

# ●ラミニンレセプターのラミニン結合部位を基にした抗菌ペプチド設計方法

先端科学研究所 バイオインフォマティクスグループ 小林 菜穂子 吉田 徹彦

細胞接着性糖タンパク質であるラミニンは、細胞の接着、増殖、転移、分化、および神経突起伸長などの様々な生物活性に関与している。多くの細菌は、ラミニンと相互作用するラミニンレセプターに類似したタンパク質を有し、感染の初期段階において細胞接着相互作用を利用することが知られている。本研究では、ラミニンとラミニンレセプターの接着相互作用に着目し、これらのタンパク質の結合部位を基に抗菌ペプチドを分子設計および合成し、その抗菌活性評価を行った。その結果、細菌が有するラミニンレセプターへ相互作用が期待されるラミニンを基にしたペプチドではなく、ラミニンレセプターを基にしたペプチドが非常に優れた抗菌機能を有することが明らかとなった。本研究は、タンパク質のリガンドとレセプターの関係を基本とした従来の創薬研究に対し、レセプターに対しレセプターの相互作用を想定した新しい抗菌ペプチドの設計方法を提案するものである。

## 1 緒言

ラミニンは細胞の外膜に存在する糖タンパク質の一種であり、細胞間の接着、細胞増殖、転移、分化および神経突起伸長などの様々な生物活性に関与している。ラミニンに特異的に結合するラミニンレセプターが正常細胞や癌細胞の細胞表面に存在しており、ラミニンとの相互作用が強力な細胞接着を仲介していることが知られている<sup>1)</sup>。例えば、癌細胞が転移する場合、ラミニンレセプターを通して基底膜へ接着することで様々な臓器へ浸潤していく<sup>1,2)</sup>。また、ラミニンレセプターは、細胞膜の糖タンパク質である細胞性プリオンタンパク質のレセプターとしても機能する<sup>3)</sup>。細胞性プリオンタンパク質のエンドサイトーシス過程において、クラスリン被覆ピットにより細胞質の内部へ移行する際、ラミニンレセプターが細胞膜表面に固着された細胞性プリオンタンパク質とクラスリンとの連結を取り持っているのである。エンドサイトーシス経路内におけるエンドソームやリソソーム、エンドリソソーム等の過程に発生する細胞性プリオンタンパク質の病原性異性化(異常プリオンタンパク質)においてもラミニンレセプターが関与していると考えられている<sup>4)</sup>。

ラミニンレセプターファミリーは酵母から脊椎動物まで真核生物において非常によく保存されたタンパク質ファミリーである<sup>5)</sup>。多くの細菌は、自身の細胞膜表面に真核生物のラミニンレセプターに類似したラミニンレセプターを有する<sup>5-8)</sup>。そして、それらの細菌は、感染の初期段階に、ラミニンとラミニンレセプターによる細胞接着相互作用をうまく利用して宿主細胞へ感染するのである<sup>6-10)</sup>。本研究では、細胞同士の接着に重要な役割を担っているタンパク質の相互作用に着目し、ラミニンとラミニンレセプターが互いに作用しあう各々の結合部位のアミノ酸配列を基に抗菌ペプチドを設計した。また、同様に、プリオンとラミニンレセプターが互

いに作用しあう結合部位を基にした抗菌ペプチドも設計した。設計したペプチドを化学合成し、それらの抗菌機能を検討する為に最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) の評価を行った。その結果、興味深いことに細菌が有するラミニンレセプターへ相互作用が期待されるラミニンや細胞性プリオンタンパク質の結合部位を基にしたペプチドではなく、ラミニンレセプターのラミニンや細胞性プリオンタンパク質への結合部位を基にしたペプチドが、非常に優れた抗菌機能を有することが明らかとなった。ラミニンレセプターを有する細菌に対し、他生物由来のラミニンレセプターを基にしたペプチドに抗菌機能が確認されたのである。現在、創薬研究において、タンパク質のリガンドとレセプターの関係を利用して様々な分子標的薬剤の探索が行われているが、それに対して、本研究のレセプターに対しレセプターの相互作用を想定して用いた抗菌ペプチド<sup>11)</sup>は、従来にない新しい薬剤の設計方法としての可能性を示唆するものである。

## 2 実験

### 2.1 ペプチド合成

ペプチド合成は、9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 固相合成法を用いて行った。Rink amide resin上にアミノ酸を伸長した後、Trifluoroacetic acid (TFA) カクテル (80% TFA、12% thioanisole、6% 1, 2-ethanedithiol、および2% *m*-cresol) による側鎖の脱保護処理を3時間行った。その後、冷ジエチルエーテルによりペプチドを沈殿させ、遠心 (2000rpm、5分) により回収した。High performance liquid chromatography (HPLC) を用いて ODS カラムにより純度 >95% に精製した。

## 2.2 抗菌活性評価

### 2.2.1 バクテリア

グラム陽性菌は、*Staphylococcus aureus* NBRC 12732およびmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) COLを用いた。グラム陰性菌は、*Escherichia coli* NBRC 3972および*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145を用いた。

### 2.2.2 バクテリア懸濁液の調製

各菌株は、Luria-Bertani (LB) broth [1.0% (w/v) tryptone、0.5% (w/v) yeast extract、および0.5% (w/v) NaCl、pH7.0]を用いて37°C下で18時間前培養を行った。その後、Mueller-Hinton broth (MHB、Difco)を用いてバクテリア細胞数が約 $2.0 \times 10^6$  cells/mLとなるよう希釈した。調製したバクテリア懸濁液は氷中で保存し、1時間以内に使用した。

### 2.2.3 最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 測定

液体培地希釈法によりMIC測定評価を行った。96穴プレート上にMHB培地を用いてペプチドの2倍希釈系列を作製し、そこにバクテリア懸濁液を $10^6$  cell/mLとなるよう混合した(全量300  $\mu$ L)そして、37°C下で24時間培養した後、目視によりMIC値の判定を行った。

## 3 結果および考察

ラミニンのラミニンレセプターへの結合部位、ラミニンレセプターのラミニンへの結合部位、および細胞性プリオンタンパク質のラミニンレセプターへの結合部位を、本論文では、

それぞれラミニンペプチド(Ln)、ラミニンレセプターペプチド(LR)、およびプリオンペプチド(Pr)と呼ぶ。ラミニンペプチドはブタオザル(*Macaca nemestrina*)由来の配列であり、哺乳類においてよく保存されたアミノ酸配列領域である<sup>12)</sup>。(Table 1)ラミニンレセプターペプチドは、ヒトの67-kDaラミニンレセプター由来の配列を基に酵母などを含む6種類の真核生物の配列のラミニン結合部位を用いた。67-kDaラミニンレセプターのラミニン結合部位は161~180番目のアミノ酸領域であることが報告されている<sup>5)</sup>。この領域上の6アミノ酸残基「LMWWML」は、特に他の生物との相同性が高く、酵母から脊椎動物まで種を越えて非常によく保存された結合ドメインである<sup>5)</sup>。このドメインは、細胞性プリオンタンパク質の結合部位としても報告されている。(Table 1)プリオンペプチドは、細胞性プリオンタンパク質の144~179番目のアミノ酸領域に由来しており、この領域はラミニンレセプターの161~179番目のアミノ酸配列と相互作用があることが確認されている<sup>3)</sup>。(Table 3)これらの結合部位を基にしたペプチドは疎水性が著しく高く抗菌評価を行うのが困難であるため、親水性を高めることを目的に核内移行性シグナル(Nuclear localization signal, NLS)をペプチドN末端あるいはC末端に連結した。NLSは、Arg残基やLys残基を多く含有する親水性の高い配列であり、既に我々が報告した核移行性シグナルを基にした抗菌ペプチド設計方法<sup>13)</sup>において用いている。本研究では、NLS<sub>1</sub> (p54): RIRKKLR, NLS<sub>2</sub> (SV40 Large T antigen): PKKKRKV, およびNLS<sub>3</sub> (Pax-QNR): LKRKLQRの3種類のNLS<sup>14)</sup>を用いた。

ラミニンペプチドとラミニンレセプターペプチドを基にした抗菌ペプチドの*S. aureus*、MRSA、*E. coli*、および

Table 1. Sequences of Laminin Peptides and Laminin Receptor Peptides.

Peptide <sup>a</sup>	Sequence	Organism of origin
Laminin peptide (Laminin receptor-binding site on laminin)		
Ln <sub>1</sub>	YIGSR	<i>Macaca nemestrina</i>
Ln <sub>2</sub>	RGD	<i>Macaca nemestrina</i>
Laminin receptor peptide (Laminin-binding site on laminin receptor)		
LR <sub>1</sub>	LMWWML	<i>Homo sapiens</i>
LR <sub>2</sub>	LIWYLL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mt) <sup>b</sup>
LR <sub>3</sub>	FFYMVI	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (mt)
LR <sub>4</sub>	VVYWLL	<i>Haloarcula marismortui</i>
LR <sub>5</sub>	CLFWLL	<i>Arabidopsis thaliana</i>
LR <sub>6</sub>	LMWWLL	<i>Drosophila melanogaster</i>

<sup>a</sup> Ln<sub>1</sub> and Ln<sub>2</sub>: the laminin peptides (Laminin receptor-binding site on laminin) <sup>12)</sup>, LR<sub>1</sub>: the laminin receptor peptide (Laminin-binding site on 67-kDa laminin receptor). LR<sub>2-6</sub>: homology region of LR<sub>1</sub> in various eukaryotes <sup>5)</sup>.

<sup>b</sup> mt, mitochondrial protein.

**Table 2. MICs for the laminin and laminin receptor peptides linked to NLS.**

Sequence	Composition <sup>a</sup>	MIC (μg/mL)			
		<i>S. aureus</i> NBRC12732	<i>S. aureus</i> COL (MRSA) <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> NBRC3972	<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145
RIRKKLR	NLS <sub>1</sub>	>100	>100	>100	>100
PKKKRKV	NLS <sub>2</sub>	>100	>100	>100	>100
LKRKLQR	NLS <sub>3</sub>	>100	>100	>100	>100
RIRKKLR YIGSR	NLS <sub>1</sub> + Ln <sub>1</sub>	>100	>100	>100	>100
RIRKKLR RGD	NLS <sub>1</sub> + Ln <sub>2</sub>	>100	>100	>100	>100
RIRKKLR LMWWML	NLS <sub>1</sub> + LR <sub>1</sub>	12.5	12.5	25	6.3
PKKKRKV LMWWML	NLS <sub>2</sub> + LR <sub>1</sub>	12.5	50	12.5	6.3
LKRKLQR LMWWML	NLS <sub>3</sub> + LR <sub>1</sub>	3.1	6.3	6.3	6.3
LKRKLQR LIWYLL	NLS <sub>3</sub> + LR <sub>2</sub>	6.3	12.5	12.5	25
LKRKLQR FFYMVI	NLS <sub>3</sub> + LR <sub>3</sub>	3.1	25	12.5	50
LKRKLQR VVYWLL	NLS <sub>3</sub> + LR <sub>4</sub>	3.1	6.3	10.7	6.3
LKRKLQR CLFWLL	NLS <sub>3</sub> + LR <sub>5</sub>	6.3	50	50	50
LKRKLQR LMWWLL	NLS <sub>3</sub> + LR <sub>6</sub>	3.1	6.3	22.3	50
LMWWML RIRKKLR	LR <sub>1</sub> + NLS <sub>1</sub>	3.1	12.5	6.3	6.3

<sup>a</sup> NLS<sub>1</sub>, NLS<sub>2</sub>, and NLS<sub>3</sub> are derived from p54, SV40 Large T antigen, and Pax-QNR respectively <sup>14</sup>.

<sup>b</sup> MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.

**Table 3. MICs for the prion peptide linked to NLS.**

Sequence	Composition <sup>a</sup>	MIC (μg/mL)	
		<i>S. aureus</i> NBRC12732	<i>E. coli</i> NBRC3972
PKKKRKV DYEDRYRENHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDC	NLS <sub>2</sub> + Pr	>280	>280

<sup>a</sup> Pr; the prion peptide (LR-binding site of cellular prion protein<sup>144-179</sup>) <sup>3</sup>. NLS<sub>2</sub> (SV40 Large T antigen): PKKKRKV <sup>14</sup>.

*P. aeruginosa* に対するMIC評価結果をTable 2に示す。評価したペプチドは、次の4タイプに分類される。i) NLSペプチド(NLS)、ii) NLSをN末端に連結したラミニンペプチド(NLS+Ln)、iii) NLSをN末端に連結したラミニンレセプターペプチド(NLS+LR)、iv) NLSをC末端に連結したラミニンレセプターペプチド(LR+NLS)である。NLSは、評価した3種類すべてそれ単体では100 μg/mLでもすべての菌株に対して抗菌活性を示さなかった。また、同様に、NLSを連結したラミニンペプチドNLS<sub>1</sub>+Ln<sub>1</sub>とNLS<sub>1</sub>+Ln<sub>2</sub>の両方もMIC値は>100 μg/mLと抗菌活性を示さなかった。一方、ヒト由来ラミニンレセプターペプチドLMWWMLのN末端側にNLSを連結したNLS<sub>1</sub>+LR<sub>1</sub>は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、あるいは耐性菌に関わらず評価したすべての菌株に対してMIC値6.3~25 μg

/mLと非常に高い抗菌活性を示した。また、LR<sub>1</sub>+NLS<sub>1</sub>はNLS<sub>1</sub>+LR<sub>1</sub>と同等の抗菌活性を示したことから、NLSの連結はN末端側、C末端側のどちらに対しても有効であることが確認された。また、NLS<sub>2</sub>+LR<sub>1</sub>およびNLS<sub>3</sub>+LR<sub>1</sub>がNLS<sub>1</sub>+LR<sub>1</sub>と同等の抗菌活性を示したことから、異なるNLSの連結も有効であることが確認された。更に、ヒト67-kDaラミニンレセプターのラミニン結合部位「LMWWML」相同領域を基にした様々な真核生物由来のラミニンレセプターペプチド5種類についても評価を行った。その結果、NLS<sub>3</sub>+LR<sub>2</sub>、NLS<sub>3</sub>+LR<sub>3</sub>、NLS<sub>3</sub>+LR<sub>4</sub>、NLS<sub>3</sub>+LR<sub>5</sub>、NLS<sub>3</sub>+LR<sub>6</sub>すべてヒト由来ラミニンレセプターペプチドの場合と同様すべての菌株に対して高い抗菌活性(MIC値は3.1~50 μg/mL)を示した。これより、ラミニンレセプターペプチドには、生物種に関わらず共通して非

常に優れた抗菌機能が内在していることが見出された。通常ならば、タンパク質のリガンドとレセプターの関係が「鍵と鍵穴の関係」に例えられる様に、ラミニンペプチドが細菌のラミニンレセプターに相互作用し抗菌活性を示すことが期待される。しかし、驚くべきことに、細菌のラミニンレセプターに対し、ラミニンペプチドではなく、ラミニンレセプターペプチドが抗菌ペプチドとして有効であることが見出されたのである。これは、リガンドとレセプターの関係にコペルニクスの転回を迫るものであり、たとえレセプターとレセプターの関係であっても、その部位の動的な立体構造の変化により相互作用を行う可能性を示唆するものであると考える。ラミニンレセプター由来ペプチドの抗菌活性はこの相互作用に起因するのかもしれない。

ラミニンレセプターは細胞性プリオンタンパク質のレセプターとしても機能することが知られている<sup>3)</sup>。ラミニンレセプターの細胞性プリオンタンパク質への結合部位は、ラミニンへの結合部位と同じ「LMWWML」ドメインである<sup>4)</sup>。そこで、細胞性プリオンタンパク質のラミニンレセプターへの結合部位を基にしたアミノ酸配列であるプリオンペプチドへもそのN末端へNLSを連結し、抗菌活性評価を行った。その結果、ラミニンペプチドの場合と同様、抗菌活性を示さなかった(MIC値は>280  $\mu$ g/mL)。(Table 3)

以上の結果をまとめると、評価したペプチド5種類(NLS、NLS+Ln、NLS+LR、LR+NLS、NLS+Pr)のうち、ラミニンレセプターペプチドに関するもの(NLS+LR、LR+NLS)のみが抗菌機能を有することが示された。その機能はグラム陽性菌およびグラム陰性菌両方に対して有効であり、更には薬剤感受性黄色ブドウ球菌と薬剤耐性黄色ブドウ球菌に対しても差異がないことから、従来の耐性化機構とは異なる抗菌作用点を持っていると考えられる。従来、創薬研究において、タンパク質のリガンドとレセプターの相互作用を基本とした分子標的薬剤を探索する方法が中心的に行われてきている。類似するレセプター同士の相互作用を想定した本研究の抗菌ペプチド設計方法は、新たなペプチド系抗生物質の開発に繋がる可能性があると考えられる。

## 謝 辞

本研究で用いた菌株は、徳島大学高麗研究室より提供いただきました。

## 引用文献

- 1) Mecham P. R., *FASEB J.*, **5**, 2538-2546 (1991).
- 2) Castronovo, V., Taraboletti, G. and Sobel, M. E., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20440-20446 (1991).

- 3) Hundt, C., Peyrin, J.-M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M. L., Deslys, J.-P., Dormont, D., Lasmézas, C. I. and Weiss, S., *EMBO J.*, **20**, 5876-5886 (2001).
- 4) Gauczynski, S.; Hundt, C.; Leucht, C.; Weiss, S. "Advances in protein chemistry, vol. 57, Prion Proteins" (Caughey, B., E. M. Richards, and D. S. Eisenberg, Ed). pp.229-272. Academic Press, San Diego (2001).
- 5) Ardini, E., Pesole, G., Tagliabue, E., Magnifico, A., Castronovo, V., Sobel, M. E., Colnaghi, M. I. and Ménard, S., *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 1017-1025 (1998).
- 6) Carneiro, W. R. C., Postol, E., Nomizo, R., Reis, L. F. L. and Brentani, R. R., *Microbes Infect.*, **6**, 604-608 (2004).
- 7) Świtalski, M. L., Speziale, P., Höök, M., Wadström, T. and Timpl, R., *J. Biol. Chem.*, **259**, 3734-3738 (1984).
- 8) Wahid, M. R., Yoshinaga, M., Nishi, M., Maeno, N., Sarantuya, J., Ohkawa, T., Jalil, A. M., Kobayashi, K. and Miyata, K., *Pediatrics International*, **47**, 196-202 (2005).
- 9) Bandyopadhyay, K., Karmakar, S., Ghosh, A. and Das, P. K., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1622-1629 (2002).
- 10) Ghosh, A., Bandyopadhyay, K., Kole, L. and Das, P. K., *Biochem. J.*, **337**, 551-558 (1999).
- 11) Kobayashi, N. and Yoshida, T., *Protein Pept. L.*, **14**, 33-36 (2007).
- 12) Chambers, J. B., Klein, N. W., Conrad, S. H., Ruppenthal, G. C., Sackett, G. P., Weeks, B. S. and Kleinman, H. K., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 6818-6822 (1995).
- 13) Kobayashi, N., Yamada, Y. and Yoshida, T., *Antimicrob. Agent Chemother.* **50**, 1118-1119 (2006).
- 14) Rost, B., Nair, R. and Cokol, M. PredictNLS server. (prediction and analysis of nuclear localization signals) Columbia University Bioinformatics Center, New York. [Online.]<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>,(2000).