

氏 名 (国 籍)	ちょう 張	こう 紅 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)	
学 位 記 番 号	博 甲 第 2938 号	
学位授与年月日	平成 14 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	医学研究科	
学 位 論 文 題 目	Isolation and Charaterization of ASABF-type Antimicrobial Peptides in the <i>Nematode Ascaris suum</i> : Toward medical application (蠕虫 <i>Ascaris suum</i> に由来する抗菌ペプチド ASABF の分離と特性の解析 : 臨床応用の可能性の検討)	
主 査	筑波大学教授	医学博士 林 英 生
副 査	筑波大学教授	医学博士 中 内 啓 光
副 査	筑波大学教授	薬学博士 永 田 恭 介
副 査	筑波大学助教授	医学博士 清 水 徹

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

下等動物が産生する抗菌ペプチドはこの10年間で急速に研究が進展しその物性と作用機序が解明されつつある新しい抗菌物質である。これまで、抗菌ペプチドは、主に脊椎動物、および昆虫を中心とした節足動物などから分離され研究されてきた。しかし、進化的に下等な動物種での探索は、新規な特性を持つペプチドの発見が期待されるにも関わらず、ほとんど行われていなかった。1996年に線虫の一種である、豚回虫 (*Ascaris suum*) の体液中から新しい抗菌ペプチドが分離され、ASABF (*Ascaris suum* antibacterial factor) と命名された。本研究ではASABFの抗菌活性の特性を解析し、臨床への応用の可能性を検討するとともに、新たなASABF型抗菌ペプチドのメンバーを豚回虫より分離することを試みた。

(対象と方法)

ASABFの抗菌活性は、主として黄色ブドウ球菌 (ATCC6538P) を対象に行った。抗菌スペクトルは、ヒト病原菌を含む、12種のグラム陽性細菌、18種のグラム陰性細菌、および9種の酵母に対して検定した。抗菌活性は、予備的には平板培地上での阻止円法、定量的には液体培養の希釈法により測定した。新しいASABF型抗菌ペプチドの探索は、回虫 cDNA ライブラリーから degenerate primer を用いた RT-PCR によって試みた。

(結果)

(1) ASABFは一定の条件下で、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌にまでおよぶ広い抗菌スペクトルを発揮した。一方、培養細胞や赤血球に対する溶血清や細胞毒性はほとんど見られず、真性細菌に対して選択的な毒性を示している。黄色ブドウ球菌に対しては1分間以内の接触で殺菌的に作用した。その殺菌効果は低イオン強度下では有効であったが、NaCl 80mMやCaCl₂ 20mM以上での塩濃度では無効であった。この抑制効果は、蔗糖では330mMでも有効であったことから、おそらく溶液のイオン強度による影響であろうと推察された。黄色ブドウ球菌に対してはピコ・モル濃度 (10⁻⁹ M) オーダーで殺菌活性を示した。この活性を臨床分離株で

検定したところ、分離株により、 10^{-9} から 10^{-6} M濃度のオーダーで可成り異なる感受性を示した。特に、全てのMRSAがMSSAより抵抗性が高かったことは、注目される。

(2) 線虫類から新しいASABF型抗菌ペプチドを探索した。その結果、ASABF型抗菌ペプチドの新しいメンバーを豚回虫から3種類(ASABF- β , γ , および δ)、また*C. elegans*から2種類(abr-1およびabr-2)を同定した。これらの新しい抗菌ペプチドを含めたASABF型抗菌ペプチドのアミノ酸配列を比較し、共通構造を調べた。ASABFは1つの α -helixと一対の逆平行 β -Sheetを持つ、CS $\alpha\beta$ (cysteine stabilized alpha-beta structure) 型抗菌ペプチドに分類された。他の生物種から分離された既知の抗菌ペプチドと比較したところ、このファミリー固有の分子内ジスルフィド結合に寄与するシステイン残基を持つこと、分子内ジスルフィド結合を形成するシステイン残基の組み合わせが特有であること、前駆体タンパク質が分泌シグナル-成熟領域-前駆領域という配列を持つことなどから、CS $\alpha\beta$ 型抗菌ペプチドのカテゴリーにおいて、ASABF型抗菌ペプチドは新たなサブグループに分類されるべきことが示唆された。ASABFと同じサブグループに属するものとして、他に軟体動物の富システイン型抗菌ペプチドがあることも見出された。

(考察)

- (1) CS $\alpha\beta$ 型抗菌ペプチドの中でも、グラム陽性菌・陰性菌および真性細菌までおよぶ広い抗菌スペクトルを示すものは、これまでIV型植物デフェンシンおよび*Phormia*由来の昆虫デフェンシンのみが報告されているが、ASABFはこのような例外的な広域抗菌スペクトルを示す線虫由来の新たな例であると考えられる。
- (2) 黄色ブドウ球菌に対してASABFは 10^{-9} Mオーダー有効であった。これは、既知の抗菌ペプチドと比較して、著しく強い活性である。抗黄色ブドウ球菌薬としての有望性を示唆する。
- (3) 1分以内の接触で黄色ブドウ球菌を殺菌したことから、ASABFの作用は殺菌的であることが示唆される。
- (4) 塩による殺菌作用の阻害は、おそらく正に荷電するASABFと負に荷電する細胞膜との静電的相互作用を防げるためと考えられる。
- (5) MRSAがMSSAより高い抵抗性を示したことから、*mecA* カセットにASABF抵抗性遺伝子が連関していると推測される。
- (6) 多くの生物種から分離されているCS $\alpha\beta$ 型抗菌ペプチドのうち、ASABFは構造上、特異なサブグループを形成していた。唯一、軟体動物由来の抗菌ペプチドが共通する構造を有していたが、適応集中か、進化的保存によるものか、現状では不明である。

(結論)

ASABFは、新規の構造上の特徴をもつCS $\alpha\beta$ 型抗菌ペプチドである。真性細菌、真菌におよぶ広い抗菌スペクトルを示すこと、 10^{-6} Mオーダー以下の濃度で有効な殺菌活性を示すこと、特に、MRSAやVRSAなどの薬剤耐性が深刻な問題となっている黄色ブドウ球菌に特効があることから、ASABFは新しい抗菌剤として有望であると考えられる。塩の存在によって殺菌作用が阻害されることは、応用上、考慮すべき問題点であろう。黄色ブドウ球菌の株間に認められたASABFに対する感受性の大きな多様性は、将来、菌株の遺伝学的差異から黄色ブドウ球菌のASABFに対する感受性因子および抵抗性因子を同定することに利用できると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

(批評)

ブタ線虫から分離精製した抗菌ペプチドASABF (*Ascaris suum* Anti-Bacterial Factor) の抗菌活性をしらべ、さらに豚回虫から新たに3種(ASABF- β , γ , および δ)の類似物質と、*C. elegans*から2種(abr-1およびabr-

2) の抗菌ペプチドを同定している。

抗菌活性に関する解析・検討はまだ不十分であり，臨床応用への基礎データも不十分であるが，線虫・回虫から天然に産生される抗菌物質を同定したことは価値ある研究である。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。