

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790803

研究課題名（和文） デフェンシン抗菌活性の決定因子

研究課題名（英文） Determinants of antimicrobial activity and salt-resistance of defensin

研究代表者

白藤 宜紀 (SHIRAFUJI YOSHINORI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90423285

研究成果の概要（和文）：ヒト $\beta$ デフェンシン-3（HBD）は、他のHBDと比較して、グラム陰性菌のみならずグラム陽性菌にも強力な抗菌活性を有し、さらにその抗菌活性が塩抵抗性であるという特徴を有する。我々はこの特徴がHBD-3のみが有するC末端の2ケのアルギニン残基に起因するものと仮定し、これを除去した desR HBD-3 と N 末端に移行した NRR-HBD-3 の組み換え型ペプチドを作成し、検討したところ、これらのアルギニン残基が、C末端に存在することが重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Human  $\beta$ -defensin (HBD) -3 has potent and salt-resistant antimicrobial activity against both gram-negative and gram positive bacteria and this activity, while other HBDS possess antimicrobial activity against only gram-negative strains and it is attenuated under salt existence. We hypothesized that these characteristics are due to two arginine residues in the COOH-terminal of HBD-3 which is not involved in other HBD-3. To investigate, we designated two recombinant mutants of HBD-3; desR HBD-3 in which these two arginine residues were deleted from HBD-3 and NRR-HBD-3 in which these two arginine residues were shifted from COOH-terminal to NH2-terminal and examined their antimicrobial activities and salt-resistance. The results showed that these two arginine residues are required to exist in the COOH-terminal in order to maintain the activity and salt-resistance of HBD-3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：デフェンシン アルギニン 抗菌活性 塩抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

デフェンシンは3-4kD、3組のジスルフィド結合持つ、陽性荷電を有する抗菌性のペプチドであり、ジスルフィド結合の形成部位とシステイン残基間のアミノ酸配列により、 $\alpha$ デフェンシンと $\beta$ デフェンシンに大別される。

1997年尋常性乾癬患者の鱗屑よりヒト $\beta$ デフェンシン(HBD)-2が分離されて以来、現在ではヒト表皮においてHBD-1~HBD-4の4種のデフェンシンが産生されることが知られている。

この中で、HBD-3は、他のヒト $\beta$ デフェンシンと比べ、グラム陰性菌のみならず黄色ブドウ球菌などのグラム陽性球菌に対しても高い抗菌作用を有しており、また、塩の存在下でも抗菌作用を保持しているが、これらの特性が、HBD-3の構造中のいずれに依存しているものかに関しては、これまで詳細な検討はなされていなかった。

### 2. 研究の目的

HBD-3は他のHBDに対し、C末端に2箇所アルギニン残基を多く有している。アルギニンは塩基性アミノ酸の一つであり陽性に荷電しやすい性質を持つことより、我々はこのC末端のアルギニン残基がHBD-3の抗菌活性や塩抵抗性に与える影響を明らかにしようとした。

### 3. 研究の方法

これまでにクローニングを終了していた全長HBD-3 cDNAを鋳型とし、site-directed mutationを行い、前述のC末端の2箇所のアルギニン残基を除去したHBD-3 (desR HBD-3) 及び、この2つのアルギニン残基を desRHBD-3 のN末端先端に移動したHBD-3

(NRR HBD-3)のcDNAを作成、pET28a systemを用いてそれらのHis-Tag fusion peptideを合成し、Factor XaにてHis-Tagを切断、RP-HPLCにて精製を行った。

HBD-3:

GIINTLQKYICRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRK  
CCRRKK

desR HBD-3:

GIINTLQKYICRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRK  
CC—KK

NRR HBD-3:

RRGIINTLQKYICRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRG  
RKCC—KK

このようにして作成した desR HBD-3、NEEHBD-3、及び、市販されている合成(synthesized) HBD-3 と HBD-2 の抗菌活性を測定するため、 $1 \sim 10 \times 10^5$  CFU/ml の細菌と様々な濃度のペプチドを混合し、インキュベートした後数段階に希釈して寒天培地上に塗布、インキュベート後コロニー数をカウントすることによって行った。

さらに、これらのペプチドの抗菌活性の塩抵抗性を測定するため、subMIC濃度のペプチドを細菌と混合し、0~250mMの塩化ナトリウム存在下でインキュベート後、同様に抗菌活性を測定した。

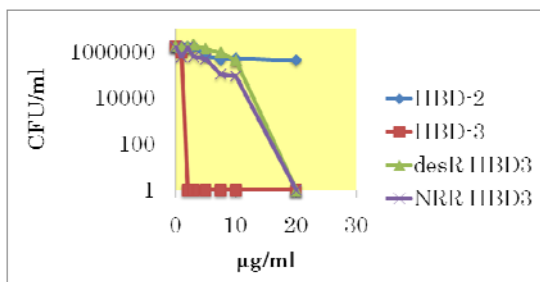
菌株はグラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌の標準株であるFDA209とグラム陰性桿菌の緑膿菌の標準株であるNBC12582を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性

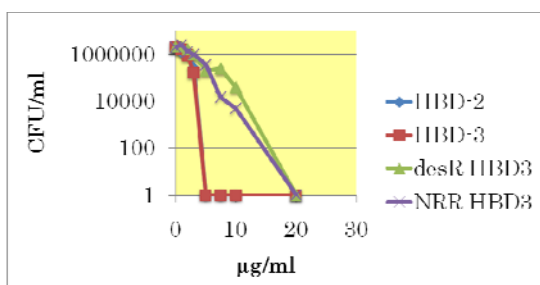
これまでの報告のとおり、HBD-3が強力な抗菌活性を示しているのに対して、HBD-2はほ

とんど抗菌作用を有さない。C末端のアルギニン残基を除去した desR HBD-3 の抗菌活性は HBD-2 に近い程度にまで減弱していることに加え、アルギニン残基を C 末端から N 末端に移行させ、HBD-3 と全く同じ陽電荷を保持させている NRR HBD-3 も desR HBD-3 と同じ程度の抗菌活性しか有さない。



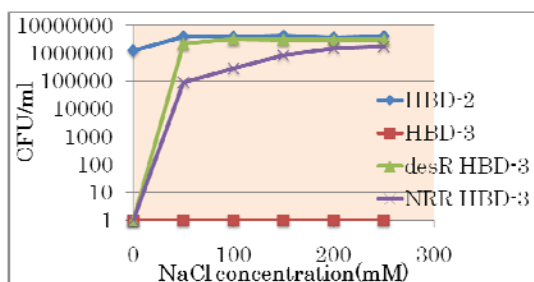
### (2) 緑膿菌に対する抗菌活性

HBD-2, -3とも強力な抗菌活性を示したが、desR HBD-3, NRR HBD-3は黄色ブドウ球菌に対する場合と同様に、いずれも同程度に抗菌作用は減弱していた。



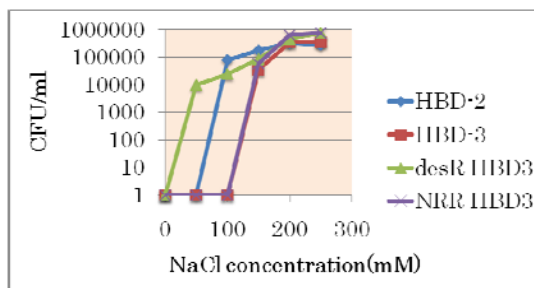
### (3) 塩存在下での抗黄色ブドウ球菌活性.

これまでの報告のとおり、HBD-3は高濃度のNaClの存在下でも強力な抗菌活性を保ち続けるが、HBD-2は元来黄色ブドウ球菌に対する活性に乏しいため、NaCl濃度に関わらず抗菌作用を認めない。desR HBD-3はNaCl存在下において、HBD-3に比べて明らかに抗菌活性が低下する。HBD-3と同じ電荷をもつNRR HBD-3の抗菌活性はdesR HBD-3よりもやや改善するものの、HBD-3にはやはり遠く及ばない。



### (4) 塩存在下での抗緑膿菌活性.

HBD-3はHBD-2に比べると強い塩抵抗性を示しているが、それぞれ100mM, 50mM以下のNaCl濃度以下でしかtotal killingを示さず、黄色ブドウ球菌の場合ほどの差はない。desR HBD-3の塩抵抗性はHBD-2をも下回ったが、NRR HBD-3ではHBD-3とほぼ同レベルにまで回復した。



黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性及び塩抵抗性については、本研究の仮説のとおり、C末端のアルギニン残基が大きく関与していることが示された。また、NRR HBD-3とdesR HBD-3の結果がほぼ程度にHBD-3に比して減弱していることより、これらのアルギニンが単純に存在するのみではなく、C末端に位置することが重要であることが示唆された。

緑膿菌においても、C末端のアルギニンが抗菌活性についてはdesR HBD-3, NRR HBD-3の両者の抗菌活性がHBD-3よりも減弱しており、アルギニン残基がC末端に存在することが必要と考えられるものの、塩抵抗性に関しては、desR HBD-3で減弱するものの、黄色ブドウ球菌とは異なり、NRR HBD-3ではHBD-3と同等に改善することより、緑膿菌などのグラム陰性桿菌に対する場合の塩抵抗性は、デフェンシンが全体で有する陽性荷電の強さが最も重要

な要因である可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Shanahan, M. T., Vidrich, A., Shirafuji, Y. 他5名. Elevated expression of paneth cell CRS4C in ileitis-prone SAMP1/YitFc mice: regional distribution, subcellular localization, and mechanism of action, J Biol Chem, 査読有、285巻、2010、7493-504

[学会発表] (計3件)

① Yoko Sakagami, Yoshinori Shirafuji, Takahi Oono, Keiji Iwatsuki、Two Arginine residues in the COOH-terminal of human beta-defensin-3 affect broad antimicrobial activities and salt-resistance, The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2009年12月04日～2009年12月06日、博多

② Yoko Sakagami, Yoshinori Shirafuji, Takashi Oono, Keiji Iwatsuki  
Antimicrobial Activity of Human Beta-defensin-3 Against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa, The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, 2008年10月30日～2008年11月02日、Hangzhou, China

③ Yoshinori Shirafuji, Yoko Sakagami, Takashi Oono, Keiji Iwatsuki、  
Antimicrobial activity of human beta-defensin-3 against metallo beta

lactamase producing Pseudomonas.

Aeruginosa, International Investigative Dermatology, 2008、2008年05月14日～2008年05月17日、Kyoto

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

白藤 宜紀 (SHIRAFUJI YOSHINORI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90423285