

2022年度 北陸大学特別研究助成【 若手・女性研究 】 報告書

代表者	所属	薬学部	職位	准教授	氏名	興村 桂子
-----	----	-----	----	-----	----	-------

研究課題名	抗菌ペプチド myticalin A6 (3-23)-OH の X-Pro-Arg 鎖長延長誘導体類の新規合成および抗菌活性、細胞毒性、溶血活性との相関の検討
-------	---

交付額	750,000 円
-----	-----------

研究成果の概要

申請者はこれまでに、myticalin A6 (3-23)-OH は、X-Pro-Arg の7回の繰り返し配列を持つ抗菌ペプチドであり、myticalin A6 の抗菌活性保持に重要な部位であることを報告し、その各種誘導体類を合成し、その抗菌活性および細胞毒性を検討してきた。また、Azumaらにより2020年に magainin 2 誘導体においては正電荷 (+9~+10) とPro残基の同時導入によりそれぞれ抗菌活性の向上と細胞毒性の低下に寄与したと報告されたことより、本研究では myticalin A6 (3-23)-OH の N- または C-末端部へ (X-Pro-Arg)*n* (*n* = 1~4) を伸長した誘導体等を合成・精製し抗菌活性および細胞毒性を検討した。(X-Pro-Arg)*n*-myticalin A6 (3-23)-OH (*n* = 1~3) は全て黄色ブドウ球菌、大腸菌および緑膿菌に対して myticalin A6 (3-23)-OH よりも高活性を示し、細胞毒性は鎖長伸長に伴って高くなる傾向を示した。

研究目的

薬剤耐性菌感染症による死亡は世界中で増加しており、このまま対策を取らなければ2050年には年間死亡者数は1,000万人にまで上昇するとの予測¹⁾がある。世界における医療上の問題の一つとして、抗微生物薬の多用による薬剤耐性 (AMR: antimicrobial resistance) があり、国内でも院内感染 (日和見感染) の病原菌であるグラム陽性菌のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、グラム陰性桿菌の緑膿菌、病原性大腸菌などの多剤耐性が問題となっており、疾患などで体力や免疫力の落ちた患者や高齢者などには脅威となっている。多剤耐性菌発生の対策として抗菌薬の適正使用の推進 (不適正使用の抑制) があるが、多剤耐性菌感染症の対策として新規抗菌薬の必要性が高まっており、その創製が求められている。しかし、新規抗菌薬を開発しても耐性菌発現抑制のために使用制限がかかるなどの理由から新規抗菌薬開発が推進されにくい状況である。従来の抗菌薬のみでは薬剤耐性菌に罹患した場合の対応が難しくなる状況であり、世界的に見ても新規抗菌薬の開発が急務の課題となっている。

Myticalin は Leoni らにより報告²⁾された抗菌ペプチドである。また近年、myticalin類の膜透過性抗菌作用のメカニズムに関する研究結果が、Pacor らによって報告³⁾されている。

申請者はこれまでに、myticalin A6 およびその短鎖誘導体類の大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性検討を行い、特徴的な (X-Pro-Arg)*n* 繰り返し配列構造を持つ myticalin A6 (3-23)-OH はグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に対して高い抗菌活性を示し、その抗菌活性は対照として用いたピペラシリンナトリウムに近似の高活性を示すことを報告⁴⁾した。また、2020年に Azuma らにより、抗菌ペプチドの一種である magainin 2 誘導体においては正電荷 (+9~+10) とPro残基の同時導入によりそれぞれ抗菌活性の向上と細胞毒性の低下に寄与したとの報告⁵⁾があり、その結果は本研究で用いている X (脂溶性アミノ酸: Trp等) -Pro-Arg (正電荷あり) をさらに伸長することで抗菌活性を向上させる可能性を示唆する内容であることより、N-末端部 または C-末端部への X-Pro-Arg の伸長による抗菌活性および細胞毒性を検討することを目的とした。

研究の方法

- 1) ペプチド合成・精製：さらなる高い抗菌活を持ちかつ低毒性の誘導体合成を目指して、抗菌活性の発現に重要な構造である(X-Pro-Arg)*n* 繰り返し配列構造を持つ myticalin A6 (3-23)-OH の N-末端部またはC-末端部へさらに (X-Pro-Arg)*n* (X = Trp) を伸長した新規誘導体を自動マイクロ波固相ペプチド合成装置を用いて合成、HPLC分取およびゲルろ過カラムにより精製後、質量分析により合成ペプチドの構造を確認した。
- 2) 抗菌活性測定：合成した myticalin A6 (3-23)-OH 誘導体類に対し、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌) およびグラム陰性菌 (大腸菌、緑膿菌) に対する抗菌活性を最小発育素子濃度 (MIC) により検討した。
- 3) 細胞毒性および溶血活性測定：合成誘導体類のうち抗菌活性が高い誘導体等については、研究分担者に依頼して MTT assay による細胞毒性検討およびマウスおよび/またはヒト赤血球を用いた溶血活性を測定した。
- 4) 上記の結果より、正電荷および Pro の増加と抗菌活性、細胞毒性および溶血活性との構造活性相関を検討した。

myticalin A6

Tyr-Ser-Trp-Pro-Arg-Leu-Pro-Arg-Ile-Pro-Arg-Leu-Pro-Arg-Tyr-Pro-Arg-Tyr-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-His-Pro-Thr-Ile-Tyr-Ala-NH₂

myticalin A6 (3-23)-OH

Trp-Pro-Arg-Leu-Pro-Arg-Ile-Pro-Arg-Leu-Pro-Arg-Tyr-Pro-Arg-Tyr-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-OH

研究成果

1) Myticalin A6 (3-23)-OH の *N*-末端部脂肪酸付加または Trp 置換誘導体類の抗菌活性・細胞毒性の検討

申請者らにより先行して合成・精製を進めていた、myticalin A6 (3-23)-OH の *N*-末端部へアミノ基を含む脂肪酸類を導入して合成した誘導体類、および、X-Pro-Arg の X 部位の一部を Trp で置換した誘導体類（それらの一部は C-末端部をアミドに変換した誘導体とした）について既に抗菌活性測定を進めていたが、本助成金を使用して細胞毒性・溶血活性について検討する際に併せて結果を検討した。

合成した myticalin A6 (3-23)-OH 誘導体類は、myticalin A6 (3-23)-OH と比較して、黄色ブドウ球菌および大腸菌に対して同等またはわずかに高い抗菌活性を示した。また、これらの誘導体類の中では、3-amino-4-(2-naphthyl)butyl-myticalin A6 (3-23)-OH は myticalin A6 (3-23)-OH よりも緑膿菌に対して高い抗菌活性を示し、さらに IC₅₀ の値は myticalin A6 (3-23)-OH よりもわずかに低い活性を示した。

この結果は、第59回ペプチド討論会において発表し、Peptide Science 2022 に掲載された。

2) Myticalin A6 (3-23)-OH の *N*-末端部 Trp-Pro-Arg 鎖長延長誘導体類の合成・精製後、抗菌活性・細胞毒性の検討

Myticalin A6 (3-23)-OH の *N*-末端部へ (X-Pro-Arg)*n* (X=Trp, *n* = 1~4) を伸長した誘導体類 : (Trp-Pro-Arg)*n*-myticalin A6 (3-23)-OH (*n* = 1~4) を合成後、RP-HPLC による分取、続いてゲルろ過カラムによる精製を行い、精製品は最終的に凍結乾燥品として得た。得られた誘導体は MALDI-TOF-MS による質量分析により確認することができた。

今回合成した *N*-末端部へ (Trp-Pro-Arg)*n* を伸長した (Trp-Pro-Arg)*n*-myticalin A6 (3-23)-OH (*n* = 1~3) は、myticalin A6 (3-23)-OH よりも、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌および、グラム陰性菌である大腸菌および緑膿菌に対して高活性を示した。細胞毒性は鎖長伸長に伴って高くなる傾向を示した。

上記の結果は、Azumaらによる抗菌ペプチド magainin 2 誘導体での正電荷 (+9~+10) と Pro 残基の同時導入によりそれぞれ抗菌活性の向上と 細胞毒性の低下に寄与したとの結果と近似の結果を示した。

これらの結果は、日本薬学会第143年会において発表した。

3) Myticalin A6 (3-23)-OH の C-末端部 Trp-Pro-Arg 鎖長延長誘導体類の合成・精製後、抗菌活性・細胞毒性の検討

Myticalin A6 (3-23)-OH の C-末端部へ (X-Pro-Arg)*n* (X=Trp, *n* = 1~4) を伸長した誘導体類 : myticalin A6 (3-23)-(Trp-Pro-Arg)*n*-OH (*n* = 1~4) を合成後、RP-HPLC による分取、続いてゲルろ過カラムによる精製を行い、精製品は最終的に凍結乾燥品として得た。得られた誘導体は MALDI-TOF-MS による質量分析により確認した。

合成誘導体類に対して、抗菌活性、細胞毒性、溶血活性 (マウス、ヒト) を検討し、構造-活性相関の検討を行った。

本結果は、第60回日本ペプチド討論会において発表を計画中の未公表データである。

4) 今後の研究計画

Myticalin A6 (3-23)-OH 誘導体における抗菌活性の向上および細胞毒性の低下を目指して、これまでに得られた誘導体の結果を組み合わせるなどにより、さらなる高活性・低毒性誘導体に向けて検討していく。

<引用文献>

- 1) The Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neill, 2014&2016.
- 2) Leoni, G., Andrea., D. P., Mardirossian, M., Gambato, S., Florian, F., Venier, P., Wilson, D. N., Tossi, A., Pallavicini, A., Gerdol, M. (2017) *Mar. Drugs*, **15**, 1-23.
- 3) Pacor, S., Benincasa M., Musso M. V., Krce L., Aviani I., Pallavicini A., Scocchi M., Gerdol M., Mardirossian, M. (2021) *Peptides*, **143**, 170594, 1-8.
- 4) Okimura, K., Matsubara, K., Suzuki, R., Ito, H., Sato, A., Sugimoto, K. (2021) *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 515-521.
- 5) Azuma, E., Choda, N., Odaki M., Yano Y., and Matsuzaki K, (2020) *ACS infect. Dis.* **6**, 2771-2278.

主な発表論文等

<査読有り著書>

Keiko Okimura, Tatsuo Takahashi, Risa Sugita, Sayuri Suzuki and Tohru Daikoku, Study of the Antimicrobial Activity and Cell Viability of *N*-Fatty Acylated or Tryptophan Substituted Myticalin A6 (3-23)-OH Derivatives, Peptide Science 2022, T. Doi, H. Konno, and K. Ohsawa (Eds.), The Japanese Peptide Society, 115-116 (2023).

<学会発表>

- 1) Keiko Okimura, Tatsuo Takahashi, Risa Sugita, Sayuri Suzuki and Tohru Daikoku, Study of the antimicrobial activity and cell viability of *N*-fatty acylated or tryptophan substituted myticalin A6 (3-23)-OH derivatives, 第59回ペプチド討論会, 仙台 (2022.10.27, ポスター発表)
- 2) 興村 桂子、高橋 達雄、森本 倫代、山本 彩賀、大黒 徹, 抗菌ペプチド myticalin A6 (3-23)-OH の *N*-末端部 Trp-Pro-Arg 鎖長延長誘導体類の抗菌活性および細胞毒性の検討, 日本薬学会第143年会, 札幌 (2023. 3.28, 口頭発表)

組織

分担・協力者	氏名	所属	職位	役割
研究分担者	大黒 徹	薬学部	教授	抗菌活性測定時の協力および施設・設備管理
研究分担者	高橋 達雄	薬学部	教授	細胞毒性および溶血活性の検討