

審査の結果の要旨

氏名 中島（上妻） 志保

近年、高齢化や、免疫低下を伴う糖尿病・癌などの罹患率増加に付随し、日和見感染が増加している。感染微生物を免疫システムで排除することができずに感染が拡大した場合や、増殖した微生物に対する薬剤投与によって微生物構成成分が体内に急激に拡散した場合、自然免疫系が活性化して過剰な炎症応答が誘導され、敗血症に陥ることがある。敗血症は全身性の炎症症状を呈し、致死率が非常に高い疾患である。感染源は細菌や真菌など様々であるが、その中でもグラム陰性菌の外膜構成成分である lipopolysaccharide (LPS) は強力なエンドトキシンであることが知られている。

本研究は、LPS に起因する敗血症の治療薬開発を目指し、LPS の作用を阻害する化合物の探索、同定、作用解析を行ったものである。論文は背景と目的を述べた緒言、結果と考察を述べた5つの章、およびまとめと展望を記した総括の章からなる。

第一章では、LPS 阻害剤を天然物サンプルから探索するためのアッセイ系の構築と、得られた阻害剤生産菌の性質、培養、阻害剤の精製、構造決定について述べている。LPS が細胞表面に結合するためには CD14 タンパク質が主要な役割を果たすことが確認されたことから、LPS と CD14 の相互作用を阻害する化合物の獲得を目指した。相互作用の検出には蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) を利用し、2つの分子が近接したときにのみ検出される蛍光を測定した。天然物サンプル約6万検体に対してハイスループットスクリーニングを行った結果、土壌細菌である *Pedobacter* sp. SANK 72003 株の培養液中に阻害活性を見出し、新規環状デプシペプチドであるペドペプチン A、B、C を単離した。また、海洋細菌である *Pseudoalteromonas* sp. SANK 71903 株の培養液中から新規環状ペプチドであるオギペプチン A、B、C、D を単離した。

第二章では、ペドペプチンとオギペプチンの生物活性について述べている。FRET アッセイ系における LPS-CD14 相互作用を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀ 値) は、ペドペプチンが 11-47 nM、オギペプチンが 4.1-6.0 nM であった。いずれの化合物も CD14 強制発現細胞に対する LPS の結合を抑制した。LPS による炎症応答は、ヒト単球系 U937 細胞株を分化誘導させた、内在性受容体発現マクロファージ様細胞を用い、tumor necrosis factor- α (TNF- α) の産生を指標とした。その結果、ペドペプチンは IC₅₀ 値 0.1-0.3 μ M、オギペプチンは 0.3-0.5 μ M で TNF- α の産生を抑制した。さらに、LPS 誘導炎症マウスモデルとして、C3H/HeN マウスに LPS を

静脈内投与し、血中の TNF- α の濃度上昇を指標に評価した。化合物を前投与し、LPS 投与の 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 の薬効を示した。以上のように、ペドペプチンとオギペプチンは細胞および動物において LPS による炎症誘導を抑制することが明らかとなった。

第三章では、ペドペプチンとオギペプチンの作用機序の解析について述べている。作用の選択性を評価するため、LPS と LPS 以外の細菌構成成分を刺激剤とした場合の、マクロファージ様細胞による TNF- α 産生に対する影響を比較した。その結果、ペドペプチンとオギペプチンは LPS 刺激に対して選択的な阻害作用を示した。LPS に対する直接的な相互作用の有無を表面プラズモン共鳴法を用いて検討したところ、ペドペプチンとオギペプチンは濃度依存的な反応性を示し、LPS に直接結合することが明らかになった。LPS は、血清存在下では LPS binding protein (LBP) と相互作用している。そこで LPS と LBP の相互作用を検出する FRET アッセイ系を構築して評価した結果、オギペプチンは明確に相互作用を阻害したが、ペドペプチンは明確な阻害を示さなかった。

第四章では、ペドペプチンとオギペプチンの抗菌活性について述べている。LPS 結合性を有する抗生物質ポリミキシン B は、グラム陰性菌外膜の LPS に結合して構造を不安定化し、抗菌活性を発揮することが知られている。複数の細菌株を対象に評価した結果、ペドペプチンとオギペプチンは抗菌活性を示し、ペドペプチン B 以外はグラム陰性菌に選択性を有することが明らかとなった。

第五章では、ペドペプチンとオギペプチンの構造と活性に関する考察を述べている。既知の LPS 結合モチーフとアミノ酸配列を比較し、複数の陽性荷電、両親媒性、ループ様構造などの共通する特徴がペドペプチンとオギペプチンの LPS 結合性に寄与すると考察した。また、ペドペプチン B は、LPS に依存しない膜障害活性を有することで、細胞障害活性や非選択的な抗菌活性を示すと推察した。

以上、本論文は LPS の作用を阻害する新規化合物の探索、同定、およびその作用機序の解析を行ったものであり、学術的・応用的に貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。