

ヒト唾液ペプチドの抗菌機能を活用した ヘルスケア製品の開発

大滝 俊樹*, 高橋 信輝**, 武井 教展***,
谷口 正之****, 斎藤 英一*****

(平成 22 年 10 月 29 日受理)

A Study on Application of Human Salivary Peptides with Antimicrobial Activities to Healthcare Products

Toshiki OHTAKI*, Nobuteru TAKAHASHI**, Norinobu TAKEI***,
Masayuki TANIGUCHI**** and Eiichi SAITOH*****

Human salivary histidine-rich polypeptides, histatin 1 (38 amino acids) and histatin 3 (32 aa) are major antimicrobial peptides harboring potent fungicidal activity against *Candida albicans*. This study was undertaken to examine the activity of four short peptide fragments, histatins 5 (24 aa), 8 (12 aa), 9 (14 aa), and 11 (8 aa), derived from histatin 3 against *Porphyromonas gingivalis* (periodontal bacteria). By determining the concentration of ATP synthesized by microorganism, histatins 5, 8, 9, and 11 were found to inhibit the growth of *P. gingivalis* with 50 % inhibitory concentrations (IC₅₀s) of 33.4, >800, 9.7, and 294.1 μM, respectively. Cytoplasmic membrane depolarization of *P. gingivalis* by the peptides was elucidated using the membrane-potential-sensitive dye, diSC₃-5. All of the fragments of histatin 3 caused membrane depolarization of 10.4 - 43.9 % at 33.4 μM in a good's buffer (5 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM glucose) and of 3.5 - 25 % in physiological condition (4 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.0, 30 mM NaCl), respectively. Taken together, it can be concluded that even shorter peptide fragments derived from human histatin 3, show potent antibactericidal activity against *P. gingivalis*. Thereby, antimicrobial peptides reported here appear to be excellent candidates for oral healthcare products.

Key words: human saliva, histatin 3, short proteolytic peptides, *Porphyromonas gingivalis*, antimicrobial peptide, membrane depolarization

* 大学院生 Graduate School, Student

** 新潟大学大学院生 Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Student

*** 新潟大学博士研究員 Niigata University, Venture Business Laboratory, Postdoctoral Fellow

**** 新潟大学機能材料工学科教授 Department of Material Science and Technology, Niigata University, Professor

***** 環境科学科教授 Department of Environmental Science, Professor

1. はじめに

近年、抗生物質の乱用による多剤耐性菌の出現が医療現場で問題視されている。従って、抗生物質とは異なる機序で作用する抗菌剤の開発が待望されている。その候補として、植物、無脊椎動物、脊椎動物の生体防御ペプチド^[1]が脚光を浴びている。医療現場で用いられるペプチド性の抗生物質ポリミキシン B やグラミシジン S に比較して、生体防御ペプチドは耐性菌を生じにくく、宿主に対しては安全性が高く、抗菌スペクトルが広いという利点がある。このような研究背景を踏まえ、著者らは口内炎（口腔カンジダ症）の原因真菌（*Candida albicans*）を殺す作用のあるヒト唾液ヒスタチン^[2-3]に着眼した。経済性と工学的利用価値を考慮して、著者らは抗 *C. albicans* 作用のあるヒスタチン（親ペプチド）のプロテオリシスによって発生したペプチド断片（子供ペプチド）を合成した。本論文では、ヒスタチンの低分子ペプチド断片が歯周病菌（*Porphyromonas gingivalis* JCM 8525 株）の増殖抑制作用を発揮することを発見したので報告する。

表1. ヒスタチン(親ペプチド)とその酵素分解産物のアミノ酸配列

Histatin 1	1*	5	10	15	20	25	30	35	38
	DS	HEKRHH	GYR	RK	FHEKHHS	SHR	EF	PFYGDY	GSNYLYDN
Histatin 2									
Histatin 3	1	5	10	15	20	25	30	32	
	DS	HAKRHH	GYR	KR	KFHEKHHS	SHR	GYR	SNLYDN	
Histatin 4									
Histatin 5									
Histatin 6									
Histatin 7									
Histatin 8									
Histatin 9									
Histatin 10									
Histatin 11									
Histatin 12									

↑ タンパク質分解酵素による切断部位 * リン酸化部位

2. 材料と方法

2.1 ペプチド断片のデザインと合成

ヒスタチン 3 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSDYLYDN; 32 残基) の分解産物であるヒスタチン 5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY; 24 残基)、ヒスタチン 9 (RKFHEKHHSHRGYR; 14 残基)、ヒスタチン 8 (KFHEKHHSHRGY; 12 残基)、ヒスタチン 11 (KRHHGYKR; 8 残基) を設計して、対応する合成ペプチドを北海道システムサイエンス株式会社の受託合成サービスにより購入した。

2.2 抗菌増殖抑制作用の評価

P. gingivalis JCM 8525 株の培養は絶対嫌気性条件下、37 °Cにて実施した。通常の方法に従い、*C. albicans* を 37 °Cで培養した。BacTiter-Glo kit (Promega G8231) およびルシフェラーゼ ATP 消去試薬 (Kikkoman 60254) を活用した化学発光法によりヒスタチン 5、8、9、11 の *P. gingivalis* JCM 8525 に対する増殖阻害過程を追跡し、生菌数をマイクロプレートリーダー ARVO™ (Parkin-Elmer) により計測した。

2.3 細胞膜脱分極作用の評価

ヒスタチン 5、8、9、11 の *P. gingivalis* JCM 8525 細胞膜に対する脱分極作用の分析は蛍光色素 3,3'-ジプロピルチアカルボシアニン(diSC₃-5) [4]を用いて実施した。

3. 結果と考察

3.1 口腔内におけるヒスタチンの分子形体

表 1 にヒトの口腔内に存在するヒスタチンの親ペプチドならびに子供ペプチドのアミノ酸配列をしめす。ヒスタチン 1 とヒスタチン 3 は唾液腺 (耳下腺ならびに顎下腺)細胞内の *HIS1* 遺伝子ならびに *HIS2* 遺伝子から合成され、唾液中に含まれるプロテアーゼによって断片化される。なお、*HIS1* 遺伝子ならびに *HIS2* 遺伝子はそれぞれヒト第 4 染色体の長腕 (4q11-13) に存在する。ヒスタチン 1、ヒスタチン 3、ヒスタチン 5 は主要な分子種であり、この 3 種で唾液中に存在するヒスタチン全体の 85 - 90 % を占有し、耳下腺唾液中における存在比は 3:1:3 である。

3.2 子供ペプチドの *P. gingivalis* JCM 8525 に対する 50 % 増殖阻害濃度

抗菌活性の測定実験により求めた各子供ペプチドの *P. gingivalis* JCM 8525 に対する 50 % 増殖阻害濃度 (IC₅₀) を求めたところ、ヒスタチン 5, 8, 9, 11 の IC₅₀ はそれぞれ 33.4, > 800, 9.7, 294.1 μM であると算出された。ヒスタチン 9 の IC₅₀ は 4 種ペプチドの中で最小であることから、*P. gingivalis* JCM 8525 に対する増殖阻害活性は最強であると考えられる。ヒスタチン 9 のアミノ(N-)末端側ならびにカルボキシル(C-)末端側から塩基性アミノ酸 Arg (R) を除去したヒスタチン 8 では *P. gingivalis* JCM 8525 に対する増殖阻害活性が消失することがわかった。驚いたことに、ヒスタチン 11 は 8 残基の極めて短いペプチドであるにもかかわらず、*P. gingivalis* JCM 8525 に対する増殖阻害活性を発揮することが明らかとなった。なお、ヒスタチン 3 の子供ペプチドであるヒスタチン 5 は抗 *C. albicans* 活性^[3,5-6] を発揮することが既に知られている。

3.3 子供ペプチドの *P. gingivalis* JCM 8525 の増殖抑制作用

図 1 は子供ペプチド (ヒスタチン 5, 9, 8, 11) の *P. gingivalis* JCM 8525 増殖抑制作用を調

べた結果である。この実験結果はヒスタチン 5, 8, 9, 11 の IC₅₀ が *P. gingivalis* JCM 8525 の増殖阻害活性によく対応することをしめしている。図 1 にしめした様に、ヒスタチン 9 が *P. gingivalis* JCM 8525 の増殖を見かけ上最も強く阻害することが判明した。この実験では、ヒスタチン 8 の増殖阻害作用を確認できなかった。

3.4 グッド緩衝液におけるヒスタチン投与量と *P. gingivalis* JCM 8525 の細胞膜脱分極レベルの関係

図 2 はグッド緩衝液 (5 mM HEPES, 50 mM glucose, pH 7.2) 中におけるヒスタチン 5 と 9 の投与量と *P. gingivalis* JCM 8525 の細胞膜脱分極レベルの関係を調べた結果である。脱分極のレベルは 50 μM グラミシジンに作用させたときの *P. gingivalis* JCM 8525 細胞からの diSC₃₋₅ 放出量 (100 %) を対照として算出した。この実験により、ヒスタチンの投与量を増やすと diSC₃₋₅ の放出量が増加することが究明された。図 2 の解析データはヒスタチン 5 とヒスタチン 9 が *P. gingivalis* JCM 8525 の細胞膜に穿孔することにより細胞内に封入しておいた蛍光物質(diSC₃₋₅) を流出させたことを示唆する。

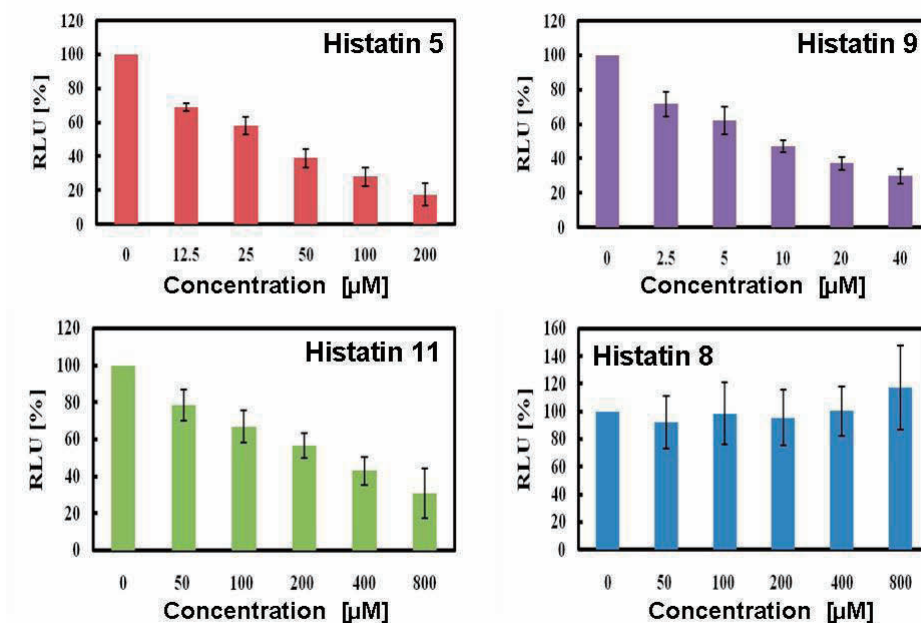


図 1. ヒスタチン断片による歯周病菌の増殖抑制作用

3.5 ヒト唾液組成模倣緩衝液における子供ペプチドの *P. gingivalis* JCM 8525 に対する細胞膜脱分極作用

人工唾液や口腔保健製品の開発に向けて、ヒスタチン子供ペプチド群がヒト唾液組成を模倣した緩衝液の中でも歯周病菌に対して細胞膜脱分極活性を発揮できるか否かを検討した。ヒト唾液を模倣した最も単純な系として、生理的リン酸緩衝液 (4 mM NaH₂PO₄/

Na₂HPO₄, 30 mM NaCl, pH 7.0) を選択した。この緩衝液はヒト唾液のイオン強度と pH を一致させたものである。

図 2 (A) と(B) にしめすように、IC₅₀ の値が小さいほど歯周病菌から放出される蛍光物質 (diSC₃-5) の量が多いことが解明された。ヒスタチン 9 の N-末端ならびに C-末端に存在していた Arg を除去したヒスタチン 8 はグッド緩衝液系ならびに唾液組成の模倣緩衝液系においても、微量の diSC₃-5 を放出させた。以上の解析結果を総括すれば、「実験に供した全てのヒスタチン断片が唾液組成の模倣系においても歯周病菌を穿孔する」と結論される。この知見は「合成ヒスタチンがヘルスケア製品の開発に有望である」ことを物語る。

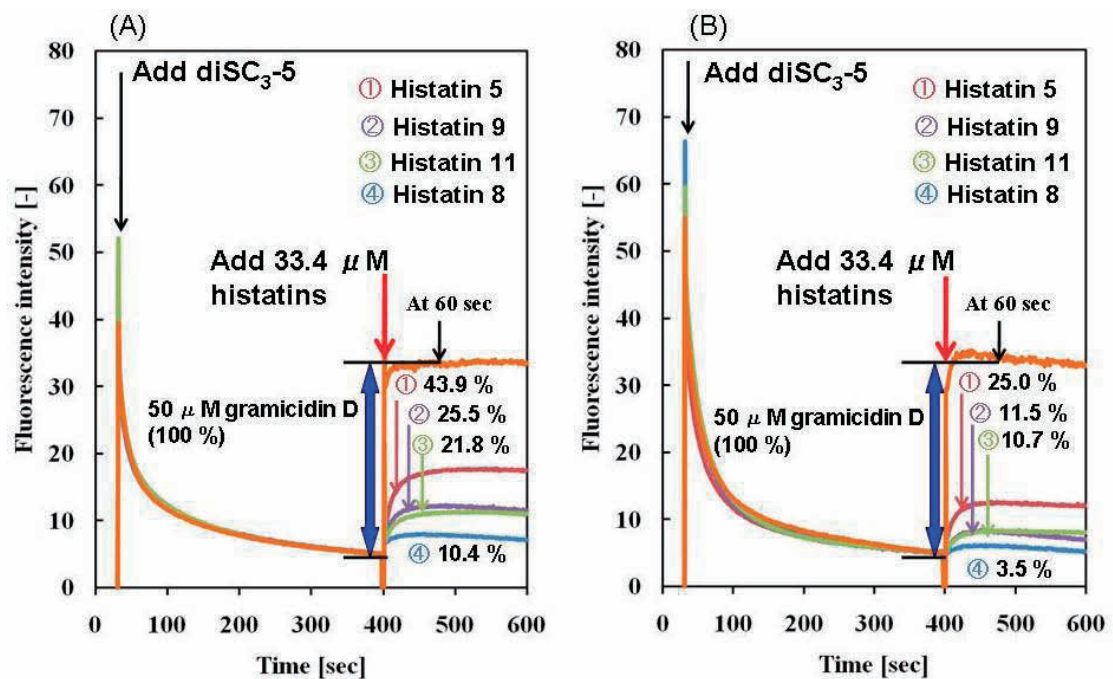


図 2. ヒスタチン 5, 9, 11, 8 の歯周病菌からの diSC₃-5 放出活性

(A) コントロール緩衝液 (5 mM HEPES, 20 mM Glucose, pH 7.2)

(B) ヒト唾液組成の模倣緩衝液 (4 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄, 30 mM NaCl, pH 7.0)

4. まとめ

ヒスタチンは細菌の細胞膜を穿孔して殺菌する。この研究を通じて、我々は過去に研究したヒト唾液高プロリンペプチド^[7] が昆虫や哺乳類の抗菌性高プロリンペプチドファミリー (バクテネシン、プロフェニン、カセリジシン、PR-39 など)^[8-9] と高度なアミノ酸配列の相同性をしめすことを発見した。高プロリンペプチドはグラム陰性菌の細胞膜を透過して細胞内代謝系を攪乱することで抗菌作用^[8-11]を発現すると提案されている。この点を配慮しながら、今後、ヒト唾液高プロリンペプチドの抗菌活性についても検討したい。

謝辞 (ACKNOWLEDGMENTS)

本研究は平成 21 年度新潟工科大学学内共同研究助成金の支援によって実施された。本報告書を新潟工科大学紀要に掲載することにより、研究助成金審査委員会に対する謝辞とする。

文献 (REFERENCES)

- [1] H.E.W. Robert, S. Hans-George: Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nature Biotechnol.* 24, 1551-1557, 2006.
- [2] F.G. Oppenheim, T. Xu, F.M. McMillan, S.M. Levitz, R.D. Diamond, G.D. Offner, R.F. Troxler: Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*, *J. Biol. Chem.* 263, 7472-7477, 1988.
- [3] P.M. Peters, J. Zhu, P.L. Fidel, Jr, M.A. Scheper, W. Hachett, S. El, Shaye, M.A. Jabra-Rizk: Protection of the oral mucosa of histatin-5 against *Candida albicans* in an ex vivo murine model of oral infection, *FEMS Yeast Res.* 10, 597-604, 2010.
- [4] W.L. Zhu, S.Y. Shin: Effects of dimerization of the cell-penetrating peptide Tat analog on antimicrobial activity and mechanism of bacterial action, *J. Pept. Sci.* 15, 345-352, 2009.
- [5] K. Kavanagh, S. Dowd: Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential, *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 285-289, 2004.
- [6] A.B. Mochon, H. Liu: The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm, *PLoS. Pathogens Pharmacol.* 4 (10), 1-12, 2008.
- [7] 斎藤英一, 伊勢村知子, 真田一男: ヒト唾液タンパク質の分子遺伝学; 歯学, 78 巻 (1 号), 2 - 20. 1990 年 6 月.
- [8] L. Otvos: The short praline-rich antibacterial peptide family, *Cell Mol. Life Sci.* 59 (7), 1138-1150, 2002.
- [9] K. Sadler, K.D. Eom, J.-L. Yang, Y. Dimitrova, J.P. Tam: Translocating praline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. *Biochemistry.* 41, 14150-14157, 2002.
- [10] M. Morell, P. Czihal, R. Hoffmann, L. Otvos, F.X. Avilis, S. Venture: Monitoring the interference of protein-protein interactions in vivo by bimolecular fluorescence complementation: DnaK case, *Proteomics* 8, 3433-3442, 2008.
- [11] K.A. Brogdeng: Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nature Rev. Microbiol.* 3, 238-3442249, 2005.