

## 「博士論文」 合否査定資料

申請者 同志社女子大学大学院 薬学研究科医療薬学専攻  
職・氏名 安藤 美菜子

---

学位の名称 博士（薬学）

---

論文名 医薬資源としての昆虫由来抗菌ペプチドに関する研究

---

審査委員 主 査 漆谷 徹郎

---

副 査 山本 康友

---




副 査 川崎 清史

---

審査結果 合格




# 博士学位論文審査結果報告書

2019年 2月 12日

学位申請者	安藤美菜子	
審査委員	主査	漆谷徹郎 
	副査	山本康友 
	副査	川崎清史 
<p>本学大学院薬学研究科医療薬学専攻在学中の安藤美菜子氏から必要書類を添えて論文「医薬資源としての昆虫由来抗菌ペプチドに関する研究」が提出された。提出を受けて本研究科では1月17日に公開で博士論文発表会を開催した。そして同日開催した研究科委員会で主査として漆谷徹郎教授、副査として山本康友准教授と川崎清史教授の3名の審査委員を選出した。漆谷教授と山本准教授は研究分野の専門性から、川崎教授は安藤氏の指導教授としての選出である。各委員は発表会での議論を踏まえて論文を査読し、申請者に試問を行った。論文では、イエバエ幼虫の抗菌ペプチド遺伝子群の体表傷付け刺激による発現誘導の解析結果から、組織ごとに誘導される遺伝子の組み合わせが異なることを見出し、この組み合わせが重要であることを指摘した。さらに、ゲノムの抗菌ペプチド配列を基に抗菌活性を有するペプチドを得て、ゲノム配列が医薬資源になりうることを示した。確かな実験結果に基づいて独創的かつ新規な結論が導き出されていた。審査過程を通じて審査委員は申請者の研究科での研究活動がディプロマポリシー（学位授与の方針）の各基準を満たしていること、そして提出論文の水準が研究科で定めた「学位論文審査基準」の評価項目を十分に満たすものであることを確認した。</p> <p>従って、審査委員は全員一致して安藤美菜子氏に対して博士（薬学）の学位を授与することが相応しいと判断した。</p>		

# 博士学位論文審査結果要旨

2019年 2月 12日

学位申請者	安藤美菜子	
審査委員	主査	漆谷徹郎 
	副査	山本康友 
	副査	川崎清史 
論文題名	医薬資源としての昆虫由来抗菌ペプチドに関する研究	
(要旨)	<p>本論文はまず第1章「背景・目的」で研究全体の背景と先行研究の状況を踏まえて本研究で明らかにするべき課題を明確に述べている。新規感染症治療薬開発の社会的必要性、抗菌ペプチドの可能性、昆虫特にイエバエを創薬資源とした理由、そして本研究の到達目標がはっきりと記述されていた。これらの記述から本論文の学術的及び社会的重要性を十分に理解できた。第2章「実験材料と方法」では本研究で用いられた試薬や実験条件等が詳細かつ適切に記述されていた。実験材料の記述に加えて、イエバエゲノム配列から抗菌ペプチド遺伝子であると予測された遺伝子群の分析結果についてもこの章でまとめて記述されていた。その分析結果は明解かつ適切、そして簡潔に記載されていた。そして以降の「結果」ではこれらの遺伝子を利用した実験結果がまとめられている。その第3章「結果」ではまず、典型的抗菌ペプチド遺伝子の傷付け刺激に対する発現誘導を解析したところそのすべてが幼虫で発現誘導されること、その誘導は蛹でも見られることが述べられており、これらの遺伝子が感染刺激誘導性の遺伝子をコードしておりおそらく抗菌ペプチドをコードすることが確かめられた。次に組織別の抗菌ペプチ</p>	

ド遺伝子の発現解析結果が述べられている。組織の採取はマーカー遺伝子の発現パターンの結果から適切に行えていると判断できた。次に各抗菌ペプチドの発現パターンが調べられ、その結果がまとめられている。傷刺激により発現する遺伝子は組織ごとに異なっており、遺伝子発現が組織ごとに異なる複雑な過程から成り立つことが示唆された。ここまでの遺伝子発現の解析方法やその解釈は適切であると判断された。さらに抗菌ペプチド遺伝子の配列を基にペプチドを合成したところ、その一つに抗菌活性が認められた。このことから医薬資源としての抗菌ペプチド遺伝子の配列の重要性も示唆された。

第4章「考察」では実験結果を踏まえて、組織ごとに発現する遺伝子が異なる意義として感染に対する抗菌スペクトルを広げることが考えられ、この抗菌ペプチドの組み合わせが抗菌ペプチドを応用するうえで重要であることが考察された。この考察は適切かつ独創的なものであり、今後の発展が期待された。次の「謝辞」に続く「参考文献」では多数の論文が引用されていたが、その引用も適切であると判断された。「図表」は大変にわかりやすく適切なものであった。ここまでの内容から本研究論文が学術的に新規性を有しかつ独創性の高いものであることが十分に理解できた。また、本論文は申請者が筆頭著者として執筆した原著論文“Tissue-dependent induction of antimicrobial peptide genes after body wall injury in house fly (*Musca domestica*) larvae; *Drug Discoveries and Therapeutics* (2018) Vol.12, 355-362”をもとに作成されたものであることを確認した。

以上の審査結果から、審査委員は全員一致で、本論文が博士論文の水準に十分達していると結論した。

# 博士学位論文要旨

2019年 1月 7日

学位申請名 安藤 美菜子

論文題目：医薬資源としての昆虫由来抗菌ペプチドに関する研究

## 【背景・目的】

近年、感染症治療のための抗菌薬の繁用による多剤耐性菌の増加が社会問題となっている。そのため、新たな抗菌薬の開発が重要であり、その候補の一つとして抗菌ペプチドが注目されている。抗菌ペプチドは先天性免疫システムにおいて重要なエフェクター分子であり、細菌などによる感染から宿主を保護する役割を担う。抗菌ペプチドの作用機序は既存の抗菌薬とは異なることから、細菌の耐性化が生じにくい新たな抗菌薬となり得る可能性がある。

抗菌ペプチドはほとんどの生物種に存在しているが、昆虫もその一つである。昆虫由来抗菌ペプチドはその構造及びアミノ酸配列の特徴から4つのファミリーに分類されており(表1)、それぞれ抗菌スペクトルも異なっている。これらの抗菌ペプチドは傷害や細菌感染で誘導されることが、ショウジョウバエやセンチクバエで知られている。昆虫に傷害や細菌感染が起こると、脂肪体と呼ばれる器官で抗菌ペプチドが合成され、体液中に分泌される。また脂肪体だけでなく、唾液腺や消化管などでも抗菌ペプチドは発現している。

表1 昆虫由来抗菌ペプチドの分類

ファミリー	抗菌ペプチド
高システイン含有ファミリー	ディフェンシン、ザーベシンB
高グリシン含有ファミリー	アタシン、ディプテリシン、ザルコトキシニンII
$\alpha$ -ヘリックスファミリー	ザルコトキシニンI-B、セクロピン
高プロリン含有ファミリー	ドロソシン

この昆虫由来抗菌ペプチドは、単体でも新たな抗菌薬の候補になる可能性があるが、単体よりも混合物にして用いる方が、細菌の耐性化が生じにくいと予想され、実際にそのような例も報告されている。従って、抗菌ペプチドを臨床で用いる場合にも、単体よりも混合物にする方が、有用性が上がると考えられる。しかし、抗菌ペプチドを混合物にする際には、配合をどうすればよいかなど不明な点が多い。上述した通り、昆虫は様々な組織で抗菌ペプチドを発現させることで、自身を細菌感染から保護していると思われる。そこで、これらの組織での抗菌ペプチドの発現を、抗菌ペプチドの混合物を配合する際の参考にすればよいのではないかと考えた。そうすることで、昆虫由来抗菌ペプチドの有用性が更に広がる可能性がある。しかし、そもそも昆虫の組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現は、各組織で同じパターンなのか、それともまったく異なるのかは分かっていない。これについて調べるために、私はイエバエに注目した。イエバエは汚染環境に生息し、病原体を媒介する衛生害虫として

知られている。イエバエがこのような環境下で生育できるのは、抗菌ペプチドなどの免疫システムが十分機能しているためと考えられる。ゲノム解析により、イエバエにはセンチクバエで見られる抗菌ペプチドと相同な遺伝子が数多く見ついている。それだけでなく、イエバエはショウジョウバエやセンチクバエよりも、ゲノムにコードされている抗菌ペプチド遺伝子の数が多く、細菌感染によってそれらの遺伝子の発現が誘導されることも報告されている。このことから私は、イエバエにこれだけ多くの抗菌ペプチドが存在しているのは、様々な組織で抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されているからではないかと考えた。従って、イエバエは各組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンを調べるのに適している可能性がある。そこでイエバエ幼虫を用い、傷刺激によって抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されるのかを解析した。またその際、どのような組織で抗菌ペプチド遺伝子は発現誘導されるのか、発現パターンは同じなのかそうでないのかを比較し、昆虫における抗菌ペプチド遺伝子がどのように発現制御されているのかを調べることにした。

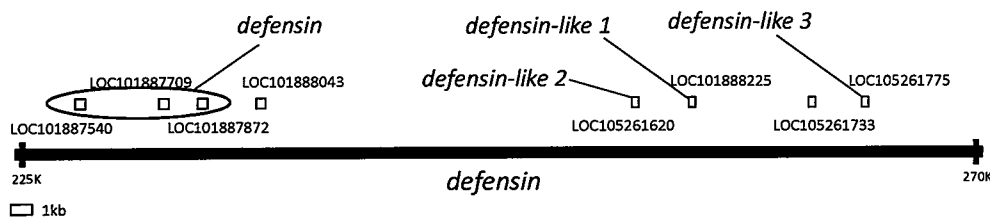
## 【結果】

抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導を解析するにあたり、どのような条件で行うのかが問題であった。これまで行われてきた細菌感染による抗菌ペプチド遺伝子の発現解析では、特定の細菌を一種類だけ昆虫に注入する方法がとられている。特定の細菌を感染させた場合、特定の抗菌ペプチド遺伝子しか発現誘導されない可能性があった。組織での発現パターンを調べるためには、できるだけ多くの種類の抗菌ペプチド遺伝子が発現誘導される方法が適していると思われる。例えば自然界では、昆虫の体に傷が生じると、その傷口から環境中の様々な細菌が侵入することで、感染が成立することが多い。これに近い条件として、イエバエ幼虫の体を注射針で刺激後に、非無菌状態で飼育する方法がある。この方法なら、幼虫の体に生じた傷口から環境中の様々な細菌が侵入する可能性があった。そこで私は、この方法でイエバエ幼虫の各組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンを調べることにした。

まず傷刺激によって、抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られるかを、幼虫の体全体で調べた。幼虫は傷刺激をしてから 30 °C で一晩飼育後、幼虫の体全体を回収して RNA を抽出し、リアルタイム PCR で抗菌ペプチド遺伝子の発現を解析した。昆虫で主に発現が見られている抗菌ペプチド *defensin*、*attacin*、*diptericin* 及び *sarcotoxin II* について解析したところ、イエバエ幼虫でこれらの遺伝子の発現が誘導された。従って、イエバエでも傷刺激によって抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られた。各組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現解析をするのに、これら 4 つの抗菌ペプチドでは全てのファミリーを網羅していないと考え、 $\alpha$ -ヘリックスファミリーに属している *sarcotoxin I-B* についても解析することにした。また、イエバエはゲノム上にコードされている抗菌ペプチド遺伝子の数が多く、同じタイプの抗菌ペプチドをコードする遺伝子も多い。例えば、図 1 に示すように、イエバエの *defensin* のゲ

ノム上には複数の遺伝子がコードされている。

図1 イエバエのディフェンシゲノム上の遺伝子群



しかし、これらの遺伝子は予測されたものである。そこで、ショウジョウバエで既に同定されているディフェンシンのアミノ酸配列とアライメント比較することで、その類似性を確認し、図1に示すような遺伝子名をつけた。他の抗菌ペプチドについても同様の解析を行い、幼虫で調べた4つの抗菌ペプチド遺伝子に追加して、各組織での発現を解析した(表2)。

*Defensin-like 1* と *defensin-like 2* は塩基配列がよく似ており、同時に複製されるようにプライマーを設計したため、*defensin-like 1/defensin-like 2* という表記にしている。

各組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現解析の結果のまとめを表3に示す。*Defensin* 及び *defensin-like*

表2 組織別発現解析を行った抗菌ペプチド遺伝子一覧

ファミリー	抗菌ペプチド遺伝子名
高システイン含有ファミリー	<i>defensin</i> <i>defensin-like 1/defensin-like 2</i> <i>defensin-like 3</i>
高グリシン含有ファミリー	<i>attacin</i> 、 <i>attacin-like</i> <i>diptericin</i> 、 <i>LOC101888779</i> <i>sarcotoxin II</i>
α-ヘリックスファミリー	<i>sarcotoxin I-B</i>

*1/defensin-like 2* は傷なしの血球でもある程度発現していた。他の論文で *diptericin* であると予測されている *LOC101888779* は脂肪体及び血球で発現が見られたが、傷なしと傷ありで差がなかった。従って、この遺伝子は傷刺激誘導性の抗菌ペプチドでないことが示唆された。以上の結果より、主に傷刺激誘導性の抗菌ペプチド遺伝子の発現が見られたのは唾液腺、脂肪体及び血球であることが分かった。しかしその発現パターンや発現の程度は、組織によってまったく異なることから、これらの抗菌ペプチド遺伝子の発現は複雑な制御を受けていることが示唆された。

表3 各組織での抗菌ペプチド遺伝子の発現結果

	唾液腺	消化管	脂肪体	血球
<i>defensin</i>	誘導性?	なし	誘導性	誘導性
<i>defensin-like 1/defensin-like 2</i>	なし	なし	なし	誘導性
<i>defensin-like 3</i>	なし	なし	なし	誘導性
<i>attacin</i>	誘導性?	なし	誘導性	誘導性
<i>attacin-like</i>	なし	なし	なし	誘導性
<i>diptericin</i>	なし	なし	誘導性	誘導性
<i>LOC101888779</i>	なし	なし	恒常的?	恒常的?
<i>sarcotoxin II</i>	誘導性?	なし	誘導性	なし
<i>sarcotoxin I-B</i>	誘導性	なし	誘導性	誘導性

## 【考察】

傷刺激によって、イエバエ幼虫で抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導が見られた。抗菌ペプチドは一般的に脂肪体で合成されると言われているが、今回の結果によりすべての抗菌ペプチド遺伝子が脂肪体で発現誘導されるわけではないことが分かった。むしろ、抗菌ペプチド遺伝子の発現が多いのは血球であった。また、*defensin-like 1/defensin-like 2*、*defensin-like 3* 及び *attacin-like* は、血球でのみ発現誘導が見られ、血球特異的な抗菌ペプチドであることが示唆された。

昆虫の免疫システムにおいて血球は、体内に侵入した細菌の貪食や包囲化に関与することが知られており、抗菌ペプチドの産生に関与しているという知見はこれまであまりされてこなかった。他の論文では、脂肪体ほどではないが血球でも抗菌ペプチドの合成及び分泌が行われていることが明らかにされている。今回血球で発現が見られた抗菌ペプチドが、血球内で合成された後に体液中に分泌されているかは分からない。しかし、他の論文との報告も併せると、昆虫の免疫システムにおいて血球は、細菌の貪食だけでなく抗菌ペプチドの産生にも関与していることが新たに示唆された。一般に昆虫の血球は全身を巡る体液中を常に循環しており、昆虫に傷害が生じた際にはその部分に集積する性質も持っている。そのため、血球は他の組織よりも細菌に遭遇する可能性が高い。傷なしの血球でもある程度 *defensin* が発現していたこと、更に様々な種類の抗菌ペプチドの発現が見られたことは、侵入してきた細菌を直ぐに除去できるようにするためであることが考えられた。




一方、今回の実験では消化管での抗菌ペプチド遺伝子の発現は見られなかった。このような結果になった理由として、イエバエ幼虫の消化管に存在する腸内細菌が関与している可能性がある。腸内細菌は、幼虫の成長や免疫システムにおいて重要な役割を果たしている。今回のような傷刺激で消化管に侵入する細菌は、細菌を直接注入した時よりも少量であったと思われる。そのような場合には、免疫を担う腸内細菌が、侵入してきた細菌を排除した可能性がある。それにより、消化管での抗菌ペプチドの発現に関わるシグナル経路が活性化されず、今回のような結果になったと考えられる。

今回の実験により、イエバエ幼虫の傷刺激による抗菌ペプチド遺伝子の発現パターン及び発現の程度は各組織でまったく異なっていることが分かり、複雑な発現制御を受けていることが示唆された。そしてこの結果は、合成抗菌ペプチドの混合物を配合する際の参考にできると考えられる。従って本研究により、昆虫由来抗菌ペプチドはそれ自身が抗菌薬になるだけでなく、その発現についても調べることで抗菌薬の開発に貢献できることを明らかにすることができた。



# 試問結果の要旨

2019年 2月 12日

学位申請者	安藤美菜子	
審査委員	主査	漆谷徹郎 
	副査	山本康友 
	副査	川崎清史 

## (要旨)

公開で行われた博士論文発表会、および審査委員（主査・副査）による面談において、申請者に対して試問が行われた。その結果、申請者の研究論文の新規性、独自性、そして薬学上の価値を確認できた。さらに薬学上の見識を備えた人物であることが確認でき、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしい人物であると判断できた。以下に試問のやりとりをまとめる。

質問1「抗菌ペプチドは全長を使うべき。そのアプローチは考えていないのか。例えば大腸菌やバキュロウイルス発現システムの利用などは考えられないか」回答1「全長の抗菌ペプチドで活性を調べることは当然である。しかし、医薬資源への応用を考えた時、抗菌ペプチド全長を利用すると毒性が生じやすくなるなどの問題や、分解抵抗性を持たせるための抗菌ペプチドへの修飾がしにくくなるなどの問題が出てくる。現時点では全長ではなく部分配列を用いるのが適していると判断した。」

質問2「ディフェンシンには切断部位があつて成熟ペプチドになるようだが、そうしないと抗菌活性は見られないのか？他の抗菌ペプチドもそうなのか？」回答2「成熟ペプチドの状態にならないと活性を示さないかどうかは分からない。defensin、defensin-like 1、defensin-like 2 及び defensin-like 3 の配列にはそれぞれ分泌シグナルペプチドがあり、細菌感染時や傷害時には成熟型が体液中に分泌されると考えている。」

質問3「抗菌ペプチドは静電相互作用で作用するのならウイルスには効かないのではないか？」回答3「『負に荷電した細菌細胞膜に、正に荷電した抗菌ペプチドが結合し、細菌細胞膜に孔を空けることで抗菌活性を示す』という機序は抗菌ペプチドの一般的な作用機序である。しかしこれ以外の作用機序、例えば細菌の外膜構成成分の合成阻害作用やタンパク合成阻害作用を示す抗菌ペプチドもある。そして cathelicidin (LL-37) という抗菌ペプチドは、ウイルスのエンベロープタンパクに作用して抗菌活性を示すことが報告されている。」

質問4「今回の合成部分ペプチドの作用機序はどのようなものか？」回答4「正確なことは分からないが、塩基性アミノ酸を多く含む部分ペプチドであることから、静電相互作用で細菌の細胞膜に結合し抗菌活性を示したのではないかと考えている。」

**質問5**「抗菌ペプチドを実際に臨床使用する際は毒性などの問題を解決する必要があると思うが、その点はどう考えているか？」**回答5**「毒性に関しては抗菌ペプチドを修飾したり、長さを短くしたりするなどの工夫が、分解性についてはD体のアミノ酸で合成するなどの工夫が必要であると考えている。また、現在臨床開発されている抗菌ペプチドは局所投与のものが多いので、そこに関しても今後の課題であると考えている。」

**質問6**「部分ペプチドを作成したロジックは何か。抗菌活性が知られる領域と類似領域を用いると既知の知見以上のことは得られないのではないか」**回答6**「ザーペシンBで抗菌活性があった領域7R-17Kを参考にした。イエバエのディフェンシンのアミノ酸配列とアライメント比較して、7R-17Kに相当する部分を選び、合成部分ペプチドを作製した。その際、7R-17Kの両端が塩基性アミノ酸であること、ある程度の長さがないと細菌の細胞膜を貫通できないことなどを考慮した。また、抗菌活性に関与すると思われる $\alpha$ -ヘリックス構造を取るかもwebベースのプログラムで確認した。イエバエのディフェンシンでも抗菌活性を示す部分配列があれば、これはディフェンシンに共通の性質であることが新たに分かったと考えている。また、今後の調べ方次第では7R-17Kよりも強い抗菌活性を示す部分配列が見つかる可能性もある。」

**質問7**「抗菌ペプチドには陽電荷が存在するようだが、汎用されている消毒薬と作用機序は類似しているのか。また、昆虫の体液のpHはどの程度か」**回答7**「合成部分ペプチドには塩基性アミノ酸が多く存在しているので、静電相互作用で細菌の細胞膜に結合して抗菌作用を示したと考えられる。よって消毒薬と類似した作用機序であると思う。また、昆虫体液のpHは微酸性、pH 6.0-7.5と昆虫の種類によって幅がある。抗菌ペプチドは塩基性アミノ酸を多く含んでいるため、酸性条件下では正に荷電する。従って、昆虫の体液もやや酸性の状態になっている方が、分泌された抗菌ペプチドが正に荷電し、抗菌活性を示しやすいと考えられる。」

**質問8**「ディフェンシンはゲノム上に複数遺伝子群が存在しているが、これらの遺伝子の発現は異なっているのか？」**回答8**「恐らく発現制御は異なっていると考えられる。論文で*defensin*とした3つの遺伝子(LOC101887540、LOC101887872及びLOC101887709)、*defensin-like 1*及び*defensin-like 2*とした遺伝子(LOC101888225及びLOC105261620)、そして*defensin-like 3*とした遺伝子(LOC105261775)はイエバエゲノム上で存在している位置が異なっているため、これらは異なる発現制御を受けていると予想している。」

**質問9**「この発表で新しいことは何か」**回答9**「組織ごとで抗菌ペプチドの発現パターンが全くことなることを見出したことである。例えば、同じ*defensin*でもタイプによって全く異なる発現パターンを示した。そのうち、*defensin-like 1/defensin-like 2*及び*defensin-like 3*は、抗菌ペプチドの主な合成器官である脂肪体ではなく、血球でのみ発現が見られたことから、今まで報告されてきたような*defensin*とは異なる性質を持っていることが示唆された。そのうち、*defensin-like 3*由来の合成部分ペプチドで抗菌活性が見られたことから、この抗菌ペプチドが医薬資源として有用であることが考えらえる。これはゲノムにコードされている遺伝子が多いイエバエだからこそ明らかになった結果であると考えている。」