

論文の内容の要旨

論文題目 昆虫由来の抗菌ペプチド Sarcotoxin IA とグラム陰性菌リポ多糖 (LPS) との相互作用に関する研究

氏名 桶本 和男

生物の生命維持には生体防御機構が必須である。生体防御機構は獲得免疫と自然免疫に大別される。昆虫の生体防御機構は自然免疫のみから成るが、昆虫は多細胞生物の七割以上を占めている最も繁栄した生物と言える。この様な昆虫の成功には優れた自然免疫系も寄与しているに違いない。この自然免疫に携わる分子の一つとして抗菌ペプチドが上げられる。

当教室ではセンチクバエから様々な抗菌性物質を精製単離してきた。その一つに Sarcotoxin IA がある。Sarcotoxin IA はセンチクバエ三令幼虫で体表傷害や感染時に誘導される抗菌ペプチドで、特にグラム陰性菌に高い活性を持つ。Sarcotoxin IA は 39 アミノ酸からなる二つの α -ヘリックスを形成する塩基性で両親媒性のペプチドである。

一般に塩基性で両親媒性のペプチドは抗菌活性を持つと考えられている。その理由は細菌の細胞膜の外側が酸性を帯びている為に抗菌ペプチドの塩基性残基が相互作用し、続いて両親媒性の性質が脂質膜を傷害すると考えられているからである。Sarcotoxin IA は昆虫やほ乳類のような高等生物の細胞に対しては全く傷害活性を持たないが、Sarcotoxin IA が真核細胞の中性の細胞膜に相互作用出来ない為と考えられている。しかし、私は博士課程において Sarcotoxin IA に抗真菌活性を見いだした。真菌は真核細胞でありその細胞膜表面は中性である。従って、Sarcotoxin IA の抗真菌作用が塩基性アミノ酸残基と細胞膜との相互作用による効果とは考えられなかった。更に酸性細胞膜を持つグラム陽性菌に

対して Sarcotoxin IA は殆ど抗菌活性を示さない。この様に、Sarcotoxin IA の抗微生物活性は細菌の酸性細胞膜をターゲットとするだけでは説明出来なかった。そこで、私は塩基性以外の性質も Sarcotoxin IA の抗微生物活性に関与すると考えた。本研究は Sarcotoxin IA のグラム陰性菌との相互作用を解析し、その生物学的な意義を明らかにすることを目的とした。

Sarcotoxin IA のアミノ酸配列と抗菌活性の関係を調べる目的で、まず Sarcotoxin IA の抗菌活性と膜傷害活性における構造活性相関を検討した。その結果、N 末端 2 残基（グリシン¹ -トリプトファン²）が無い Δ^2 Sarcotoxin IA では大腸菌に対する抗菌活性が著しく低下した。一方で細菌内膜のリン脂質組成を模した酸性リポソームに対しては全長の Native Sarcotoxin IA とその膜傷害活性に差が認められなかった。さらに、 Δ^2 Sarcotoxin IA は未処理の大腸菌には抗菌活性を示さないが、外膜の透過性を上げた大腸菌に対しては内膜を傷害し抗菌活性を示すことが解った。従って、N 末端 2 残基のグリシン-トリプトファンがグラム陰性菌の外膜層との相互作用に必須であり、この相互作用が抗グラム陰性菌活性に関係することが示唆された。

グラム陰性菌の外膜層の主成分はリポ多糖（LPS）である。この LPS は多糖と糖脂質の lipid A から構成される。私は LPS と Sarcotoxin IA が相互作用して細菌に結合したのち、細菌細胞膜に作用する事で抗菌活性を示すと考えた。この仮説を証明する為に LPS と Sarcotoxin IA の相互作用を検討した。その結果、Sarcotoxin IA は N 末端 2 残基を削ると LPS に対する親和性が減少した。さらに Native Sarcotoxin IA は lipid A により抗菌活性を阻害された。そこで、Sarcotoxin IA のリポソーム膜傷害活性に対する lipid A の影響を検討した。その結果、lipid A の含量に応じて中性リポソームの Native Sarcotoxin IA に対する感受性が著しく上昇した。一方、N 末端 2 残基を削った Δ^2 Sarcotoxin IA に対しては lipid A の含量を増やしても中性リポソームの感受性に変化は認められなかった。以上の結果は N 末端 2 残基は Sarcotoxin IA と LPS 中の lipid A との相互作用に必須であり、この相互作用が抗菌活性に関係している事を強く示唆した。

多くの抗菌ペプチドは二次構造を形成する、この様な抗菌ペプチドの二次構造は抗菌活性に必須である事が解っている。N 末端の 2 残基が Sarcotoxin IA の二次構造形成に影響を与えていると当初は考えた。Native Sarcotoxin IA と Δ^2 Sarcotoxin IA の構造を NMR スペクトル、CD スペクトル及びゲル濾過により比較した。その結果、Native Sarcotoxin IA と Δ^2 Sarcotoxin IA 共に lipid A と共存すると α -helix を形成した。N 末端 2 残基のトリプトファンはその蛍光変化から lipid A との相互作用部位に位置することも示唆された。また、1 mM の Sarcotoxin IA において自己会合を起こす事が示唆された。しかし、今回の結果では Native sarcotoxin IA と Δ^2 Sarcotoxin IA で構造に大きな違いは認められな

かった。

LPS はその生物活性からエンドトキシンと呼ばれている。大量の LPS を哺乳類に投与すると発熱やショックを起こし最終的には死に至る。この様々な LPS の生物活性に必要な活性部位は lipid A で有ることが知られている。Native Sarcotoxin IA は lipid A に結合すると考えられたので、Sarcotoxin IA の LPS への結合で LPS の生物活性が失われる事が予想された。LPS の生物活性に対する Sarcotoxin IA の影響を調べる目的で LPS によるマクロファージからのサイトカイン産生とセンチクバエでの LPS 誘導性遺伝子に対する Sarcotoxin IA の効果を検討した。その結果、マウス株化細胞 J774.1 細胞からの LPS による TNF- α の産生、及びマウス腹腔マクロファージからの LPS によるサイトカイン (IL-1 α 、IL-10、TNF- α 、GM-CSF) の産生を Native Sarcotoxin IA の濃度依存に抑制した。一方、 Δ^2 Sarcotoxin IA ではその様な抑制効果は認められなかった。また、センチクバエ三令幼虫に於いても Sarcotoxin IA は LPS 誘導性遺伝子の活性化を抑制した。サイトカインの結果と同様に Δ^2 Sarcotoxin IA による LPS 誘導性遺伝子の抑制は認められなかった。従って、Sarcotoxin IA は抗菌活性以外の機能として LPS に結合する事で LPS に対する過剰な応答を抑制していると考えられた。

以上は抗菌ペプチドの塩基性や両親媒性以外の性質が抗菌作用と LPS 中和作用に必須である事を示した初めての知見である。Sarcotoxin IA は LPS によりセンチクバエで体液中に誘導される抗菌物質である。Sarcotoxin IA は lipid A に対する親和性によりグラム陰性菌に選択的な傷害活性を有するのみならず、センチクバエのグラム陰性菌に対する生体防御機構において負の制御機構の一役を担っていると考えられる。