【246】

氏　名（本籍）	上野　悟（茨城県）
学位の種類	博　士（生物科学）
学位記番号	博　甲　第　5397　号
学位授与年月日	平成22年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	**線虫セクロピン前駆領域の生理的役割の解明およびその改変ペプチドの利用に関する研究**

主　査	筑波大学教授	工学博士	王　碧　昭
副　査	筑波大学教授	農学博士	杉浦則夫
副　査	筑波大学准教授	博士（学術）	中島敏明
副　査	筑波大学准教授	博士（理学）	内海真生

論文の内容の要旨

本研究は、微生物に対し選択的に毒性を示す抗微生物ペプチド（AMP）のドメイン－ cecropin P1 を含む nematode cecropin －を解析し、新しい抗菌剤の構築を目指す。AMP は分泌ペプチドであり、細胞外で作用するため、必ずN末端に分泌シグナル領域を含む前駆体として合成され、プロセシングを受けた後、成熟ペプチドとして細胞外の微生物に作用する。cecropin P1 を含む nematode cecropin は、豚回虫から分離された AMP であり、最もその性質が解析されている AMP の一つである。近年、酸性前駆領域が nematode cecropin の前駆体のC末端に保存されていることが発見されたが、その機能は不明だった。本研究では、nematode cecropin P4 の酸性前駆領域の生理的役割を解明し、さらに nematode cecropin P1-P4 前駆領域の電荷を中和した変異体（NP1P-NP4P）の薬理学的特性を解析した。

nematode cecropin P4 の酸性前駆領域と成熟ペプチドを共存させたところ、成熟ペプチドの抗微生物活性を抑制された。他の AMP に対して、insect cecropin A や polymyxin B の活性も抑制した。この抑制効果には、酸性前駆領域のN末端にある3残基（HRR）の配列が存在するときのみに確認され、HRR はプロセシングにおいて除かれると予測されたことから、生体内において酸性前駆領域はプロセシングによる成熟ペプチドの抗微生物活性の制御に寄与していることが示唆された。

一方、塩基性抗微生物ペプチド（CAMPs）は新しい抗菌剤や抗腫瘍剤として有望視されているが、新たな天然の CAMPs の探索には限界がきている。そこで、CAMPs の新しい骨格を得るために、非抗微生物性の配列の酸性アミノ酸残基をアミドと置換（Glu → Gln および Asp → Asn）することで、固有の高次構造への影響を最小限に抑えながら、正電荷を増加させ抗微生物活性を付与させた。この戦略を検証するため、nematode cecropin P1-P4 の前駆領域（P1P-P4P）をモデルとして、P1P-P4P と酸アミド置換により電荷を中和した NP1P-NP4P を調製した。P1P-P4P は抗微生物活性を示さなかったが、NP1P-NP3P は強い抗微生物活性を獲得した。NP2P および NP3P は酸性リン脂質膜に対し障害性を示した。対照的に、NP1P では膜破壊活性を示さなかったことから、多様な殺菌機構が示唆された。また、二次構造の大きな変化は確認されなかった。したがって、酸アミド置換により CAMP の新規骨格を得る戦略は有望であることが示唆された。同様に前

駆領域の酸アミド置換によって得たNP4Pは、単独では抗微生物活性を示さないが、膜障害性AMPと共存させるとその抗微生物活性を増強させる前例のない薬理作用を示した。対照的に、膜障害性以外の作用機序をもつ抗菌剤の活性には影響を及ぼさなかった。膜障害性AMPによる黄色ブドウ球菌の細胞膜の破壊に対するNP4Pの影響を調べた結果から、NP4Pは細胞膜に対する細胞膜破壊を直接促進することで、選択的に膜障害性AMPの抗微生物活性を増強させると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は既存の800以上の抗微生物ペプチドAMPから最も有望なnematode cecropinを着目し、抗菌剤への応用を実現するため、抗菌作用の機序を解析した。第一に、nematode cecropinP4の酸性前駆領域と成熟ペプチドを共存条件下、酸性前駆領域のN末端にある3残基（HRR）の配列が存在するときのみ成熟ペプチドの抗微生物活性を抑制できた。生体内において酸性前駆領域はプロセシングによる成熟ペプチドの抗微生物活性の制御に寄与することが明らかになった。第二に、抗微生物性の配列の酸性アミノ酸残基をアミドと置換（Glu → Gln および Asp → Asn）したら、固有の高次構造へ影響が少ないが、正電荷を増加させ抗微生物活性が付与された。特にNP1P-NP3Pは強い抗微生物活性を獲得し、NP2PおよびNP3Pは酸性リン脂質膜に対し障害性を示した。対照的に、P1P-P4Pは抗微生物活性を示さなかったし、NP1Pでは膜破壊活性を示さなかったことから、多様な殺菌機構が示唆された。

同様に前駆領域の酸アミド置換によって得たNP4Pは、単独では抗微生物活性を示さないが、膜障害性AMPと共存させるとその抗微生物活性を増強させる前例のない薬理作用を実証した。生体内において酸性前駆領域はプロセシングによる成熟ペプチドの抗微生物活性の制御に寄与していることが示唆された。これらの知見は、新規抗菌剤の開発に向けて大きく貢献するものであり、その成果の医薬的応用が期待できる。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。