

# 論文内容要旨 (和文)

平成30年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 譚 奥 印

論文題目 Study on antibacterial activity and self-assembly of ovalbumin-derived peptides  
オボアルブミン由来断片ペプチドの抗菌活性と自己組織化に関する研究

## [諸言]

1980年から2013年の間に12,000件以上の感染症が発生し、およそ半数は細菌が原因である。現段階で細菌は人類にとって非常に脅威であると考えられ、その進化の速さから将来的にも脅威を与え続けると推測される。一方で、1980年代以降、新たに承認された抗菌剤は年々減少しており、1998年から2002年においてはわずか6種類、2006年までには4種類のみが承認されるに過ぎない。1970年代まで数多くの抗生物質の発見と医薬品としての利用があったものの、現在は新規性の高い低分子抗生物質の発見は困難を極めている。

この現状を打開すべく数多くの抗菌ペプチドの探索が行われてきた。現在まで発見された生物活性ペプチドは5,000種類以上であり、100種類のペプチドが臨床応用された。そのうち抗菌ペプチドは9種類であり、すべて環状構造を有している。通常ペプチドは鎖状構造を持つが消化安定性の低さや溶血性などの問題から薬剤利用には大きな制限を受けているのが現状である。

そこで本博士論文では抗菌活性を有する新規性の高い鎖状ペプチドを探索することとした。さらに得られるペプチドに対して様々な角度から評価し、安定性向上を付与することを目的とした。

## [実験方法]

$\alpha$ -ヘリックスペプチドは抗菌スペクトルが広く、種類が豊富に存在する。そこで、身近な食物由来タンパク質に着目し、抗菌ペプチドの探索を始めることにした。身近なタンパク質はすでに多くの研究結果が報告されており、その抗菌活性ペプチドの探索も非常に活発であった。筆者は過去にほとんど報告例のない方法論で鶏卵由来オボアルブミンから抗菌ペプチドの探索を行うことにした。すなわちプロテインデータベース (PDB) からオボアルブミンのアミノ酸配列とその立体構造を入手し、主に $\alpha$ -ヘリックスを形成している部分について20残基からなるペプチドを抽出することにした。次に抗菌活性の向上を目指して、配列の再抽出とアミノ酸を最適化した。

まずPDBから10種類のオボアルブミン由来ペプチドを抽出し、それらをFmoc-固相合成法で調製し、精製は高速液体クロマトグラフィーで行った。構造の確認は質量スペクトルとCDスペクトルで行った。得たペプチドをグラム陽性ならびにグラム陰性細菌、真菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)で評価した。さらに、動物血液を使用した細胞溶血性試験、HeLa細胞を用いた細胞毒性試験を行った。

次にペプチドの安定性を向上させるため抗菌ペプチドのC末端またはN末端に疎水性アミノ酸を $\beta$ -ターン部分として追加し、さらに負電荷アミノ酸に置換したペプチドを設計、合成した。得られたペプチドは二次構造確認後、抗菌活性試験と自己組織化について評価した。さらに代謝安定性試験を合わせて行った。

**【結果及び考察】**

20 残基からなる $\alpha$ -ヘリックスペプチドから高い抗菌能は見出せなかった。それは配列中に抗菌活性を低下させると思われるアミノ酸配列を含んでいるためであると考え、ダウンサイジングを行ったところ、天然抗菌ペプチド TK9.1 (RKIKVYLPRMK) および修飾ペプチド TK9.1.3(RKIKVYLRRMI)を見出すことができた。これらのペプチドは細胞毒性、溶血性を示さなかった。細菌、真菌に対して優れた抗菌活性を示し、TK9.1.3 は *M. luteus* に対して MIC = 3.125  $\mu\text{g/mL}$  に達した。

一方で、TK9.1.3 はトリプシンの処理によって短時間で分解されるため、消化環境では利用価値が低く、薬剤開発には適用できない。抗菌活性を示すために必要な Arg, Lys, His 残基は親水性正電荷アミノ酸であり、消化されやすいことが知られている。そこで、自己組織化を期待して TK9.1.3 にその逆配列を組み込んだペプチドを設計した。逆配列には分子間の相互作用を持たせる目的で負電荷アミノ酸 (Gln ならびに Glu) に置換した。その結果、TK9Z2 (RKIKVYLRRMI-PPIMQQLYQEIEQ)ならびに TK9Z4 (RKIKVYLRRMI-PPIMEQLYQQIEQ)を見出すことができた。これらのペプチドは TK9.1.3 と同等の抗菌活性を示し、なおかつトリプシンの消化に抵抗し、代謝安定性を大幅に向上させることができた。

**【結論】**

オボアルブミン由来抗菌ペプチド TK9.1 ならびに TK9.1.3 を見出した。過去に発見された抗菌ペプチドにはないアミノ酸配列を有していた。さらに逆配列様ペプチドを連結することで消化安定性に優れた抗菌ペプチド TK9Z2 ならびに YK9Z4 を見出すことができた。

## 論文内容要旨 (英文)

平成30年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 \_\_\_\_\_ 譚 奥 \_\_\_\_\_ 印

論文題目 Study on antibacterial activity and self-assembly of ovalbumin-derived peptides

Currently, more than 5000 peptides with various medicinal properties have been discovered.

By 2019, approximately 100 of peptides have been approved for sale, only 9 antibacterial peptides, But these are all cyclic peptides. The remain peptides are limited by weak stability and other side effects such as hemolysis and can't be used for drug development. now, we will start by search for antibacterial peptides from the sequence of ovalbumin and improving stability.

Ovalbumin is a glycoprotein in egg white and is composed of 384 amino acids. Ovalbumin also produces various antibacterial peptides after hydrolysis. Therefore, we decided to obtain the amino acid sequence of ovalbumin and its three-dimensional structure from PDB, and extract peptides mainly from the part forming the  $\alpha$ -helix. Natural antibacterial peptides 9. and modified peptides 9.1.3 could be found.

However, the method to improve stability, the structure of the peptide is altered and the peptide tends to aggregate, which clearly affects the antibacterial activity of the peptide. The mechanism of peptide antibacterial activity relies primarily on cationic amino acids to produce selectivity, and lipophilic amino acids are inserted into the bacterial membrane to physically disrupt the bacterial structure and produce antibacterial activity. our target is maintain antibacterial activity while producing self-organization. We will study based on these two points, Add hydrophobic amino acid at the C-terminus or N-terminus as the Beta turn portion. Later, add a sequence containing negatively charged amino acids as a self-assembling model sequence

Test the effect on negative charge and antibacterial activity on selectivity. We anticipate the formation of large-sized spiral self-assembling, depending on hydrogen bonds and electrostatic interactions, and finally measure the antibacterial mechanism.

The purpose of the experiment is add a self-assembling model sequence to the short  $\alpha$ -helix antibacterial peptide portion self-assemble and have a slight effect on antibacterial activity. Expand the value in use of antibacterial peptides.

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

令和3年 2月 9日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 ..... 今野 博行 ..... 印

副査 ..... 多賀谷 英幸 ..... 印

副査 ..... 羽鳥 晋由 ..... 印

副査 ..... 矢野 成和 ..... 印

副査 ..... ..... 印

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	バイオ工学専攻・バイオ化学分野		氏名 譚 奥
論文題目	オボアルブミン由来断片ペプチドの抗菌活性と自己組織化に関する研究		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	令和 3年 1月25日～ 令和 3年 2月 8日
論文公聴会	令和 3年 2月 8日	場 所	工学部3号館3-2307号室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	令和 3年 2月 8日

学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)

アミノ酸の組み合わせで形成されるペプチド類は様々な生物活性を有するものが多く存在し、その多様性から医薬品リード化合物の候補として注目されている。本論文ではタンパク質に内在する抗菌活性を有する直鎖ペプチドに着目し、ペプチドの化学合成と構造活性相関を主眼に置き研究を展開している。

第1章では研究の背景について詳細に述べられている。特に抗生物質の歴史に焦点を当て、近年認可される抗生物質が激減している現状やそれに代わるペプチド医薬品の可能性について言及している。第2章では鶏卵白に大量に含まれるオボアルブミンに焦点を当て、データベースを利用しそのアミノ酸配列から2次構造を形成するペプチド断片を抽出し、化学合成によって入手するという全く新しいペプチドライブラリー入手法を考案した。本方法論を用いて抗菌ペプチド TK9.1 を発見した。さらに構造最適化を施すことで TK9.1.3 を開発することに成功した。これらのペプチドは細胞毒性、溶血活性を全く示さず、強力な抗菌性のみを有していた。このように身近に存在するタンパク質の配列を利用した生理活性ペプチド入手法を確立した。一方でこれらのペプチドはプロテアーゼで短時間のうちに消化されることも明らかとなった。そこで第3章では、TK9.1.3 の抗菌性を維持しながら、プロテアーゼ耐性も兼ね備えるペプチドを開発するという課題に取り組んでいる。TK9.1.3 配列に電荷を制御した新たなペプチドを連結することで自己組織化ペプチドを作製し抗菌性とプロテアーゼ耐性を併せ持つ直鎖ペプチドを探索した。その結果、TKZ3 ペプチドの開発に成功した。TKZ3 は TK9.1.3 とほぼ同等の抗菌活性を持ちながら、プロテアーゼによって消化を受けないものであった。高次構造の解明には至らなかったものの新しいタイプの抗菌ペプチドの設計として有効であることを示した。

以上の結果は今後の抗菌ペプチド、抗生物質開発研究の大きな足掛かりとなり、その応用が期待できる。本研究の成果は学術論文1報、国際学会プロシーディングス2報に掲載され、当該専攻の審査基準を満たしている。以上より、博士(工学)の学位論文として価値と水準を十分に満たしており、合格と判断した。

本論文は、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ありません。

最終試験の結果の要旨

最終試験は、公聴会実施後に口頭で行った。その結果、学位論文の内容及び専門知識、関連知識の理解度は十分であり、博士として必要とされる知識と能力は十分にあると判断できた。その結果、最終試験について合格と判断した。