

博士論文

LPS に誘導される炎症を抑制する新規化合物
ペドペプチン、オギペプチンの発見と作用機序の解析

中島（上妻） 志保

目次

略語	2
緒言	3
第一章 LPS 阻害剤の探索	12
1.1 材料と方法	13
1.2 結果	16
1.2.1 LPS の結合に関する検討	16
1.2.2 LPS 阻害剤の探索	20
1.2.3 LPS 阻害剤の構造決定	33
1.3 考察	42
第二章 ペドペプチン、オギペプチンの生物活性	48
2.1 材料と方法	49
2.2 結果	51
2.2.1 LPS の結合におよぼす影響	51
2.2.2 細胞の LPS 応答におよぼす影響	53
2.2.3 細胞障害活性	54
2.2.4 マウス急性毒性	55
2.2.5 マウス <i>in vivo</i> 薬効試験	56
2.3 考察	57
第三章 ペドペプチン、オギペプチンの作用解析	60
3.1 材料と方法	61
3.2 結果	63
3.2.1 サイトカイン産生系における選択性評価	63
3.2.2 表面プラズモン共鳴法による LPS への結合試験	65
3.2.3 LPS と LBP の相互作用におよぼす影響	67
3.3 考察	69
第四章 ペドペプチン、オギペプチンの抗菌活性	72
4.1 材料と方法	73
4.2 結果	74
4.3 考察	76
第五章 構造と活性に関する考察	78
総括	82
引用文献	86
要旨	92
公表論文	97
謝辞	98

略語

CD14	cell differentiation 14
Dab	diaminobutyric acid
Dap	diaminopropionic acid
DEPT	distorsionless enhancement by polarization transfer
Dhb	dehydrobutyrine
DIC	disseminated intravascular coagulation 播種性血管内凝固
ED ₅₀	50% effective dose
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GC	gas chromatography
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	hetero-nuclear single quantum coherence
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ICU	intensive care unit 集中治療室
IL	interleukin
Kd	dissociation constant 解離定数
LALF	<i>Limulus</i> anti-LPS factor
LBP	LPS-binding protein
LPS	lipopolysaccharide
MIC	minimum inhibitory concentration
MFI	mean fluorescenc intensity
MS	mass spectrometry
NOE	nuclear overhauser effect
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PMB	polymyxin B
PRR	pattern recognition receptor
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TMS	trimethylsilyl
TOCSY	totally correlated spectroscopy
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α

緒言

古来から人類は、微生物と共存し利用してきた一方で、感染に起因する疾病に苦しめられてきた。ときには歴史や文化さえも影響を受けてきたと言える。

感染に苦しめられてきたのは人類だけではなく、植物、単細胞生物から高等生物にまで至る。生物は、感染した微生物を排除して生き延びるために、自然免疫系と称される体内の防御機構を備えるに至った。自然免疫とは、感染した微生物の構成成分を認識し、液性因子や細胞を活性化誘導することで感染微生物を排除するシステムである。

自然免疫系によって認識される微生物構成成分は pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と総称され、微生物に由来する膜成分や核酸などが該当する。PAMPs をリガンドとして認識し結合する受容体が pattern recognition receptors (PRRs) であり、PRRs を介して感染を察知した細胞は細胞内・細胞間シグナル伝達を経て、サイトカイン産生による免疫細胞の活性化や、ケモカイン産生による免疫細胞誘引などを惹起する。その結果、感染微生物の貪食、感染細胞の殺傷を経て、感染を収束させる。

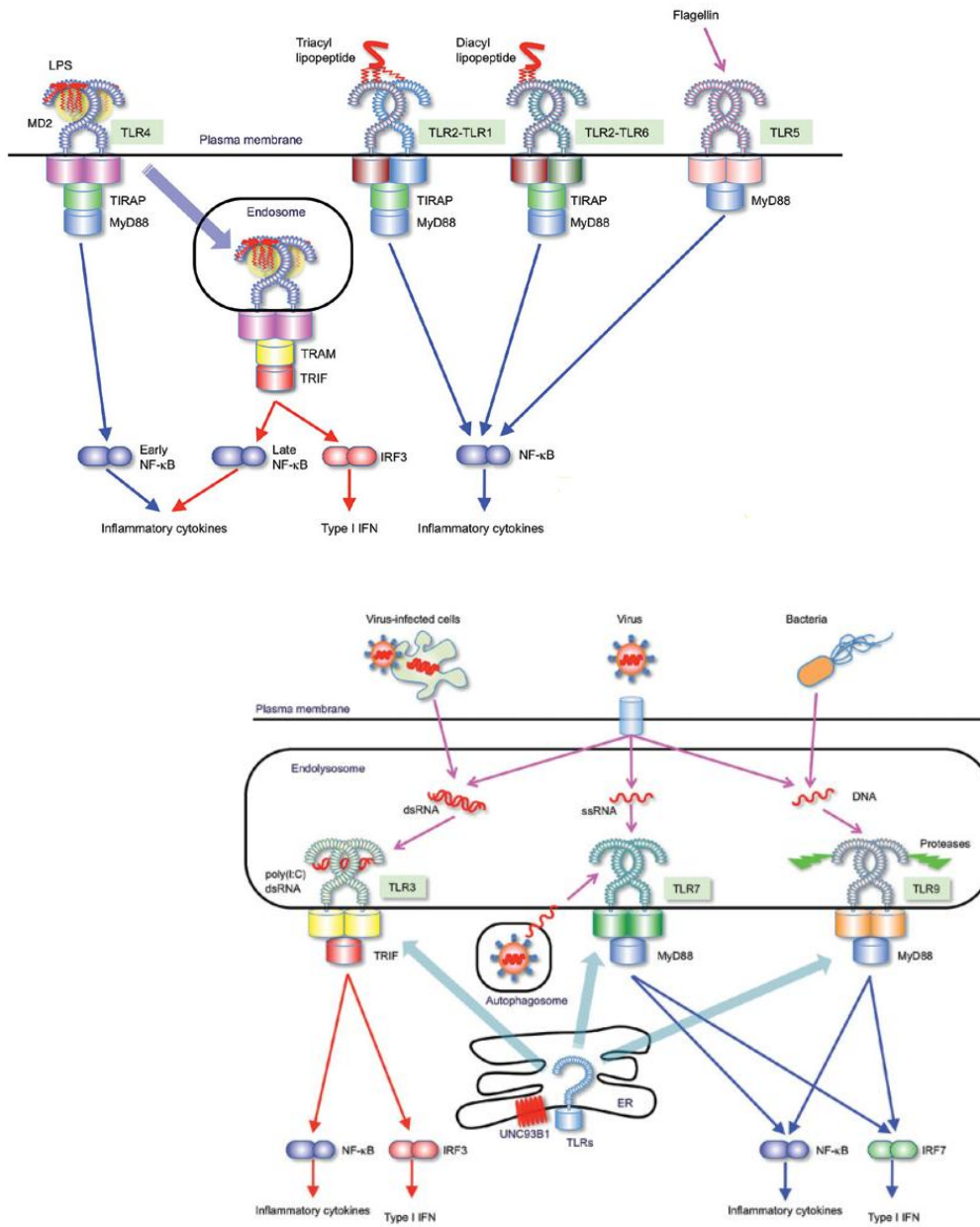
高等生物においては、自然免疫系に加えて、生体内の「非自己」を認識する獲得免疫系も発達した。獲得免疫系においては、外来成分（抗原）の感作により、免疫細胞がきわめて特異的な応答能を獲得する。しかし、特に微生物感染のような状況では、自然免疫系による迅速かつ強力な生体防御が重要な機能を果たしている。

近代に至り、人類は、感染との戦いのために免疫システム以外の武器を獲得した。それは、抗生物質を始めとする薬剤である。しかし、感染症患者にとって抗生物質の投与が病態の悪化を引き起こすことがある。この場合、抗生物質によって殺菌された死菌体から大量の PAMPs が体内に放出され、それに対する過剰な免疫応答が誘導されると、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1、6 などが分泌され、全身性の炎症状態となる¹ (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。その結果、微小血管などの組織障害に血圧低下や血液凝固異常である播種性血管内凝固 (DIC) などが加わることで多臓器機能不全状態・ショック状態に至ることがある (敗血症、敗血症ショック)。

敗血症は、「感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害」と定義される。2013年に日本集中治療医学会から報告された2007年の調査結果²によると、重症敗血症および敗血症性ショックと診断された症例の集中治療室 (ICU) における死亡率は30.8%であった。世界でも敗血症と診断された症例のICU死亡率は25.8%と報告されている³。死亡者数としては、日本で1.1万人(2010年)⁴、米国で21万人(2007年)⁵にのぼる。本来は宿主を感染菌から守るための自然免疫系は、時として宿主の生命を脅かすことになる。

2007年の調査²における敗血症治療の登録項目は、抗菌薬、免疫グロブリン製剤、ステロイド、持続的血液濾過透析、ポリミキシン B 固定化繊維充填カラム吸着療法、選択的腸管内除菌、経腸栄養、輸血となっている。これらが標準治療に含まれると考えられるが、死亡率の高さが示すように、敗血症治療薬のアンメットメディカルニーズは高い。現在までに、抗TNF- α 抗体やNO阻害剤などの炎症状態を標的とした薬剤や、抗血液凝固剤などのDICに対する薬剤あるいは治療法の開発が試みられてきた。しかしながら、いずれも死亡率の有意な低下などの明確な治療効果を得るには至っていない。

敗血症の病態に寄与し得る自然免疫系のリガンド-受容体-シグナル伝達分子に関しては、2000年前後に次々に解明された⁶(図1)。感染にかかわるPAMPsとPRRsには以下のようなものを挙げるができる。グラム陰性菌の外膜成分であるlipopolysaccharide (LPS)はToll-like receptor (TLR) 4に⁷、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンにTLR2に⁸、マイコプラズマや細菌などのリポペプチドはTLR2/6やTLR2/1に⁹、鞭毛由来タンパク質フラジェリンはTLR5に¹⁰細胞表面上で認識される。そのシグナルは細胞内に伝達され、TNF- α やタイプIインターフェロンなどを産生誘導して免疫を活性化する。ウィルスや細菌由来の核酸であるdsRNA、ssRNA、非メチル化CpG DNAは、エンドソームに発現するTLR3、7、9に認識され、主としてタイプIインターフェロンを誘導する^{11、12、13}(図1)。いずれの受容体も、細胞内にToll/interleukin-1 receptor (TIR) ドメインと称される配列を有しており、TIRドメインを有する細胞内アダプタータンパク質であるMyD88やTIR-domain-containing adapter inducing interferon- β (TRIF) と会合することでシグナル伝達を活性化する^{14、15、16}。



Nat. Immunol. **11**, 373-384 (2010)

Figure 1 Innate immune system.

これら種々のリガンド-受容体の中でも、LPS の炎症応答惹起能、すなわちエンドトキシン(内毒素)としての作用はきわめて強いことが知られる。宿主側は微量の LPS を検出すると、種々のサイトカイン、ケモカインを産生し、他の細胞の活性化も誘導して炎症反応を増幅する。敗血症の起因菌の内訳としては、先の日本集中治療医学会²によると、表1のように報告されている。上位5位までのうち *Staphylococcus aureus* 以外はグラム陰性菌で、グラム陰性菌は全体の約半数を占めている。グラム陰性菌の感染に起因する敗血症では、LPS が敗血症の起因物質となることが多い¹。

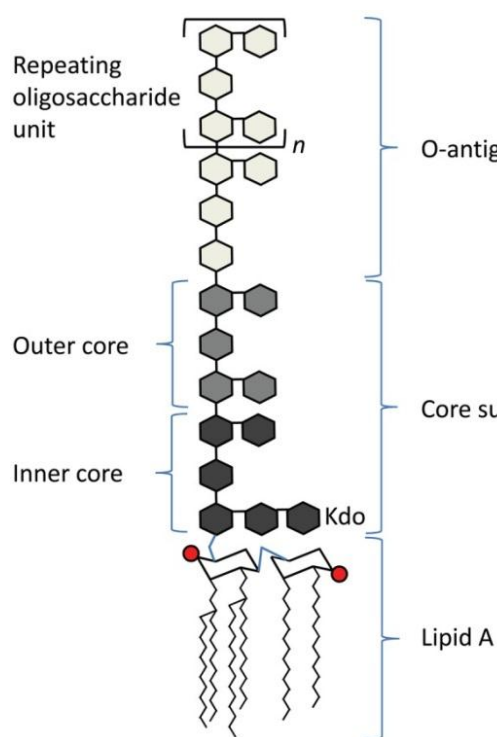
Table 1 Microorganisms isolated in patients with severe sepsis and septic shock

日集中医誌 20, 329-334 (2013)

	No. (%)
MRSA	41 (15.4)
<i>Escherichia coli</i>	36 (13.5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28 (10.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28 (10.5)
MSSA	24 (9.0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	20 (7.5)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16 (6.0)
<i>Enterococcus faecalis</i>	15 (5.6)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12 (4.5)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 (3.8)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9 (3.4)
<i>Candida non-albicans</i>	6 (2.3)
<i>Candida albicans</i>	4 (1.5)
<i>Bacteroides fragilis</i>	4 (1.5)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4 (1.5)
<i>Acinetobacter</i> species	4 (1.5)
<i>Serratia marcescans</i>	2 (0.8)
<i>Haemophilis influenzae</i>	1 (0.4)
<i>Aeromonas</i> species	1 (0.4)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 (0.4)

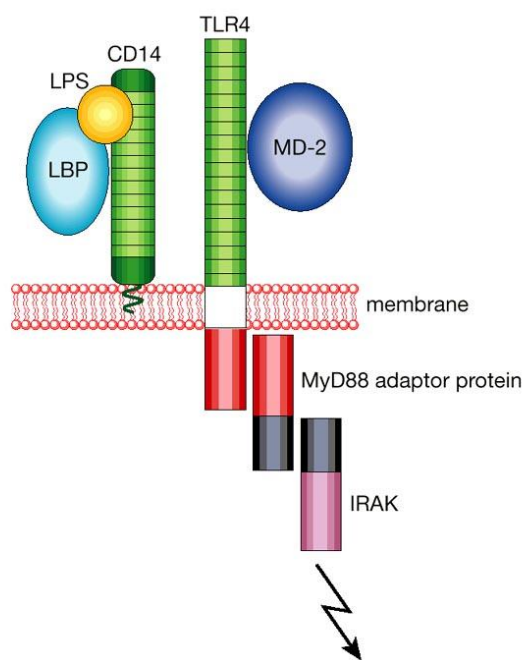
MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*.

LPS はリピド A、コア多糖、O 抗原で構成されており (図 2)¹⁷、リピド A 部分が LPS の作用の中核を担っている。LPS は、血清存在下では LPS-binding protein (LBP) と結合しており、可溶性あるいはグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) で膜にアンカリングしている膜型 CD14 との相互作用を介して細胞表面上の TLR4 と MD-2 の複合体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する^{18, 19, 20, 21, 22} (図 3)²³。LPS-LBP-CD14 複合体を形成することで、LPS は低濃度で細胞を活性化できると報告されている²⁴。



Front. Cell. Infect. Microbiol. **3**, 3 (2013)

Figure 2 Structure of lipopolysaccharide.



Nature **406**, 782-787 (2000)

Figure 3 LPS receptor complex.

敗血症の病態に対する寄与が大きいと考えられる LPS に対して、その作用すなわち LPS シグナルを抑制する薬剤があれば、グラム陰性菌に起因する敗血症の治療薬として有望である。LPS に誘導される細胞の活性化を抑制する手段としては、LPS に結合して作用を中和する、LPS の受容体をブロックする、細胞内シグナルカスケードをいずれかの段階で阻害する、放出されたサイトカインやケモカインをトラップするあるいはその受容体をブロックする、など複数挙げられる。現在までに、これらのステップに着目し、SIRS、敗血症、敗血症ショック症状を治療するための努力がなされてきた。しかし、前述のように、誘導された炎症反応や DIC に対処する薬剤は、明確な治療効果をもたらしていない。その理由として、LPS が引き金をひいた後の種々の反応は協調し増強し合うため、コントロールするのは容易ではないためと考えられる。よって、LPS の作用の上流を標的として免疫活性化を抑制するには、LPS が標的細胞である単球、マクロファージや上皮細胞など²⁵に結合する段階を薬剤で抑えることが効果的であると推測される。

この戦略にあてはまる前例として、LPS アンタゴニスト、LPS 吸着剤による除去療法が挙げられるが、上市に至らなかったか、限定的な効果しか得られていない。例えば、LPS の結合阻害剤として開発が試みられたエリトランは、リピド A 部分のアナログとして合成された物質であり、TLR4 に対するアンタゴニスト作用を有する²⁶が、臨床第三相試験でエンドポイントに見合う結果が得られず開発中止となった²⁷。リピド A アナログアンタゴニストは、LPS 濃度が高い環境では拮抗阻害作用が減弱することがわかっており、有効性を示せなかった一因であると推察される。他の例としては、図 4 に示すポリミキシン B (PMB) を挙げることができる。PMB は LPS に結合して LPS の作用を中和する環状リポペプチドであり、1947 年に *Bacillus polymyxa* (現在は *Paenibacillus polymyxa* として知られる) の培養液から、抗菌活性を指標に単離された²⁸。LPS はグラム陰性菌の外膜構成成分であることから、PMB は膜に結合してその構造を不安定化することで、抗菌活性を発揮すると考えられている²⁹。PMB は LPS の病原性作用を動物モデルなどで強力に阻害する^{30, 31, 32}が、腎毒性および神経毒性を有する³³ことから、局所での使用しか認められていない。

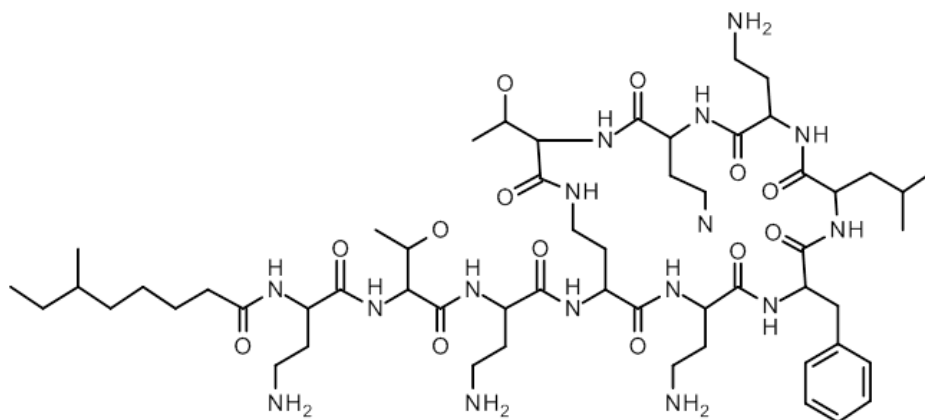
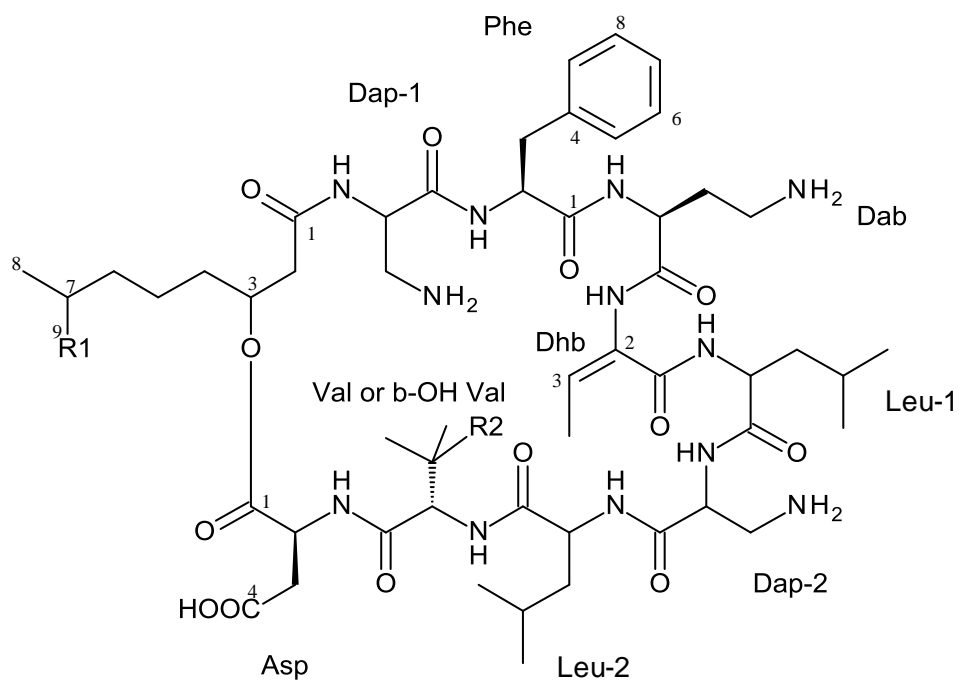


Figure 4 Structure of polymyxin B.

以上の作用点に関する知見、過去の開発情報を踏まえ、本研究では LPS の結合段階に着目し、拮抗作用によらない阻害剤を探索することとした。スクリーニングソースとしては天然物を選択し、特に微生物サンプルからの探索をおこなった。なぜならば、LPS に結合する抗生物質である前述のポリミキシン類やグラミシジン類などが、微生物の二次代謝産物より発見されているからである^{28, 34}。いずれも LPS 結合活性が報告されているが、抗菌活性を指標に見出されたペプチド性の抗生物質である。LPS 結合阻害に着目して新たに微生物サンプルからの探索をおこなうことで、構造面および活性面で新しい化合物を得ることを目指した。

上記のような考察に基づいて研究を実施した結果、効率的な LPS 阻害剤のスクリーニング系の構築に成功した。さらに新規化合物であるペドペプチン (図 5) とオギペプチン (図 6) を発見するに至った。これらの化合物は LPS によって引き起こされる自然免疫応答を強力に抑制し、炎症応答を抑制する薬効を有することが明らかとなった。本学位論文では、これらの研究成果について述べる。



pedopeptin A (1)	$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OH}$
pedopeptin B (2)	$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$
pedopeptin C (3)	$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$

Figure 5 Structures of pedopeptins.

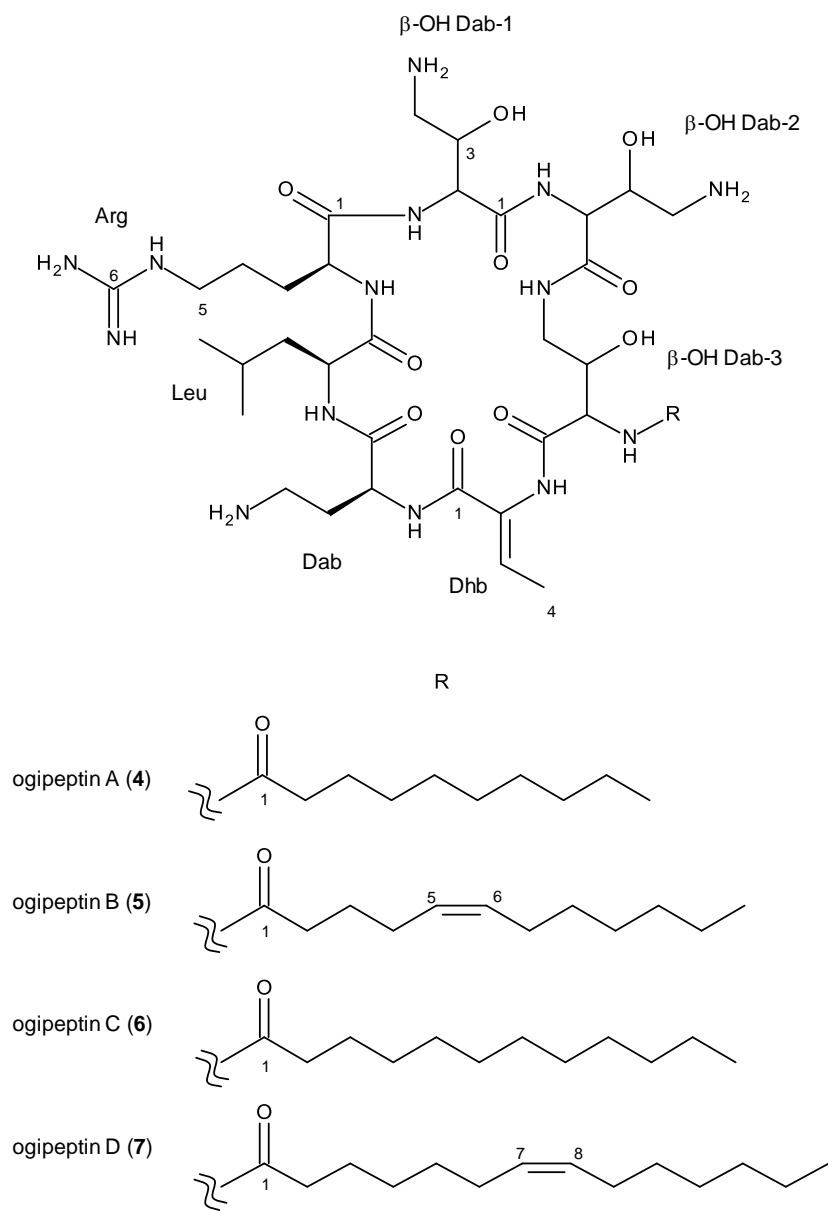


Figure 6 Structures of ogipeptins.

第一章 LPS 阻害剤の探索

小序

LPS の細胞への結合を阻害する化合物を探索する目的で、ランダムスクリーニングに利用可能な評価系を構築した。まず始めに、LPS が生体に認識される第一段階である細胞への結合には、CD14 が大きく寄与することをフローサイトメトリーで確認した。そこで、LPS と CD14 の相互作用を検出するアッセイ系の構築を検討し、LPS と CD14 の相互作用を蛍光共鳴エネルギー遷移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) で検出する評価系の構築に成功した。本系を用い、微生物サンプルを対象に結合阻害剤のハイスループットスクリーニングを実施した。その結果、2 株の細菌培養液中に阻害活性を検出した。それぞれの活性物質の単離、精製をおこない、構造決定の結果、2 系統のペプチド性新規物質であることを見出し、環状デプシペプチドをペドペプチン A、B、C、環状ペプチドをオギペプチン A、B、C、D と命名した。

1.1 材料と方法

LPS 阻害剤アッセイ系の構築

Escherichia coli (*E. coli*) J5 由来の LPS はシグマアルドリッチより購入し、ビオチン化した。ストレプトアビジン標識した XL665 (ストレプトアビジン-XL665) はシスバイオより購入した。LANCE Europium (ユーロピウム) 標識した抗 c-myc 抗体はパーキンエルマーより購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)-LPS (*E. coli* O111:B4)、PMB はシグマアルドリッチより購入した。HEK293T (CRL-3216) 細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。C 末 myc タグヒト CD14 タンパク質は、COS-7 細胞に CD14-myc 発現プラスミドを一過性導入し、無血清培地に交換して 3 日間培養後上清を回収してタンパク質溶液として用いた。タンパク質の発現は、myc タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより目的分子量の産物が検出されたことで確認した。プロテアーゼ阻害剤 Complete mini はロシュより購入した。

ビオチン化 LPS の調製方法

LPS (1 mg) を 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) に溶解し、1 mL の 10 mM NaIO₄ 溶液で氷上にて遮光で酸化した。30 分後、2 mL のグリセロールを添加して反応を停止した。続いて分子量 8,000 カットオフ膜を用い、PBS 中で 4°C にて透析した。次に、0.1 mL の 50 mM biotin-LC-hydrazide (ピアース) を添加し、2 時間、室温で緩やかに攪拌しながらインキュベートした。反応物は 4°C で透析し、ビオチン化 LPS とした。

フローサイトメトリー

FITC 標識した LPS (FITC-LPS) の細胞表面への結合をフローサイトメトリーで検出した。HEK293T 細胞への遺伝子導入は Lipofectamine 2000 (インビトロジェン) を用いた。10% ウシ胎仔血清 (FBS) 添加 DMEM 培地 (インビトロジェン) 中で、CO₂ インキュベーター内で 2 日間 37°C にて培養後、細胞を回収した。10% FBS を添加した PBS に懸濁した細胞液に FITC-LPS を添加して 1 時間、4°C でインキュベートし、PBS で洗浄後、PBS に懸濁し、細胞表面の FITC 輝度 (励起 488 nm、蛍光 530 nm) を FACSCanto II (ベクトンディッキンソン) を用いて検出した。

LPS-CD14 結合アッセイ

LPS と CD14 の結合を、時間分解蛍光共鳴エネルギー遷移 (time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET))³⁵ で検出した。バッファの組成は以下の通りとした。

バッファA: 50 mM HEPES pH 7.2、100 ng/mL ビオチン化 LPS、120 ng/mL ユーロピウム標識

抗 myc 抗体、0.2% FBS、0.2% ウシ血清アルブミン (BSA)

バッファB: 50 mM HEPES pH 7.2、6.7% myc-CD14 タンパク質溶液、1.5 µg/mL ストレプトアビ

ジン-XL665、5% FBS、10 mL に対して 1 錠の complete mini

384 ウェルの黒プレートに、10 µL のバッファA、9 µL のバッファB と 1 µL の検体溶液を混合し、4°C で反応させた。ハイスループットスクリーニングおよび化合物による阻害評価の際は、16 時間静置して反応させた。その後、TR-FRET の測定には Discovery (パックカード) を用い、337 nm で励起し、665 nm の蛍光を検出した。阻害率 (%) は、下記の式で算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{(\text{化合物存在下のFRET比}) - (\text{LPSなしのFRET比})}{(\text{化合物なしのFRET比}) - (\text{LPSなしのFRET比})} \right\} \times 100$$

リムルスアッセイ

LPS-CD14 結合アッセイで阻害率が高かった検体 (陽性検体) について、LPS 関連物質を含有しているか調べるために、リムルステスト (和光純薬) を用いてリムルスアッセイをおこなった。

LPS 関連物質が検出された場合は、陽性検体から除外した。

菌株同定、培養、精製

16S rDNA は PCR で増幅し、直接配列を解析した。ClustalW を用いてアラインメントし³⁶、系統解析は近隣結合法³⁷でおこなった。形態学および生理学的性質の解析は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology に従った。菌株の同定は定法³⁸によりおこなった。

物理化学的性質

IR スペクトルは JASCO FT/IR-610 スペクトロメーターで測定した。UV スペクトルは島津

UV-265FW スペクトロメーターで記録した。NMR スペクトルは C-H dual および TXI クライオプローブを備えた AVC500 スペクトロメーターで記録した。高分解能マススペクトル (MS) は Micromass LCT スペクトロメーターで記録した。ガスクロマトグラフィー (GC)-MS スペクトルは DB-5 カラムを備えた HP6890 シリーズ GC システムと 5973 Mass Selective Detector で記録した。Linked-scan スペクトルは JMS-700 スペクトロメーターで取得した。

アミノ酸分析

穏やかな条件下での加水分解は、ペドペプチン A (20 mg) を 0.02N の NaOH (20 mL) に溶解し、室温で 22 時間攪拌することで実施した。

構成アミノ酸は、アミノ酸分析機 (HITACHI L-8800 アミノ酸分析機) と GC-MS で測定した。アミノ酸分析機による分析では、100 μ g のペドペプチン A あるいはオギペプチン B を 6N HCl (400 μ L) を用いて 105°C、20 時間で完全加水分解し、それを濃縮乾燥後、0.02N HCl に溶解したものを試料溶液とした。GC-MS による分析では、ペドペプチン A (1.0 mg) あるいはオギペプチン B (1.0 mg) を上述のように完全加水分解し、それをピリジン溶液中 (100 μ L) で bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide にて trimethylsilyl (TMS) 化した。標品となるアミノ酸も同様に TMS 化し、分析した。

1.2 結果

1.2.1 LPS の結合に関する検討

細胞を用いた LPS 結合評価

LPS は、可溶型あるいは膜型 CD14 を介して TLR4 と MD-2 の複合体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する^{18, 19, 20, 21, 22}。そこで、LPS が結合しない HEK293T 細胞に、膜型 CD14、TLR4 および MD-2 の発現ベクターを遺伝子導入して一過性発現させ、FITC-LPS の結合性を調べた。

まず、CD14 遺伝子を導入した細胞に 200 あるいは 1,000 ng/mL の FITC-LPS を添加し、フローサイトメーターで結合性を調べたところ、LPS の濃度依存的に FITC 輝度が上昇した(図 7A)。次に、TLR4 とその細胞外アダプター分子である MD-2 を単独であるいは CD14 との組み合わせで細胞に発現させ、FITC-LPS の結合性を調べた。その結果、TLR4、TLR4/MD-2 導入細胞には LPS は結合しなかった。CD14 と TLR4/MD-2 を同時に導入した場合も、CD14 単独導入の場合に比べて輝度は上昇しなかった(図 7B)。よって、LPS が細胞表面に結合するには、CD14 の発現が重要であることが明らかとなった。

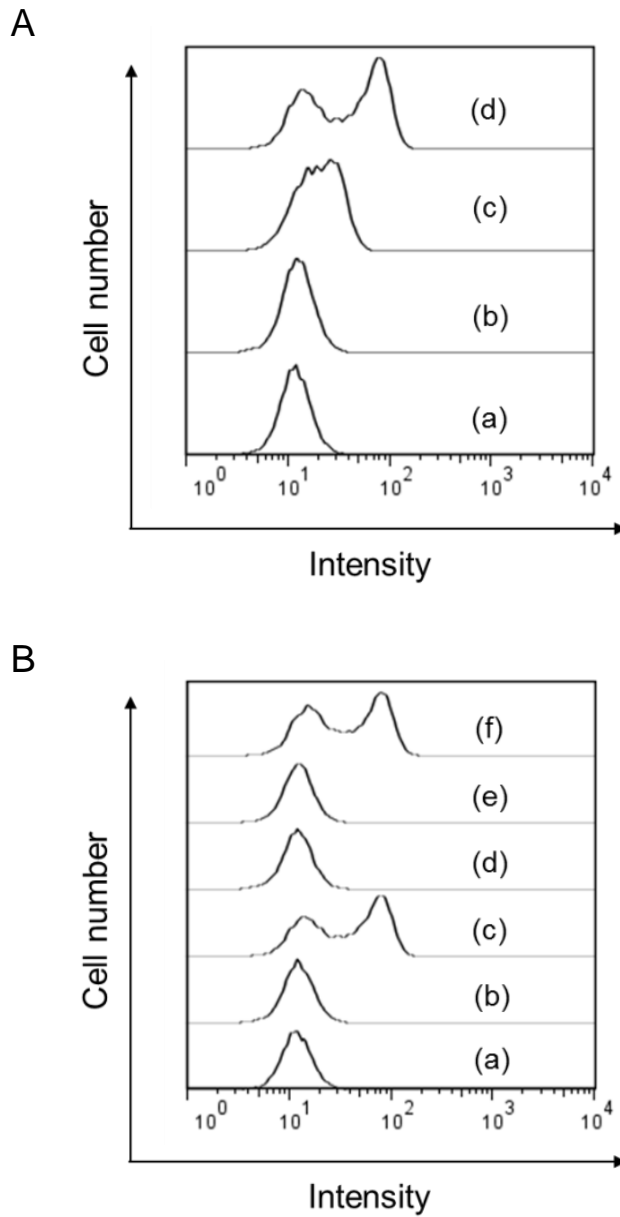


Figure 7 Flow cytometric analysis showing that CD14 expression contributes to LPS binding.

(A) HEK293T cells were transiently transfected with the control vector (a) or mCD14 plasmid (b–d). The cells were incubated with 0 ng/ml (b), 200 ng/ml (c) and 1,000 ng/ml (d) of FITC-LPS, and binding was detected using flow cytometry. (B) The effect of additional expression of TLR4 and MD-2 to CD14 on LPS binding was determined. Mock transfected cells (b) or the cells transfected with CD14 (c), TLR4 (d), TLR4/MD-2 (e) or CD14/TLR4/MD-2 (f) were incubated with 1,000 ng/ml of FITC-LPS. In (a), mock transfected cells were not incubated with FITC-LPS. Then the cells were analyzed as in A.

非細胞結合評価系 LPS-CD14 FRET アッセイ系の構築

前項の結果を受け、LPS と CD14 の結合を検出する系を構築した。ハイスループットスクリーニングをおこなうため、細胞を用いずにバッファー中で LPS と CD14 を相互作用させる系とした。FRET アッセイを用い、ユーロピウムをフルオロフォアドナー、XL665 をアクセプターとし、両者が近接すると 665 nm の蛍光を検出できる系を構築した (図 8)。可溶性 CD14 の配列に myc タグの配列を付加して発現ベクターを構築し、細胞に導入して myc-CD14 タンパク質を調製した。myc-CD14 タンパク質は、ユーロピウム標識した抗 myc 抗体で検出した。LPS はビオチン化して用い、streptavidin-XL665 でビオチン化 LPS を検出した。反応系中に FBS を添加し、材料と方法の項で示した組成で、ビオチン化 LPS とユーロピウム標識抗 myc 抗体をバッファーA、myc-CD14 とstreptavidin-XL665 をバッファーB に調製した。両者を混合して 4°C に静置して反応させた後 337 nm で励起すると、665 nm の蛍光シグナルが検出された (図 9A)。蛍光強度は反応時間に依存して増加し、6 時間以降は 22 時間までゆるやかな増加となった。以後のアッセイでは一晩処理をおこない 16 時間後に測定することとした。

次に、LPS に結合してその作用を中和することが知られている PMB を系に添加した。その結果、PMB は濃度依存的に反応を阻害した (図 9B)。

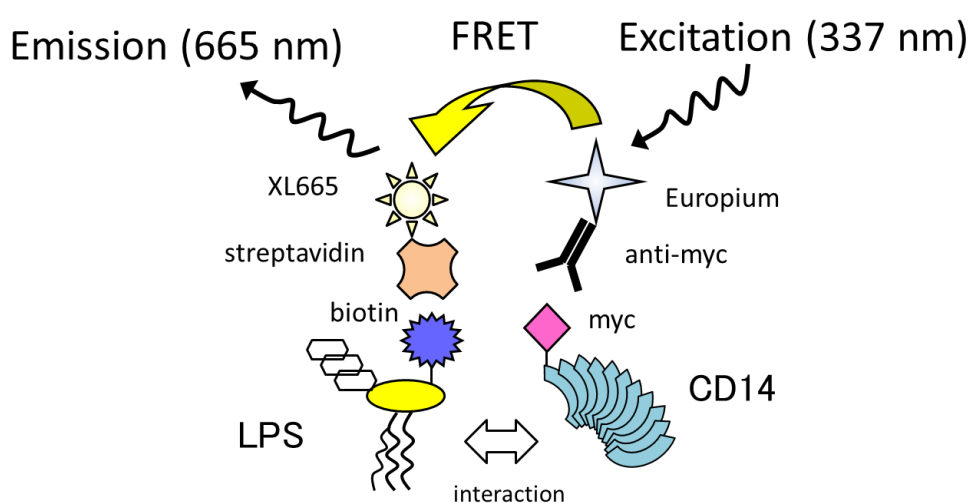


Figure 8 LPS-CD14 FRET assay.

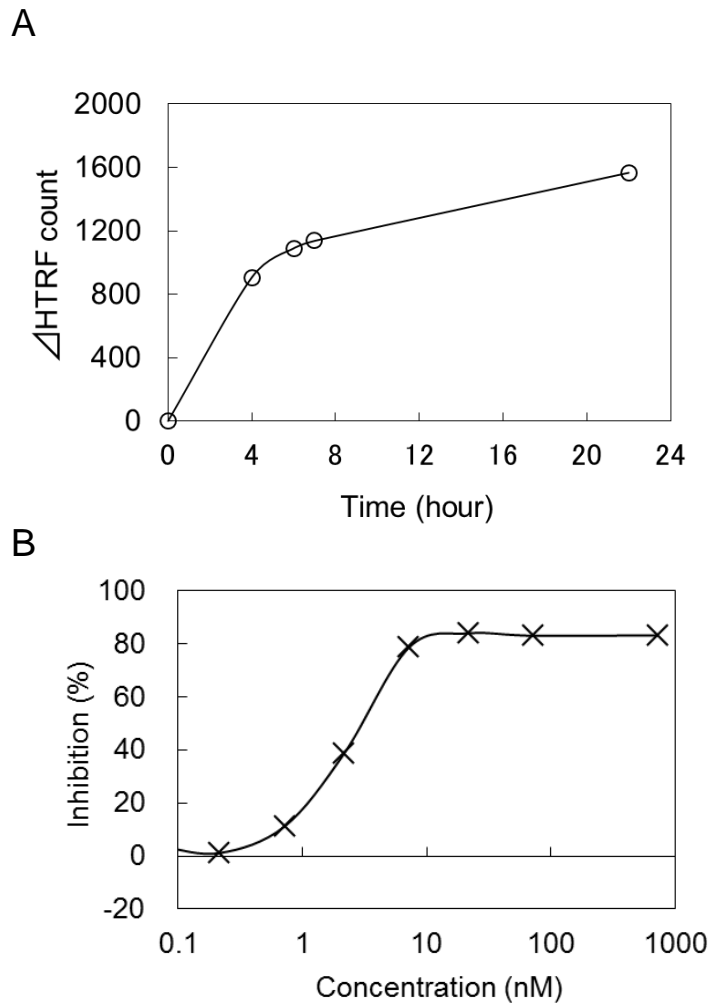


Figure 9 LPS-CD14 interaction monitored using TR-FRET assay.

(A) Biotin-LPS and myc-CD14 were incubated with streptavidin-XL665 and Europium-labeled anti-myc antibody for the indicated time (h) at 4°C and TR-FRET was measured. (B) TR-FRET assay was performed in the presence of various concentrations of PMB.

1.2.2 LPS 阻害剤の探索

スクリーニング

各種微生物培養液抽出物を検体として、構築した LPS-CD14 結合評価系 (FRET アッセイ) にてハイスループットスクリーニングを実施した。材料と方法の項に記載したように、384 ウェルのマイクロタイタープレートを用い、検体溶液 1 μL 、総液量が 20 μL のスケールで、エネルギー遷移による蛍光シグナルを検出することでスクリーニングをおこなった。本ハイスループットスクリーニングにて反応の阻害活性を示した複数の検体が選抜されたが、これらの陽性検体の中には微生物由来の LPS 関連物質が含まれる事が予想されたため、続いてリムルスアッセイに供した。その結果、リムルスアッセイ陽性検体が見出されたためこれらを除外し、LPS 関連物質とは異なる阻害剤を含むと考えられた検体について高次評価を進めた。

高次評価系としては、ヒト培養細胞株を用いた LPS 刺激によるサイトカイン産生アッセイを用いた。阻害活性があることを確認した検体については、微生物の再培養をおこない、阻害活性を指標として各種分離操作によって活性物質を精製した。その結果、2 株の細菌の培養液抽出物から、複数の強力な阻害物質を見出し、構造決定の結果新規化合物であると決定した。これらをそれぞれ、ペドペプチン A、B、C、オギペプチン A、B、C、D と命名した。

阻害剤産生株の同定、培養、精製

ペドペプチン生産菌の同定

細菌 SANK 72003 は、長野県真田町の土壌サンプルより分離された。本菌株を定法により普通寒天培地で 28°C、2 日間培養し、性状を調べた。

SANK 72003 はグラム陰性菌で、桿菌様であり、運動性、孢子形成は認められなかった。普通寒天培地上のコロニーはスムーズで、クリーミーな白色、円形であった。カタラーゼ、オキシダーゼ、DNase 生産試験で陽性で、O-F 試験によってグルコースを資化できることがわかった。増殖可能温度は 10 から 31°C であった。16S rDNA 配列の BLAST サーチでは、*Pedobacter himalayensis* HHS22T (AJ583425) に対して 99% の相同性を示した。系統解析の結果、SANK 72003 はペドバク

ター属に分類された。形態学および生理学的性質もペドバクター属と類似していたことから、本株をペドバクター属の一種と同定し、*Pedobacter* sp. SANK 72003 と命名した。SANK 72003 は産業技術総合研究所 国際特許生物寄託センターに FERM BP-08549 として寄託した。系統解析の結果を図 10 に示した。

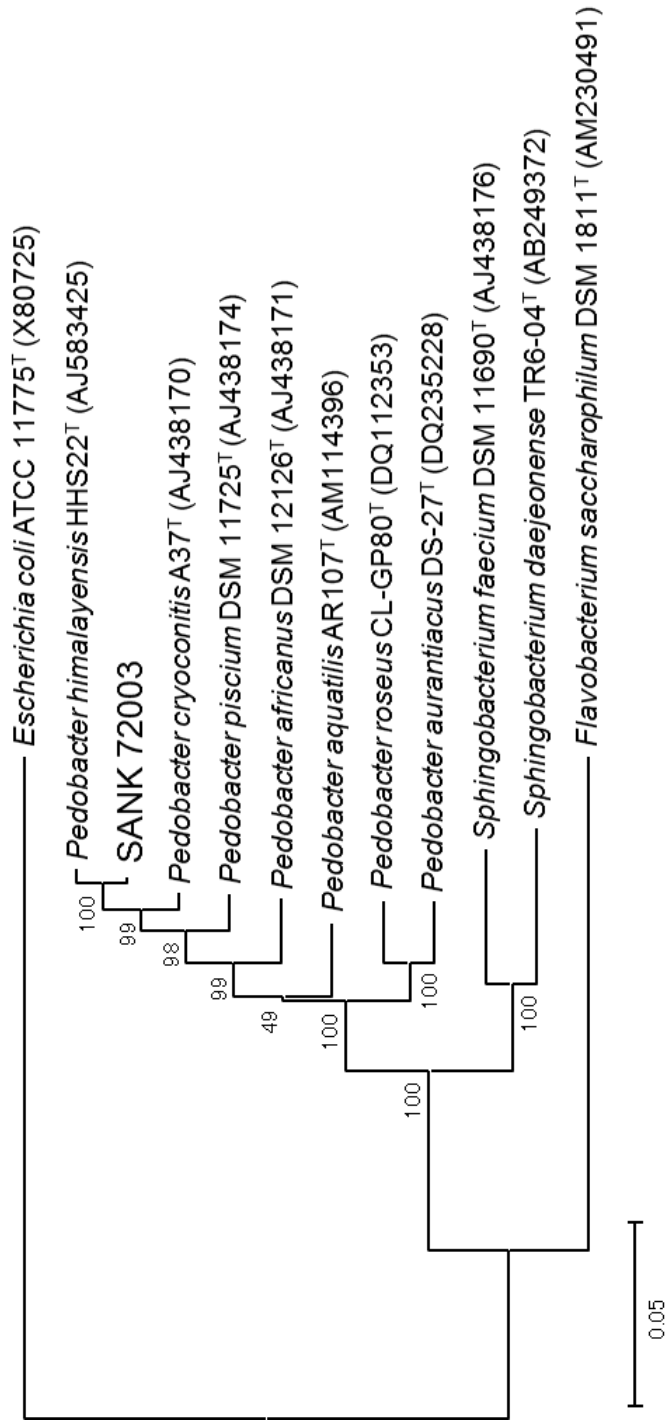


Figure 10 Phylogenetic analysis of SANK 72003.

Analysis of 16S rDNA sequences based on the neighbor-joining method indicated the taxonomic position of the strain SANK 72003. Bootstrap values (%) are indicated at the branches from 1,000 replications. The scale bar below the phylogenetic tree indicates 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

ペドペプチンの培養生産

Pedobacter sp. SANK 72003 のスラントから 1 白金耳掻き取り、それを 300 mL のシード培地 (1.8% 普通ブイヨン (栄研化学)) を含む 2 L 容三角フラスコに接種し、28°C、47 時間、210 rpm で振とう培養した。得られたシード培養液 300 mL を、15 L の本培養培地 (シード培地と同じ) を含む 30 L ジャー・ファーメンターに接種し、28°C、70 時間、通気 7.5 L/分、100-220 rpm で通気攪拌培養した。

ペドペプチンの単離

フローを図 11 に示した。

培養液 (ジャー4 基分 60 L) を遠心分離し、得られた上清を 6N HCl で pH 8.0 に調整した後、DIAION HP-20 カラム (7.2 L) に付した。これを 21 L の水、21 L の 50%アセトン水、5.4 L の 60%アセトン水-0.1%ギ酸で洗浄後、8.0 L の 60%アセトン水-0.1%ギ酸で溶出した。溶出液を濃縮、凍結乾燥し、6.57 g の粉末を得た。

ついで、この粉末を 800 mL のアセトニトリル : 0.3% トリエチルアミンリン酸 (TEAP) バッファー (pH 3.0)=1:9 に溶解し、コスモシルカラム (COSMOSIL 140C₁₈-OPN, 2.4 L) に付した。これをアセトニトリル : 0.3% TEAP バッファー (pH 3.0)=1:3 (5 L) 、3:7 (8 L) 、7:13 (5.5 L) 、2:3 (3 L) で段階的に溶出した。7:13 と 2:3 の溶出液については、300 mL ずつ分画し、各画分を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析し、活性物質の所在を確認した。

ペドペプチン A (化合物 1) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 7:13 のうち、化合物 1 を含む画分を集め、アセトニトリルを留去後、10% NaOH 水溶液で pH 6.0 に調整した。それを HP-20 カラム (300 mL) に付して脱塩した。水 (1.5 L) で洗浄後、60%アセトン水-0.1%ギ酸 (900 mL) で溶出し、溶出液を濃縮、凍結乾燥して化合物 1 の白色粉末 1.3 g を得た。

ペドペプチン B (化合物 2) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 2:3 のうち、化合物 2 を含む画分を集め、化合物 1 と同様に HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥して化合物 2 の白色粉末 98 mg を得た。

ペドペプチン C (化合物 3) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 7:13 のうち、化合物 3 を含む画分を集め、HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥して化合物 3 の粗精製物 1.15 g を得た。これをさらにコスモシルカラム (100 mL) で精製した。得られた粗精製物をアセトニトリル:0.3% TEAP バッファー (pH 3.0)=1:3 (50 mL) に溶解し、コスモシルカラムに付した後、アセトニトリル:0.3% TEAP バッファー (pH 3.0) =1:3 (320 mL)、3:7 (600 mL) で段階的に溶出した。化合物 3 を含む溶出液 3:7 の画分を集め、HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥して化合物 3 の白色粉末 132 mg を得た。

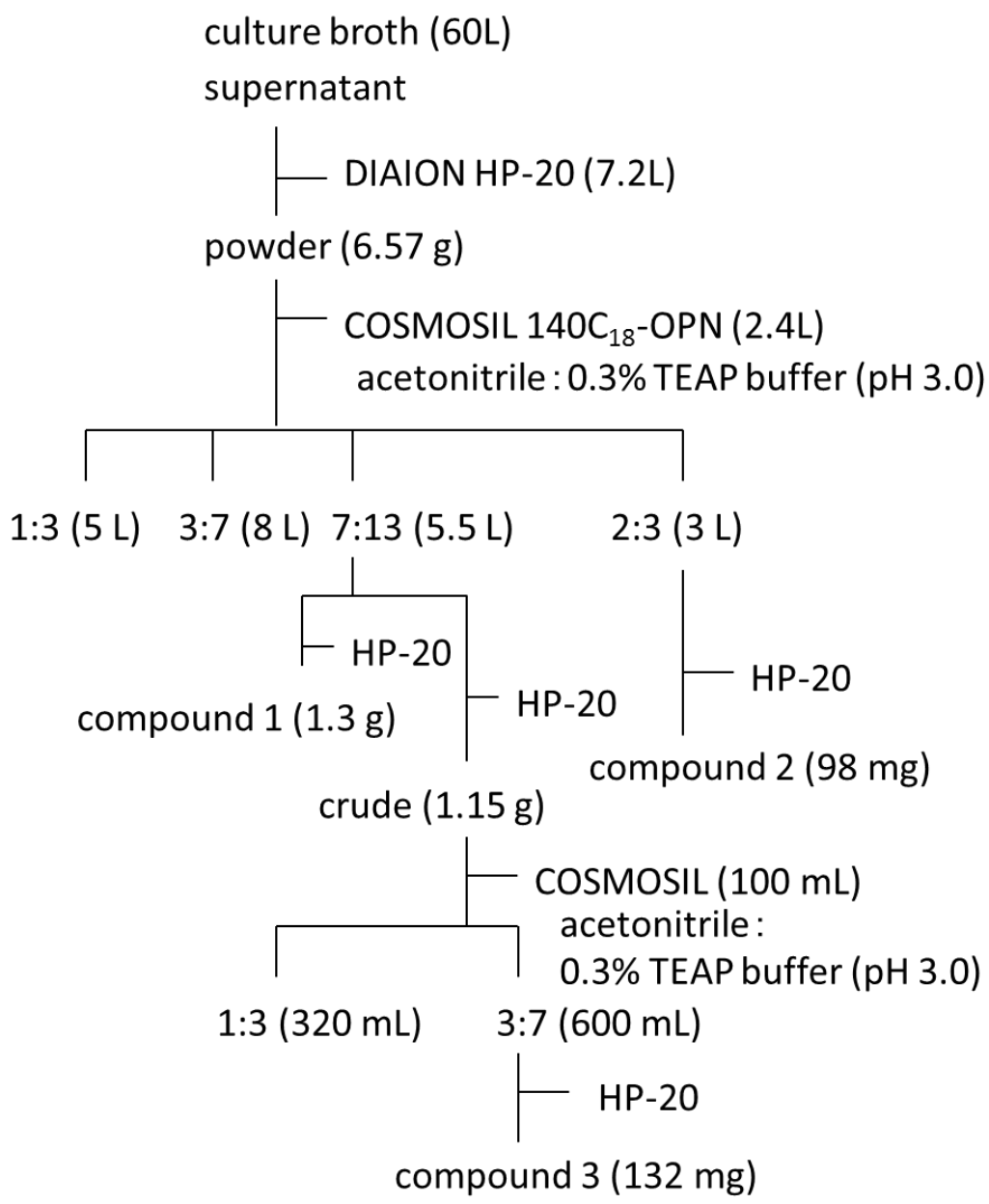


Figure 11 Isolation scheme of pedopeptins.

オギペプチン生産菌の同定

細菌 SANK 71903 は新潟県佐渡市小木町にて海藻より分離した。運動性があり、孢子形成は観察されず、桿菌様でグラム陰性であった。増殖には海水を要した。マリンアガー2216 (Difco) 上のコロニーはスムーズ、円形で、明るいオリーブ色であった。アミラーゼ、カタラーゼ、オキシダーゼ、DNase が陽性であった。至適増殖温度は 17-37°C であった。16S rDNA 配列の BLAST サーチから、もっとも相同性が高かったのは *Pseudoalteromonas flavipulchra* (AF297958) であった (99%)。16S rDNA の系統解析から、SANK 71903 はシュードアルテロモナス属であることが示唆された。SANK 71903 の形態学および生理学的性質もシュードアルテロモナス属に類似していたことから、本株をシュードアルテロモナス属の一種と同定し、*Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 と命名した。系統解析の結果を図 12 に示した。

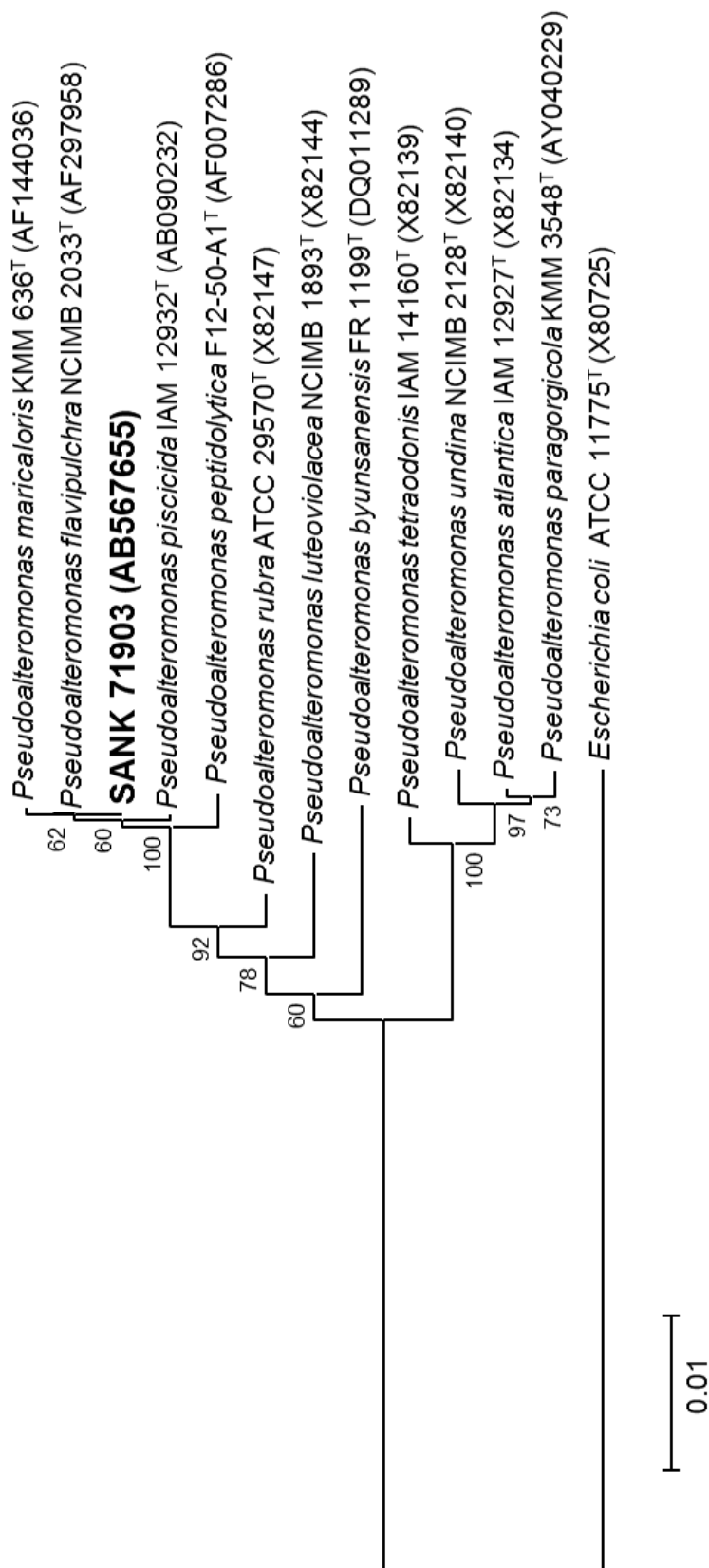


Figure 12 Phylogenetic analysis of SANK 71903.

Analysis of 16S rDNA sequences based on the neighbor-joining method indicated the taxonomic position of the strain SANK 71903. Bootstrap values (%) are indicated at the branches from 1,000 replications. The scale bar below the phylogenetic tree indicates 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

オギペプチンの培養生産

Pseudoalteromonas sp. SANK 71903 のスラントを 0.85% NaCl 水溶液 (9.5 mL) でホモジェナイズした。このホモジェナイズ液 (1 mL) を 80 mL のシード培地 (2.0% 可溶性スターチ、3.74% マリンブロス 2216) をそれぞれ含む 2 つの 500 mL 容三角フラスコに接種し、23°C、22 時間、210 rpm で振とう培養した。得られたシード培養液 (150 mL) を、15 L の本培養培地 (2.0% スクロース、3.74% マリンブロス 2216) を含む 30 L ジャー・ファーメンターに接種し、23°C、43 時間、通気 7.5 L/分、100-230 rpm で通気攪拌培養した。

オギペプチンの単離

フローを図 13 に示した。

培養液 (60 L) を遠心分離し、菌体と上清に分離した。菌体 (1.35 kg) には 5 L のアセトンを添加し、活性物質を抽出した。この菌体アセトン抽出液を濃縮、アセトン留去した後、前述の上清 (58 L) と合併し、6N HCl で pH 8.0 に調整した。これを DIAION HP-20 カラム (7.2 L) に付し、21 L の水と 21 L の 60% アセトン水で洗浄後、60% アセトン水-0.1% ギ酸 (26 L) で溶出した。溶出液を濃縮、凍結乾燥し、粉末 (8.5 g) を得た。この粉末を 1 L の水に溶解し、HCl で pH 5.0 に、続いて 10% NaOH で pH 7.2 に調整し、都度生じた沈殿を遠心分離して除去した。得られた上清 1.25 L に、アセトニトリル : 5 mM 硫酸ナトリウム-0.5% リン酸水溶液 (A 液) = 1:19 (1.25 L) を添加し、コスモシルカラム (COSMOSIL 140C₁₈-OPN、2.2 L) に付した。これをアセトニトリル : A 液 = 1:9 (20 L) 、 3:17 (5 L) 、 1:4 (2 L) 、 1:3 (2 L) 、 3:7 (5 L) で段階的に溶出し、1 L ごとに分画した。

オギペプチン A (化合物 4) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 1:4 と 1:3 のうち、化合物 4 を含む画分を集め、ペドペプチンと同様に HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥し、粗精製物 310 mg を得た。これを 100 mL のアセトニトリル : 溶液 A = 1:9 に溶解し、コスモシルカラム (80 mL) でさらに精製した。カラムをアセトニトリル : 溶液 A = 1:9 (20 L) と 3:17 (9 L) で洗浄後、アセトニトリル : 溶液 A = 1:4 で溶

出した。化合物 **4** を含む画分を HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥し、化合物 **4** の白色粉末 212 mg を得た。

オギペプチン B (化合物 **5**) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 3:7 の 5 画分のうち、化合物 **5** を含む 1 番目と 2 番目の画分を集め、HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥し、化合物 **5** の白色粉末 960 mg を得た。

オギペプチン C (化合物 **6**) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 3:7 の 5 画分のうち、化合物 **6** を含む 3 番目の画分を HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥し、粗精製物を 650 mg 得た。これを 80 mL のアセトニトリル：溶液 A=1:4 に溶解し、コスモシルカラム (100 mL) でさらに精製した。カラムをアセトニトリル：溶液 A=1:4 (400 mL) と 1:3 (400 mL) で洗浄後、アセトニトリル：溶液 A=3:7 (460 mL) で溶出した。化合物 **6** を含む画分を HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥し、化合物 **6** の白色粉末 430 mg を得た。

オギペプチン D (化合物 **7**) の単離

上述のコスモシルカラムの溶出液 3:7 の 5 画分のうち、化合物 **7** を含む 5 番目の画分を HP-20 カラムで脱塩後、凍結乾燥し、化合物 **7** の白色粉末 910 mg を得た。

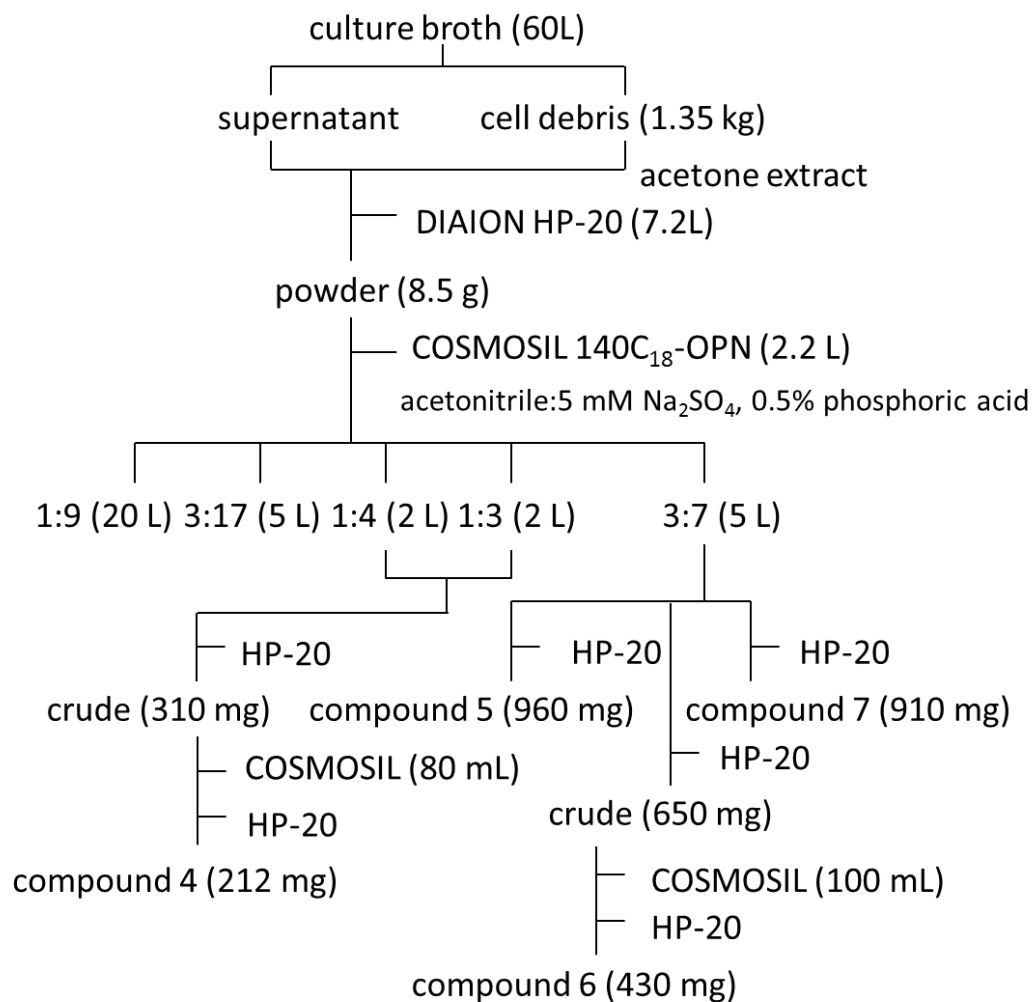


Figure 13 Isolation scheme of ogipeptins.

オギペプチン X (オギペプチンデアシル体) の調製

オギペプチン B (30 mg) を 3N HCl (10 mL) に溶解し、37°C、24 時間かけて加水分解した。部分加水分解産物を Sep-Pak C₁₈ カートリッジ(ウォーターズ)に付し、アセトニトリル:溶液 A=1:99、1:19、1:9、1:4 (各 5 mL) で溶出した。オギペプチン X を含む 1:9 の画分からアセトニトリルを留去し脱塩後、凍結乾燥し、白色粉末 7.0 mg を得た。

ペドペプチンとオギペプチンの物理化学的性質

測定結果を、表 2 と表 3 に示した。

Table 2 Physicochemical properties of pedopeptin A, B and C

	Pedopeptin A (1)	Pedopeptin B (2)	Pedopeptin C (3)
Appearance	White powder	White powder	White powder
Molecular formula	$C_{53}H_{86}N_{12}O_{14}$	$C_{53}H_{86}N_{12}O_{13}$	$C_{52}H_{84}N_{12}O_{14}$
HR-MS (<i>m/z</i>)			
Found:	1115.6460 (M+H) ⁺	1099.6517 (M+H) ⁺	1101.6299 (M+H) ⁺
Calcd.:	1115.6465 (for $C_{53}H_{87}N_{12}O_{14}$)	1099.6516 (for $C_{53}H_{87}N_{12}O_{13}$)	1101.6308 (for $C_{52}H_{85}N_{12}O_{14}$)
$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.53, 0.01N HCl)	-38°	-36°	-33°
UV $\lambda_{max}^{0.01N HCl}$ nm (ϵ)	End absorption	End absorption	End absorption
IR $\nu_{max}^{cm^{-1}}$ (KBr pellet)	3299, 2957, 1732, 1652, 1534, 1388	3298, 2957, 1737, 1651, 1537, 1388	3299, 2958, 1731, 1651, 1536, 1389

Table 3 Physicochemical properties of ogipeptin A, B, C and D

	Ogipeptin A (4)	Ogipeptin B (5)	Ogipeptin C (6)	Ogipeptin D (7)
Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder
Molecular formula	$C_{42}H_{76}N_{14}O_{11}$	$C_{44}H_{80}N_{14}O_{11}$	$C_{44}H_{82}N_{14}O_{11}$	$C_{46}H_{84}N_{14}O_{11}$
HR-MS (<i>m/z</i>)				
Found:	955.6047 (M+H) ⁺	981.6217 (M+H) ⁺	983.6376 (M+H) ⁺	1009.6519 (M+H) ⁺
Calcd.:	955.6053 (for $C_{42}H_{79}N_{14}O_{11}$)	981.6209 (for $C_{44}H_{81}N_{14}O_{11}$)	983.6366 (for $C_{44}H_{83}N_{14}O_{11}$)	1009.6522 (for $C_{46}H_{85}N_{14}O_{11}$)
$[\alpha]_D^{25}$ (c 0.50, 0.04N HCl)	-39.2°	-35.6°	-36.8°	-39.2°
UV $\lambda_{max}^{0.04N HCl}$ nm (ϵ)	End absorption	End absorption	End absorption	End absorption
IR $\nu_{max}^{cm^{-1}}$ (KBr pellet)	3270, 2927, 1655, 1532, 1347, 1077, 532	3271, 2927, 1655, 1531, 1347, 1075, 531	3265, 2926, 1655, 1632, 1532, 1347, 1077, 529	3274, 2927, 1656, 1532, 1109, 536

1.2.3 LPS 阻害剤の構造決定

ペドペプチンの構造決定

構造解析は主にペドペプチン A についておこなった。 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータ (表 4) から、ペプチド性物質であることが推測された。 ^1H NMR スペクトルにおいては、アミノ酸残基の α -メチンとフェニル基のシグナルが観察された。 ^{13}C 、DEPT、および HSQC スペクトルからは、53 個の炭素を観測し、それらはメチル 9 個、メチレン 12 個、メチン 18 個、4 級炭素 14 個とアサインされた。

赤外線スペクトルデータから、エステル基の存在が示唆され、アルカリ加水分解物 (図 14) の分子量が 18 マス増加したことから、ペドペプチン A は環状デプシペプチドであることが判明した。

アミノ酸分析機によるアミノ酸分析では、1 モルのアスパラギン酸、2 モルのロイシン、1 モルのフェニルアラニンが検出された。GC-MS によるアミノ酸分析では、上述のアミノ酸に加えて、ジアミノプロピオン酸 (Dap) とジアミノブチル酸 (Dab) も観測された。

DQFCOSY、HSQC、HMBC などの各種 2D NMR からは、3-ヒドロキシ-7-メチルオクタン酸、 β -ヒドロキシバリンと 2-アミノ-2-ブテノイン酸 (デヒドロブチリン (dehydrobutyrine, Dhb)) が存在することがわかった。そして、これらのアミノ酸のつながりを、ペドペプチン A や、そのアルカリ加水分解、さらにキモトリプシン分解した産物 (図 14) の各種 2D NMR や MS データから解析し、平面構造を決定した (図 15)。

アミノ酸の立体配置は改良 Marfey 法³⁹によって決定し、Dhb の立体は NOE から E 体と決定した。2 モル存在するロイシンについては D、L 体が 1 モルずつ含まれることが判明したが、いずれかは決定できなかった。Dap については立体を決定できなかった。

ペドペプチン B および C の構造は、それぞれペドペプチン A と同様に解析し、決定した。 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータを表 5、6 に示した。

Table 4 ^1H and ^{13}C NMR signal assignments of pedopeptin A (1) in 0.01N DCI/D₂O

	Position	δ_{C}	δ_{H}
Dap-1	1	169.9(s)	
	2	50.6(d)	5.12 (1H, m)
	3	43.1(t)	3.30 (1H, m), 3.52 (1H, dd, 3.1, 13.9 Hz)
Phe	1	174.1(s)	
	2	57.1(d)	4.62 (1H, dd, 6.4, 9.9 Hz)
	3	36.8(t)	3.00 (1H, m) 3.22 (1H, *)
	4	135.6(s)	
	5	129.5(d)	7.25 (1H, d, 7.2 Hz)
	6	129.8(d)	7.34 (1H, dd, 7.2, 7.6 Hz)
	7	128.2(d)	7.21 (1H, dd, 7.2, 7.6 Hz)
	8	129.8(d)	7.34 (1H, dd, 7.2, 7.6 Hz)
	9	129.5(d)	7.25 (1H, d, 7.2 Hz)
Dab	1	169.1(s)	
	2	49.8(d)	4.56 (1H, dd, 4.6, 10.3 Hz)
	3	29.1(t)	1.69 (1H, *) 2.00 (1H, m)
	4	36.4(t)	2.86 (2H, t, 7.4 Hz)
Dhb	1	169.0(s)	
	2	130.0(s)	
	3	121.8(d)	5.65 (1H, q, 7.4 Hz)
	4	13.1(q)	1.84 (3H, d, 7.4 Hz)
Leu-1	1	176.4(s)	
	2	54.3(d)	4.24 (1H, dd, 2.8, 11.7 Hz)
	3	39.4(t)	1.67 (1H, *) 1.79 (1H, *)
	4	25.0(d)	1.81 (1H, *)
	5	20.1(q)	0.97 (3H, d, 5.5 Hz)
	6	23.2(q)	0.97 (3H, d, 5.5 Hz)
Dap-2	1	170.3(s)	
	2	52.3(d)	4.68 (1H, dd, 4.8, 10.4 Hz)
	3	39.9(t)	3.39 (1H, dd, 10.4, 13.0 Hz) 3.55 (1H, *)
Leu-2	1	173.7(s)	
	2	53.0(d)	4.46 (1H, dd, 3.1, 11.7 Hz)
	3	40.5(t)	1.65 (1H, *) 1.91 (1H, m)
	4	25.3(d)	1.69 (1H, *)
	5	20.6(q)	0.89 (3H, d, 6.4 Hz)
	6	23.1(q)	1.02 (3H, d, 6.4 Hz)
β -OH Val	1	171.4(s)	
	2	60.0(d)	4.78 (1H, *)
	3	72.6(s)	
	4	25.8(q)	1.14 (3H, s)
	5	27.0(q)	1.22 (3H, s)
Asp	1	173.2(s)	
	2	49.4(d)	4.98 (1H, m)
	3	39.9(t)	2.56 (1H, br.) 3.19 (1H, *)
	4	177.6(s)	
Fatty acid	1	173.4(s)	
	2	40.6(t)	2.46 (1H, dd, 2.8, 13.9 Hz) 2.88 (1H, *)
	3	73.4(d)	5.19 (1H, m)
	4	32.3(t)	1.50 (1H, m) 1.60 (1H, m)
	5	23.6(t)	1.27 (2H, m)
	6	38.3(t)	1.13 (2H, m)
	7	27.9(d)	1.50 (1H, m)
	8	22.4(q)	0.84 (3H, d, 6.6 Hz)
	9	22.5(q)	0.84 (3H, d, 6.6 Hz)

Chemical shifts are given in ppm referenced to HOD at 4.80 ppm for ^1H , and dioxane at 67.2 ppm for ^{13}C .

* Not clearly observed due to overlap.

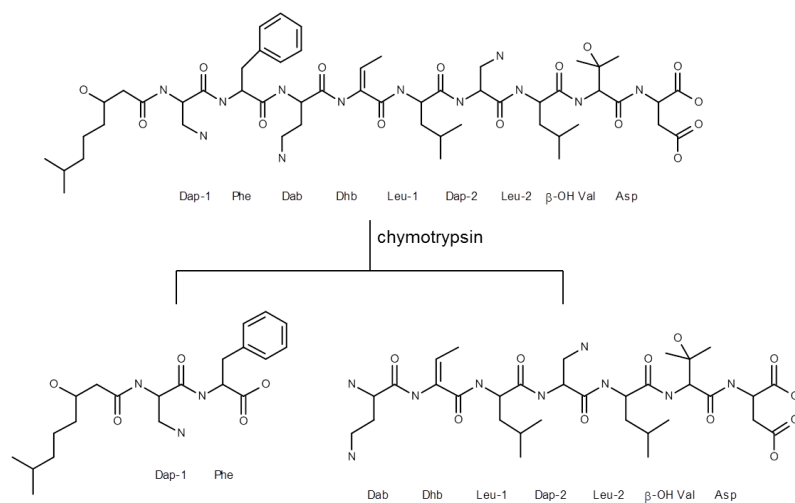


Figure 14 Chymotrypsin-digested products from the mild alkaline hydrolysate of pedopeptin A.

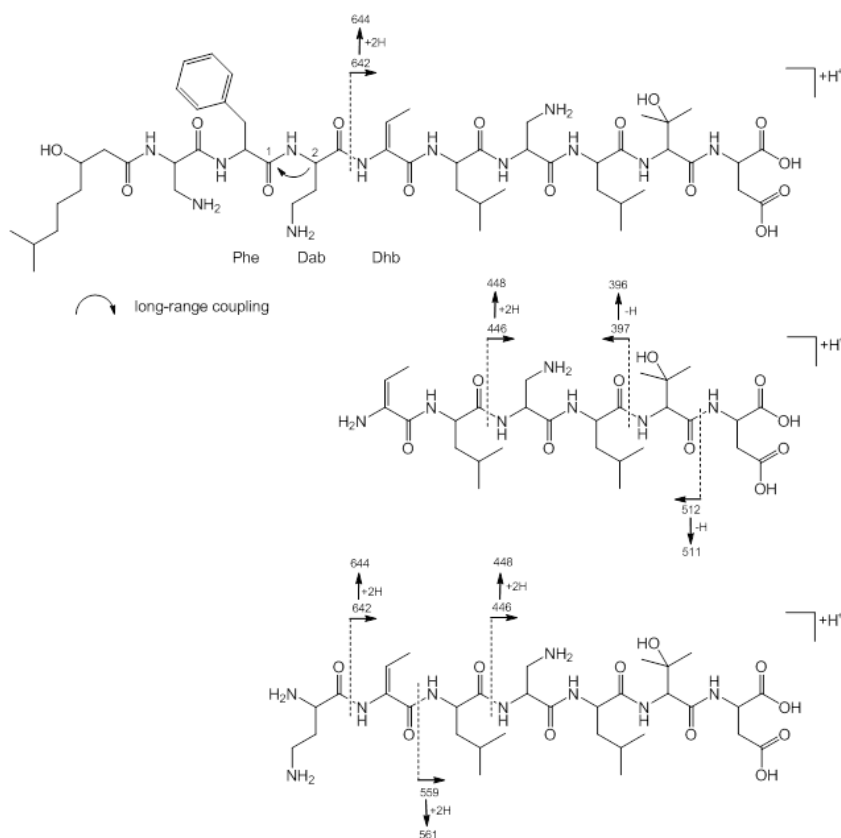


Figure 15 Productions observed in collision-induced dissociation spectra of the protonated molecules shown in Figure 14.

Table 5 ¹H and ¹³C NMR signal assignments of pedoheptin B (2) in methanol-d4

	Position	δ_C	δ_H
Dap-1	1	171.8(s)	
	2	54.5(d)	4.54 (1H, t, 7.3 Hz)
	3	42.0(t)	3.21 (1H, *) 3.35 (1H, *)
Phe	1	175.4(s)	
	2	58.4(d)	4.68 (1H, dd, 6.8, 7.9 Hz)
	3	37.8(t)	3.01 (1H, dd, 9.0, 14.3 Hz) 3.31 (1H, *)
	4	137.8(s)	
	5	130.1(d)	7.27 (1H, *)
	6	129.8(d)	7.27 (1H, *)
	7	128.2(d)	7.18 (1H, m)
	8	129.8(d)	7.27 (1H, *)
	9	130.1(d)	7.27 (1H, *)
Dab	1	170.0(s)	
	2	51.2(d)	4.61 (1H, *)
	3	30.6(t)	1.76 (1H, *) 1.92 (1H, *) 2.83 (2H, m)
Dhb	1	168.4(s)	
	2	132.9(s)	
	3	119.4(d)	5.64 (1H, q, 7.3 Hz)
	4	13.4(q)	1.84 (3H, d, 7.3 Hz)
Leu-1	1	175.3(s)	
	2	54.8(d)	4.25 (1H, dd, 3.9, 11.0 Hz)
	3	40.4(t)	1.76 (2H, *)
	4	26.0(d)	1.84 (1H, *)
	5	20.6(q)	0.98 (3H, d, 6.4 Hz)
	6	23.6 ^a (q)	1.01 ^b (3H, d, 6.1 Hz)
Dap-2	1	172.1(s)	
	2	52.4(d)	4.92 (1H, *)
	3	45.1(t)	3.24 (1H, *) 3.38 (1H, *)
Leu-2	1	174.0(s)	
	2	53.2(d)	4.49 (1H, dd, 2.9, 10.1 Hz)
	3	42.1(t)	1.48 (1H, *) 1.92 (1H, *) 1.76 (1H, *)
	4	25.9(d)	0.95 (3H, d, 6.6 Hz)
	5	22.0(q)	1.02 ^b (3H, d, 6.2 Hz)
	6	23.9 ^a (q)	
Val	1	172.7(s)	
	2	58.6(d)	4.61 (1H, *)
	3	32.9(d)	1.84 (1H, *)
	4	19.2(q)	0.72 (3H, d, 5.0 Hz)
	5	20.0(q)	0.73 (3H, d, 4.8 Hz)
Asp	1	172.7(s)	
	2	50.2(d)	4.87 (1H, *)
	3	41.7(t)	2.40 (1H, dd, 3.1, 16.5 Hz) 3.18 (1H, *)
Fatty acid	4	178.1(s)	
	1	171.8(s)	
	2	41.2(t)	2.32 (1H, dd, 2.4, 13.8 Hz) 2.92 (1H, dd, 3.5, 13.8 Hz)
	3	73.0(d)	5.10 (1H, m)
	4	33.4(t)	1.48 (1H, *) 1.54 (1H, m)
	5	24.8(t)	1.27 (2H, m)
	6	39.7(t)	1.10 (2H, m)
	7	29.1(d)	1.48 (1H, *)
	8	22.9(q)	0.85 (3H, d, 6.2 Hz)
9	23.0(q)	0.85 (3H, d, 6.2 Hz)	

Chemical shifts are given in ppm referenced to TMS at 0.0 ppm for ¹H and ¹³C.

Not clearly observed due to overlap
a, b) Interchangeable

Table 6 ¹H and ¹³C NMR signal assignments of pedoheptin C (3) in 0.01N DCI/D₂O

	Position	δ_C	δ_H
Dap-1	1	170.3(s)	
	2	51.5(d)	5.06 (1H, dd, 3.3, 9.5 Hz)
	3	43.7(t)	3.21 (1H, *) 3.42 (1H, dd, 3.5, 13.4 Hz)
Phe	1	174.2(s)	
	2	57.2(d)	4.62 (1H, *)
	3	36.8(t)	3.01 (1H, dd, 11.0, 13.6 Hz) 3.25 (1H, dd, 9.9, 13.6 Hz)
	4	135.6(s)	
	5	129.5(d)	7.24 (1H, d, 7.5 Hz)
	6	129.8(d)	7.33 (1H, dd, 7.5, 7.5 Hz)
	7	128.2(d)	7.20 (1H, dd, 7.5, 7.5 Hz)
	8	129.8(d)	7.33 (1H, dd, 7.5, 7.5 Hz)
	9	129.5(d)	7.24 (1H, d, 7.5 Hz)
Dab	1	169.1(s)	
	2	49.9(d)	4.55 (1H, dd, 4.6, 10.5 Hz)
	3	29.1(t)	1.68 (1H, *) 1.99 (1H, m) 2.85 (2H, t, 8.3 Hz)
Dhb	1	169.0(s)	
	2	130.0(s)	
	3	121.6(d)	5.63 (1H, q, 7.4 Hz)
	4	13.1(q)	1.83 (3H, d, 7.4 Hz)
Leu-1	1	176.4(s)	
	2	54.3(d)	4.23 (1H, dd, 3.3, 11.7 Hz)
	3	39.5(t)	1.64 (1H, *) 1.79 (1H, *) 1.81 (1H, *)
	4	25.0(d)	0.97 (3H, d, 6.2 Hz)
	5	20.1(q)	0.97 (3H, d, 6.2 Hz)
	6	23.2(q)	0.97 (3H, d, 6.2 Hz)
Dap-2	1	170.7(s)	
	2	53.2(d)	4.60 (1H, *)
	3	40.2(t)	3.32 (1H, dd, 10.1, 13.3 Hz) 3.48 (1H, dd, 4.8, 13.3 Hz)
Leu-2	1	173.7(s)	
	2	52.9(d)	4.47 (1H, dd, 3.3, 11.7 Hz)
	3	40.5(t)	1.61 (1H, *) 1.91 (1H, m) 1.68 (1H, *)
	4	25.3(d)	0.90 (3H, d, 6.4 Hz)
	5	20.6(q)	1.03 (3H, d, 6.6 Hz)
	6	23.1(q)	1.03 (3H, d, 6.6 Hz)
β -OH Val	1	171.4(s)	
	2	59.9(d)	4.76 (1H, *)
	3	72.6(s)	
	4	25.9(q)	1.21 (3H, s)
	5	27.0(q)	1.13 (3H, s)
Asp	1	173.4(s)	
	2	49.6(d)	4.95 (1H, t, 3.8 Hz)
	3	40.5(t)	2.44 (1H, *) 3.17 (1H, dd, 4.0, 18.2 Hz)
Fatty acid	4	178.1(s)	
	1	173.2(s)	
	2	40.5(t)	2.44 (1H, *) 2.88 (1H, dd, 4.2, 13.9 Hz)
	3	73.2(d)	5.20 (1H, m)
	4	31.9(t)	1.50 (1H, m) 1.59 (1H, m)
	5	25.4(t)	1.27 (2H, *)
	6	22.5 ^a (t)	1.27 (2H, m)
	7	31.2 ^a (t)	1.23 (2H, m)
	8	13.9(q)	0.84 (3H, t, 6.8 Hz)

Chemical shifts are given in ppm referenced to HOD at 4.80 ppm for ¹H, and dioxane at 67.2 ppm for ¹³C.

* Not clearly observed due to overlap.
a) Interchangeable

オギペプチンの構造決定

構造は、物理化学的性質や各種スペクトル解析より決定した。オギペプチンは酸性水に易溶であり、他の溶媒に比してピーク形状が良好であったことから、NMR は、0.04N DCI/D₂O を用いて解析した。

オギペプチン A-D の NMR スペクトルから、ペプチドと脂肪鎖を有しており、いくつかのオレフィンプロトンの違い以外はお互いに類似していると推察された。アミノ酸分析機によるアミノ酸分析の結果では、A-D の構成アミノ酸は同じであり、1モルのロイシン、1モルのアルギニンが検出された。一方、GC-MS によるアミノ酸分析では、上述のアミノ酸に加えて、Dab も観測された。赤外線スペクトルデータからは、エステル基は存在せず、デプシペプチドではないことがわかった。以上より、オギペプチン A-D は同じペプチド残基を有しており、脂肪鎖部分が異なると示唆された。

構造解析は、主にオギペプチンBを用いておこなった。表9に示す¹H NMRからは、アミノ酸のメチル、 α -メチンと3つのオレフィンプロトンを検出した。¹³C NMRからは、44の炭素が観測され、それらはメチル4個、メチレン17個、メチン13個、4級炭素10個とアサインされた。各種2D NMR により部分構造を解明し（図16）、脂肪酸の構造はn-5-ドデセノン酸であること、 β -ヒドロキシDabを3つ含有することを明らかにした。

それぞれのアミノ酸のつながりは、パラジウム還元および、部分加水分解によって得たデアシル誘導体（オギペプチンX）を用いて解析した（図17）（表8）。また、アミノ酸の立体は改良Marfey法で決定し、DhbはNOEとTOCSY（図18）によってZ体と決定した。

オギペプチンA、C、Dについて、オギペプチンBと同様に部分加水分解したところ、同じデアシル誘導体を得られたことから、それぞれの違いは脂肪鎖部分であることが判明した。脂肪鎖部分の構造は、A、CについてはGC-MSで標品と合わせることで決定し、DについてはNMRとLinked-scanで決定した（図19）。

Table 7 ¹H and ¹³C NMR signal assignments of ogipeptin B (5) in 0.04N DCI/D₂O

	Position	δ_C	δ_H
Dhb	1	168.0 (s)	
	2	129.0 (s)	
	3	133.2 (d)	6.60 (1H, q, 7.0 Hz)
	4	13.2 (q)	1.77 (3H, d, 7.0 Hz)
Dab	1	173.5 (s)	
	2	53.0 (d)	4.42 (1H, *)
	3	29.0 (t)	2.15 (1H, m) 2.27 (1H, m)
	4	37.1 (t)	3.10 (2H, *)
Leu	1	175.0 (s)	
	2	53.7 (d)	4.25 (1H, *)
	3	39.4 (t)	1.60 (1H, *) 1.82 (1H, *)
	4	25.1 (d)	1.58 (1H, *)
	5	20.9 (q)	0.88 (3H, d, 6.3 Hz)
	6	22.9 (q)	0.93 (3H, d, 6.3 Hz)
Arg	1	174.6 (s)	
	2	53.5 (d)	4.36 (1H, dd, 3.3, 10.6 Hz)
	3	28.4 (t)	1.77 (1H, *) 1.97 (1H, m)
	4	25.0 (t)	1.58 (2H, *)
	5	40.8 (t)	3.20 (2H, m)
	6	157.3 (s)	
β -OH Dab-1	1	171.4 (s)	
	2	58.4 (d)	4.30 (1H, *)
	3	67.4 (d)	4.30 (1H, *)
	4	42.7 (t)	3.10 (1H, *) 3.28 (1H, *)
β -OH Dab-2	1	170.7 (s)	
	2	56.9 (d)	4.42 (1H, *)
	3	67.5 (d)	4.30 (1H, *)
	4	42.4 (t)	3.04 (1H, m) 3.28 (1H, *)
β -OH Dab-3	1	172.7 (s)	
	2	56.9 (d)	4.48 (1H, d, 2.4 Hz)
	3	69.7 (d)	4.21 (1H, m)
	4	43.2 (t)	3.10 (1H, *) 3.58 (1H, dd, 4.2, 14.1 Hz)
Fatty acid	1	178.4 (s)	
	2	35.5 (t)	2.42 (2H, m)
	3	25.9 (t)	1.68 (2H, m)
	4	26.7 (t)	2.10 (2H, m)
	5	129.6 (d)	5.42 (1H, m)
	6	132.6 (d)	5.52 (1H, m)
	7	27.2 (t)	2.02 (2H, m)
	8	29.5 (t)	1.32 (2H, *)
	9	28.8 (t)	1.22-1.29 (2H, *)
	10	31.6 ^a (t)	1.22-1.29 (2H, *)
	11	22.6 ^a (t)	1.22-1.29 (2H, *)
	12	14.0 (q)	0.85 (3H, t, 6.8 Hz)

Spectra were recorded at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, respectively, in 0.04 N DCI/D₂O.

Chemical shifts are referenced to HDO at 4.80 ppm for ¹H and dioxane at 67.2 ppm for ¹³C.

* Not clearly observed due to overlapping.

a) interchangeable

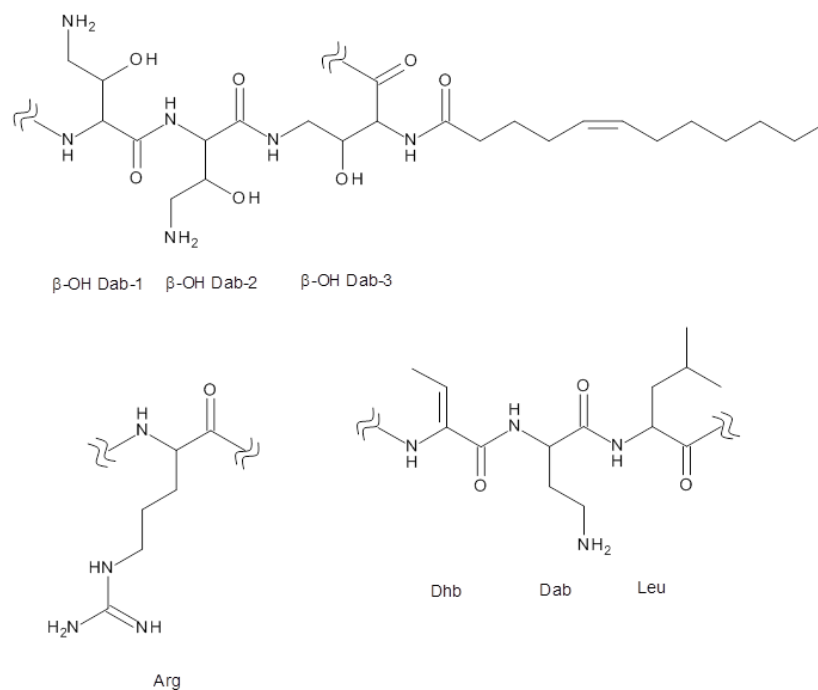


Figure 16 Partial structures obtained from the NMR analyses of ogipeptin B.

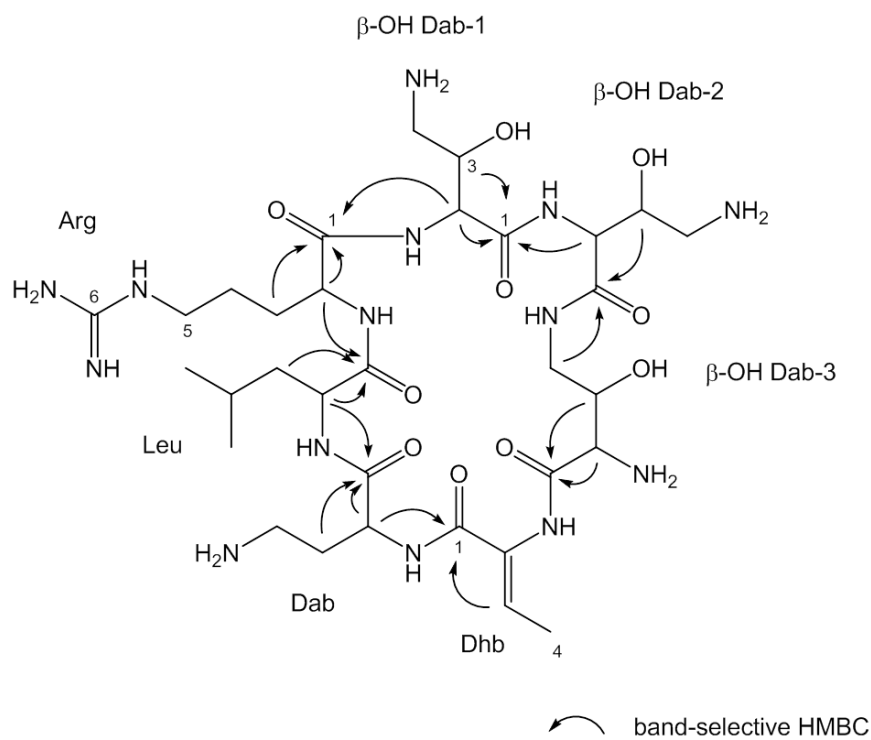


Figure 17 Band-selective HMBC correlations of deacyl derivative of ogipeptin B focused on the carbonyl region.

Table 8 ^1H and ^{13}C NMR signal assignments of ogipeptin X in D_2O

	Position	δ_{C}	δ_{H}
Dhb	1	168.2 (s)	
	2	129.0 (s)	
	3	131.9 (d)	6.56 (1H, q, 7.0 Hz)
	4	13.0 (q)	1.78 (3H, d, 7.0 Hz)
Dab	1	173.7 (s)	
	2	53.4 (d)	4.35 (1H, *)
	3	29.0 (t)	2.18 (2H, m)
	4	36.9 (t)	3.09 (2H, *)
Leu	1	174.8 (s)	
	2	53.8 (d)	4.12 (1H, *)
	3	38.5 (t)	1.62 (1H, *) 1.82 (1H, *)
	4	25.2 (d)	1.50 (1H, *)
	5	20.8 (q)	0.88 (3H, d, 6.0 Hz)
	6	23.0 (q)	0.93 (3H, d, 6.0 Hz)
Arg	1	174.5 (s)	
	2	53.2 (d)	4.35 (1H, *)
	3	28.2 (t)	1.65 (1H, *) 1.87 (1H, *)
	4	25.1 (t)	1.46 (2H, *)
	5	40.8 (t)	3.08 (2H, *)
	6	157.3 (s)	
β -OH Dab-1	1	171.3 (s)	
	2	58.1 (d)	4.31 (1H, d, 5.0 Hz)
	3	67.4 (d)	4.25 (1H, *)
	4	42.6 (t)	3.06 (1H, *) 3.23 (1H, *)
β -OH Dab-2	1	171.2 (s)	
	2	56.8 (d)	4.38 (1H, d, 8.5 Hz)
	3	67.4 (d)	4.25 (1H, *) 3.02 (1H, dd, 10.0, 12.5 Hz)
	4	42.3 (t)	3.23 (1H, *)
β -OH Dab-3	1	170.6 (s)	
	2	56.1 (d)	3.97 (1H, br. s)
	3	69.5 (d)	4.11 (1H, *)
	4	43.1 (t)	3.26 (1H, *) 3.59 (1H, dd, 4.0, 13.5 Hz)

Spectra were recorded at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C , respectively, in D_2O .

Chemical shifts are referenced to HDO at 4.80 ppm for ^1H and dioxane at 67.2 ppm for ^{13}C .

* Not clearly observed due to overlapping.

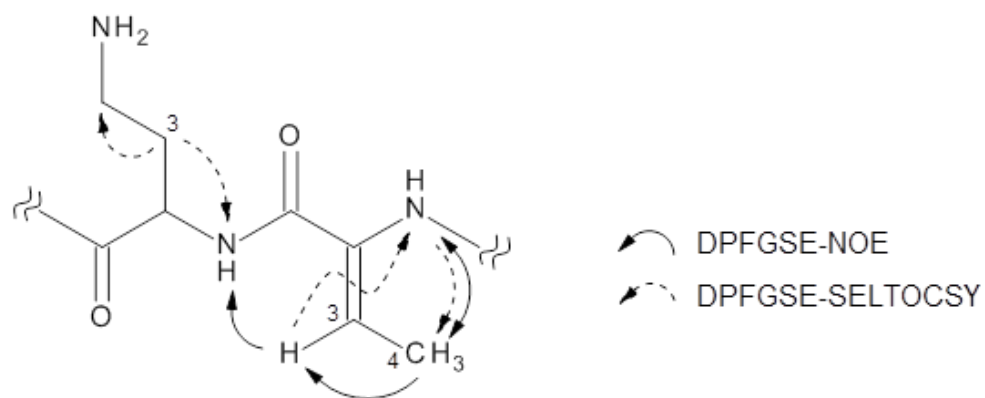


Figure 18 Configuration of dehydrobutyryne (Dhb).

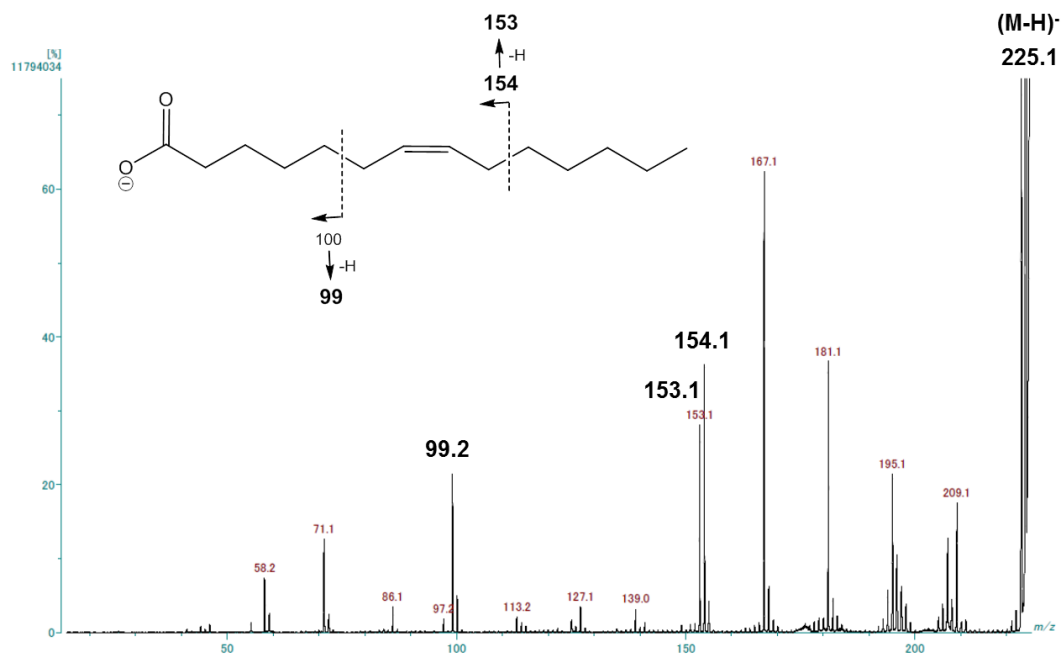
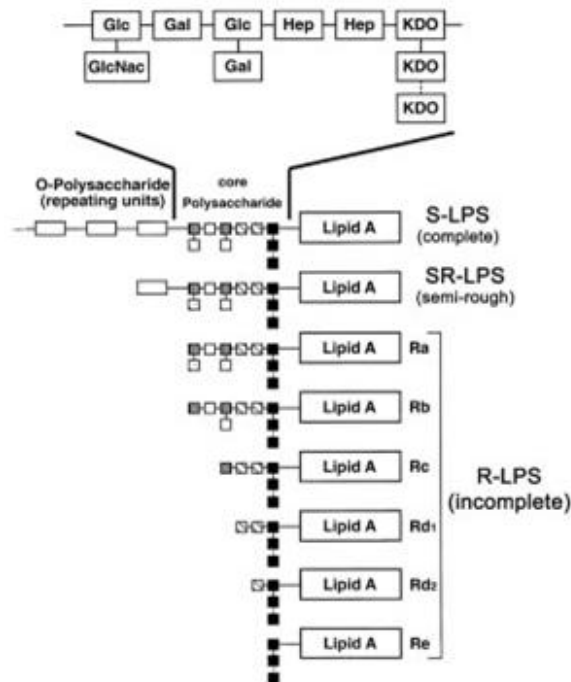


Figure 19 Linked-scan spectrum of the fatty acid of ogipeptin D.

1.3 考察

LPS は単球やマクロファージなど、TLR4 を発現する細胞に結合して炎症応答を誘導する。LPS 阻害剤の探索をおこなうにあたり、細胞への結合段階を標的とするのが、その後の細胞応答全体を抑制するためには効果的であると考えた。そこでまず初めに、細胞表面に LPS が結合するために必要な分子を明らかにするべく検討をおこなった。その結果、図 7 のように、HEK293T 細胞に CD14 を発現させることで、LPS と結合した高輝度ピークが検出され、細胞表面に発現する CD14 が LPS の結合に大きく寄与することを確認した。なお、CD14 発現細胞においても、ほかの細胞と同様に低輝度のピークが検出されたが、これは一過性発現では CD14 遺伝子が導入されなかった細胞であると考えられる。また、HEK293 細胞に CD14、TLR4、MD-2 の発現ベクターを遺伝子導入し、LPS 刺激に対する応答性を調べたところ、CD14 を発現しない場合はシグナル応答が観察されなかった（未発表データ）。これらの結果から、LPS が細胞に結合し、膜貫通タンパク質である TLR4 との相互作用を経て細胞内へのシグナル伝達を惹起するためには、LPS と CD14 の相互作用が重要であることが示された。そこで、LPS シグナル伝達の最初期の段階を制御する化合物を獲得する目的で、LPS と CD14 の相互作用を阻害する物質を探索することに決定した。

今回、LPS が HEK293T 細胞に結合するためには、CD14 の発現が必要であることが示された。LPS のなかには、R-LPS と呼ばれる糖鎖部分が短いものが存在し（図 20）、もっとも短鎖である Re-LPS はシグナル伝達に必ずしも CD14 を必要としないと報告されている⁴⁰が、一般的には LPS の認識には CD14 が重要な役割を担うと考えられている。実際、マクロファージの LPS 応答において、CD14 依存性の場合には CD14 非依存性よりも低濃度で TNF- α を産生誘導するという報告がある²⁴。本研究では、LPS-CD14 FRET アッセイには *E. coli* J5 由来の Rc-form の LPS を用い、それ以外では *E. coli* 0111:B4 由来の S-form の LPS を用いた（図 20）。



Eur. J. Immunol. **36**, 701–711 (2006)

Figure 20 S- and R-form structure of LPS.

LPS と CD14 の相互作用を阻害する物質の探索については、自社所有の微生物サンプル約 6 万検体を対象に、ハイスループットスクリーニングを実施することを目指した。そのためには、細胞を用いたフローサイトメトリーによる LPS 結合評価系では操作の煩雑さが問題であった。また、細胞を用いた評価系の場合、天然物抽出物中には細胞障害性を有する化合物が含まれる可能性が高いため、その影響を受けないようにサンプルを大幅に希釈して評価する必要があった。しかしこの場合には、活性物質の検出感度が悪くなり、阻害物質の検出頻度が低下することが懸念された。これらの問題を排除する目的で、阻害物質の作用点を限定しやすい、シンプルな非細胞アッセイを新たに構築した。CD14 には、GPI で細胞膜にアンカリングして存在する膜型 CD14 と、血中に遊離している可溶型 CD14 があり、いずれも LPS に結合して機能することが知られる。構造上、両者の LPS 結合活性に差異はないと考えられるため、スクリーニングのアッセイ系には可溶型 CD14 を用いて液相反応系とすることで操作性を向上させた。LPS と CD14 の相互作用を高感度で検出するために、LPS はビオチン標識し、ストレプトアビジンで検出した。ビオ

チン基は LPS の糖鎖部分に導入されるため、LPS の活性本体であるリポド A 部分の反応に影響を受けることはないと考えられ、アッセイに供した。

構築した FRET アッセイ系では、ユーロピウムと XL665 が近接すると、337 nm で励起した際にエネルギー遷移が生じ、665 nm の蛍光が放出される。すなわち、溶液中の LPS と CD14 が相互作用すると 665 nm の蛍光を検出することができる。FRET アッセイ系は、分子間の相互作用を、結合体／非結合フリー体を分離することなくその比率を測定することができる、いわゆるホモジニアスな方法である。分離操作や洗浄操作を必要としないため、操作の簡便さや時間の短縮、ばらつきの低下など、多検体を処理するのに適した特長があることから、本研究で採用した。さらなる工夫として、バッファーA に LPS と CD14 検出試薬、バッファーB に CD14 と LPS 検出試薬を添加した反応液を調製し、スクリーニング検体を添加して混合するのみというシンプルな系とした。また、阻害剤の検出感度を高めるため、反応に使用する LPS と CD14 はなるべく低濃度に設定し、かつ FRET で結合を検出するのに十分な濃度とした。条件検討の結果、384 ウェルプレートで全液量 20 μ L のミニチュア化が可能となり、ハイスループットスクリーニングを効率的に実施することに成功した。

構築した系の妥当性を評価するために、陽性コントロールとして PMB を用いた。PMB は LPS 作用を中和することが知られ、臨床でも LPS 吸着剤として用いられている環状ペプチドである。図 8 に示すように PMB は濃度依存的な阻害作用を示し、IC₅₀ 値は 3.6 nM であった。PMB の LPS 中和活性に関しては、LPS 検出に用いられるリムルスアッセイにおいて 30 nM で 50% 阻害を示すとの報告がある⁴¹。リムルスアッセイとは、カプトガニの血球抽出物が LPS に反応すると凝固することを応用した LPS 検出方法である⁴²。また、PMB は固相化した LPS に対する LBP の相互作用を、約 50 nM の IC₅₀ 値で阻害するという報告がある⁴³。LPS 濃度や検出方法などの反応条件によって阻害の程度は異なるため、単純には阻害濃度の比較はできないものの、構築したアッセイ系は LPS 阻害剤を高感度で検出する系として機能すると判断し、以降、スクリーニングに用いた。

本アッセイ系を用いたスクリーニングの結果、2 系統の新規化合物群を取得することに成功し

た。一般に天然物サンプルを用いたランダムスクリーニングにおいては、天然物サンプルの性質、つまり多成分の混合に起因する非特異的な影響を受ける懸念がある。しかしスクリーニングの結果から、本系は真のヒットを選出する、天然物スクリーニングに適した評価系であることが明らかとなった。

細菌が有する LPS には構造上の多様性が認められ、それに応じて免疫系刺激活性についても刺激活性の低いものが存在することが報告されている⁴⁴。刺激活性はリピド A 構造に依存しており、化学合成リピド A アナログに関しては、アゴニスト（刺激の誘導）あるいはアンタゴニスト（刺激の阻害）の創製および作用解析が以前からおこなわれてきた⁴⁵。緒言で述べたエリトランもリピド A アナログのアンタゴニストである。しかしながら、リピド A アナログは、種差や濃度域などアッセイ環境に応じて、TLR4 に対してアンタゴニストとアゴニストの両作用を發揮することがあると報告されている⁴⁶。よって、望む作用に反する機能が副作用につながるリスクをなくすため、微生物が生産するリピド A 関連物質は本研究ではスクリーニングヒットとして選択しないこととした。そのため、スクリーニングの過程で、初期陽性検体についてリムルスアッセイをおこない、リピド A 関連物質が検出された場合には、陽性検体から排除した。

今回の活性物質スクリーニングでは、いずれもペプチド性の新規化合物を生産する細菌が見出された。ペドペプチンの生産菌はペドバクター属と同定した。ペドバクターは比較的新しく同定された属であり⁴⁷、ユニークな代謝酵素発現—たとえば低温で機能する β 1,3-グルカナーゼやメタロプロテアーゼなどが報告されている細菌である^{48, 49}。しかし、ペドバクター属に関しては、ペプチド性抗生物質の生産は報告されていなかった。もう一方のオギペプチンの生産菌は海藻から分離された海洋細菌であり、増殖に海水が必要であることがわかった。そこで培養にはマリンブロスを用い、安定した増殖を確保した。生産菌が属するシュードアルテロモナスは、オギペプチンと類似したペプチド性抗生物質を生産することが報告されている⁵⁰。これは、我々がオギペプチンを (B-5529 として) 報告した後に特許出願されている。構造はオギペプチンとはロイシンおよびアシル基部分が異なり、LPS に対する結合活性を有することが出願明細に記載されている。この化合物とオギペプチンは、特徴的な塩基性アミノ酸である β -ヒドロキシ Dab を 3

つ含有しているという共通点がある。これに対し、バチルス属が生産する環状ペプチドで LPS 活性阻害物質であるポリミキシン類には、 β -ヒドロキシ Dab は含まれていない。このように今回得られたペドペプチンとオギペプチンは、構造と生産菌に関して、従来知られていない特徴を有している新規化合物であった。

ペドペプチンおよびオギペプチンの初段階の精製では、DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーに供した後、アセトン水にギ酸を添加することで溶出が可能であった。このことから、活性物質が塩基性残基と疎水性残基を有することが示唆された。オギペプチンの逆相クロマトグラフィーでは、移動相にアセトニトリルと 5 mM 硫酸ナトリウム水溶液-0.5%リン酸を用いた。これは、同じく環状ペプチドである PMB の単離方法にヒントを得たものであり、オギペプチンでも同条件を用いることで分離可能であることが明らかとなった。

構造解析は物理化学的性質や各種スペクトル解析をもとにおこなった。ペドペプチンは新規の環状デプシペプチド、オギペプチンは新規の環状ペプチドであることがわかった。NMR による解析は、溶解性と分解能の点から溶媒が限定されたため、 $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ あるいは methanol-d_4 を使用した。立体構造の決定は文献情報などを参考に進めた。アミノ酸の立体配置は改良 Marfey 法により解析をおこなったが、ペドペプチンに 2 モルずつ存在するロイシンと Dap については、D、L 体の決定には至っていない。ロイシンについては D、L 体が 1 モルずつ存在することが判明した。しかし、いずれもキモトリプシン処理によって得られた同一のペプチド断片に含まれているため、どちらのロイシンが D あるいは L 体かを決定することができなかった。一方 Dap については、キモトリプシン処理によって得られた 2 つの断片に 1 モルずつ含まれていたため、それぞれの断片について再解析した。しかし、いずれも D、L 体の混合として検出された。Dap については、酸加水分解によってラセミ化することが報告されている⁵¹。よって、本検討においても同様に、ラセミ体として検出されたと考えられる。それぞれの立体配置の決定にはさらなる検討が必要である。

構造解析の結果、両化合物群とも塩基性アミノ酸を多く含んでいた。PMB をはじめとする既に報告されているペプチド系の LPS 結合物質は塩基性アミノ酸を有し、負電荷を有する LPS と

の相互作用に寄与している。LPS の CD14 への結合阻害剤として見出されたペドペプチン、オギペプチンも同様に塩基性アミノ酸を有していることから、これらの化合物が LPS との結合活性を有している可能性が示唆された。

第二章 ペドペプチン、オギペプチンの生物活性

小序

第一章で単離精製した新規 LPS 阻害物質、ペドペプチンおよびオギペプチンについて、生物活性を評価した。

まず始めに、スクリーニングに用いた LPS と CD14 の相互作用検出系 (FRET アッセイ) で阻害活性を評価したところ、4.1-47 nM の強い IC₅₀ 値を示した。また、CD14 を強制発現させた細胞に対する LPS の結合を抑制した。

ペドペプチンとオギペプチンは、ヒト培養細胞や動物の LPS 応答も抑制した。マクロファージ様に分化した細胞は、LPS 刺激に応じて TNF- α を産生するが、両化合物は TNF- α 産生を濃度依存的に抑制した。マウスモデルにおいては、急性毒性用量と乖離した低濃度域で、LPS 投与した際の血中 TNF- α の濃度上昇を抑制することが明らかになった。

2.1 材料と方法

LPS と CD14 の相互作用におよぼす影響

材料と方法は、第一章と同様に実施した。

細胞の LPS 応答におよぼす影響

ヒト単球系細胞株 U937 (CRL-1593.2) は、ATCC より購入した。U937 細胞は、FBS 10% 含有 RPMI1640 培地 (インビトロジェン) を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞は、96 ウェルプレートに 2x10⁵ cells/mL で 100 μL ずつ播種し、30 ng/mL の phorbol 12-myristate 13-acetate を添加して 3 日間培養することでマクロファージ様細胞に分化誘導した。その後上清を除去し、新しい培地に LPS (*E. coli* O111:B4) 5 ng/mL と被験化合物を同時添加し、CO₂ インキュベーター内に静置した。4.5 時間経過後、上清を回収し、上清中の TNF-α の濃度を測定した。測定には HTRF キット (62TNFPEB、シスバイオ) を用い、1 反応あたり上清 10 μL を使用して添付文書通りに処理した。TR-FRET は Discovery (パッカード) を用い、337 nm で励起し、665 nm の蛍光を検出した。被験化合物の阻害率 (%) は下記の式にしたがって算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{(\text{化合物存在下LPS刺激のFRET比}) - (\text{無刺激のFRET比})}{(\text{LPS刺激のFRET比}) - (\text{無刺激のFRET比})} \right\} \times 100$$

細胞障害活性

HEK293 (CRL-1573) 細胞株は、ATCC より購入した。HEK293 細胞は 96 ウェルプレートに 10% FBS 含有 DMEM 培地で 100 μL ずつ播種し、37°C で一晩 5% CO₂ インキュベーター内で培養後、種々の濃度の被験化合物を添加し、さらに 20 時間培養した。細胞生存率は、Cell-TiterGlo (プロメガ) を用い、添付文書にしたがって測定した。

マウス *in vivo* 試験

急性毒性の試験については、ddY マウス（雄、日本エスエルシー）を用いて、被験物質を静脈内投与し、4 日後の生存を観察した。3 例のうち、1 例以上で死亡例が検出された最低の用量を最低毒性用量とした。本動物試験は、社内倫理規定に則って実施した。

LPS 刺激抑制活性の試験については Endo らの方法⁵²を参考にしておこなった。C3H/HeN マウス（雄、日本エスエルシー）に 1 mg/kg の被験化合物を静脈内投与し、5 分後、50 µg/kg の LPS (*E.coli* 0111:B4、シグマアルドリッチ) と 1 g/kg のガラクトサミンを静脈内投与した。1 時間後、マウスより採血し、血漿中 TNF- α 濃度を ELISA で測定した。本動物試験は、社内倫理規定に則って実施した。

2.2 結果

2.2.1 LPS の結合におよぼす影響

LPS-CD14 FRET アッセイ系における作用

スクリーニングを実施するために構築した、バッファー内での LPS と CD14 の相互作用を FRET で検出する評価系において、単離精製した化合物の阻害作用を検討した。図 21 に示すように、ペドペプチン、オギペプチンとも、濃度依存的に相互作用を阻害した。50%の阻害を示す濃度である IC₅₀ 値は、ペドペプチン A、B、C がそれぞれ 20、11、47 nM、オギペプチン A、B、C、D がそれぞれ 4.8、6.0、4.1、5.6 nM であった。

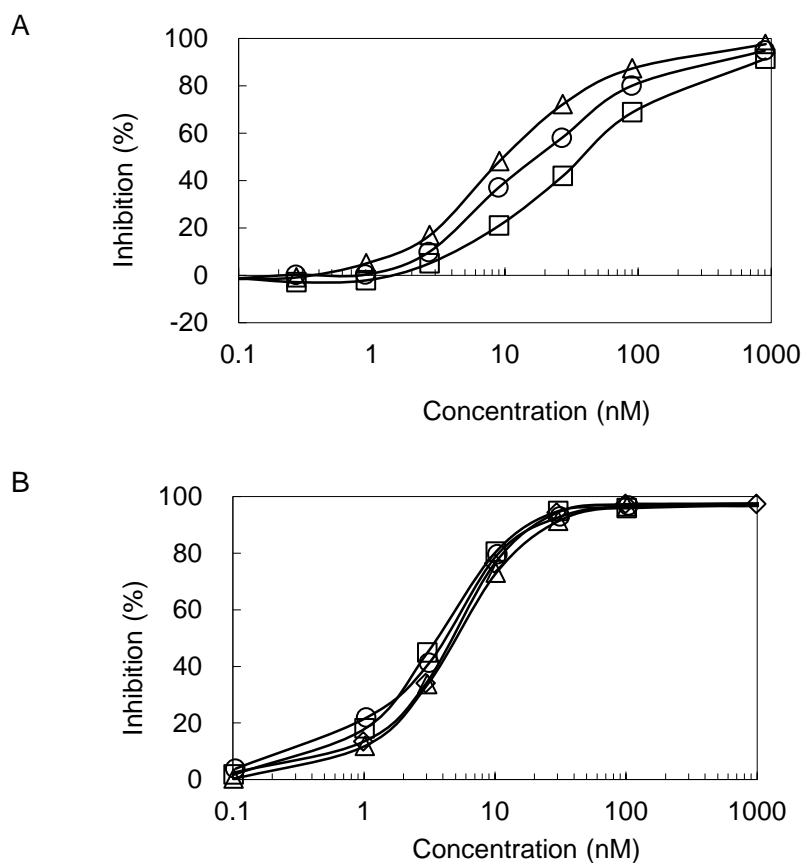


Figure 21 Inhibition of LPS-CD14 binding by pedopeptins and ogipeptins in FRET assay.

TR-FRET assay was performed in the presence of various concentrations of (A) pedopeptin A (circles), pedopeptin B (triangles) and pedopeptin C (squares) and (B) ogipeptin A (circles), ogipeptin B (triangles), ogipeptin C (squares) and ogipeptin D (diamonds).

細胞への LPS 結合におよぼす作用

膜型 CD14 を一過性発現させた HEK293T 細胞 (mCD14-293T) に FITC-LPS を添加し、そこに被験物質を添加したときの蛍光強度の平均値 (mean fluorescence intensity, MFI) を図 22 に棒グラフで示した。mCD14-293T に FITC-LPS を添加すると、添加しないときに比較して細胞表面の FITC 輝度は増加し、明確な結合を示した。ペドペプチン A-C および PMB は、濃度依存的に MFI を低下させ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加すると LPS 非添加レベルに近い MFI まで低下させた。オギペプチン A-D については、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における MFI はほぼ同等であり、観察された最大活性は、LPS による輝度上昇の約 50% の低下にとどまった。デアシル体であるオギペプチン X は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで作用をおよぼさなかった。なお、CD14 を発現していない HEK293T 細胞に FITC-LPS を添加しても、MFI は上昇しなかった。

なお、化合物 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度は、それぞれ 0.90 μM (ペドペプチン A)、0.91 μM (ペドペプチン B)、0.91 μM (ペドペプチン C)、1.1 μM (オギペプチン A)、1.0 μM (オギペプチン B)、1.0 μM (オギペプチン C)、0.99 μM (オギペプチン D)、1.3 μM (オギペプチン X)、0.72 μM (PMB) に相当する。

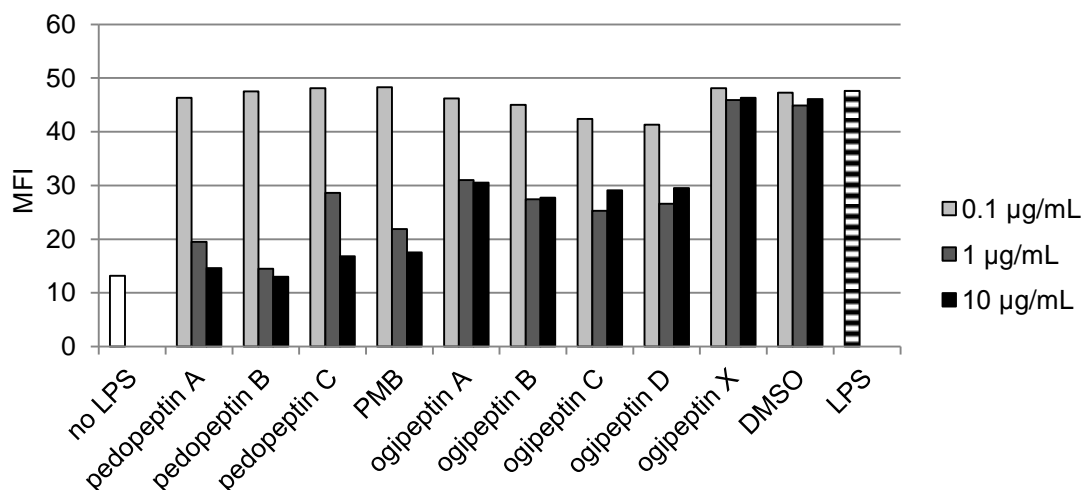


Figure 22 Inhibition of LPS binding to the CD14-expressing cells by pedo-peptins and ogipeptins.

HEK293T cells expressing CD14 were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of FITC-LPS in the absence or presence of various concentrations of pedo-peptins and ogipeptins. The mean fluorescence intensity (MFI) of FITC histogram of each analysis is shown. Data for DMSO show MFI when the same concentration of DMSO was added as compound treatment.

2.2.2 細胞の LPS 応答におよぼす影響

ペドペプチンとオギペプチンは、マクロファージ様に分化した U937 細胞が LPS 刺激にตอบสนองして誘導する TNF- α の産生を阻害した。阻害作用はペドペプチン B の IC₅₀ 値が約 0.1 μ M ともっとも強く、それ以外の化合物は IC₅₀ 値が 0.3-0.5 μ M で同程度であった。阻害曲線を図 23 に示した。

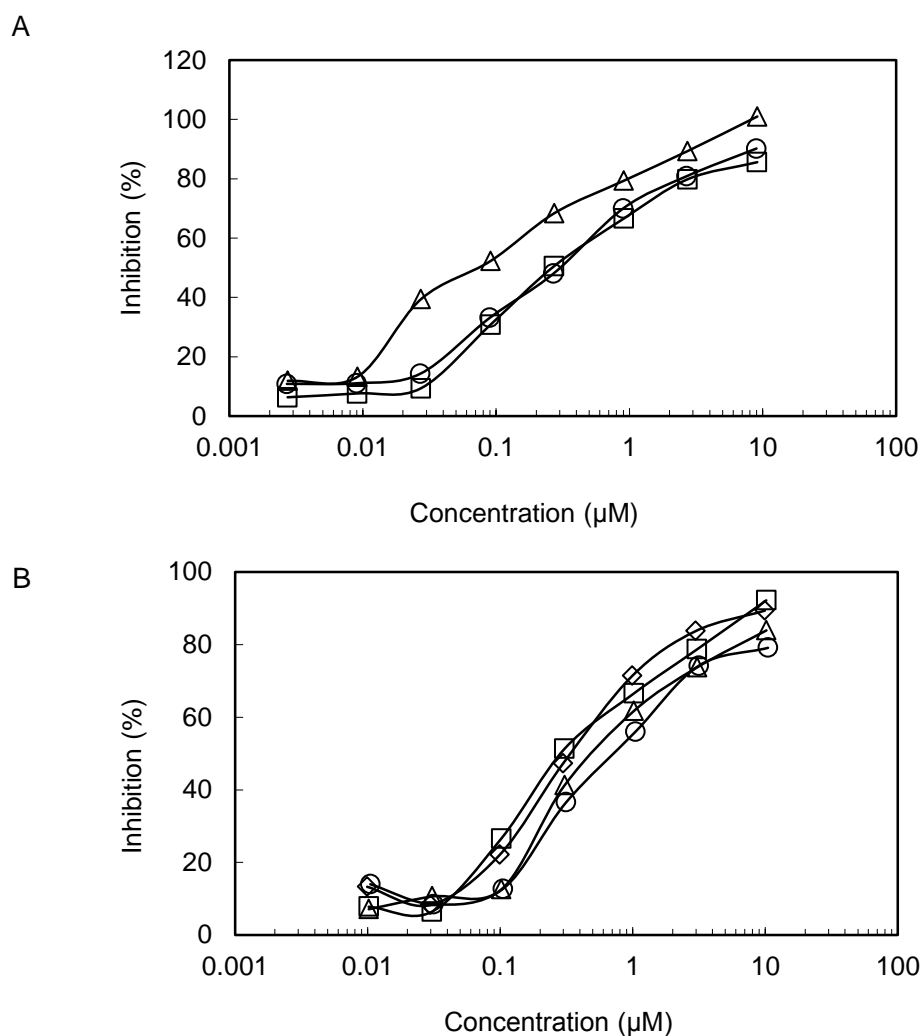


Figure 23 Inhibition of LPS-induced TNF- α production by peditopeptins and ogipeptins.

U937 cells differentiated into macrophage-like cells were treated with LPS and indicated concentrations of compounds for 4.5 h. Then TNF- α concentration in the supernatant was measured as described in materials and methods. (A) peditopeptin A (circles), peditopeptin B (triangles) and peditopeptin C (squares). (B) Ogipeptin A (circles), ogipeptin B (triangles), ogipeptin C (squares) and ogipeptin D (diamonds).

2.2.3 細胞障害活性

HEK293 細胞に対し、ペドペプチン A は 100 μM 、ペドペプチン B は 30 μM で細胞を死滅させた (図 24A)。ペドペプチン C とオギペプチン D の細胞生存率に対する IC_{50} 値は約 100 μM であった (図 24A、B)。オギペプチン A、B は 100 μM まで顕著な細胞障害を示さず、オギペプチン C の 100 μM における細胞障害活性は約 30% であった (図 24B)。

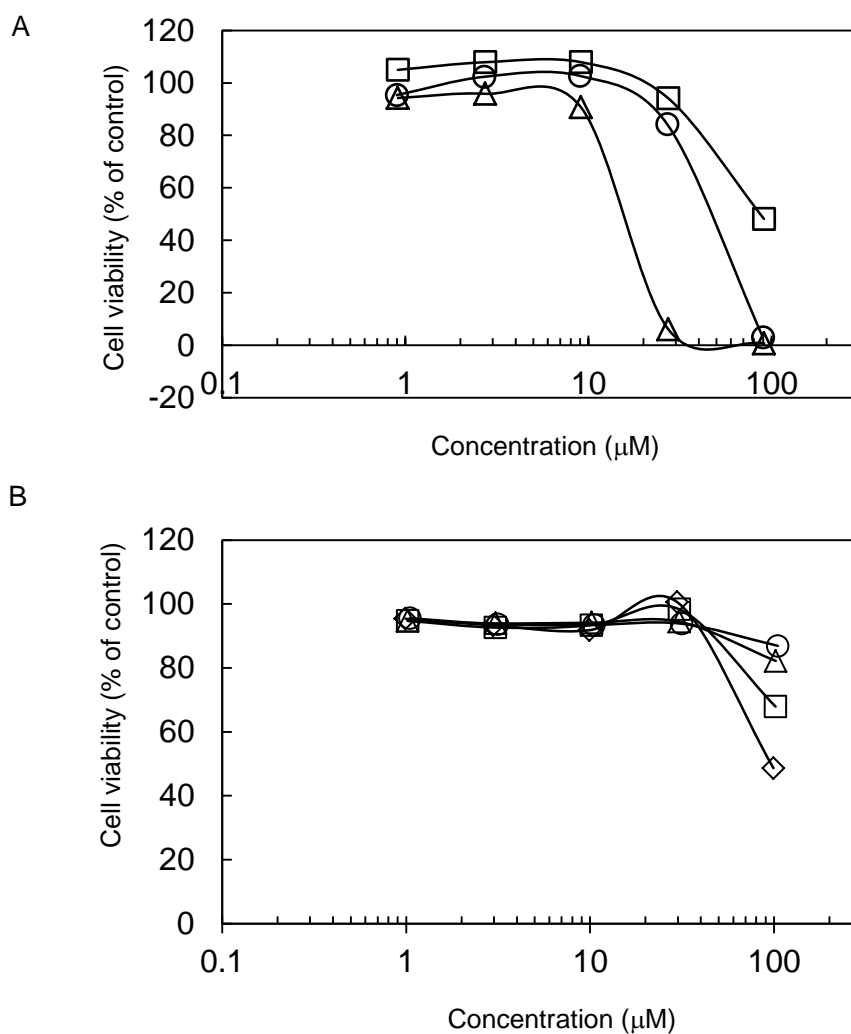


Figure 24 Effects on cell viability by pedopeptins and ogipeptins.

HEK293 cells were treated with indicated concentrations of (A) pedopeptin A (circles), pedopeptin B (triangles) and pedopeptin C (squares), (B) ogipeptin A (circles), ogipeptin B (triangles), ogipeptin C (squares) and ogipeptin D (diamonds) for 20 h. Then, the cell viability was measured using Cell-Titer Glo according to the manufacturer's instructions.

2.2.4 マウス急性毒性

マウスに被験化合物を投与し、死亡が観察された最低用量を表9に示した。なお、用量は、3、10、30 mg/kg のいずれかで投与した。死亡例が観察された場合には、より低用量にて投与し、生存率に影響がないことを確認した。

ペドペプチン A、C は 30 mg/kg まで死亡例が無く、もっとも低毒性であった。次に毒性が低かったのはペドペプチン B およびオギペプチン A で、30 mg/kg で死亡例が観察された。オギペプチン B、C、D は 10 mg/kg から死亡例が観察され、PMB と同程度の毒性を示した。

Table 9 *In vivo* acute toxicity in mice

Minimum toxic dose (mg/kg)							
pedopeptin			ogipeptin				PMB
A	B	C	A	B	C	D	
>30	30	>30	30	10	10	10	10

2.2.5 マウス *in vivo* 薬効試験

LPS に誘導される炎症のマウスモデルとして、LPS を静脈内投与する系で薬効を評価した。マウスに LPS を投与すると、血中の TNF- α の濃度が上昇することを確認した。LPS 投与前にペドペプチンあるいはオギペプチンを投与しておくことで、TNF- α の濃度上昇が抑制されることが明らかとなった。血中における TNF- α 産生を 50% 抑制する投与量である ED₅₀ 値を表 10 に示した。

薬効はオギペプチンのほうが強く、ED₅₀ 値は 0.12-0.39 mg/kg であった。ペドペプチンの ED₅₀ 値は 0.61-0.80 mg/kg で、オギペプチンに比較して 2-7 倍の高用量を要したが、いずれも ED₅₀ 値が 1 mg/kg 未満と強い薬効を示した。なお、PMB は、ペドペプチンとオギペプチンより 1/4 から 1/27 の低用量で薬効を示した。

Table 10 *In vivo* activity in LPS-injected mouse model

ED ₅₀ (mg/kg)							
pedopeptin			ogipeptin				PMB
A	B	C	A	B	C	D	
0.69	0.61	0.80	0.34	0.18	0.39	0.12	0.03

2.3 考察

バッファー中の LPS と CD14 の相互作用を、ペドペプチンとオギペプチンは濃度依存的に阻害した。また、濃度を上げると完全に阻害した (図 21)。阻害活性はオギペプチンのほうが強く、 IC_{50} 値は、ペドペプチンが 11-47 nM に対し、オギペプチンは 4.1-6.0 nM であった。一方、LPS の細胞への結合に対する阻害作用は、ペドペプチンのほうが強かった (図 22)。図 22 に示したように、ペドペプチンを添加すると、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約 10 μM) まで濃度依存的に LPS の結合を阻害し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でほぼ完全に阻害した。一方、オギペプチンは、1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における阻害強度はほぼ同等で、阻害の程度も 50%程度にとどまった。この差異、すなわちバッファー中と細胞表面での LPS 結合に対する阻害効果の違いは、各アッセイ系においてそれぞれの化合物群の阻害様式が異なることを示唆していると考えられた。

LPS の細胞への結合は、LPS が細胞に炎症反応を誘導するために必要なステップである。そこで次の項では、細胞の LPS に対する炎症応答の代表として、TNF- α 産生におよぼす化合物の影響について調べた。特に、細胞に対する LPS の結合阻害が 50%程度で頭打ちになったオギペプチンの効果に興味を持たれた。試験の結果、マクロファージ様に分化させた U937 細胞の LPS 刺激による TNF- α 産生を、ペドペプチンとオギペプチンは濃度依存的に阻害した。オギペプチンは、10 μM (約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 80-90%程度まで阻害した (図 23)。

以上の結果から、これまでに得られた細胞評価系におけるオギペプチンの作用に着目して考察したい。オギペプチンは、CD14 を発現させた HEK293T 細胞に対する LPS の結合を最大で 50%程度までしか阻害しなかったが、U937 細胞におけるサイトカイン産生誘導を 80-90%抑制することができた。最大効果が異なる理由として、ひとつは、U937 細胞に対しては LPS の結合をオギペプチンが強く阻害した可能性は否定できていない。あるいは、オギペプチン存在下、細胞表面に LPS が到達していてもサイトカイン誘導シグナルを伝達できず、サイトカイン産生が阻害された可能性がある。例えば、受容体複合体形成が不完全であり、シグナル伝達を惹起するためのコンフォメーションを取れない場合などが想定される。

U937 細胞がオギペプチンによって、想定した作用とは異なる非特異的なメカニズムによって

障害を受けたためにサイトカイン産生が阻害された可能性は低いと考えられる。実際、顕微鏡下で細胞を観察したところ、形態的な細胞へのダメージは見られなかった。よって、オギペプチンは、サイトカイン産生誘導過程のいずれかの段階に作用している可能性が高いと推測された。

ペドペプチン、オギペプチンの細胞障害活性については、HEK293 細胞を用い、細胞内 ATP を検出する試薬で評価をおこなった (図 24)。HEK293 細胞はおよそ 24 時間で 2 倍程度に増殖する。よって、無処理細胞コントロールに対して ATP カウントが低値の場合は、被験物質により細胞死が誘導されたか、あるいは細胞増殖が阻害されたことを意味する。24 時間後にコントロールの値の 50%を下回れば、開始時より細胞数が減少した、すなわち細胞死が誘導されたことを示す。50%以上であっても、増殖後に細胞死が誘導された可能性はある。試験の結果、ペドペプチンは 10 μM まで、オギペプチンは 30 μM まで、ATP の減少は見られなかった。両化合物を比較すると、ペドペプチンのほうがオギペプチンよりも細胞障害活性が強い傾向があり、全体としては、U937 細胞の LPS 刺激による TNF- α 産生に対する阻害活性の強さと相関する傾向があった。しかしながら、これまでに試験した細胞評価系、すなわち LPS 結合試験および TNF- α 産生試験では、細胞障害が検出されていない被験物質 10 μM の濃度で LPS 結合あるいは LPS 刺激による TNF- α 産生応答が阻害されていた。よって、細胞評価系における阻害効果は細胞障害によるものではなく、LPS の作用を阻害したことに起因すると考えられる。

In vivo 試験では、ペドペプチン、オギペプチンとも、PMB と同程度の急性毒性が認められたか、あるいはより高用量の 30 mg/kg まで毒性が認められなかった (表 9)。対照化合物である PMB は、動物試験で薬効および毒性が報告されている^{30, 31, 32, 33}。ポリミキシン類は全身暴露により腎毒性や神経毒性を誘発するため、静脈内投与することができない。また、経口吸収性がほとんどないことから、皮膚への塗布または腸管内細菌を選択的に抑制する目的で経口投与で使用されている。腎毒性の一因としては、正の電荷により腎の近位尿細管上皮に蓄積することが推測されている⁵³。ペドペプチン、オギペプチンも正に荷電する塩基性アミノ酸残基を有していることから、腎臓に毒性が発現する可能性がある。しかしながら現時点では腎毒性の有無は調べられていない。

薬効試験においては、いずれの化合物も ED₅₀ 値が 1 mg/kg を下まわる強力な活性を示した。ED₅₀ 値としては、PMB に比較して 4 倍から 27 倍の高用量となった。薬剤として開発する可能性を考えるとときには、薬効用量のみならず、薬効用量と毒性用量との開きを示す安全域が指標のひとつとして用いられる。それぞれの化合物の安全域を、薬効試験と急性毒性試験の結果から算出すると、表 11 のようになった。最低でも 26 倍の開きがあることから、LPS 投与マウスモデルにおける TNF- α の産生阻害は、生体に対する非特異的な毒性作用によるものではないと推測された。急性毒性用量を示すことができたオギペプチンに関して、安全域の数値で比較すると PMB にはおよばなかったが、安全域をさらに大きくするための構造改変などをおこなうことで、今後の展開の余地はあると考えられる。また、ペドペプチンとオギペプチンに関して、副作用など毒性面の評価を詳細におこなうことも、薬剤としての開発にあたり重要な検討課題である。

Table 11 Safety margin of pedopeptins and ogipeptins

Safety margin* (fold)							
pedopeptin			ogipeptin				PMB
A	B	C	A	B	C	D	
>44	49	>38	88	56	26	83	333

*Safety margin was calculated by dividing minimum toxic dose by *in vivo* ED₅₀ value.

第三章 ペドペプチン、オギペプチンの作用解析

小序

第二章では、ペドペプチンとオギペプチンが、細胞アッセイ系や動物モデルにおいて LPS の生理活性を抑制することを明らかにした。本章では、どのようにしてこれらの抑制作用を発揮するのか、選択性や作用機序に関して検討した。

まず始めに、LPS 以外の PAMPs を用いて、TNF- α 産生誘導に対するペドペプチンとオギペプチンの効果を評価したところ、LPS 刺激に選択的な阻害活性であることが明らかになった。選択性につながる作用機序として、化合物が LPS に直接相互作用する可能性を考えた。そこで表面プラズモン共鳴法で化合物と LPS の相互作用について検討したところ、いずれの化合物も LPS と直接相互作用することが示された。LPS は血清存在下では LPS binding protein (LBP) と結合して存在している。そこで、LPS と LBP の相互作用におよぼす影響を調べたところ、ペドペプチンによる相互作用の阻害は極めて弱かった一方、オギペプチンは LPS と CD14 の相互作用に対する阻害と同程度の濃度域で阻害することが明らかになった。

3.1 材料と方法

PAMPs による TNF- α の産生誘導

LPS (*E. coli* O111:B4) は、シグマアルドリッチより購入した。ペプチドグリカン¹はフルカより、(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys₄-OH, 3HCl (Pam₃CSK₄) は、カルビオケムより購入した。

PAMPs 刺激により TNF- α 産生を誘導するため、第二章で述べた方法で U937 細胞をマクロファージ様に分化させた。分化後、新しい培地に、5 ng/mL の LPS、1 μ g/mL のペプチドグリカン、あるいは 10 ng/mL の Pam₃CSK₄ と被験化合物を添加し、CO₂ インキュベーター内 37°C にて 4.5 時間培養した。その後、培養上清を回収し、TNF- α の濃度を HTRF キット (62TNFPEB、シスバイオ) を用いて測定した。

LPS に対する結合

ビオチン化 LPS (*E. coli* O111:B4) はインビボジェンから購入した。

LPS に対する相互作用は、Biacore3000 (GE ヘルスケア) を用いて表面プラズモン共鳴法で測定した。ビオチン化 LPS は、0.5 mg/mL で PBS に懸濁し、10 mM EDTA を添加して氷上で 2 分、0.5% デオキシコール酸ナトリウムを添加して数分間ソニケーションし、モノマー化した。13,000g で 2 分間遠心後、上清部分を固相化に用いた。センサーにストレプトアビジンチップを用い、PBS を移動相として、ビオチン化 LPS モノマーをおよそ 1,000RU になるように固相化した。

被験化合物は、DMSO/MeOH (1:1) で 1 mg/mL に溶解した。移動相は、10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.005% Tween20、5% DMSO を用い、25°C、30 μ L/分で使用した。被験化合物を移動相にて 1 μ g/mL から 3 倍希釈で 12 ng/mL の濃度まで希釈し、固相化した LPS に 5 分間かけて注入した。5 分後、0.5% デオキシコール酸ナトリウムを 20 秒間流すことで、固相化した LPS に結合した化合物を除去した。化合物と LPS の相互作用の解析は、1:1 の相互作用として BIA ソフトウェアバージョン 4.01 でおこなった。

LPS と LBP の相互作用におよぼす影響

LPS と CD14 の相互作用を FRET で検出する系を改変して、LPS と LBP の相互作用を検出する系を構築した。具体的には、第一章に記載した LPS-CD14 結合アッセイの反応系で、FBS を添加せず代わりに 0.1% の BSA を添加し、myc-CD14 に代えて myc-LBP を用いた。C 末 myc タグマウス LBP タンパク質は、COS-7 細胞に myc-LBP 発現プラスミドを一過性導入し、無血清培地に交換して 3 日間培養後、上清を回収してタンパク質溶液とした。これをバッファー B に 2.2% 添加して使用した。

3.2 結果

3.2.1 サイトカイン産生系における選択性評価

各種 PAMPs (LPS、ペプチドグリカン、Pam₃CSK₄) の刺激によって誘導される TNF- α 産生に対するペドペプチン、オギペプチンの作用を調べた。ペプチドグリカンはグラム陽性菌の主要な細胞壁構成因子であり、TLR2 のリガンドとして用いた。Pam₃CSK₄ はグラム陽性菌や陰性菌の細胞壁や細胞膜の構成因子であるリボプロテインのアシル化されたアミノ末端を模した合成リポペプチドであり、TLR2/TLR1 のリガンドとして用いた。

結果を、阻害曲線として図 25 に示した。いずれの被験化合物も、LPS 刺激に対して選択性をもって TNF- α の産生を阻害した。ペドペプチン B のみ、10 μ M で Pam₃CSK₄ に対して 50%以上の阻害を示したが、それ以外の化合物については、10 μ M まで明確な阻害活性は検出されなかった。

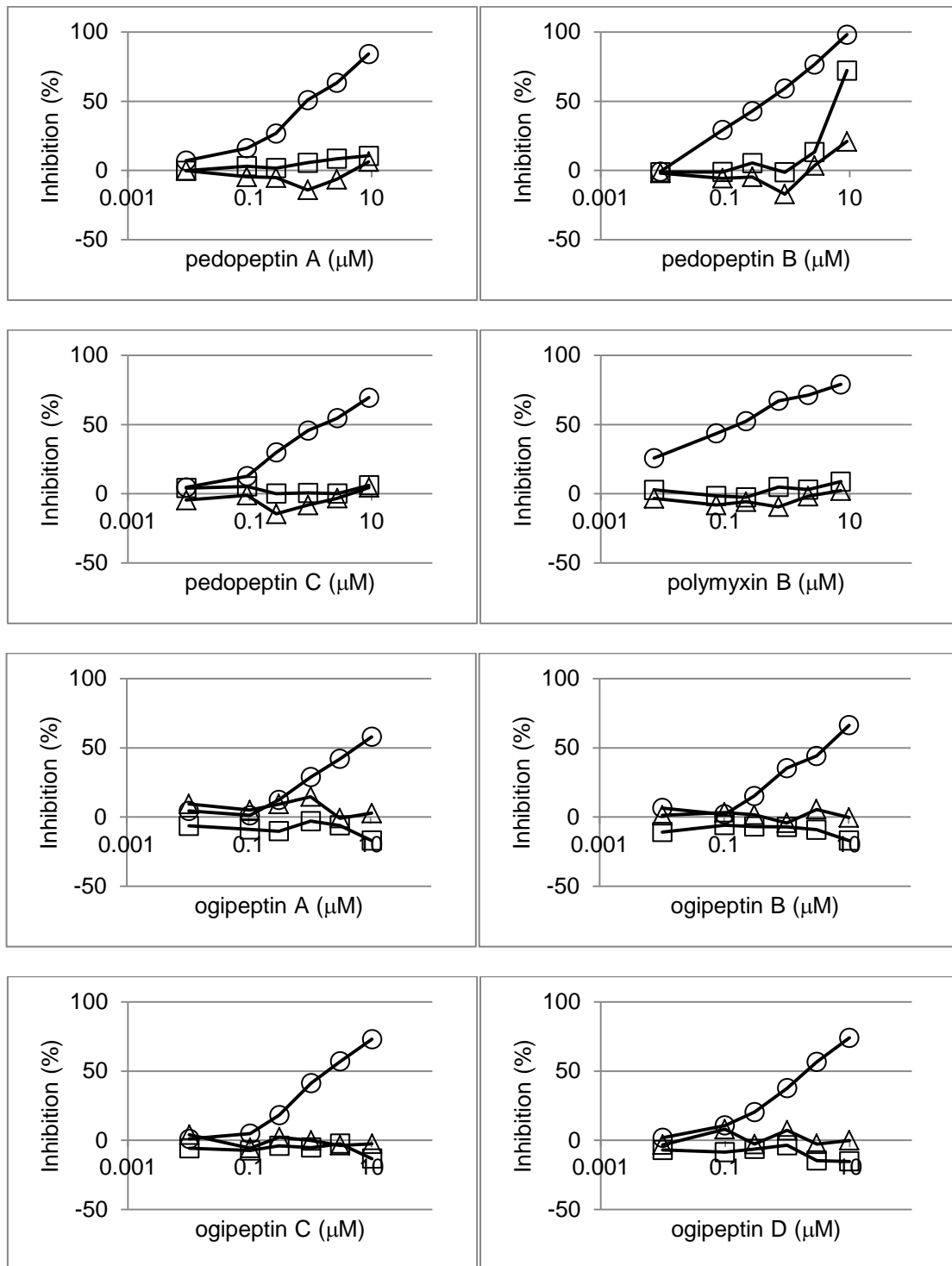


Figure 25 Inhibition of PAMPs-induced TNF- α production by pedopeptins and ogipeptins.

U937 cells differentiated into macrophage-like cells were stimulated with LPS (circles), peptidoglycan (triangles) or Pam₃CSK₄ (squares) in the absence or presence of compounds at indicated concentrations. After 4.5 h TNF- α concentration in the supernatant was measured as described in materials and methods.

3.2.2 表面プラズモン共鳴法による LPS への結合試験

表面プラズモン共鳴法で、LPS に対する直接的な相互作用の有無を調べた。ペドペプチン、オギペプチンについて、ストレプトアビジンチップ上に固相化されたビオチン化 LPS に対する相互作用を測定した。図 26 にセンサグラムで示したように、いずれの化合物も濃度依存的にシグナルを増強したことから、LPS と相互作用することが明らかとなった。測定結果から相互作用の解離定数である K_d 値を算出し、表 12 に示した。

Table 12 Affinity to biotin-LPS determined by surface plasmon resonance assay

Kd [M]							
pedopeptin			ogipeptin				PMB
A	B	C	A	B	C	D	
6.2×10^{-7}	7.7×10^{-8}	1.2×10^{-6}	2.8×10^{-4}	3.7×10^{-7}	3.0×10^{-7}	1.3×10^{-7}	1.9×10^{-5}

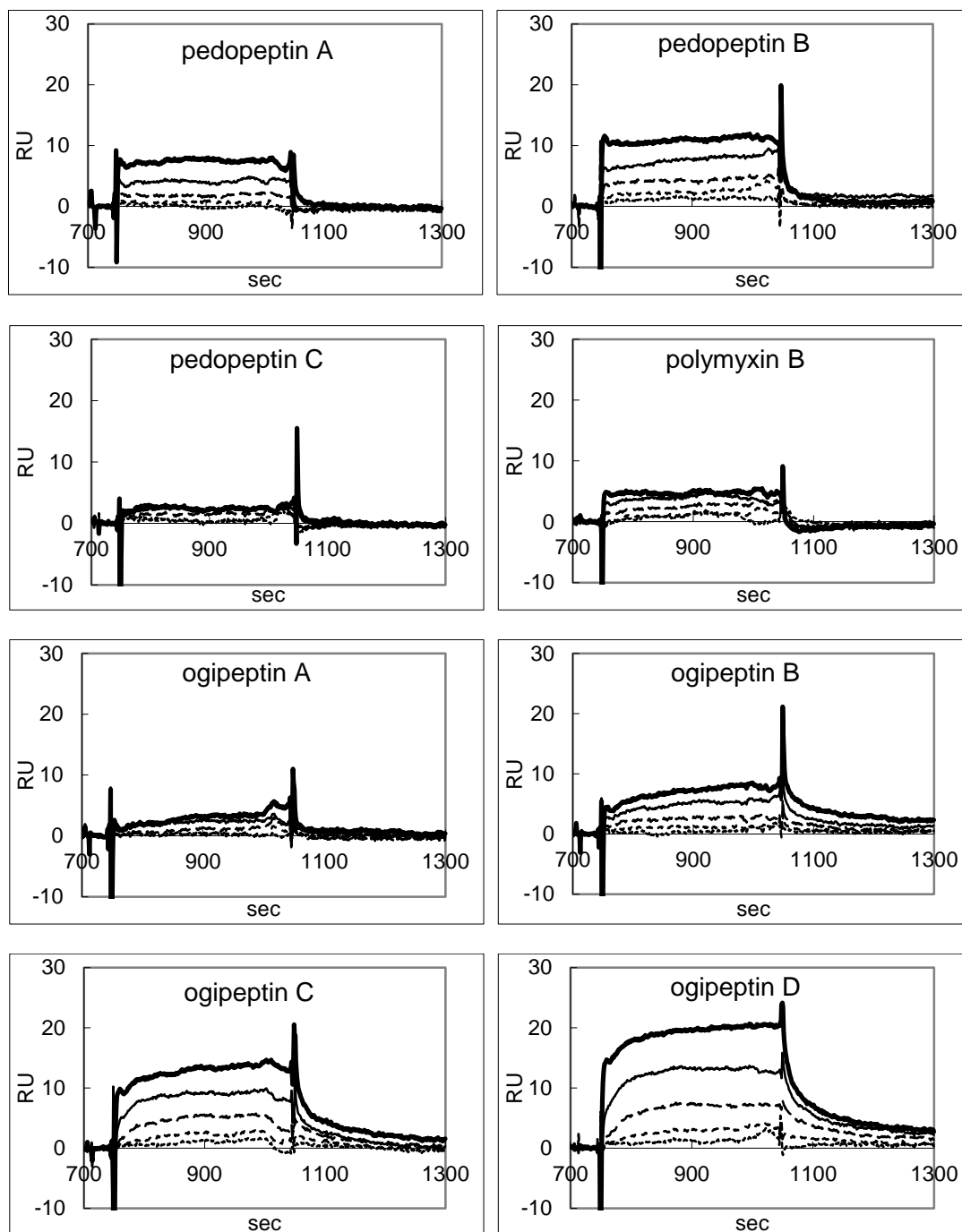


Figure 26 Sensorgrams of pedopeptins and ogipeptins to biotinylated LPS immobilized on streptavidin chip.

Compounds were injected at concentrations of 1,000 ng/mL (bold lines), 333 ng/mL (solid lines), 111 ng/mL (long-dashed lines), 37 ng/mL (dashed lines) and 12 ng/mL (dotted lines).

3.2.3 LPS と LBP の相互作用におよぼす影響

LPS と LBP の相互作用を検出する FRET アッセイ系を、材料と方法の項に記載したとおりに構築した。LPS と LBP をバッファー中で混合して 337 nm で励起した際の、665 nm の蛍光シグナルを検出した。反応系にペドペプチンを添加した場合、濃度 300 nM で阻害活性は 30-40%程度であった。一方、オギペプチンは、7.3-16.7 nM の IC₅₀ 値で相互作用を阻害した (図 27) (表 13)。参考として、表 13 に LPS と CD14 の相互作用を検出する FRET アッセイ系の IC₅₀ 値を併記した (データは図 21)。

Table 13 IC₅₀ values of LPS binding to LBP or CD14 in FRET assay

Assay system	IC ₅₀ (nM)							
	pedopeptin			ogipeptin				PMB
	A	B	C	A	B	C	D	
LPS-LBP	>300	>300	>300	7.3	13.7	13.5	16.7	6.3
LPS-CD14	20	11	47	4.8	6.0	4.1	5.6	3.6

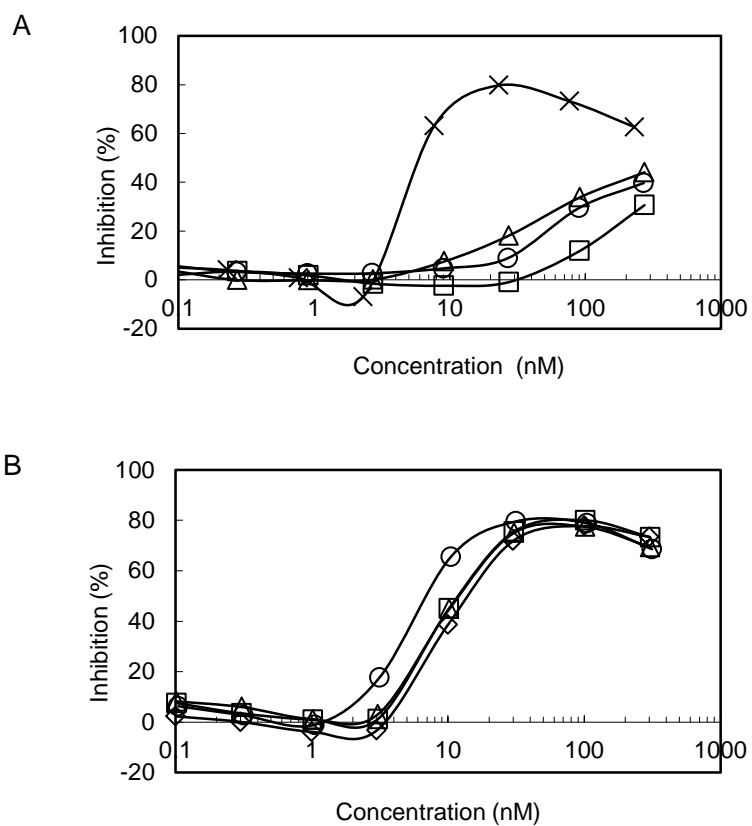


Figure 27 Inhibition of LPS-LBP binding by pedo- and ogipeptins in FRET assay.

TR-FRET assay was performed in the presence of various concentrations of (A) pedo- and ogipeptins and (B) ogipeptins. (A) pedo- and ogipeptins were pedo- and ogipeptins A (circles), pedo- and ogipeptins B (triangles), pedo- and ogipeptins C (squares) and polymyxin B (crosses) and (B) ogipeptins A (circles), ogipeptins B (triangles), ogipeptins C (squares) and ogipeptins D (diamonds).

3.3 考察

ペドペプチンとオギペプチンは、マクロファージ様に分化した U937 細胞において LPS、ペプチドグリカン、Pam₃CSK₄により誘導された TNF- α 産生のうち、LPS 刺激に対して選択性をもって阻害することが明らかとなった。選択性を発揮する作用機序について、シグナル伝達過程に着目して考察した。

LPS は CD14 に結合し、それがリガンドとなって TLR4-MD2 複合体 (細胞表面受容体) が細胞内にシグナルを伝達する。ペドペプチンとオギペプチンの作用の選択性を調べるために、LPS-TLR4 以外の PAMP-PRR の組み合わせとして、ペプチドグリカン-TLR2、Pam₃CSK₄-TLR2/TLR1 に対する作用と比較した。

今回の検討では、受容体を内在性に発現する細胞として、マクロファージ様に分化させた U937 細胞株を用いた。この細胞に LPS、ペプチドグリカン、あるいは Pam₃CSK₄ を添加すると、これらの刺激に応答して TNF- α を産生したことから、各受容体を内在性に発現していることが確認された。TLR1、TLR2、TLR4 は、いずれも細胞内に Toll/interleukin-1 receptor (TIR) 領域を有しており、TIR 領域を有するアダプター分子 MyD88 と会合してシグナルを伝達する¹⁴。すなわち、シグナル伝達において、TIR 領域を介した TLR と MyD88 との会合以降は、LPS、ペプチドグリカン、Pam₃CSK₄ で共通する。ペドペプチンとオギペプチンは LPS-TLR4 シグナル選択的な阻害作用を示したことから、マクロファージ様細胞において、LPS-CD14-TLR4-MD2 の複合体形成までのいずれかの段階を阻害することが作用機構であると推定された。第二章では、CD14 を強制発現させた HEK293T 細胞に対する FITC-LPS の結合を、ペドペプチンとオギペプチンが抑制することを示した。本章での結果より、両化合物群は、受容体を内在性に発現する細胞においても、LPS の細胞への結合段階で阻害作用を発揮している可能性が高いと考えられた。

以上の結果を受け、ペドペプチンとオギペプチンが LPS に対して直接的な相互作用を有する可能性が高まった。そこで、表面プラズモン共鳴法を用いて、LPS と化合物の相互作用が検出できるかどうか検討した。本検討で陽性コントロールとして用いた PMB の LPS に対する相互作用の Kd 値は $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ であり (図 26、表 12)、報告されている Kd 値 $6.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ⁵⁴ に比べて弱かつ

た。この原因として、実験方法の違いが影響している可能性がある。既報では、いずれも PMB を固相化し LPS をアナライトとして解析している。一方、本研究では LPS を固相化し、PMB をアナライトとした。また、本研究ではビオチン化 LPS を用い、ストレプトアビジンチップに固相化した。既報からは、同様の方法による PMB の Kd 値を見出すことはできていない。リガンドとアナライトが逆転することで Kd 値が異なることはしばしば観察される現象であり、固相化方法も異なるため、それらが影響している可能性が考えられた。しかしながら、図 26 に示した一連のセンサグラムにおいて、PMB に加えて、被験化合物であるペドペプチンとオギペプチンについても、濃度依存的なシグナル増強が実験的に検出された。よって、ペドペプチンとオギペプチンも、LPS と直接相互作用する性質を有すると判断した。

上記の結果を受け、ペドペプチンとオギペプチンに関してこれまでに検出された種々の阻害作用は、化合物が LPS に直接作用することで発揮され、その結果、LPS 選択的な作用を示したと考えられた。そこで次に、ペドペプチンとオギペプチンが LPS に直接結合して CD14 との相互作用を阻害する段階について、さらに詳細に検討した。スクリーニング系として用いた LPS-CD14 の結合アッセイ系は、バッファー中に FBS (ウシ血清) を添加している。LPS は、血清存在下では血清中に含まれる LBP に結合していることが知られており、実際は、LPS-LBP-CD14 の相互作用を検出していたことになる²⁰。そこで、LPS と CD14 の FRET アッセイ系を改変し、LPS と LBP の相互作用を評価する FRET アッセイ系を構築して検討した。なお、LPS-CD14 の FRET アッセイでは、バッファー中に FBS を添加しておりウシ由来 LBP の寄与を検出していたことになるが、LPS-LBP の FRET アッセイには、材料の都合からマウス由来の LBP 配列を用いた。LBP のアミノ酸配列に関して、LPS との結合に関わるとされる領域 (第五章で詳述) のシミラリティーは、ヒトとウシで 89%、ヒトとマウスで 100% であり、相同性が高いことからヒト LBP の代替として使用可能であると判断した。評価の結果、LPS-CD14 相互作用の阻害に比較して、オギペプチンは LPS-LBP 相互作用を同程度に阻害した (IC₅₀ 値 4.2-6.0 nM に対して 7.3-16.7 nM) が、ペドペプチンは LPS-LBP 相互作用を極めて弱いレベルでしか阻害しない (IC₅₀ 値 11-47 nM に対して >300 nM) ことが明らかになった (図 27)。この結果から、ペドペプチンとオギペプチンが、

LPS-LBP-CD14 の複合体形成に対して異なる様式で阻害することが示唆された。この作用機序の差異が、薬効面でどのように影響するのか興味を持たれた。また、薬剤候補として機序の異なる化合物を提供し得ることは意義が大きいと考えられた。作用機序については、第五章で考察する。

第四章 ペドペプチン、オギペプチンの抗菌活性

小序

ペドペプチン、オギペプチンは微生物サンプルより単離精製された新規ペプチド性物質である。第三章における検討では、LPS に対する直接的な相互作用が検出された。LPS はグラム陰性菌の外膜構成成分であり、化合物が菌体膜に相互作用してその構造を不安定化する作用があれば、抗菌活性が期待される²⁹。そこで、グラム陽性菌も含めて、抗菌スペクトルを測定した。その結果、ペドペプチン B を除き、両化合物群はグラム陰性菌の増殖をより強く抑制する傾向が観察された。特にオギペプチンはグラム陰性菌に選択性の高い抗菌スペクトルを示した。ペドペプチン B は、グラム陰性、陽性菌に対してほぼ同等の抗菌活性を示した。

4.1 材料と方法

ペドペプチン、オギペプチンおよび PMB を用い、下記の細菌の増殖に対する最小阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) を培地微量希釈法によって測定した。

- ・ グラム陽性菌

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus pyogenes

Enterococcus faecium

- ・ グラム陰性菌

Klebsiella pneumoniae

Enterobacter cloacae

Serratia marcescens

Proteus vulgaris

Pseudomonas aeruginosa

Stenotrophomonas maltophilia

Acinetobacter baumannii

Escherichia coli

4.2 結果

MIC の一覧を表 14 に示した。

ペドペプチンは、いずれの菌に対しても添加した最高濃度である 128 $\mu\text{g/mL}$ 以下の MIC を示した。ペドペプチン A および C はグラム陽性菌よりグラム陰性菌を低濃度で増殖阻害したが、ペドペプチン B は両者をほぼ同程度の濃度域で阻害した。

オギペプチンは、A、B、C、D の順序で、グラム陰性菌に対して選択性のある増殖阻害を示す傾向があった。ただし、グラム陰性菌のうち、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae*、*Serratia marcescens* に対してはほとんど増殖阻害を示さなかった ($\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g/mL}$)。第一章でオギペプチンの構造決定のために用いたデアシル体であるオギペプチン X は、抗菌活性をほとんど消失していた ($\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g/mL}$)。

一部のグラム陰性菌に対しては、オギペプチン A、B は PMB より強い抗菌活性を示した。

Table 14 Antimicrobial activity of pedopeptins, ogipeptins and PMB

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	pedopeptin			ogipeptin						polymyxin B		
	A	B	C	A	B	C	D	X	A	B	C	X
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	32	4	4	64	128	64	32	16	16	64	>128	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 10925	64	8	8	128	>128	128	32	16	16	128	>128	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	32	4	4	64	64	32	16	8	8	32	>128	32
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344	16	8	8	32	>128	128	64	64	64	64	>128	64
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	64	8	8	128	>128	128	32	16	16	128	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	4	4	4	4	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	4	4	4	4	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	32	4	4	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	2	2	2	2	32	32	32	8	8	32	>128	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	16	8	8	32	4	32	8	4	4	32	>128	0.5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	4	4	4	2	0.5	0.25	1	1	1	0.25	>128	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	4	2	4	4	0.5	1	1	2	2	1	>128	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 47076	2	4	2	2	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	128	128	0.5
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	2	4	2	2	0.25	0.5	0.5	1	1	128	128	0.25

4.3 考察

PMB は LPS に結合する。グラム陰性菌の細胞外膜を構成する LPS に対しても結合し、その結果、細菌の膜構造を不安定化することで抗菌活性を示す²⁹。ペドペプチンとオギペプチンも LPS に直接相互作用することが明らかになったので、グラム陰性菌に対して抗菌活性を発揮することが期待された。そこで、抗菌スペクトルを測定した。

ペドペプチンは、A、C については、グラム陽性菌よりも陰性菌に対して強い抗菌活性を示した。ペドペプチン B は、グラム陽性菌と陰性菌に対して同程度の MIC を示したことから、抗菌活性は単純に LPS 結合活性に依存しているわけではないことが推察された。

オギペプチンは、グラム陰性菌に対して選択性のある増殖阻害を示す傾向があった。オギペプチンも PMB と同様に、LPS に結合してグラム陰性菌の細胞膜構造を不安定化することで抗菌活性を発揮する可能性が高いと考えられた。

グラム陰性菌のうち、オギペプチンが増殖阻害を示さなかった *Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae*、*Serratia marcescens* については、PMB 耐性株が存在することが報告されている^{55, 56, 57}。耐性メカニズムの例としては、Lipid A のリン酸塩部分を糖に置換して負の電を減弱させることで正に荷電する PMB に対する親和性を下げる機構や、細胞膜を安定化させる膜タンパク質を高発現する機構などが報告されている⁵⁵。なお、本研究で用いた *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 は PMB 感受性株であるが、オギペプチンは MIC \geq 128 $\mu\text{g/mL}$ であった。

ペドペプチンとオギペプチンの生産菌もグラム陰性菌であるが、PMB に対して耐性 (MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$ 、未発表データ) であることがわかっている。自らが生産する LPS 阻害剤 (ペドペプチンおよびオギペプチン) によって障害を受けなかったのは、上述の PMB 耐性株と同様の耐性機構を発揮している可能性があると考えられる。

オギペプチンのデアシル体であるオギペプチン X は、表 14 のいずれの菌に対しても MIC \geq 128 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、オギペプチン X は、マクロファージ様細胞の LPS 応答 (TNF- α 産生) に対して、30 $\mu\text{g/mL}$ まで明確な阻害を示さなかった (データ表示せず)。よって、LPS の作用阻害と抗菌活性には、アシル基が重要な役割を担うことが示唆された。

これまでに活性を評価した LPS-CD14 結合阻害 (FRET アッセイ)、LPS に対する結合 (Biacore) の強さと、抗菌活性の強さの間には、明確な相関は見られなかった。一方、HEK293 細胞に対する細胞障害活性がもっとも強かったペドペプチン B は、グラム陽性菌に対しても陰性菌と同様の MIC 値を示しており、LPS に依存しない細胞膜障害活性を有する可能性が示唆された。

第五章 構造と活性に関する考察

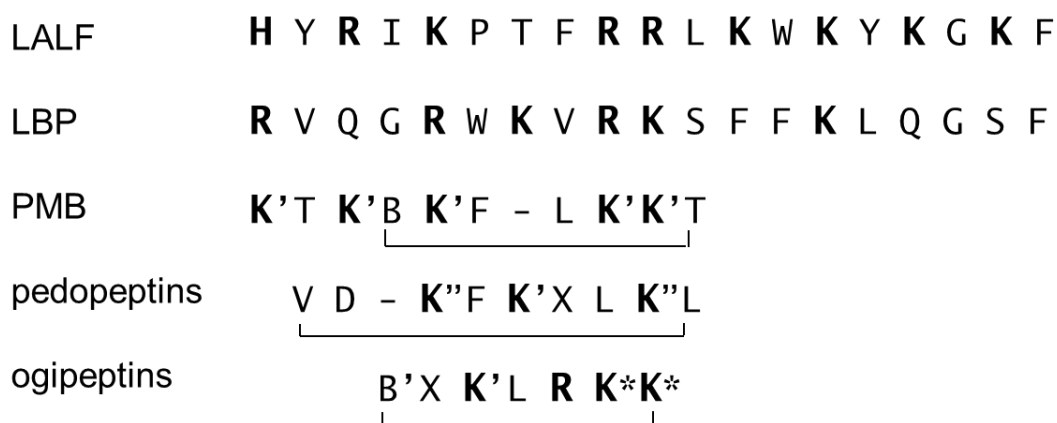
新規ペプチド性抗生物質であるペドペプチン、オギペプチンについて、既知の LPS 結合物質や LPS 結合活性を有する既知の抗生物質と構造を比較し、作用機序や抗菌活性について考察した。

ペドペプチンは9個のアミノ酸を含む環状デプシペプチドで、3つの塩基性残基を有している。オギペプチンは7個のアミノ酸を含む環状ペプチドで、5つの塩基性残基を有している。PMBは10個のアミノ酸を含む環状ペプチドで、5つの塩基性残基を有しており、LPSに結合してその作用を中和する活性がある。塩基性残基の正の電荷は、負に帯電するLPSに相互作用するために重要な役割を担っていると考えられている²⁹。これらの化合物は、構造およびLPSに関する生物活性において類似した性質が多いことがこれまでの研究で明らかになった。そこで、LPSに対する結合性が知られる他の物質を含め、構造の特徴に関して比較をおこなった。

Limulus anti-LPS factor (LALF) はLPS検出試薬として用いられている。Hoessらは、LALFタンパク質の結晶構造解析をおこない、伸長した両親媒性のループ部分がLPS結合モチーフであることを示した⁵⁸。このモチーフは、陽性荷電残基と疎水性残基が交互に並び、中央に2つの塩基性アミノ酸が位置することでループを形成している。彼らは、アミノ酸配列を比較し、LBPとPMBも同じようなモチーフを有することを示した(図28)。またLampingらは、点変異体を用いて、LBPのこのモチーフがLPS結合に必須であることを示した⁵⁹。

我々が見出したペドペプチンとオギペプチンに関しても、同様にアミノ酸配列の比較をおこなった。図28では、塩基性アミノ酸を太字で表示した。その結果、図28に示すように、両化合物群の配列にも類似した傾向があり、なかでもオギペプチンがLPS結合モチーフとしての条件をより満たすと考えられた。LPSに対する結合にはこのモチーフ配列が重要であることから、オギペプチンがLPSに相互作用する様式は、PMBの様式に類似している可能性が高いと考えられた。このことは、オギペプチンがPMBと同様にLPSとLBPの相互作用を阻害する性質を有すること、グラム陰性菌に対して選択性のある抗菌プロファイルを示したことによっても支持されると考えられる。相違点も挙げられる。デアシル化したオギペプチンXはLPS阻害作用や抗菌活性を

ほとんど失ったことを先に述べた。一方で PMB は、デアシル化しても (PMB ノナペプチド)、LPS への結合活性を失わないことが報告されている^{60, 61}。よって、オギペプチンについては、モチーフ配列のみならず、アシル基部分も LPS への相互作用に寄与していることが示唆された。



K': diaminobutyric acid (Dab)	B: bridging Dab
K*: β -OH diaminobutyric acid (β -OH Dab)	B': bridging β -OH Dab
K'': diaminopropionic acid (Dap)	
X': dehydrobutyryne (Dhb)	

Modified from *EMBO J.* **12**, 3351-3356 (1993)

Figure 28 Alignment of amino acid sequences of pedopeptins, ogipeptins and LPS-binding agents.

Alignment of amino acid sequences of LALF, LBP and PMB was quoted from the indicated literature. Amino acid sequences of pedopeptins and ogipeptins were aligned with them. Basic amino acids are shown in bold letters.

他に LPS に結合する物質として、環状ペプチドの抗生物質であるグラミシジン S を挙げる
ことができる (図 29)。グラミシジン S には両親媒性のベータシート構造が存在し、この部分が細
胞膜と相互作用して高い細胞膜障害活性を有すると報告されている⁶²。ペドペプチンの構造を見
ると、疎水性と塩基性のアミノ酸をほぼ交互に有しており、両親媒性を示しうる部分があること
がわかる。この構造の特徴が、特に水酸基が付加していないバリン残基を有するペドペプチン B
に、細胞膜と相互作用する性質を付与している可能性があると考えられる。細胞障害活性はペド
ペプチン B がもっとも高く、30 μM で HEK293 細胞を死滅させた。また、ペドペプチン B は、
グラム陰性菌と同程度の MIC 値でグラム陽性菌に対しても抗菌活性を示した。これらの知見か
らも、ペドペプチン B は LPS に直接結合する作用に加え、LPS に依存しない機序で細胞膜を不
安定化させる作用を有する可能性が高いと考えられた。

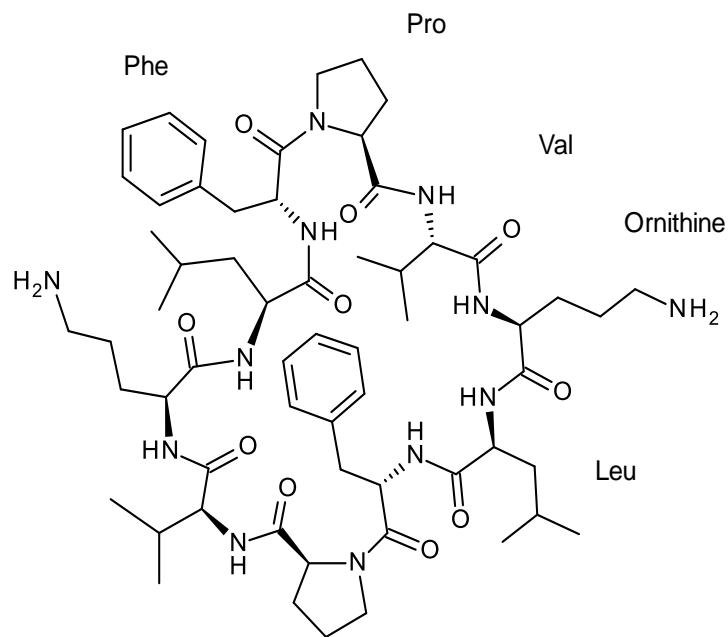


Figure 29 Structure of gramicidin S.

各種解析の結果、ペドペプチンとオギペプチンは、PMB に類似した性質、作用を有することが明らかになった。このことは、ペドペプチンとオギペプチンの構造と LPS に対する活性を考察するにあたり、PMB に関する既知の情報から多くのヒントを得ることにつながった。一方、比較により、細胞に対する LPS の結合阻害活性や、LPS-LBP 相互作用に対する阻害活性などが、ペドペプチン、オギペプチン、PMB で異なることを見出した。これらの相違点により、ペプチド性 LPS 結合物質の構造活性相関に対し、新たな情報を付与することができると期待される。すなわち、新規薬剤開発を目指した誘導体合成などに展開の多様性を提供することが可能になると考えられる。

本章において、ペドペプチンとオギペプチンについて、LPS 結合活性を有する抗生物質として、構造と活性に関する考察をおこなった。その結果、LPS 結合に寄与することが推察される特徴的なアミノ酸モチーフのみならず、アシル基を含めた相互作用が作用機序に影響すると考えられた。これらの構造が、シグナル伝達に至る LPS の複合体形成状態や、細胞膜との親和性などに影響しており、その結果としてユニークな作用機序につながっていると示唆された。

総括

第一章のまとめ

第一章では、LPS 阻害剤の探索をおこなった。

LPS 阻害剤を探索するにあたり、LPS が細胞応答を惹起する第一段階である細胞への結合には、CD14 が重要な役割を担っていることを確認した。ハイスループットスクリーニングをおこなうため、LPS と可溶性 CD14 タンパク質の相互作用を FRET で検出する系を構築し、ミニチュア化した。自社で所有する微生物サンプルを対象にハイスループットスクリーニングをおこなった結果、*Pedobacter* sp. SANK 72003 から新規環状デプシペプチドであるペドペプチンを、*Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 から新規環状ペプチドであるオギペプチンを見出し、構造を決定した。

第二章のまとめ

第二章では、ペドペプチンとオギペプチンの生物活性を評価した。

ペドペプチン、オギペプチンは、バッファー中の LPS と CD14 の相互作用を、それぞれ 11-47 nM、4.1-6.0 nM の IC₅₀ 値で強力に阻害した。CD14 を強制発現した 293T 細胞に対して、FITC-LPS の結合をいずれも 1 μM から抑制した。また、マクロファージ様に分化した U937 細胞において、LPS 刺激による TNF-α 産生を、それぞれ 0.1-0.3 μM、0.3-0.5 μM の IC₅₀ 値で阻害した。阻害濃度域は、細胞障害が発現する濃度より低く、ペドペプチンとオギペプチンは、LPS の炎症惹起活性そのものを抑制していると推測された。

さらに、動物モデルでは、LPS を投与したマウスの血中 TNF-α の濃度上昇を、それぞれ 0.61-0.80 mg/kg、0.12-0.39 mg/kg の ED₅₀ 値で抑制した。このときの投与量は、急性毒性を発現するより 26 倍以上低用量であった。

第三章のまとめ

第三章では、ペドペプチンとオギペプチンの LPS 選択性とその作用機序について検討した。

ペドペプチンとオギペプチンはマクロファージ様細胞において、PAMPs 刺激による TNF- α 産生のうち、LPS 刺激に選択性をもって阻害作用を示した。LPS に対する直接的な相互作用が表面プラズモン共鳴法により検出され、LPS に直接結合してその作用を阻害することが LPS 選択性につながると考えられた。LPS は血清存在下では LBP と相互作用している。LPS と LBP の相互作用を検出する FRET アッセイ系を構築して調べたところ、ペドペプチンは微弱な阻害のみ示したのに対し、オギペプチンは明確な阻害作用を有することが明らかになった。

第四章のまとめ

第四章では、ペドペプチンとオギペプチンの抗菌活性を評価した。

ペドペプチンとオギペプチンは、抗菌活性を示した。ペドペプチン B は、グラム陽性菌、陰性菌に対し同程度の抗菌活性を有した。それ以外のペドペプチン A、C とオギペプチン A-D は、グラム陰性菌に対して選択性のある抗菌活性を示した。グラム陰性菌に対する抗菌活性は、細菌外膜の LPS に結合してその構造を不安定化することで発揮している可能性が考えられた。

第五章のまとめ

第五章では、ペドペプチンとオギペプチンについて、ペプチド性の LPS 結合物質あるいは抗生物質と、構造と活性に関する比較、考察をおこなった。

ペドペプチンとオギペプチンは、既知の LPS 結合モチーフと類似したアミノ酸配列を有していた。オギペプチンの配列が PMB のモチーフ配列により近く、LPS に対する作用が PMB と類似していることの一因と考えられた。ペドペプチン B のアミノ酸配列は両親媒性の傾向があり、細胞障害活性を有すること、グラム陽性菌と陰性菌の両者に対して抗菌活性を示すことに寄与している可能性が考えられた。

以上のように本研究では、LPS により誘導される炎症を阻害する物質として、微生物培養液よりペドペプチンおよびオギペプチンを発見、単離精製し、生物活性を明らかにした。また、構造決定の結果、新規なペプチド性化合物であることを明らかにした。両化合物群は、LPS に対す

る生物の免疫応答 (TNF- α 産生) に対しては同様な阻害作用と選択性を示したが、LPS の結合性 (LPS の細胞への結合、LPS の LBP への結合) に対しては異なるプロファイルを示した。これらの知見は、多様性を有する新規な LPS 阻害物質として有用な情報を提供するものであり、類縁化合物の作用機序の解析や構造活性相関の解析に有効に活用されることが期待される。

また、これらの新規化合物群の発見は、抗生物質としての観点からも重要な意味を持つと言える。ペプチド性の抗生物質ポリミキシン類は、近年の深刻な多剤耐性菌の蔓延に対して、最後の砦とされていた。しかし最近、ポリミキシン類に対する耐性菌が報告され、耐性遺伝子が同定されている⁶³。また、ポリミキシン類は全身暴露による腎毒性や神経毒性が報告されており、用途が局所投与に限定されている。これらの副作用を克服した新規薬剤を開発するため、ポリミキシン類の誘導体に関する研究は長年おこなわれているが、大きな進歩がないのが現状である。そのような状況下、毒性が低く、広い抗菌スペクトルを持つ抗生物質は、我々が感染症と戦うために強く求められており、本研究における新規化合物の発見の意義は大きい。

あらためてペドペプチン、オギペプチンについて、薬剤という視点で PMB と比較したい。マウス薬効モデルでの有効性は、PMB の 4 倍から 27 倍弱いものであった。急性毒性試験では、同等かあるいは 3 倍以上低毒性であると推定された。PMB に関しては腎毒性や神経毒性が問題となっているが、ペドペプチンとオギペプチンが同様の毒性を有するかどうかは調べられていない。PMB が示す毒性の一因として正の電荷の寄与が報告されているが、含有する塩基性アミノ酸の数は PMB が 5 つであるのに対してペドペプチン、オギペプチンはそれぞれ 3 つ、5 つである。単純にこの数で副作用を予測することはできないが、もっとも数が少ないペドペプチンが腎、神経毒性を有しているのか、また PMB に比較してどの程度であるのか興味もたれる。十分な安全域 (薬効と毒性との差) が確保できれば、薬剤として開発する価値があると考えられる。一方、ペドペプチンに関しては、デプシペプチドであるために、環を形成するエステル結合部分が体内、特に血液中で安定に保たれるかどうか懸念点である。これについては、加水分解された結果、直鎖状の化合物が薬効を有するか、エステル部分を他の安定な構造に置換しても薬効が残存するかなどの検討もあわせて必要と考えられる。オギペプチンについても毒性を精査し、構造改変を

おこなうことも含めて、検討する余地があると思われる。構造改変に関しては、化学合成による方法に加え、生合成遺伝子を同定することで生物合成による展開も可能であると考えられる。

ペドペプチンとオギペプチンは、LPS 阻害物質であり、感染菌からの自然免疫刺激による炎症反応を抑制し、同時に菌の増殖を抑制することのできる抗生物質である。これらの性質は、医療現場でニーズの高い敗血症治療薬として有用である。我々が提供したこれらのペプチド性抗生物質の構造や生物活性に関する知見、および LPS 阻害剤探索の戦略は、新たな薬剤の開発に生かされることが期待される。そして、それらを通じて、本研究が医療に貢献することを望む。

引用文献

1. Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 169-176 (2003)
2. 日集中医誌 **20**, 329-334 (2013)
3. Vincent, J. L., *et al.* Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir. Med.* **2**, 380-386 (2014)
4. 平成 22 年人口動態統計第 6 表 厚生労働省
5. Kisson, N., *et al.* World federation of pediatric intensive care and critical care societies: global sepsis initiative. *Pediat. Crit. Care Med.* **12**, 494-503 (2011)
6. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373-384 (2010)
7. Hoshino, K., *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749-3752 (1999)
8. Schwandner R., *et al.* Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 17406-17409 (1999)
9. Takeda, K., Takeuchi, O. & Akira, S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* **8**, 459-463 (2002)
10. Hayashi, F., *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103 (2001)
11. Alexopoulou, L., *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NFkappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001)
12. Diebold, S. S., *et al.* Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **5**, 1529-1531 (2004)
13. Bauer, S., *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9237-9242 (2001)
14. Bowie, A. & O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 508-514

(2000)

15. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-122 (1999)
16. Yamamoto, M., *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643 (2003)
17. Maeshima, N. & Fernandez, R. C. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 3 (2013)
18. Bazil, V., *et al.* Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur. J. Immunol.* **16**, 1583-1589 (1986)
19. Haziot, A., *et al.* The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* **141**, 547-552 (1988)
20. Hailman, E., *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* **179**, 269-277 (1994)
21. Shimazu, R., *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**, 1777-1782 (1999)
22. Da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* **276**, 21129-21135 (2001)
23. Aderem, A. & Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787 (2000)
24. Gangloff, S. C., Hijjya, N., Haziot, A. & Goyert, S. M. Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 491-496 (1999)
25. Zhang, F. X., *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 7611-7614 (1999)
26. Wong, Y. N., *et al.* Continuous pharmacodynamic activity of eritoran tetrasodium, a TLR4 antagonist, during intermittent intravenous infusion into normal volunteers. *Innate Immun.* **14**, 383-394 (2008)

27. Opal, S. M., *et al.* Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis. *JAMA* **309**, 1154-1162 (2013)
28. Stansly, P. G., Shepherd, R. G. & White, H. J. Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **81**, 43-54 (1947)
29. Vaara, M. & Vaara, T. Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**, 114-122 (1983)
30. Rifkind, D. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. *J. Bacteriol.* **93**, 1463-1464 (1967)
31. Jacobs, D. M. & Morrison, D. C. Inhibition of the mitogenic response to lipopolysaccharide (LPS) in mouse spleen cells by polymyxin B. *J. Immunol.* **118**, 21-27 (1977)
32. From, A. H., Fong, J. S. & Good, R. A. Polymyxin B sulfate modification of bacterial endotoxin: effects on the development of endotoxin shock in dogs. *Infect. Immun.* **23**, 660-664 (1979)
33. Vinnicombe, J. & Stamey, T. A. The relative nephrotoxicities of polymyxin B sulfate, sodium sulfomethyl-polymyxin B, sodium sulfomethyl-colistin (colymycin), and neomycin sulfate. *Invest. Urol.* **6**, 505-519 (1969)
34. Dubos, R. J. & Hotchkiss, R. D. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating Bacilli. *J. Exp. Med.* **73**, 629-640 (1941)
35. Mathis, G. Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clin. Chem.* **39**, 1953-1959 (1993)
36. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680 (1994)
37. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425 (1987)
38. Cowan, S. T. & Steel, K. J. in *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* 3rd edn (eds Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A) (Cambridge University Press, Cambridge, 1993)
39. Fujii, K., Shimoya, T., Ikai, Y., Oka, H. & Harada, K. Further application of advanced Marfey's method for determination of absolute configuration of primary amino compound. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2579-2582 (1998)

40. Huber, M., *et al.* R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 710-711 (2006)
41. Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2206-2214 (1998)
42. Levin, J. & Bang, F. B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **115**, 265-274 (1964)
43. Taylor, A. H., *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 17934-17938 (1995)
44. Matsuura, M. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front. Immunol.* **4**, 109 (2013)
45. Mochizuki, T., *et al.* Synthesis and biological activities of lipid A-type pyranocarboxylic acid derivatives. *Carbohydr. Res.* **324**, 225-230 (2000)
46. Bryant, C. E., *et al.* The cellular Toll-like receptor 4 antagonist E5531 can act as an agonist in horse whole blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **116**, 182-189 (2007)
47. Steyn, P. L., *et al.* Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 165-177 (1998)
48. Rasmussen, M. A., Madsen, S. M., Stougaard, P. & Johnsen, M. G. *Flavobacterium* sp. strain 4221 and *Pedobacter* sp. strain 4236 beta-1,3-glucanases that are active at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7070-7072 (2008)
49. Margesin, R., Dieplinger, H., Hofmann, J., Sarg, B. & Lindner, H. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis* - production and properties. *Res. Microbiol.* **156**, 499-505 (2005)
50. Desriac, F., Fleury, Y., Le Chevalier, P., Destoumieux, D. & Simon, M. Fr. Demande. Use of a bacterium isolated from the genus *Pseudoalteromonas*, cyclolipopeptides and uses thereof. FR 3005963 (2013)
51. Fusetani, N., Matsunaga, S., Matsumoto, H. & Takebayashi, Y. Cyclotheonamides, potent

- thrombin inhibitors, from a marine sponge *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7053-7054 (1990).
52. Endo, Y., *et al.* Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide (LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 5-12 (1999)
 53. Zavascki, A. P., *et al.* Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 1298-1304 (2008)
 54. Thomas, C. J. & Suroliya, A. Kinetics of the interaction of endotoxin with polymyxin B and its analogs: a surface plasmon resonance analysis. *FEBS Lett.* **445**, 420-424 (1999)
 55. Olaitan, A. O., Morand, S. & Rolain, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* **5**, 643 (2014)
 56. Landman, D., Salamera, J. & Quale, J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 4106-4111 (2013)
 57. Greenup, P. & Blazevic, D. J. Antibiotic susceptibilities of *Serratia marcescens* and *Enterobacter liquefaciens*. *Appl. Microbiol.* **22**, 309-314 (1971)
 58. Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R. & Liddington, R. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5Å resolution. *EMBO J.* **12**, 3351-3356 (1993)
 59. Lamping, N., *et al.* Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg94, Lys95, Lys99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J. Immunol.* **157**, 4648-4656 (1996)
 60. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S. & Fridkin, M. Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: implications to sensitization of gram-negative bacteria. *J. Med. Chem.* **43**, 3085-3092 (2000)
 61. Warren, H. S., Kania, S. A. & Siber, G. R. Binding and neutralization of bacterial lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 107-112 (1985)
 62. Zhang, L., Dhillon, P., Yan, H., Farmer, S. & Hancock, R. E. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3317-3321 (2000)

63. Liu, Y. Y., *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 161-168 (2016)

要旨

Lipopolysaccharide (LPS) に代表されるエンドトキシンは、自然免疫システムを刺激し、炎症反応を惹起する。LPS は、感染を伴う敗血症などの病態において、その引き金や増悪因子となる。敗血症ショックの死亡率は未だ高いことが問題であり、新しい治療薬のニーズは依然高い。そこで我々は、微生物培養サンプルより、LPS に誘導される炎症を抑制する化合物の探索をおこなった。

LPS は可溶性 cluster of differentiation 14 (sCD14) あるいは細胞膜上に glycosylphosphatidylinositol でアンカリングされた膜型 CD14 (mCD14) を介して、細胞膜上の Toll-like receptor 4 (TLR4) と myeloid differentiation 2 (MD-2) の複合体に結合する。TLR4 は細胞内にシグナルドメインを有しており、アダプター分子との会合を介して細胞内にシグナルを伝達する。まず、LPS が細胞に作用するための第一段階である細胞への結合に着目し、再構築系で各分子の寄与を調べた。LPS が結合性を示さない HEK293T 細胞に、mCD14、TLR4、MD-2 を一過性に発現させ、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した LPS の結合性を検討した。その結果、mCD14 を導入した細胞に FITC-LPS が結合性を示し、TLR4 と MD-2 の共発現による上乗せ効果は見られなかったことから、LPS と CD14 の相互作用が重要であることが示された。そこで次に、LPS 阻害剤の探索を目的として、LPS と CD14 タンパク質との相互作用を検出するアッセイ系を構築した。アッセイ系をハイスループット化することを前提に、sCD14 を用いて、*in vitro* で fluorescence resonance energy transfer (FRET) で検出する系の条件検討をおこなった。具体的には、ビオチン標識した LPS と LANCE-Europium 標識した抗 myc 抗体、myc タグを付けたヒト sCD14 とストレプトアビジン標識した XL665 の溶液を各々用意して混合し、LPS と CD14 の相互作用によって近接した LANCE-Europium と XL665 の間で生じるエネルギー遷移による蛍光を測定するのみの簡便な系とした。相互作用を検出するためには血清の添加が必要であり、ウシ血清を 2.4% 添加して用いた。蛍光が時間に依存して増加し、また、LPS 結合物質として汎用される polymyxin B (PMB) が反応を濃度依存的に阻害したことから、構築したアッセイ系が妥当なものであると確認した。

阻害剤の探索は、微生物培養液約 6 万サンプルを対象とし、384 ウェルプレートを用いてハイスループットスクリーニングを実施した。微生物の中には LPS 類縁物質を生産するものがあることが知られている。類縁物質による LPS 拮抗作用は、LPS 濃度が上がるほど効果が減弱するデメリットがある。よって我々は、スクリーニングヒットに対してリムルス試験をおこない、LPS 類縁物質を除外した。最終的に、2 系統の阻害化合物群を獲得した。活性に基づいて単離精製を行い、構造決定したところ、それぞれ環状デプシペプチドおよび環状ペプチドの新規化合物であり、ペドペプチン A、B、C およびオギペプチン A、B、C、D (図 I) と命名した。生産菌は新規の菌であり、*Pedobacter* sp. SANK 72003 および *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 と命名した。

単離精製したペドペプチンとオギペプチンの生物活性を評価した。スクリーニングに用いた *in vitro* FRET アッセイでは、LPS と CD14 の相互作用を、ペドペプチンは 11-47 nM、オギペプチンは 4.1-6.0 nM の IC₅₀ 値で強力に阻害した。HEK293T 細胞への FITC-LPS の結合に対して、ペドペプチンは 10 μM でほぼ完全に抑制したが、オギペプチンは最大で 50% 程度の抑制にとどまった。そこで、LPS 刺激に対する細胞応答を、ペドペプチンとオギペプチンがどの程度抑制できるか調べた。細胞応答の評価には、内在性に LPS 受容体を発現する細胞株を用い、LPS 刺激により誘導されるサイトカイン産生を指標とした。具体的には、ヒト単球系細胞株 U937 細胞をマクロファージ様細胞に分化させて LPS 刺激し、産生される tumor necrosis factor- α (TNF- α) を測定した。ペドペプチンとオギペプチンは、TNF- α の産生を IC₅₀ 値がそれぞれ 0.1-0.3 μM、0.3-0.5 μM で抑制した。また、高濃度域では両化合物群ともほぼ完全に TNF- α の産生を抑制した。完全に抑制する濃度域でいずれも細胞障害活性を示さなかったことから、サイトカイン産生阻害は単なる細胞毒性によるものではないと考えられた。

ペドペプチン、オギペプチンの薬効を動物モデルで調べた。C3H/HeN マウスに LPS を静脈内投与し、血中の TNF- α の濃度上昇に対する化合物の効果を検討した。LPS 投与から 1 時間後に採血して ED₅₀ 値を求めたところ、ペドペプチンは 0.61-0.80 mg/kg、オギペプチンは 0.12-0.39 mg/kg であった。以上より、動物でも LPS の作用を抑制することがわかった。

次に、ペドペプチン、オギペプチンの作用の選択性に関して評価した。感染微生物から放出される病原体構成成分などの因子は、pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs) と総称され、LPS はグラム陰性菌の細胞外膜に由来する。その他の PAMPs としては、グラム陽性菌由来のペプチドグリカンやグラム陰性菌および陽性菌由来のリポプロテインなどが挙げられ、その受容体は TLR2、TLR2/1 であることが知られる。そこで、前述の U937 細胞の系を用いて、ペプチドグリカンと、リポプロテインを模した合成リポペプチドである Pam₃CSK₄ に誘導されるサイトカインに対する化合物の抑制作用を調べた。その結果、ペドペプチン、オギペプチンは、LPS 刺激による TNF- α の産生を選択的に阻害することがわかった。

ペドペプチン、オギペプチンによる LPS 阻害の作用機序について検討した。サイトカイン産生抑制効果は LPS に選択性があることが示されたことから、LPS に対して直接結合する可能性があると考えられた。そこで、表面プラズモン共鳴法を用いて固相化した LPS に対する相互作用の有無を検討した。その結果、両化合物群とも濃度依存的なシグナル増強が検出され、LPS に直接結合することが示された。

LPS は、血清存在下では LPS binding protein (LBP) と結合しており、CD14 と相互作用する際にも LPS-LBP-CD14 の複合体を形成している。そこで次に、化合物が LPS と LBP の相互作用を阻害するかどうか、*in vitro* FRET アッセイ系を構築して評価した。その結果、オギペプチンは LPS と LBP の結合を阻害するが、ペドペプチンはきわめて弱いレベルでしか阻害しないことがわかった。

LPS に結合する化合物やタンパク質、ペプチドは今までに複数報告されており、その中には細菌外膜構造を不安定化させることで抗菌活性を有するものが存在する。そこで、ペドペプチン、オギペプチンについて抗菌活性の有無を調べた。その結果、いずれも抗菌活性を示し、グラム陰性菌に対してグラム陽性菌より低濃度で増殖阻害する傾向が認められた。

以上の結果を受けて、ペドペプチンとオギペプチンについて、LPS 結合物質と構造の比較をおこなった。具体的には抗生物質 PMB、Limulus anti-LPS factor (LALF) などと、アミノ酸配列を比較した。Hoess らは、LALF の結晶構造解析によって、LALF loop (中央に 2 つの塩基性アミノ酸

が位置し、陽性荷電残基と疎水性残基が交互に並ぶモチーフ) が LPS 結合領域であり、このモチーフは、LBP や PMB にも存在すると報告した(Hoess, *et al. EMBO J.* **12**, 3351-3356 (1993))。ペドペプチンとオギペプチンに関してもアミノ酸配列の比較をしたところ、両化合物群にも類似した配列があり、なかでもオギペプチンがモチーフとしての条件をより満たすと推察された。

以上のように我々は、微生物培養液よりペドペプチンおよびオギペプチンを発見、単離精製し、生物活性を明らかにした。両化合物群は、LPS に対する生物の免疫応答 (TNF- α 産生) に関しては類似の作用を示したが、LPS の結合性 (LPS の細胞への結合、LPS の LBP への結合) に関しては異なるプロファイルを示した。抗生物質としての観点からも、これら新規化合物の発見は重要な意味を持つと言える。ペプチド性の抗生物質ポリミキシン類は、近年の深刻な多剤耐性菌の蔓延に対して、最後の砦とされていた。しかし最近、ポリミキシン類に対する耐性遺伝子が同定された。そのような状況下、我々が発見したペドペプチン、オギペプチンは、LPS に誘導される炎症を抑制するのみならず、抗菌活性を有する化合物であり、医療現場でニーズの高い敗血症治療薬として有用な性質を備えていると言える。我々が提供したこれらのペプチド性抗生物質の構造や生物活性に関する知見、および LPS 阻害剤探索のストラテジーが、新たな薬剤の開発に生かされ、本研究が医療に貢献することを望む。

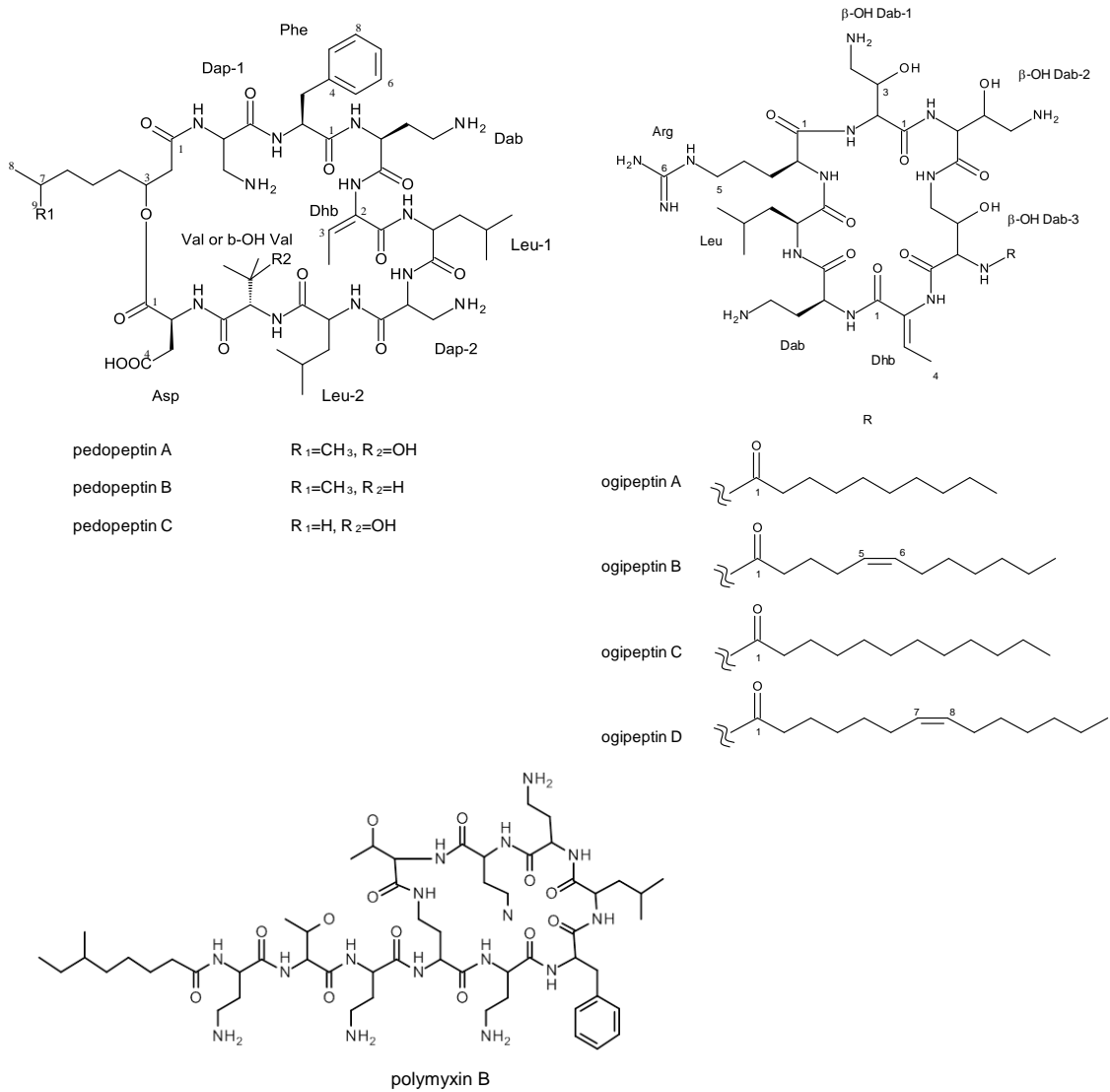


図 I ペドペプチン、オギペプチン、およびポリミキシン B (参考) の構造

公表論文

本学位論文は下記の投稿論文をもとに作成されたものである。

Screening and biological activities of pedopeptins, novel inhibitors of LPS produced by soil bacteria.

Kozuma, S., Hirota-Takahata, Y., Fukuda, D., Kuraya, N., Nakajima, M., Ando, O.

The Journal of Antibiotics **67**, 237-242 (2014)

Pedopeptins, novel inhibitors of LPS: taxonomy of producing organism, fermentation, isolation, physicochemical properties and structural elucidation.

Hirota-Takahata, Y., Kozuma, S., Kuraya, N., Fukuda, D., Nakajima, M., Ando, O.

The Journal of Antibiotics **67**, 243-251 (2014)

Ogipeptins, novel inhibitors of LPS: physicochemical properties and structural elucidation.

Hirota-Takahata, Y., Kozuma, S., Kuraya, N., Fukuda, D., Nakajima, M., Takatsu, T., Ando, O.

The Journal of Antibiotics **70**, 79-83 (2017)

Identification and biological activity of ogipeptins, novel LPS inhibitors produced by marine bacterium.

Kozuma, S., Hirota-Takahata, Y., Fukuda, D., Kuraya, N., Nakajima, M., Ando, O.

The Journal of Antibiotics **70**, 84-89 (2017)

謝辞

本論文提出の機会をお与えいただき、ご多忙の中、ご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科微生物学研究室 有岡学 准教授に深く感謝いたします。本論文の作成にあたりご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科分子生命工学研究室 足立博之 准教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、新規物質の精製や構造解析、菌学解析にご協力くださった、共同研究者である廣田一高畑由紀氏、倉屋奈穂樹博士、福田大介博士、中島睦男氏に感謝します。また、実験にご協力くださった、大山高央博士、松井直子氏、磯部崇博士、吉田真氏に感謝します。

論文作成にご助言いただいた磯野藤男博士、和田悌司博士、奥平典子博士、高津敏夫博士、田中勝弘博士に感謝します。

実験と論文作成を長い間、丁寧にご指導くださった安東治博士に尊敬と深い感謝の意を表します。

最後に、研究生生活を支えてくれた家族に心より感謝します。

2017年 中島（上妻） 志保