

タキプレシン I とリポ多糖の相互作用解析

¹北大院・生命科学、²北大院・理、³富山大・薬、⁴九大院・理

○神谷昌克¹、杉田圭太郎²、相沢智康²、水口峰之³、川畑俊一郎⁴、出村誠¹、河野敬一²

NMR analysis of Tachyplesin I with LPS

¹Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., ³Fac. of Pharmaceut. Sci., Toyama Univ., ⁴Dept. of Biol., Grad. Sch. of Sci., Kyushu Univ.

○ Masakatsu Kamiya¹, Keitaro Sugita², Tomoyasu Aizawa², Mineyuki Mizuguchi³, Shun-ichiro Kawabata⁴, Makoto Demura¹, Keiichi Kawano²

Antimicrobial peptides are a key component of the innate immune systems of most multi-cellular organisms. An antimicrobial peptide, Tachyplesin I, was found in hemocytes of the Japanese horseshoe crab. Tachyplesin I is a 17-residue cyclic peptide which is active against fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria. In aqueous solution, Tachyplesin I adopts a β -hairpin fold by two disulfide bridges.

Despite broad divergences in sequence and taxonomy, most antimicrobial peptides share a common mechanism, i.e., membrane permeabilization of the pathogen. The action mechanism of tachyplesin I is also believed to disrupt or permeabilize bacterial membranes. Previous studies have shown that Tachyplesin I is capable of interacting with lipopolysaccharide (LPS). LPS is the major constituent of the outer membrane of Gram-negative bacteria. However, the molecular mechanism has yet to be elucidated. To better understand the action mechanism of Tachyplesin I, we performed a structural analysis of tachyplesin I in the presence of LPS. In this presentation, we would like to discuss the action mechanism of antimicrobial activity based on the structures of Tachyplesin I with LPS..

キーワード： 抗菌ペプチド、リポ多糖、trNOE

著者ふりがな： かみや まさかつ、すぎた けいたろう、あいざわ ともやす、みずぐち みねゆき、かわばた しゅんいちろう、でむら まこと、かわの けいいち

[序論]

タキプレシン I (TP)はカプトガニの血球から発見された抗菌ペプチドであり、グラム陰性菌・陽性菌の両方に活性をもつ (Fig. 1)。抗菌ペプチドは一般に細菌の細胞膜を破壊することで抗菌活性を示すと考えられているが、詳細な分子機構については未だ議論の的である。タキプレシン I やそのアナログは様々な感染症に対する治療に有効であると考えられており、抗菌活性の分子機構の解明が期待される。本研究では、グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS)との相互作用解析を行うことにより、その一端を明らかにすることを目的とする。本発表では、タキプレシン I・リポ多糖複合体のモデル構造を提示し、その活性機構について議論する予定である。

[方法]

固相合成法によりタキプレシンIペプチドを合成した。空気酸化により、システイン間のジスルフィド結合を形成させたのち、逆相HPLCにより精製し、凍結乾燥させたものを測定試料として用いた。LPSは、*E. coli* O111:B4由来のものをSIGMAから購入した。測定試料の条件は1mM TP, 10 % D₂O, pH 4.2である。全ての測定はBruker DRX 500 MHzまたは 600 MHz(クライオプローブ付)の装置で行われた。

[結果]

一次元¹H NMRによるLPS滴定実験からTP/LPS複合体試料のLPSの量を0.8 mgとした(data not shown)。Fig.2はTP単体およびLPSとの複合体試料の¹H TOCSYスペクトルである。LPSの添加により、Cys3, Arg15, Arg17 およびC末アミド基に相当するピークの化学シフトに有意な変化が見られた。このことは、LPSがFig.1における左側に位置するアミノ酸残基すなわちN末、C末の両末端部分でタキプレシンIと相互作用することが明らかになった。また、¹H NOESYスペクトルにおいて、TP単体に比べてTP/LPS複合体では両末端部分に位置する原子間のNOE相関ピークが多く観測された。TP単体では末端部分はNOE距離制限の不足により、構造の収束があまり良くない。したがって、複合体でのNOE相関ピークの増加はこの部分がよりリジットな構造に変化したことを示唆する。現在、複合体の構造計算を行っている。また、STD (Saturation Transfer Difference)法により、LPS側の相互作用部位を同定することによって、構造計算の結果と合わせて合理的なTP/LPS複合体を提示する予定である。

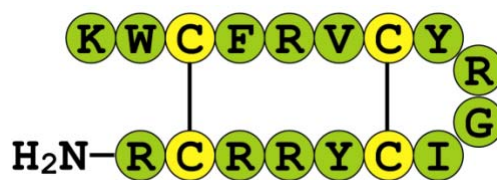


Fig.1 Schematic diagram of Tachyplesin I

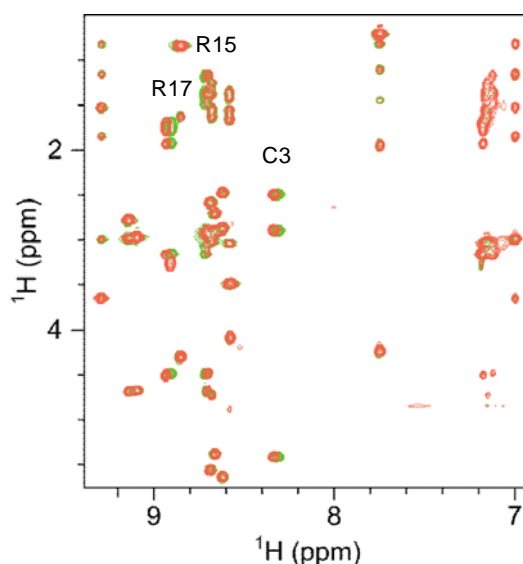


Fig.2 ¹H TOCSY spectra of TP/LPS complex