

Mini Review

抗菌ペプチドCAP11の構造改変による殺菌作用とLPS中和能の増強

奥田大樹¹⁾, 蓬田 伸¹⁾, 田村弘志²⁾, 長岡 功¹⁾¹⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学²⁾生化学工業株式会社

Augmentation of the bactericidal and LPS-neutralizing activities of guinea pig cathelicidin CAP11-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions

Mammalian myeloid and epithelial cell express several antibacterial peptides (defensins and cathelicidins) that contribute to the innate host defense by killing invaded microorganisms. CAP11 (cationic antibacterial polypeptide of 11kDa), which was isolated from guinea pig neutrophils, has been shown to possess the potent bactericidal and LPS-neutralizing activities. CAP11 is a homodimer of Gly¹-Ile⁴³ joined with one disulfide bond. In this study, we revealed that the dimerization of the peptides is not essential for its biological activity, and 18mer peptide of CAP11(G¹-R¹⁸) is the most potent among various peptide derivatives. However, its biological activities were much lower compared with native CAP11. Furthermore, we tried to enhance the biological activities of CAP11(G¹-R¹⁸) by substituting amino acids. Two novel peptides, CAP11(1-18m) and CAP11(1-18m2), whose hydrophobicity and positive charge were modified by the amino acid substitutions, exhibited more potent bactericidal activities against *S.aureus* and *E.coli*, and more strongly inhibited the LPS-binding to CD14⁺ RAW264.7 cells, compared with CAP11; i.e. the bactericidal and LPS-neutralizing activities of CAP11(1-18m2) was about 10-fold greater than those of CAP11, and CAP11(1-18m2) completely killed both methicillin-sensitive *S.aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) even at 0.1 μg/ml.

Thus, the bactericidal and LPS-neutralizing activities of CAP11-derived antibacterial peptides could be enhanced by the modification of their hydrophobicity and positive charge via the amino acid substitutions.

Rec.5/31/2005, Acc.6/20/2005, pp101-106

Daiju Okuda¹⁾, Shin Yomogida¹⁾, Hiroshi Tamura²⁾ and Isao Nagaoka¹⁾¹⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University School of Medicine²⁾Seikagaku Corporation

Key words antibacterial peptide, Lipopolysaccharide(LPS), cathelicidin, LPS-neutralization, endotoxin

はじめに

抗菌ペプチドは脊椎動物をはじめ昆虫まで発現し、宿主を病原微生物感染から守るための防御因子として役割を担っている¹⁻³⁾。抗菌ペプチドにはいくつかのファミリーが存在するが、中でも defensin と cathelicidin ファミリーに

属する抗菌ペプチドが、哺乳類において特に重要な働きをしている^{4,5)}。cathelicidin ファミリーの殺菌ペプチドは、前駆体であるプロペプチド領域のアミノ酸配列がブタ好中球より同定された cathelin タンパク質に相同性を示すことから cathelicidin と名付けられた^{1,6)}。

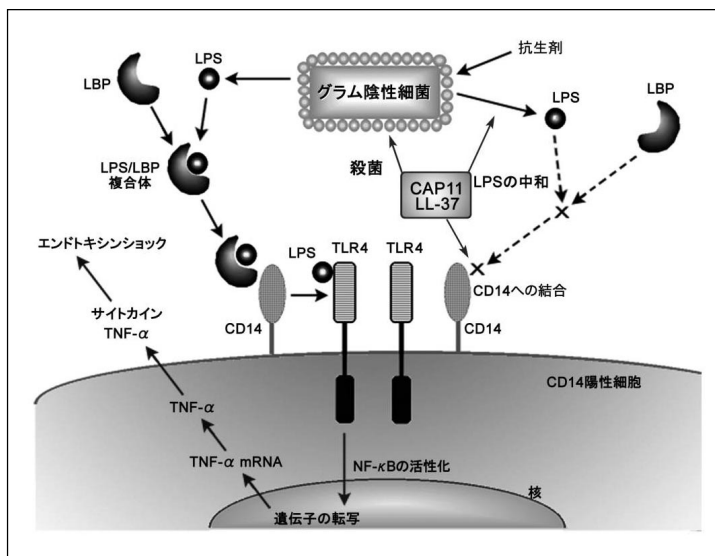


図1 cathelicidinファミリーに属する抗菌ペプチドの作用

抗菌ペプチドであるモルモット CAP11 やヒト LL-37 は細菌に直接作用して殺菌活性を示すのみならず, LPS に結合することで LPS が細胞表面上の CD14 へ結合することを阻害し, Toll-like receptor-4 (TLR4) を介したシグナルをブロックすることによって, LPS によるエンドキシンショックに対して防御的に働く。

Human LL-37	1	37
	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	
Guinea pig CAP11	1	43
	GLRKKFRKTRKRIQKLGRKIGKTGRKVKAWREYQGIPYPCRI	
G ¹ -E ³³	1	33
	GLRKKFRKTRKRIQKLGRKIGKTGRKVKAWRE	
		Y ³⁴ -I ⁴³ YQGIPYPCRI
G ¹ -R ¹⁸	1	18
	GLRKKFRKTRKRIQKLGR	
T ⁹ -R ²⁶	9	26
	TRKRIQKLGRKIGKTGR	
L ¹⁶ -E ³³	16	33
	LGRKIGKTGRKVKAWRE	

図2 ヒト LL-37 とモルモット CAP11 のアミノ酸配列

CAP11 は 41 残基目のシステイン残基がジスルフィド結合によって架橋されたホモ二量体構造を有する。アミノ酸配列の下に本研究で使用した部分ペプチドをそれぞれ示した。

CAP11 はモルモットの好中球より単離, 同定された 11kDa の非常に塩基性の強いポリペプチドであり, 43 個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖がジスルフィド結合によってホモダイマーを形成して生体内に存在する⁷⁻⁹⁾。我々は cathelicidin ファミリーの抗菌ペプチドが抗菌活性のみならず¹⁰⁾, エンドキシンショックの原因であるリポポリサッカライド (LPS) を中和する能力を有することを見出している¹¹⁾。すなわち, cathelicidin は細胞膜上 CD14 に LPS が結合するのを阻害することでエンドキシンショックに対して防御的に働き^{11, 12)}, また, LPS による好中球のアポトーシス抑制を阻止する¹³⁾(図 1)。

CAP11 の生物活性と構造相関

CAP11 は他の cathelicidin ファミリーにはない特徴的な二量体構造を有している(図 2)。この二量体構造が CAP11 の殺菌活性に必要なかどうかを検討するため, 二量体 CAP11 とシステイン残基をビニルピリジンにより還元修飾を行った単鎖のポリジエチル化 CAP11 を調製し, そ

れぞれの殺菌活性並びに LPS 結合阻害活性について検討を行った。その結果, 殺菌活性については, ピリジエチル化 CAP11 は二量体と活性の強さはほぼ同じであり, また LPS 結合阻害能においても同様に差が見られないことがわかった。このことから CAP11 の生物活性において, そのペプチド鎖の二量体化は大きく影響していないことがわかった(図 3)。

CAP11 の活性部位の同定を行うため, まず CAP11 の二量体化に関わるカルボキシル末端部分の Y³⁴-I⁴³ を合成, また CAP11 を endoprotease Glu-C 処理によって G¹-E³³ ペプチドを分離し, それらの生物活性を比較した(図 4)。カルボキシル末端部分の欠けた G¹-E³³ 残基ペプチドは単量体の CAP11 と全く同様の生物活性を示した。一方, カルボキシル末端ペプチド Y³⁴-I⁴³ については全く活性が見られなかったことから, CAP11 のカルボキシル末端の Y³⁴-I⁴³ 残基部分は, 生物活性には関与していないことが示唆された。さらに, G¹-E³³ ペプチドを 18 アミノ酸残基ごとに断片化した G¹-R¹⁸, T⁹-R²⁶, L¹⁶-E³³ の 3 種のペプチドを合成し, 各ペ

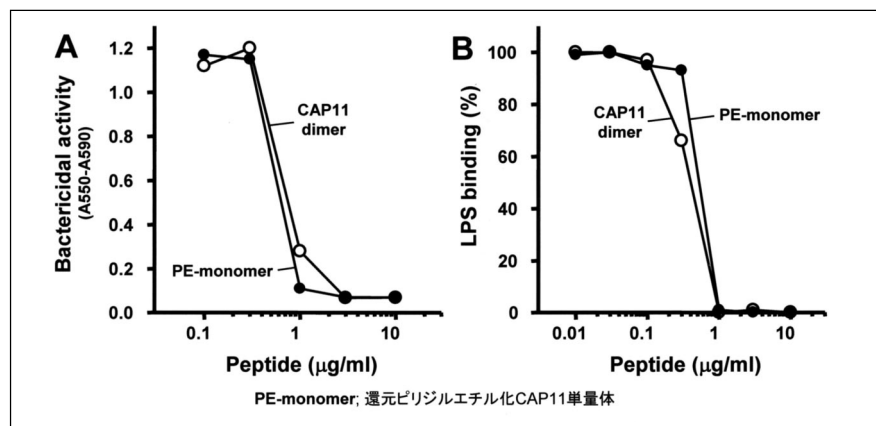


図3 CAP11の生物活性に及ぼす二量体化の影響

(A)大腸菌(NIH JC-2株)に対する殺菌活性についてAlamarBlue試薬を用いた吸光度測定により測定を行った¹⁵⁾. ペプチドの濃度に依存して550nmと595nmの吸光度差が低下し、大腸菌が殺菌されていることがわかる。(B) RAW264.7細胞のCD14へのAlexa488標識大腸菌LPS (O55:B5) の結合に対するCAP11の阻害効果をフローサイトメトリーを用いて測定した。

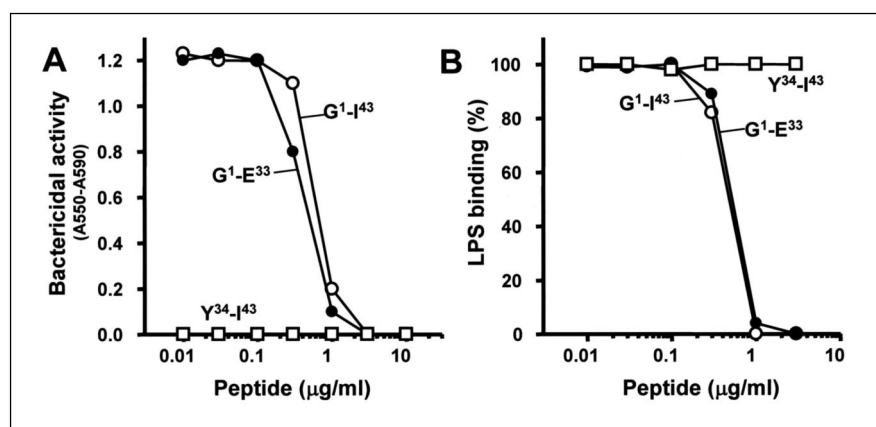


図4 CAP11のG¹-E³³ペプチドとY³⁴-I⁴³ペプチドの抗菌活性ならびにLPS結合阻害能

大腸菌を用いて AlamarBlue 法で殺菌活性を測定(A), また RAW264.7 細胞を用いて LPS 結合阻害能を測定した (B)。

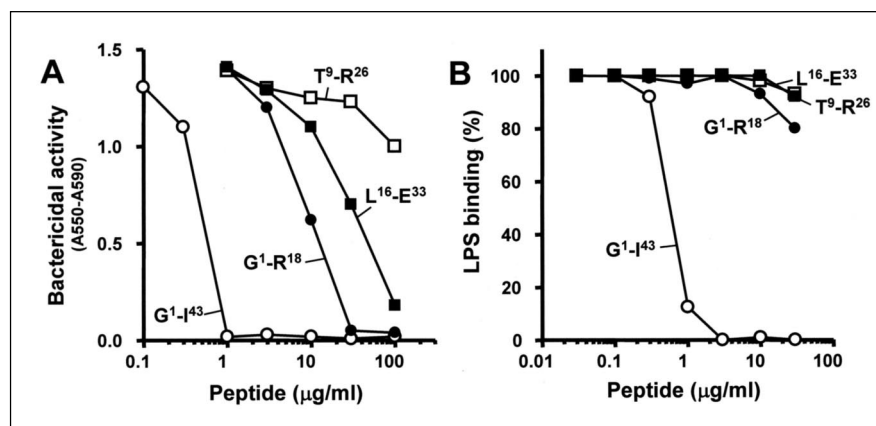


図5 CAP11のG¹-R¹⁸, T⁹-R²⁶, L¹⁶-E³³ペプチドの殺菌活性およびLPS結合阻害能

大腸菌を用いて AlamarBlue 法で殺菌活性を測定(A), また RAW264.7 細胞を用いて LPS 結合阻害能を測定した (B)。

チドの生物活性を同様に測定した (図5). 全ての部分ペプチドは、全長のCAP11に比較して殺菌活性は1/10以下まで減弱し、LPS結合阻害能においては約1/100に活性が低下した。しかし、3種のペプチドの中でG¹-R¹⁸が他の2種よりも比較的生物活性が高かった。これらの結果から、CAP11が十分な生物活性を表すためにはG¹-E³³の部分が必要であること、そして、その活性領域はG¹-R¹⁸の18残基部分に存在することが示唆された。

CAP11の構造改変による抗菌活性とLPS中和能の増強

これまでにcathelicidinファミリーの抗菌ペプチドの一つであるヒト好中球由来CAP18/LL-37の部分ペプチドを用いた研究において、アミノ酸配列を疎水性および塩基性アミノ酸に置換することで活性を増強させることができることを我々は報告している^{14, 15)}. そこで、我々は先の実験において比較的強い活性が見られたG¹-R¹⁸を基に、このペプ

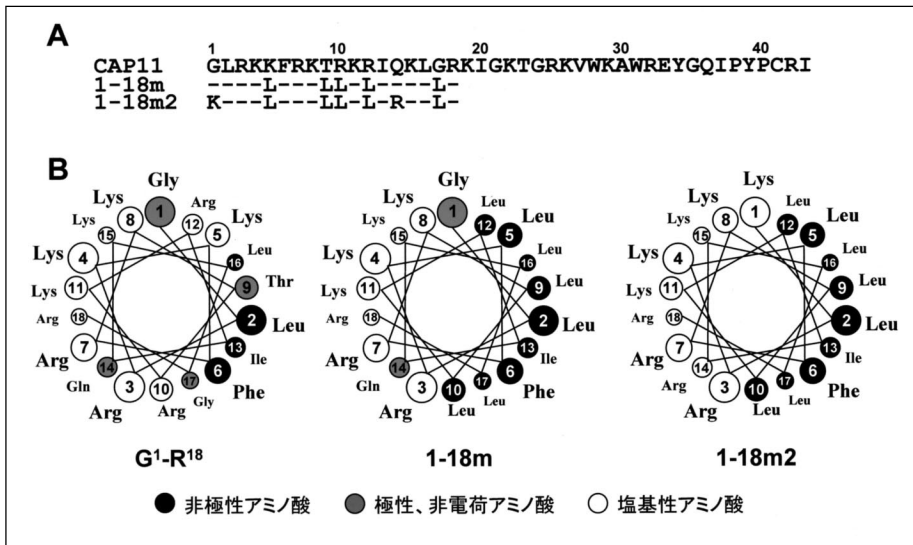


図6 CAP11改変ペプチドの一次構造と α ヘリックスの模式図

(A)CAP11のG¹-R¹⁸部分について改変したペプチドである1-18mと1-18 m2のアミノ酸配列を示した。ハイフンで示したアミノ酸はCAP11と同一であることを示す。1-18mではG¹-R¹⁸のK⁵, T⁹, R¹⁰, R¹², G¹⁷のアミノ酸をLeu(L)に、また1-18 m2ではさらにG¹とQ¹⁴をそれぞれLys(K)とArg(R)に置換した。(B)G¹-R¹⁸ペプチドとその改変体について α ヘリックス構造を取ったときの各アミノ酸の立体配置の仮想的な位置を示す。

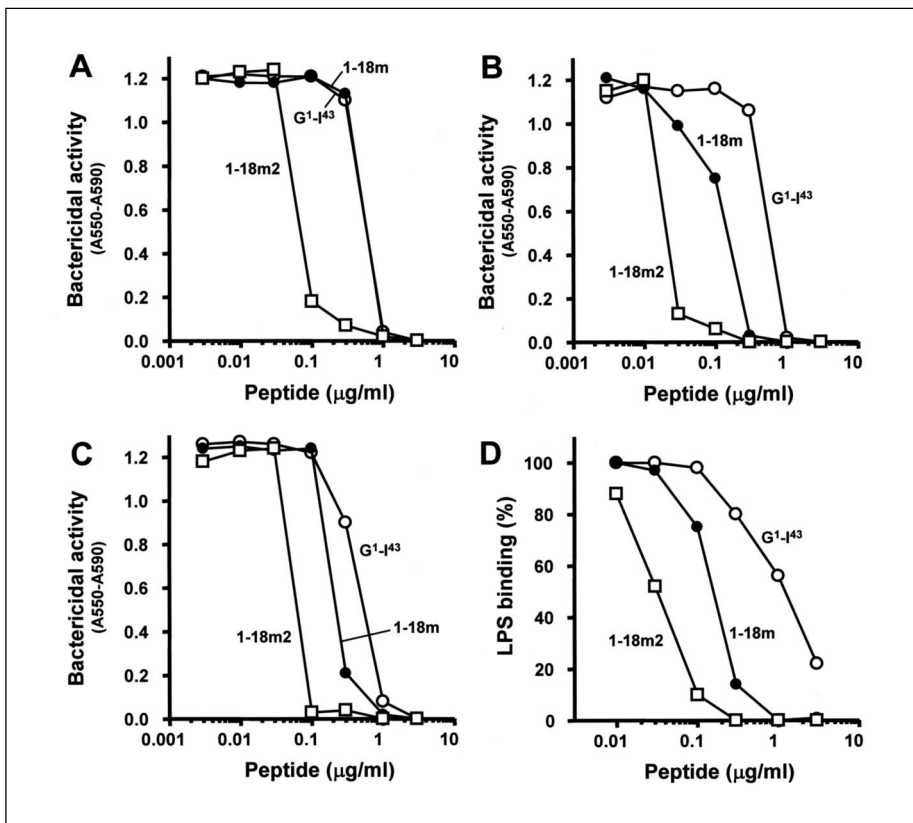


図7 改変ペプチドの抗菌活性並びにLPS結合阻害能 (A)大腸菌(NIH JC-2株),(B)黄色ブドウ球菌(NIH JC-1株),(C)メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(LR5P1-IPM8-1株)に対する抗菌活性,(D) CAP11および改変ペプチドのLPS結合阻害能を示す。

チドのアミノ酸配列を改変することによりペプチド鎖長が短いまま、その活性を上昇させることを試みた。cathelicidinファミリーに属するペプチドの中でLL-37とCAP11は立体構造上 α ヘリックスを取ることが知られており、ヘリックス上で非極性面と塩基性アミノ酸に富む親水性面が形成され、両親水性面を示すことがわかっている^{6,7,16}。そこで我々は、G¹-R¹⁸の模式的なヘリックス図を

作成し、この図を基に疎水性面と親水性面を明確にするようにアミノ酸配列の一部をロイシンによって置換したペプチド改変体である1-18 m, またその一部を、さらにリジン、アルギニンによって置換した1-18 m2の2種のペプチドを新たに作製した(図6)。

アミノ酸配列を改変したことによってペプチドの生物活性は大きく上昇した(図7)。すなわち1-18 m2ペプチドは、

0.1 µg/mlの濃度において大腸菌ならびに黄色ブドウ球菌をほぼ完全に殺菌した(図7A, B). また, 黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性株の一つであるLR5P1-IPM8-1株に対しても, 非耐性菌群と全く同様の濃度で十分な殺菌効果を発揮した(図7C). また, LPS結合阻害活性についても同様に活性が著明に上昇し, 1-18 m2は改変前のペプチドの約100倍, CAP11と比べても10倍以上の増強効果が見られた(図7D). このようにして18アミノ酸残基の長さを保持したまま, 基となるCAP11よりも殺菌活性およびLPS中和能が強力なペプチド改変体を作出することができた.

おわりに

今回の研究において, モルモット由来抗菌ペプチドCAP11の構造と生物活性について検討した結果, CAP11の特異的な二量体構造とカルボキシル末端部分であるY³⁴-I⁴³部分は, その生物活性に関与していないことがわかった. また, 部分ペプチドを用いた検討によってCAP11が十分な生物活性を示すためには, 1-33残基ないし, それに近い長さの部分構造が必要であることが示唆された. しかし, 部分ペプチドのG¹-R¹⁸のアミノ酸配列を改変することによって, ペプチド鎖を短縮させた状態でも天然のCAP11よりも強力な活性を持つペプチドを得ることができた. CAP11とその改変体のペプチドは, 今回の結果から薬剤耐性を持つような菌株に対しても非薬剤耐性菌に対しても効果的に殺菌作用を示したことから, 他の薬剤耐性菌についても同様の効果が期待される. しかし, 薬剤耐性菌については抗菌ペプチドが効果を発揮しにくい場合もあるとの報告もあり¹⁷⁾, 今後さらに他の菌種や菌株についても検討する必要がある.

また, 抗菌ペプチドは細胞膜を障害することによって殺菌能を示すため, 弱いながら宿主に対して細胞障害性を有することが知られている¹⁸⁾. 今回, アミノ酸配列を改変し, その活性を増強させたことによって細胞障害性に変化が見られるかどうか, また, ペプチド改変体が宿主細胞の機能に影響するかどうかなどを, 今後検討しなければならないと考える.

文 献

- 1) Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT: Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med*, 109: 127-142, 1988.
- 2) Spitznagel JK: Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest*, 86: 1381-1386, 1990.
- 3) 石井(堤) 裕子, Niyonsaba F, 長岡 功: 殺菌ペプチド defensin と cathelicidin の生体防御における役割. *感染 炎症 免疫*, 31: 62-65, 2001.
- 4) Selsted ME, Ouellette AJ: Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, 6: 551-557, 2005.
- 5) Tomasinsig L, Zanetti M: The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*, 6: 23-34, 2005.
- 6) Zanetti M, Gennaro R, Romeo D: Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, 374: 1-5, 1995.
- 7) Yomogida S, Nagaoka I, Yamashita T: Purification of the 11- and 5-kDa antibacterial polypeptides from guinea pig neutrophils. *Arch Biochem Biophys*, 328: 219-226, 1996.
- 8) Nagaoka I, Tsutsumi-Ishii Y, Yomogida S, Yamashita T: Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation. *J Biol Chem*, 272: 22742-22750, 1997.
- 9) Yomogida S, Nagaoka I, Yamashita T: Comparative studies on the extracellular release and biological activity of guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and defensins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 116: 99-107, 1997.
- 10) Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M: Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res*, 49: 73-79, 2000.
- 11) Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D: Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *J Immunol*, 167: 3329-3338, 2001.
- 12) Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, Kobayashi H, Yanai T, Kato Y, Miyano T: Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatr Surg Int*, 21: 20-24, 2005.
- 13) Nagaoka I, Yomogida S, Tamura H, Hirata M: Antibacterial cathelicidin peptide CAP11 inhibits the lipopolysaccharide (LPS)-induced suppression of neutrophil apoptosis by blocking the binding of LPS to target cells. *Inflamm Res*, 53: 609-622, 2004.
- 14) Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Heumann D: Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9: 972-982, 2002.

- 15) Nagaoka I, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K, Hirata M: Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. *Inflamm Res*, 54: 66-73, 2005.
- 16) Tossi A, Scocchi M, Skerlavaj B, Gennaro R: Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett*, 339: 108-112, 1994.
- 17) 應原一久, 小松澤均, 落合恭子, 西裕美, 栗原英見, 菅井基行: MRSAはMSSAに比べヒト抗菌ペプチドに対して感受性が低いのか? *日本細菌学会誌*, 59: 145, 2004.
- 18) Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*, 11: 105-128, 1993.