

Award Accounts

第7回 D-アミノ酸学会奨励賞

両生類由来抗菌ペプチドに含まれるDアミノ酸残基の役割

川村 出

横浜国立大学 大学院工学研究院 機能の創生部門

1. はじめに

生体分子のわずかな構造の違いによってその機能が增强される場合がある。両生類、特にカエルの皮膚分泌物に含まれるペプチドには、オピオイドペプチドを代表とするペプチドホルモンや抗菌活性を持つカチオン性のペプチドがある。D体のアミノ酸を含むペプチドの産生メカニズムは依然として不明な点が多い。現在までのところ、まず始めに前駆体タンパク質にはD体は含まれず、プロセッシングによって前駆体タンパク質からペプチドが切り出される^{1,2)}。その後、イソメラーゼによる翻訳後修飾を受けて特定のアミノ酸残基に対して立体転移反応が発生し、D体のアミノ酸残基を含むペプチドが生まれると考えられている(図1)³⁻⁶⁾。このようなD体のアミノ酸を残基として持つペプチドは、高い活性を持つことが報告されている。例えば、南アフリカを中心に生息するフタイロネコメガエル(和名)(学名:Phyllomedusa bicolor)の皮膚分泌物から発見され、強力な鎮痛作用を示すデルモルフィンもその一つである⁷⁾。デルモルフィンの1次構造はTyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂であり、2残基目にD体のアラニンを含み、μ受容体に対して高い親和性を持つことは有名である。本稿ではD体アミノ酸残基を含む抗菌性のペプチドについて触れたい。両生類の抗菌ペプチドとしてはアフリカツメガル由来のペプチドであるマガイニンが有名である⁸⁾。マガイニンをはじめとして多くの両生類由来の抗菌ペプチドは

塩基性のアミノ酸残基を保有し、細胞膜結合時に両親媒性のヘリックス構造を形成することによって、ヘリックスの一方の面に正電荷を局在させる。このことによって、負電荷に富む細菌の細胞膜に対して強い選択性を持つとされている⁹⁾。一方で、両親媒性の抗菌ペプチドが細胞膜の水-膜界面を経て、脂質二分子膜内の疎水的な環境で働くことを考えれば、ペプチド中の特定のアミノ酸残基がD体に置き換わることで、その残基の周囲との相互作用が劇的に変化し、ペプチドと細胞膜との相互作用に変化をもたらすことが推測できるが、それがどのように活性の增强に繋がるかは細胞膜中でのペプチドの挙動を理解する必要がある。本稿では2残基目にD体のアロ-イソロイシン残基を持つボンビニンH4の活性と構造の関係について我々の研究成果を含めて説明したい。

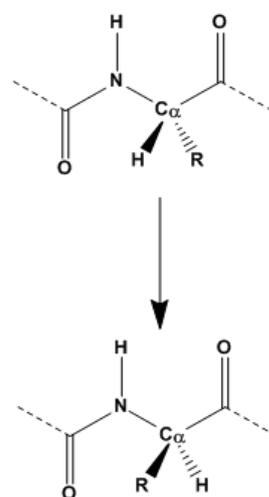


図1 両生類のイソメラーゼによる翻訳後修飾 (L/D 転移反応)

2. ボンビニン H4 の細菌膜との相互作用

ボンビニン H4 はヨーロッパに生息するキバラスズガエル(和名) (学名: *Bombina variegata*) の皮膚分泌物に含まれる抗菌ペプチドとして発見され¹⁰⁾、その活性や物理的な特徴についてイタリアのマリア マンゴーニらによってよく研究されている^{11,12)}。また、ボンビニン H4 の産生メカニズムについてはアレキサンダー ジレックらによって次のように報告されている。全て L 体のアミノ酸で構成されるボンビニン H2 はペプチジル L/D イソメラーゼによって、その 2 残基目の L 体イソロイシンの α 炭素からプロトンが引き抜かれ、逆側からプロトンが付加される立体転移反応によって D 体の *allo*-イソロイシンへと変化する¹³⁻¹⁵⁾。このような翻訳後修飾によって生まれたペプチドがボンビニン H4 である。イソメラーゼの立体構造がわかっていないため、なぜ 2 残基目に翻訳後修飾が起きるかの分子レベルでの理解は進んでいないが、おそらく N 端から 3 残基目にかけて強く相互作用する様式が存在している。一次構造を以下に示す。ボンビニンはグリシンが豊富な 20 アミノ酸残基で構成されるペプチドで C 末端はプロセッシング後にアミド化されている。

ボンビニン H2:

Ile-(**L-Ile**)-Gly-Pro-Val-Leu-Gly-Leu-Val-Gly-Ser-Ala-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Lys-Lys-Ile-NH₂

ボンビニン H4:

Ile-(**D-*allo*-Ile**)-Gly-Pro-Val-Leu-Gly-Leu-Val-Gly-Ser-Ala-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Lys-Lys-Ile-NH₂

これら二つのペプチドについて、大腸菌などに対する抗菌試験やリーシュマニア原虫に対する半数致死濃度の調査などが行われ、多くの場合、ボンビニン H4 の活性が高い。また、蛍光試薬を内包したリポソームからの蛍光漏出実験

などにおいても、漏出割合は H2 よりも H4 の方が高い¹⁶⁻¹⁸⁾。これらの結果は D アミノ酸残基を持つことによるペプチドのプロテアーゼ耐性が高まることだけでなく、ペプチドが細胞膜に相互作用する際の様式に違いがあると考えられてきた。特に、ボンビニン H4 は深刻な感染症であるリーシュマニア症の原因となるリーシュマニア原虫に対してより強い抗菌活性を示す¹⁶⁾。一方で、なぜ D 体アロイソロイシン残基が存在することでそのような差をもたらすのかは現在のところわかっていない。我々はこのような性質を示すボンビニン H2 と H4 に注目し、特にリーシュマニア原虫の細胞膜構成成分を参考にした模倣膜を作成し研究を行ってきた¹⁹⁾。2 つのペプチドは固相ペプチド合成法により合成し、C18 ODS カラムを装着した逆相 HPLC で精製し、MALDI-TOF MS で質量を確認した。ちなみに、この精製試料はダイセルのキラルパック IF カラム(ダイセル)を用いても良好なジアステレオ分離を確認した。次に、リーシュマニア原虫の細胞膜構成脂質成分を参考にし、その水和リポソームを作成し、³¹P 固体核磁気共鳴(固体 NMR)測定によって膜成分の変化を追跡した。ペプチド濃度が高い場合(ペプチド:脂質のモル比が 1:200 以上)に、サイズが小さい膜断片に由来する NMR 信号を観測した。これはペプチドが作用することで多重膜リポソームが欠損を受けていることを示し、このことからボンビニン H2 と H4 が膜分断活性を示すことを明らかにした。これは抗菌ペプチドの挙動でしばしば見られる現象で、膜中である濃度に達したペプチド同士が会合し、細胞膜に欠損を与えることを示唆している。興味深いことに、同濃度で黄色ブドウ球菌模倣膜やフォスファチジルコリンのみの膜に作用させた場合には、このような現象は起きなかった^{19, 20)}。したがって、ボンビニンはリーシュマニア原虫の細胞膜に対して強い選択性を持っていることが示唆された。一方で H2 と H4 の明確な差はこの NMR 測定では計測できなかった。

続いて、分子の絶対立体配置を決定することが

できる手法の一つである振動円偏光二色性 (VCD)分光法を用いて、ボンビニンの N 端のコンフォメーションを調査した。赤外領域の振動を検知する方法によってペプチドの構造に由来する多くの情報を得ることができる。すでにこのペプチドの研究を想定して、アミノ酸レベルでイソロイシンの VCD パターンを詳細に説明していた²¹⁾。これを参考にするとともに、H2 と H4 の VCD スペクトルにおいて、いくつかの信号の正負が異なることを観測し、立体構造が異なることが判明した。さらに第一原理計算の結果から 1 残基目の側鎖と 2 残基目の側鎖の関係が H2 ではトランス型、H4 ではシス型のコンフォメーションを取ることによって安定し、この構造が実験で得られたスペクトルをよく説明した。当然の結果かもしれないが、2 つのペプチドの N 端のコンフォメーションに違いがあることを実験的に示した。さらに分子動力学シミュレーションの解析によって、H2 と H4 それぞれについてリーシュマニア模倣細胞膜との相互作用を評価した。水中から細胞膜表面にペプチドが吸着する際に H4 の方がより早く相互作用を始め、その際に、N 端から 1 残基目のイソロイシンと 2 残基目の D-アロ-イソロイシン残基の側鎖のコンフォメーションが VCD で示したようなシス型をとることがわかった(図 2)。この 2 つの側鎖が疎水性のアンカーとして働き、脂質二分子膜の疎水環境に同時に挿入される。この相互作用によって、ペプチドの膜貫通状態への移行がより進行しやすくなることが示唆された。これは同じく D 体を含み、H4 と類似の配列を持つ H3(2 残基目 Ile)や H7(2 残基目 Leu)^{18, 22)}などにも見られる現象であると予想される。しかし、抗菌ペプチドの性質に立ち戻ると、実際には細胞膜中でのペプチド同士の動的な会合状態が活性に影響すると考えられる。そのため、現在は、細胞膜に対する欠損により生じる電流パターンを解析することで、どのような性質の孔が形成されているかを明らかにできる電気生理学的な計

測によって H2 と H4 の差を調べている²³⁾。

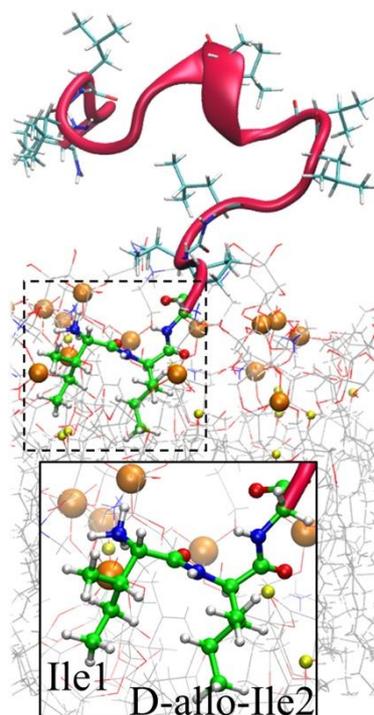


図 2 ボンビニンとリーシュマニア模倣膜が相互作用した時のスナップショット：ボンビニン H4 の 1 残基目イソロイシンと 2 残基目 D-アロ-イソロイシンの側鎖が細胞膜に挿入されている様子(参考文献 19 から許可を得て転載)。

両生類に含まれるペプチドは 2 残基目に D 体を持つ。なぜ 2 残基目に D 体を持つかという疑問に対して、イソメラーゼがペプチドの N 端に対して選択性を持つことで 2 残基目選択的に翻訳後修飾を行い、そのペプチドの立体構造が受容体や細胞膜との特異的な相互作用に生かされていると考えることができる。

3. おわりに

ペプチド中のアミノ酸 1 残基の立体転移によって、その活性にどのように影響するかは構造-機能相関の観点から興味深く、D アミノ酸残基を含むペプチドの立体構造解析の研究は重要である。ボンビニン以外にも新しい D アミノ酸含有抗菌ペプチドの発見、もしくは特定の部位を D アミノ酸に化学的に置換することで活性をエン

ハンスした報告例もある^{24,25)}。実際、2 残基目に D 体のフェニルアラニンをもつフェニルセプチンと呼ばれる抗菌ペプチドが発見されており、やや高い活性を示すことが報告されている²⁶⁾。今後も様々な手法を取り入れて、ペプチド中に含まれる D アミノ酸の生理的な役割を構造情報から理解していきたい。

謝 辞

本研究は科研費 新学術領域 “柔らかな分子系” (16H00828) および横浜学術教育振興財団の研究助成 (527) などの支援を受けて行われたものです。D-アミノ酸研究会に最初に誘っていただいた八木達彦先生に深く感謝申し上げます。また、共同研究者の愛媛大学 佐藤久子教授、横浜国立大学 上田一義教授、内藤晶名誉教授、東京農工大学 川野竜司准教授に心から感謝申し上げます。また、博士課程学生の Batsaikhan Mijiddorj 君をはじめとする共に研究した学生たちに感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Ladram A, Nicolas P. 2016. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Frontiers in Bioscience* (Landmark Edit.), 21: 1341-1371.
- 2) 岩室 祥一. 2017. 両生類の抗菌ペプチドとその多機能性. バイオテクノロジーシリーズ 抗菌ペプチドの機能解明と技術利用 (監修 長岡功, シーエムシー出版), 第1編 第2章:15-27.
- 3) Kreil G. 1994. Conversion of L- to D-amino acids: A posttranslational reaction. *Science*, 266: 996-997.
- 4) Jilek A, Kreil G. 2008. D-amino acids in animal peptides. *Monatshefte für Chemie*. 139: 1-5.
- 5) Bai L, Sheeley S, Sweedler JV. 2009. Analysis of endogenous D-amino acid-containing peptides in Metazoa. *Bioanal. Rev.*, 1: 7-24.
- 6) Ollivaux C, Soye D, Toullec JY. 2014. Biogenesis of D-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how? *J. Pept. Sci.*, 20: 595-612.
- 7) Montecucchi PC, De Castiglione R, Piani S, Gozzini L, Erspamer VR. (1981) Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept. Protein Res.*, 17: 275-283.
- 8) Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N, Miyajima K. 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34: 3423-3429.
- 9) Al-Ahmad A, Laird D, Zou P, Tomakidi P, Steinberg T, Leinkamp K. 2013. Nature-inspired antimicrobial polymers – Assessment of their potential for biomedical applications. *Plos ONE*, e73812.
- 10) Mignogna G, Simmaco M, Kreil G, Barra D. 1993. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J.* 12:4289-4232.
- 11) Mangoni ML, Grovale N, Giorgi A, Mignogna G, Simmaco M, Barra D. 2000. Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from *Bombina* skin secretions. *Peptides*, 21: 1673-1679.
- 12) Mangoni ML. 2013. A lesson from Bombinin H, mildly cationic diastereomeric antimicrobial peptides from *Bombina* skin. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13:734-743.
- 13) Jilek A, Mollay C, Lohner K, Kreil G. 2012. Substrate specificity of a peptidyl-aminoacyl-L/D-isomerase from frog skin. *Amino Acids* 42:1757-1764.
- 14) Jilek A, Mollay C, Tippelt, C, Grassi J, Mignogna G, Müllegger J, Sander V, Fehrer C, Barra D, Kreil G. 2005. Biosynthesis of a D-amino acid in peptide linkage by an enzyme from frog skin secretions. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 102: 4235-4239.
- 15) Gehmayr V, Mollay C, Reith L, Müller N, Jilek

- A. 2011. Tight binding of transition-state analogues to a peptidyl-aminoacyl-L/D isomerase from frog skin. *ChemBioChem*. 12:1996-2000.
- 16) Mangoni, ML, Papo N, Saugar JM, Barra D, Shai Y, Simmaco M, Rivas L. 2006. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. *Biochemistry*, 45: 4266-4276.
- 17) Coccia C, Rinaldi AC, Luca V, Barra D, Bozzi A, Di Giulio A, Veerman ECI, Mangoni ML. 2011. Membrane interaction and antibacterial properties of two mildly cationic peptide diastereomers, bombinins H2 and H4, isolated from *Bombina* skin. *Eur. Biophys. J.*, 40: 577-588.
- 18) Mangoni, ML, Marcelline HGL, Simmaco M. 2007. Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic anti-microbial peptides from amphibian skin. *J. Pept. Sci.*, 13: 603-613.
- 19) Mijiddorj B, Kaneda S, Sato H, Kitahashi Y, Javkhlantugs N, Naito A, Ueda K, Kawamura I. 2018. The role of D-allo-isoleucine in the deposition of the anti-*Leishmania* peptide bombinin H4 as revealed by *31P* solid-state NMR, VCD spectroscopy, and MD simulation. *Biochim. Biophys. Acta -Proteins and Proteomics-*, 1768: 789-798.
- 20) Kitahashi Y, Naito A, Kawamura I. 2015. Membrane interaction of antimicrobial peptides Bombinin H2 and H4 from frog skin secretion. *Peptide Science 2015 (The Proceedings of 52nd Japanese Peptide Symposium)*, 167-168.
- 21) Sato H, Kawamura I, Yamagishi A, Sato F. 2017. Solid-state vibrational circular dichroism spectra of isoleucine and its related compounds: effects of interplay between two chiral centers. *Chem. Lett.*, 46: 449-452.
- 22) Simmaco M, Kreil G, Barra D. 2009. Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. *Biochim. Biophys. Acta -Biomembranes-*, 1788: 1551-1555.
- 23) Sekiya Y, Watanabe H, Kitahashi Y, Kawamura I, Kawano, R. 2015. Effect of antimicrobial activities on D- and L-Bombinin using artificial bacteria cell-membrane. *Proceedings of the 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2015)* pp. 823-825.
- 24) Brunetti AE, Marani MM, Soldi RA, Mendonca JN, Faivovich J, Cabrera GM, Lopes NP. 2018. Cleavage of peptides from amphibian skin revealed by combining analysis of gland secretion and in situ MALDI mass spectrometry. *ACS Omega*, 3: 5426-5434.
- 25) Serra I, Scorciapino MA, Manzo G, Casu M, Rinaldi AC, Attoub S, Mechkarska M, Conlon JM. 2014. Conformational analysis and cytotoxic activities of the frog skin host-defense peptide, hymenochirin-1Pa. *Peptides*, 61: 114-121.
- 26) Falciani C, Lozzi L, Pollini S, Luca V, Carnicelli V, Brunetti J, Lelli B, Bindi S, Scali S, Di Giulio A, Rossolini GM, Mangoni ML, Bracci L, Pini A. 2012. Isomerization of an antimicrobial peptide broadens antimicrobial spectrum to gram-positive bacterial pathogens. *Plos ONE*, e46259.



川村 出 (かわむら いずる) 氏

略歴

- 1998-2002 横浜国立大学 工学部 物質工学科
- 2002-2004 横浜国立大学 大学院工学府
機能発現工学専攻 博士課程前期
- 2004-2007 横浜国立大学 大学院工学府
機能発現工学専攻 博士課程後期
- 2007-2011 横浜国立大学 大学院工学研究院
研究教員
- 2009-2010 University of Guelph 客員研究員
- 2012-2013 横浜国立大学 大学院工学研究院
機能の創生部門 助教