

2024 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	非メチル化 CpG DNA の免疫刺激活性を増強する 抗菌ペプチド
キーワード	①両親媒性、②自然免疫応答、③マクロファージ

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	ニシハラ サエカ 西原 冴佳
配付時の所属先・職位等 (令和6年4月1日現在)	同志社女子大学薬学部 特別任用助教
現在の所属先・職位等	同志社女子大学薬学部 特別任用助教
プロフィール	2018年同志社女子大学薬学部を卒業、薬剤師免許を取得。同年、同志社女子大学大学院薬学研究科へ進学し、2022年に博士（薬学）を取得。2019年より同志社女子大学薬学部にて特別任用助手、2022年10月より現職の特別任用助教として主に生体防御応答に関する研究に従事している。

1. 研究の概要

細菌に特有の核酸構造である CpG-DNA は、抗腫瘍薬やワクチンアジュバントとして利用されていることから、その活性化を増強する物質は創薬への応用が期待される。申請者はこれまでに、一部の α -ヘリックス型抗菌ペプチドが、CpG-DNA によるマクロファージ活性化を顕著に増強することを見出している。一方、この増強にはペプチドによる DNA の細胞内取り込み促進が関与するが、それだけでは不十分であることもわかった。本研究ではペプチドの性質を詳細に解析し、 α -ヘリックスペプチドにおける高い両親媒性が、CpG-DNA 刺激応答の増強に必須の性質であることを明らかにした。

2. 研究の動機、目的

抗菌ペプチドは細菌から哺乳類まで幅広い生物種に存在する生体防御因子であり、微生物感染に対する自然免疫応答において重要な役割を果たす。抗菌ペプチドは正電荷を有するため、核酸やリポ多糖などの負に荷電した細菌成分が殺菌作用の標的となる。これらの細菌成分は Toll 様受容体（TLR）などの自然免疫受容体を介して宿主の免疫システムの活性化を引き起こす免疫刺激物質でもある。したがって抗菌ペプチドは、これらの細菌成分との相互作用により免疫応答を調節する可能性がある。このような視点から申請者は、マウスマクロファージ様培養細胞株 RAW264.7 の TLR リガンド応答に対する α -ヘリックス型抗菌ペプチドの効果を調べた。そして、サソリ毒液由来の抗菌ペプチド Kn2-7（FIKRIARLLRKIF）が、細菌特有の核酸構造である非メチル化 CpG DNA（CpG-DNA）による細胞活性化を顕著に増強することを発見した [S. Nishihara *et al.*, *BBRC* (2020)]。CpG-DNA は、ワクチンのアジュバント等へ応用する上で多くの利点を有するだけでなく、抗腫瘍薬や抗アレルギー薬など、様々な用途への利用が可能である。したがって、CpG-DNA による細胞活性化を増強する物質の発見や、その調節メカニズムの解明が応用上きわめて重要である。

CpG-DNA は細胞内のエンドソームに局在する TLR9 に認識されるため、CpG-DNA の細胞内への取り込みが細胞応答の律速段階となる。そこで、Kn2-7 が CpG-DNA 刺激応答を増強するメカニズムを調べるために、蛍光標識 CpG-DNA の細胞内への取り込みを解析した。その結果、Kn2-7 が DNA の細胞内への取り込みを促進することで CpG-DNA 刺激応答を増強することがわかった。一方、別の α -ヘリックス型抗菌ペプチド L5 (KLKLLLLLKLK) は CpG-DNA 刺激応答を増強しないが、DNA の細胞内への取り込みを Kn2-7 と同程度増加させた [S. Nishihara *et al.*, *BPB Rep.*, 2021]。このことから、ペプチドによる CpG-DNA 刺激応答の増強には、DNA の細胞内への取り込み促進が関与するが、それだけでは不十分であり、ペプチドがさらに何らかの作用を果たす必要があると考えられた (図 1)。これらの知見を踏まえて本研究は、CpG-DNA 刺激応答を増強するために必要な、ペプチドの「未知の作用」を明らかにすることを目的とし、その作用に関わる「ペプチドの性質」に焦点をあてて詳細に解析を行った。

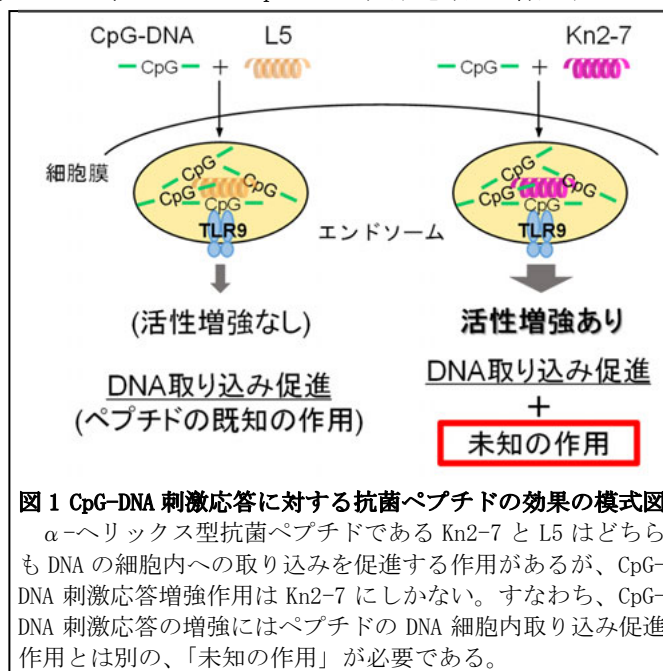


図 1 CpG-DNA 刺激応答に対する抗菌ペプチドの効果の模式図
 α -ヘリックス型抗菌ペプチドである Kn2-7 と L5 はどちらも DNA の細胞内への取り込みを促進する作用があるが、CpG-DNA 刺激応答増強作用は Kn2-7 にしかない。すなわち、CpG-DNA 刺激応答の増強にはペプチドの DNA 細胞内取り込み促進作用とは別の、「未知の作用」が必要である。

3. 研究の結果

申請者のこれまでの研究結果より、 α -ヘリックス型抗菌ペプチド Kn2-7 は CpG-DNA 刺激応答を顕著に増強するが、L5 はほとんど増強しないことがわかっていいる。 α -ヘリックスペプチドの特性を予測するためにペプチドの helical wheel を作成したところ、Kn2-7 はヘリックスの一方の面に親水性残基が多く存在して、その反対の面に疎水性残基が多く存在するため両親媒性が高いが、L5 は両親媒性が低い (図 2)。このことから、 α -ヘリックスペプチドの両親媒性が、CpG-DNA 刺激応答の増強にとって重要な性質である可能性が考えられる。そこで、Kn2-7 および L5 のアミノ酸組成は変化させずに一部のアミノ酸を入れ替えて、それぞれの両親媒性を変化させたペプチドを作成して、それらのペプチドの CpG-DNA 刺激応答増強作用を調べた。その結果、Kn2-7 の両親媒性を低下させた改変ペプチドはいずれも、CpG-DNA 刺激応答を増強しなかった。一方、L5 の両親媒性を上昇させた改変ペプチドのうち、高い両親媒性をもつものは CpG-DNA 刺激応答を増強した。さらに、改変ペプチドの配列を逆向きにすることで、両親媒性を変化させずに配列を変えたペプチドを作成して、CpG-DNA 刺激応答増強効果を調べた。すると、両親媒性が高い改変ペプチドの配列を逆向きにしたペプチドはいずれも、元の配列のペプチドと同様に CpG-DNA 刺激応答を増強した。これらの結果より、 α -ヘリックスペプチドの高い両親媒性が、CpG-DNA 刺激応答の増強に必須の性質であることが明らかとなった。

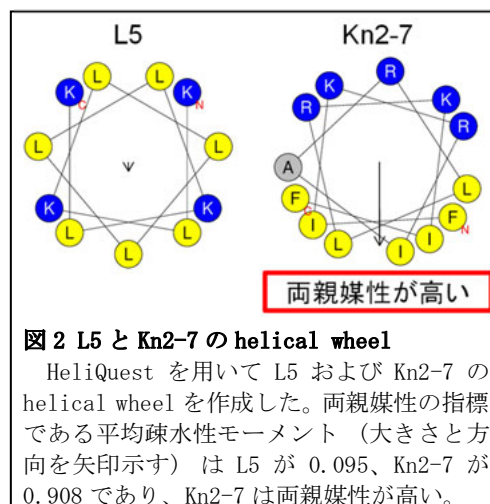


図 2 L5 と Kn2-7 の helical wheel
 HeliQuest を用いて L5 および Kn2-7 の helical wheel を作成した。両親媒性の指標である平均疎水性モーメント (大きさと方向を矢印示す) は L5 が 0.095、Kn2-7 が 0.908 であり、Kn2-7 は両親媒性が高い。

本研究成果は、以下の学術雑誌に公表した。

S. Nishihara, N. Nakamura, and K. Kawasaki. High amphipathicity of α -helical peptides enhances unmethylated CpG DNA-induced activation of mouse macrophage-like RAW264.7 cells. *Scientific Reports*, 14: 16274 (2024)

4. 研究者としてのこれからの展望

私は、6年制薬学部を卒業して薬剤師免許を取得しましたが、薬剤師にはならず博士課程（4年制）に進学し、博士（薬学）の学位を取得して研究者の道へと進みました。そして、現在は教員として6年制薬学部にも所属し、学生たちと一緒に研究に励んでいます。一方で、6年制薬学部を卒業した学生の大半が薬剤師となり、博士課程への進学者が非常に少ないことが課題であります。その大きな要因の1つとして、将来のキャリア形成に対する不安が挙げられると私は考えています。薬学部が6年制となってからまだ20年目と歴史が浅く、薬剤師免許をもつ研究者（もしくは博士号をもつ薬剤師）が活躍する姿を身近に知る機会が少ないことが、博士課程進学への大きなハードルになっていると感じます。したがって、私自身が1つのロールモデルとなれるよう、薬剤師免許をもつ研究者として医療に貢献し得る基礎研究に真摯に取り組み、その成果を社会に還元していく所存です。また、そうした姿勢を通じて、薬学部卒業後の進路の1つに博士課程進学という選択肢があることを、後進の学生たちに自信をもって示せる存在になりたいと考えています。これからも研究と教育の両面から新たな道を切り拓き、未来の薬学を支える人材の育成を通じて、薬学・医療の発展に貢献できるよう努めてまいります。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、本研究課題に対して若手研究者奨励金を賜り、支援者の皆さまには心より感謝申し上げます。本研究により、 α -ヘリックスペプチドの高い両親媒性が、CpG-DNA 刺激応答の増強に必須の性質であることを明らかにすることができました。CpG-DNA は、ワクチンの免疫原性を強めるアジュバントや抗腫瘍薬などとして利用されていることから、本研究は医療の発展に資するものと確信しております。また、本研究成果を日本エンドトキシン・自然免疫研究会にて発表し、大変光栄なことに優秀賞を受賞することができました（写真）。本奨励金に採択していただいた際と同様に、受賞した時は自身の研究が認められたように感じ、非常に大きな励みとなりました。今後とも研究に邁進して本研究を発展させ、より多くの研究成果を学術論文や学会等で発表することで広く世界に発信する所存です。そして、これらの研究活動を通じて社会に貢献できるよう精進してまいります。

