



Title	Mechanistic and Structural Basis of Bioengineered Cathelicidin Peptides with Enhanced Therapeutic Efficacy
Author(s)	Sahoo, Bikash
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59529
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/resource/thesis/#closed"〉大阪大学の博士論文について〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (BIKASH RANJAN SAHOO)

Title

Mechanistic and Structural Basis of Bioengineered Cathelicidin Peptides with Enhanced Therapeutic Efficacy (薬剤への応用を指向した抗菌ペプチド、カセリシジンの構造と作用機序に関する研究)

Abstract of Thesis

With an alarming rise of cancer deaths and multi-drug resistant pathogens, the small cationic cell-penetrating peptides are emerging as a key area of research for their multidimensional therapeutic applications. In this report, the optimizations of two bovine cathelicidins (BMAP27 and BMAP28) with enhanced therapeutic activity were described using a combinatorial *in silico*, *in vitro* and *in vivo* techniques. The major objectives are: (i) establishment of structural model to unravel the mechanism of selective cell cytotoxicity by BMAP27 and BMAP28; (ii) Optimization of their cytotoxicity through novel peptide screening methods; (iii) Cost-effective short BMAP28 analogue design with enhanced antimicrobial/anticancer potency; and (iv) *in vitro* and animal model evidence for antibiotic/anticancer drug development. The bovine cathelicidins mediated membrane biophysics was probed in cell-membrane systems that mimics simple anionic (DOPS)/zwitterionic (POPC), *E. coli* like, and complex eukaryotic thymocytes-like (TLM)/leukemia-like (LLM) membrane systems. Circular dichroism and NMR spectroscopy studies revealed the helical peptide conformation of bovine cathelicidins. Molecular dynamics (MD) simulations on multi- μ s scale using all-atom and coarse-grained (CG) methods depicted membrane dependent peptide folding and interaction. A well-defined helix conformation was obtained only in membranes having anionic lipids on the exofacial leaflet; whereas structural loss revealed in zwitterionic systems. CG-MD presented stable peptide self-assemblies in zwitterionic/TLM, and monomeric interaction with bacterial/LLM systems. A peptide tilt ($\sim 35-45^\circ$) and central helix kink were found to be crucial for the peptide attachment, orientation and penetration in bacterial/LLM membranes. Tryptophan fluorescence analysis depicted polar and non-polar peptide orientation in anionic/bacterial/LLM and TLM /DPPC, systems, respectively. The binding kinetics using isothermal titration calorimetry estimated an exothermic (in DPPC) and endothermic (anionic) reactions with estimated apparent binding affinity $^{app}\Delta G_{bind}$ of -8.25 , -6.78 and -6.54 , and -5.88 kcal mol $^{-1}$ in DOPS, leukemia, *E. coli* and DPPC liposomes, respectively. On the basis of these studies, we designed peptide derivatives from BAMP28 and screened using potential of mean force approach. Antimicrobial assay of BMAP28 and its analogues with leucine-zipper/kink residue mutation (Syn1/Syn2) and N-terminal truncation (Syn3) against bacteria, malaria parasites and tumor cells showed optimized therapeutic activity. Minimum inhibitory concentrations were 1-2 and 30 μ M against bacteria (except *E. coli* DH5 α) and malaria parasites, respectively. In contrast, Syn2 and Syn3 presented the loss of activity. Electron microscopy, flow cytometry and luciferase synthesis analysis revealed a bimodal (membrane disruption and protein synthesis inhibition) mechanism of action. The BAMP28, its C-terminal truncated analogue and Syn1 exhibited potential anticancer activity against T/B-cell lymphoma, melanoma and osteoclasts at 2-10 μ M concentration. While at this concentration BMAP28 showed significant hemolysis and cytotoxicity to healthy bone marrow cells, Syn1 possesses a negligible toxic activity. The *in vivo* mouse model study further established the potential therapeutic activity of Syn1 against skin cancer. These findings reported the potential therapeutic application of optimized BMAP28 analogues for the treatment of multiple diseases.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Bikash Ranjan Sahoo)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 藤 原 敏 道
	副 査	教 授 奥 村 光 隆
	副 査	教 授 中 野 元 裕

論文審査の結果の要旨

抗菌ペプチド bovine cathelicidin に属する BMAP27 と BMPA28 について、その医療的効果の向上を目指して、物理化学的な基礎研究と、その検証のために細胞系での実験を行った。

このペプチドが作用するリン脂質二重膜としては、細胞種依存性を調べるために、DOPS からなる負電荷を持つ膜、POPC からなる中性膜、複数の脂質を含む大腸菌モデル膜、胸腺細胞モデル膜、白血病細胞モデル膜を対象にした。全原子および粗視化分子動力学計算では、これら異なる脂質組成を持つ二重膜と、特にその界面領域で相互作用して形成されるペプチドのヘリックス構造および集合体形成、膜への部分貫通を明らかにした。粗視化モデルではサブミリ秒の長時間シミュレーションを実施できた。膜透過性を調べるためには、二重膜深さ方向の座標の関数としてペプチドとリン脂質二重膜の結合自由エネルギーを求めて評価した。これら計算機シミュレーションに基づく原子分解能構造等の結果は、円偏光二色性、核磁気共鳴解析、蛍光解析、動的光散乱、等温滴定熱測定等で得られる実験で裏付けられた。この解析の過程を通じて、BMPA28 の疎水的な C 端領域やヘリックスが曲がる部位、ロイシンジッパー部位について、アミノ酸を変異させた変異体を新たに複数設計した。これらペプチドは、大きな構造変化は伴わないで、細胞種つまり脂質組成に依存した生体膜との相互作用が変化することが期待された。

BMPA28 およびその派生体ペプチドについて細胞選択的な毒性を調べた。大腸菌、マラリア原虫に関して抗菌・病原性を調べ、T および B 細胞リンパ腫、メラノーマについて抗がん性を調べた。これを、骨髄や破骨細胞など正常細胞に対する毒性と比較した。作用機構の解析ではルシフェラーゼ活性、核染色細胞のフローサイトメトリーや透過電子顕微鏡細胞画像等を用いた。これらによって、新たに導入した BMPA28 派生体ペプチドの 1 つでは、正常細胞に比べて、細菌や病原体、がん細胞に対する細胞毒性を選択的に高められることがわかった。また、この細胞毒性が膜透過性に由来することが示唆された。

このように本論文は、脂質組成に依存した脂質二重膜とペプチドとの相互作用の構造化学・物性化学的解明という基礎研究に寄与するだけでなく、その研究がペプチドの医療効果最適化にも貢献することを示している。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。