



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The molecular factors derived from potent bactericidal activity of reduced cryptdin-4 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 優次; Sato, Yuji
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(ソフトマター科学)
Dissertation Number	甲第14846号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/86017">https://hdl.handle.net/2115/86017</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Sato_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(ソフトウェア) 氏名 佐藤 優次

## 学位論文題名

The molecular factors derived from potent bactericidal activity of reduced cryptdin-4  
(還元型 cryptdin-4 の強力な殺菌活性の分子機構に関する研究)

抗菌ペプチドは多くの生物が有する自然免疫系の一因子である。塩基性アミノ酸を多く含み生理条件下では正電荷を有するものが多く、負に荷電した細菌の細胞膜と相互作用し活性を示すとされている。その抗菌スペクトラムは広く、グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌等に対し活性を示し感染性の微生物から宿主を防御している。主要な抗菌ペプチドファミリーに defensin があり、その特徴の 1 つはシステイン残基に富んでいることである。例えばヒト defensin では、これらのシステイン残基が形成するジスルフィド結合パターンから  $\alpha$ -defensin と  $\beta$ -defensin に分類される。ジスルフィド結合が形成された酸化型 defensin はその架橋により安定化された 3 本のストランドからなる  $\beta$ -シート構造を形成する。長らく defensin の研究対象は酸化型が中心であったが、還元型が酸化型と異なる殺菌活性を示すことが報告されて以降、還元型に対しても注目が集まり始めた。生体内における還元型 defensin の機能にはまだ不明な点が多いが、炎症性腸疾患患者で健康人と比較し還元型の生成に関与するチオレドキシンの発現に違いが見られるなど、疾患との関連性も示唆されている。

マウスの小腸陰窩にある Paneth 細胞から分泌される  $\alpha$ -defensin は cryptdin (Crp) と呼ばれ、その中の主要なものとして cryptdin-4 (Crp4) が挙げられる。酸化型 Crp4 は腸の非常在細菌に対してのみ活性を示す一方、還元型 Crp4 は非常在細菌に加え常在細菌にも活性を示すという強い殺菌活性を有する。炎症性腸疾患の 1 つであるクローン病のモデルマウスでは Crp4 を含む種々の還元型 Crp が増加していることから、ヒトにおいても還元型 defensin と疾病の関連が示唆されている。しかし、酸化型 Crp4、還元型 Crp4 とともにその殺菌活性機序には未だ不明の点が多い。酸化型 Crp4 では細菌の脂質二重膜透過性を上げ内容物の漏出を引き起こすことが主要な活性機序との報告がある一方、他の defensin の中には細菌細胞内の特定分子をターゲットとしているものがあることも報告されている。また近年、ヒト腸管内に分泌される  $\alpha$ -defensin 6 では酸化型、還元型ともにナノネットを形成し、酸化型では微生物の侵入防御、還元型ではそれに加えて、強い殺菌活性も示すことが、新規的作用機序として報告されている。一方、ヒト  $\beta$ -defensin 1 では還元型のみナノネットを形成するという酸化型とは異なる作用機序を持ち、その形成にはシステイン残基のチオール基が重要とされる。また、システイン残基そのものが単独で抗菌活性を示すことや、ペプチドの構造と疎水性が活性に寄与することも知られており、酸化型と還元型的作用機序の詳細は明らかでない。

このような背景から、還元型 defensin の分子レベルでの作用機序解明は重要であり、ヒト疾患の治療等につながる知見を得ることも期待される。そこで本研究では、還元型 Crp4 の強力な殺菌

活性に重要な分子構造及びその作用機序を明らかにすることを目的とし、特にシステイン残基のチオール基、ペプチドの立体構造等の性質に着目し研究を進めた。

第1章では、還元型 Crp4 の作用機序解明のため必要なペプチド調製法の確立を試みた。ペプチドの機能解析や構造解析には、一般に化学合成ペプチドが用いられるが、生産効率等において難点も多い。また Crp4 のような抗菌ペプチドの微生物宿主による遺伝子組換えでの調製については、その宿主への毒性や宿主由来プロテアーゼによる分解のため安定な生産技術の確立は困難である。そこで、酸化型 Crp4 を凝集傾向のあるタンパク質と共発現させ不活性な封入体として安定化する手法を用いることで、酸化型及び還元型 Crp4 の大量調製を行った。特に還元型 Crp4 については、酸化型 Crp4 を還元変性する方法を検討し、高純度の試料を得ることに成功した。また、システインのチオール基の抗菌活性への役割を検討するため、アルキル化剤として N-ethylmaleimide (NEM) を選択し、化学反応によるシステイン残基の修飾及び精製をおこない、遊離のチオール基を持たない NEM-Crp4 の調製を行った。

第2章では、前章で調製した酸化型 Crp4、還元型 Crp4、NEM-Crp4 に加え、システイン残基をセリンに置換した 6C/S-Crp を用い還元型 Crp4 の分子レベルでの作用機序解明を試みた。始めに非常在菌として *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)、*Escherichia coli* ML35 (*E. coli* ML35) の2種、常在菌として *Lactobacillus johnsonii* (*L. johnsonii*)、*Bifidobacterium breve* (*B. breve*) をそれぞれ選択し、これらに対する各ペプチドの殺菌活性を測定した。非常在菌2種に対しては全てのペプチドが活性を示した。常在菌については、還元型 Crp4 と NEM-Crp4 は *L. johnsonii*、*B. breve* 両方に対して活性を示したが、6C/S-Crp4 は *L. johnsonii* に対しては活性を示さず、*B. breve* には高濃度条件でのみ活性を示した。これに対して、酸化型 Crp4 はどちらの常在菌に対しても活性を示さなかった。これら結果からシステイン残基のチオール基そのものは還元型 Crp4 の活性において重要でないことが示唆された。次に各ペプチドの種々の膜模倣環境中で CD 測定により、その二次構造解析を行った。酸化型 Crp4 は水中、TFE、SDS ミセル全てで  $\beta$  構造を示すスペクトルを示した。還元型 Crp4、NEM-Crp4、6C/S-Crp4 は TFE 中と SDS ミセル中でわずかに構造変化があったが、これら3ペプチドの間で顕著な構造の違いは見られなかった。各ペプチドの疎水性を逆相 HPLC により分析した。保持時間から NEM-Crp4、還元型 Crp4、6C/S-Crp4、酸化型 Crp4 の順に疎水性が高いことが示され、殺菌活性との相関がみられたことから、還元型 Crp4 の強い活性とその疎水性との関連が示唆された。さらに還元型 Crp4 の作用機序が直接的な膜相互作用に起因するかを確かめるため、*L. johnsonii* から抽出した脂質により、蛍光色素を内包したリポソームを調製し、各ペプチドと作用させた。その結果、*L. johnsonii* に対し活性を示した還元型 Crp4 と NEM-Crp4 でのみ顕著な蛍光色素の漏出が見られた。また、静電相互作用を阻害する高濃度 NaCl 存在下では還元型 Crp4 の殺菌活性が低下したことから還元型 Crp4 の強力な活性は膜相互作用によるものであることが示唆された。以上から、本研究によって還元型 Crp4 の強力な活性はその疎水性に由来し、活性機序としては膜破壊が主要な機構であることが明らかになった。