoplasma pneumoniae において、過酸化水素の産生を誘導した。

(3) hydroxyl radical 阻害剤の阻害効果

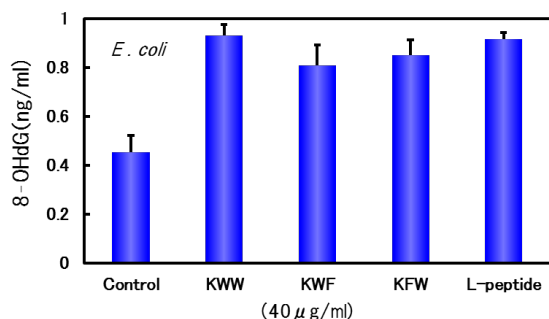




阻害剤（方法参照）はKWW（10µg/ml）の抗菌活性（対大腸菌）をほぼ阻害した。KWF、KFWにおいても同様に阻害効果を認めた。しかしながら、L-peptideは全く阻害効果を認めなかった。この結果は、L-peptideの抗菌機構には、活性酸素が関与しないことを示唆する。また、阻害剤は抗菌ペプチドの *Mycoplasma pneumoniae* に対する抗菌活性を阻害した。

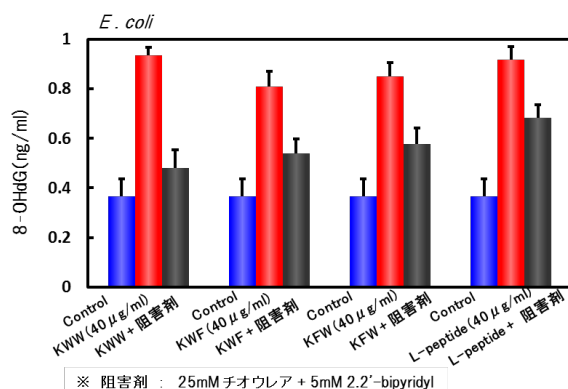
(4) 8-OHdG の産生誘導

hydroxyl radical 阻害剤の阻害効果を認めたことから、hydroxyl radical の産物である 8-OHdG を定量した。



図のように、すべてのペプチドが 8-OHdG を誘導した。

(5) hydroxyl radical 阻害剤による 8-OHdG の産生阻害



阻害剤の添加により、8-OHdG の産生は抑制された。特に、KWW では、その阻害効果が最も強かった。

(6) カタラーゼの役割

黄色ブドウ球菌が活性酸素を産生しているにも拘わらず、hydroxyl radical の除去剤による抗菌活性阻害を認めなかったことから、カタラーゼの関与を検討するため、抗菌ペプチド処理した黄色ブドウ球菌、大腸菌のカタラーゼ産生を調べた。抗菌ペプチド処理により、黄色ブドウ球菌は有意にカタラーゼを産生した。その産生量は大腸菌のそれと比較して有意に高かった。即ち、黄色ブドウ球菌ではカタラーゼが抗菌ペプチドにより誘導された過酸化水素を分解するため、活性酸素はその細胞死誘導に強く関与しないと推定する。

以上より、抗菌ペプチドは膜透過性亢進、および活性酸素 (hydroxyl radical 等) による抗菌機構を有することを明らかにした。しかし、菌のカタラーゼ産生レベルが抗菌ペプチドの活性酸素依存性抗菌活性に影響することを見出した。

また、抗菌活性を増強するため、酸化反応に関与する鉄剤、糖の役割を検討したが、現時点の解析では有意なポジティブデータは得られていない。さらに、抗菌活性を増強におけるカタラーゼ等の関与について解析を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

Shimizu T, Kimura Y, Kida Y, Kuwano K, 以下 3 名 Cytadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4. *Infect Immun* 82, 3076-86(2014) 査読有 doi: 10.1128/IAI.01961-14.

Uchida K, Nakahira K, Mimura K, 以下 8 名, 6 番目 Effects of *Ureaplasma parvum* lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice. *J Reprod Immunol*. 100(2):118-27(2013) 査読有 doi: 10.1016/j.jri.2013.10.001.

Taira J, Kida Y, Kuwano K, Higashimoto Y. Protein phosphatase 2A dephosphorylates phosphoserines in nucleocytoplasmic shuttling and secretion of high mobility group box 1. *J Biochem* 154(3) 299-308(2013) 査読有 doi: 10.1093/jb/mvt056.

Kida Y, Taira J, Yamamoto T, Higashimoto Y, Kuwano K. EprS, an autotransporter protein of

Pseudomonas aeruginosa, possessing serine protease activity induces inflammatory responses through protease-activated receptors. Cell Microbiol. 15(7):1168-1181(2013) 査読有 doi: 10.1111/cmi.12106.
Qin L, Kida Y, Imamura Y, Kuwano K, Watanabe H. Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Chemother. 19: 261-271(2013) 査読有 doi: 10.1007/s10156-012-0495-3.
Kurokawa K, Ryu KH, Ichikawa R, 以下 11 名、7 番目 Novel bacterial lipoprotein structures conserved in low-GC content gram-positive bacteria are recognized by Toll-like receptor 2. J Biol Chem. Apr 13;287(16):13170-81. (2012) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.292235.
Choi SY, Lim JW, Shimizu T, Kuwano K, Kim JM, Kim H. Reactive oxygen species mediate Jak2/Stat3 activation and IL-8 expression in pulmonary epithelial cells stimulated with lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma pneumoniae*. Inflamm. Res. May; 61(5):493-501(2012) 査読有 doi: 10.1007/s00011-012-0437-7.

〔学会発表〕(計 8 件)

山本武司、桑野剛一、木田豊

Mycoplasma pneumoniae の細胞内侵入性は本菌感染に伴う IL-8 産生応答を増強する
第 88 回日本細菌学会総会 平成 27 年 3 月 26 日 岐阜

山本武司、谷健次、木田豊、桑野剛一

Mycoplasma pneumoniae 感染肺上皮細胞における IL-8 産生機構の解析。第 41 回日本マイコプラズマ学会、平成 26 年 5 月 22 日 東京大学 伊藤国際学術研究センター

谷健次、桑野剛一

塩基性抗菌ペプチドの抗菌機構における ROS の関与の検討 第 87 回日本細菌学会総会 平成 26 年 3 月 26 日 タワーホール船堀 東京

桑野剛一

マイコプラズマと宿主の相互作用---マイコプラズマ研究の松明を受け継いで 第 40 回日本マイコプラズマ学会、平成 25 年 5 月 23 日 秋葉原 UDX GALLERY 東京

清水隆、桑野剛一、木田豊、橋理人、渡会雅久

Mycoplasma pneumoniae による新規炎症誘導機構の解析 第 40 回日本マイコプラズマ学会、平成 25 年 5 月 23 日 秋葉原 UDX GALLERY 東京

谷健次、桑野剛一

塩基性抗菌ペプチドの抗菌機構の解析 第 86 回日本細菌学会総会 平成 25 年 3 月 18 日 幕張メッセ 国際会議場 千葉

清水隆、木田豊、桑野剛一

Mycoplasma pneumoniae の TLR2 非依存的な炎症誘導 第 39 回日本マイコプラズマ学会、平成 24 年 5 月 24 日 いわて県民情報センター

谷健次、木田豊、桑野剛一

塩基性抗菌ペプチドの抗菌機構の解析 第 85 回日本細菌学会総会 平成 24 年 3 月 28 日 長崎ブリックホール 長崎市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/micro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 剛一 (KUWANO KOICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60215118

(2) 研究分担者

木田 豊 (KIDA YUTAKA)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30309752

谷 健次 (TANI KENJI)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：00614108