


## 2017（平成29）年度 北陸大学特別研究助成金【 奨励・若手女性 】 成果報告書

北 陸 大 学  
学 長 殿

平成 30 年 5 月 1 日

代表者	所属	薬学部	職位	講師	氏名	興村 桂子	
-----	----	-----	----	----	----	-------	-------------------------------------------------------------------------------------

研究課題名	新規抗菌活性ペプチド誘導体の合成および抗菌活性の検討
-------	----------------------------

交付額	500,000	円
-----	---------	---

## 研究成果の概要

体力や免疫力が落ちた患者や高齢者への日和見感染や多剤耐性菌による感染症が現在も問題となっており、新規抗菌薬の開発は大変有用である。本研究では、2016年に E. Chaparro らにより報告された抗菌活性ペプチドLacrain およびその活性増強を目的とした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後、HPLC 分取およびゲル濾過カラムによる精製を行い、高純度な誘導体を得た後、E. Chaparro らの方法に準じて類縁菌種を用いて抗菌活性を測定した。Lacrainおよび一部の合成誘導体は今回の活性測定条件下では抗菌活性が認められなかった。Arg-Arg-Thr-Trp-Lacrain(3-7)-Arg-Arg-Thr-Trp-OH およびArg-Arg-Thr-Lacrain(2-7)-Arg-Arg-Thr-Tyr-OHは大腸菌および緑膿菌に対する活性が認められ、後者は他誘導体よりも緑膿菌に対して強い抗菌活性を示した。

**研究目的** 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

疾患などで体力や免疫力が落ちた患者や高齢者への日和見感染について現在も多数の報告があり、多剤耐性菌が問題となっている。多剤耐性菌への対策として厚生労働省健康局結核感染症課より「抗微生物薬適正使用の手引き 第一版」（平成29年3月1日）が発行されている。

厚生労働省が推進する薬剤耐性（AMR）耐性アクションプランにおいては、抗生物質の使用制限などによる対策が行われているが、多剤耐性菌による疾患にかかってしまった場合等の対策として新規抗菌薬の開発は大変有用である。

研究代表者は、以前よりペプチドを液相法<sup>1)</sup> または固相法<sup>2)</sup> により合成し、精製後に構造-活性相関を検討する研究を行ってきた。ペプチド性抗生物質であり医薬品でもあるポリミキシン類の半合成法などによる構造-活性相関研究<sup>3,4)</sup> を行ってきた。ポリミキシンは特殊アミノ酸を複数含む環状構造を持っているが、直鎖かつ短鎖のペプチド性抗生物質であれば合成も容易である。

また、平成29年3月に本学中央機器としてマイクロ波ペプチド合成装置が導入された。マイクロ波によるペプチド合成法は従来の液相法や固相合成法と比較して短時間で収率良くペプチド合成を行うことができ、かつ溶媒等の使用量も少なく済むなどのメリットの多い方法である。

2016年に E. Chaparro らにより報告されたムカデ（Brazilian Chilopoda Scolopendra viridicornis）より抽出された抗菌活性ペプチドLacrain<sup>5)</sup> は直鎖かつ短鎖（アミノ酸8個から構成）のペプチドであると報告された。

今回Lacrainおよび下記の誘導体類を合成した。 Lacrain H-Arg-Tyr-Pro-Ala-Val-Gly-Tyr-Thr-OH

- ① N- または C-末端部よりアミノ酸を欠損させたペプチド類を合成した。（活性部位の探索を目的）
- ② N-末端部に高脂溶性の構造を持つカルボン酸類を縮合した誘導体類を合成した。（細胞膜への親和性を上げることを目的）
- ③ N- およびC-末端部へArg, Thr, Trp, Tyr残基を含む構造を導入した誘導体類を合成した。（活性増強を目的に塩基性アミノ酸導入、鎖長の延長等）

合成アナログ類の抗菌活性を検討し、抗菌活性増強および菌特異的な抗菌活性をもつ誘導体の生成を目的とした研究を行った。

## 研究の方法

## &lt;ペプチド合成&gt;

Lacrain およびその誘導体は自動マイクロ波固相ペプチド合成装置（Liberty Blue, CEM社）を用いたFmoc-法により合成、TFA（2,2,2-Trifluoroacetic acid）：TIPS（Triisopropylsilane）：Water = 95 : 2.5 : 2.5により脱保護後、RP-HPLC を用いた分取およびゲル濾過（TOYOPEARL HW-40F）カラムによる精製を行い、凍結乾燥を行い高純度な誘導体を得た。合成したペプチドは質量分析により確認した。

合成に用いた試薬類：Fmoc-アミノ酸類[Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH]、樹脂類[Fmoc-Thr(tBu)-Alko Resin, Fmoc-Tyr(tBu)-Alko Resin, Fmoc-Gly-Alko Resin, Fmoc-Trp(Boc)-Alko Resin]、溶媒およびその他の試薬[DMF(N,N-Dimethylformamide), Piperidine, OxymaPure(Ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime), DIPC(1,1'-Diisopropylcarbo-diimide), TFA, TIPS] は渡辺化学工業より購入して用いた。C末端部がアミド(-CONH<sub>2</sub>)となっているペプチド合成時の樹脂はRink Amide ProTide Resin (CEM社) を用いた。

## &lt;抗菌活性&gt;

Chaparro らの方法<sup>5)</sup> に準じたマイクロプレート法による大腸菌（*E. coli* IF012734）および緑膿菌（*P. aeruginosa* NBRC3080）に対する最少発育阻止濃度（MIC）により測定した。

Chaparro らの方法<sup>5)</sup> では菌株として大腸菌では *E. coli* D31、緑膿菌では *P. aeruginosa* ATCC27853を用いて測定している。

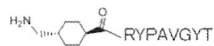
## 〈合成ペプチド〉

① N-末端またはC-末端よりアミノ酸を除去した誘導體類

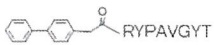
- a) Lacrain-OH RYPAVGYT  
 b) Lacrain(1-7)-OH RYPAVGY  
 c) Lacrain(1-6)-OH RYPAVG  
 d) Lacrain(2-8)-OH YPAVGYT  
 e) Lacrain(3-8)-OH PAVGYT  
 f) Lacrain(4-8)-OH AVGYT

② N-末端部に高脂溶性の構造を持つカルボン酸類を縮合した誘導體類

- g) *trans*-4-aminomethyl-cyclohexanecarboxyl-Lacrain-OH  
 Arg-Arg-Lacrain-Arg-Arg-Tyr-Tyr-OH



- h) 4-Biphenylacetyl-Lacrain-OH



- i) Cyclohexylbutanoyl-Lacrain-OH



③ その他 N- およびC-末端部へArg, Thr, Trp, Tyr残基を含む構造を導入した誘導體類等

- j) [Arg<sup>2</sup>]-Lacrain-OH RRPVAVGYT  
 k) [Tyr<sup>1</sup>,Arg<sup>2</sup>]-Lacrain-OH YRPVAVGYT  
 l) [Tyr<sup>1</sup>]-Lacrain-OH YYPVAVGYT  
 m) Lacrain-NH<sub>2</sub> RYPVAVGYT-NH<sub>2</sub>  
 n) Lacrain(2-8)-NH<sub>2</sub> YPAVGYT-NH<sub>2</sub>  
 o) Arg-Lacrain-OH RRPVAVGYT  
 p) Arg-Tyr-Lacrain(2-8)-OH RYPVAVGYT  
 q) Arg-Arg-Thr-Trp-Lacrain(3-7)-Arg-Arg-Thr-Trp-OH RRTWPVAVGYRRTW  
 r) Arg-Arg-Lacrain-Arg-Arg-Tyr-Tyr-OH RRRYPVAVGYTRRY  
 s) Arg-Arg-Thr-Lacrain(2-7)-Arg-Arg-Thr-Tyr-OH RRTYPVAVGYRRTY

Lacrain および① N- または C-末端部よりアミノ酸を欠損させたペプチドフラグメントは、E. Chaparro らの方法に準じて類縁菌種を用いて抗菌活性を測定したが、この条件下では抗菌活性が認められなかった (MIC: 大腸菌 >1280 µg/mL、緑膿菌 >1280 µg/mL)。この結果は、抗菌活性測定に用いた菌株が異なることによる可能性が考えられる。

② N-末端部に高脂溶性の構造を持つカルボン酸類を縮合した誘導體類においては、4-Biphenylacetyl-Lacrain-OH (h) およびCyclohexylbutanoyl-Lacrain-OH (i) は、合成ペプチドの脂溶性が高く、溶媒としてエチルアルコールを使用した。そのためにアルコールによる影響により正確な活性測定ができなかった。今後の課題として、エチルアルコールではなくジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた活性測定を検討している。

③ N- およびC-末端部へArg, Thr, Trp, Tyr残基を含む構造を導入した誘導體類のうち、Arg-Arg-Thr-Trp-Lacrain(3-7)-Arg-Arg-Thr-Trp-OH (q, MIC: 大腸菌 320 µg/mL、緑膿菌 640 µg/mL)、Arg-Arg-Lacrain-Arg-Arg-Tyr-Tyr-OH (r, MIC: 大腸菌 640 µg/mL、緑膿菌 1280 µg/mL) およびArg-Arg-Thr-Lacrain(2-7)-Arg-Arg-Thr-Tyr-OH (s, MIC: 大腸菌 320 µg/mL、緑膿菌 80 µg/mL)は大腸菌および緑膿菌に対する活性が認められた。中でも (s) は緑膿菌に対する抗菌活性が強かった。塩基性アミノ酸および脂溶性アミノ酸の数を増やしたことで菌膜への作用が強くなったと考えられ、Trpの側鎖インドールよりもTyrの側鎖 -OH が緑膿菌に対する作用増強に関与していると思われる。

抗菌活性の対象として用いた polymyxin B の結果は大腸菌に対しては0.25 µg/mL、緑膿菌に対しては 0.5 µg/mL であり、今回合成した Lacrain 誘導體は Lacrain より活性が増強したが、polymyxin B の 活性には及ばなかった。

今回、マイクロウェーブ法を用いた直鎖の抗菌ペプチド誘導體を合成し、その抗菌活性の構造-活性相関研究法を確立した。今後、別の高活性な新規抗菌ペプチドを基盤とした構造-活性相関研究、また、緑膿菌など菌種を絞った抗菌活性誘導體の合成研究等を進めていきたい。

〈謝辞〉

分子量測定は、杉本佳織氏 (株式会社スクラム) に測定を依頼した。

〈引用文献〉

- 1) S. Nagai, K. Okimura, N. Kaizawa, K. Ohki and S. Kanatomo, *Chem. Pharm. Bull.*, 44(1), 5-10 (1996).
- 2) K. Okimura, N. Sakura, S. Ohta, K. Kurosawa and T. Hashimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 40(6), 1500-1503 (1992).
- 3) K. Okimura, K. Ohki, Y. Sato, K. Ohnishi, Y. Uchida, and N. Sakura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 80(3), 543-552 (2007).
- 4) K. Okimura, K. Ohki, Y. Sato, K. Ohnishi, and N. Sakura, *Chem. Pharm. Bull.*, 55(12), 1724-1730 (2007).
- 5) E. Chaparro, P.I. da Silva Junior, *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Sep; 48(3): 277-85.
- 6) この研究内容の一部は日本薬学会 138年会 (金沢、2018年) においてポスター発表をした。

主な発表論文等 論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい

日本薬学会 138年会 (金沢) ポスター発表  
 抗菌ペプチドLacrainの高活性誘導體の合成  
 ○興村桂子、松原京子、伊波由美、島田祐衣