

受賞者

浮穴 和義

広島大学大学院総合科学研究科人間科学部門生命科学研究領域

研究テーマ

両生類の皮膚に存在する新規抗菌物質の同定と合成アナログ分子の開発

1. 目的

院内感染の原因とされる抗生物質（薬剤）耐性細菌や食中毒菌の出現は、特に幼児や高齢者の生命を脅かす極めて深刻な問題である。そのため、抗生物質に代わる新たな抗菌物質の同定・開発・応用に関する早急な研究が望まれている。本研究では、病原性細菌に対し活性を示す新規の抗菌物質を同定しその利用を確立することを目的として、両生類の皮膚から新規の抗菌ペプチドを同定し、それを応用利用することを目指した。具体的な目的は次のとおりである。

まず、両生類の皮膚から生化学的手法により新規の抗菌ペプチドを同定することを目的とした。生物は外界の細菌に対して自らを防御する抗菌ペプチドを含有している。特に湿った場所に生息している両生類の皮膚は多くの抗菌ペプチドを持っていると思われる。微生物が産出する抗生物質と違い、この両生類が持つ抗菌ペプチドは我々の人体に対する副作用や有害作用が極めて小さく、抗生物質の代わりとなる抗菌物質として期待されており、院内感染や食中毒問題の解決に大いに役立つものと考えた。また、両生類が持つ抗菌物質は哺乳類のものとは構造がかなり異なっているため、ヒトの抗菌物質に対する耐性菌の出現は危惧しなくても良いという利点があり、社会的な要請と意義が大きいものとする。

2 番目に、種々の細菌に対する抗菌活性の解析と、合成アナログ分子を用いた、より強力な抗菌ペプチドの産出を行うことで病原性細菌の駆除に役立つための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 方法

両生類の皮膚からの抗菌ペプチドの同定

広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設の住田正幸教授が人工繁殖させている両生類のイシカワガエル (*Rana ishikawae*) を材料として用いた。5 個体分の皮膚からペプチド性画分を粗抽出した後、グラム陰性細菌である大腸菌 (*Escherichia coli*) の増殖率を指標とした抗菌アッセイと逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる 5 段階にわたる精製を繰り返し、抗菌ペプチドを精製・単離した。その後、アミノ酸配列分析と質量分析 (MALDI-TOF-MS) により一次構造を決定した。

新規抗菌ペプチドの前駆体 cDNA の同定

上記の研究で同定できた新規抗菌ペプチドをコードしている cDNA 配列を明らかにするために、得られたアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを作成し、PCR クローニングを試みた。3',5'-RACE 法により前駆体 cDNA 配列を決定した。

同定できた抗菌ペプチドの抗菌活性評価

上記で同定できた抗菌ペプチドを用いてグラム陽性及びグラム陰性細菌に対する抗菌活性を解析した。その細菌として、院内感染や食中毒で問題となる大腸菌 (*E. coli*) や黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus*

aureus) を用いた。

抗菌ペプチドの強力合成アナログ分子の作製とその利用の検討

同定できた抗菌ペプチドの構造を変化させることで、より抗菌活性の強い抗菌ペプチドの産出を試みた。Fmoc 法によるペプチド固相法を用い上記で得られた天然抗菌ペプチドのアミノ酸配列を参考にし、様々な人工ペプチドを合成した。

3. 研究成果

両生類の皮膚からの抗菌ペプチドの同定

イシカワガエルの皮膚から大腸菌の増殖阻止を指標とするアッセイ系により数種の抗菌ペプチドを同定することが出来た。これらの抗菌ペプチドはこれまでに同じアカガエル属の皮膚から単離・同定されている抗菌ペプチドのファミリーに属するペプチドであったが、新規のアミノ酸配列であった（参考文献 1, 2）。また、これらの抗菌ペプチドは、塩基性アミノ酸のリジン残基を豊富に含み、C 末端側にジスルフィド結合を有しているという特徴があることが分かった。

新規抗菌ペプチドの前駆体cDNAの同定

3',5'-RACE 法により前駆体 cDNA 解析を行った。その結果、上記で同定できたペプチドの前駆体タンパク質構造が明らかになった。興味深いことに、前駆体タンパク質構造はいずれの抗菌ペプチドにおいても特徴的な構造を有することが分かった。開始メチオニンに続くシグナルペプチド、酸性アミノ酸に富む酸性スパーサー、リジン・アルギニン (KR) からなるプロセッシング配列、抗菌ペプチドという 4 つの共通構造を有するというものであった。

同定できた抗菌ペプチドの抗菌活性評価

大腸菌 (*E. coli*) と黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を用い、同定できた抗菌ペプチドの抗菌活性を評価した。抗菌ペプチドを段階希釈し、最も低濃度で細菌の増殖を阻止する濃度である最小発育阻止濃度 (MIC) として表した。その結果、どちらの細菌にも強い抗菌活性を示すものや比較的黄色ブドウ球菌に対して強い抗菌活性を示すものなどがあり、抗菌ペプチドの種類により抗菌スペクトラムも違うことが示された。尚、最も小さい MIC の値はどちらの細菌においても $3.1 \mu\text{M}$ であり、最も大きい MIC の値は大腸菌で $100 \mu\text{M}$ 、黄色ブドウ球菌では $25 \mu\text{M}$ であった。

抗菌ペプチドの強力合成アナログ分子の作製とその利用の検討

上記の研究で同定した抗菌ペプチドのうち、36 アミノ酸残基からなる構造的にユニークなペプチド 1 種に着目した。それは、このペプチドは既知の抗菌ペプチドと異なり、ジスルフィド結合から C 末端側に 7 残基伸びた構造をしていることが特徴である。この天然物の構造を基に様々な合成ペプチドを作成し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を検討したところ、C 末端を 7 残基欠損させた合成物に天然物の 4 倍程度強い抗菌力があることを見出した（天然物の MIC が $6.3 \mu\text{M}$ であるのに対し、合成物では $1.6 \mu\text{M}$ ）。

4. 考察

近年、多くの院内感染の拡大が深刻化しており、少子高齢化の現代において免疫力の低い幼児や高齢者の死亡率の爆発的な増加が危惧されている。この院内感染の原因は、多剤耐性緑膿菌・メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）・バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）などの抗生物質や消毒液に対する耐性細菌の感染である。薬剤耐性細菌の出現を減らすために医療現場での抗生物質の使用量を減らす努力が望まれている。その一方、抗生物質以外の新規の抗菌物質の探索とその応用が急務である。

この1年間の研究期間内で上記のとおり貴重な研究成果を得ることが出来た。現在、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などの薬剤耐性細菌に対する抗菌力を調べているところである。上記の合成物は他の抗菌ペプチドと比べても抗菌力が強いため、強力合成アナログ分子の開発に成功したと思われる。また、医学的利用を考えた際に、溶血活性を示してはいけないため、溶血活性が低く抗菌力が強いものを選別する必要がある。今後は抗菌活性のみならず、溶血活性についても検討していく必要がある。

5. 参考文献

1) Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N.

Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents.

Biochim Biophys Acta. 1696:1-14 (2004).

2) Conlon JM.

Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae.

Peptides. 29:1815-1819 (2008).