

学 位 論 文 題 名

Structural Analyses of the Antimicrobial Peptides
Derived from Horseshoe Crab by NMR spectroscopy.

(核磁気共鳴法を用いたカブトガニ由来の
抗菌タンパク質の構造に関する研究)

学位論文内容の要旨

ヒトを始めとする高等動物は、未知のウィルスにも対応することができるといわれる記憶免疫システムを有しているが、無脊椎動物にはその記憶免疫システムが存在せず、その生体防御反応は一般に体液に含まれる抗菌物質群が司っている。記憶免疫システムは後天性免疫であるのに対し、抗菌物質による異物への直接的な攻撃は先天性免疫(自然免疫)と呼ばれ、この先天性免疫は全ての種の生物に見られる基本的な自己防御機構の1つである。記憶免疫システムを有する高等動物にも抗菌物質群が存在し、それらは後天性免疫が機能を発揮する前段階に先天性免疫による攻撃反応を行うことで免疫反応を助ける補助的な役割を担うと考えられている。現在まで、先天性免疫反応を担う抗菌物質群の多くは節足動物に多く発見されており、中でもその半数以上は昆虫由来のものである。昆虫は地球上の動物の約80%を占めるほどに最も繁栄している動物であり、このことから先天性免疫による直接的な生体防御機構の効果は優れたものと推察できる。

本研究では抗菌メカニズムを探るために抗菌ペプチドの立体構造解析を行ったが、その際、生物種にカブトガニ(*Tachypleus tridentatus*)を選択した。カブトガニは「生きた化石」と呼ばれるように、その形体を約2億年もの間変えていないと考えられており、その強固な骨格構造も然ることながら、そこに含まれる抗菌物質群の有能さが伺える。また、カブトガニの体液は生体防御反応の1つとして細菌の細胞壁構成成分である lipopolysaccharides (LPS) 及び β -(1,3)-D-glucans に鋭敏に反応して凝固することから、これらの物質を生体内で検出するためのリムルステストに利用されており、生理学的、薬理学的に非常に有用な生体物質として知られている。現在までに47種類の生体防御にかかわるペプチド、タンパク質がカブトガニ体液中から発見されているが、このうち2つの抗菌ペプチド tachystatin A 及び big defensin について解析を行った。

【1】 抗菌ペプチド tachystatin A の立体構造解析

tachystatin A は3組のジスルフィド結合が存在する44アミノ酸残基からなる抗菌ペプチドであり、グラム陰性菌、グラム陽性菌、及び真菌に対し抗菌活性を示す。このように広い抗菌スペクトルを示すことから、生体防御反応において非常に重要な役割を担っていると考えられる。また、tachystatin A は1次構造において、サソリの毒液中から単離されたカルシウムイオンチャンネルの阻害剤である ω -agatoxin IVA (ω -aga IVA) と約20%ながら相同性があることが明らかになっている。カブトガニは進化上ク

モヤサソリと近縁の動物であることが知られていることから、両者は共通の祖先を持つ可能性があることが示唆される。本研究では tachystatin A の抗菌メカニズムを探るため、核磁気共鳴法(NMR 法)によって立体構造解析を行った。

全ての NMR シグナルを帰属することに成功し、NOE ピークの強度から核間距離を見積もり、プログラム X-PLOR を用いて構造計算を行って立体構造を算出した。得られた tachystatin A の立体構造は逆平行 3 本鎖 β -sheet を有し、また、defensin ペプチドに多く見られる両親媒性の構造を形成していることが明らかになった。このことから defensin 同様に正電荷が集中した面が生体膜と相互作用することで抗菌活性を発揮することが示唆された。さらに tachystatin A の立体構造は ω -aga IVA のそれと非常によく似たものであることが明らかになった。構造活性相関の観点から、本研究において ω -aga IVA の抗菌活性を調べたところ、 ω -aga IVA にもそれが認められた。また、tachystatin A において、 ω -aga IVA のカルシウムチャンネルを阻害する活性部位が欠損していることも明らかになり、tachystatin A はカルシウムチャンネルを阻害活性は有しない結果も得られた。

tachystatin A はまた、真菌の細胞壁構成成分であるキチンと結合することが知られているが、他の糖鎖認識タンパク質との比較の結果、Phe 9 が結合に深く関わる可能性が示唆された。さらに同様の構造を持つ ω -aga IVA にもキチン結合能が認められ、tachystatin A と ω -aga IVA の構造は他のキチン結合タンパク質と相同性が無いことから新たなキチン結合モチーフとして提案された。

【2】 抗菌ペプチド big defensin の立体構造解析

哺乳類および節足動物において発見されている defensin は 29~42 アミノ酸残基から構成されるのに対し、big defensin は 79 残基からなることが「big」の名の由来となっている。big defensin はその N 末端ドメインがグラム陽性菌に対し、C 末端ドメインがグラム陰性菌に対して抗菌活性を示す。ドメイン間で異なる活性を示すことから、big defensin は「天然に存在するキメラタンパク質」とも呼ばれる。N 末端ドメインは他のタンパク質と 1 次構造において相同性が認められないが C 末端ドメインはウシの神経細胞から単離された β -defensin(BNBD-12)と相同性が認められる。

tachystatin A と同様に NMR によって立体構造解析を行った結果、N 末端ドメインは 2 本の α -helix を有し、C 末端ドメインは逆平行 3 本鎖 β -sheet を持つことが明らかになった。両ドメインは Ile 35-Gly 50 の長いループによって連結されており、全体として収束した構造は得られなかった。しかし、トリプシン処理により big defensin を N 及び C 末端ドメインに分断しても両ドメインが単独でその活性を発揮することから、両ドメインは何らかの相互作用によって安定化されて機能を発揮しているとは考えにくく、このことは合理的であると考えられる。N 末端ドメインは非常に疎水性が高く、生体膜を貫通するために好都合であると考えられる。抗菌ペプチドが生体膜と相互作用するモデルが数多く提唱されているが、このうち big defensin の N 末端ドメインはヘリックスの軸が垂直方向に生体膜に刺さりこむタイプに属すると考えられる。C 末端ドメインは tachystatin A の立体構造と非常によく似ている構造を形成しており、 β -sheet のトポロジーも tachystatin A のものと一致する(+2x, -1)。さらに、C 末端ドメインは BNBD-12 をはじめとする哺乳類のクラシカルディフェンシンと立体構造上の相同性が認められた。tachystatin A の構造も含めて、節足動物の抗菌ペプチドの立体構造が哺乳類のそれと相同性が認められたのは、本研究が初めての例である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 助教授 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

Structural Analyses of the Antimicrobial Peptides Derived from Horseshoe Crab by NMR spectroscopy.

(核磁気共鳴法を用いたカブトガニ由来の
抗菌タンパク質の構造に関する研究)

ヒトを始めとする高等動物は、未知のウィルスにも対応することができるといわれる記憶免疫システムを有しているが、無脊椎動物にはその記憶免疫システムが存在せず、その生体防御反応は一般に体液に含まれる抗菌物質群が司っている。高等動物の記憶免疫システムは後天性免疫であるのに対し、抗菌物質による異物への直接的な攻撃は先天性免疫と呼ばれ、この先天性免疫は全ての種の生物に見られる基本的な自己防衛機構の 1 つである。現在まで、先天性免疫反応を担う抗菌物質群の多くは節足動物に多く発見されており、中でもその半数以上は昆虫由来のものである。昆虫は地球上の動物の約 80%を占めるほどに最も繁栄している動物であり、このことから先天性免疫による直接的な生体防御機構の効果は優れたものと推察できる。

以上の様な背景の下、申請者は抗菌メカニズムを探るために抗菌ペプチドの立体構造解析を行ったが、その際、生物種にカブトガニ(*Tachypleus tridentatus*)を選択した。カブトガニは「生きた化石」と呼ばれるように、その形体を約 2 億年もの間変えていないと考えられており、そこに含まれる抗菌物質群の有能さが伺える。また、カブトガニの体液は細菌の細胞壁構成成分に鋭敏に反応して凝固することから、これらの物質を生体内で検出するためのリムルステストに利用されており、生理学的、薬理学的に非常に有用な生体物質として知られている。現在までに 47 種類の生体防御にかかわるペプチド、タンパク質がカブトガニ体液中から発見されているが、申請者はこのうち 2 つの抗菌ペプチド、tachystatin A 及び big defensin について NMR を用いた立体構造解析を行った。

その結果 tachystatin A は逆平行 3 本鎖 β -sheet を有し、また、defensin ペプチドに多く見られる両親媒性の構造を形成していることを明らかにした。このことから defensin 同様に正電荷が集中した面が生体膜と相互作用することで抗菌活性を発揮することを示した。また、tachystatin A はサソリの毒液中から単離されたカルシウムイオンチャンネルの阻害剤である ω -agatoxin IVA (ω -aga IVA)と 1 次構造において相同性があることが過去に明らかになっているが、立体構造においても ω -aga IVA のそれと非常によく似たものであることを明らかにした。構造活性相関の観点から、申請者が ω -aga IVA の抗菌活性を調べたところ、 ω -aga IVA にもそれが認められた。また、tachystatin A において、 ω -aga IVA のカルシウムチャンネルを阻害する活性部位が欠損していることも明らかになり、tachystatin A はカルシウムチャンネルを阻害活性は有しない結果も得た。tachystatin A はまた、真菌の細胞壁構成成分であるキチンと結合することが知られているが、他の糖鎖認識タンパク質との比較の結果、Phe 9 が結合に深く関わることを示唆した。さらに同様の構造を持つ ω -aga IVA にもキチン結合能が認められ、申請者は両者の構造を用いて新たなキチン結合モチーフを提唱した。

同様に big defensin の立体構造解析も行い、N 末端ドメインは 2 本の α -helix を有し、C 末端ドメインは逆平行 3 本鎖 β -sheet を持つことを明らかにした。両ドメインはループ構造によって連結されており、全体として収束した構造は得られなかった。しかし big defensin を N 及び C 末端ドメインに分断しても両ドメインが単独でその活性を維持することから、両ドメインは何らかの相互作用によって安定化されて機能を発揮しているのではなく、各ドメインが単独で機能していると考えられ、このことは合理的であることを示した。抗菌ペプチドが生体膜と相互作用するモデルが数多く提唱されているが、このうち big defensin の N 末端ドメインはヘリックスが疎水性相互作用によって生体膜と相互作用し、C 末端ドメインは他の defensin 同様、両親媒性の構造を形成していることを明らかにした。さらに C 末端ドメインは哺乳類の β -defensin と立体構造上の相同性が認められ、節足動物の抗菌ペプチドの立体構造が哺乳類のそれと相同性が認められたのは、本研究が初めての例である。

学位論文の公開審査における質疑応答では、申請者は自らの経験や参考文献を引用することによって、質問に対して的確に回答した。

以上のように申請者は、2 つの新規の抗菌ペプチドの立体構造を明らかにしたのと同時に、構造生物学的な視点からそれらの活性メカニズムについても重要な知見を示した。さらに新規の糖鎖認識モチーフを提唱し、糖鎖認識研究の新たな方向性を示した。審査員一同はこれらの成果を評価し、申請者が北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認定した。