

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11 - 335394

(43)公開日 平成11年(1999)12月7日

| | | | |
|--------------------------|------|-------------|-----|
| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | F I | |
| C07K 14/435 | ZNA | C07K 14/435 | ZNA |
| A01N 63/00 | | A01N 63/00 | A |

審査請求 有 請求項の数 2 F D (全11頁)

(21)出願番号 特願平10 - 156911

(22)出願日 平成10年(1998)5月22日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年3月5日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 第72巻臨時増刊号」に発表

(71)出願人 591031360
農林水産省食品総合研究所長
茨城県つくば市観音台2丁目1 - 2

(71)出願人 598073992
町田 幸子
茨城県つくば市吾妻1 - 601 - 506

(72)発明者 町田 幸子
茨城県つくば市吾妻1 - 601 - 506

(72)発明者 余 涌
茨城県つくば市観音台1 - 22 - 7 キャノ
ン21 - 212

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54)【発明の名称】膜作動性ペプチド

(57)【要約】

【課題】 微生物膜と動物細胞膜を識別し、微生物膜に特異的に作用し、選択的にポア形成能を有し、しかも溶血性を欠失している膜作動性ペプチドの開発。

【解決手段】 配列表の配列番号1あるいは2記載のアミノ酸配列を有する膜作動性ペプチド並びに該ペプチドを用いて微生物膜に対して選択的に作用させ、そのバリアー能を損傷させる方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 あるいは 2 記載のアミノ酸配列を有する膜作動性ペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 記載のペプチドを用いて微生物膜に対して選択的に作用させ、そのバリアー能を損傷させる方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、膜作動性ペプチドとその用途に関し、詳しくは微生物細胞膜に対して選択的にポア形成能を有するが、溶血性を欠いている膜作動性ペプチドおよびその用途に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】自然界には、生体膜に作用して膜に穴をあける能力（ポア形成能）を有するペプチドが存在する。すなわち、生体膜に作用し、そのバリアー能を損傷することにより、微生物を殺す機能を発現するペプチドが存在する。このものは、膜作動性ペプチドと呼ばれている。膜作動性ペプチドには、ミツバチ毒由来のメリチン（mellitin）のように、抗微生物作用と同時に溶血性も示すものがある一方、アフリカツメガエル由来のマガイニン 2（magainin 2）のように、溶血性を示さず、微生物膜にのみ選択的にポア形成能を有するペプチドもある。後者は、生体防御ペプチドと呼ばれている。ところが、これまでに知られている生体防御ペプチドの抗菌性は、すべての細菌、真菌等に対して示されるものではなく、ペプチド毎に様々な抗菌スペクトルを示す。その上、安定性に欠ける等の問題点も指摘され、該ペプチドを抗菌ペプチドとして利用に供するには不十分であった。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、こうした生体防御ペプチドの構造に着目し、微生物膜と動物細胞膜を識別し、微生物膜に特異的に作用し、しかも上記のような問題が解消されたペプチドを作出すべく検討した。微生物膜表面にはフォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、カルジオリピン等の酸性リン脂質が存在するのに対して、健康な動物細胞膜表面には酸性リン脂質は露出しておらず、逆に微生物膜には存在しないコレステロールが豊富に存在しており、両者は構造上の差異が明白である。生体防御ペプチドは、このような膜の構造上の差異を認識して膜にポアを形成することにより、抗菌性を示すと考えられている。

【 0 0 0 4 】本発明者らは、目的とするペプチドを作出するにあたり、代表的な生体防御ペプチドであるマガイニン 2 並びにマガイニン 2 と同様の構造を採り得るであろう膜作動性のペプチドの構造に着目した。図 1 はマガイニン 2 の車輪表示である。この車輪表示は、マガイニン 2 タイプの膜作動性ペプチドの構造上の特徴、すなわち膜内に配向し、ヘリックス構造をとる際に、ヘリ

ックスの一方の側に疎水性のアミノ酸が、他方に塩基性のアミノ酸が存在する両親媒性のペプチドであることを端的に示している。そこで、この情報に基づいて多くのペプチドを合成し、それぞれについて選択的ポア形成能について検討した。その結果、抗微生物膜作用と溶血性を併せ持つスズメバチ毒由来の膜作動性ペプチドであるマストパラン X の基本骨格を改変して作出したペプチドが微生物膜に対して選択的ポア形成能を有し、しかも溶血性を欠失していることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】請求項 1 記載の本発明は、配列表の配列番号 1 あるいは 2 記載のアミノ酸配列を有する膜作動性ペプチドである。請求項 2 記載の本発明は、請求項 1 記載のペプチドを用いて微生物膜に対して選択的に作用させ、そのバリアー能を損傷させる方法である。

【 0 0 0 6 】

【発明の実施の形態】前記したように、マストパラン X は抗微生物膜作用と溶血性の両方を具備するペプチドである。本発明者らは、このマストパラン X のアミノ酸配列の一部に塩基性アミノ酸残基を挿入および改変して得た、21 個のアミノ酸からなるペプチド（配列表の配列番号 1）が微生物細胞膜に対しポア形成能を有し、溶血性を欠失していることを見出した。これをマスト 2 1（mast 21）と命名した。

【 0 0 0 7 】以下に、マスト 2 1 の作出方法について説明する。まず、マストパラン X のヘリックスの一方の側に塩基性アミノ酸を導入するなどの改変を加えた数種のペプチドを合成した。ペプチドの合成は、常法に従い Fmoc 法により行った。すなわち、ペプチドシンセサイザーを用いて Fmoc 法のプログラムにより数種のペプチドを自動合成した。合成したペプチドを所定の溶媒中で攪拌することによりペプチドを保護基および樹脂から切り離す脱保護の操作を行った。脱保護後のペプチドは、再結晶、凍結乾燥させた後、高速液体クロマトグラフィ等により精製した。その結果、得られたペプチドの車輪表示を図 2 に示す。また、参考のため、マストパラン X の車輪表示を図 3 に示す。両者を比較すると明らかかなように、マスト 2 1 はマストパラン X のアミノ酸配列の一部に塩基性アミノ酸を導入するなどの改変が加えられたものである。すなわち、図 2 の車輪表示で表現される電荷 + 6 のペプチド（配列表の配列番号 1）が本発明の膜作動性ペプチド、マスト 2 1 である。また、該ペプチドの 2 個のアミノ酸残基が置換されたもの、すなわち 5 番目と 15 番目のグリシン残基をリジン残基に代えて電荷を + 8 に調節した誘導体（配列表の配列番号 2）も、本発明の膜作動性ペプチドである。

【 0 0 0 8 】本発明のマスト 2 1 とその誘導体は、微生物の膜に対して選択的に作用し、溶血性を示さない、優

れた膜作動性ペプチドである。これらマスト 2 1 等の有する機能については、以下の一連の実験により確認した。まず、微生物膜に対する選択的な作用について、蛍光物質であるカルセインを内包させた種々のリン脂質組成の異なるリポソーム（人工脂質二重膜）を用いて確認した。

【 0 0 0 9 】動物細胞膜と微生物膜は、脂質二分子膜構造をとり、内外で異なるリン脂質を含む点で共通している。しかし、両者は、以下の点で大きく相違している。第 1 の相違点は、細胞膜の外層と内層の脂質組成である。健康な動物細胞膜の場合、細胞の外層に露出しているのはホスファチジルコリン（ P C ）等のような双イオン性リン脂質であり、ホスファチジルセリン（ P S ）のような酸性リン脂質は細胞質側に局在している。これに対し、微生物の細胞膜では、細胞の外側にホスファチジルグリセロール（ P G ）、ホスファチジルセリン（ P S ）並びにカルジオリピン（ C L ）といった酸性リン脂質が露出している。第 2 の相違点は、動物細胞の膜に含まれるコレステロールが、微生物には含まれていないことである。

【 0 0 1 0 】上記 2 つの相違点を踏まえて、微生物膜のモデルタイプ、あるいは動物細胞のモデルタイプとなるようにリン脂質組成を変えたリポソームを作成した。リポソームの作成は、常法により行うことができる。例えば、後述の実施例 1 に記載したように、リン脂質を所定の割合で配合したリン脂質混合物から脂質薄膜を作成した後、蛍光物質を含む緩衝液と共に攪拌、超音波処理を行った後、カルセイン内包リポソームとリポソーム中に入り込まなかったフリーのカルセインとをゲル濾過により分離することにより、カルセイン内包一枚膜リポソーム L U V (Large unilamellar vesicle) を得ることができる。

【 0 0 1 1 】マスト 2 1 のポア形成能評価は、リポソームより漏洩してくるカルセインの蛍光強度を測定することにより行った。すなわち、リポソームにマスト 2 1 を作用させると、リポソームのリン脂質膜に作用してポアが形成された場合、リポソーム中のカルセインが外部に漏洩する。リポソーム内では殆ど蛍光を発しないカルセインが、リポソーム外に漏洩すると、その蛍光を蛍光光度計により高感度に測定することが可能となる。さらに、測定系の微量化を図るために、測定には 9 6 穴のマイクロプレートを用い、マイクロプレート対応蛍光測定装置（ミリアポア Cytofluor 2300/2350）により効率的に測定を行った。

【 0 0 1 2 】その結果、マスト 2 1 は、酸性リン脂質を多く含む微生物膜のモデルタイプのリポソームに対して、他の膜作動性ペプチドであるマストパラン X 等と同程度の強いポア形成能を示した（図 4 および図 5 参照）。

【 0 0 1 3 】一方、酸性リン脂質含量を減少させたリポ

ソームに対するマスト 2 1 の活性は比較的 low、さらにコレステロールを含む膜には殆ど反応を示さなかった（図 6 および図 7）。このような結果は、マストパラン X が、コレステロールの有無にかかわらず、高いポア形成能を示すのと対照的である。このことから、本発明のマスト 2 1 等は、微生物膜モデルに対して選択的にポア形成能を有することが判明した。

【 0 0 1 4 】次に、マスト 2 1 等の溶血性について検討した。これは、赤血球に作用させ、ヘモグロビンの漏洩度をみることにより行うことができる。その結果、マスト 2 1 は、高い溶血性を示すマストパラン X とは対照的に、殆ど溶血性を示さず、溶血性を示さない生体防御ペプチドであるマガイニン 2 と同程度であることがわかった。

【 0 0 1 5 】このようなマスト 2 1 の選択的なポア形成能には、リポソームの酸性リン脂質とペプチドの静電的相互作用が関係している可能性が高い。マスト 2 1 中のアミノ酸配列中に含まれる塩基性アミノ酸であるリジン残基を他のアミノ酸残基に置換することにより得られる電荷の低い誘導体は、マスト 2 1 程のポア形成能を示さない。これに対し、全体として + 6 または + 8 の電荷を有する本発明のペプチド（配列表の配列番号 1 および 2）は、高いポア形成能を示し、溶血性を示さないことが判明した（図 8）。

【 0 0 1 6 】次に、マスト 2 1 が膜に対して作用するときどのような構造変化を生ずるかについて検討するために、リポソーム中および緩衝液中における C D (circular dichroism: 円二色性) スペクトルを測定した。その結果、図 9 に示したように、リポソームと相互作用している場合には、緩衝液中では見られない負の山 (2 0 8 n m および 2 2 2 n m) および正の山 (2 0 0 n m 以下) を示したことから、マスト 2 1 は、ポア形成時にヘリックス構造をとることが示された。

【 0 0 1 7 】さらに、マスト 2 1 が実際にリポソームの膜内に入り込んでいるか否かを明らかにするために、マスト 2 1 の疎水平面上におけるトリプトファン残基の蛍光極大波長を測定した。その結果、緩衝液中では、トリプトファンは水溶液中での値である 3 5 0 n m 付近に蛍光極大波長を示すのに対し、リポソーム中では最大波長が短波長側にずれるブルーシフトが観察された（図 1 0 参照）。このことから、マスト 2 1 は、リポソームの膜内に挿入されていることが示された。

【 0 0 1 8 】上記のように、本発明のマスト 2 1 とその誘導体（配列表の配列番号 1 および 2）は、微生物膜に対して選択的なポア形成能を有し、かつ溶血性を示さない、優れた膜作動性ペプチドであることから、このものは抗菌性物質としての利用が期待される。

【 0 0 1 9 】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例 1

(マスト 2 1 の作成) 膜作動性の抗菌性ペプチドには、メリチンのように抗微生物作用と溶血性を示すものと、マガイニン 2 のように微生物膜に対して選択的に作用し、溶血性を示さないもの等がある。そこで、後者のタイプ、すなわち微生物膜と動物細胞膜を識別し、微生物膜に特異的に作用するペプチドを作出すべく、ペプチドのデザインを行った。抗菌性および溶血性を有するスズメバチ毒由来のペプチドであるマストバラン X のアミノ酸配列に塩基性アミノ酸を導入するなどの改変を加えたペプチドを作成した。すなわち、アミノ酸残基 2 0 程度の鎖長を有するペプチドを、パーキンエルマー アプライドバイオシステム社 (P E A B I) 製ペプチドシンセサイザー 4 3 1 A により 0 . 2 5 m m o l スケールの F m o c 法のプログラムにより自動合成した。合成後のペプチドの付いた樹脂 0 . 3 g を、リージェント K 1 0 m l 中で 3 時間常温で攪拌することにより、ペプチドの保護基を外すと同時にペプチドを樹脂から切り離す脱保護の操作を行った。

【 0 0 2 0 】なお、リージェント K の組成は、以下の通りである。

| | |
|----------|-----------------------|
| トリフルオロ酢酸 | 8 . 2 5 m l |
| フェノール | 0 . 5 6 g |
| チオアニソール | 0 . 5 m l |
| エタンジチオール | 0 . 2 5 m l / 1 0 m l |

【 0 0 2 1 】このペプチドを、C₁₈ O D S カラムを用いた H P L C で精製した。精製したペプチドを精製時と同一条件、すなわち A 液 (0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含む超純水) および B 液 (0 . 1 % トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル) を用い、B 液の濃度を 5 % から 6 5 % へと上昇させ (流速 : 1 m l / m i n , 3 0 m i n)、その濃度勾配より C₁₈ O D S カラムに吸着したペプチドを溶出させた。図 1 1 は、その結果を示すクロマトグラムである。図 1 1 から明らかなように、1 7 . 6 3 分の時点でマスト 2 1 の溶出を示す鋭いピークが検出され、このピーク領域は、全ピークの 9 6 . 8 3 % を占めることから、得られたペプチドは純度 9 5 % 以上の高純度品であることが確認された。さらに、ヒューレットパッカード (H P) 社製アミノ酸シーケンサー G 1 0 0 5 A により、ペプチドのアミノ酸配列を確認した。

【 0 0 2 2 】このようにして得られたペプチドの中で、当初の目的に適合すると思われるペプチドを幾つか得ることができた。その中の 1 つのペプチドの車輪表示を図 2 に、マストバラン X の車輪表示を図 3 に示した。図 3 からわかるように、該ペプチドは、マストバラン X のアミノ酸配列の一部に塩基性アミノ酸を導入するなどの改変を行ったものである。このペプチド (配列表の配列番号 1) および該ペプチドの 5 番目と 1 5 番目のグリシン残基をリジン残基に代えて電荷を + 8 に調節した誘導体 (配列表の配列番号 2) が、本発明の膜作動性ペプチドである。

【 0 0 2 3 】 (2) マスト 2 1 のポア形成能評価 (1) で得られた電荷が + 6 のマスト 2 1 (配列表の配列番号 1) について、蛍光物質を内包したリポソームを用いて、その膜に対するポア形成能を評価し、併せて他のペプチドの活性との比較を行った。

【 0 0 2 4 】① リポソームの作成
リン脂質組成の異なる 5 種類のリポソームを作成した。まず、リン脂質であるホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジルセリン (P S)、ホスファチジルグリセロール (P G) およびコレステロール (C H) を第 1 表に示すような割合となるように配合したリン脂質混合物 2 0 m g / m l クロロホルム溶液を窒素ガス存在下で減圧濃縮して脂質薄膜を作成した。

【 0 0 2 5 】さらに、脂質薄膜をデシケータ中で一晚減圧下におき、有機溶媒を完全に揮発させた。続いて、カルセイン 7 0 m M を含む 1 0 m M H E P E S (p H 7 . 4) 溶液 1 . 5 m l を添加し、ボルテックスで 1 0 分間攪拌して懸濁させ、多重層リポソーム (multilamellar vesicle : M L V) を形成させた。さらにその後、超音波で懸濁液が透明になるまで処理し (約 3 0 分)、カルセインを内包した大きな一枚膜リポソーム (Large unilamellar vesicle : L U V) を形成させた後、ゲル濾過 (セファロース C L - 4 B , 1 c m x 2 5 c m , 流速 0 . 2 5 m l / 分 , 分画サイズ 2 m l) を行い、直径数百 n m のカルセイン内包 L U V を得た。得られた 5 種類のカルセイン含有 L U V のリン脂質組成を第 1 表に示す。

【 0 0 2 6 】

【表 1】

第 1 表

リン脂質組成および配合割合

| | | | |
|------------------|-----------------|---|-------------|
| calsein- L U V a | P C / P S | = | 1 / 1 |
| calsein- L U V b | P C / P S | = | 1 0 / 1 |
| calsein- L U V c | P C / P S / C H | = | 1 0 / 1 / 1 |
| calsein- L U V d | P C / P G | = | 7 / 3 |
| calsein- L U V e | P C / P G / C H | = | 7 / 3 / 1 |

【 0 0 2 7 】 ② 微生物膜モデルに対する各ペプチドのポア形成能の比較

第 1 表の calsein-L U V a に対し、前記のマスト 2 1、マストパラン X の他、膜作動性ペプチドとしてマガイニン 2 および溶血性ペプチドとして、マガイニン 2 とほぼ同じ分子量を有するメリチンを作用させ、各ペプチドのポア形成能の濃度依存性および経時的变化を評価した。すなわち、各ペプチドを最終濃度 0 . 5 ~ 1 0 μ M (濃度依存性測定用) あるいは 5 . 0 μ M (経時的变化測定用) となるように、カルセイン含有 L U V に作用させ、L U V の膜が破壊されることにより漏洩したカルセインの蛍光強度を測定した。各測定値について、L U V に Triton-X 100 を作用させて完全に膜を破壊したときの蛍光強度を 1 0 0 とした場合の百分率を算出し、比較を行った。

【 0 0 2 8 】 calsein-L U V a に対する各ペプチドのポア形成能を図 4 および図 5 に示す。図 4 は濃度依存性を、図 5 は経時的变化を追った結果である。図 4、5 の縦軸はカルセインの漏出量 (%) を示し、図 4 の横軸は各ペプチドの濃度 (μ M) を、図 5 の横軸は試験開始後の時間 (分) を示す。図 4 より、いずれのペプチドも濃度 5 μ M でほぼ平衡に達することおよびマスト 2 1 は、メリチンほどのポア形成能はないが、マガイニン 2 よりも高い活性を有し、マストパラン X と同程度のポア形成能を有することがわかる。また、図 5 より、いずれのペプチドも試験開始後 1 分という短時間にポア形成能を發揮することが示された。マスト 2 1 は、マストパラン X と同様のポア形成能を有し、マガイニン 2 よりも高い活性を示すことから、ポア形成能を有するペプチドとして有用であることが明らかとなった。

【 0 0 2 9 】 ③ 動物細胞の細胞膜モデルに対するポア形成能の検討 (その 1)

酸性リン脂質であるホスファチジルセリン含量を少なくした calsein-L U V b (P C / P S = 1 0 / 1) および動物細胞には存在するが、微生物には含まれないコレステロールを配合した calsein-L U V c (P C / P S / C H = 1 0 / 1 / 1) に対するマスト 2 1 およびマストパラン X のポア形成能を比較した。ポア形成能は、上記 ② と同様の方法で測定した。経時的に測定した結果を図 6 に示す。縦軸はカルセインの漏出量 (%) を、横軸は試験開始後の時間 (分) を示す。

【 0 0 3 0 】 図 6 から以下のことがわかる。まず、calsein-L U V b (P C / P S = 1 0 / 1) に対する各ペプチドの作動結果をみると、マストパラン X は、calsein-L U V a (P C / P S = 1 / 1) のリポソームに対するポア形成能 (図 5) とほぼ同等のポア形成能を示している。一方、マスト 2 1 の場合は、ポア形成能がかなり低下している。このことから、酸性リン脂質含量の少ない膜に対するマスト 2 1 のポア形成能は低いことがわかる。

【 0 0 3 1 】 次に、calsein-L U V c (P C / P S / C H = 1 0 / 1 / 1) に対する各ペプチドの作動結果をみると、両ペプチドとも、calsein-L U V a および calsein-L U V b に比べて著しく低い活性を示している。この傾向は、マスト 2 1 の場合により顕著である。このようなコレステロール含有リポソームに対するポア形成能の低下は、マガイニン 2 などの微生物膜に特異的に作用する膜作動性ペプチドにも観察される現象である。

【 0 0 3 2 】 ④ 動物細胞の細胞膜モデルに対するポア形成能の検討 (その 2)

ホスファチジルセリンの代わりに、微生物膜に量的に多く含まれる酸性リン脂質であるホスファチジルグリセロールを配合した calsein-L U V d (P C / P G = 7 / 3) およびコレステロールをも配合した calsein-L U V e (P C / P G / C H = 7 / 3 / 1) に対するマスト 2 1 およびマストパラン X のポア形成能を比較した。ポア形成能は、前記 ② と同様の方法で測定した。経時的に測定した結果を図 7 に示す。縦軸はカルセインの漏出量 (%) を、横軸は試験開始後の時間 (分) を示す。

【 0 0 3 3 】 図 7 から以下のことがわかる。マストパラン X は、calsein-L U V d および calsein-L U V e のいずれに対しても高いポア形成能を示し、この活性は図 5 とほぼ同じである。一方、マスト 2 1 は、酸性リン脂質含量が高い calsein-L U V a (図 5 参照) に対するよりも低い活性を示している。また、全体的にマストパラン X よりもポア形成能が低い。さらに、コレステロールを含む calsein-L U V e に対するポア形成能は、コレステロールを含まない calsein-L U V d に対する活性よりもかなり低い。つまり、マストパラン X の高いポア形成能は、コレステロールの有無および含まれる酸性リン脂質含量の比にほとんど影響されないのに対して、マスト 2 1 は、酸性リン脂質含量の高い膜に対して強く作用するのみならず、コレステロールを有する膜に対してあまり活性を示さないことがわかる。微生物膜の細胞膜表層には、酸性リン脂質が露出していること、コレステロールが動物細胞に特異的な脂質であることから、上記の結果は、マスト 2 1 のポア形成能は、微生物の細胞膜に対してのみ特異的である可能性を示している。

【 0 0 3 4 】 (3) マスト 2 1 の溶血性の観察
ヒトから採取した新鮮血を遠心分離 (7 0 0 ~ 1 0 0 0 g × 5 ~ 1 0 分) し、得られた赤血球を等張液で洗浄し、赤血球溶液とした (0 . 1 5 M NaCl / リン酸緩衝液、pH 7 . 4) 。この赤血球溶液 (2 × 1 0 ⁷ cells / ml) 7 2 0 μ l にマガイニン 2、メリチン、マストパラン X およびマスト 2 1 (配列表の配列番号 1 参照) の各ペプチド溶液 8 0 μ l を添加して 3 7 で 5 ~ 3 0 分間反応させた。反応後に漏洩してくるヘモグロビンを 5 4 0 nm で測定した。結果を第 2 表に示す。評価は、Triton X-100 を添加した際の吸光度を 1 0 0 とした場合の相対度で示した。

【 0 0 3 5 】

【表 2】

第 2 表〔各ペプチドの溶血性(%)〕

| | 5 μ M | 1 0 μ M |
|----------|-------|---------|
| マガイニン 2 | < 1 | 4 . 5 |
| メリチン | 1 0 0 | 1 0 0 |
| マストパラン X | 9 . 3 | 2 4 |
| マスト 2 1 | < 1 | 6 . 4 |

【 0 0 3 6 】第 2 表より、マストパラン X が溶血性を示すのに対し、マスト 2 1 は殆ど溶血性を示さず、溶血性を示さない生体防御ペプチドであるマガイニン 2 と同程度であることがわかる。したがって、前記の結果と総合して判断すると、マスト 2 1 は膜に対するポア形成能を示す点で、マストパラン X と共通しているが、赤血球に対するポア形成能、すなわち溶血性を有しない点で明らかに相違している。

【 0 0 3 7 】(4) マスト 2 1 の電荷のポア形成能に対する影響

+ 6 または + 8 の電荷を有するペプチド (配列表の配列番号 1 および 2 参照) のアミノ酸配列の一部を、電荷が + 2 または + 4 となるように入れ換えて、2 種の誘導体を作成した。それぞれの誘導体を誘導体 i、誘導体 ii と表す (配列表の配列番号 3 および 4 参照)。前記 (2) の calsein-LUV a (PC / PS = 1 / 1) を用いて、これらの誘導体およびマスト 2 1 等に対するポア形成能

を調べた。調査手法は、(2) と同様とした。結果を図 8 に示す。縦軸はカルセインの漏出量 (%) を、横軸は各ペプチドの濃度 (μ M) を示す。

【 0 0 3 8 】図 8 から明らかなように、電荷が + 2 の誘導体 i は、酸性リン脂質を含む膜に殆どポア形成能を示さなかったが、電荷が + 4 の誘導体 ii、電荷が + 8 のペプチドは、正電荷の増大につれてポア形成能が増大し、ポア形成における静電的相互作用の重要性が示唆された。

20 【 0 0 3 9 】また、前記 (3) と同様にして各誘導体および本発明のペプチドの溶血性について調べた。その結果を第 3 表に示す。なお、第 3 表に示した数値は、(3) の測定のとおりと同様に、メリチンの溶血性を 1 0 0 % とした場合の相対値である。

【 0 0 4 0 】

【表 3】

第 3 表〔電荷の異なるペプチドの溶血性に対する影響〕

| | 電荷 | 5 μ M | 1 0 μ M |
|--------------------|-----|-------|---------|
| 誘導体 i (配列番号 3) | + 2 | < 1 | 5 . 3 |
| 誘導体 ii (配列番号 4) | + 4 | < 1 | 8 . 1 |
| マスト 2 1 (配列番号 1) | + 6 | < 1 | 6 . 4 |
| ペプチド (配列番号 2) | + 8 | < 1 | 6 . 3 |

【 0 0 4 1 】(5) CD スペクトルによるマスト 2 1 の二次構造解析

LUV (PC / PS = 1 0 / 1 および PC / PG = 7 / 3 の 2 種類) をポリカーボネート製フィルターからなるエクストルーダーに 1 0 回通すことにより得られる SUV (small unilamellar vesicle: 直径 1 0 0 nm 以下の一重膜リポソーム) 中でのマスト 2 1 (配列表の配列番号 1) の CD スペクトルを測定した。また、対照として 1 0 mM リン酸緩衝液 (pH 7 . 4) 中の CD スペクトルについても測定した。CD 曲線は、測定時のリン脂質とペプチドの濃度を、リン脂質 0 . 9 mM に対してペプチドを 3 0 μ M とし日本分光 J - 7 2 0 により、2 3 において 2 5 0 ~ 2 0 0 nm の範囲を 5 0 nm / min のスキャンスピードでスキャンすることにより測定し

た。測定は各試料ごとに 5 回ずつ行い、積算した。結果を図 9 に示す。図中、縦軸は (1 0 ³ deg cm ² d mol ⁻¹) を、横軸は波長 (nm) を示す。

40 【 0 0 4 2 】図 9 より、SUV (PC / PG = 7 / 3) の場合、2 0 8 ~ 2 0 9 nm 並びに 2 2 2 nm に負の山を、2 0 0 nm 以下で正の山をとっているが、緩衝液中ではこうしたヘリックスに起因するピークは殆ど観察されず、SUV (PC / PS = 1 0 / 1) 中でも明らかではない。この結果は、SUV (PC / PG = 7 / 3) に作用するマスト 2 1 が、ヘリックス構造をとっていることを示唆するものである。

50 【 0 0 4 3 】なお、マスト 2 1 に大きな構造変化を引き起こすことが判明した SUV は、PC / PG = 7 / 3 であるが、前述の (3) の結果より、マスト 2 1 はリポソ

ーム (P C / P S = 1 0 / 1) よりもリポソーム (P C / P G = 7 / 3) に対して高いポア形成能を有している (図 6 および図 7 参照) ことを考えると、ポア形成能と構造変化に相関があることを示すものである。

【 0 0 4 4 】 (6) マスト 2 1 中のトリプトファン残基の蛍光極大波長測定

さらに、マスト 2 1 (配列表の配列番号 1 参照) が実際にリポソームの膜内に入り込んでいるか否かを明らかにするために、SUV (P C / P G = 1 / 1)、SUV (P C / P G = 7 / 3)、SUV (P G のみ) にマスト 2 1 を作用させた際のマスト 2 1 中のトリプトファン残基の蛍光極大波長を測定した。

【 0 0 4 5 】測定条件は、日本分光 F P - 7 7 7 蛍光分光光度計を用いて、励起波長 2 8 0 n m、走査波長範囲 3 0 0 ~ 4 0 0 n m、測定温度 2 3 とした。測定は、リン脂質 3 0 μ M に対して 5 μ M のペプチドを加えて 5 分後に行った。また、対照として、1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4) 中でのマスト 2 1 のスペクトルについても同様の条件で測定した。

【 0 0 4 6 】その結果を図 1 0 に示す。縦軸は波長 (n m) を、横軸は蛍光強度を示す。図 1 0 の A は、SUV (P C / P G = 7 / 3) の結果を、B は SUV (P C / P G = 1 / 1) の結果を、C は SUV (P G のみ) の結

配列番号 : 1

配列の長さ : 2 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

直接の起源 : mastoparan X

特徴を表す記号 : peptide

特徴を決定した方法 : E

配列

Lys Asn Trp Lys Gly Ile Ala Gly Met Ala Lys Lys Leu Leu Gly Lys

1 5 10 15

Asn Trp Lys Leu Met

20

【 0 0 5 0 】

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

直接の起源 : mastoparan X

特徴を表す記号 : peptide

特徴を決定した方法 : E

配列

Lys Asn Trp Lys Lys Ile Ala Gly Met Ala Lys Lys Leu Leu Lys Lys

1 5 10 15

果をそれぞれ示したものである。図中の実線はリポソーム中での測定結果を、破線は緩衝液中での測定結果を示す。

【 0 0 4 7 】図 1 0 から以下のことがわかる。緩衝液中での測定結果をみると、3 5 0 n m 付近に蛍光極大波長が示されており、これはマスト 2 1 中のトリプトファン残基が水溶液中にあることを示す値である。一方、各 SUV 中ではブルーシフトが観察されたが、これは P G 含量の多いリポソームにおいて、トリプトファン残基近傍の環境の誘電率が低下したことを示すものである。この傾向は、図 1 0 の A よりも C において顕著であることから、P G 含量の高いリポソームほど高いことがわかる。このことから、マスト 2 1 はリポソームの膜内に挿入され、ポア形成能とペプチドの膜内への配向が密接な関係にあることが示された。

【 0 0 4 8 】

【 発明の効果 】本発明の膜作動性ペプチドは微生物膜に対して特異的なポア形成能を示し、しかも溶血性を示さないことから、抗菌物質として有効に利用できる可能性を示している。

【 0 0 4 9 】

【 配列表 】

13
 Asn Trp Lys Leu Met
 20

14

【 0 0 5 1 】

配列番号： 3
 配列の長さ： 2 1
 配列の型：アミノ酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 直接の起源：mastoparan X
 特徴を表す記号：peptide
 特徴を決定した方法： E
 配列
 Lys Asn Trp Lys Gly Ile Ala Gly Met Ala Lys Lys Leu Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Asn Trp Glu Leu Met
 20

【 0 0 5 2 】

配列番号： 4
 配列の長さ： 2 1
 配列の型：アミノ酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 直接の起源：mastoparan X
 特徴を表す記号：peptide
 特徴を決定した方法： E
 配列
 Lys Asn Trp Lys Gly Ile Ala Gly Met Ala Lys Lys Leu Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Asn Trp Lys Leu Met
 20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 マガイニン 2 の車輪表示である。

【 図 2 】 マスト 2 1 の車輪表示である。

【 符号の説明 】

数値はアミノ酸の N 末端から数えた順番を示す。また、
 四角で囲んだアルファベットは疎水性アミノ酸であるこ
 とを、丸で囲んだアルファベットは塩基性アミノ酸であ
 ることを示す。

【 図 3 】 マストパラン X の車輪表示である。

【 符号の説明 】

数値はアミノ酸の N 末端から数えた順番を示す。また、
 四角で囲んだアルファベットは疎水性アミノ酸であるこ
 とを、丸で囲んだアルファベットは塩基性アミノ酸であ
 ることを示す。

【 図 4 】 カルセイン内包 L U V に対する各ペプチドのポア形成能の濃度依存性を示す図である。

【 符号の説明 】

- - はマガイニン 2 の結果を、 - - はメリチンの結

果を、 - - はマストパラン X の結果を、 - - はマスト 2 1 の結果を示す。

【 図 5 】 カルセイン内包 L U V に対する各ペプチドのポア形成能の経時変化を示す図である。

【 符号の説明 】

- - はマガイニン 2 の結果を、 - - はメリチンの結
 果を、 - - はマストパラン X の結果を、 - - はマスト
 2 1 の結果を示す。

【 図 6 】 カルセイン内包 L U V に対する各ペプチドのポア形成能の経時的変化を示す図である。

【 符号の説明 】

- - は calsein- L U V b に対するマストパラン X の結
 果を、 - - は calsein- L U V c に対するマストパラン
 X の結果を、 - - は calsein- L U V b に対するマスト
 2 1 の結果を、 - - は calsein- L U V c に対するマスト
 2 1 の結果を示す。

【 図 7 】 カルセイン内包 L U V に対する各ペプチドのポア形成能の経時的変化を示す図である。

40

50

【符号の説明】

- - はcalsein-LUV dに対するマストパランXの結果を、- - はcalsein-LUV eに対するマストパランXの結果を、- - はcalsein-LUV dに対するマスト21の結果を、- - はcalsein-LUV eに対するマスト21の結果を示す。

【図8】 カルセイン内包LUVに対する各ペプチドのポア形成能の濃度依存性を示す図である。

【符号の説明】

- - は誘導体iの結果を、- - は誘導体iiの結果を、- - はマスト21の結果を、- - は電荷8のペ

プチドの結果を示す。

【図9】 マスト21のCDスペクトルを示す図である。

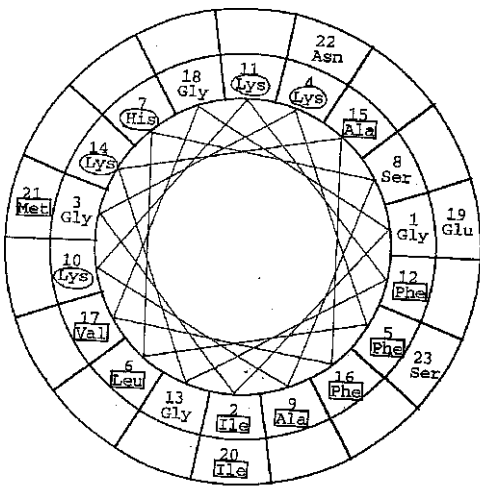
【符号の説明】

buffer、PC、PGは、それぞれ緩衝液、LUV (PC / PS = 10 / 1)、LUV (PC / PG = 7 / 3) のCDスペクトルを示す。

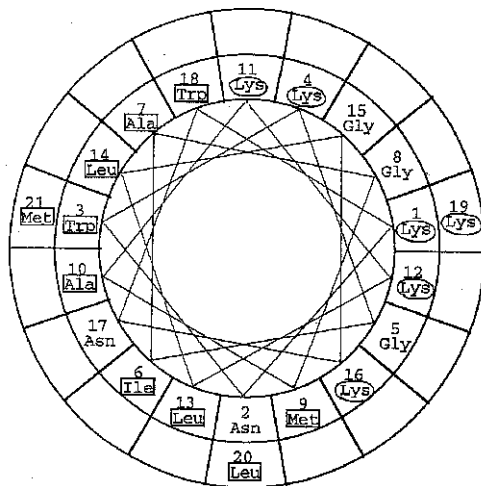
【図10】 トリプトファン残基の蛍光波長極大を示す図である。

10 【図11】 マスト21のクロマトグラムである。

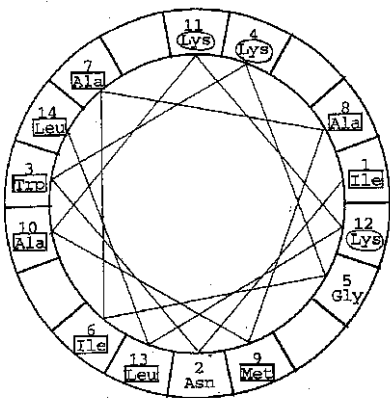
【図1】



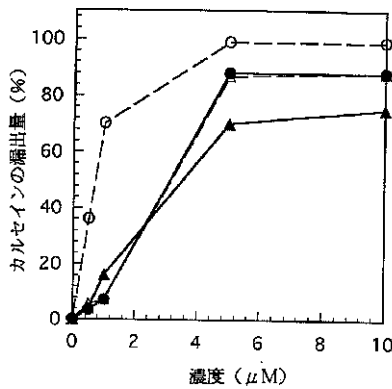
【図2】



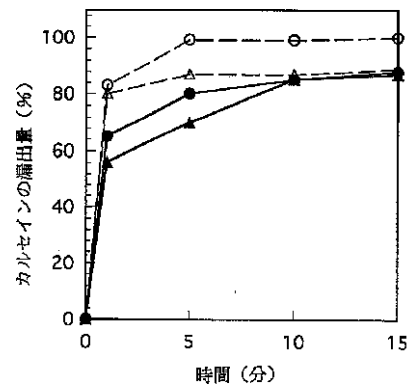
【図3】



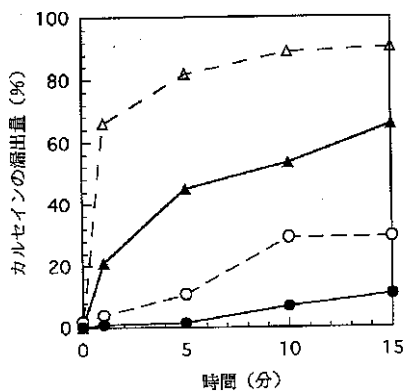
【図4】



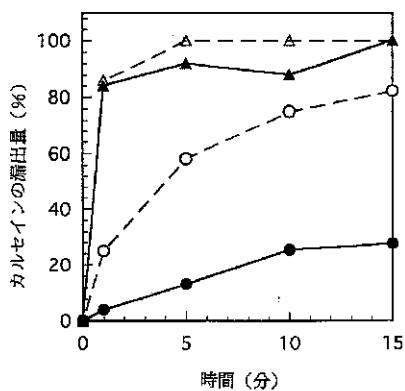
【図5】



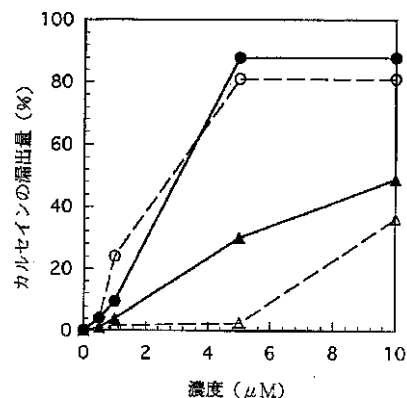
【図 6】



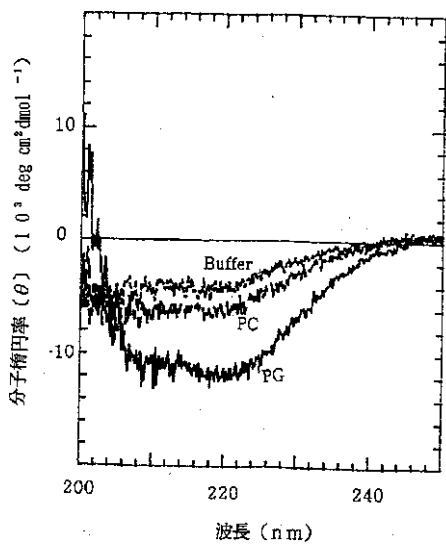
【図 7】



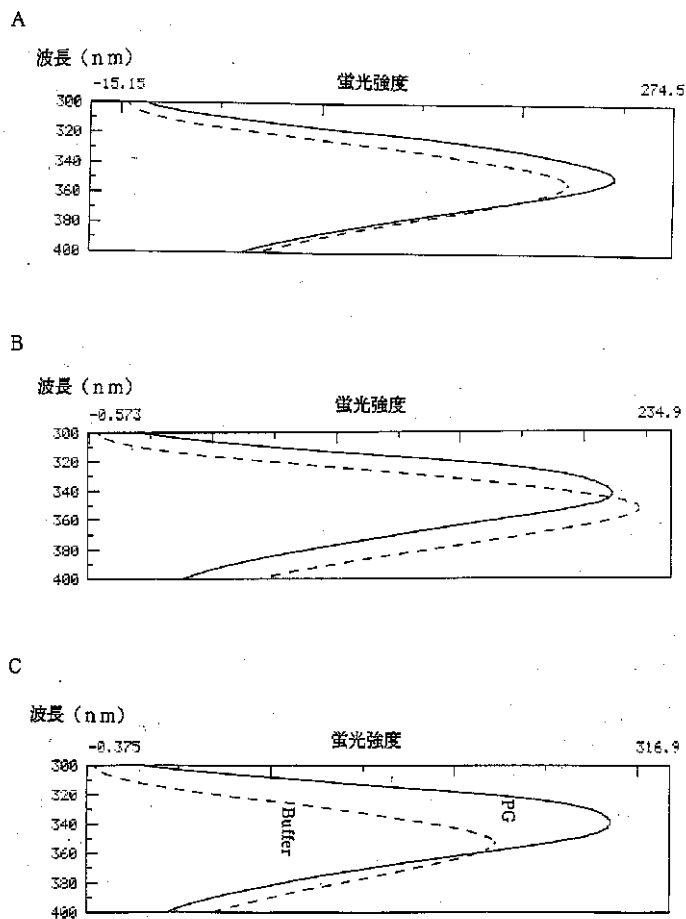
【図 8】



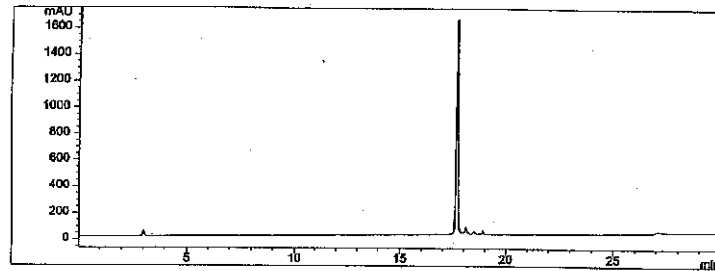
【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



【手続補正書】

【提出日】平成 1 1 年 6 月 4 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項 1】配列表の配列番号 1 あるいは 2 記載のアミノ酸配列からなる膜作動性ペプチド。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 5

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 0 5】

【課題を解決するための手段】請求項 1 記載の本発明は、配列表の配列番号 1 あるいは 2 記載のアミノ酸配列からなる膜作動性ペプチドである。請求項 2 記載の本発明は、請求項 1 記載のペプチドを用いて微生物膜に対して選択的に作用させ、そのバリアー能を損傷させる方法である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 5

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 2 5】さらに、脂質薄膜をデシケータ中で一晚減圧下におき、有機溶媒を完全に揮発させた。続いて、カルセイン 7 0 m M を含む 1 0 m M H E P E S (p H 7 . 4) 溶液 1 . 5 m l を添加し、ボルテックス社製の攪拌機で 1 0 分間攪拌して懸濁させ、多重層リポソーム (multilamellar vesicle : M L V) を形成させた。さらにその後、超音波で懸濁液が透明になるまで処理し (約 3 0 分) 、カルセインを内包した大きな一枚膜リポソーム (Large unilamellar vesicle : L U V) を形成させた後、ゲル濾過 (セファロース C L - 4 B , 1 c m × 2 5 c m , 流速 0 . 2 5 m l / 分 , 分画サイズ 2 m l) を行い、直径数百 n m のカルセイン内包 L U V を得た。得られた 5 種類のカルセイン含有 L U V のリン脂質組成を第 1 表に示す。