

- 9) de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Höltje, J.V., & Schwarz, H. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 2823–2834.
- 10) Young, K.D. (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 660–703.
- 11) Swulius, M.T. & Jensen, G.J. (2012) *J. Bacteriol.*, **194**, 6382–6386.
- 12) van Teeffelen, S., Wang, S., Furchtgott, L., Huang, K.C., Win-green, N.S., Shaevitz, J.W., & Gitai, Z. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15822–15827.
- 13) Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D. Z., & Mitchison, T. (2011) *Science*, **333**, 222–225.
- 14) Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Söldner, R., & Carballido-López, R. (2011) *Science*, **333**, 225–228.
- 15) Uehara, T. & Park, J.T. (2008) *J. Bacteriol.*, **190**, 3914–3922.
- 16) Nurse, P. & Mariani, K.J. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 3469–3475.
- 17) Singh, S.K., Saisree, L., Amrutha, R.N., & Reddy, M. (2012) *Mol. Microbiol.*, **86**, 1036–1051.
- 18) Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., & Devine, K.M. (2007) *Mol. Microbiol.*, **65**, 180–200.
- 19) Popham, D.L. & Young, K.D. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 594–599.
- 20) Brown, P.J., de Pedro, M.A., Kysela, D.T., Van der Henst, C., Kim, J., De Bolle, X., Fuqua, C., & Brun, Y.V. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1697–1701.
- 21) Aldridge, B.B., Fernandez-Suarez, M., Heller, D., Ambravaneswaran, V., Irimia, D., Toner, M., & Fortune, S.M. (2012) *Science*, **335**, 100–104.
- 22) Letek, M., Ordóñez, E., Vaquera, J., Margolin, W., Flärdh, K., Mateos, L.M., & Gil, J.A. (2008) *J. Bacteriol.*, **190**, 3283–3292.
- 23) Daniel, R.A. & Errington, J. (2003) *Cell*, **113**, 767–776.
- 24) Ausmees, N., Kuhn, J.R., & Jacobs-Wagner, C. (2003) *Cell*, **115**, 705–713.
- 25) Cabeen, M.T., Charbon, G., Vollmer, W., Born, P., Ausmees, N., Weibel, D.B., & Jacobs-Wagner, C. (2009) *EMBO J.*, **28**, 1208–1219.
- 26) Sycuro, L.K., Pincus, Z., Gutierrez, K.D., Biboy, J., Stern, C. A., Vollmer, W., & Salama, N.R. (2010) *Cell*, **141**, 822–833.
- 27) Bonis, M., Ecobichon, C., Guadagnini, S., Prévost, M.C., & Boneca, I.G. (2010) *Mol. Microbiol.*, **78**, 809–819.
- 28) Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K.A., Bernhardt, T.G., & Rudner, D.Z. (2010) *Genes Dev.*, **24**, 411–422.
- 29) McPherson, D.C., Driks, A., & Popham, D.L. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 6046–6053.
- 30) Young, K.D. (2010) *Annu. Rev. Microbiol.*, **64**, 223–240.

上原 剛

(ノバルティス バイオメディカル研究所)

Cell wall shaping during bacterial morphogenesis
Tsuyoshi Uehara (Novartis Institutes for Biomedical Research, Inc., 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, USA)

Asp-hemolysin 由来合成ペプチドと酸化 LDL/リゾリン脂質の相互作用

1. はじめに

Asp-hemolysin は, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) Fresenius-村松株から分離・精製された, 131 アミノ酸残基からなる分子量 14,275 のタンパク質毒素である (図 1)^{1,2)}. この毒素は, *A. fumigatus* の実験的感染に際して感染促進効果を示し, 感染病巣中にも産生される³⁾. また, Asp-hemolysin は, 各種動物赤血球に対して *in vitro* において溶血活性を有するほか, マウス腹腔内血管透過性亢進作用や, ヒト多核白血球, モルモット腹腔マクロファージに対する細胞毒性など様々な生物活性を有することから, *A. fumigatus* 感染の病変形成・進展に関与することが強く示唆されている¹⁾.

これまで, *Streptococcus pyogenes* が産生するストレプトリジン O などの細菌毒素は, 赤血球膜にあるコレステロールに結合し溶血活性を発現すると考えられてきた. それに対し, Asp-hemolysin は赤血球膜の構成成分であるリン脂質やコレステロールには結合しないこと⁴⁾, また Asp-hemolysin の赤血球膜に対する結合には同ペプチド中のアルギニン残基が⁵⁾, 溶血活性の発現にはシステイン残基のチオール基⁶⁾がそれぞれ必須であることが明らかとなっている. さらには, 血液中に存在する低密度リポタンパク質 (low-density lipoprotein : LDL) および動脈硬化症の原因物質である酸化 LDL がいずれも Asp-hemolysin の溶血活性を阻害することから⁷⁻⁹⁾, 赤血球膜上に存在する LDL が Asp-hemolysin と赤血球の結合に関与する可能性も示唆されている. 実際, LDL, 酸化 LDL はそれぞれ, Asp-hemolysin に対し, LDL 受容体, 酸化 LDL の受容体であるスカベンジャー受容体と同等の高親和性で結合すること¹⁰⁾, さらには Asp-hemolysin が酸化 LDL の主要構成成分でありリゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine : LPC) とも結合することが明らかとなっている¹¹⁾.

また, Asp-hemolysin 中の 34~45 番目のアミノ酸領域がヒト LDL 受容体のリガンド結合領域と, 22~37 番目のアミノ酸領域が酸化 LDL 受容体であるヒトスカベンジャー受容体クラス A タイプ 1 のコラーゲン様ドメイン (リガンド結合領域) と, それぞれ類似することがわかった (図

```

                                                                                                                                 TCTGTTTCATCTCCCTC   17
ACCTGTCTTAATTGCAGTTCTATCTCTTAGCAACACCGCTCCAAAATGGCATCGGTCCAA   77
                                                                                                                                 M A S V Q   -1
GCTTACGCACAGTGGGTTACGGTTCATCTCATCAATAGCATGTCCTCCGAGACCTTGAGT   137
A Y A Q W V T V H L I N S M S S E T L S   20
ATCAAGAATGCTAGTCTCTCTCGGGCAAGTGGTACAAGGACGCTGACAAGGACGCCGAA   197
I K N A S L S W G K W Y K D G D K D A E   40
-----
ATCACAAGTGAAGATGTCCAGCAAAAGACGGCACCCCGGGTTCGGTGAACGTCAAC   257
I T S E D V Q Q K T A P P G G S V N V N   60
-----
TCTTGCGGTTCGACGACGCTTCGAGTGAACGACGGGAGGTTTTGATTTGTATGACGGC   317
S C G R S D A S S G T T G G F D L Y D G   80
AATACCAAGATTGGAAGAGTCCACTGGGACTGTCCATGGGGTTCFAAAACCAACGATTTTC   377
N T K I G R V H W D C P W G S K T N D F   100
GATGTTGGAGAGAGAAACAAAATTACTGGGTCGAAAATGGAACGTGGAACAAGTATGGT   437
D V G E R N K N Y W V E I G T W N K Y G   120
GGTGCCATTGGCAACTGTTGACGTTGAAGTTGGAAGGAAGCGCTGAAGCAGTTTGACGCA   497
G A I G N C *   126

```

図1 Asp-hemolysinのアミノ酸配列

各アミノ酸は1文字表記で示した。また、実線部分は酸化LDL受容体であるヒトスカベンジャー受容体クラスAタイプIのコラーゲン様ドメイン(リガンド結合領域)と類似する配列、点線部分はヒトLDL受容体のリガンド結合領域と類似する配列をそれぞれ示す。

1). そこで著者らは、Asp-hemolysinにおいて、これら二つの領域を含む21~49残基間のアミノ酸配列をもとにして4~29アミノ酸残基からなるペプチドを合成し(図2)、これらペプチドと酸化LDL、ならびにLPCをはじめとする各種リゾリン脂質との相互作用解析を行ってきた。本稿では、Asp-hemolysin由来合成ペプチドの酸化LDLおよび各種リゾリン脂質との相互作用について紹介する。

2. Asp-hemolysin由来合成ペプチドと酸化LDL/リゾリン脂質の相互作用

酸化LDLは、動脈硬化症の原因物質であり、その受容体であるスカベンジャー受容体クラスAタイプ1およびクラスAタイプ2を介してマクロファージの増殖に関与する。著者らは、Asp-hemolysin由来合成ペプチドのうちP4、P21(図2)とネイティブLDL、酸化LDLとの相互作用解析を行い、P4、P21がともに酸化LDLと結合するがネイティブLDLには結合しないこと、酸化LDLによるマウス腹腔マクロファージ増殖活性を用量依存的かつ顕著に抑制することを明らかにした。さらに、酸化LDLの主要構成成分であるLPCはその用量に依存してP21と酸化LDLの結合を阻害することから、これら合成ペプチドはLPCと直接的に結合する可能性が考えられた。

さらに著者らは、P21中に存在するトリプトファン(Trp, 図2)の蛍光を指標としてP21と各種リゾリン脂質の相互作用解析を行った。Trpは蛍光性アミノ酸として最も高い蛍光特性を示し、そのスペクトルの波長や強度は溶媒の極性などの因子を含む局所環境によって大きく変化することが知られている。すなわち、ペプチド/タンパク質中のTrpの蛍光強度を測定することは、ペプチド/タンパク質とリガンドとの相互作用を解析するための有用なツールとなり得る。実際に、P21、特にペプチドプローブ体として各種実験に用いてきたN末端ビオチニル化P21(以下、BP21)が、LPCをはじめとする各種リゾリン脂質、ならびにリゾリン脂質様の構造を持つ血小板活性化因子(platelet-activating factor: PAF)、その前駆/代謝脂質であるリゾPAFと選択的に相互作用する一方で、細胞膜やネイティブLDLなどに多量に存在するリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)と相互作用しないことが明らかとなった。以上の結果はAsp-hemolysin由来合成ペプチドと酸化LDLの特異的相互作用を強く示唆するものであった。

さらに著者らは、Asp-hemolysin由来合成ペプチドのリゾリン脂質活性に対する作用の検討を行った。まず、ヒト血管臍帯静脈内皮細胞を用いてLPC、PAFの細胞障害活

(A)

| | |
|-----|---|
| P29 | IKNASLSWGK WKYKDG DKDAEITSEDVQQK |
| P24 | LSWGK WKYKDG DKDAEITSEDVQQK |
| P21 | IKNASLSWGK WKYKDG DKDAEI |
| P16 | LSWGK WKYKDG DKDAEI |
| P15 | IKNASLSWGK WKYKDG |
| P11 | WGK WKYKDG DKD |
| P9 | WGK WKYKDG |
| P7 | YKDG DKD |
| P6 | WKYKDG |
| P4 | YKDG |

(B)

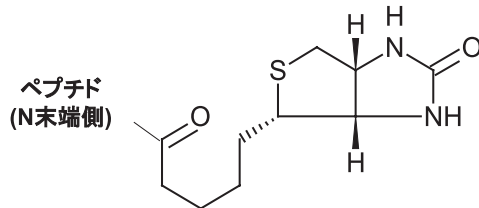


図2 Asp-hemolysin 由来合成ペプチド (P4~P29) のアミノ酸配列とそのN末端ビオチニル化ペプチドの構造

(A) 各種合成ペプチドはいずれも Tyr-Lys-Asp-Gly (YKDG) 配列を共通して有する。(B) 上記ビオチニル化ペプチドはペプチドのN末端にビオチンを結合させたものである。

性に対する P21 の作用を調べた結果、P21 はその用量に依存して LPC, PAF の細胞障害活性を抑制することがわかった。さらに、*in vivo* における合成ペプチドの PAF 活性に対する効果を調べるために PAF 誘発ラット足蹠浮腫試験を行った結果、本実験で使用した P4, P21 よりも、それら N 末端をビオチニル化した BP4, BP21 が静脈内、皮下いずれの投与においても PAF 誘発足浮腫を劇的かつ用量依存的、そしてより安定的に抑制した (図 3)。なお、ラットにペプチドと同モル量のビオチンを投与してもその抗 PAF 作用は認められないことから、ビオチニル化ペプチドの抗 PAF 作用はビオチン単独によるものではなく、ビオチンがそのペプチドの N 末端に結合することで発揮されると言える。さらに、この抗 PAF 作用は YKDG 配列を有さない N 末端ビオチニル化ペプチドの投与では起こらないことから、ビオチニル化ペプチド中のビオチンなら

びに YKDG 配列がその抗 PAF 作用に重要な役割を担っていると考えられた。

3. Asp-hemolysin 由来合成ペプチドの抗 PAF 作用の機序

一般に、PAF の血液中濃度は、アレルギー性脳脊髄炎、歯肉炎、胸膜炎、アナフィラキシーなど様々な炎症性疾患発症時に上昇する。PAF は、二つの異なる経路、*de novo* 経路とりモデリング経路 (Land's cycle) を介して生合成され¹²⁾、特に炎症時には後者の経路を介して行われる^{13,14)}。また、PAF はその特異的な PAF 受容体を介して作用を発揮するが、現在までにその PAF 受容体を標的とした PAF 受容体拮抗剤が多く開発・研究されている。特に、CV-3988¹⁵⁾や WEB-2086¹⁶⁾などは抗アレルギー剤や抗喘息剤として臨床試験段階であるが、これら PAF 受容体拮抗剤はいまだ実用化されていない。それに対し、Asp-hemolysin 由来ビオチニル化ペプチドは、既知 PAF 受容体拮抗剤の 40 分の 1 投与量と、非常に低用量で劇的な抗 PAF 作用を発揮することがわかった (図 3)。さらに、上記合成ペプチドは PAF 受容体作動剤、PAF 受容体拮抗剤のいずれでもないことがわかり、従来の PAF 対象薬剤とは異なる作用機序によって抗 PAF 作用を示すものと考えられた。

一般に、炎症反応は、PAF の他、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンなど様々な炎症性メディエーターが関与する。ヒスタミンは肥満細胞や好塩基球より遊離され、血管内皮にあるヒスタミン H₁ 受容体を活性化して血管透過性を亢進させること、セロトニンもまたセロトニン受容体を介して血管透過性を亢進させ、さらにブラジキニンは強力な血管平滑筋弛緩作用を有し、血管内皮細胞でのブラジキニン B₂ 受容体を介して血管透過性を亢進させるとともに、肥満細胞にあるブラジキニン B₂ 受容体も介してヒスタミンや PAF を遊離することが知られている。しかし、Asp-hemolysin 由来合成ペプチドは、PAF 以外の各種炎症性メディエーター (ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン) による炎症をいずれも抑制しないことから、PAF 依存性炎症を特異的に抑制する可能性が考えられた。

4. 現状の問題点と将来の展望

前述の通り、Asp-hemolysin 由来合成ペプチド、特にその N 末端ビオチニル化ペプチドは、PAF 依存性炎症を特異的に抑制するが、PAF の PAF 受容体活性に影響しない。したがって、合成ペプチドの抗 PAF 作用のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。しかし最近、肺におい

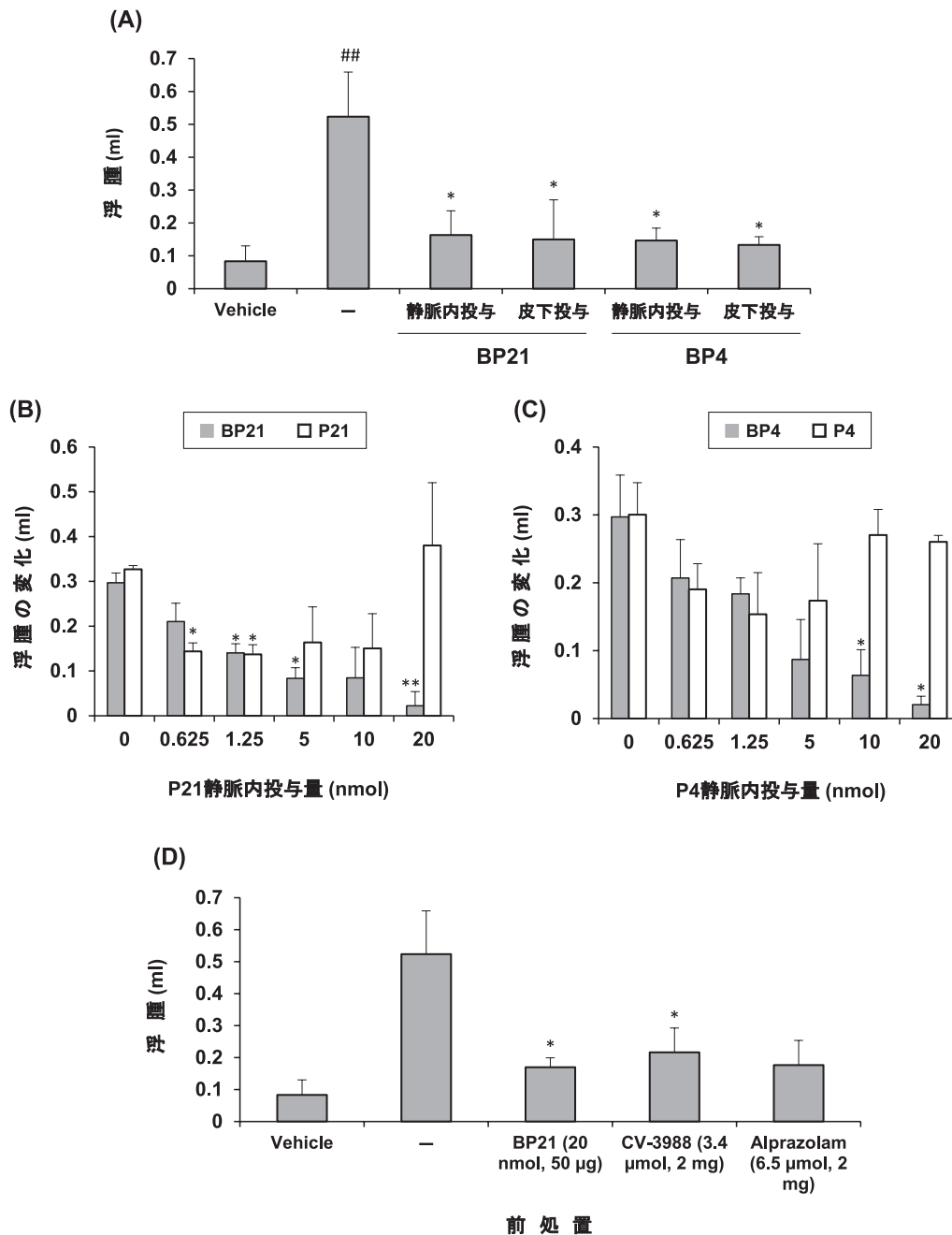


図3 Asp-hemolysin 由来合成ペプチドの PAF 活性に対する効果

(A) BP21, BP4 (各 10 nmol) の PAF 活性に対する効果. (B) P21, BP21 の静脈内投与量と抗 PAF 活性の相関. (C) P4, BP4 の静脈内投与量と抗 PAF 活性の相関. (D) BP21 と PAF 受容体拮抗剤の抗 PAF 活性の比較. いずれのデータも平均値 \pm S.D. ($n=3-4$) として示した. $^{##}P<0.05$ (vehicle との比較), $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ (PAF 単独との比較).

て, PAF は PAF 受容体を活性化した後, (1) シクロオキシゲナーゼ-1 を介したトロンボキサン A_2 の経路, (2) リポキシゲナーゼを介したロイコトリエン C_4/D_4 経路, (3) 酸

性スフィンゴミエリナーゼを介したセラミドの経路 (IP_3 受容体を介した経路と予測される), (4) シクロオキシゲナーゼを介したプロスタグランジン E_2 の経路, の大きく

四つの経路を介して作用を示すことが報告されている¹⁷⁾。また、これら経路のうち、(3)と(4)の各経路は直接的に血管透過性につながり、(1)と(2)の各経路は血管収縮や静水圧の増加を引き起こすことにより、結果として浮腫を引き起こすことが知られている。よって、上記ペプチドはPAF受容体活性化後のいずれかのシグナル経路を阻止している可能性も考えられる。さらには、PAFの他、リゾホスファチジン酸(LPA)などのリゾリン脂質も血管透過性を増大させることから¹⁸⁾、今後、上記ペプチドがPAFやLPAなどにより起こる血管透過性亢進に影響を与えるのかを調べていく必要もある。また最近、PAFによる炎症はPAF受容体に依存しない経路、例えば近年明らかになったLPCの受容体(G2A受容体、GPR4受容体)など、PAF受容体以外のリゾリン脂質受容体などの経路を介して行われることも報告されており¹⁹⁾、Asp-hemolysin由来合成ペプチドが、LPC受容体のようなPAF以外のリゾリン脂質受容体の経路を阻止し、結果としてPAF炎症活性を抑制している可能性も考えられる。今後著者らは、本研究の結果をもとに、Asp-hemolysin由来合成ペプチドの抗炎症作用のメカニズムについてさらなる解析を進めていくとともに、これらペプチドのPAF以外の各種リゾリン脂質活性に対する影響についても検討を進め、最終的には上記合成ペプチドを用いた新しい抗炎症剤の開発ならびに実用化を目指したいと考えている。

謝辞

本研究の一部を実施して頂いた東北薬科大学・環境衛生学教室 熊谷健先生に深く感謝を申し上げます。また、本研究の一部は科学技術振興機構(JST)研究成果展開事業A-STEPの助成により行われたものです。ここに感謝の意を表します。

- 1) Yokota, K., Shimada, H., Kamaguchi, A., & Sakaguchi, O. (1977) *Microbiol. Immunol.*, **21**, 11-22.
- 2) Ebina, K., Sakagami, H., Yokota, K., & Kondo, H. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148-150.
- 3) 蝦名敬一, 横田勝司, 坂田 平 (1982) 真菌誌, **23**, 246-252.
- 4) 福地祐司 (2001) *YAKUGAKU ZASSHI*, **121**, 423-432.
- 5) Yokota, K., Ichinowatari, S., Ebina, K., & Wakabayashi, N. (1985) *Microbiol. Immunol.*, **29**, 91-101.
- 6) 横田勝司, 一ノ渡俊也, 蝦名敬一 (1984) 真菌誌, **25**, 332-339.
- 7) Fukuchi, Y., Kudo, Y., Kumagai, T., Ebina, K., & Yokota, K. (1996) *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1380-1381.
- 8) Fukuchi, Y., Kudo, Y., Kumagai, T., Ebina, K., & Yokota, K.

- (1998) *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**, 275-280.
- 9) Kudo, Y., Kumagai, T., Fukuchi, Y., Ebina, K., & Yokota, K. (1999) *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 549-550.
- 10) 工藤陽一 (2005) *YAKUGAKU ZASSHI*, **125**, 617-629.
- 11) Tsutsumi, H., Kumagai, T., Naitoo, S., Ebina, K., & Yokota, K. (2006) *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 907-910.
- 12) Shindou, H. & Shimizu, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 1-5.
- 13) Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., & McIntyre, T.M. (2000) *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 419-445.
- 14) Harayama, T., Shindou, H., Ogasawara, R., Suwabe, A., & Shimizu, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 5514-5516.
- 15) Terashita, Z., Tsushima, S., Yoshioka, Y., Nomura, H., Inaba, Y., & Nishikawa, K. (1983) *Life Sci.*, **32**, 1975-1982.
- 16) Casal-Stenzel, J., Muacevic, G., & Weber, K.H. (1987) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 974-981.
- 17) Uhlig, S., Göggel, R., & Engel, S. (2005) *Pharmacol. Rep.*, **57**, 206-221.
- 18) Hashimoto, T., Ohata, H., & Honda, K. (2006) *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 82-87.
- 19) Dyer, K.D., Percopo, C.M., Xie, Z., Yang, Z., Kim, J.D., Davoine, F., Lacy, P., Druey, K.M., Moqbel, R., & Rosenberg, H. F. (2010) *J. Immunol.*, **184**, 6327-6334.

佐藤 陽, 蝦名 敬一
(いわき明星大学薬学部)

Interaction between Asp-hemolysin-related synthetic peptides and oxidized LDL/lysophospholipids

Akira Sato and Keiichi Ebina (Faculty of Pharmacy, Iwaki Meisei University, 5-5-1, Chuodai-Iino, Iwaki, Fukushima 970-8551, Japan)

投稿受付:平成24年10月3日

ミトコンドリア DNA の母性遺伝を制御する多様な分子機構

1. はじめに

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によりATPを産生するエネルギー工場であり、真核生物にとって必須な細胞内小器官(オルガネラ)である。ミトコンドリアは10~20億年前に現在の真核生物の祖である嫌気性真核生物に好気性細菌の α -プロテオバクテリアが共生して誕生したものと考えられており、独自のゲノムDNA(mtDNA)とその複製系を持つ。ヒトの場合、mtDNAは酸化的リン酸化に関わるタンパク質やミトコドリア特異的なrRNA, tRNAをコードする16.5 kbpの環状DNAで、一つの体細胞あたり $10^3 \sim 10^4$ コピー存在する。mtDNAの変異は疾患とも関連し、脳や筋、心臓などに症状が現れるミトコンドリア病