

ヒト唾液短鎖ヒスタチンの口内炎菌 (*Candida albicans* NBRC 1385 株) の細胞膜に対する作動性

大滝 俊樹*, 笠原 仁*, 武井 教展**,
谷口 正之***, 加藤 哲男****, 斎藤 英一*****

(平成24年10月31日受理)

Action of Human Salivary Short Histatins Against The Cell Membrane of *Candida Albicans* NBRC 1385

Toshiki OHTAKI*, Hitoshi KASAHARA*, Norinobu TAKEI**,
Masayuki Taniguchi***, Tetsuo KATO**** and Eiichi SAITOH*****

Human saliva contains histatins (1 and 3) and their short proteolytic fragments. To study the antifungal mechanism and action against cell membrane of *Candida albicans* NBRC 1385, we prepared synthetic histatins 5(24 amino acids), 8(12 a.a.), 9(14 a.a.) and 11(8 a.a.). By cell viability assay, half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of histatins 5, 8, 9, and 11 was elucidated, respectively, to be 136.7, 251.7, 109.6, and 267.2 μM. When 20 μM melittin was employed as the 100 % control, the percentage of membrane depolarization caused by 20 μM histatins (5, 8, 9, and 11) was determined, respectively, to be 79.9, 16.8, 58.5, and 48.4 % with the membrane potential-sensitive dye diSC₃-5. Using 200 μM melittin as the 100 % control, the percentage of calcein leakage from *C. albicans* by 200 μM of above histatins was estimated, respectively, to be 65.1, 20.2, 42.8, and 13.2 %. Taken together it may be suggested that histatins attach to the cell membrane of *C. albicans* via electrostatic interactions. On the membrane surface, the histatins may not only form the pores by placing their hydrophobic part in contact with the hydrophobic core of membrane but also lead to the collapse of the membrane. Based on the ideas, it can be proposed that the interaction between histatins and phospholipid of cell membrane mediates *C. albicans*-killing process.

Key words: Human saliva, antimicrobial peptide, proteolysis, short peptides, histatin 3, candida albicans

1. はじめに

ヒトの唾液腺 (耳下腺, 顎下腺, 舌下腺, 小唾液腺) 細胞内の遺伝子発現により生産される唾液タンパク質群^[1-3]は導管を経て電解質液と共に口腔内に分泌される。これが唾液

* 大学院生 Graduate School of Technology, Student

** 新潟大学 博士研究員 Niigata University, Post Doctral Fellow

*** 新潟大学大学院自然科学研究科 教授 Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Professor

**** 東京歯科大学化学研究室 教授 Department of Chemistry, Tokyo Dental College, Professor

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

(Saliva)である。唾液の中に含まれる無機成分や有機成分(タンパク質群)は口腔や腸管内で重要な生理機能を果たしていることが次第に明らかにされつつある。ヒトの口腔に内在する混合唾液(全唾液または汚染唾液)には300~500種の口腔細菌が共生しており、全唾液1 ml当たり約 10^{8-9} 個もの口腔細菌が生息している。口腔内に存在する唾液タンパク質の一部は口腔細菌が生産放出するプロテアーゼ(タンパク分解酵素)や唾液自体に含まれるプロテアーゼによって短鎖断片^[4]に分解されてゆく。短鎖断片ペプチドのアミノ酸配列(一次構造)は個人個人の口腔の環境や健康状態により異なる。長い間、唾液の短鎖ペプチドは単なる栄養成分として再利用されるものと思われていた。最近、我々の研究グループは口腔内のタンパク分解で誕生したヒスタチン短鎖ペプチドが歯周病菌の増殖を阻害する^[5]ことを解明した。さらに、ある種の唾液短鎖ペプチドが歯周病菌の死滅崩壊により放出される内毒素(リポ多糖; LPS)を中和する^[6]ことを明らかにした。この研究成果に基づき、我々はヒト唾液短鎖ペプチドを配合した革新的なヘルスケア製品の開発が可能ではないかと考えている。

本研究では、ヒスタチン3のタンパク分解により発生する短鎖ペプチド(ヒスタチン5, 8, 9, 11)を化学合成し、合成ペプチドの口内炎菌(*Candida albicans* NBRC 1385株)に対する増殖阻害作用と抗菌作用機序を検討したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料

図1にヒト唾液ヒスタチン3の分解断片ペプチド群(ヒスタチン5, 8, 9, 11)のアミノ酸配列をまとめておく。Merrifield法により自動合成された断片ペプチド群を北海道システムサイエンス(株)から購入した。蛍光色素 DiSC₃₋₅ (3,3-Dipropylthiadicarbocyanine iodide) と Calcein-AM (Calcein acetoxymethylester) Solution (同仁化学) は生化学グレードのものを入手した。

2.2 *C. albicans* NBRC1385 の培養

Peptone 5 g, Yeast powder 3 g, NaCl 3 g を1リットルの蒸留水に溶かし、pHを7.5に調節した。この溶液をオートクレーブ処理した後にGlucose 10 gを添加することによってYM培地を調製した。口内炎菌 *C. albicans* NBRC 1385 (真菌) をYM培地に接種して好気性条件で培養(25°C, 24h)した。

2.3 *C. albicans* NBRC1385 に対する増殖阻害活性の測定

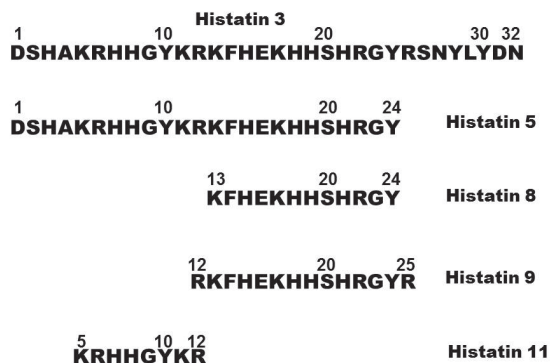


図1. ヒスタチン3と人工合成した断片ペプチドのアミノ酸配列

96 ウェルのマイクロプレートの各細胞 (*C. albicans* NBRC 1385 株) の懸濁液に, 10 μ l のルシフェール ATP 消去試薬 (Kikkoman 60254) を添加して振盪 (10 min) した. 続いて, 50 μ l の ATP 発光試薬 (BacTiter-Glo キット; Promega G82319) を各ウェルに添加した. 15 sec 混合反応させた後, マイクロプレートリーダー (Parkin Elmer-ARVOTM MX) により 560 nm の吸光度 (生菌の ATP 産生量に対応; Relative Light Units, RLU) を測定した. コントロールの RLU 値を 100 として, 合成ペプチドによる *C. albicans* NBRC 1385 の増殖阻害率を計算した. 菌増殖阻害率と合成ペプチドの投与濃度の関係をプロットして, 50 % 増殖阻害濃度 (50 % Inhibitory Concentration, IC₅₀) を算出した.

2.4 *C. albicans* NBRC 1385 細胞膜脱分極 assay

C. albicans NBRC 1385 を対数増殖期まで培養し, 遠心分離 (25 °C, 2500 \times g, 5 min) により集菌した. 次いで, この菌体を Glucose buffer (20 mM Glucose, 5 mM HEPES, pH 7.2) で 2 回洗浄した. 菌体懸濁液の濁度 (OD₆₅₀) を 0.05 に調節し, 終濃度 4 μ M となるように DiSC₃₋₅ を添加して 25 °C, 60 min 静置した. この菌体調製液 (1950 μ l) を石英セルに分注し, 50 μ l の Melittin (ミツバチの細胞膜損傷性ペプチド) またはヒスタチン 5, 8, 9, 11 (終濃度 20 μ M) を添加して菌体膜表面を刺激した. 蛍光光度計 (FP-6200, 日本分光株式会社; 励起波長, 622 nm; 蛍光波長, 670 nm) で Melittin またはヒスタチン断片群の刺激により菌体膜表面から放出された DiSC₃₋₅ の蛍光強度 (Melittin 刺激, I_{int} ; ヒスタチン断片, I_r) を 600 sec まで追跡した. 各ヒスタチン断片の菌体膜脱分極率は $(I_r)/(I_{int}) \times 100$ の式で算出した.

2.5 *C. albicans* NBRC 1385 の Calcein 漏出 assay

対数増殖期の *C. albicans* NBRC 1385 を遠心分離 (25 °C, 2500 \times g, 5 min) により集め, 10 mM Phosphate buffer (pH 7.4) で 3 回洗浄した. 菌体懸濁液の濁度 (OD₆₅₀) を 0.5 に調節し, 1 ml の懸濁液に 5 μ l の 1 mM Calcein-AM solution を添加して静置 (25 °C, 4h) した. 次いで, 10 mM Phosphate buffer (pH 7.4) で 4 回洗浄して, 菌体細胞内に取り込まれなかった Calcein-AM を除去した. このようにして調製した菌体液を 200 μ l ずつ 96 well の Black-microplate に分注して, 各 well の菌体液の中に終濃度 200 μ M の Melittin またはヒスタチン 5, 8, 9, 11 を加え, マイクロプレートリーダー (ARVOTM MX, Parkin Elmer 社; 励起波長, 485 nm; 蛍光波長, 535 nm) で菌体外に放出された Calcein の蛍光強度 (Melittin, I_{int} ; 各ヒスタチン断片, I_r) を 5 min 毎に 90 min 追跡した. 滅菌水を添加したときの蛍光強度 (I_{bkg}) をバックグラウンドとして, ヒスタチン 5, 8, 9, 11 刺激による Calcein 漏出率を $(I_r - I_{bkg})/(I_{int} - I_{bkg}) \times 100$ の式で算出した.

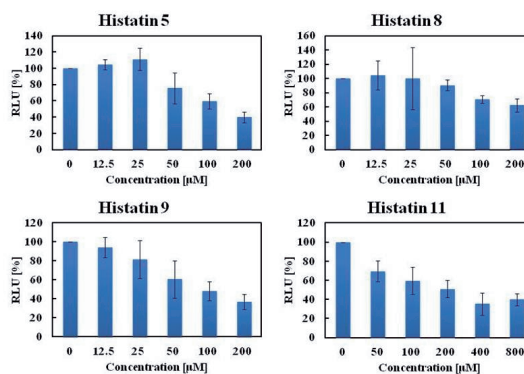


図 2. ヒスタチン 3 の断片ペプチドによる *C. albicans* NBRC 1385 の増殖阻害

3. 結果

3.1 ヒスタチン 3 の分解断片による *C. albicans* NBRC 1385 の増殖阻害

4 種の合成ヒスタチン断片の 24 h 培養における *C. albicans* NBRC 1385 に対する増殖阻害の成績を図 2 にまとめる。横軸はペプチドの濃度、縦軸は生菌数 RLU である。培養系に加えるヒスタチン 5, 8, 9 および 11 の濃度を段階的に高めるにつれて、RLU が逐次低下した。この成績は、全てのヒスタチン断片が濃度依存的に *C. albicans* NBRC 1385 の増殖を阻害することを物語る。なお、過去の解析からヒスタチン 5, 8, 9 は両親媒性のペプチドであることが判明している。

実験データは示さないが、増殖阻害率と短鎖ペプチドの投与濃度の関係をプロットすることにより、ヒスタチン 5, 8, 9 および 11 の *C. albicans* NBRC 1385 に対する IC₅₀ はそれぞれ 136.7, 251.7, 109.6, 267.2 μM であった。

3.2 ヒスタチン短鎖ペプチドによる *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜脱分極

図 3 はヒスタチン 3 の短鎖ペプチドで *C. albicans* NBRC 1385 細胞膜を刺激した場合の脱分極率の経時変化を調べた結果である。細胞膜の脱分極を誘発することにより、細胞膜に結合している蛍光物質 DiSC₃-5 が時間の経過とともにどのように放出されるかについて検討した。横軸は経過時間で、縦軸は細胞膜脱分極率を表している。20 μM Melittin で *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜を刺激し、600 sec 経過した時に放出された DiSC₃-5 の蛍光強度を 100 % 脱分極率に換算して試験ペプチドの脱分極率を見積もった。その結果、20 μM のヒスタチン 5, 8, 9, 11 の細胞膜脱分極率はそれぞれ 79.9, 16.8, 58.5 および 48.4 % で

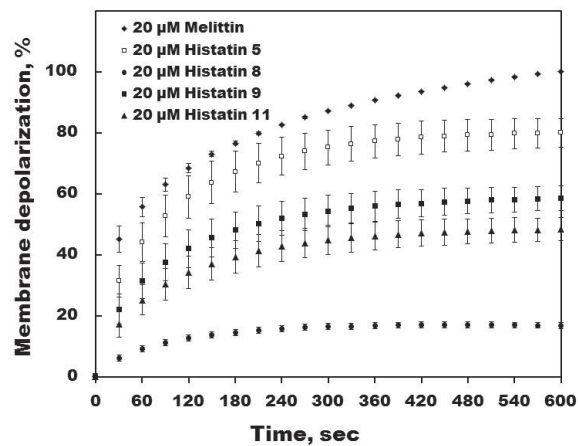


図 3. ヒスタチン 3 の断片ペプチドによる *C. albicans* NBRC1385 の細胞膜脱分極

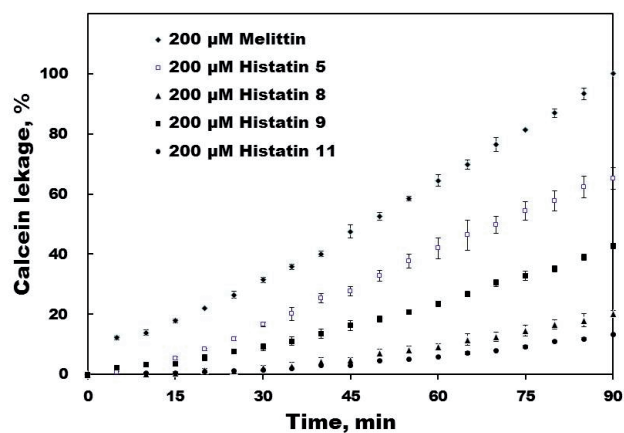


図 4. ヒスタチン 3 の断片ペプチド刺激による *C. albicans* NBRC 1385 細胞からの Calcein 漏出

あることが分かった。以上の解析データは実験に供した全てのヒスタチン短鎖ペプチドが *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜における膜電位変化を誘発することを物語る。

3.3 ヒスタチン短鎖ペプチドによる *C. albicans* NBRC 1385 の Calcein 漏出

図4はヒスタチン3の断片ペプチドで *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜を刺激したときに、菌体内に取り込まれた Calcein が細胞外に漏出する現象を解析した結果である。縦軸は Calcein 漏出率、横軸は膜刺激開始時からの時間経過を表わす。この実験では、室温において短鎖ペプチドを細胞膜に作用させ、90 min 後に菌体内から漏れ出る Calcein を測定した。200 μ M Melittin による細胞膜刺激をコントロール (漏出率100%) として、ヒスタチン短鎖ペプチドによる細胞膜刺激で誘発される Calcein 漏出の割合 (Calcein leakage) を算出した。図4に示すように、200 μ M (終濃度) のヒスタチン 5, 8, 9 および 11 で Calcein を取り込んだ *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜を刺激した場合、90 min 経過した時点における漏出率がそれぞれ 65.1, 20.2, 42.8 および 13.2 % に達した。以上の実験結果はヒスタチン短鎖ペプチド群が *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜に一旦蓄積してから細胞膜に孔を形成することを示唆する。

4. 考察

ヒスタチン3短鎖断片の *C. albicans* NBRC 1385 に対する脱分極 assay を実施した。その結果、ヒスタチン3の断片は細胞膜に脱分極を誘発することが強く示唆された。それゆえ、両親媒性かつ強塩基性のヒスタチン短鎖断片は *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜表面のリン脂質のリン酸基 (負電荷の親水性基) に静電的相互作用により引き寄せられて細胞膜表面に結合すると考えられる。実験結果は示さないが、ヒスタチン短鎖断片の *C. albicans* NBRC 1385 に対する増殖阻害活性と脱分極率の間には強い正の相関関係が認められた。ヒスタチン3に由来する短鎖断片の *C. albicans* NBRC 1385 細胞内からの Calcein 漏出を調べたところ、全てのヒスタチン断片が Calcein を漏出させることが明らかとなった。図5にヒト

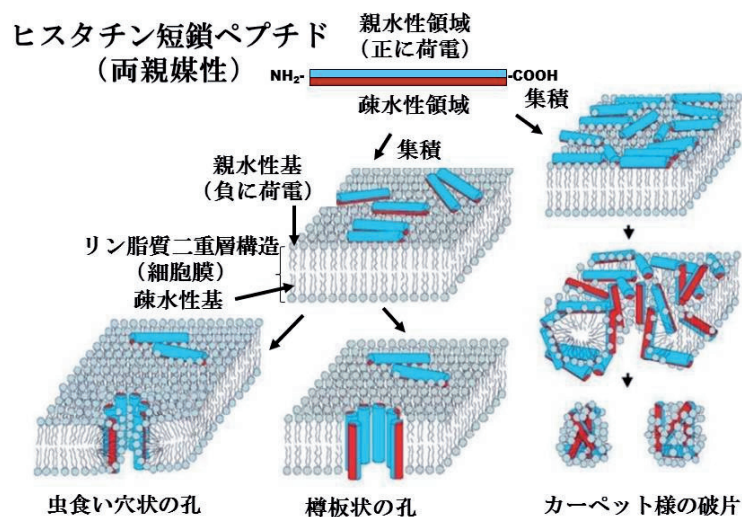


図5. 唾液ヒスタチン短鎖ペプチドによる *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜破壊モデル

唾液のヒスタチン短鎖ペプチドの *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜破壊モデルを提案する。このモデルに描いたように、ヒスタチン断片が *C. albicans* NBRC 1385 の細胞膜に孔を形成すると、細胞内容物の流出が喚起される可能性が高まる。さらに、チャンネル状の孔を通過して細胞内に流入したヒスタチン短鎖断片は、細胞内のタンパク質合成系を攪乱する可能性もある。この点については今後の研究が待たれる。

5. おわりに

ヒト唾液のヒスタチン 3 (親ポリペプチド) は口腔内に生息している細菌のプロテアーゼによって分解され、複数のヒスタチン短鎖ペプチドが生産される。親ヒスタチンの分解により生産された短鎖ペプチド群 (子供ペプチド群) は口腔内細菌を殺菌制御する役割を果たしながら唾液と共に嚥下される。その後、短鎖ペプチド群は咽喉や食道を経て消化管へと運搬される。したがって、唾液の抗菌ペプチド群は消化管内に生息する有害菌にも作用する可能性もある。以上の観点で考えれば、胃に生息している有害菌 *Helicobacter Pylori* (ピロリ菌) や腸内に生息するグラム陰性菌の内毒素 (LPS) に対する唾液ペプチドの生体防御機能を究明する必要がある。本研究の成果に基づき、我々はヒト唾液ペプチドの生理機能に学んだ革新的な口腔ケア製品、機能性化粧品、LPS 中和剤の創出をめざす。

謝辞

本研究は平成 23 年度新潟工科大学共同研究助成金の支援のもとで実施された。研究の成果を本紀要に公表することで謝意を表明する。

文献

- [1] F. Amado, M.J.C. Lobo, P. Domingues, J.A. Duarte, R. Vitorino: Salivary peptidomics ; Expert Rev. Proteomics 7(5), pp.709-721, 2010.
- [2] 斎藤英一 : “5.2 章 唾液成分の生体機能” , 咀嚼の事典, 大出吉信編, 朝倉書店 (ISBN978-4-254-30089-5 C3547), pp.83-94, 2007 年.
- [3] 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(1), 2-20, 1990.
- [4] N.L. Huq, K.J. Cross, M. Ung, H. Myroforidis, P.D. Veith, D. Chen, D. Stanton, H. He, B.R. Ward, E.C.Reynolds: A Review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics; Int. J. Pept. Res. Ther. 13(9), pp.547-564, 2001.
- [5] T. Ohtaki, N.Takahashi, N. Takei, M. Taniguchi, E. Saitoh: Antimicrobial activity of the peptide fragments from salivary histatin 3 against *Porphyromonas gingivalis*, an oral bacterium associated with periodontitis; Abst. of Pasificchem 2010: pp.195-BIOL913, 2010.
- [6] E. Saitoh, M. Taniguchi, S. Isemura, K. Ishihara, T. Kato: Human salivary proline-rich proteins revisited; J. Oral Biosci. 53(Suppl): pp.103, 2011.