

2Cp21 抗菌ペプチド Apidaecin の高活性化のための戦略：細胞内導入量の向上

○山形 享子¹, 一戸 健太¹, 折笠 善丈¹, 橋本 茂樹²,
松本 謙一郎¹, 大井 俊彦¹, 田口 精一¹
(¹北大院・工・生物機能高分子, ²東理大・基礎工)

[目的] Apidaecin は天然アミノ酸からなるミツバチ由来の抗菌ペプチドであり、グラム陰性菌に対して静菌的に作用し、耐性菌を誘発しにくい環境調和型の新規抗菌剤として期待されている。我々はこれまでに独自の進化戦略で Apidaecin 高活性変異体を7種取得した¹⁾。本研究ではそのうちの2種と野生型を蛍光標識し、大腸菌へ作用させた際の細胞の蛍光強度を指標として細胞内導入量を比較することで高活性化の要因を検討した。

[実験方法と結果] Apidaecin 野生型と高活性変異体の N 末端に蛍光色素カルボキシフルオレセイン (FAM) を付加した3種の蛍光標識体を作製し、それぞれを同一濃度で作用させた大腸菌の蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定した。その結果、高活性変異体は野生型に比べて蛍光強度が上昇しており、細胞内導入量が向上していることが示唆された。加えて、各変異体が示した蛍光強度と抗菌活性の間に相関がみられたことから、細胞内導入量の向上が抗菌活性向上の一因であると考えられる。

1) S. Taguchi et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 1460-1464 (2009)

A strategy for activity improvement of an antibacterial peptide Apidaecin: improvement in membrane permeability

○Kyoko YAMAGATA¹, Kenta ICHINOHE¹, Yoshitake ORIKASA¹,
Shigeki HASHIMOTO², Ken' ichiro MATSUMOTO¹, Toshihiko OOI¹,
Seichi TAGUCHI¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,
²Fuc. Ind. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

Key words antibacterial peptide, apidaecin

2Cp23 ペプチドアレイを用いたコレステロール吸収抑制ペプチドのデザイン

○竹下 敏一¹, 加賀 千晶¹, 加藤 竜司¹, 大河内 美奈¹,
伊勢川 真史², 兼松 智², 山下 佑加², 森川 健正², 長岡 利²,
本多 裕之^{1,3}
(¹名大院・工・生物機能, ²岐大院・農・応生, ³名大・予防
早期医療創成センター)

【目的】血中コレステロールの増加はメタボリックシンドロームの危険因子の1つである。食事性コレステロールは小腸で胆汁酸とミセルを形成することで体内へ吸収される。ミセル形成はコレステロール吸収に不可欠な現象であることから、胆汁酸と高親和性を有した化合物はミセル形成阻害を示すことが期待され、コレステロール吸収阻害剤として非常に有用であると考えられる。本研究では、大豆グリシニン由来のペプチドである VAWWMY (Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr) をシード配列とした胆汁酸高結合ペプチドのデザインを試みた。

【方法・結果】本研究によるペプチドデザインは2ステップより成る。第1ステップはVAWWMY の1残基置換網羅アレイを作製することで、各ポジションにおける最適アミノ酸残基のスクリーニングを行った。第2ステップでは、前ステップで得られたアミノ酸を網羅的に組み合わせたアレイを作製し、スクリーニングを行った。その結果、VAWWMY を超える3種類の胆汁酸高結合ペプチドのデザインに成功した。デザインしたペプチドは in vitro において高いミセル形成阻害能を示し、in vivo においても、高いコレステロール吸収阻害作用を示した。本研究で得られた2種類の胆汁酸高結合ペプチドはコレステロール吸収阻害作用を有することから、今後食品や医薬品への応用が期待される。

Screening and design of functional peptide for cholesterol uptake inhibition

○Toshikazu TAKESHITA¹, Chiaki KAGA¹, Ryuji KATO¹,
Mina OKOCHI¹, Masashi ISEGAWA², Satoshi KANEMATU²,
Yuka YAMASHITA², Kensei MORIKAWA², Satoshi NAGAOKA²,
Hiroyuki HONDA^{1,3}
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Fac. Agric., Gifu Univ., ³MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering)

Key words Peptide array, Bile acid, Cholesterol

2Cp22 抗菌ペプチド Thanatin およびその高活性化化学修飾体の細菌に対する作用

○折笠 善丈¹, 斉藤 洵己¹, 橋本 茂樹², 松本 謙一郎¹,
大井 俊彦¹, 田口 精一¹
(¹北大院・工・生物機能高分子, ²東理大・基礎工)

Thanatin はカメシム由来の21アミノ酸残基からなる抗菌ペプチドであり、グラム陽性菌、陰性菌、糸状菌と幅広い抗菌スペクトルを持つがその作用機構は明らかにされていない。現在までに、Thanatin 分子中の逆平行βシート構造に存在する11番目と18番目のシステイン残基の側鎖部位を、疎水性のアルキル鎖で化学修飾することで抗菌活性が上昇することが報告されている^{1,2)}。本研究では、野生型と化学修飾体の局在を比較することで高活性化の原因を検討することを目的とした。

局在の比較を行うため、野生型、化学修飾体を化学合成法によって作製し、さらにペプチド鎖のN末端アミノ基にCarboxyfluoresceinを付加した蛍光標識体をそれぞれ作製した。被検菌としてグラム陽性菌である *Corynebacterium glutamicum* を用い、これらを用いた菌を蛍光顕微鏡観察したところ、野生型、化学修飾体が共に膜へ局在している様子が観察された。次に、抗菌活性を調べたところ化学修飾体は蛍光標識の有無に関わらず野生型よりも高い活性を示した。これらの結果から、化学修飾体の高活性化は膜への作用が変化したことが原因のひとつであると考えられた。
1) T. Imamura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 609-615 (2008)
2) Y. Orikasa et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2009)

Comparison of the action against bacteria using antimicrobial peptide, thanatin and its derivatives

○Yoshitake ORIKASA¹, Junki SAITO¹, Shigeki HASHIMOTO²,
Ken'ichiro MATSUMOTO¹, Toshihiko OOI¹, Seichi TAGUCHI¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,
²Fuc. Ind. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

Key words antimicrobial peptide, chemical modification, thanatin

2Cp24 ペプチドアレイを用いた血管新生阻害のための細胞接着ペプチドの探索

○菅原 毅¹, 加賀 千晶¹, 加藤 竜司¹, 大河内 美奈¹,
本多 裕之^{1,2}
(¹名大院・工・生物機能, ²名大予防早期医療創成センター)

【目的】血管新生はがん細胞の増殖・転移を誘導することから、がん抑制の観点より血管新生を阻害する治療薬の開発が注目されている。細胞接着ペプチドRGDS (Arg-Gly-Asn-Ser) は、血管内皮細胞の接着阻害やAnoikis機構などにより血管新生阻害をすることが報告されている。本研究ではペプチドアレイを用いて、血管新生阻害剤の素材となりうる新規の細胞接着ペプチドを探索した。

【方法及び結果】本研究ではまず、ランダムな4mer peptide libraryからペプチドアレイとパイオインフォマティクスを組み合わせた「ペプチドインフォマティクス」という手法を用いて、マウス繊維芽細胞に接着するペプチドを取得した。この中から血管内皮細胞 (HUVEC: human umbilical vein endothelial cell) に強く接着するペプチドを、ペプチドアレイを用いて探索した。また、これらのペプチドをガラス基板上に合成したガラスアレイ上で HUVEC を培養し、細胞形態の変化を観察することにより、HUVEC 接着ペプチドを同定した。さらにペプチドの接着性を向上させるために残基置換も行った。このようにして見つかった接着ペプチドが in vitro において血管新生阻害を示すことを確認した。

Screening of cell adhesive peptides for anti-angiogenesis using peptide array

○TAKESHI SUGAWARA¹, Chiaki KAGA¹, Ryuji KATO¹,
Mina OKOCHI¹, Hiroyuki HONDA^{1,2}
(¹Dept. of Biotechnol., Sch. of Eng., Nagoya Univ., ²PME center, Nagoya Univ)

Key words peptide array, anti-angiogenesis, adhesive peptide