



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the interaction between substances derived from pathogens and an antimicrobial peptide tachyplestin I [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	櫛引, 崇弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11833号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58619
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Kushibiki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 櫛引 崇弘

学 位 論 文 題 名

Studies on the interaction between substances derived from pathogens and an antimicrobial peptide tachyplesin I

(病原菌由来物質と抗菌ペプチドタキプレシン I の相互作用に関する研究)

抗菌ペプチドは現在までに様々な生物から発見されており、自然免疫の一部を担っている。抗菌ペプチドの多くはグラム陰性菌・陽性菌・真菌等に対する幅広い抗菌活性を保持している。近年は抗生物質に耐性を持った細菌の出現が問題になっているが、抗菌ペプチドの中にはそのような耐性菌に活性を示すものもあり、その上抗生物質とは異なり、菌に耐性を獲得されにくいという特徴を持つ。これらの理由から、抗菌ペプチドは次世代の新薬候補として期待されている。

二次構造に基づくと、抗菌ペプチドは大きく 3 つ、つまりアルファヘリックスタイプ、ベータシートタイプ、フレキシブルタイプに分類される。構造が知られている抗菌ペプチドのうち、アルファヘリックスタイプが最も多く発見されており、その構造及び活性に関する研究は近年著しく進められている。ベータシートタイプの抗菌ペプチドは、アルファヘリックスタイプに次いで多く発見されているにもかかわらず、構造に関する知見は不足している。また一般的に抗菌ペプチドは、細菌の膜と相互作用し、膜を崩壊させることで抗菌活性を発揮していると考えられているが、抗菌ペプチドと病原菌由来物質の相互作用に関する構造的知見は乏しい。そこで本研究では、Tachyplesin I (TP I) と呼ばれるベータシートタイプの抗菌ペプチドをターゲットとし、病原菌由来物質との相互作用の詳細について、構造の観点から明らかにすることを試みた。

TP I はカプトガニから発見され、グラム陰性菌・陽性菌・真菌に対して抗菌活性を示すことが知られている。2 本のジスルフィド結合を持ち、水中ではベータシート構造を形成している。TP I が病原菌由来物質のリポ多糖と相互作用することはすでに報告されている。リポ多糖はグラム陰性菌外膜の主成分であり、ヒトにおいて敗血症を引き起こす原因物質であることも知られている。敗血症は現在もなお世界的に深刻な病であり、有効な治療法が確立されていない。そのため、リポ多糖に結合し、毒性を抑えるような抗菌ペプチドの研究が注目されている。ただし前述の通り、抗菌ペプチドと病原菌由来物質の相互作用に関する研究は少なく、特に野生型のベータシート型抗菌ペプチドとリポ多糖の複合体構造を明らかにした例

は無い。TP I においても、リポ多糖との相互作用に関する詳細については、不明な点が多い。したがってまずは、TP I とリポ多糖との複合体構造解析を行った。

リポ多糖存在時における TP I の立体構造を決定するため、核磁気共鳴(NMR)装置による測定と円偏光二色性(CD)測定を行った。さらに NMR 等を用いた、TP I のリポ多糖結合部位の推定を行い、最終的にドッキングソフトで複合体モデルを提案した。これらの研究結果により、以下に示すことが明らかになった。

1. リポ多糖に結合することで、TP I のベータシート領域が伸長し、わずかにシート構造がねじれる。
2. TP I の Trp2 を含む N および C 末端がリポ多糖との結合に関与している。
3. TP I の塩基性残基である Lys1, Arg15, Arg17 はリポ多糖の糖部分やリン酸基部分に、芳香族残基である Trp2 や Phe4 は脂肪鎖側と相互作用する。

本研究で提案した TP I とリポ多糖の複合体モデルは、野生型ベータシートタイプ抗菌ペプチドとして初めてのものである。これらの成果をもとに、TP I の病原菌由来物質への結合能の強化等を通じ、医薬品・医療材料へ応用されることが期待される。

また次に、TP I のキチンに対する結合に関する研究を行った。キチンは真菌の細胞壁に必須の構成成分であり、抗真菌活性を示す抗菌ペプチドには、キチンをターゲットにしているものもある。したがって今後より詳細に抗真菌活性メカニズムを理解する上で、まずはキチンとの相互作用を理解することが必須であるが、そういった研究例は少ない。キチン結合に重要な要因として、芳香族残基、ベータシート構造、その他特別なドメイン等、様々な候補が提案されているが、結論は出ていない。そこで我々はまず、NMR 測定により、TP I のキチン結合部位を推定した。その後結合部位と推定された残基を置換した変異体を用いて、各残基の重要性を調べた。これらの研究で、以下に示すことを明らかにした。

1. TP I の中でも 4 つの残基(Phe4, Arg9, Tyr13, Arg17)がキチン結合に関与していることが示唆された。
2. 特に芳香族残基である Phe4 と Tyr13 がキチン結合に重要であり、塩基性残基である Arg9 と Arg17 は副次的に関与する可能性がある。

我々の知る限り、TP I はキチン結合能を有する最小の抗菌ペプチドである。その TP I のキチン結合能やキチン結合部位を明らかにしたことは、今後他の抗菌ペプチドのキチン結合メカニズムの解明や、キチン結合能と抗真菌活性の相関に関する研究の基盤となり得る。