

*Sarcophaga peregrina* (flesh fly) の抗菌蛋白質  
に関する研究

山田 勝成

学位論文

*Sarcophaga peregrina* (flesh fly) の抗菌蛋白質

に関する研究

山田 勝成

# 目 次

第1章 序 章.....	1
第1節 生体防御機構と抗菌性タンパク質.....	2
第2節 センチニクバエ ( <i>Sarcophaga peregrina</i> ) の抗菌タンパク質.....	5
第3節 本研究の目的.....	8
第2章 バキュロウィルスベクター系を用いた組換え型 sarcotoxin IA の産生.....	9
第1節 序 論.....	10
第2節 組換えウィルスの作成と Bm-N cell における sarcotoxin IA の発現.....	11
第3節 組換え型 sarcotoxin IA の精製.....	16
第4節 組換え型 sarcotoxin IA のカルボキシ末端の構造.....	23
第5節 考 察.....	26
第3章 <i>Sarcophaga</i> 胚細胞培養上清からの sapecin ホモログの精製と性質.....	28
第1節 序 論.....	29
第2節 NIH-Sape-4 の培養上清からの sapecin ホモログの精製.....	30
第3節 ピーク V とピーク VI 蛋白の構造構造解析.....	36
第4節 sapecin ホモログの抗菌活性.....	38
第5節 考 察.....	43
第4章 Sapecin B の抗菌活性コア部分の決定と性質.....	46
第1節 序 論.....	47
第2節 sapecin B からの4つのペプチドフラグメント調製と抗菌活性.....	48
第3節 7R-17K フラグメントとリン脂質の相互作用.....	54
第4節 考 察.....	60
第5章 Sapecin B の活性コア部分のアナログと抗菌活性発現の特徴.....	63
第1節 序 論.....	64
第2節 7R-17K フラグメントのアナログの抗菌活性.....	64
第3節 抗菌活性に対する pH の影響.....	66
第4節 抗菌活性と界面活性能と溶血活性の相関.....	66
第5節 考 察.....	73

第6章 総括及び今後の展望.....	75
第7章 材料と方法.....	82
<参考文献>.....	101
<謝 辞>.....	105

<略号>

APS	ammonium persulfate
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
CL	cardiolipin
CM	carboxymethyl
Da	dalton
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitro benzoate)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
mBBr	4-bromomethyl-3,,-trimethyl-1,5-diazabicyclo[3.3.0]octa- 3,6-diene-2,8-dione
PC	phosphatidylcholine
PCMBS	p-chloromercuribenzenesulfonic acid
PE	phosphatidylethanolamine
PG	phosphatidylglycerol
PI	phosphatidylinositol
PS	phosphatidylserine
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 第1章

## 序 章

## 第1節 生体防御機構と抗菌性タンパク質

生物の基本的な特徴は、「自己の増殖」と「自己の保存」であると言われている。つまり、自己の組織、細胞または生体分子と他者のそれらを区別し、生存し、自己の遺伝情報を子孫に伝えるものであるとすることができる。ここで、生物の生存において、外部からの異物の侵入は、大きな脅威であるといえる。したがって、すべての生物は、侵入した異物だけを自己と区別して排除したり無害化することによって、自らを守るための巧妙な生体防御機構を持っている。

生体防御機構は、記憶と反応特異性に特徴付けられる免疫システムと、異物を区別することなく作用する非特異的防御機構に分けられる。高等脊椎動物では、Tリンパ球、Bリンパ球に担われた高度に発達した免疫システムと、補体などの非特異的な体液性因子や、好中球、マクロファージなど非特異的な細胞性因子が生体防御に関与している。一方、無脊椎動物である昆虫は、脊椎動物において認められるような、特異的防御機構を持たず、非特異的な防御機構によって生体を防御している。昆虫の外界と体内との境界である皮膚、または、消化管における物理化学的なバリアーを通過した外敵は、体液の血球中のプラズマ細胞や顆粒球による食作用、ノジュール形成や包囲作用などの細胞性防御システムによって除去される(1-3)。また、さらに、血漿中の体液性の防御システムである抗菌性や抗ウイルス活性を持つ感染防御因子(4-13)、異物の凝集活性を持つレクチン様凝集因子(14-16)、補体様成分(17-18)などの体液性生体防御システムによって不活性化される。

これら昆虫の生体防御機構のうち、感染防御因子の多くは、Table 1 に示すよ

うに、低分子のタンパク質かあるいはペプチドであり、昆虫の体表の障害や細菌のワクチンやLPSを接種することで、体液中に速やかに、かつ、一過的に誘導される。また、抗菌性を示すタンパク質は、Table 1にあるように昆虫ばかりでなく高等脊椎動物にも認められており、広く生物一般において感染の初期防御機構として重要な位置を占めていると考えられている。

特に、免疫システムを発達させていない昆虫の生体防御機構の研究は、非特異的な生体防御機構の原点を探る上でも重要であり、また、昆虫には、高等脊椎動物には存在しないような多彩な抗菌性タンパク質が存在する可能性が考えられる。こういった点で、当研究室で行われているセンチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) の抗菌性タンパク質に関する研究は意義深いものと考えられる。



Table 1 Antimicrobial proteins previously reported.

Names	M.W.	Origins	References
Cecropins	4,000	Hyalophora hemolymph	5
Attacins	20,000	Hyalophora hemolymph	7
Sarcotoxin I	4,000	Flesh-fly hemolymph	22
NP-1~NP-5	4,000	Rabbit neutrophils	26,27
PC-III	1,800	Rabbit serum	28
Magainins	2,500	Xenopus skin	29
Cecropin PI	3,300	Pig intestine	30

## 第2節 センチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) の抗菌タンパク質

当研究室でのこれまでの研究で明らかにされているセンチニクバエの抗菌タンパク質を Table 2 に示した。センチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) の幼虫の体表障害時に、sarcotoxin I, II, III(8-10)と名付けられた抗菌性タンパク質が誘導されてくることが明らかにされている。さらに、センチニクバエの胚由来の培養細胞の培養上清から sapecin と sarcotoxin I と類似した抗菌性タンパク質が見いだされている(11)。

これら抗菌性タンパク質は、体表の障害後1~2日をピークとして速やかに誘導されることから、センチニクバエの初期の生体防御因子として好適な性質を持っていると考えられる。また、この抗菌性タンパク質の誘導は、cDNAを用いた northern blot hybridization 解析により転写レベルでコントロールされていることが明らかにされている(19-20)。

また sarcotoxin I は、主にグラム陰性細菌に対して強い抗菌作用を持ち、分子量約3,500のカルボキシル末端がアミド化された塩基性タンパク質である。Sarcotoxin II は分子量約24,000のタンパク質で、やはり、グラム陰性菌に抗菌活性を有している。Sapecin は、主にグラム陽性細菌に対して幅広く殺菌作用を示し、分子内に3ヶのジスルフィド結合を持つ分子量約4,000のタンパク質である。さらに、sarcotoxin I は、それぞれ若干のアミノ酸配列だけが異なる4種のサブタイプ、すなわち、sarcotoxin IA, IB, IC, ID (8,11)からなり、sarcotoxin II は、IIA, IIB, IIC の3種類のサブタイプからなっていることが分かっている(9)。また、これらサブタイプで

抗菌スペクトルが少し異なることも示唆されている。

Sarcotoxin I(22,23), sapecin(21)がバクテリアの細胞膜に対する障害性によって殺菌作用を示すのに対して、sarcotoxin IIは増殖中の大腸菌のスフェロプラスト化を引き起こすことから、その作用点は細胞壁であると考えられている(9)。

以上の様に、センチニクバエでは、それぞれ、バクテリアに対する抗菌スペクトルが異なった抗菌タンパク質が存在しており、しかも、それぞれに数種のサブタイプがある。また、バクテリアの細胞膜に作用する抗菌性タンパク質と、細胞壁に作用する抗菌性タンパク質があり、さらに、直接的な殺菌作用は持たないが大腸菌の凝集作用を持つ糖タンパク質 sarcophaga レクチン(24)など、それぞれ作用機構が異なった生体防御タンパク質が存在している。したがって、これら一連の物質は、この昆虫の体表障害時に一斉に発現し、種々多様な感染因子(病原微生物)に対応すべく、互いに強力な生体防御ネットワークを形成しているものと考えられる。

また、リボソームを用いたモデル実験から、sarcotoxin IA が動物細胞には障害性が低く細菌に特異的に障害性を発揮することが強く示唆されており(25)、抗菌物質としての側面から見た場合、毒性が低く、かつ、有効な抗菌剤としての特性を有することが予想される。

Table 2 Antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*.

Names	M.W.	Specificities	Targets
Sarcotoxin IA,IB,IC,ID	3,500	Gram (-)	Cell membrane
Sarcotoxin IIA,IIB,IIC	24,000	Gram (-)	Cell wall
Sarcotoxin III	7,000	?	?
sapecin	4,000	Gram (+)	Cell membrane

### 第3節 本研究の目的

以上述べてきたように、センチニクバエの抗菌タンパク質は、生体の非特異的な生体防御機構を担う重要な蛋白性因子であると考えられる。これら抗菌性タンパク質は、異物の個々の認識能には劣るとは言え、生体防御物質である限り基本的に自己と浸入した異物を認識する能力と異物を障害する能力を有しているはずである。そして、その異物の認識能と障害性を両立させる秘密は、その分子構造、すなわち、そのアミノ酸配列に存在すると言うことができる。この「異物だけを選択的に障害する性質」は、見方を変えれば感染症の治療剤に望まれる性質でもある。

したがって、これら抗菌性タンパク質の構造、作用性の違い、作用機構などを研究することは、生物における非特異的な生体防御機構を解明するためだけでなく、新しい抗菌剤をデザインしていくためにも価値あることと考えられる。タンパク質の活性発現の考察にはその立体構造を知ることが重要であるが、蛋白質の立体構造の解析はその分子量が大きくなるにしたがって困難となる。この点から、センチニクバエの抗菌タンパク質の中で sarcotoxin I および sapecin は比較的分子量が小さいため、その構造と活性の相関を考察することがより容易であると予想される。

そこで、本研究では、sarcotoxin I, sapecin の抗菌活性、特にその構造的な特徴と活性発現の相関に焦点を置くことで、最終的に新規な抗菌剤のデザインにおいて、有用な情報やリード化合物を得ることを目的とした。

## 第2章

### バキュロウイルスベクター系を用いた 組換え型 sarcotoxin IA の産生

## 第1節 序 論

Sarcotoxin IA は、センチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) の体表障害時に、その体液中に誘導される抗菌ペプチドのひとつである(8, 22)。 Sarcotoxin IA は、グラム陰性細菌に対して特に強い抗菌スペクトルを持つ抗菌タンパク質であるが分子量が小さく(約 3,500 Da)、その構造と抗菌活性の相関を研究する上で有用な物質である。 これまで、sarcotoxin IA は、センチニクバエの3齢幼虫の体液から精製されているが、その含量は低く通常約 70  $\mu$ g の混合物 (sarcotoxin IA, IB, IC) が 150ml の体液から精製されるにすぎない。この体液を集めるには多くの時間と複雑な作業が必要である。 したがって、この蛋白の機能を詳細に検討するためには、この蛋白を大量にかつ簡便に調節する方法を確立することが重要である。 そこで、sarcotoxin I 群のうち、最もメジャーな蛋白のひとつである sarcotoxin IA の cDNA がクローニングされていることから(19)、この cDNA を用いた sarcotoxin IA の遺伝子組換え法による発現について検討することにした。

この蛋白は、大腸菌に対して強い抗菌活性を持っているため、大腸菌を宿主として sarcotoxin IA の組換え体を生産することは困難であると考えられた。 また、体液から得られる sarcotoxin IA のカルボキシル末端 (C末端) は、アルギニン残基がアミド化された構造 (-Arg-NH<sub>2</sub>) であるが、cDNA から翻訳される C末端はグリシン (-Arg-Gly) であることから(19)、sarcotoxin IA は、一度 C末端がグリシンの形で発現した後、生体内で C末端グリシンのアミド化酵素によって修飾を受けるものと考えられる。 そこで、sarcotoxin IA に対する抵抗性と C末端グリシンのアミド

化を期待して、バキュロウイルス発現系を用いたカイコ卵巣由来培養細胞 *Bombyx mori* における sarcotoxin IA の生産を検討することにした。

## 第2節 組換えウイルスの作成と Bm-N cell における sarcotoxin IA の発現

Sarcotoxin IA を Bm-N cell で発現させるために、sarcotoxin IA の cDNA を組み込んだ組換え型バキュロウイルスを作成した。この作成方法を Fig.1 に示した。Sarcotoxin IA の cDNA をバキュロウイルスベクター pBM0507(36) に挿入するためには、pTO19 上の sarcotoxin IA の開始コドンの上流に新しく *Bgl*II サイトを作る必要があった。そこで、*Bgl*II サイトと *Xmn*I サイトを含む 26mer 合成リンカーを、pTO19 上の sarcotoxin IA の開始コドン付近に挿入しフレームを合わせた。このプラスミドから完全な sarcotoxin IA 配列を含んだ *Bgl*II-*Eco*R I fragment を分離し、pBM0507 のクローニングサイトへ挿入した。得られたサブクローン (pBMSIA) と核多角体ウイルス (strain T3) の DNA を、リン酸カルシウム共沈法で Bm-N cell へ co-transfection した。そして、核多核体の生成が無いことを指標として sarcotoxin IA cDNA が導入された組換え型ウイルスを選択し、BMSIA1 と BMSIA2 の2つのウイルス株を作成した。

この BMSIA1 又は BMSI2 によって感染した細胞が sarcotoxin IA を生産するかどうかの検定は、ラジオイムノアッセイを用いて行った。



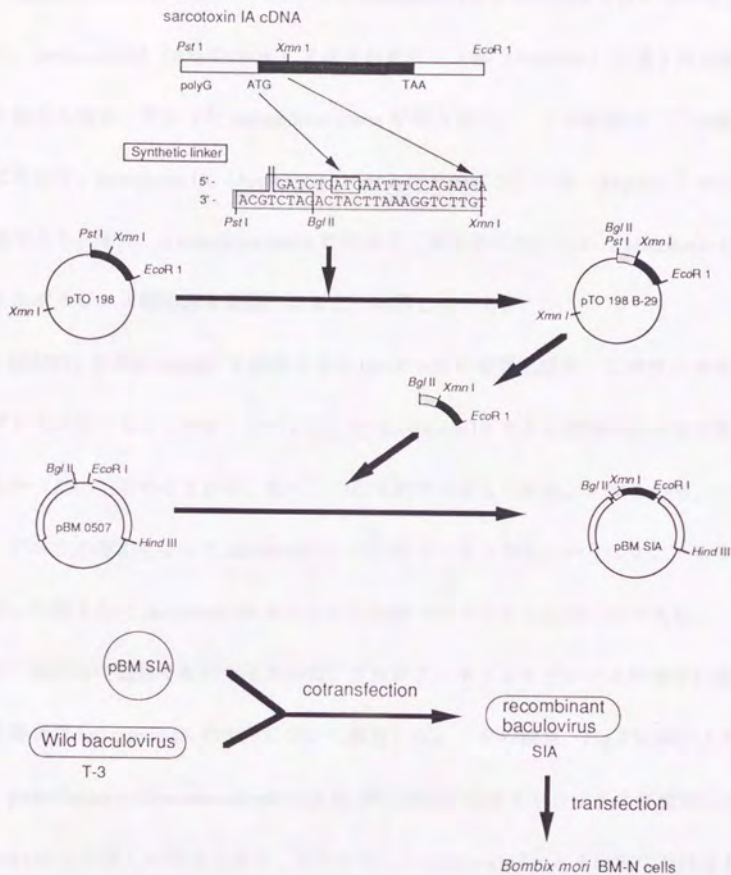


Fig. 1 Plasmid construction for expression of sarcotoxin IA.

The cDNA clone of sarcotoxin IA (pTO19) was modified with the synthetic 26-mer linker to create a *Bgl* II site in the upstream region of the initiation codon. Then the *Bgl* II-*EcoR*I fragment from resulting plasmid (pTO198 B-29) was inserted between the *Bgl*II and *EcoR*I sites of the baculovirus cloning vector pBM050 to obtain pBMSIA.

Fig.2 に示したように、ラベル化した sarcotoxin IA とその抗体を含んでいる反応液に、sarcotoxin IA (Arg-CONH<sub>2</sub>) 又はそのグリシン体 (Arg-Gly) の量を順次増やして加えた場合、異なった competition curve が得られた。この結果は、この測定系において、sarcotoxin IA (Arg-CONH<sub>2</sub>) およびそのグリシン体 (Arg-Gly) が定量可能であり、また、competition curve の形から、反応系に加えられた sarcotoxin IA のカルボキシル末端の形を判別できることを示している。

BMSIS1 または BMSI2 を感染させた Bm-N cell の培養上清を、このラジオイムノアッセイでテストしたが、ラベル化した sarcotoxin IA とその抗体の結合は阻害されなかった。このことから、次の二つの可能性が考えられた。すなわち、一つは、何らかの理由によって sarcotoxin IA が生産されなかったということ。もう一つは、生産された sarcotoxin IA がすばやく分解されていることの二つである。そこで、後者の可能性を検討するために、プロテアーゼインヒビターを培地中に添加した場合の sarcotoxin IA の生産について検討した。その結果、Fig.3 に示すように、p-chloromercuribenzenesulfonic acid-Na(PCMBs)の存在下でウイルスに感染した Bm-N cell を培養した培養上清が、ラベル化した sarcotoxin IA とその抗体の結合を強く阻害した。つまり、PCMBsを添加した場合にだけ、sarcotoxin IA が検出された。他の二つのプロテアーゼインヒビター phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) と pepstaain は、sarcotoxin IA の産生には効果がなかった。PCMBs はシステインプロテアーゼインヒビターであるから、ある種のシステインプロテアーゼが sarcotoxin IA の分解に関係しているものと考えられる。

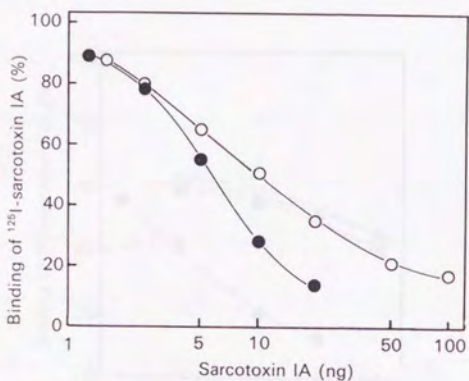


Fig.2 Competition curve for radioimmunoassay.

Fixed amounts of radioiodinated sarcotoxin IA ( $^{125}\text{I}$  was incorporated into histidine) were incubated with increasing amounts of synthetic sarcotoxin IA or its derivative and diluted antiserum against sarcotoxin IA at  $4^\circ\text{C}$  for 12h. Then a suspension of *Staphylococcus aureus* Cowan I strain was added and the mixture was centrifuged to precipitate the antigen-antibody complex. the radioactivity of the precipitate was counted. ●, Sarcotoxin IA with -Arg-NH<sub>2</sub> C-terminus; ○, derivative of sarcotoxin IA with -Arg-Gly C-terminus.

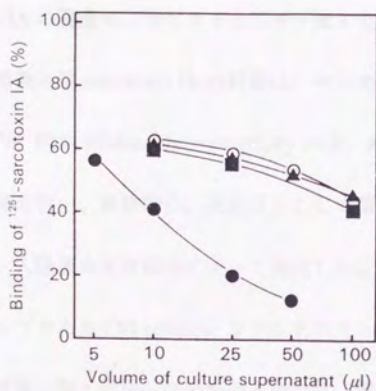


Fig.3 Effects of various proteinase inhibitors on the concentration of sarcotoxin IA in the culture medium of virus-infected Bm-N cells.

Increasing amounts of culture medium prepared in the absence of proteinase inhibitor (O) or in the presence of 0.25mM-phenylmethanesulfonyl fluoride (▲), 1  $\mu$ g of pepstatin/ml (■) or 0.5mM-PCMBs (●) were added to the radioimmunoassay system, and the percentage radioactivity of the antigen-antibody complex formed was determined.

### 第3節 組換え型 sarcotoxin IA の精製

PCMBs の存在下で培養した組換え型ウイルスを感染させた Bm-N cell の培養上清には、sarcotoxin IA が含まれていたため、この培養上清から sarcotoxin IA の精製を検討することにした。ウイルス感染 Bm-N cell を3日間培養した後、終濃度で5mM の PCMBs を添加し、さらに1日培養した後に培地を集めた。その培地中の sarcotoxin IA の濃度を、ラジオイムノアッセイで測定した結果、約1mg/l であった。この組換え型 sarcotoxin IA の精製は、センチニクバエ幼虫体液からの精製方法、すなわち、CM-cellulose chromatography の後、熱処理を行い、Sephadex G-50 によるゲルろ過を行い、最終的に、逆相 HPLC で精製する方法に従って行った。抗菌活性は、大腸菌の生育阻害によって測定した。この精製の検討中に、精製の最初のステップである CM-cellulose カラムクロマトグラフィーにおいて、PCMBs を添加した培養上清と添加しない培養上清では、明らかに活性の溶出パターンが異なることに気付いた。つまり、Fig.4 に示すように、PCMBs を添加した培地を用いた場合には、抗菌活性はすどいピークとして回収された。しかしながら、Fig.5 に示したように、PCMBs を添加しない培地を用いた場合には、抗菌活性はテーリングした形で溶出された。これは、PCMBs を添加しない場合には、一度産生された sarcotoxin IA が分解を受けたためと考えられ、この現象は、sarcotoxin IA の分解物が抗菌活性を有する可能性を指摘するものと考えられた。

実際の精製は、PCMBs を添加した培養上清 450ml を出発材料として行った。

Fig.4 に示した CM-cellulose カラムクロマトグラフィーで抗菌活性を有するフラク

ションを回収し、Sephadex G-50 column 分画を行ったところ、Fig.6 に示したように、抗菌活性は、ラジオイムノアッセイによる sarcotoxin IA のピークと一致した単一のピークとして溶出された。このピークフラクションを逆相HPLCにより精製することで、Fig.7 に示したように、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上で単一のバンドを与える sarcotoxin IA が得られた。なお、典型的な精製の概要を Table 3 に示した。以上の操作によって、約  $20\mu\text{g}$  のほぼ純粋な sarcotoxin IA が 450ml の培養上清から得ることができた。



Figure 6. Chromatogram showing the elution profile of sarcotoxin IA. The x-axis is labeled 'Retention Time' and the y-axis is labeled 'Radioactivity'. A single, sharp peak is visible, indicating the presence of sarcotoxin IA. The peak is centered around a retention time of approximately 25 minutes.

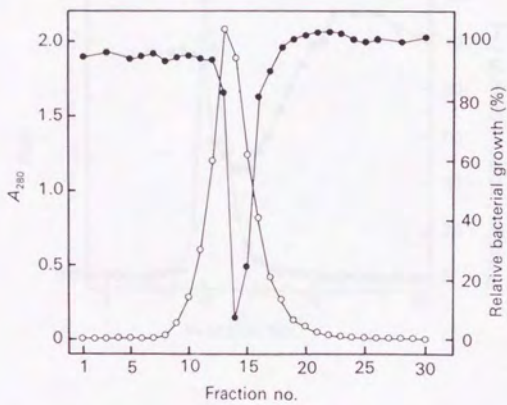


Fig. 4 Chromatogram of antibacterial activity on a column of CM-cellulose.

Tenfold-diluted culture medium prepared the presence of 0.5mM-PCMBs was applied to a column (4.5 cm x 6 cm) of CM-cellulose, and adsorbed material was eluted with 10 mM-sodium phosphate buffer, PH6.0, containing 520mM-NaCl. The antibacterial activity of each fraction was measured. ○, A<sub>280</sub>; ●, relative bacterial growth.

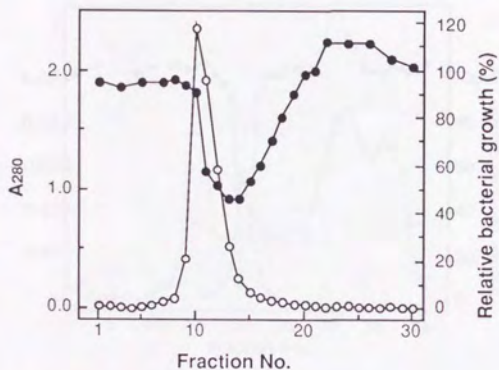


Fig. 5 Chromatogram of antibacterial activity on a column of CM-cellulose.

Tenfold-diluted culture medium prepared in the absence of 0.5 mM PCMBS was applied to a column (4.5cm x 6 cm) of CM-cellulose, and adsorbed material was eluted with 10 mM-sodium phosphate buffer, pH 6.0, containing 520 mM-NaCl. The antibacterial activity of each fraction was measured.

○ , A<sub>280</sub>; ● , relative bacterial growth.



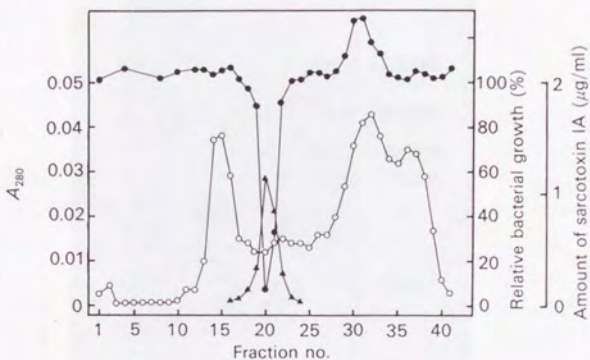
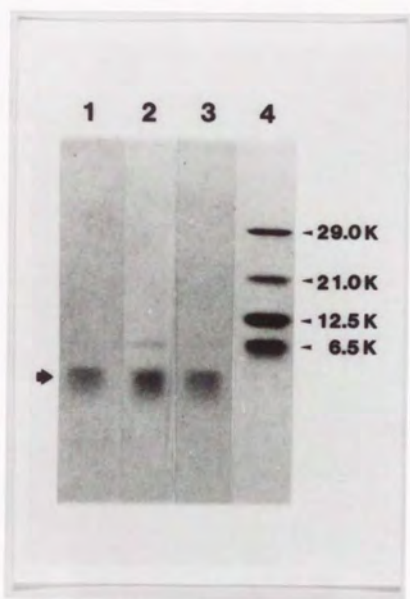


Fig. 6 Chromatogram of sarcotoxin IA on a column of Sephadex G-50.

The active fraction from CM-cellulose was heated at 100 °C for 10 min, and the resulting supernatant was concentrated and applied to a column (1.2 x 120 cm) of Sephadex G-50. The column was washed with 10 mM-sodium phosphate buffer, pH 6.0, containing 130 mM-NaCl. Antibacterial activity and the amount of sarcotoxin IA in each fraction were determined. ○,  $A_{280}$ ; ●, relative bacterial growth; ▲, amount of sarcotoxin IA.



**Fig. 7 PAGE of purified recombinant sarcotoxin IA.**

Recombinant sarcotoxin IA purified by reverse-phase HPLC was subjected to electrophoresis under denaturing conditions, and stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, recombinant sarcotoxin IA; lane 2, authentic sarcotoxin IA; lane 3, the derivative of sarcotoxin IA; lane 4, a mixture of molecular-mass markers. An arrow indicates the position of authentic sarcotoxin IA.

Table 3 Summary of purification of sarcotoxin IA from 450ml of the culture medium of virus-infected Bm-N cells.

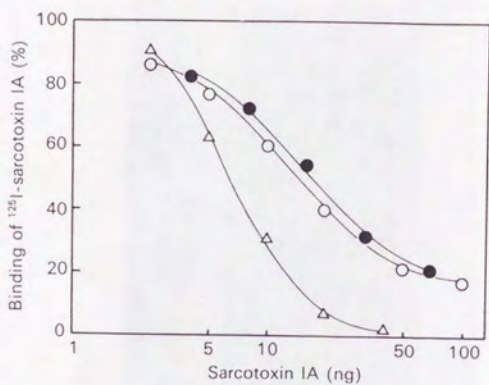
Purification step	Total sarcotoxin IA ( $\mu$ g)	Total protein (mg)	Specific content (mg/mg)	Yield (%)
Culture medium	511	2321	$2.2 \times 10^{-4}$	100
CM-cellulose	210	22	$9.5 \times 10^{-3}$	41.1
Heat treatment	189	9.5	$2.0 \times 10^{-2}$	37.0
Sephadex G-50	169	7.7	$2.2 \times 10^{-2}$	33.1
1st HPLC	24	0.035	$6.9 \times 10^{-1}$	4.5
2nd HPLC	19	0.021	$9.0 \times 10^{-1}$	3.7

\*The amount of sarcotoxin IA was determined by radioimmunoassay.

#### 第4節 組換え型 sarcotoxin IA のカルボキシ末端の構造

すでに述べたように、ラジオイムノアッセイにおける competition curveの形から、sarcotoxin IA のカルボキシル末端の構造を推定することが可能である。そこで、上記の精製した組換え型 sarcotoxin IA について、ラジオイムノアッセイを行ったところ、Fig.8 に示したように、組換え型 sarcotoxin IA の competition curve は sarcotoxin IA 誘導体 (Arg-Gly) のカーブと一致し、authentic sarcotoxin IA (Arg-NH<sub>2</sub>) のカーブとは一致しなかった。

また、未変成条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動では、authentic sarcotoxin IA とその誘導体の移動度は異なっていることがわかっている。そこで、組換え型 sarcotoxin IA を未変成条件下で電気泳動し、その泳動位置を Haltmerkら (37)の方法によって検定した。Fig.9 に示したように、組換え型 sarcotoxin IA の移動度は、その誘導体 sarcotoxin IA の移動度と一致した。すなわち、この方法によっても組換え sarcotoxin IA のカルボキシル末端は、グリシンであることが示されたと考えられる。



**Fig. 8** Competition curve of recombinant sarcotoxin IA in radioimmunoassay.

Purified recombinant sarcotoxin IA was used as a competition for radioimmunoassay. The competition curve (●) was compared with those of authentic sarcotoxin IA (Δ) and its derivative (○).



**Fig. 9** PAGE of recombinant sarcotoxin IA under non-denaturing conditions.

PAGE was performed under non-denaturing conditions. Then soft agar containing *E. coli* was layered on top and the gel was incubated for 18 h at 37 °C to locate spots of antibacterial materials according to the method of Hultmark *et al.* (1980). Lane 1, authentic sarcotoxin IA; lane 2, recombinant sarcotoxin IA; lane 3, the derivative of sarcotoxin IA.

## 第5節 考察

この章では、*Bombyx mori* のバキュロウイルス発現系を用いた sarcotoxin IA の生産について試みた結果について述べた。本発現系を用いることで、種々抗菌タンパク質の中で、初めて、遺伝子工学的手法によって sarcotoxin IA が生産可能であることを示した。そして、この手法で、450ml の培養上清から、約20 $\mu$ g の抗菌活性を持つ組換え型 sarcotoxin IA を得ることができた。従来の sarcotoxin IA の単離が、体表を障害したセンチクバエの幼虫から体液を集めるのに、大変な時間と労力が必要であったことを考えると、この生産システムは、より効率的なものと考えられることができる。

しかしながら、組換え型 sarcotoxin IA のカルボキシル末端は、authentic sarcotoxin IA のカルボキシル末端とは異なっており、この発現系を用いた場合には、sarcotoxin IA は、そのカルボキシル末端にグリシンをもった前駆体ペプチドとして発現されることが分かった。おそらく、Bm-N cell はカルボキシル末端のグリシンを開裂し、その隣接のアミノ酸残基をアミド化する酵素、つまり、アルファアミド化酵素を欠損しているものと考えられる。したがって、カルボキシル末端がアミド化されている authentic sarcotoxin IA を得るためには、この sarcotoxin IA のカルボキシル末端におけるグリシンのアルファアミダーション反応がさらに必要と思われる。

また、この発現系では、PCMBS を培地に加えた場合には、sarcotoxin IA が培地上清から回収されが、PCMBS を添加しない場合には、sarcotoxin IA は検出されな

かった。この結果は、sarcotoxin IA が Bm-N cell のシステインプロテアーゼによって分解されるを示していると考えられ、PCMBS は、このシステインプロテアーゼの活性を阻害するのに有効な薬剤であると考えられる。全く同じバキュロウィルスシステムを用いた場合に、PCMBS が存在しない場合でも、真核細胞の転写促進因子 SII(38)、 $\alpha$ -interferon(39)が、安定に生産可能であることが示されている。このことから、おそらく、sarcotoxin IA は、少なくともこの発現系において、非常に分解を受け易いものと考えられる。

また、転写因子 SII の産生では、組換え型 SII は、細胞中に存在していたが、本 sarcotoxin IA の場合は、培養上清に分泌された。これは、用いた cDNA のシグナル配列(19)が、Bm-N cell 中で機能したためと考えられる。



### 第3章

## *Sarcophaga* 胚細胞培養上清からの sapecin ホモログの精製と性質

## 第1節 序論

*Sarcophaga peregrina* の胚由来細胞である NIH-Sape-4 の培養上清からは、すでに、sarcotoxin I のファミリーに属する数種類の抗菌タンパク質と、これらとは構造が大きく異なる抗菌タンパク質である sapecin が精製されている(11)。

sapecin は、主としてグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を持っており、分子内に3ヶのジスルフィド結合を持つ特徴的な構造をした40個のアミノ酸から成るタンパク質である。また、sapecin の作用点は細菌の細胞膜であり、細菌細胞膜のリン脂質の中でカルジオリピンだけに特異的に結合することが明らかとなっている(21)。同じ抗菌タンパク質である sarcotoxin IAは、酸性リン脂質すべてに結合することから考えて(25)、sapecin のカルジオリピンに対する特異的な結合能力は、sapecin の特徴的な立体構造に由来するものと考えられる。したがって、抗菌タンパク質の構造と細胞膜との相互作用の関係を解明していく上で、sapecin はより優れた材料と言うことができる。この目的のためには、sapecin の立体構造を詳細に解析すると同時に、sapecin と同様な構造を持つタンパク質の活性とその構造を調べ、普遍性が認められるかどうかを知ることが重要である。

sapecin に類似した抗菌蛋白は、他の双翅目昆虫である *Phormia terranova* から phormicin が(40)、また、*Apis mellifera* から royalicin が単離精製されている(41)。

また、sarcotoxin I, II には、サブタイプが存在することから(42,43)、sapecin にも同様なサブタイプが存在する可能性が考えられた。そこで、*Sarcophaga peregrina* の胚由来の培養細胞である NIH-Sape-4 の培養上清について、sapecin ホモログが存在す

るかどうか検討することにした。

## 第2節 NIH-Sape-4 の培養上清からの sapecin ホモログの精製

これまで、NIH-Sape-4 培養上清からの sapecin の精製には、*E. coli* を抗菌活性の指示菌として用いていたが、sapecin はグラム陰性細菌には抗菌活性が低い。

そこで、新しい sapecin 様抗菌蛋白を精製するために、sapecin に感受性の高いグラム陽性細菌である *Staphylococcus aureus* IFO 12732 を指示菌株として用いることにした。精製方法は、既に報告されている方法(20)に従った。すなわち、約 900 ml の培養上清を、CM-cellulose カラムに通液し、吸着した蛋白を 520 mM の食塩を含む 10 mM リン酸バッファー (pH 6.0) を用いて溶出させた。抗菌活性を有するフラクションを集め、100℃ で 10 分間加熱処理した。そして、変性した蛋白を遠心分離により取り除いた。得られた上澄液を、限外濾過膜 (ダイヤロー、UF デスクタイプ A) を用いて約 5 ml まで濃縮した。濃縮液は、さらに Sephadex G-50 を用いたゲル濾過によって精製した。Sephadex G-50 での抗菌活性と蛋白の溶出パターン (280nm) を Fig.10 に示した。単一のピークとして溶出された抗菌活性画分を回収し、逆相 HPLC を用いてさらに精製を行った。Fig.11 に示すように、Sephadex G-50 で回収した活性画分は、I~VI の 6 つのピークに分離した。各ピークを分取し、凍結乾燥した後、各ピークの抗菌活性を検定した。その結果、ピーク IV、V、VI が顕著な抗菌活性を有しており、ピーク I、II、III は、抗菌活性を有していなかった。

この3つの蛋白のうちピーク IV の蛋白は、sapecin と一緒に逆相 H P L C 分析を行ったところ、単一で対照的なピークを示しリテンションタイムは全く同一であった。しかし、ピーク V と VI の逆相 H P L C 分析におけるリテンションタイムは、sapecin と全く異なっていた。従って、ピーク IV は、sapecin であり、ピーク V とピーク VI は、*S. aureus* に対して抗菌活性を持つ新しい抗菌蛋白であると考えた。Fig.12 に示すように、精製されたピーク V、VI は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、sapecin とほぼ同じ分子量の位置に単一バンドを与え、ほぼ均一にまで精製されていた。これら抗菌蛋白の精製過程の一例を Table 4 にまとめた。

約 900 ml の NIH sape-4 の培養上清から、sapecin が約 500  $\mu$ g、ピーク V 蛋白が約 70  $\mu$ g、ピーク VI 蛋白が約 80  $\mu$ g 得られた。ピーク VI 蛋白の比活性は、sapecin とほぼ同等であったが、ピーク V 蛋白の比活性は、sapecin より低かった。

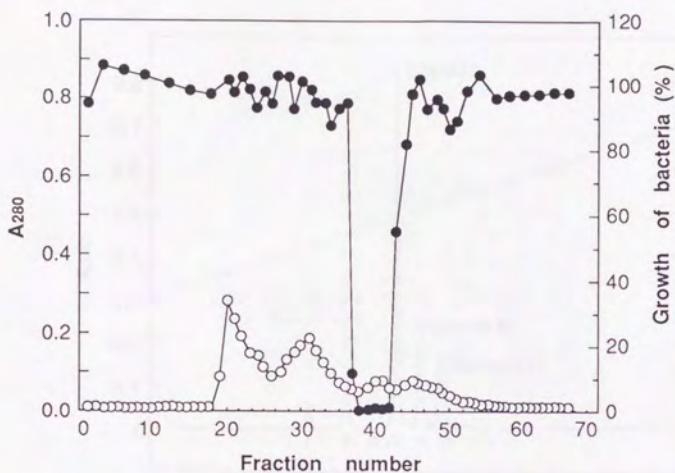


Fig. 10 Chromatography of antibacterial activity on a column of Sephadex G-50.

Concentrated solution (about 5 ml) was fractionated on a column (1.5cm X 120 cm) of Sephadex G-50. Fractions were collected, and the antibacterial activity of 20  $\mu$ l of each fraction was tested using *S. aureus*. Antibacterial activity was measured as inhibition of bacterial growth. ○ , A<sub>280</sub>; ● , Bacterial growth.

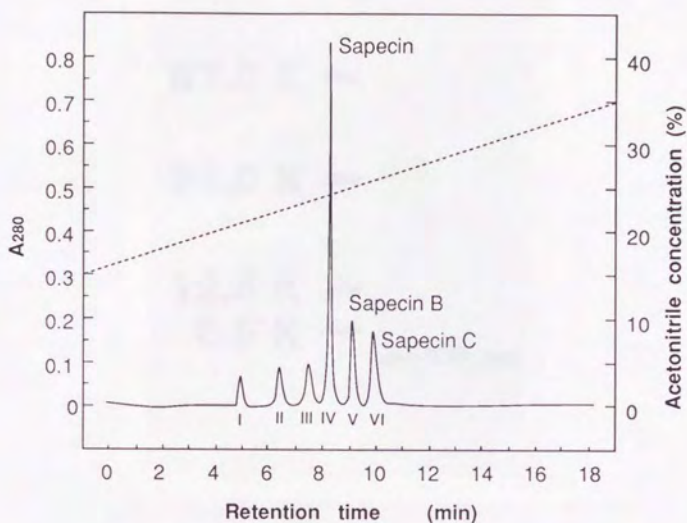


Fig. 11 Reversed-phase HPLC of the Sephadex G-50 fraction.

The active fraction from Sephadex G-50 was fractionated in a HPLC system with a Synchropak RP-R (C18) column. Material was eluted with a linear gradient of 15-35% acetonitrile. —, A280; ----, acetonitrile concentration (%).

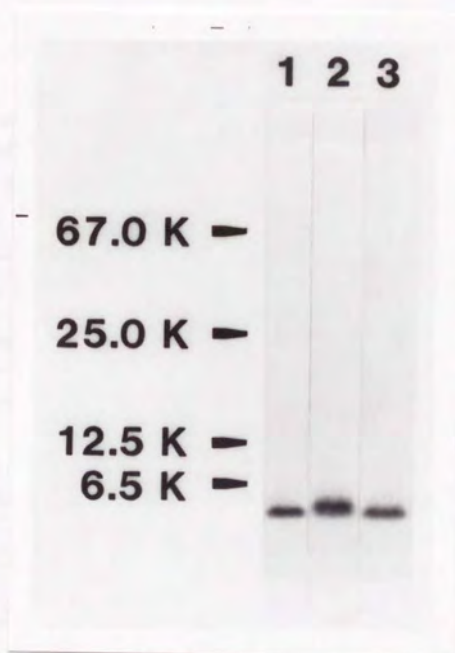


Fig. 12 SDS-PAGE of purified proteins.

Electrophoresis was carried out with  $2 \mu\text{g}$  of purified protein per lane under denaturing conditions. Lane 1, peak IV protein; lane 2, peak V protein; lane 3, peak VI protein. Arrows indicate the positions of the following marker proteins: BSA (67,000),  $\alpha$ -chymotrypsinogen (25,000), cytochrome C (12,500) and aprotinin (6,500).

Table 4 Summary of purification of sapecin-like proteins.

About 900ml of culture medium was used as starting material. protein was determined by the method of Lowry *et al.*

Purification step	Total activity ( $\mu$ g)	Total protein (mg)	Specific activity (mg/mg)	Yield (%)
Culture medium	6675	3258	2	100
CM-cellulose	4247	26.8	159	63.6
Heat treatment	3406	18.3	186	51.0
Sephadex G-50	2912	15.8	184	43.6
HPLC			4.5	
sapecin	1540	0.53	2917	23.1
sapecin B	58.3	0.07	833	0.9
sapecin C	206.6	0.08	2583	3.1



### 第3節 ピーク V とピーク VI 蛋白の構造構造解析

ピーク V とピーク VI 蛋白の一次構造を決定する目的で、精製したピーク V とピーク VI 蛋白を、自動気相式アミノ酸シーケンサーを用いてアミノ酸のシーケンズ分析を行った。ピーク VI 蛋白は、Fig.13 に示したように、sapecin と同様に 40 個のアミノ酸残基から成り、アミノ酸配列は 9 残基が異なるだけであり、相同性は 78% と高いことから sapecin ホモログであることが分かった。一方、ピーク V 蛋白は、34 個のアミノ酸残基から成っており、sapecin とのアミノ酸配列の相同性は、41% にしか過ぎなかった。しかし、分子内に sapecin と同様に 6 個のシステイン残基を持っていることから、この蛋白もまた sapecin ホモログであると結論した。したがって、ピーク V 蛋白を、sapecin B、ピーク VI 蛋白を、sapecin C と命名することにした。

sapecin B と sapecin C は、ともに分子内に 6 個のシステイン残基を持っている。DTNB を用いたフリーのスルフヒドリル基の解析から、両タンパク質のすべてのシステイン残基がジスルフィド結合していることが分かったため、そのジスルフィド結合を決定することにした。sapecin C は、sapecin とアミノ酸配列が非常に似ていることから、sapecin の場合と同様にサーモライシンで分解し(44)、得られたシステインを含む分解フラグメントのアミノ酸配列を分析することによって、ジスルフィド結合の位置を決定した。すなわち、sapecin C のサーモライシン分解フラグメントを全て HPLC で精製した。得られた分解フラグメントを NaBH<sub>4</sub> で還元した後、DTNB によって発色することを指標としてシステインを含むフラグメン

トを選出し、そのアミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーを用いて決定した。しかし、この方法は、sapecin B の場合には適用できなかった。そこで、sapecin B の場合には、Fig.14 に示した手順に従って、ジスルフィド結合の位置を決定した。すなわち、まず、sapecin B を、エンドペプチダーゼ Lys-C とエンドペプチダーゼ Glu-C で分解し、得られた fragment 1 と fragment 2 をさらにペプシンで分解し、逆相 HPLC においてリテンションタイムの遅いメジャーピークを回収し、それぞれ、fragment 3 と fragment 4 を得た。fragment 3 は、そのままアミノ酸シーケンスを行った。fragment 4 は、さらに、トリプシンで分解し、分解フラグメントを逆相 HPLC で回収した後、システインを含む fragment 5, 6 についてアミノ酸の配列を決定した。以上の検討の結果、sapecin B, C のジスルフィド結合の位置は、sapecin のものと全く同じであった。つまり、Fig.13 に示したように、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって 1 から 6 までシステイン残基に番号を付けたとき、システイン残基のペアは、1-4、2-5、3-6 であった。

Sapecin の  $^1\text{H-NMR}$  に基づく立体構造モデルが解析されており(45)、また、Bontems らは(46)、サソリ毒の一種である charybdotoxin と sapecin の構造的モチーフが同じであることを指摘している。Sapecin と charybdotoxin は、ジスルフィド結合の位置は同じであるが、アミノ末端から 1 番目と 2 番目システイン残基間のアミノ酸の数が異なっている。すなわち、sapecin では 1 2 アミノ酸残基であるのに対して、charybdotoxin では 5 アミノ酸残基である(47)。これに対して、sapecin B は、この領域のアミノ酸残基の数は 6 残基であり、さらに、Fig.15 に示したように、ア

ミノ酸配列においても charybdotoxin と高いホモロジーを持っていた。したがって、sapecin B と charybdotoxin は、全体的な立体構造においても、非常に高いホモロジーを持つものと推定される。

#### 第4節 sapecin ホモログの抗菌活性

Sapecin B と sapecin C が、sapecin とよく似た構造を持つことが分かったので、これらホモログが、sapecin と同様な抗菌スペクトルを持っているかどうか検討した。

Table 5 に示したように、sapecin B と sapecin C は、sapecin とほぼ同じ抗菌スペクトルを持っており、*Staphylococcus* 属、*Bacillus* 属、*Streptococcus* 属といったグラム陽性細菌の増殖を強く阻害した。しかしながら、 $20 \mu\text{g/ml}$  の濃度では *Escherichia* 属、*Proteus* 属、*Klebsiella* 属といったグラム陰性細菌に対しては、抗菌活性を示さなかった。特に興味深い点として、sapecin C は、細菌感染治療において大きな問題となっている多剤耐性 *Staphylococcus aureus*、いわゆる MRSA (SR3626 株、SR1550 株、SR1587 株、SR3636 株) に対しても顕著な抗菌活性を有していた。また、sapecin 類は、ウシ乳腺炎の原因菌 (*Staphylococcus*, *Streptococcus bovis*) や、虫菌の原因菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*) に対しても強い抗菌活性を持つことが分かった。

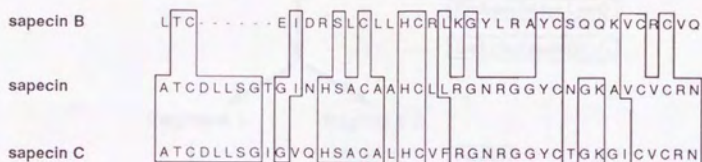


Fig. 13 comparison of amino acid sequences of sapecin and its homologues.

Identical amino acids in sapecin and its homologues are boxed. A gap was introduced to obtain maximal sequence similarity.

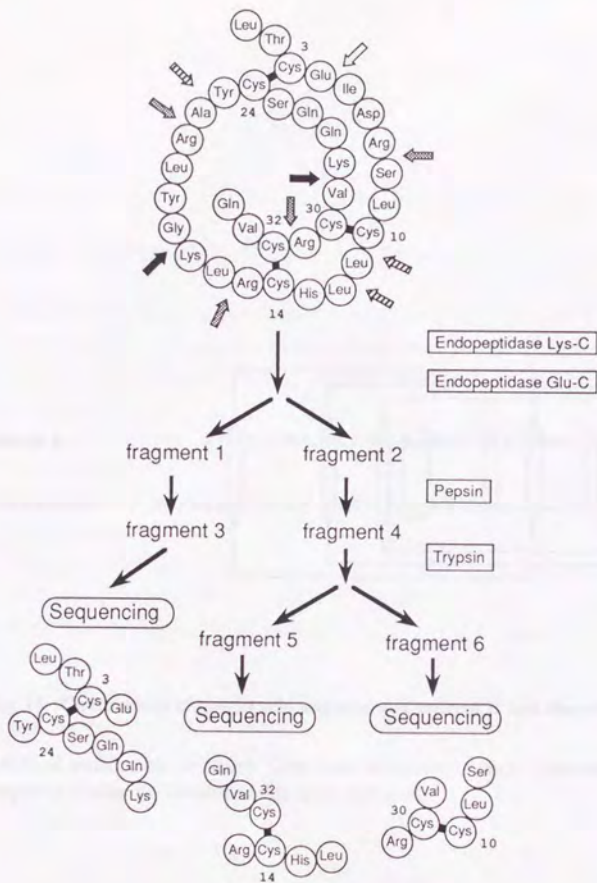


Fig. 14 Flow chart of the determination of the disulfide pairs of sapecin B.

Points of cleavage by the various proteinases are shown by arrows. Numbers indicate the positions of cysteine residues from the N-terminal amino acid residue. Cleavage site are;

- ➔, Endopeptidase Lys-C; ➡, Endopeptidase Glu-C; - - - , pepsin;
- ▨▨▨, TPCK-trypsin.

Fragments 3, 5 and 6 were sequenced.

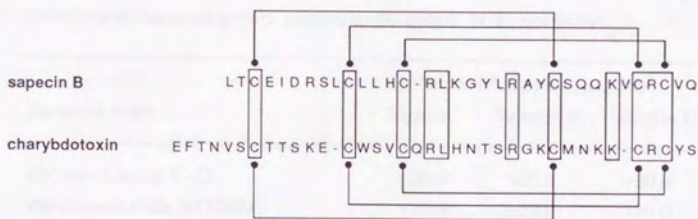


Fig. 15 Comparison of amino acid sequences of sapecin B and charybdotoxin.

Identical amino acids are boxed. Gaps were introduced to obtain maximal sequence similarity. Disulfide bridges are indicated.

Table 5 Antibacterial activities of sapecin, sapecin B, sapecin C.

Antibacterial activities were measured as described in the text unless otherwise mentioned and antibacterial activities are expressed as concentrations causing 50% inhibition of bacterial growth relative to the control. N.T., not tested.

Bacterial strain	Antibacterial activity ( $\mu$ g/ml)		
	Sapecin	Sapecin B	Sapecin C
<i>Escherichia coli</i> K-12	>20.0	>20.0	>20.0
<i>Proteus mirabilis</i> IFO3849	>20.0	>20.0	>20.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC21316	>20.0	>20.0	>20.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538B	0.5	1.6	0.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO3762	N.T.	N.T.	1.2
<i>Staphylococcus aureus</i> MR3626*	N.T.	N.T.	4.6
<i>Staphylococcus aureus</i> MR1550*	N.T.	N.T.	6.6
<i>Staphylococcus aureus</i> MR1587*	N.T.	N.T.	0.9
<i>Staphylococcus aureus</i> MR3636*	N.T.	N.T.	5.4
<i>Streptococcus mutans</i> 6516	4.5	6.6	2.6
<i>Streptococcus sanguis</i> ST3	1.5	3.8	0.9
<i>Streptococcus salivarius</i> HHT	2.6	3.5	0.7
<i>Streptococcus bovis</i> ATCC27960	5.2	0.9	2.4
<i>Bacillus megaterium</i> IAM1166	<0.2	<0.2	<0.2
<i>Bacillus circulans</i> IFO3967	<0.2	<0.2	<0.2
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13059	<0.2	<0.2	<0.2

\* Methicillin- and cephem-resistant strain.

## 第5節 考察

本章では、*Sarcophaga peregrina* の胚由来細胞である NIH sape-4 の培養上清からの、新規な sapecin ホモログの精製と構造及びその抗菌活性に関して述べた。

NIH sape-4 の培養上清からは、松山らによって抗菌蛋白 sapecin が精製されているが(11)、今回、精製における抗菌活性の指示菌として *Staphylococcus aureus* を用いたことによって、NIH sape-4 の培養上清中のマイナー成分であった sapecin ホモログを精製することができた。 Sapecin C は、アミノ酸配列が sapecin と非常に良く似ており、40 アミノ酸残基の内31 残基が同じであることから、sapecin のファミリーに属する抗菌蛋白と考えられる。このことから、*Sarcophaga peregrina* においては、sapecin も sarcotoxin I (8), sarcotoxin II (43)と同様に共通の遺伝子を祖先としているものと思われる。これに対して、sapecin B は、アミノ酸残基数が34 であり、sapecin より6 残基も少なく、また、アミノ酸配列が最大の一致を取るような配列を考えても、34 残基中14 残基しか一致しない。

この一方で、sapecin B は、アミノ酸配列が最大に一致する配列で考えた場合、サソリ毒の成分でK<sup>+</sup>チャンネル阻害剤として知られている charybdotoxin (33)と、34 残基中11 残基のアミノ酸が一致していた。 Charybdotoxin は、Cys-X-X-X-Cys 配列と Cys-X-Cys 配列の両端の Cys 残基が、互いにジスルフィド結合で結ばれた構造を持っている(46)。興味深いことに、sapecin B も、また、同様な構造モチーフを有していることから、sapecin B が、charybdotoxin と同様に、Ca<sup>2+</sup>依存性のK<sup>+</sup>チャンネルを阻害する可能性が考えられる。もし、sapecin B が、このような活性を持つ



ていたならば、sapecin B が、sapecin と同様に、センチニクバエの幼虫の体表障害時または胚発生時に一過的に発現するかどうかに興味を持たれる。この発現が見られれば、sapecin B は、sapecin ファミリーに属するものであろう。そして、sarcotoxin, sapecin が、生体防御だけでなく、胚発生時、蛹化時における自己由来の異物排除にも関与しているという可能性(19, 20)を検証する上で、K<sup>+</sup>チャンネル阻害活性という具体的な機能に基づいたアプローチを可能とするかもしれない。逆に、体表障害時や発生時に、sapecin B の発現が見られないようであれば、このタンパク質は、charybdotoxin 様のチャンネル阻害活性を持つタンパク質のファミリーと考えることができるであろう。これらの点については、今後の検討が必要である。

抗菌活性については、sapecin B, sapecin C ともに、グラム陽性細菌に強い抗菌活性を有していたが、菌株によっては、多少、感受性が異なっていた。例えば、*S. epidermidis* は、sapecin B に対して感受性が特に低い、逆に、*Strep. bovis* は、sapecin B に最も感受性が高かった。恐らく、多種多様なグラム陽性菌に対する防御機構として、sapecin のホモログが存在する意義があるものと思われる。

Sarcotoxin I にも、3種類のホモログが存在する理由も同じであろうと思われる。

また、生体内では、sapecin 類、sarcotoxin 類が同時に存在することから、これら抗菌タンパク質の共同作用にも関心が持たれる。また、sapecin C は、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) に、強い抗菌活性を有していた。Sapecin の抗菌活性発現のための作用点は、細胞膜であることが示されている(21)ことから、

sapecin 類の作用機構は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質とは異なっていると考えられる。

したがって、sapecin とこのホモログは、MRSA感染症の治療剤をデザインする上で有用な材料となる可能性があると思われる。

以上、新規な sapecin ホモログの2つが、sapecin と同じ2次構造を持ち、かつ、同様な活性を持つことが分かった。また、分子内に3つのジスルフィド結合を持ち、その結合様式が sapecin と同じである数種のサソリ毒の構造モチーフが、3次構造のレベルですべて同じであることが知られている(34)。すなわち、参考図に示すように、これらサソリ毒類は、 $\alpha$ -ヘリックス (Cys-X-X-X-Cys の部分) と折れ曲がり  $\beta$ シート (C末端側の Cys-X-Cys 部分まで) が、2つのジスルフィド結合で連結された、非常に特徴的な立体構造を持つという共通点がある。Sapecin B も同じ立体構造を持っている可能性が非常に高いと考えられ、この特徴的な構造とこのタンパク質の活性との相関に関心が持たれる。

## 第 4 章

### Sapecin B の抗菌活性コア部分の決定と性質

## 第1節 序 論

前章で述べたように、sapecin B は、構造的に、抗菌タンパク質 sapecin とホモロジーを持つだけでなく、サソリ毒蛋白でK<sup>+</sup>チャンネル阻害剤として知られている charybdotoxin とも高いホモロジーを持っていた。これらのタンパク質は、 $\alpha$ -ヘリックス (Cys-X-X-X-Cys の部分) と折れ曲がり  $\beta$ シート (C末端側の Cys-X-Cys 部分まで) が、2つのジスルフィド結合で連結されているという、非常に特徴的な立体構造を持っている。また、最近解明された sapecin の立体構造から、 $\alpha$ -ヘリックス部分が疎水性表面を形成しており、その反対側に位置する  $\beta$ シート部分に塩基性アミノ酸残基が集まっていることから、全体として両親媒性を持つことが示唆されている(45)。タンパク質の疎水性部分は細胞膜との相互作用に重要な役割を持つと考えられ、また、sapecin は、バクテリアのリン脂質のうちカルジオリピンだけに特異的に結合するが、この  $\beta$ シート部分にある Arg, Lys 残基が、カルジオリピンの2つのリン酸基と相互作用する可能性が指摘されている(45)。これらのことから、この立体構造的に特徴的な部分の何れかに、抗菌活性の発現に必要な部分があるのではないかと考えた。そこで、sapecin と charybdotoxin の立体構造モデルを参考にして、sapecin B を4つの領域に分割し、各領域の抗菌活性および性質を調べることによって、sapecin B の活性コア部分の決定を試みることにした。

## 第2節 sapecin B からの4つのペプチドフラグメント調製と抗菌活性

Sapecin B と charybdotoxin の構造比較から、sapecin B のアミノ酸残基 7-17 が  $\alpha$ -ヘリックス領域、22-26、29-34 がそれぞれ  $\beta$ シート領域と類推された。そこで、Fig. 16 に示したように、 $\alpha$ -ヘリックス領域と  $\beta$ シート領域を保存する形で、4つのペプチド (1L-6D, 7R-17K, 18G-28K, 29V-34Q) を C末端がアミド化された形で合成した。ただし、29V-34Q フラグメントだけは、C末端はアミド化されていない。

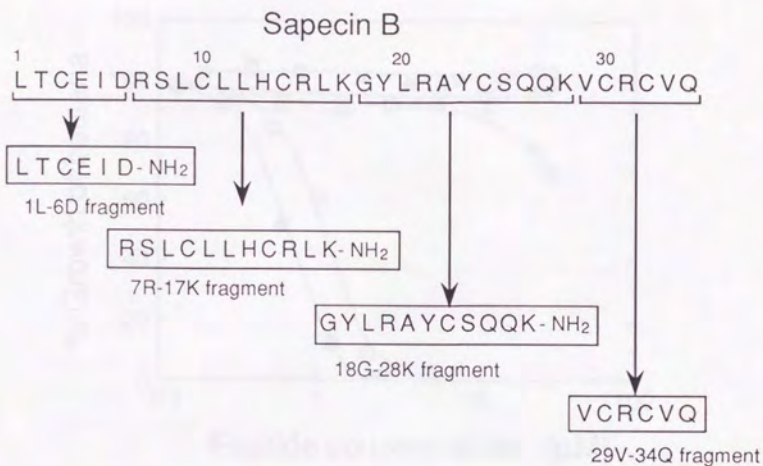
これらの、ペプチドの *S. aureus* に対する抗菌活性を調べたところ、Fig. 17 に示すように 7R-17K フラグメントだけが顕著に *S. aureus* の増殖を抑制し、その 50% 生育阻害濃度 (ID<sub>50</sub>) は 1.5  $\mu$ M と低く、sapecin B の 0.7  $\mu$ M に匹敵するものであった。

他の3つのペプチドは、濃度 10  $\mu$ M 以下の濃度では抗菌活性を示さなかった。

この結果は、sapecin B のアミノ酸配列で、7-17 残基の領域が、抗菌活性発現に重要であることを強く示唆している。

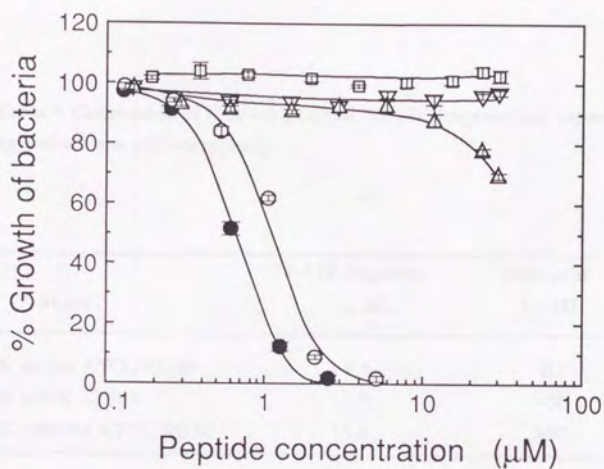
前章で述べたように、sapecin B は、*S. aureus* などのグラム陽性菌に対しては強い抗菌活性を持っているが、*E. coli* のようなグラム陰性菌に対しては顕著な抗菌活性は持っていない。しかし、Table 6 に示したように、7R-17K フラグメントは、*S. aureus* ばかりでなく、*E. coli* の生育も強く抑制した。さらに、驚くべきことに、ID<sub>50</sub> は約 10 倍ほど高いものの、真菌類である *Candida albicans* に対しても生育抑制活性を持っていた。そこで、7R-17K フラグメントの *Candida albicans* に対する生育抑制作用が、殺菌的なものなのか、単に静菌的なものなのかを知るために、7R-17K フラグメントで 1 時間処理した *Candida albicans* の生菌数を調べた。

すなわち、 $2 \times 10^5$  cells/ml の *C. albicans* を増殖培地である sabouraud 培地中で、各種濃度の抗菌ペプチドと  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベーションした。この培養液  $100 \mu\text{l}$  を適当に希釈した後、sabouraud 寒天培地へ塗布し  $37^\circ\text{C}$  で一晩培養した。生じたコロニーを数えることで生菌数を測定した。その結果、Fig. 18 に示すように、7R-17K フラグメント濃度が増すにつれて、*Candida albicans* の生菌数が顕著に減少することが分かった。このことから、7R-17K フラグメントは、*Candida albicans* に対して殺菌的に作用すると考えられる。また、7R-17K フラグメントは、 $10 \mu\text{M}$  の濃度で *S. aureus*、*E. coli* の生菌数を  $10^5$  cells/ml から  $10^2$  cells/ml にまで顕著に減少させることが分かった。これらの結果から、7R-17K フラグメントは様々な微生物に対して殺菌活性を持っていると考えられる。



**Fig.16** Fragmentation of sapecin B and synthetic peptides.

Sapecin B was divided into 4 parts and amidated peptides shown in boxes corresponding to each fragment were synthesized. The 7R-17K fragment and 29V-34Q fragment correspond to the helix region and sheet region of sapecin B, respectively. The  $\alpha$ -carboxyl group of Gln in the synthetic 29V-34Q fragment was not amidated.



**Fig. 17** Antibacterial activities of synthetic peptides.

The antibacterial activities of amidated fragments of sapecin B were measured using *S. aureus* ATCC6538P as a target bacterium. Increasing amounts of test sample were added to the medium and relative bacterial growth was determined after incubation for 180 min at 37°C. ●, sapecin B; □, 1L-6D fragment; ○, 7R-17K fragment; △, 18G-28K fragment; ▽, 29V-34Q fragment.



Table 6 Comparison of ID<sub>50</sub> values of the 7R-17K fragment and sapecin B against various microorganisms.

Strain	7R-17K fragment ( $\mu$ M)	Sapecin B ( $\mu$ M)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	1.5	0.7
<i>E. coli</i> K-12 594	3.0	>50
<i>C. albicans</i> ATCC 36232	15.0	>80

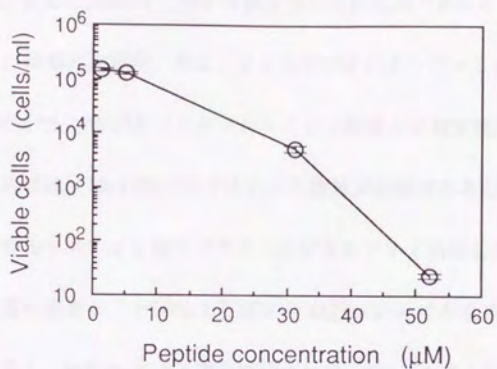


Fig. 18 Candidacidal activity of the 7R-17K fragment.

Increasing amounts of the 7R-17K fragment were incubated with a fixed number of *C. albicans* ATCC36232 cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) suspended in Sabouraud medium for 1 hr at 37°C. Then the cell suspension was plated, and incubated for 2 days at 37°C, and numbers of colonies formed were counted.

### 第3節 7R-17K フラグメントとリン脂質の相互作用

Sapeccin は、バクテリア細胞膜のカルジオリピン(CL)に特異的に結合し、細胞膜中の CL 含量と sapecin に対する感受性の間に相関があることから、sapecin の作用部位は、細菌の細胞膜、特に、リン脂質がそのターゲットと考えられている

(21)。そこで、7R-17K フラグメントとリン脂質との相互作用を調べることにした。

このためには、7R-17K フラグメントの標識が必要であるため、まず、このペプチドの2つのシステイン残基がフリーカジスルフィド結合しているか調べた。フリーSH基の定量は、DTNBと反応させ412nmにおける吸光度を測定することによって定量し、NaBH<sub>4</sub>による還元前後のフリーSH基の量を比較することでジスルフィド結合の有無を判断することにした。Fig. 19に示したように、7R-17K フラグメントは、還元前後でフリーSH基量には変化がなく、また、分子内に1つのフリーSH基を持つグルタチオンのちょうど2倍のフリーSH基を持つことから、このペプチドのシステイン残基のSH基はフリーの状態で存在していることが分かった。

そこで、蛍光標識は、このペプチドのフリーSH基を、mBBBrと反応させることで行い、得られたmBBBr誘導体は、HPLCによって均一に精製した。HPLCによって分取したラベル化ペプチドは、DTNBとの反応性を持たなかったため、7R-17K フラグメントの2つのSH基は、mBBBrでラベルされたことが分かった。さらに、このラベル体のアミノ酸配列をエドマン分解で確認したところ、7R-17K フラグメントと同一のアミノ酸配列を持つことが分かった。

このラベル化7R-17K フラグメントのリン脂質への結合は、リボソームを用い

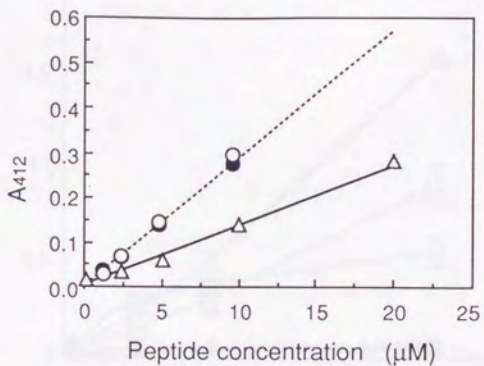
て検定した。リン脂質の中には、単独でリボソームを形成しないものがあるため、phosphatidylcholine (PC)をベースとして(モル比として0.6)、他のリン脂質(モル比として0.4)と混合してリボソームを作成した。このリボソーム懸濁液の量を変化させ、一定量のラベル化ペプチドと反応させた後、リボソームを十分に洗浄し、リボソームに結合したペプチドの量を、蛍光分光光度計で測定することで、ペプチドのリン脂質への結合能を検定した。mBBr単独では、すべてのリボソームに対して蛍光が検出されなかったため、これらリボソームにおいて検出される蛍光は、ペプチドのリボソームへの結合に依存するものであると考えられる。Fig. 20に示すように、phosphatidylserine (PS)を例外として、酸性リン脂質から成るリボソームにおいて、有為な蛍光が検出された。この結果は、7R-17k フラグメントのリン脂質に対する結合の特異性は、cardiolipin (CL) 特異的な sapecin と比較して、それほど厳密ではないことを示している。しかし、7R-17K フラグメントは、phosphatidylglycerol (PG) や phosphatidylinositol (PI) と比較すると、CL に対する結合能が高いことが分かる。一方、7R-17K フラグメントは、中性リン脂質である phosphatylcholine (PC) や phosphatyl ethanolamine (PE) には、明確な結合能を持たなかった。

次に、7R-17K フラグメントは、*S. aureus* に対しても、*E. coli* に対しても、強い抗菌活性を有する(11)。そこで、この2つの抗菌物質の細胞膜に対する障害性を比較するために、細胞膜のモデルであるリボソームに対する障害性を調べた。

このために、グルコースをトラップした *S. aureus* タイプの細胞膜リン脂質から

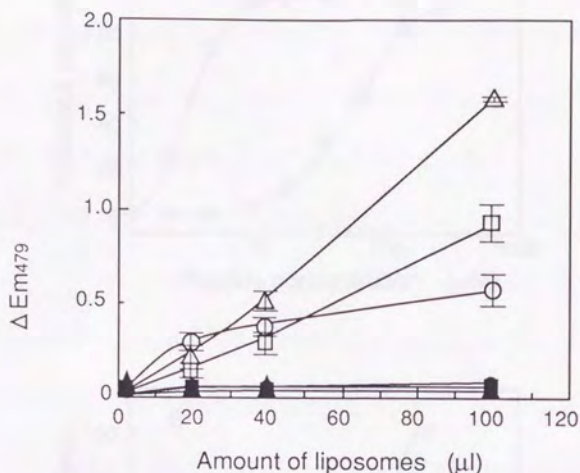
成るリボソームと、*E. coli* タイプの細胞膜リン脂質から成るリボソームを調製した。

そして、sapecin B、または、7R-17K フラグメントと、これらリボソームを反応させた後、漏出したグルコースを測定することによりリボソームに対する障害性を検討した。 Fig. 21 に示すように、PG:CL が 3:1 から成る *S. aureus* タイプのリボソームにおいては、sapecin B、または、7R-17K フラグメントの量依存的にグルコースの漏出が観察された。しかしながら、グルコースの 50% 漏出に必要な量 (ED<sub>50</sub>) は、7R-17K フラグメントの方が 10 倍程度低濃度であった。また、期待どおり、7R-17K フラグメントは、*S. aureus* タイプのリボソームに対するよりは高濃度においてではあるが、PE:PG:CL が 7:2:1 から成る *E. coli* タイプのリボソームに対してもグルコースの漏出を誘導した。しかし、sapecin B は、200  $\mu$  M までの濃度において、*E. coli* タイプのリボソームからグルコースを漏出させることができなかった。この結果は、sapecin B が *E. coli* に対して活性が弱く、*S. aureus* に対して強いという傾向と一致する。この結果から、7R-17K フラグメントの抗菌活性は、細菌の細胞膜に直接作用することによって発現するものと考えられる。



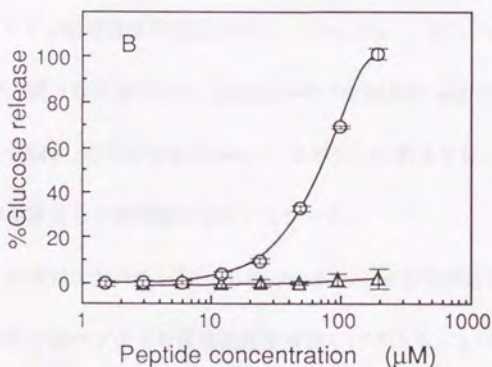
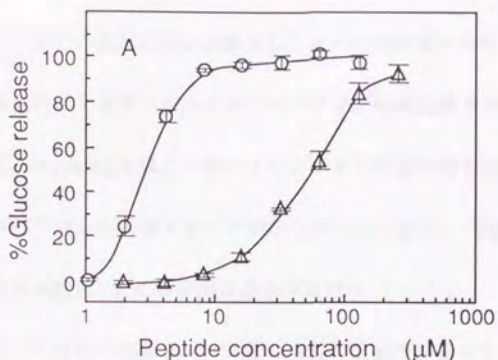
**Fig. 19** Free -SH determination of 7R-17K fragment .

The free -SH of 7R-17K fragment was determined with DTNB.  
 Dotted line indicates the line calculated as 2 times of glutathione.  
 ; ○ , before reduction ; ● , after reduction ; Δ , glutathione.



**Fig.20 Binding of the 7R-17K fragment to liposomes.**

Liposomes were prepared by mixing PC and various phospholipids in molar ratios of 0.6 to 0.4, and the bindings of increasing amounts of these liposomes to a fixed amount of fluorescence-labeled 7R-17K fragment were washed well. Emission of fluorescence was measured at 479 nm with excitation at 385 nm, after solubilizing the liposomes with Triton X-100. The phosphorous content of 10  $\mu$ l of liposome suspension varied from 14 to 17 nmol depending upon the phospholipid. ○, PG; △, CL; □, PI; ■, PC; ▲, PS; ●, PE.



**Fig.21 Release of glucose from liposomes in the presence of the 7R-17K fragment or sapecin B.**

Two types of liposomes with entrapped glucose were prepared from PE, PG, and CL. Their phospholipid compositions resembled those of *S. aureus* (molar ratio of PG : CL, 7.5 : 2.5) and *E. coli* (PE : PG : CL, 7 : 2 : 1). Increasing amounts of the 7R-17K fragment (A), or sapecin B (B) were incubated with these liposomes for 1 hr at 37°C. Then the amount of glucose released from the liposomes was measured. Phospholipid composition: ○, like that of *S. aureus*; △, like that of *E. coli*.



#### 第4節 考察

これまでに、多くの抗菌蛋白が分離され、その特徴が調べられている(7-11)。これらの、抗菌蛋白の1次ターゲットは、バクテリアの細胞膜であると考えられている。実際に、sarcotoxin Iは、一種のイオノフォア的作用を有しており *E. coli* の細胞膜のポテンシャルを破壊することが示されている(23)。Sapecin は、バクテリアの細胞膜のリン脂質 CL に特異的に結合する(21)。

また一方で、これらの抗菌タンパク質の活性の改良の試みがなされている。例えば、cecropin A と cecropin D のハイブリッドや、cecropin A、magaiin-2-amide、melittin の D-アミノ酸置換体が報告されている(51,52)。また、cecropin-melittin ハイブリッドが合成されており(53)、diptericin の Arg 残基を Arg の代謝拮抗物質である canvanine へ置換した報告もある(54)。しかし、これまでに、抗菌タンパク質の活性コア部分を決定した例は知られていなかった。

ところが、本研究において sapecin B を charibdotoxin との構造の類推から4分割して、対応する合成ペプチドの抗菌活性を検討したところ、 $\alpha$ -ヘリックス構造を取ると推定される部分に相当するペプチドだけが、顕著な抗菌活性を持つことを見いだした。このアミノ酸11残基から成るペプチドは、グラム陽性菌の *S. aureus* に対して、親蛋白である sapecin B とほぼ同じ抗菌活性を持っていた。さらに、このペプチドは、グラム陰性菌である *E. coli* ばかりか、真菌類である *C. albicans* にも抗菌活性を有していた。この現象から、2つの可能性が考えられる。

一つは、この部分ペプチド部分が sapecin B の活性部位であり、本来 sapecin B

は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、真菌類に対して抗菌活性を有すべきものであり、この活性部位以外の部分がグラム陰性菌、真菌に対する活性を妨害している可能性である。 もう一つの可能性は、sapecin B の抗菌活性とこのペプチドの抗菌活性は無関係であり、偶然、sapecin B のこの部分が抗菌活性を有していたという可能性である。 7R-17K フラグメントと sapecin B による *S. aureus* タイプのリボソーム障害性の検討では、ともにグルコースの漏出が認められた。 このとき、7R-17K フラグメントによるグルコースの漏出は、抗菌活性を発現するために必要な濃度とほぼ同じ濃度で生じているが、sapecin B の場合は、グルコース漏出に必要な濃度は、抗菌活性発現に必要な濃度より明らかに高かった。 このことから、7R-17K フラグメントと sapecin B の抗菌活性の発現の様式は、異なっていることが推定できる。

したがって、どちらの可能性が正しいか結論することは、この2つの物質の抗菌活性の特異性が異なることもあり、現在のところ困難である。

11 アミノ残基の 7R-17K フラグメントが、抗真菌活性を持っている点は、さらに興味深いことである。 これまで、tachypleisin (17 残基) (55), indolicidin (13 残基) (56), bactenecin (12 残基) (57) といった低分子量の抗菌ペプチドが単離されている。 しかし、どのペプチドも抗真菌活性については示されていない。

以上、本研究で得られた 7R-17K フラグメントが、sapecin B の本来の抗菌活性の活性サイトであるかどうかには、まだ議論の余地があるものの、このペプチドは、従来知られている抗菌蛋白質と比較して幅広い抗菌スペクトルを有している点、また、11 アミノ酸残基という低分子である点から考えて、新規な抗菌剤のデザイン

において有用なリード化合物となるものと期待される。すなわち、7R-17K フラグメントの抗菌活性発現における特徴、抗真菌活性を含め抗菌スペクトルが拡大した理由を明かにすることによって、より有用な抗菌剤をデザインすることが可能となると思われる。また、7R-17K フラグメントは、アミノ酸11残基からなる小さなペプチドであるので、アミノ酸配列の改変によって、さらに強い抗菌活性を持つペプチドをデザインすることが比較的容易ではないかと考えられる。

## 第 5 章

### Sapecin B の活性コア部分のアナログと 抗菌活性発現の特徴

## 第1節 序論

前章で述べたように、sapeicin B の抗菌活性のコア部分と考えられる 7R-17K フラグメントが、幅広い抗菌スペクトルを有していること、また、このペプチドがリン脂質との結合能を持っており、さらに、リボソーム障害作用を持つことから、このペプチドもまたその作用部位が細胞膜であると考えられることが分かった。

この 7R-17K fragment はアミノ酸残基が 11 個と非常に短いペプチドであることから、アミノ酸配列を少し変更することで、その物理化学的性質が大きく変化し、これに従って抗菌活性が変化することが予想される。したがって、7R-17K フラグメントのアミノ酸配列の改変と抗菌活性の相関を調べることは、このペプチドの抗菌活性発現の作用機構を推定するためだけでなく、さらには、より抗菌活性の高いペプチドをデザインするための有用な情報を与えるものと考え、7R-17K フラグメントのアナログを合成し、その抗菌活性について検討することにした。

## 第2節 7R-17K フラグメントのアナログの抗菌活性

7R-17K フラグメントは、バクテリアの細胞膜の酸性リン脂質に作用することで抗菌活性を発現すると考えられる。そして、このペプチドのリン脂質への作用には、疎水性アミノ酸と (+) チャージアミノ酸が関与していると予想される。そこで、この可能性を検証する目的で、Table 7 に示した、4 種類のアナログを合成し、その抗菌活性を調べた。アナログ 1 は、7R-17K fragment の C 末端アミドをフリーのカルボキシル基としたものである。アナログ 2 は、7R-17K fragment

のシステイン残基をロイシンに置換することで疎水性を高めたものである。アナログ3は、N末端から3番目のロイシンをリジンに換えN末端側の(+)チャージを強め、セリンとヒスチジン残基をロイシンとすることで疎水性を高めたものである。アナログ4は、analog3のC末端をフリーのカルボキシル基としたものである。Table7に示した結果から、アナログ2,3の抗菌活性は、7R-17Kフラグメントと比較して、*S. aureus*に対して5-7倍に向上し、*E. coli*に対しては約2倍向上した。また、7R-17Kフラグメントとアナログ1の比較から、C末端のリジン残基のアミド化が抗菌活性を向上させることが分かり、この傾向はアナログ3とアナログ4の場合にも認められた。今回検討したアナログのうちでは、アナログ2とアナログ3が特に強い抗菌活性を持っており、親蛋白 sapecin B と比較して、*S. aureus*に対して約3倍、*E. coli*に対する活性では30倍以上、*C. albicans*に対しては少なくとも6倍以上の活性向上が認められた。次に、7R-17Kフラグメントは、*C. albicans*に抗菌活性を有していたので、このアナログも含め、これらペプチドが広く酵母類に抗菌活性を有するかどうか検討した。Table8に示したように、すべての抗菌ペプチドは検討した酵母すべてに対して強い抗菌活性を持っており、幅広い抗真菌活性を有するものと考えられた。特に、analog2と3は各酵母に対して広く、かつ、低濃度で抗菌活性を示し、*C. albicans*に対しては7R-17Kフラグメントと比較して4-8倍の抗菌活性を有していた。

### 第3節 抗菌活性に対する pH の影響

(+) チャージアミノ酸を増やすことで抗菌活性が向上したことから、このペプチドのリン脂質への結合において、イオン結合が関与していることが考えられる。

そこで、抗菌活性に対する pH の影響を調べることにした。Table 9 に示したように、7R-17K フラグメントを含めアナログ 2, 3 の抗菌活性は、抗菌活性を検定する培地の pH が高くなるに従って低下した。この結果から、培地 pH によって、試験菌の表層のチャージまたはペプチドの (+) チャージが pH によって変化するために、抗菌活性が影響を受けると考えられ、抗菌活性の発現にペプチドとリン脂質の結合にイオン結合が重要な役割を果たしていることが推定される。

### 第4節 抗菌活性と界面活性能と溶血活性の相関

疎水性アミノ酸であるロイシン残基を増加させることで、著しい抗菌活性の向上が認められた。ペプチド中の疎水性アミノ酸を増加させることは、この分子の両親媒性を強めることになる。そこで、7R-17K フラグメントとそのアナログの抗菌活性と界面活性能との相関を調べることにした。Table 10 に示したように、各ペプチドは、代表的な界面活性剤である SDS より、強い界面活性能を有しており、さらに、界面活性能の強さと抗菌活性は良い相関を示した (Table 7 参照)。

これらのペプチドが幅広い抗真菌活性を有すること、また、高い界面活性能を持つことから、動物細胞にもまた作用する可能性が考えられた。抗バクテリア活性を持つハチ毒のメリチンは、強い溶血活性を持つことが知られている。そこで、

ヒツジ赤血球を用いて、これらペプチドの溶血活性を調べてみた。しかしながら、Fig. 22 に示したように、予想に反してメリチンが溶血を引き起こす濃度においても、これらペプチドはまったく溶血作用を示さなかった。これらペプチドの抗菌活性は、Table 7, Table 8 に示したように、 $50 \mu\text{M}$  以下で十分な抗菌活性を示すことから、少なくとも溶血活性においては、これら抗菌ペプチドは十分満足のいく選択性を有していると判断できる。

Peptide	Antibacterial Activity (MIC)	Hemolytic Activity (IC <sub>50</sub> )
Peptide 1	$10^{-5}$ M	> $10^{-4}$ M
Peptide 2	$10^{-5}$ M	> $10^{-4}$ M
Peptide 3	$10^{-5}$ M	> $10^{-4}$ M
Peptide 4	$10^{-5}$ M	> $10^{-4}$ M
Peptide 5	$10^{-5}$ M	> $10^{-4}$ M



Table 7. Antibacterial activities of synthetic analogues of the 7R-17K fragment.

peptides	sequence	ID <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
		<i>S. aureus</i> ATCC6538P	<i>E. coli</i> K-12
7R-17K	RSLCLLCRLK-NH <sub>2</sub>	1.5	3.0
Analogue 1	RSLCLLCRLK-COOH	8.6	14.0
Analogue 2	RSLLLLHLRLK-NH <sub>2</sub>	0.3	1.9
Analogue 3	RLKLLLLCRLK-NH <sub>2</sub>	0.2	1.5
Analogue 3	RLKLLLLCRLK-COOH	0.4	2.2
Sapecin B		0.7	>50

Table 8 . Antifungal activities of the 7R-17K fragment, its analogues and sapecin B against various yeasts.

Organism	Minimum inhibitory concentration ( $\mu$ M)				
	7R-17K	Analogue2	Analogue3	Analogue4	sapecin B
<i>Candida albicans</i>	50	6	12	25	>80
<i>Candida lipolitica</i>	12	6	6	25	>80
<i>Pichia pastoris</i>	12	6	6	25	>80
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1.5	1.5	1.5	3	>80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	6	25	50	>80

Table 9 . Effect of pH on antibacterial activity of synthetic analogues of 7R-17K fragment.

After incubation of *S. aureus* ATCC 6538P with increasing amounts of each peptide in Mueller-Hinton medium for 24hr at 37°C, minimum inhibitory concentration was measured.

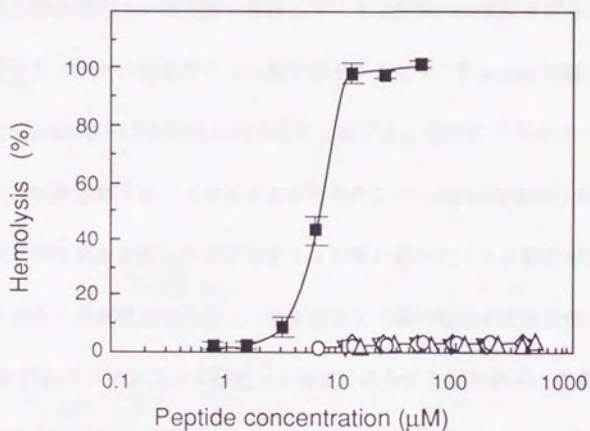
pH of medium	Peptides ( $\mu$ M)		
	7R-17K	Analogue 2	Analogue 3
7.35	32	16	32
6.90	8	4	8
6.50	8	2	4

Table 10. Surface activities of antimicrobial peptides.

Peptides or SDS were dissolved in distilled water at concentration of 0.154mM.

Surface tensions were measured in a platinum ring connected to a precision electrobalance at 25°C.

Sample	Surface tension ( $10^5$ N/cm)
7R-17K fragment	65.91
Analogue 1	66.88
Analogue 2	61.95
Analogue 3	61.75
Analogue 4	62.29
SDS	68.90
Distilled water	72.29



**Fig.22 Hemolytic activities of antibacterial peptides.**

Sheep red blood cells were incubated with increasing amounts of each peptide for 2 hr at 37°C. After centrifugation, the A<sub>492</sub> values of the resulting supernatants were measured. 100% lysis was achieved by incubating the cells in distilled water.

The peptides used were: □, analogue 1; ▽, analogue 2; △, analogue 3; ○, analogue 4; ◇, the 7R-17K fragment; ■, melittin (positive control).

## 第5節 考察

この章では、sapecin B の活性コア部分と考えられる 7R-17K フラグメントのアナログを合成し、その抗菌活性の変化と物理化学的な性質の変化について述べた。

7R-17K フラグメントは細胞膜に作用すると考えられることから、塩基性アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基に着目してアミノ酸配列の変更を試みた。その結果、塩基性アミノ酸と、疎水性アミノ酸を増やすことで、*S. aureus* に対する抗菌活性を、親蛋白 sapecin B の3倍程度に高めることができ、同時にグラム（-）細菌、真菌に対する抗菌活性も向上させることができた。pHの増加にともなって抗菌活性が低下する現象から、ペプチドとリン脂質の結合にイオン結合が重要な役割を果たしていることが推定できる。塩基性アミノ酸の増加が抗菌活性を向上させたこと、7R-17K フラグメントが酸性リン脂質に結合することから、塩基性アミノ酸残基と細胞膜中のリン脂質のリン酸イオンとの相互作用が抗菌活性発現に重要であることが分かる。また、抗菌活性の界面活性能と抗菌活性が良好な相関をもつことから、ペプチドの両親媒性が抗菌活性の発現に重要であることが推測され、疎水性アミノ酸の増加がペプチドの両親媒性向上に有効であると考えられる。これらのことから、より強力な殺菌剤として、このペプチドをデザインするためには（+）チャージを有するアミノ酸残基を導入することが有効であり、かつ、疎水性アミノ酸残基をバランス良く配置させることが重要と考えられる。また、これらアミノ酸の配列は、ペプチドの両親媒性を高めるようにデザインすべきであり、このためには、ペプチドの界面活性能の測定が有力な指標となり得ると思われる。

しかし、これらのペプチドは、代表的な界面活性剤である SDS より強い界面活性能を持っていたが、一方で、 $500\mu\text{M}$  の濃度でも有意な溶血活性を持っていなかった。 SDS は、カチオン性界面活性剤と比較すると溶血活性の低い界面活性剤ではあるが、 $100\mu\text{M}$  以下でヒツジ赤血球を溶血させることが知られている。しかし、*S. aureus* に対する抗菌活性は、MIC で  $3.5\text{mM}$  と非常に弱い。したがって、これらペプチドの界面活性能の増加は抗菌活性の一つの指標とはなり得るが、これだけで抗菌活性の向上を説明することはできない。おそらく、これら一連のペプチドは、抗菌活性の発現において従来知られている界面活性剤の抗菌活性とは異なる何らかの特異性を有するものと考えられる。

7R-17K フラグメントは、アミノ酸が 11 残基であることから合成が容易であり、これをリード化合物としてさらに新規なペプチド系の有用な抗菌剤をデザインすることが可能と考えられる。今後、NMR 解析によるこれら抗菌ペプチドの細胞膜中での立体構造、細菌の細胞膜蛋白質との特異的な相互作用などを研究することで、新しい薬剤をデザインするための有用な情報がさらに得られるものと考えられる。

本邦では、サンダー・ブービー (Thunder-bu-bu) の乱暴者が、夏の一時期入浴  
料を上げ、湯治料の増徴が、あることによる。湯治料は、湯治料の増徴に  
関係があることを見出し、第6章

## 第6章

サンダー・ブービー (Thunder-bu-bu) の乱暴者が、夏の一時期入浴  
料を上げ、湯治料の増徴が、あることによる。湯治料は、湯治料の増徴に  
関係があることを見出し、第6章

### 総括及び今後の展望

本邦では、サンダー・ブービー (Thunder-bu-bu) の乱暴者が、夏の一時期入浴  
料を上げ、湯治料の増徴が、あることによる。湯治料は、湯治料の増徴に  
関係があることを見出し、第6章



本研究は、センチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) の抗菌蛋白質の一次構造の特徴と抗菌活性の相関を調べることによって、新規な抗菌剤のデザインにおける有用な情報を得ることを目的としたものである。

センチニクバエの抗菌蛋白質である sarcotoxin I または sapecin の機能発現に重要なアミノ酸残基または領域を推定するための直接的な一つの手法は、これら抗菌タンパク質を遺伝子工学的に発現させる系を確立し、人為的に変異を導入したミュータント蛋白質を作成し解析することである。そこで、まず、すでに単離されていた sarcotoxin IA の cDNA (19) を用いて、組換え型 sarcotoxin IA の産生について検討した。その結果、カイコ卵巣由来細胞 *Bombyx mori* BM-N cell を宿主とするバキュロウィルスベクター系を利用して、組換え型 sarcotoxin IA を初めて産生させることに成功した。しかしながら、センチニクバエの体液中で見いだされる sarcotoxin IA のカルボキシル末端 (C末端) は  $-\text{Arg-NH}_2$  であるのに対して、この系で発現された組換え型 sarcotoxin IA の C末端は  $-\text{Arg-Gly}$  であり、C末端のグリシン残基がアミド化されていなかった(31)。また、この発現系では、組換え型 sarcotoxin IA は、プロテアーゼで分解を受けることから、活性のある組換え型 sarcotoxin IA を得るためには、システインプロテアーゼ阻害剤を添加する必要がある。本生産系は、sarcotoxin IA の C末端をアミド化する能力を持たないこと、また、プロテアーゼによる分解活性が強いことから、さらに、各種ミュータント sarcotoxin IA を作成するには必ずしも適しているとは言えなかった。しかし、この組換え型 sarcotoxin IA の精製の検討中に、sarcotoxin IA の分解フラグメントが

抗菌活性を持つ可能性が示唆されたことから、抗菌蛋白質に活性コア部分が存在するのではないかという発想を得ることができ、以後の研究の進展に大きく役立った。

一方、センチニクバエの胚由来細胞である NIH-sape-4 は、培養上清中に主にグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つ sapecin や sarcotoxin 類を生産し(20)、抗菌タンパク質の生産系としても優れている。この生産系の検討中に、構造上 sapecin に類似し、主としてグラム陽性菌に抗菌活性を示す新規な抗菌タンパク質 sapecin B, C を見いだした(32)。

Sapecin B, C のアミノ酸配列とジスルフィド結合の位置を解析した結果から、sapecin C は、sapecin ファミリーに属すると考えられた。sapecin B のアミノ酸配列は、sapecin だけでなくカルシウム依存性K<sup>+</sup>チャンネル阻害剤として知られているサソリ毒の一種 charybdotoxin (33) とも高いホモロジーを持っていることが分かった。Charybdotoxin の立体構造は詳細に調べられており、分子内にジスルフィド結合で連結された $\alpha$ -ヘリックス構造と $\beta$ -シート構造を持つという特徴的な構造を持っていることが分かっていた(34)。したがって、sapecin B も同様な立体構造を持っている可能性が高いと考えられた。

そこで、sarcotoxin IA の分解フラグメントが抗菌活性を持つ可能性が示唆されていたこともあり、この特徴的な charybdotoxin の立体構造から類推できる sapecin B の $\alpha$ -ヘリックス部分と $\beta$ -シート部分を保存するような形で分割し、各分解フラグメントの抗菌活性を調べれば、sapecin B の抗菌活性のコア部分が決定出来るのではないかと考えた。そこで、sapecin B を4分割し、化学合成した対応するペプ

チドの抗菌活性を検定したところ、 $\alpha$ -ヘリックス構造を持つと予想された部分のペプチドだけに有意な抗菌活性が認められた(35)。非常に興味深いことに、このペプチドは、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌ばかりでなく酵母など真菌類にも抗菌活性を有していた。さらに、このペプチドは、sapecin B の抗菌活性の大部分を有しており、また、リン脂質に対する作用性の検討からその作用点は細胞膜であると予想された。これらの結果は、このペプチドが sapecin B の抗菌活性のコア部分であることを強く示唆しているものと考えている。

このペプチドは、11個のアミノ酸から成るショートペプチドであるから、ある程度立体構造の影響を除外して、アミノ酸配列と抗菌活性の相関を考察することが可能であると考えた。そこで、このペプチドのアミノ酸配列を改変したアナログを合成し抗菌活性を検討した。その結果、N-末端の塩基性アミノ酸の増加や疎水性アミノ酸の導入によって著しく抗菌活性が増強されることを見だし、最も活性の高いアナログでは、抗菌活性を sapecin B の約7.5倍に向上させることができた。また、これらアナログは、強い界面活性能を持ち、酸性リン脂質を含むリポソームを障害する作用を持つにもかかわらず、羊赤血球に対して顕著な溶血活性を持たなかった。したがって、これら一連の抗菌ペプチドは、親蛋白質 sapecin B の選択毒性の一部を受け継いでおり、抗菌活性の発現において何らかの特異性を持つものと考えられた。

以上、本研究において、センチニクバエの抗菌タンパク質の抗菌活性のコア部分と考えられる配列を初めて決定することに成功し、さらに、アミノ酸配列を改変

することで抗菌活性を大幅に向上させることができた。この活性コア部分から得られる情報は新しい薬剤のデザインに有用な情報を与えることが期待できる。

このための今後の展開としては、まず、この活性コア部分の立体構造の解明が重要であると考えられる。本ペプチドは、アミノ酸残基11個からなるショートペプチドであるから、NMR等の手法によって比較的容易に立体構造を明かにすることができると思われる。特に、細胞膜中での立体構造の解明が重要と考えられ、この活性コア部分とリン脂質、細胞膜蛋白質との相互作用に関する情報は、抗菌活性発現のメカニズムや選択毒性の本質に迫ることを可能にするものと思われる。この活性コア部分が細胞膜または膜成分との相互作用が明かとなった場合、次の興味深いアプローチのひとつは、この活性コア部分の立体構造を模倣した非ペプチド系の抗菌剤をデザインすることであろう。酵素と基質、または、蛋白質とレセプターの分子認識に関して構造レベルで情報が得られる場合は、論理的なドラッグデザインの格好のターゲットとなりうる。実際に、酵素の活性中心と基質の相互作用の解析から得られた情報を基に、レニンやHIVプロテアーゼに対する非ペプチド系の高活性な酵素阻害剤がデザインされている(74,75,76,77,78)。また、下垂体後葉ホルモンの一つであるバソプレシンのレセプター拮抗薬も、レセプターとバソプレシンの立体的な相互作用に関する解析を基に進められている(79,80)。こういったアプローチを参考にすることによって、さらに有効な抗菌剤がデザインされることが可能となるかもしれない。

次に今後の展開として興味深い点は、第3章の考察でも述べたように、sapecin

B が charybdotoxin と同様に Ca 依存性 K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性を持っているかどうかである。もし、sapecin B が、このような活性を持っていたならば、sapecin B が、sapecin と同様に、センチニクバエの幼虫の体表障害時または胚発生時に一過的に発現するかどうかに興味を持たれる。この発現が見られれば、sapecin B は、sapecin ファミリーに属するものであろう。そして、sarcotoxin, sapecin が、生体防御だけでなく、胚発生時、蛹化時における自己由来の異物排除にも関与しているという可能性 (19, 20) を検証する上で、K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性という具体的な機能に基づいたアプローチを可能とするかもしれない。逆に、体表障害時や発生時に、sapecin B の発現が見られないようであれば、このタンパク質は、charybdotoxin 様のチャンネル阻害活性を持つタンパク質のファミリーと考えることができるであろう。

これらの点については、今後の検討が必要であるが、サソリ毒の中には sapecin B と同じ構造的特徴を持つ多くの昆虫特異的な神経毒が知られている (48,49,50)。したがって、これらの原始タンパク質が、サソリにおいては補食、個体防御の手段として、他方、センチニクバエにおいては感染防御と発生時の自己細胞のプログラムドマスにと機能的に進化した可能性が想起され、興味深いものがある。

さらに、同定された sapecin B の抗菌活性のコア部分が、抗菌活性だけでなく Ca 依存性 K<sup>+</sup> チャンネル阻害活性を持っているかどうかに興味を持たれる。もし、この活性を有するようならば、すでに述べたように Ca 依存性 K<sup>+</sup> チャンネルとの相互作用を解析することで、有効な非ペプチド系の新規な K<sup>+</sup> チャンネル阻害剤をデザインすることが可能となるかも知れない。

以上、本研究を通じて得られた sapecin B の活性コア部分は、新しい抗菌剤のデザインにおける有用なリード化合物となると同時に、抗菌タンパク質の研究において新しい局面を開くきっかけになるものと考えている。さらに、このコア部分は、抗菌活性ばかりでなく  $K^+$  チャンネル阻害剤の研究においても有効なプローブとなる可能性を秘めていると考えられ、この方面での今後の進展にも期待が持たれる。



## < 1 > 使用微生物およびその培地

*E. coli* K12 594 (str ' ) は、東京大学薬学部微生物薬品化学教室で継代しているものを用いた。 *Streptococcus* 類は、*Streptococcus bovis* を除き、大阪大学菌学部浜田教授から分譲していただいた。 その他のバクテリアおよび酵母は、I F O (Institute of Fermentation of Osaka)、A T C C (American Type Culture Collection) から分譲されたものを用いた。 これらのバクテリアの培養には、基本的に、市販の antibiotic medium 3 (DIFCO) を使用した。

*Streptococcus* 属のバクテリアの培養には、市販の Brain Heart Infusion 培地を用いた。 酵母類の培養には、Sabouraud 培地を用いた。 その組成を以下に示す。

### < Sabouraud 培地 1000ml 中の組成 >

Glucose	40g
Poly Peptone(Daigo)	10g
<hr/>	
(pH 5.8 に調整)	

## < 2 > 抗菌活性の測定方法

### 1) 液体培養による抗菌アッセイ

(a) *E. coli* などに対する好氣的培養条件下でのアッセイ

Full growth した微生物菌体の 35% glycerol 保存液 (-20°C) 100  $\mu$ l を、5ml の増殖培地を含んだモノー試験管に接種し、37°C で約 4 時間振とう培養し、菌液の濁度 (OD<sub>650</sub>) が約 0.3 になるまで培養した。 遠心分離 (8000 rpm, 5 min., 4°C ; 日立高速冷却遠心機 20 PR-52, RPR20-3) により集菌し、buffer S\* に、OD<sub>650</sub> が 0.3 (約  $2.5 \times 10^8$  cells/ml) になるように浮遊させた。 そして、下記の方法に従い、OD<sub>650</sub> を測定す



ることにより供試菌の増殖を調べた。

sample in buffer S* containing 0.2 % BSA	200 $\mu$ l
Bacterial cell susp.(OD <sub>650</sub> =0.3)	10 $\mu$ l
antibiotic medium 3	190 $\mu$ l

↓

cultur with shaking at 37°C for 140 min.

↓

measure at OD<sub>650</sub>

\*: buffer S; 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0,  
containing 130 mM NaCl

(b) *Streptococcus* などに対する嫌氣的培養条件下でのアッセイ

Full growth した供試菌の 35% glycerol 保存液(-20°C)の 100  $\mu$  l を、スクリュー  
キャップ付き試験管( $\phi$  15mm)中の Brain Heart Infusion Medium 5ml に接種し、37°C  
で約 5 時間静地培養し、菌液の濁度(OD<sub>650</sub>)が約 0.3 になるまで培養した。遠心  
(8000 rpm, 5 min, 4°C; 日立高速冷却遠心機 20 PR-52, RPR20-3)により集菌し、buffer  
S\*に、OD<sub>650</sub>が約 0.3 になるように浮遊させた。そして、下記の方法に従い、  
OD<sub>650</sub>を測定することにより、供試菌の増殖を調べた。

Sample in buffer S*containing 0.2 % BSA	400 $\mu$ l
Bacterial cell susp.(OD <sub>650</sub> =0.3)	20 $\mu$ l
Brain Heart Infusion	380 $\mu$ l

↓

static cultur without shaking at 37°C for 180 min.

↓

measure at OD<sub>650</sub>

(c) 酵母など真菌類に対するアッセイ

Full growth した 微生物菌体の 35% glycerol 保存液 (-20°C) 100  $\mu$  l, を Sabouraud

培地 5ml に接種し、37℃で約 1 6 時間振とう培養した。遠心分離 (3000 rpm, 5 min., 4℃; 日立高速冷却遠心機 20 PR-52, RPR20-3) により集菌し、Sabouraud 培地に、OD<sub>650</sub> が 0.0336 (約 2.0x10<sup>5</sup> cells/ml) になるように懸濁させた。下記の方法に従い、OD<sub>650</sub> を測定することにより供試菌の増殖を調べた。

Sample in buffer S*containing 0.2 % BSA	400 $\mu$ l
Yeast cell susp.(OD <sub>650</sub> =0.0336)	400 $\mu$ l
<hr/>	
↓	
cultur with shaking at 37℃ for 18 hr.	
↓	
measure at OD <sub>650</sub>	

通常の抗菌活性は、特に断らない限り、供試微生物の増殖を 50% 阻害する時の抗菌タンパク質の濃度で表すこととし (ID<sub>50</sub>)、供試微生物の生育がまったく認められない時の濃度を、最少生育阻害濃度 (MIC) とした。

## 2) 活性染色による抗菌アッセイ

Hultmarkらの方法(37)に従って行った。すなわち、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動したゲルを角型シャーレ (栄研、滅菌 2号 角シャーレ) の中に入れ、予め 37℃ に暖めておいた中和 medium(\*1) 約 100ml を加え、37℃ で 30 分間インキュベートした。その後、中和 medium を捨て、48℃ に保温しておいた *E. coli* K-12 594 (Str<sup>B</sup>) を含む軟寒天培地(\*2)ゲルの上に重層した。軟寒天培地が、固化した後(約 3分)、さらに、バクテリアを含まない軟寒天培地を重層し、37℃、18時間培養し、バクテリアの生育阻害スポットを抗菌スポットとして検出した。写真撮影をした場合、黒いスポットとして観察される。

(\*1):中和 medium 調製法

Antibiotic medium 3 medium (Difco)	3.5g
0.2M Phosphate buffer, pH7.5	200ml

---

↓  
Dissolve well  
↓  
Autoclave (120°C, 20min)  
↓  
Add streptomycin (20mg)  
↓  
Incubate at 37°C

(\*2):軟寒天培地(0.7%) 調製法

Nutrient agar	0.7 g
0.2M phosphate buffer,pH7.5	100 ml

---

↓  
Dissolve well  
↓  
Autoclave (120°C, 20min)  
↓  
Add streptomycin (20mg)  
↓  
Add 1ml of *E. coli* K-12 594 suspension in Buffer S (OD<sub>650</sub> 0.3)  
↓  
Incubate at 48°C

< 3 > NIH-Sape4 の培養および培地

センチクバエ胚由来の培養細胞である NIH-Sape-4(58)は、国立林業試験場の三橋先生より供与していただいたものを、東京大学薬学部微生物薬品化学教室で継代培養したものをを用いた。この細胞を、以下に示すように、浮遊培養法で培養し、その培養上清を得た。2,000 ml のスピナフラスコ中で、50ml の condition medium を含む、M-M培地 (59) 450ml に、NIH-Sape-4 を  $5 \times 10^5$  cells/ml になるようにして浮遊させ、毎分 45回転で攪拌しながら、25°Cにて、5日間培養した。細胞濃度が、

4 x 10<sup>6</sup> cells/mlにまで増殖した後、遠心（3,000回転、10分、4℃）にて細胞を分離し、培養上清を得た。培養上清は、使用時まで -20℃にて冷凍保存しておいた。M-M培地は、以下に示す3種類の保存液培地を、使用時に、各々、同容量混ぜ、滅菌水を加えて、10倍希釈して使用した。

< 10 x A solution >

NaCl	35 g
KCl	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.3 g

---

↓  
Make upto 500 ml with distilled water  
↓  
Sterilize with membrane filter (pore size; 0.22 μm)

< 10 x B solution >

NaHCO <sub>3</sub>	0.6 g
--------------------	-------

---

↓  
Make upto 500 ml with distilled water  
↓  
Sterilize with membrane filter (pore size; 0.22 μm)

< 10 x C solution >

Glucose	20.0 g
Yeastlactate(DIFCO)	25.0 g
Lactalbumine hydrolysate(DIFCO)	32.5 g

---

↓  
Make upto 500 ml with distilled water  
↓  
Sterilize with membrane filter (pore size; 0.22 μm)

#### <4>バキュロウィルスベクター系の構築

##### 1) *Bombyx mori* Bm-N cell とその培養

Volkman と Goldsmith ら(60)によって樹立されたカイコ卵巣由来の細胞株である *Bombyx mori* Bm-N cell は、第一製薬(分子生物研)で継代されていたものを用いた。培地の TC-10 は、Gardiner と Stockdale らの方法(61)に従って調製した後、メンブランフィルター(pore size, 0.22  $\mu$ m)により除菌濾過し、56°C, 30分処理で非動化した牛胎児血清(Gibco)を 10%(v/v)、カナマイシンを 60mg/l 添加して用いた。

Bm-N cell の培養は、tissue cultur flask 中で 27°Cで行った。通常、4-5日で confluent culture となったため、これを5倍量の新しい培地に移し替えることで継代をおこなった。

##### 2) 組換えバキュロウィルスのクローニング

*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (T3 strain) DNA は、proteinase K 処理と phenol 処理によってウィルス顆粒から調製した。組換え型ウィルスの選択は、marker rescue 法(62)を用い、Bm-N cell への DNA の導入は、リン酸カルシウム共沈法(63)を用いた。すなわち、*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus DNA 2.5  $\mu$ g と組換え型 transfer vector 12.5  $\mu$ g を含む、0.25M CaCl<sub>2</sub> 溶液 1.5ml を調製した。この DNA 溶液を、0.28M NaCl と 0.7mM Na phosphate を含む 50mM HEPES buffer (pH7.1) 1.0ml に、空気を送りながら、ゆっくり滴下した。さらに、30分間室温で放置し、リン酸カルシウム-DNA 複合体を調製した。この複合体 0.45ml を、細胞密度  $1 \times 10^5$  cells/ml の Bm-N cell 培養液 4ml に加え、27°Cで1日培養した後、培

地を交換し、さらに、一週間培養を続けた。バキュロウィルスの感染によって Bm-N cell 中にポリヘドリン粒子の形成が確認されてから、その上清を回収し、限界希釈法(64)により、組換えウィルスのクローニングを行った。組換え型ウィルスは、顕微鏡観察によって、細胞内にポリヘドリン粒子を形成しないクローンを選択することによって選んだ。得られたクローンの上清を回収し、もう一度 Bm-N cell に感染させることで、さらに、ウィルスを純化した。この組換え型ウィルスを、confluent な Bm-N cell に感染させ、5日間培養した後、培養上清を遠心分離(2000rpm, 10min, 4°C)によって回収し、-80°C で保存した。このウィルス液を、sarcotoxin IA の生産やラジオイムノアッセイ用のサンプルとして用いた。

#### <5>ラジオイムノアッセイ

##### 1) 抗血清の調製

化学合成した sarcotoxin IA は、39個のアミノ酸残基からなる分子量の小さなタンパク質なので、Flyg, C.ら(65)の方法に従って、sarcotoxin IA をコーティングしたポリスチレンビーズ(C18)を用いて、albino rabbit を免疫した。2日後にもう一度免疫し、7日後に耳の静脈から採血し抗血清を得た。この抗血清は、sarcotoxin IA を用いたオクタロニーテストで沈降線を形成した。

##### 2) sarcotoxin IA の $^{125}\text{I}$ -標識

sarcotoxin IA は、分子中に Tyr を持たないため、Chisholm ら(66)の方法に従って、pH8.7 で chloramine T を用いて処理することによって  $^{125}\text{I}$ -標識を行った。すなわち、約  $5\mu\text{g}$  の sarcotoxin IA を  $20\mu\text{l}$  の 0.5M Na phosphate buffer, pH8.7 に溶解し、

0.5 mCi の  $\text{Na} \cdot ^{125}\text{I}$  と 1mg/ml の chloramine T を含む 0.5M Na phosphate buffer, pH8.7 を加え、室温で 1 分間反応させた。直ちに 2mg/ml  $\text{NaHSO}_3$  を  $100 \mu\text{l}$  と 2M NaI を  $10 \mu\text{l}$  を加えて反応を停止させた。次に、あらかじめ 0.2% BSA を含む 0.5M Na phosphate buffer で平衡化しておいた Sephadex G-10 カラム (0.8 x 26 cm) を用いて ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、free の  $^{125}\text{I}$  を取り除いた。flow through 画分に 溶出された放射能活性画分を  $^{125}\text{I}$ -sarcotoxin IA として回収し、使用時まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。なお、通常この操作で、約  $4 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$  protein の比放射活性をもつ sarcotoxin IA が得られた。また、この放射活性画分の放射活性は、HPLC 分析で、sarcotoxin IA とほぼ同じ保持時間の画分に溶出された。

### 3) *Staphylococcus aureus*, Cowan I の調製

東大薬学部微生物薬品化学教室で継代している Cowan I 用 *Staphylococcus aureus* を用いて、Kessler らの方法に従って調製した。

### 4) ラジオイムノアッセイ

PBS-storage buffer(\*1) で 40 倍希釈した sarcotoxin IA 抗血清  $10 \mu\text{l}$  と同じく PBS-storage buffer で希釈した 20,000 cpm の  $^{125}\text{I}$ -sarcotoxin IA  $10 \mu\text{l}$  を sarcotoxin IA の標品またはサンプルを 0 ~ 100ng を含む PBS-storage buffer  $500 \mu\text{l}$  に加え、 $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。次に、上記の方法で調製された *Staphylococcus aureus*, Cowan I 溶液を  $50 \mu\text{l}$  加え、氷上に 10 分間放置した。遠心分離によって、Cowan I の沈澱を回収し、 $750 \mu\text{l}$  の wash buffer I(\*2) で遠心分離によって洗浄した。さらに、同量の wash buffer II(\*3), wash buffer III(\*4) を用いて、それぞれ一回ずつ洗浄した。

得られた沈澱の radioactivity を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。

(\*1) PBS-storage buffer

Na azide	0.02g
Gelatin	0.1g
Triton X-100	1.0g
Distiled water	upto 100ml

(\*2) Wash buffer I

NaCl	29.2g
1M Tris-HCl(pH7.4)	10ml
Triton X-100	0.5g
Distiled water	500ml

(\*3) Wash buffer II

NaCl	4.0g
0.5M EDTA	5ml
1M Tris-HCl(pH7.4)	25ml
Triton X-100	5g
20% SDS	7.5ml
Distiled water	500ml

(\*4) Wash buffer III

1M Tris-HCl(pH7.4)	5ml
Triton X-100	0.5g
Distiled water	500ml

## < 5 > 電気泳動

### 1) 未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

未変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Gabrielの方法(67)に従った。ゲルのポリアクリルアミドは、10%の濃度で行った。泳動後のゲルは、抗菌活性測定のため活性染色を行った。



<ゲルの作成>

A solution(*1)	2.5 ml
B solution(*2)	3.3 ml
C solution(*3)	10.0 ml
DDW	4.2 ml

↓

pour into a slab gel plate (1 mm thickness)

↓

set a comb

↓

polymerization at room temperature

(\*1): A solution

1N KOH	24.0 ml
Acetic acid	8.6 ml
TEMED	2.0 ml
DDW	Up to 50 ml

(\*2): B solution

Acrylamide	30 g
Bis-acrylamide	0.4 g
DDW	Up to 50 ml

(\*3): C solution

APS	0.14g
DDW	Up to 50 ml

<電気泳動用バッファー>

$\beta$ -alanine	3.12 g
Acetic acid	0.8 ml
DDW	Up to 1000 ml

<サンプルの調整>

Sample	10 $\mu$ l
5 mg/ml methylgreen in 1 M acetic acid	5 $\mu$ l
50 % glycerol	25 $\mu$ l

<電気泳動条件>

200Vの一定電圧で、4℃にて3～4時間、(+)電極から(-)電極の方向に泳動した。

## 2) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Laemmli(68)の方法を少し改良した方法で行った。ゲルのポリアクリルアミドは15%の濃度で行った。

### <Separating Gel (15%)の作成>

44% acrylamide solution(*1)	10.1 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.78	7.5 ml
10% SDS	0.3 ml
10% APS	0.3 ml
TEMED	0.01 ml
DDW	11.8 ml

---

↓

Pour into a slab gel plate (thickness 1 mm)

↓

Overlay DDW on the top of separating gel

↓

Polymerization at room temperature

(\*1): 44% acrylamide solution;

acrylamide	22 g
bisacrylamide	0.6 g
DDW	Up to 50 ml

### <Stacking Gel (5%)の作成>

44% acrylamide solution	2.2 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.7 ml
10% SDS	0.2 ml
TEMED	0.01 ml
DDW	15.7 ml

---

↓

pour on the top separating gel

↓

set a comb

↓

polymerization at room temperature

< Sample の調製 >

sample	2vol
sample buffer(*1)	1vol

↓

stand in boiling watre for 5 min.

↓

cool to room temperature on ice

(\*1): sample buffer

10% SDS	300 $\mu$ l
$\beta$ -mercapto ethanol	60 $\mu$ l
50% glycerol	100 $\mu$ l
0.1% brome phenol blue	60 $\mu$ l
1.5M Tris-HCL, pH 6.8	30 $\mu$ l

< Electrophoresis buffer の調製 >

Tris	9 g
Glycine	28 g
10% SDS	10 ml
DDW	Up to 1,000 ml

< Electrophoresis condition >

stacking gel	75V
separating gel	150V
	at room temperature

< 6 > アミノ酸配列分析

HPLCにより得られた蛋白画分を、遠心型エバポレーターにてドライアップ後、気相式プロテインシークエンサー (model 477A, Applied Biosystem Inc.)を用いて、アミノ酸の配列を決定した。生じたPTH (phenylthiohydantoin)-アミノ酸誘導体は、Aquasil SEQ-4(K)(4x300 mm)のカラムを装着した Spectraphysics の HPLC システムを用いて同定した。尚、アミノ酸配列の同定は、東レ・リサーチセンター (株) へ依頼して行った。

### < 7 > アミノ酸組成分析

HPLCにより得られた蛋白画分を、遠心型エバポレーターにてドライアップ後、6N 塩酸に溶解し、110°Cで22時間加水分解した後、生じたアミノ酸をアミノ酸アナライザー(model 835, HITACHI Inc.)を用いて分析した。又、tylosine 及び carboxymethylcysteine の分解を防ぐ目的で、4% thioglycolic acid 存在下で塩酸加水分解を行った。尚、アミノ酸配列の同定は、東レ・リサーチセンター(株)へ依頼して行った。

### < 8 > 蛋白質中のSH基の定量

Ellmanら(69)の方法に従って行った。すなわち、5,5'-dithiobis-(2-nitro benzoate) (DTNB) を、蛋白質中のフリー SH基と反応させ、生じた 2-nitro-5-mercapto benzoic acid を 412 nm における吸収度を測定することで定量した。

約 4nmol の蛋白サンプルを 500  $\mu$ l の 0.02M EDTA  $\cdot$  2Na 溶液に溶解し、0.4M Tris-HCl buffer, pH8.9 250  $\mu$ l とよく混合した後、0.01M DTNB のメタノール溶液 25  $\mu$ l を添加し、直ちに OD<sub>412</sub> を測定した。検量線は、還元型グルタチオンを標準液として作成した。

### < 9 > リポソームの作成

Kinskyらの方法(70)に従い、グルコースを封入したマルチラメラベシクル型のリポソームを作成した。クロロホルム/メタノール混液に溶解している市販のリン脂質溶液(単独リン脂質又は、各種リン脂質の混合液)の約 1  $\mu$ mol をガラス試験管(クロロホルムで前もって5回洗浄したもの)に入れ、ロータリーエバポレー

ターを用いて、真空条件下で、乾燥させた。そして、あらかじめ 70-75°C に保温していた 0.3M のグルコース溶液 100  $\mu$ l を加えて、Vortex mixer にて、激しく 1 分間攪拌することで、グルコースを内包するマルチラメラリポソームを得た。次に、400  $\mu$ l の 5mM Veronal buffered saline(\*1) を用いて、遠心分離 (10,000 g, 10 min.) にて、リポソームを 3 回洗浄し、リポソームに取り込まれなかったグルコースを除去した。

そして、最終的に、500  $\mu$ l の同じ緩衝液にリポソームを浮遊させ、アッセイに用いた。また、リポソーム中のリン脂質量は、Chen らの方法(71)に従い、リポソーム中のリンの定量を行うことにより算出した。すなわち、pyrex のガラスチューブにリポソーム浮遊液を入れ、直火で乾燥させた。2.5% Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> のエタノール溶液 200  $\mu$ l を加え、直火で加熱し、灰化させた。次に、1N HCl を 900  $\mu$ l 加えた後、沸騰水浴中で 15min 加熱し、Ascorbic molybdate 混液(\*2) を 2.1 ml 加えて、45°C にて、20min 反応させ、820 nm の吸光度を測定した。検量線は、塩化カルシウム入りのデシケーター中で一晩乾燥させた KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を用いて作成した。

(\*1): 5mM Veronal buffered saline, pH 7.5

Barbital sodium	0.15 g
Barbital	0.23 g
NaCl	3.4 g
1.0 M CaCl <sub>2</sub>	60 $\mu$ l
1.0 M MgCl <sub>2</sub>	200 $\mu$ l
DDW	Up to 400 ml
(オートクレーブにて溶解)	

(\*2): Ascorbic molybdate 混液

0.84 % Ammonium molybdate	30 ml
2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 ml
10% Ascorbic acid	10 ml

### < 10 > リボソームの感受性の測定

グルコースを封入したリボソームに各種濃度のペプチドを添加し、リボソームより漏出してくるグルコース量を測定することにより、リボソームの各ペプチドに対する感受性を調べた。10 $\mu$ lのグルコース封入リボソーム懸濁液に、10 $\mu$ lの各種濃度のペプチド溶液(130mM NaClを含む10mM phosphate buffer(pH6.5))を加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。その後、リボソームから漏出したグルコースをGlicose C-Test kit (Wako chemical Co.)を用いて定量した。

リボソームに封入されたグルコースのトータル量は、リボソームをエーテルにて全量破壊した時のグルコース量から、リボソームとbuffer Sのみを反応させたときのグルコース量を差し引いた量とした。

### < 11 > ペプチドの合成

すべてのペプチドは、固相法(13)を用いてBoc-アミノ酸を原料として合成した。このとき、側鎖に官能基を持つアミノ酸は、適切な保護基で保護されたBoc-アミノ酸を用いた。すなわち、 $\epsilon$ -アミノ基は2-クロロベンジルオキシカルボニル基、水酸基はベンジル基、グアニジル基はトシル基、スルフヒドリル基はp-メチルベンジル基で保護されたアミノ酸を用いた。ペプチドの合成は、自動ペプチド合成機 (Applied Biosystems Inc., model 430A) を用いて、カルボキシル末端側から自動的に合成した。合成が終了後、フッ化水素で得られたペプチドの全保護基をはずすと共に、ペプチドを樹脂から切り離した。さらにこの粗ペプチドをHPLCで精製して合成ペプチドを得た。つまり、C18の逆相シリカゲルカラム

を用いて、トリフルオロ酢酸0.1%を含むアセトニトリル0-40%水溶液のグラディエント条件下で精製した。精製されたペプチドの純度はHPLCの検定で95%以上であり、十分に高い純度を有していた。また、ペプチドの配列は、エドマン分解してペプチドシーケンサー (Applied biosystem Inc., model 477A) により確認した。

### <12>溶血活性の測定

綿羊赤血球 (日本生物材料) 1 ml を低速遠心分離 (2000rpm, 5min) し、赤血球を集め、0.8 ml の PBS を用い、低速遠心分離で3回洗浄し、最終的にPBSで1 ml とした。この洗浄赤血球0.5 ml をPBSで10倍希釈した赤血球懸濁液25  $\mu$  l に希釈した各種ペプチドを添加し、37°Cで2時間保温した。上清20  $\mu$  l を静かに取り、PBSを80  $\mu$  l 添加した後、OD<sub>540</sub>を測定し、溶血活性測定した。コントロールとして溶血活性を持つことが知られている、ハチ毒メリチンの溶血活性も同時に測定した。また、溶血活性は、蒸留水で溶血させたときを100%活性とした。

### <13>ペプチドのmBBrによる蛍光標識

7R-17Kフラグメントは、monobromobimane (mBBr) を用いて、Faheyら (72)の方法に従って行い、そのmBBr誘導体は、逆相HPLCで精製した。すなわち、5mMのdiethylentriamin-N,N,N',N',N"-pentaacetic acid (DTPA) と2mMのmBBrを含む50mM HEPPS 40  $\mu$  l に、7R-17Kフラグメント1  $\mu$  mol を加え、遮光下、室温で10分間反応を行った後、2  $\mu$  l のmethanesulfonic acid を添加して反応を止めた。

目的のmBBr誘導体は、逆相HPLCによって精製して得た。すなわち、得られ

た反応液を、synchronapak RP-P カラムにアプライし、0.05% trifluoroacetic acid 溶液と、0.05% trifluoroacetic acid を含むアセトニトリル溶液を用いて、アセトニトリル 0-40% のリニアグラディエントにより溶出させた。得られた3つのメインピークのうち、mBBBr よりリテンションタイムの遅い新たに生じたピークを分取し、凍結乾燥した。この物質を蒸留水に溶解した後、さらに上記と同一条件で、リクロマトグラフィーにかけた。得られた物質を凍結乾燥後、蒸留水に溶解し4℃、暗所にて保存した。

#### < 1 4 > 蛍光標識した7R-17K フラグメントのリポソームへの結合活性の測定

0.3% bovine serum albumin (BSA) を含む Veronal-buffer 100 $\mu$ l 中で、各種リポソームと mBBBr で標識した 7R-17K フラグメント 0.42nmol を、37℃で、1 hr インキュベートした。その後、遠心分離(10,000 x g, 10 min) によってリポソームを回収し、0.3% BSA を含む Veronal-buffer 100 $\mu$ l で2度洗浄した。得られたリポソームを 100 $\mu$ l の Veronal-buffered saline に懸濁し、100 $\mu$ l の 20% Triton X-100 を加え、リポソームを溶解させ、0.9ml の Veronal-buffered saline を加えた。リポソームに結合した 7R-17K フラグメントに依存する mBBBr の蛍光は、蛍光分光光度計を用いて、excitation 385nm、emission 479nm の条件で測定した。

#### < 1 5 > ペプチドの界面活性性能の測定

ペプチドの界面活性性能の検定は、Harkins らの方法(73)に従って、ペプチド水溶液の表面張力を測定することによって行った。すなわち、ペプチド、または、対照として sodium dodecyl sulfate (SDS) を、蒸留水に、0.154mM の濃度で溶解した。



これらの水溶液の温度が25°Cで一定になった後、精密電気天秤に接続したブリヂナリングを用いて表面張力を測定した。

- 1) H. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 2) K. H. G. Oelkers and G. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 475 (1944).
- 3) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 4) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 5) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 6) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 7) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 8) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 9) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 10) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 11) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 12) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 13) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 14) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 15) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 16) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 17) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 18) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 19) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 20) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 21) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).
- 22) K. H. G. Oelkers, *Zellulosechem.*, **25**, 486 (1944).

<参考文献>

- 1) Wago,H.(1980) Appl. Ent. Zool., 15, 489-491
- 2) Ratcliffe,N.A. and Gagen,S.J.(1976) J. Invertebr. Pathol., 28, 373- 382
- 3) Ennesser,C.A. and Nappi,A.J.(1984) J. Ultrastruct. Res., 87, 31-45
- 4) Natori,S.(1977) J.Insect Physiol., 23, 1169-1173
- 5) Hultmark,D.,Steiner,H.,Rasmuson,T., and BomanH.G.(1980) Eur. J. Biochem. 106, 7-16
- 6) Steiner,H.,Hultmark,D.,Engstrom,A.,Bennich,H., and Boman,H.G. (1981) Nature, 292, 246-248
- 7) Hultmark,D.,Engstrom,A.,Andersson,K.,Steiner,H.,Bennich,H., and Boman,H.G.(1983) EMBO J. 2, 571-576
- 8) Okada,M., and Natori,S.(1985) J. Biol. Chem. 260, 7174-7177
- 9) Ando,K.,Okada,M., and Natori,S.(1987) Biochemistry 26, 226-230
- 10) Baba,K.,Okada,M.,Kawano,T., and Natori,S.(1987) J. Biochem. 102, 69-74
- 11) Matsuyama,K., and Natori,S.(1988) J. Biol. Chem. 263, 17112-17116
- 12) Dimarcq,J.L.,Keppi,E.,Dunbar,B.,Lambert,J.,Reichhart,J.M.,Hoffmann, D.,Rankine,S.M.,Forthegill,J.E.,and Hoffmann,J.A.(1989) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 86,262-266
- 13) Bulet,P.,Cociancich,S.,Dimarcq,J.L.,Lambert,J.,Reichhart,J.M., Hoffmann,D.,Hetru,C., and Hoffmann,J.A.(1991) J.Biol.Chem. 266, 24520-24525
- 14) Komano,H.,Mizuno,D.,and Natori,S.(1980) J.Biol.Chem. 255, 2919-2924
- 15) Komano,H.,Mizuno,D.,and Natori,S.(1981) J.Biol.Chem. 256, 7087-7089
- 16) Vogel,G.,Thilo,L.,Schwarz,H.,and Steinhart,R.(1980) J.Cell.Biol. 86, 456-460
- 17) Anderson,R.S.,Day,N.K.B.,and Good,R.A.(1972) Infect.Immun. 5, 55-59
- 18) Noguchi,A.,Baba,A.,and Tamura,S.(1981) Dev.Comp.Immunol. 5, 111-116
- 19) Matsumoto,N.,Okada,M.,Takahashi,H.,Qu,X.-M.,Nakajima,Y., Nakanishi, Y., Komano,H.,and Natori,S.(1986) Biochem. J., 239, 717-722
- 20) Matsuyama,K., and Natori,S.(1988) J.Biol.Chem. 263, 17117-17121
- 21) Matsuyama,K., and Natori,S.(1990) J. Biochem. 108, 128-432
- 22) Okada,M., and Natori,S. (1983) Biochem.J. 211, 724-734

- 23) Okada,M., and Natori,S. (1985) *Biochem.J.* 229 , 153-458
- 24) Komano,H., and Natori,S.(1985) *Dev.Comp.Immunol.* 9 , 31-40
- 25) Nakajima,Y.,Qu,X.-M.,and Natori,S.(1987) *J.Biol.Chem.* 262 , 1665-1669
- 26) Selsted,M.E.,Szklaresk,D.,and Lehrer,R. (1984) *Inf.Immun.* , 45 , 150-154
- 27) Selsted,M.E.,Brown, D.M., DeLange, R.J., Harwig, S.S.L. and Lehrer, R.I. (1985) *J. Biol. Chem.* 260 , 4579-4584
- 28) Carroll,S.F.,and Martines,R.J. (1981) *Biochemistry*, 20 , 5973-5981
- 29) Zasloff, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 , 5449-5453
- 30) Lee,J-Y.,Boman,A.,Chuanxin,S.,Andersson,M.,Jornvall,H.,Mutt,V.,and Boman,H.G. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 86 , 9159-9162
- 31) Yamada,K.,and Natori,S. (1990) *Biochem. J.* 272 , 633-636
- 32) Yamada,K.,and Natori,S. (1993) *Biochem. J.* 291 , 275-279
- 33) Miller,C.,Moczydlowski,E.,Latorre,R., and Phillips,M.(1985) *Nature* 313 , 316-318
- 34) Bontems,F.,Roumestand,C.,Boyot,P.,Gilquin,P.,Doljansky,Y.,Menez,A., and Toma,F. (1991) *Eur. J. Biochem.* 196 , 19-28
- 35) Yamada,K.,and Natori,S. (1994) *Biochem. J.* 298 , 623-628
- 36) Horiuchi,T.,Marumoto,Y.,Saeki,Y.,Sato,Y.,Furusawa,M.,Kondo,A.,and Maeda,S. (1987) *Agric.Biol.Chem.* 51 , 1573-1580
- 37) Hultmark,D.,Steiner,H.,Rasmuson,T.,and Boman,H.G. (1980) *Eur.J.Biochem.* 106 , 7-16
- 38) Hirashima,S.,Horikoshi,N.,Sekimizu,K.,and Natori,S.(1989) *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 160 , 1093-1099
- 39) Maeda,S., Kawai,K., Obinata, M.,Chika, T.,Horiuchi,T., Saeki,Y., Sato,Y., and Furusawa,M. (1985) *Nature(London)* 315 , 592-594
- 40) Lambert,J.,Keppi,E.,Dimarcq,J-L.,Wicker,C.,Reichhart,J-K., Dunbar,B., Lepage,P.,Dorsselaer,A.V.,Hoffmann,J.,Forthergill,J.,and Hoffmann,D. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86 , 262-266
- 41) Fujiwara,S., Imai,J., Fujiwara, M., Yaeshima,T., Kawashima,T., and Kobayashi, K. (1990) *J.Biol.Chem.* 265 , 11333-11337
- 42) Kanai,A., and Natori,S. (1989) *FEBS Letts.* 258 , 199-202
- 43) Kanai,A., and Natori,S. (1990) *Mol.Cell.Biol.* 10 , 6114-6122
- 44) Kuzuhara,T.,Nakajima,Y.,Matsuyama,K.,and Natori,S. (1990) *J.Biochem.* 107 , 514-518
- 45) Hanzawa,H.,Shimada,I.,Kuzuhara,T.,Komano,H.,Kohda,D.,Inagaki,F., Natori,S.,and Arata,Y. (1990) *FEBS Letts.* 269 , 413-420

- 46) Bontems,F., Roumestand,C., Gilquin,P., Menez,A., and Toma, F.(1991) *Science* 254 , 1521-1523
- 47) Gimenez-Gallego,G., Navia,M.A., Reuben,J.P., Katz,G.M., Kaczorowski, G.J., and Garcia,M.L. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 85 , 3329-3333
- 48) Arseniev.A.S., Kondakov, V.N., Maioeov, V.N., Bystrov,V.F. (1984) *FEFB Lett.* 165 , 57-62
- 49) Darbon, H.,Weber, C., Braun, W (1991) *Biochemistry* 30 , 1836
- 50) Ji, Y-H., Hsu, K., Kim, U. Y., and Terakawa, S. (1988) *Comp. Biochem. Physiol. C* 90 , 237-240
- 51) Fink,J., Merrifield,R.B., Boman,A. and Boman. H.G. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 , 6260-6267
- 52) Wada, D., Boman, A., Wahlin, B., and Merrifield,R.B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 , 4761-4765
- 53) Boman, H.G., Wada, D., Boman, I.A., Wahlin, B. and Merrifield,R.B. (1989) *FEBS Lett.* 259 , 103-106
- 54) Rosenthal, G. A., Lambert, J. and Hoffmann, D. (1989) *J. Bio;. Chem.* 264 , 9768-9771
- 55) Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T.,Tokunaga, F. Muta, T. and Iwanaga, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 , 16709-167163
- 56) Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.-Q., and Cullor, J.S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 , 4292-4295
- 57) Romeo,D., Skerlavaj,B., Bolognesi, M., and Gennaro, R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 , 9563-9575
- 58) Takahashi, M., Mitsuhashi, J., and Ohtaki, T. (1980) *Dev. Growth Differ.* 22 , 11-19
- 59) Mitsuashi, J., and Maramorasch, K. (1964) *Contrib. Boyce. ThompsonInst.* 22 , 435-460
- 60) Volkman, L. E., and Goldsmith, P. A. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 44 , 227
- 61) Gardiner, G. R., and Stockdale, H. (1975) *J. Invertebr. Pathol.*, 16, 284
- 62) Pennock, G. D., Shoemaker, C., and Miller, L. K., (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 399
- 63) Burand, J. P., Summers, M. D., and Smith, G.E., (1980) *Virology* 101 , 286
- 64) Liu, O.C., and Henle, W. (1953) *J. Exp. Med.*, 97 , 889
- 65) Flyg, C., Dalhammar, G., Rasmuson, B. and Boman, H. G. (1987) *Insect Biochem.* 17 , 153-160

- 66) Chisholm, D.J., Young, J.D., and Lazarus, L. (1969) *J. Clin. Invest.* 48 , 1453-1460
- 67) Gabriel, O. (1971) *Methods Enzymol.* 22 , 565-578
- 68) Laemmli, U.K. (1970) *Nature(Lond.)* 227 . 680-685
- 69) Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82 , 70-77
- 70) Kinsky, S. C., Haxby, J. A., Zopf, D. A. Alving, C. R., and Kinsky, C. B. (1969) *Biochemistry*, 8, 4149-4158
- 71) Chen, P. S., Toribara, Y. Y., and Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28 , 1756-1758
- 72) Fahey, R. C., Newton, G. L., and Kosower, E. M. (1981) *Anal. Biochem.* 11 , 357-365
- 73) Harkins, W. D. and Jordan, H. F. (1930) *J. Am. Chem. Soc.* 52 , 1751-1758
- 74) Iizuka, K., Kamijo, T., Harda, H., Akahane, K., Kubota, T., Umeyama, T., Kiso, Y. (1990) *J. Med. Chem.*, 33 , 2707
- 75) Harada, T., Iyobe, A., Ysubaki, A., Yamaguchi, K., Hirata, T., Kamijo, T., Iizuka, K., and Kiso, Y. *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. I*, 1990 , 2497
- 76) Doi, M., In, Y., Inoue, M., Ishida, K., Iizuka, K., Akahane, K., Harada, H., Umeyama, Y., and Kiso, Y. *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. I*, 1991 , 1153
- 77) Kiriyama, A., Mimoto, T., Kisanuki, ., Kiso, Y., and Takada, K. (1993) *Biopharm., Drug Disp.* 14 , 199
- 78) Kiriyama, A., Mimoto, T., Kisanuki, S., Kiso, Y., and Takada, K. (1993) *Biopharm., Drug Disp.*, 14 , 697
- 79) Yamamura, Y., Ogawa,H., Chihara, T., Kondo, K., Onogawa, T., Nakamura, S., Mori, T., Tominaga, M., and Yabuuchi, Y. (1991) *Science*, 252 , 572
- 80) Yamamura, Y., Ogawa,H., Yamashita, H., Chihara, T., Miyamoto, H., Nakamura, S., Onogawa, T., Yamashita, T., Hosokawa, T., Mori, T., Tominaga, M., and Yabuuchi, Y. (1992) *J. Pharmacol.* 105 , 787

## <謝 辞>

本研究を進めるにあたり、常に適切な御指導と篤厚な御助言を賜り、本論文発表の機会を与えてくださいました東京大学薬学部微生物薬品化学教室 名取俊二教授に深い謹敬と心からの感謝を申し上げます。

また、常に有益な御教示、御助言をいただきました九州大学薬学部 関水和久教授、東京大学薬学部微生物薬品化学教室 駒野宏人（前）助手、久保健雄講師に深く感謝いたします。

そして、直接研究の進め方について御教示いただきました 掘越信夫博士、中島由紀氏を初め、多くの有益な討論、教唆をいただきました東京大学薬学部微生物薬品化学教室の皆様にご心から謝意を表します。

口腔内細菌を提供してくださいました大阪大学歯学部 浜田茂幸教授、メチシリン耐性菌の供与に御尽力下さいました塩野義製薬株式会社 野村和秀氏に厚くお礼申し上げます。

また、東京大学薬学部微生物薬品化学教室で研究する機会を与えて下さいました、東レ株式会社 城内宏 専務取締役、(財)東レ科学振興会 故児玉宏専務理事、東レ株式会社 今村伸三 ケミカル研究所主幹、四本喬介 技術センター主幹、田中千秋 知的財産部部長、藤田尚 医療システム研究所所長に心から感謝の意を表します。



Kodak  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8  
inches 1 2 3 4 5 6 7 8

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

