

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592791

研究課題名(和文)プロタミンペプチドのバイオフィーム形成病原真菌に対する作用機作の解明と応用開発

研究課題名(英文)Antifungal activity and application of protamine peptide against fungal pathogens forming biofilms

研究代表者

長環(Cho, Tamaki)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90131870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：サケ白子に含まれるプロタミンタンパク質には抗真菌作用を示す14アミノ酸配列(VSRRRRRR GRRRRR：プロタミンペプチド)が存在する。今回の研究ではこのペプチドの殺菌作用機序を解析するとともに応用展開の基盤を構築した。細胞内への透過、ATPの細胞外流出および活性酸素の産生が菌の死滅を促したと考えられる。応用展開を前提としペプチドの環状化を行った。環状型は直鎖型に比べ塩感受性の低下、殺菌作用の強化、さらに口腔カンジダ症モデルマウスを用いたin vivo 実験において、白苔形成抑制効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Candida albicans is a commensal of the oral cavity and the gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy individuals and also a common mucosal and systemic pathogen in the setting of immunosuppression. The 14-amino acid basic, arginine-rich protamine peptide derived from salmon protamine showed antifungal activity against C. albicans. We constructed a cyclic protamine peptide that showed salt-insensitive and higher antifungal activity. To establish the basement of clinical application of protamine peptide, we performed animal experiments with using murine oral candidiasis model. Oral treatment with cyclic protamine peptide significantly protected the mice from severe oral candidiasis, whereas straight protamine peptide did not show significant efficacy. This study suggests that cyclic protamine peptide may have potentialities as a novel treatment of oral candidiasis.

研究分野：微生物学

キーワード：抗真菌薬 塩基性ペプチド プロタミンペプチド Candida albicans 口腔カンジダ症 環状化ペプチド

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢化社会の到来は、多くの人々が老化に伴う身体や生体防御機構の機能低下と直面することから、それらの質の維持に関する問題の解決策が求められる。一方 *Candida albicans* はヒトの皮膚や粘膜に常在する真菌であるが、宿主の生体防御能の低下に伴いカンジダ症を起こす日和見感染菌でもある。本菌の口腔常在率は高齢者で高く、さらに義歯の装着によりほぼ 100% になる。このことは高齢者が口腔カンジダ症のハイリスク下にあること示している。

(2) 現在日本で承認されている抗真菌薬は 8 剤と少なく、いずれも副作用や耐性菌出現の問題を抱えている。現在より安全性の高い新規抗真菌薬の開発としてペプチド研究が活発化してきている。中でもヒト唾液由来の塩基性ペプチド(ヒスタチン-5)の研究は生体成分由来として注目されているが、生体の有する分解酵素の作用を受けやすい欠点もある。

2. 研究の目的

(1) プロタミンペプチドは食用のサケ白子に含まれるプロタミンから抗菌性を示す画分を探索するなかで発見されたもので、14 アミノ酸残基 (VSRRRRRRGGRRRR) からなる。当該研究はこのプロタミンペプチドの *in vitro* における抗真菌作用スペクトルと作用機序の解析を目的とした。

(2) 応用開発をめざすためのプロタミンペプチドの構造と活性の関係を検討し、それらの *in vivo* における活性を口腔カンジダ症モデルマウスにおける白苔形成率で評価することをめざした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株、供試ペプチド、*in vitro* 実験
供試菌株：*Candida albicans* SC5314 (深在性真

菌症患者由来)、*C. glabrata* CBS138、*C. tropicalis* IFM5797、*C. krusi* IFM5462 使用。

供試ペプチド：プロタミンペプチド(直鎖型)は、シロサケ (*Oncorhynchus keta*) 白子由来のプロタミンから発見された VSRRRRRRGGRRRR を化学合成した合成ペプチドを使用。環状型は N 末端バリン残基とセリン残基を除いた直鎖型プロタミンペプチドにシステイン残基を付与し酸性条件下でジスルフィド結合させ環状化したものを使用。ヒスタチン 5: AKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY、Tat ペプチド: YGRKKRRQRIRD、N 末端 FITC ラベルプロタミンペプチドを使用。

増殖抑制活性: OD_{600} を測定し、ペプチド無添加での増殖に対して 90% の抑制を示す濃度で評価。

形態変換抑制活性: 2 時間後の 200 細胞中の菌糸形細胞の割合により算出。

C. albicans のバイオフィルムに対する抗真菌活性: YNB-glucose (Yeast Nitrogen Base-glucose) 培地を用いて 37、24 時間培養後のバイオフィルムに対する効果を、XXT 法による代謝活性で評価。

NaCl 感受性の評価: 塩濃度下 (0~200 mM) においてペプチドを作用させ、37 で 2 時間後の代謝活性を Microbial Viability Assay Kit-WST (DOJINDO) を用いて測定。

細胞外 ATP の検出: ATP assay kit (Sigma) を用いて検出。

細胞内活性酸素の検出: OH^{\cdot} 検出蛍光プローブ 3-(*p*-hydroxyphenyl) fluorescein による蛍光顕微鏡観察により検出。

(2) *in vivo* 評価

口腔カンジダ症モデルマウス: 白苔形成抑制試験は安部法で検討。

組織切片: PAS 染色による通常方法。

統計処理: 両側の Student t-test、 $P < 0.05$ で有意差。

4 . 研究成果

(1) 3 種類の塩基性ペプチドの抗真菌活性 :
in vitro の実験による 3 種類の塩基性ペプチド
の抗真菌活性の違いを図 1 にまとめた。

図 1 3 種ペプチドにおける生物活性の比較

項目	プロタミン ペプチド	Hist-5	Tat peptide
<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> の 4 菌種 に対する抗真菌 活性	4 菌種に作 用する	<i>C. glabrata</i> 以外の 3 種 に抗真菌作 用を示す	<i>C. glabrata</i> 以外の 3 種 に抗真菌作 用を示す
Azide 処理で理 解される抗真菌 活性における ATP の必要性	必要	必要	必要
ペプチド作用に よる ATP の細胞 外流出	有り	有り	有り
laminarin 処理で 理解される 1,3-グルカンに よる抗真菌活性 の低下	低下無し	低下する	低下する
バイオフィーム に対する抗真菌 活性の低下	低下無し	低下する	低下する
NaCl による抗真 菌活性の低下	低下する	低下する	低下する
殺菌作用濃度 以下での菌糸 形成抑制作用	抑制有り	抑制無し	抑制無し

プロタミンペプチドは *C. glabrata* を含めた 4
菌種に対して抗真菌活性を示し、他 2 種と比べ

プロタミンペプチドの利点が見られた。アジ化ナトリウムによる ATP 産生の抑制下における *C. albicans* の増殖は、3 種ともペプチドによる抗真菌活性に ATP が必要であることを示唆した。3 種ペプチドの殺菌作用濃度下における *C. albicans* の ATP 細胞外流出の現象は、このことが殺菌に繋がっている可能性を示唆した。*C. albicans* のバイオフィーム形成時には、菌体外 - グルカンが放出される。酵母由来 1,3 - グルカンである Laminarine の存在は、Hst-5 と Tat peptide による抗真菌活性を低下させたが、プロタミンペプチドは影響されなかった。さらにバイオフィームへの直接作用では、Hst-5 と Tat peptide の活性は低下したが、プロタミンペプチドは活性を示した。*C. albicans* によるカンジダ症では、カテーテルをはじめとする医療インプラント表面や粘膜表面でのバイオフィーム形成が大きな問題となっている。バイオフィームはその構造上、薬剤等の効果が発揮されない点が宿主にとっての脅威である。ここで示したプロタミンペプチドは 1,3 - グルカンによる抗真菌活性の低下を示さない点は、臨床応用の際の大きな利点となると思われる。NaCl により 3 種類とも活性低下が認められ、生体内でのペプチドの使用において塩類の影響を受けることが予想される。殺菌作用濃度以下の濃度では、Hst-5 と Tat peptide はもはや何も作用をおよぼさないが、プロタミンペプチドは菌糸形成を抑制した。菌糸形成の抑制はバイオフィーム形成抑制にも影響することから、プロタミンペプチドのこの作用は臨床応用において興味ある利点である。

(2) プロタミンペプチドの細胞局在 : FITC ラ
ベルしたプロタミンペプチドによる細胞局在の
観察は、殺菌作用濃度でのペプチドは細胞内へ透
過し、殺菌作用濃度以下の濃度では細胞表層に蓄
積することを示した。プロタミンペプチドの細胞
内取り込みがエンドサイトーシスによるものが

を検討するために、エンドサイトーシス阻害剤 Latrunculin C の効果を調べた。その結果、阻害剤が存在してもその殺菌効果が認められたため、エンドサイトーシスによる細胞内透過ではない可能性が考えられた。

(3) 直鎖型と環状型のプロタミンペプチドの作用機作: プロタミンペプチドの直鎖型と環状型の作用比較を図2に示す。

図2 プロタミンペプチドの直鎖型と環状型

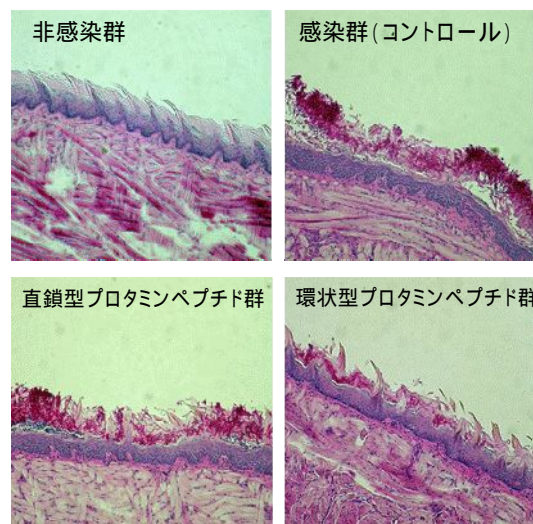
項目	直鎖型	環状型
NaCl による抗真菌活性の低下の有無	有	無
殺菌濃度 (μM)	50	10
50%菌糸形成抑制濃度 (μM)	10	2.5
殺菌作用濃度での ATP の細胞外流出の有無	有	有
10 μM 濃度の作用で菌数が 100 分の 1 に減少するに要する時間 (分)	60	< 30
1 μM 濃度の作用で菌数が 100 分の 1 に減少するに要する時間 (分)	120	40
殺菌濃度作用時の細胞内活性酸素産生の有無	有	有
50%菌糸形成抑制濃度作用時の細胞内活性酸素の有無	無	無

塩に対するプロタミンペプチドの感受性は環状化により低下し、生体中の塩による活性阻害の懸念を軽減できると思われる。環状型では抗真菌活性および菌糸形成抑制の効果強化が認められた。ATP 細胞外流出および細胞内活性酸素の出現は、直鎖型同様に環状型でも確認された。

(4) 直鎖型および環状型プロタミンペプチドの in vivo 評価: 口腔カンジダ症モデルマウスにおける白苔形成へのプロタミンペプチドの抗真菌

活性を検討し、直鎖型環状型プロタミンペプチドの抗真菌活性試験を施した2日目の組織切片像組織切片像を図3に示す。

図3 組織切片像



非感染群では舌表層の舌乳頭がはっきりと観察されるが、感染群(コントロール)では、舌乳頭が見えないくらいカンジダバイオフィームが形成された。直鎖型群ではコントロール群に近い状態のカンジダバイオフィームが観察された。環状型群では酵母形細胞の増殖が若干観察された。すなわち in vivo では環状型で明らかな抗真菌活性が観察された。その効果は完全な殺菌効果ではなく、菌糸形成抑制が顕著に認められた。この現象は in vitro で殺菌効果以下の濃度において菌糸形成を抑制した結果とよく符合する。以上の結果より環状型プロタミンペプチドは、臨床応用に発展できる素材であると考えられる。

< 引用文献 >

庵原 啓司、河原崎 正貴、古賀 倫子、他、アルギニンリッチな配列を有する新規抗カンジダ活性ペプチド、防菌防黴誌、37巻、413-420、2009
Ishijima, S.A., Hayama, K, Burton, J.P., et al, Effect of *Streptococcus salivarius*

K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis. *App. Environ. Microbiol.* 78,2190-2199, 2013.

〔雑誌論文〕(計9件)

Yoshikane, Y., et al (4: 3rd), JNK is critical for the development of *Candida albicans*-induced vascular lesions in a mouse model of Kawasaki Disease. *Car. Path.* 24, 33-40, 2015. 査読有

Cho, T., Nagao, J., Imayoshi, R., Tanaka, Y., Importance of diversity in the oral microbiota including *Candida* species revealed by high-throughput technologies. *Int. J. Dent* 2014: Article ID 454391, %pages, 2014. 査読有

Koba, C., et al (3: 2nd), Determination of *Candida* species nestled in denture fissures. *Biomed. Rep.* 1, 529-533, 2013. 査読有

Matsumoto, H., Nagao, J., Cho, T., Kodama, J., Evaluation of pathogenicity of *Candida albicans* in germination-ready states using a silkworm infection model. *Med. Mycol. J.*, 54, 131-140, 2013. 査読有

Cho, T., Nagao, J., Imayoshi, R., et al(3), In vitro efficacy of continuous mild heat stress on the antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilm formation. *Biol Pham. Bull.* 35, 1371-1373, 2012. 査読有

Nagao, J., Cho, T., Uno, J., Imayoshi, R.,

et al (3), *Candida albicans* Msi3p, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Sse1p of the Hsp70 family, is involved in cell growth and fluconazole tolerance. *FEMS Yeast Res.* 12, 728-737, 2012. 査読有

長環、*Candida albicans* のバイオフィルムと mild heat stress. 化学療法の領域、29, 106-112, 2013. 査読無

長環、ヒト病原真菌の二成分制御系、化学療法の領域、29, 72-79, 2013. 査読無

長環、病原真菌のバイオフィルム形成とクオラムセンシング機構、化学療法の領域、28, 42-48, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計6件)

橋本麻利江、他、プロタミンペプチドの濃度依存的抗真菌活性について、第58回日本医真菌学会総会・学術大会、2014年11月1-2日、ワークピア横浜・横浜産貿ホールマリネリア(横浜市)

長環、他、プロタミンペプチド派生抗真菌活性ペプチドの構造改変の効果、第56回歯科基礎医学会総会・学術集会、2014年9月25-27日、福岡国際会議場(福岡市)

長環、他、プロタミン派生ペプチドの抗真菌活性と応用に向けた機能改変、第55回歯科基礎医学会総会・学術集会、2013年9月20-22日、岡山コンベンションセンター(岡山市)

長環、他、プロタミンペプチドのバイオフィルム形成病原真菌に対する作用機作

の解明と応用開発、第 57 回日本医真菌学会総会・学術大会、2013 年 9 月 27-28 日、京王プラザホテル新宿（東京都）

羽山 和美（HAYAMA, Kazumi）

長 環、他、プロタミンペプチドの抗真菌活性、第 56 回日本医真菌学会総会・学術大会、2012 年 11 月 10-11 日、京王プラザホテル多摩（多摩市）

永尾 潤一、他、サケ由来プロタミンペプチドの病原真菌 *Candida albicans* 形態変換阻害活性、第 56 回日本医真菌学会総会・学術大会、2012 年 11 月 10-11 日、京王プラザホテル多摩（多摩市）

6．研究組織

（ 1 ）研究代表者

長 環（CHO, Tamaki）
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号：90131870

（ 2 ）研究分担者

稲井 哲一郎（INAI, Tetsuichiro）
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号：00264044

今吉 理恵子（IMAYOSHI, Rieko）
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号：80320331

永尾 潤一（NAGAO, Jun-ichi）
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号：30509047

（ 3 ）研究協力者

庵原 啓司（IOHARA, Keishi）
御手洗 誠（MITARAI, Makoto）
安部 茂（ABE, Shigeru）