

(千葉大学学位申請論文)

ヒト抗菌ペプチドに関する研究

2004年 1月

千葉大学大学院自然科学研究科
多様性科学専攻物質多様性科学

西村栄作

目次

略号

第一章 序論	1
第二章 ヒト抗菌ペプチドの口腔細菌に対する効果	9
第一節 緒言	9
第二節 材料と方法	12
第一項 試薬	12
第二項 被験菌株	13
第三項 阻止円形成による hBD-2 の抗菌活性	15
第四項 プロテアーゼ阻害剤の影響	16
第三節 結果	18
第一項 レンサ球菌に対する hBD-2 の抗菌活性	18
第二項 hBD-2 抵抗性の機構解明 (プロテアーゼの効果)	27
第四節 考察	34
第一項 hBD-2 の口腔細菌に対する抗菌活性	34
第二項 口腔細菌叢に対する defensin の影響	35
第三項 今後の展望	37

第三章 抗菌ペプチドの食品成分による誘導増強効果	38
第一節 緒言	38
第二節 材料と方法	40
第一項 ヒト初代培養角化表皮細胞からの RNA 抽出	40
第二項 定量 P C R	41
第三項 プライマーの設計	42
第四項 hBD-2 発現量の標準化	45
第五項 hBD-2 cDNA standard の調整	46
第六項 食品サンプル調整	48
第三節 結果	50
第一項 hBD-2 mRNA 測定系の確立	50
第二項 hBD-2 誘導効果における食品由来微生物の効果	53
第三項 大腸菌と穀物による hBD-2 発現に対する相乗的な共刺激効果	55
第四項 アマランス中の hBD-2 増強活性成分の分画	60
第四節 考察	64
第一項 測定系の特徴	64
第二項 食品関連素材からの hBD-2 の誘導	65
第三項 NF- κ B pathway の活性化を経た hBD-2 の誘導	67

第四項 本研究の応用	70
第四章 総括	71
要旨	73
参考文献	75
謝辞	87

略号

human β -defensin-2 (hBD-2)

American Type Culture Collection (ATCC)

Gifu Type Culture Collection (GTC)

Institute for Fermentation, Osaka (IFO)

brain heart infusion (BHI)

tryptic soy broth (TSB)

sodium phosphate buffer (NaPB)

3,4-Dichloroisocoumarin (3,4-DCI)

tosylphenylalanine chloromethylketone (TPCK)

4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)

dimethylsulfoxide (DMSO)

human primary foreskin keratinocyte (HFK)

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

6-carboxy-fluorescein (FAM)

6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)

Toll-like receptors (TLRs)

pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)

fluorescence generation (ΔR_n)

threshold amplification cycle (Ct)

第一章 序論

従来より食品は、人類の生存、活動に欠くことのできない主要因子である。原始時代の人類は、生き延びるために本能的に栄養の補給を行ったが、食糧の確保が出来るようになると、味覚、風味、物性などの点でより嗜好性の高い食べ物を次第に求めるようになってきた。また、これと同時に、体の調子が悪いときや病気にかかった時に何を食べればよいかを経験的に学習し始めた。

このような人類と食糧との関わり合いの歴史は、食品研究の歴史ともいえる。これまでの食品の価値は、栄養面からみた一次特性と、嗜好面から見た二次特性の二点でのみ評価を受けるのが通常であった(1)。しかし、近年、社会の高齢化や合理化によって、成人病や慢性疾患あるいはストレス疾患が急増し始め、人々の間に健康に対する関心が高まった結果、摂取された際に食品中に存在する因子によって有効に発現する食品機能についての研究が盛んに行われるようになってきた。従来、食品の質を表す言葉として用いられてきた栄養面での「一次特性」、嗜好品としての「二次特性」の代わりに、「食品中の栄養素が生体に対して短期あるいは長期に果たす機能であり、生命を維持していく上で基本的に重要なもの」として「一次機能」、および「食品組織あるいは食品成分が感覚に訴える機能であり、食品の受諾性を決定する因子」として「二次機能」の概念が現在使われている(1)。しかしながら、食品中には栄養素と嗜好成分（香り、味等）だけではなく、これとは別の生理活性物質とも呼ぶべき様々な成分が存在し

ている。そのような物質は摂取された後、生体の生理系統（生体防御、ホルモン、神経、循環器、消化器等）を調節し、健康の維持（病気の予防）や回復（治療）に直接役立つ事が、最近の研究で明らかになってきている(1)。食品に存在する生体調節物質の例を荒井の報告(1)より引用した物を、Table 1 に示した。このような物質を含有する食品の新しい生体調節機能（三次機能）を効率よく発現するように作製された加工食品を、機能性食品（physiologically functional food）と呼ぶ事を1985年に荒井等が世界に先駆けて提唱した。更に、1991年に法律的にも制度化され、特定保健用食品と呼ばれている。

その中でも、免疫増強などの生体防御系に関する研究は、最近の免疫学の発展と共に特に注目されている。このように食品と免疫系の関係は深いと考えられ、低アレルゲン化食品、免疫増強食品、造血および免疫細胞分化誘導能を持つ食品、腸内細菌叢の確立とその保護を持つ食品など免疫学的機能性食品の開発が可能であると期待できる。

21世紀に入り、日本は高齢化社会に突入しつつあるが、高齢者の増加および少子化によって、食品は新たなニーズが要求され、高齢者にとって最も関心の高い「健康」に役立つ、栄養機能食品としての役割が与えられると考えられる。高齢化によって免疫力が低下すると、風邪や病気に罹りやすくなる。免疫力を高めることが解決法の1つではあるが、後天的免疫機構は複雑で微妙なシステムであるため、免疫過敏（アレルギー反応）等

Table 1. 食品中の生体調節因子とその機能例

食品	生体調節因子	主な機能
生体防御に関して		
ミルク	イムノグロブリン	体液性免疫
ミルク	貪食細胞活性化ペプチド	細胞性免疫
シイタケ等	β -1,3,-グルカン	免疫増強
エビ・カニ	キチン	免疫増強
ホルモン系に関して		
ミルク	成長ホルモン放出因子	成長ホルモン分泌
ミルク	ガストリン放出ペプチド	ガストリン分泌
オオムギ	黄体形成ホルモン放出因子	黄体形成ホルモン分泌
ギムネマ	ギムネマ酸	インスリン分泌
神経系に関して		
ミルク	オピオイドペプチド	神経鎮静
ミルク	オピオイドアンタゴニスト	神経調節
コムギ	オピオイドペプチド	神経鎮静
循環系に関して		
ミルク	エリスロポエチン	造血
ミルク	アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド	血圧調節
トウモロコシ	アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド	血圧調節
イワシ等	エイコサペンタエン酸	抗血栓
エビ・カニ	キトサン	コレステロール低減
ダイズ	グリシニン	コレステロール低減
カイソウ	食物繊維	コレステロール低減
消化系に関して		
ミルク	Ca結晶成長阻害ペプチド	Ca吸収促進
ミルク	シアロオリゴ糖	ビヒズス菌活性化
キクイモ	フラクトオリゴ糖	ビヒズス菌活性化
ダイズ	ガラクトオリゴ糖	ビヒズス菌活性化
トウモロコシ	イソマルトオリゴ糖	ビヒズス菌活性化
ミルク	ラクトフェリン	抗菌
ミルク	ラクトペルオキシダーゼ	抗菌
ミルク	シスタチン	抗ウイルス
ダイズ	ソヤサポニン	抗ウイルス
ミルク	グリコマクロペプチド	抗ウイルス
ミルク	ガングリオシド	抗毒
細胞系に関して		
ミルク	上皮成長因子	細胞成長
ツキミソウ	γ -リノレン酸	細胞膜強化
ソバ	ルチン	細胞膜強化
コメ	γ -オリザノール	細胞老化抑制
ゴマ	セサミノール	細胞老化抑制
クルミ	エラゲ酸	細胞老化抑制

(荒井ら、バイオサイエンスとインダストリー、1990より)

のマイナスの面も増強する可能性がある。

後天的免疫機構とは別に細菌やカビ等から身体を守る働きには自然（先天的）免疫機構があり、ヒトも抗菌ペプチドを作っていることが知られている。低分子塩基性抗菌ペプチドは、その構造、アミノ酸組成、ジスルフィドの数により4つのグループがあり、昆虫、両生類、鳥類および様々な哺乳類において、70種類以上の分子が報告されている (Table 2)。このことから低分子塩基性抗菌ペプチドは自然界に広く分布し、太古より生体防御のメカニズムとして進化してきたと考えられている (2, 3)。

ディフェンシン (Defensin) と総称される哺乳動物の抗菌性ペプチドは粘膜表層の生体防御において重要な役割を担っている。defensin は、低分子塩基性抗菌ペプチドの1グループとして分類され、 β -sheet 構造と2、3個の分子内ジスルフィドを持つカチオン性のペプチドとして特徴づけられている (Table 3)。defensin は、抗菌ペプチドの多型遺伝子族を形成しており、1980年に最初に発見されてからヒトを含む様々な哺乳動物の気管、腸、舌、血液、皮膚などで見つかった (4)。

defensin は、存在する6つのシステイン残基の形成する3つのジスルフィド結合の組み合わせの違いから、従来の α -defensin と呼ばれるものと、1991年に初めてウシの気管から見つかった β -defensin とよばれるものに大きく分類される。ヒトのもつ defensin は、 α -defensin として6種類 (5, 6)、 β -defensin として6種類が現在までに報告されている (7-12)。

ヒト β -defensin-2 (hBD-2) は、1997年に乾癬症患者の皮膚から分離

Table 2. Cationic antibacterial peptide classes based on structure and source.

<u>Peptide</u>	<u>Source</u>
<u>Amphiphilic α-helix, with cysteine residues</u>	
Cecropins	insects, pigs
Magainins	frogs
LL-37	humans
CAP18	rabbits
<u>Extended helical, with cysteine, with high content of an amino acid</u>	
Apidaecins	insects rich in pro arg
Drosocins	insects pro
Bac-5	cattle pro arg
Bac-7	sheep, goats pro arg
Indolicidin	cattle trp
PR-39	pigs pro arg
<u>Loop structure, with one disulfide bond</u>	
Brevinins	frogs
Esculentin	cattle
<u>β-sheet, with 2-3 disulfide bonds</u>	
α -Defensins	humans, rats, guinea pigs, rabbits
β -Defensins	humans, cattle, mice
Protegrins	pigs
Tachyplesins	crabs
Insect Defensins	insects

精製された 41 アミノ酸残基の塩基性ペプチドであり、3 つの分子内ジスルフィドを持つ(13)。グラム陰性菌、陽性菌および真菌に対して抗菌活性をもち、皮膚や気管および肺で多く発現し、腎臓、子宮、唾液腺でもつくられている。

hBD-2 は、生体が細菌や炎症性のサイトカインに曝された際に著しく誘導的に発現されることが報告されている(13-16)。hBD-2 は主としてグラム陰性菌や酵母に対して有効であることが知られており(13, 14, 17, 18)、また、他の α -または β -defensin よりも約 10 倍の抗菌活性を有している(14, 19)。

一方、口腔に関しては、hBD-1 の mRNA は歯肉の上皮細胞で構成的に発現されている(20)。また、hBD-2 の mRNA は歯肉上皮の培養細胞(21)や唾液腺(22)で誘導的に発現されている。唾液中の hBD-2 の濃度は約 150 ng/ml であることが知られている(16)。

以上のように、hBD-2 の組織分布や発現レベルに関する種々の報告がなされているが、口腔う蝕原性レンサ球菌に対する抗菌活性については未だ知見がない。

口腔のように細菌が豊富な環境下では、hBD-2 のような抗菌ペプチドが生体防御に寄与していることが考えられる。この仮説を検証すべく、我々はまず、hBD-2 の抗菌活性を測定する *in vitro* システムを構築した。第 1 章では、口腔内で常在細菌として最も優勢に存在するレンサ球菌に対する hBD-2 の抗菌活性、及び hBD-2 耐性メカニズムに関して論じた。hBD-2 は

口腔う蝕原性細菌に対して抗菌作用を示し、常在細菌に対しては影響を与えなかった。また、常在細菌の中には hBD-2 に対して高い抵抗性を示し、その抵抗性はセリンプロテアーゼ阻害剤存在下で低下したことからプロテアーゼ活性に由来する自己防御機構が存在することを証明した。

さらに、食品成分のような外的刺激で defensin の発現を増強することができれば、人体が備える生体防御能を利用した機能性食品の開発が可能となる。抗菌ペプチドの産生増強効果を持つ食品成分の探索を行うため、ヒト表皮角化細胞が産生する hBD-2 をモデルに実験系を構築した。第 2 章では、hBD-2 が食材によって増強されるかどうかという可能性について報告し、食品添加物であるパン酵母粉末による hBD-2 発現誘導効果と、穀類と大腸菌粉末の共刺激による発現誘導増強効果を見出した。これらの活性は総じて不溶性の画分に存在することも明らかとなった。

第二章 ヒト抗菌ペプチドの口腔細菌に対する効果

第一節 緒言

defensin と総称される哺乳動物の抗菌性ペプチドは粘膜表層の生体防御において重要な役割を担っている。感染に対する自然免疫の重要な要素であるこれらのペプチドには様々な構造上の多様性が存在し、貪食細胞や上皮細胞など数種の細胞で産生されている。

defensin ファミリーは 6 個の cysteine 残基が 3 対の分子内ジスルフィド結合を形成するカチオン性のペプチドとして特徴づけられている。これらの cysteine 残基のジスルフィド結合の組合せにより、human defensin ファミリーは α -及び β -の 2 種のサブファミリーに分類される。

1985 年に Ganz らにより初めて見出された human α -defensin には現在 6 個の isoform が報告されている (5, 6)。その中で、Human neutrophil peptide-1 から-4 (HNP-1~-4) と称される 4 分子は白血球中のアズール顆粒に局在する。Human defensin-5 と-6 (HD-5 と-6) と称される 2 種の α -defensin は、腸管の Paneth 細胞の分泌顆粒や女性の生殖器官の上皮細胞に存在する (23)。

1995 年には、 α -defensin とは構造上異なった human defensin が、血液ろ過液から分離され (10)、 β -defensin と名づけられた。その Human β -defensin-1 (hBD-1) は腎臓、膵臓、尿管、気道、その他数種の上皮組織で構成的に発現されている (7-11)。

また 41 アミノ酸残基から成るシステインに富むカチオン性ペプチドで

ある human β -defensin-2 (hBD-2) は 1997 年にヒト皮膚より見出され(13)、後に肺、口腔粘膜、唾液などにも存在が確認されている。hBD-2 は生体が細菌や炎症性のサイトカインに曝された際に著しく誘導的に発現されることが報告されている(13-16)。hBD-2 は主としてグラム陰性菌や酵母に対して有効であり(13, 14, 17, 18)、その活性は、他の defensin よりも約 10 倍の抗菌活性を有する事が報告されている(14, 19)。

それらの直接的な抗菌活性に加えて、defensin には自然免疫と獲得免疫反応との間の伝達において重要な作用を持つことも認識されてきている。例えば、hBD-2 は CCR6 ケモカインレセプターを介して樹状細胞を刺激している(24)が、樹状細胞は初期の免疫反応に於いて、抗原提示細胞として重要な役割を果たしている。この数年で、新たな human β -defensin である hBD-3 と hBD-4 が同定され、皮膚及び鼻粘膜 (hBD-3) や精巣及び胃の幽門洞 (stomach pyloric antrum) (hBD-4) におけるそれらの組織特異的発現が報告され(25, 26)、更に hBD-5 と hBD-6 がヒトゲノム情報からのマウス遺伝子とのホモログ検索解析により、新たに発見されている(12)。

一方、口腔に関しては、hBD-1 の mRNA は歯肉の上皮細胞で構成的に発現されている(20)。反対に hBD-2 の mRNA は歯肉上皮の培養細胞(21)や唾液腺(22)で誘導的に発現されている。唾液中の hBD-2 の濃度は約 150 ng/ml であることが知られている(16)。以上のように、hBD-2 の組織分布や発現レベルに関する種々の報告がなされているが、口腔う蝕原性レンサ球菌に対する抗菌活性については未だ知見がない。

口腔のように細菌が豊富な環境下で hBD-2 のような抗菌ペプチドが生体防御に寄与していることが期待される。この仮説を検証すべく、我々はまず、hBD-2 の抗菌活性を測定する *in vitro* システムを構築した。口腔では 5 百種類以上の常在細菌の菌層の中で、レンサ球菌の菌叢は多くの割合を占めている (27)。レンサ球菌は虫歯の原因菌として知られる 2 種類のう蝕原性レンサ球菌である *Streptococcus mutans* や *S. sobrinus* を含むことから口腔細菌叢の制御において重要である。

本研究を通して、hBD-2 が *S. mutans* や *S. sobrinus* に対して効果があり、常在菌に対してはほとんど影響を与えず、さらに、数種の常在レンサ球菌が hBD-2 に耐性であることを見出し、セリンプロテアーゼ阻害剤による微生物プロテアーゼ活性の阻害が hBD-2 に対する菌株の感受性を高めるということが確認できた。

本研究では口腔う蝕原性レンサ球菌に対する hBD-2 の抗菌活性、及び hBD-2 耐性メカニズムに関して論じており、口腔常在菌叢の宿主に対する防御機構の存在を示唆している。

第二節 材料と方法

第一項 試薬

抗菌試験に用いた hBD-2 は、ペプチド研究所（大阪、日本）より合成ペプチドを購入した。被験菌株の培養には Difco (Michigan, USA) 製のものを用いた。低融点アガロースは Gibco BRL (USA) 製を用いた。特に示さない限り、その他の試薬は和光製あるいはシグマ製を用いた。

第二項 被験菌株

実験に用いた被験菌株は、American Type Culture Collection (ATCC)、Gifu Type Culture Collection (GTC)あるいは Institute for Fermentation, Osaka (IFO) 等の微生物バンクより入手し、それらの菌株名は Table 4 に示した。

Table 4. Strains used in this study.

Strain	
reference	
	<i>Escherichia coli</i> IFO 15044
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC12600 T
anginosus (milleri) group	
	<i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 33397 T
	<i>Streptococcus constellatus</i> ATCC 27823 T
	<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335 T
mitis group	
	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558 T
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 6249
	<i>Streptococcus mitis</i> GTC 495 T
	<i>Streptococcus oralis</i> GTC 276 T
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> GTC 261 T
	<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 T
mutans group	
	<i>Streptococcus cricetus</i> ATCC 19642 T
	<i>Streptococcus downei</i> ATCC 33748 T
	<i>Streptococcus ferus</i> ATCC 33477 T
	<i>Streptococcus macacae</i> ATCC 35911 T
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 T
	<i>Streptococcus mutans</i> MT8148
	<i>Streptococcus rattus</i> ATCC 19645 T
	<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478 T
	<i>Streptococcus sobrinus</i> 6715
pyogenic group	
	<i>Streptococcus agalactiae</i> GTC 1234 T
	<i>Streptococcus pyogenes</i> GTC 262 T
salivarius group	
	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 9759

IFO , Institute for Fermentation, Osaka
 ATCC , American type culture collection
 GTC , Gifu Type culture collection
 T , Type strain

第三項 阻止円による hBD-2 の抗菌活性

hBD-2 の細菌に対する生育阻害活性は、Lehrer らの radial diffusion assay method(28-30)を参考にした。簡潔に述べると、被験菌を BHI broth 中で一晚培養し、冷やした 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で遠心により 2 度洗浄後、滅菌後 43°C に暖めてあるリン酸ナトリウム緩衝寒天溶液 (1% 低融点 agarose、0.03% TSB、0.02% Tween 20) に A_{620} が 0.0015-0.01 となるように懸濁した。以上のように調製した菌懸濁液は、6 ml 毎にシャーレに約 1 mm の厚さとなるように分注した。ゲルが十分固化した後に、プレート上に直径 3 mm の穴を空け、4.5 μ l ずつの hBD-2 溶液 (各濃度が 0、1.74、3.47、6.94、13.9、27.8、55.6、111、222 μ g/ml) を添加した。37°C で 3 時間インキュベーションした後、同様に加温して溶かした 6% (w/v) TSB 寒天溶液を重層した。その後、十分菌が生育してローンが形成されるまで 18-24 時間培養した。菌の生育しない透明な阻止円の直径を計測し、生育阻止活性を求めた。hBD-2 の生育阻止活性は下記のように定義した。

1 unit of inhibitory activity = (diameter of clear zone in mm minus 3.0) $\times 10$

第四項 プロテアーゼ阻害剤の影響

上記第三項の生育阻止試験の実験方法に準じて、菌を懸濁したリン酸緩衝寒天溶液中に、DMSO に溶かした 15 種のプロテアーゼ阻害剤 (AEBSF、Amastatin、Antipain、Aprotinin、Bestatin、Chymostatin、3,4-DCI、E-64、EDTA、Leuhistin、Leupeptin、Pepstatin、Phosphoramidon、TPCK、Trypsin inhibitor) を 10 nM-10 mM の阻害至適濃度で加え、微生物由来のプロテアーゼ活性を阻害した。用いた阻害剤の入手元と特徴も併せて Table 5 に示した。DMSO のみを加えたものを対照とした。

Table. 5 Inhibitors used in this study.

Inhibitor	Inhibition	Supplier
AEBSF	serine proteases	Roche Diagnostics GmbH
Amastatin	aminopeptidase and leucine aminopeptidase	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
Antipain	trypsin, papain, and cathepsin A, B	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
Aprotinin	Kallikrein, pancreatic trypsin	Roche Diagnostics GmbH
Bestatin	aminopeptidases	SIGMA
Chymostatin	chymotrypsin, papain, and cathepsin A, B, D	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
3,4-DCI	serine proteases	SIGMA
E-64	thiol proteases	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
EDTA	metallo-proteases, metal-activated proteases	SIGMA
Leuhistin	Aminopeptidase M	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
Leupeptin	trypsin, plasmin, papain, and cathepsin B	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
Pepstatin	pepsin, cathepsin D, and renin	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
Phosphoramidon	thermolysin, Neutral Endopeptidase-24.11 (ANP Degradation Enzyme), and Endothelin Converting Enzyme	PEPTIDE INSTITUTE, INC.
TPCK	chymotrypsin-like serine protease	SIGMA
Trypsin inhibitor	trypsin	Roche Diagnostics GmbH

第三節 結果

第一項 レンサ球菌に対する hBD-2 の抗菌活性

レンサ球菌群は、血清学的分類と 16S-rRNA の塩基配列の相同性および finger-printing による分類に基づいて、anginosus (milleri)、mitis、mutans、pyogenic、salivarius、bovis group の 6 つのグループに分類される (31, 32)。我々は、この中で bovis group を除いた口腔に於いてよく見つかる口腔由来のレンサ球菌に対して、阻止円形成による hBD-2 への感受性を検討した。本試験に阻止円形成法を採用したのは、この試験方法が抗菌ペプチドの活性測定に広く使われており (28, 29, 33, 34)、また、最も簡便且つ直接的で高い再現性を有し、hBD-2 の菌に対する抗菌効果を決定する事が出来るからである。

Escherichia coli と *Staphylococcus aureus* をグラム陰性菌とグラム陽性菌のコントロールとして用いたこの実験系で、hBD-2 は、0-250 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で、両者に対して濃度依存的に生育阻害活性を示した (Figure 1)。それぞれの hBD-2 に対する被験菌の感受性を比較するために、近似直線に対して hBD-2 濃度が生育阻害活性の 20 units (Inhibitory Concentrations at 20 units ; IC_{20}) を示す値とした。この値は既に報告されている大腸菌 (*E. coli*) および黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) に対する hBD-2 の LD_{90} (13) と一致している値である。*E. coli* に対する hBD-2 の IC_{20} は 4.2 $\mu\text{g/ml}$ で *S. aureus* は、244 $\mu\text{g/ml}$ であった。

21 種類の口腔レンサ球菌に対する試験の結果、*S. mitis* および

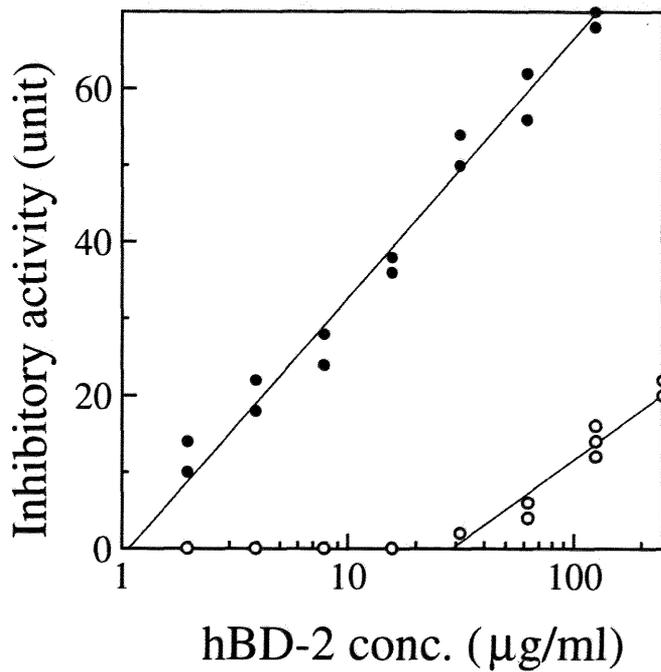


Figure 1. The hBD-2 susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The radial diffusion assay was performed to determine hBD-2 activity in inhibiting growth of *Escherichia coli* IFO 15044 (BLACK) and *Staphylococcus aureus* ATCC12600 (WHITE). The linear regression lines were drawn by the least square method using the average values of triplicate determinations.

anginosus group の 3 菌種を除いたほとんど全ての被験菌に対して、hBD-2 は様々な濃度での抗菌効果を示した (Figure 2~4)。また、これらの hBD-2 濃度の対数値と生育阻害活性の間には、直線性が観察された。

試験結果から求めた 21 菌株の IC_{20} を Table 6 にまとめた。興味深い結果として、ヒトの口腔で主要なう蝕性細菌として知られている *S. mutans* と *S. sobrinus* に対しては、hBD-2 の IC_{20} は *S. mutans* では、標準株 (ATCC 25175) で 21.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、試験でよく用いられている MT8148 株で 57.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり、*S. sobrinus* では、標準株 (ATCC 33478) で 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、試験でよく用いられている 6715 株で 23.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり、高い感受性を示した (Table 6 および Figure 2 e, f, h, i)。ヒト由来の mutans group の菌は総じて高い感受性である (Table 6 および Figure 2) のに対して、mutans group に含まれるサル由来の菌種 (*S. downei* および *S. macacae*) は IC_{20} が 230 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度で感受性が低かった (Figure 2 b, d)。*S. salivarius* も hBD-2 に対して高感受性であった (Table 6 および Figure 3 f)。

ヒトの口腔で優勢的に常在している事が知られている菌種である *S. mitis*(35) は、標準株 (GTC 495) および ATCC 6249 株の 2 種類の菌株を検討したが、何れの株も hBD-2 に対して完全に非感受性であった (Table 6 および Figure 4 b, c)。しかしながら、mitis group の *S. pneumoniae* を含む *S. mitis* 以外の菌種は、hBD-2 に対して感受性であった (Table 6 および Figure 4 a, d, e, f)。さらに、anginosus group を構成する全ての 3 菌種の標準株は非感受性であった (Table 6 および Figure 3 a, b, c)。

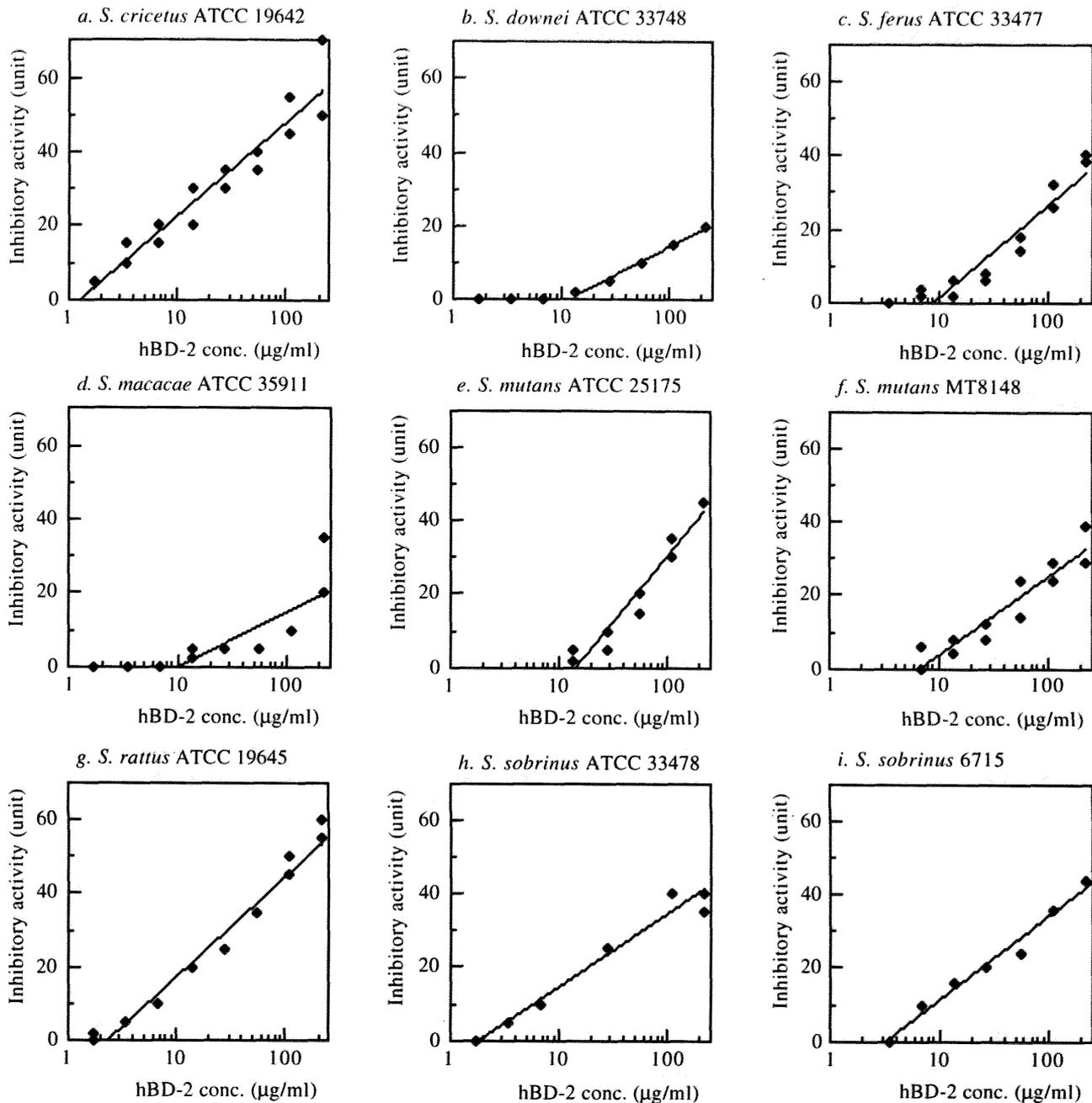


Figure 2. The hBD-2 susceptibility of 9 oral streptococci strains included in the mutans group.

The activity of hBD-2 in inhibiting bacterial growth was determined by radial diffusion assay on (a) *S. cricetus*, (b) *S. downei*, (c) *S. ferus*, (d) *S. macacae*, (e) *S. mutans* ATCC 25175, (f) *S. mutans* MT8148, (g) *S. rattus*, (h) *S. sobrinus* ATCC 33478, and (i) *S. sobrinus* 6715. The activity was expressed with an arbitrary unit as defined under Materials and Methods.

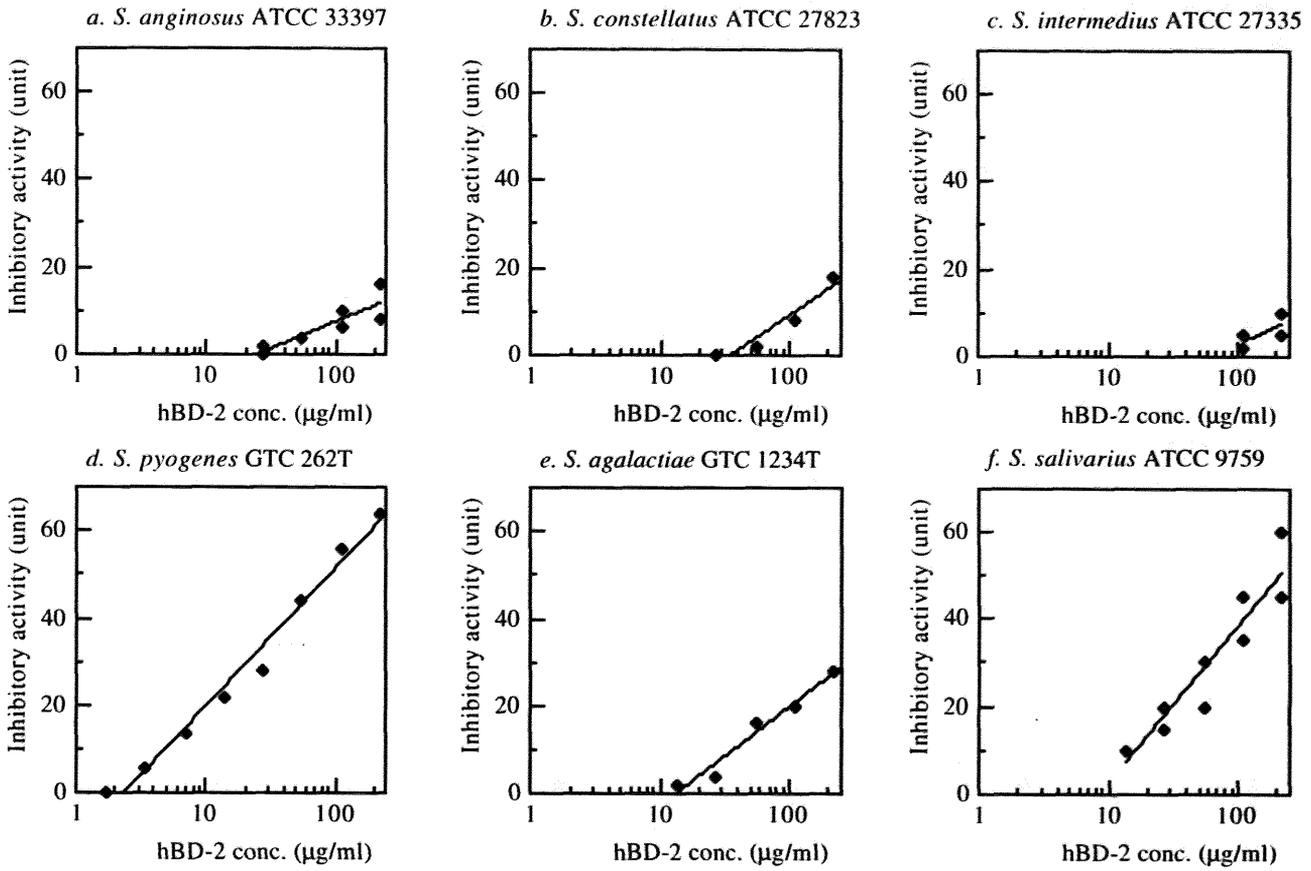


Figure 3. The hBD-2 susceptibility of oral streptococci strains included in the groups of anginosus (three strains), pyogenic (two strains) and salivarius (one strain).

The assay condition was the same as that for Figure 2;
 (a) *S. anginosus*, (b) *S. constellatus*, (c) *S. intermedius*, (d) *S. pyogenes*,
 (e) *S. agalactiae*, (f) *S. salivarius*.

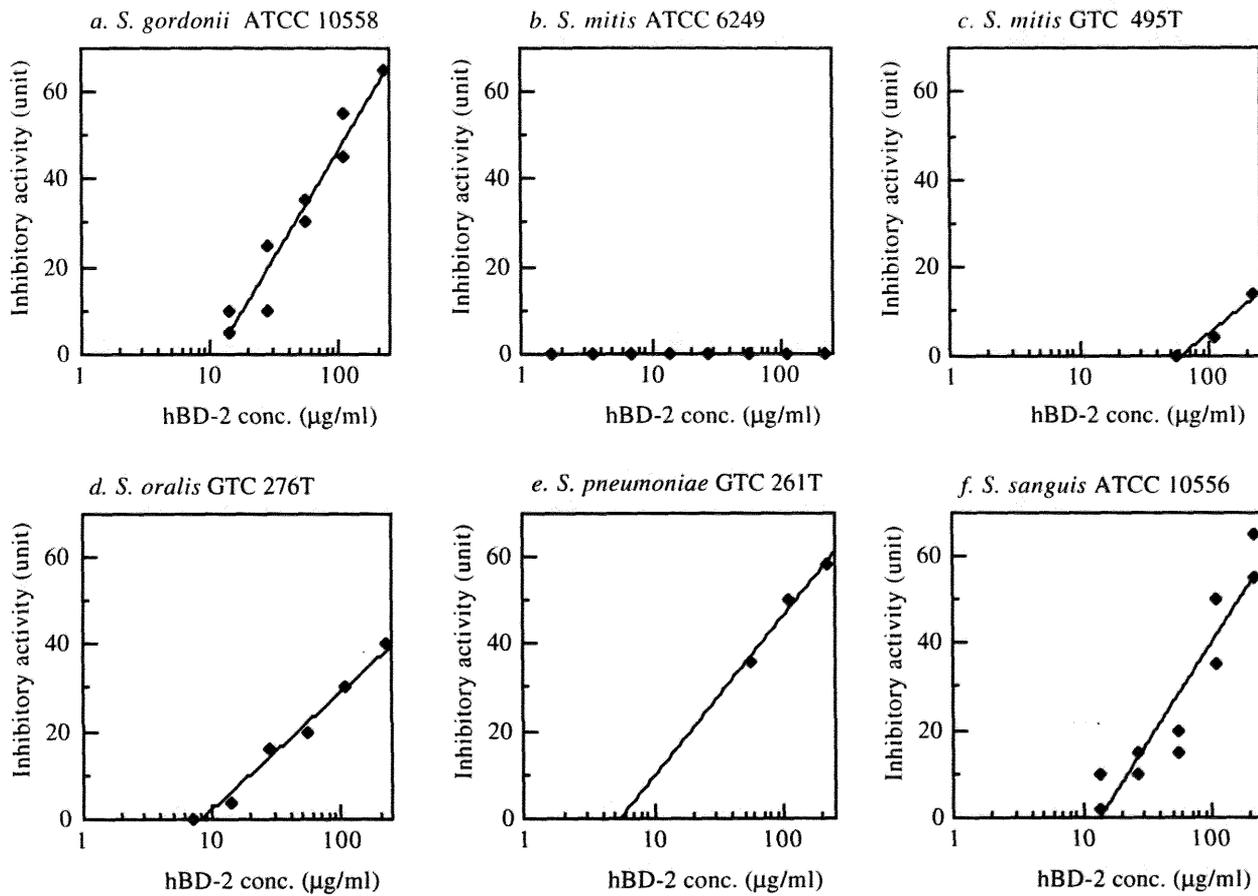


Figure 4. The hBD-2 susceptibility of 6 oral streptococci strains included in the mitis group.

Assays were conducted under the same conditions as Figure 2;
 (a) *S. gordonii*, (b) *S. mitis* ATCC 6249, (c) *S. mitis* GTC 495T,
 (d) *S. oralis*, (e) *S. pneumoniae*, (f) *S. sanguis*.

Table 6. Strains used in this study and their resistances to hBD-2.

Strain		Resistance to hBD-2 (µg/ml)
reference		
<i>Escherichia coli</i> IFO 15044		4.18
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600		244
anginosus (milleri) group		
<i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 33397	T	>250
<i>Streptococcus constellatus</i> ATCC 27823	T	>250
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335	T	>250
mitis group		
<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558	T	8.31
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 6249		>250
<i>Streptococcus mitis</i> GTC 495	T	>250
<i>Streptococcus oralis</i> GTC 276	T	44.9
<i>Streptococcus pneumoniae</i> GTC 261	T	18.8
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556	T	13.2
mutans group		
<i>Streptococcus cricetus</i> ATCC 19642	T	7.82
<i>Streptococcus downei</i> ATCC 33748	T	233
<i>Streptococcus ferus</i> ATCC 33477	T	54.4
<i>Streptococcus macacae</i> ATCC 35911	T	229
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	T	21.6
<i>Streptococcus mutans</i> MT8148		57.1
<i>Streptococcus rattus</i> ATCC 19645	T	12.6
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478	T	18.2
<i>Streptococcus sobrinus</i> 6715		23.8
pyogenic group		
<i>Streptococcus agalactiae</i> GTC 1234	T	101
<i>Streptococcus pyogenes</i> GTC 262	T	9.87
salivarius group		
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 9759		9.75

IFO , Institute for Fermentation, Osaka
 ATCC , American type culture collection
 GTC , Gifu Type culture collection
 T , Type strain

pyogenic group については、ヒトに対して最も一般的で広範囲に分布する病原性の菌種の1つとして知られている A 群レンサ球菌の *S. pyogenes* は、hBD-2 に対して 9.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で感受性であったが、*S. agalactiae* は 101 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と感受性が低かった (Table 6 および Figure 3 d, e)。

上記の結果から、我々は 21 菌種のレンサ球菌属 (streptococci) を hBD-2 に対する感受性について、高感受性 (IC_{20} が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)、非感受性 (IC_{20} が 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上) と中間感受性 (IC_{20} が 100-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の3つのグループに分類した (Table 7)。

anginosus group や 2 株の *S. mitis* の様に hBD-2 に対して非感受性である菌種は、抵抗性を持つ点で streptococci では珍しい菌種である (Table 7)。

これらの結果から、口腔レンサ球菌は hBD-2 に対する感受性について、菌種毎に大きな違いがあることが分かった。上記の結果から、hBD-2 は、口腔内でう蝕病原性を持つ *S. mutans* と *S. sobrinus* や病原性の菌種として知られている *S. pyogenes* に対しては抗菌活性を示し、常在菌として口腔内に存在する anginosus group や 2 株の *S. mitis* に対しては効果を持たないことが示された。*S. mitis* および *S. anginosus* の hBD-2 に対する抵抗性について研究していく上で、我々は細菌の持つプロテアーゼ活性について検討していくこととした。

Table 7. Comparison with sensitivities of Streptococci to hBD-2.

Group	Sensitivity to hBD-2		
	Sensitive	Intermediate	Insensitive
reference	<i>Escherichia coli</i> IFO 15044	<i>Staphylococcus aureus</i>	
anginosus			<i>S. anginosus</i> ATCC33397 ^T <i>S. constellatus</i> ATCC27823 ^T <i>S. intermedius</i> ATCC27335 ^T
mitis	<i>S. gordonii</i> ATCC10558 ^T <i>S. oralis</i> GTC276 ^T <i>S. pneumoniae</i> GTC261 ^T <i>S. sanguis</i> ATCC10556 ^T		<i>S. mitis</i> ATCC6249 <i>S. mitis</i> GTC495 ^T
mutans	<i>S. cricetus</i> ATCC19642 ^T <i>S. ferus</i> ATCC33477 ^T <i>S. mutans</i> ATCC25175 ^T <i>S. mutans</i> MT8148 <i>S. rattus</i> ATCC19645 ^T <i>S. sobrinus</i> ATCC33478 ^T <i>S. sobrinus</i> 6715	<i>S. downei</i> ATCC33748 ^T <i>S. macacae</i> ATCC35911 ^T	
pyogenic	<i>S. pyogenes</i> GTC262 ^T	<i>S. agalactiae</i> GTC1234 ^T	
salivarius	<i>S. salivarius</i> ATCC9759		

Sensitive , under 100 µg/ml
Intermediate , 100-250 µg/ml
Insensitive , over 250 µg/ml

第二項 hBD-2 抵抗性の機構解明（プロテアーゼの効果）

口腔レンサ球菌の hBD-2 感受性の違いを解明する為、細菌由来の IgA protease の様なプロテアーゼの宿主に対する防御作用(35, 36)による hBD-2 抗菌活性の不活性化の可能性について、被験菌に対して検討を行った。プロテアーゼは、基質特異性やその他の特徴によってセリン (serine) プロテアーゼ、システイン (cysteine) プロテアーゼ、金属 (metallo) プロテアーゼ、アスパルティック (aspartic) プロテアーゼ、アミノ (amino) プロテアーゼの大きく5つに分類されるが、どのタイプのプロテアーゼが抗菌活性の不活性化に関与しているかを調べるため、Table 5 に示すような様々な特異性をもった 15 種類のプロテアーゼ阻害剤を各至適濃度で用いてスクリーニングを行ったところ、hBD-2 抵抗性の高い *S. anginosus* および *S. mitis* に対して、セリンプロテアーゼ阻害剤である 3,4-DCI を用いたときに hBD-2 に対する抵抗性が著しく低下した (Figure 5, 6)。また、同様にセリンプロテアーゼ阻害剤である TPCK、AEBSF を用いると *S. anginosus* のみ抵抗性が著しく低下した (Figure 6)。

効果のあった数種の阻害剤について、*S. anginosus* と *S. mitis* に対して hBD-2 感受性の高い *S. mutans* を用いて比較した (Figure 7~9)。阻害剤のない DMSO のみ添加した条件では、hBD-2 に対して非感受性である *S. mitis* および *S. anginosus* が、3,4-DCI 存在下で感受性となった (Figure 7, 8)。また、*S. anginosus* については AEBSF や TPCK でも感受性となった (Figures 8)。*S. mitis* および *S. anginosus* は、60 μM の 3,4-DCI 存在

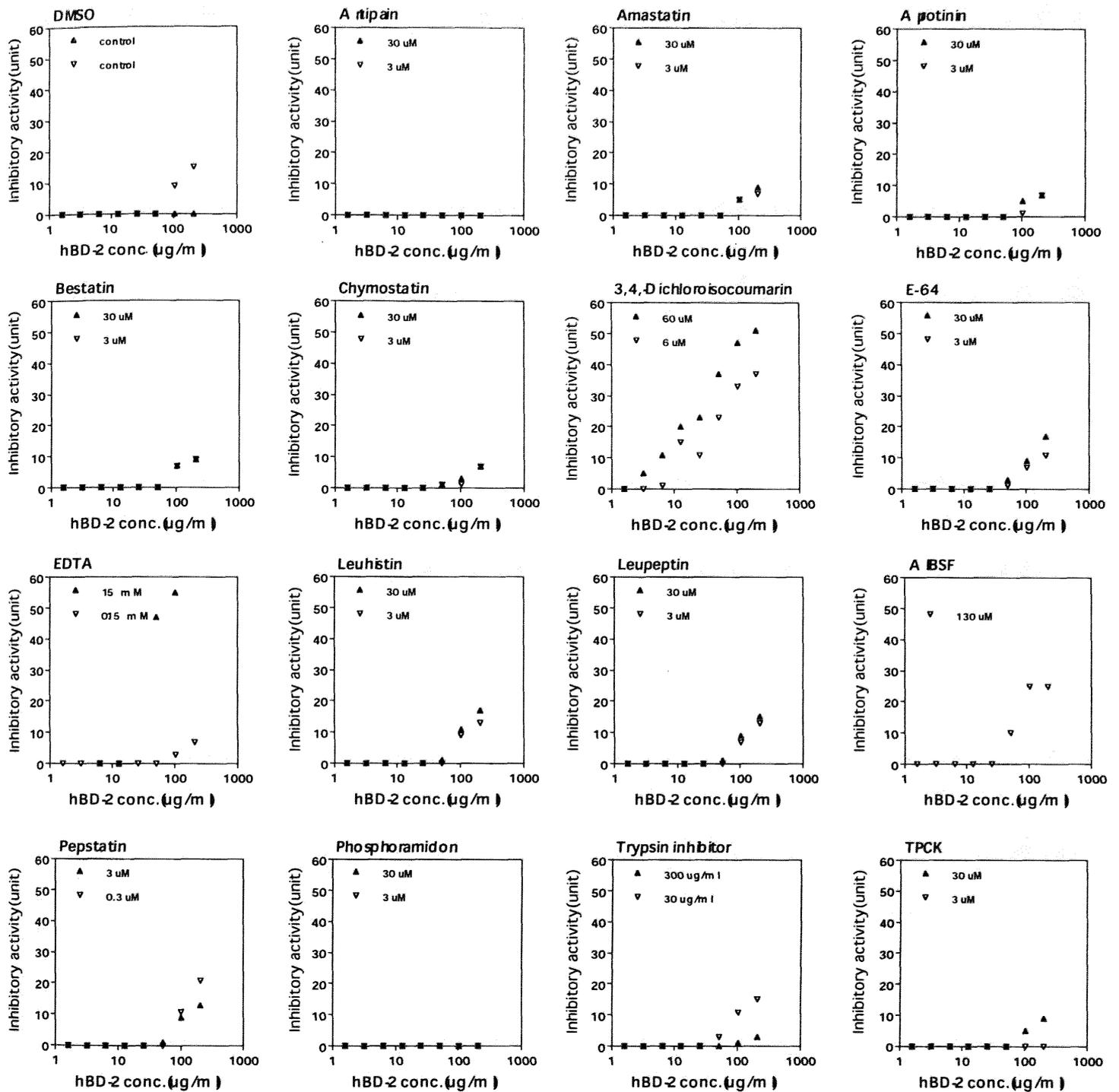


Figure 5. Suppression of the resistance of *S. mitis* to hBD-2 by Protease inhibitors.

The results of Radial diffusion assays with some protease inhibitors are shown.

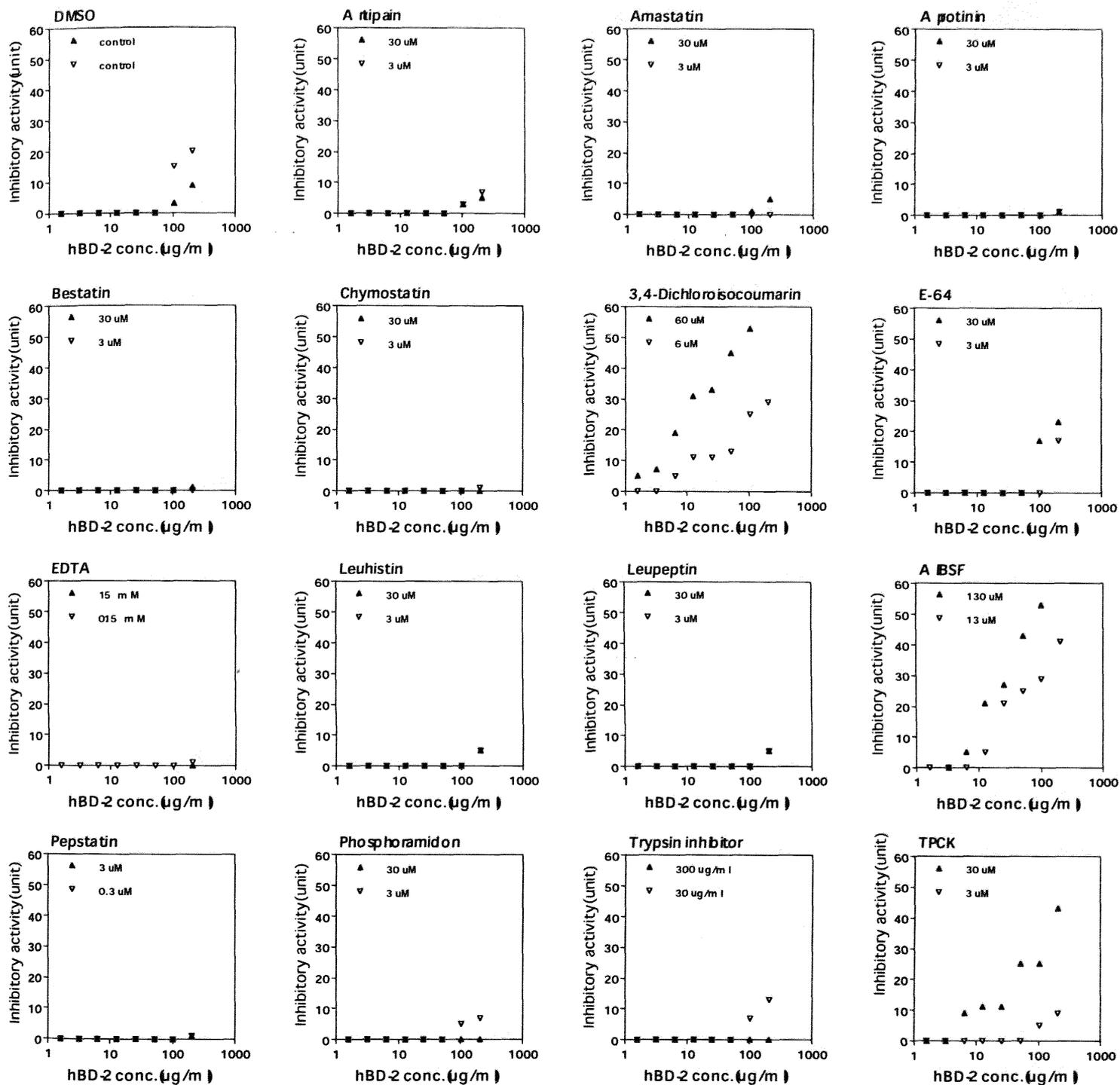


Figure 6. Suppression of the resistance of *S. anginosus* to hBD-2 by Protease inhibitors.

The results of Radial diffusion assays with some protease inhibitors are shown.

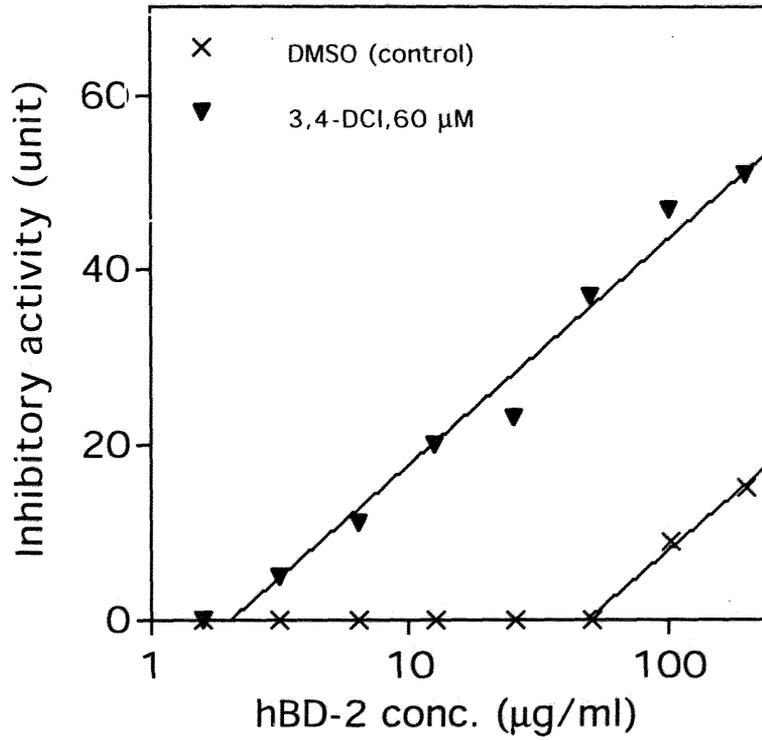


Figure 7. Suppression of the resistance of *S. mitis* ATCC 6249 to hBD-2 by 3,4-DCI.

The results of Radial diffusion assays with 3,4-DCI and DMSO are shown.

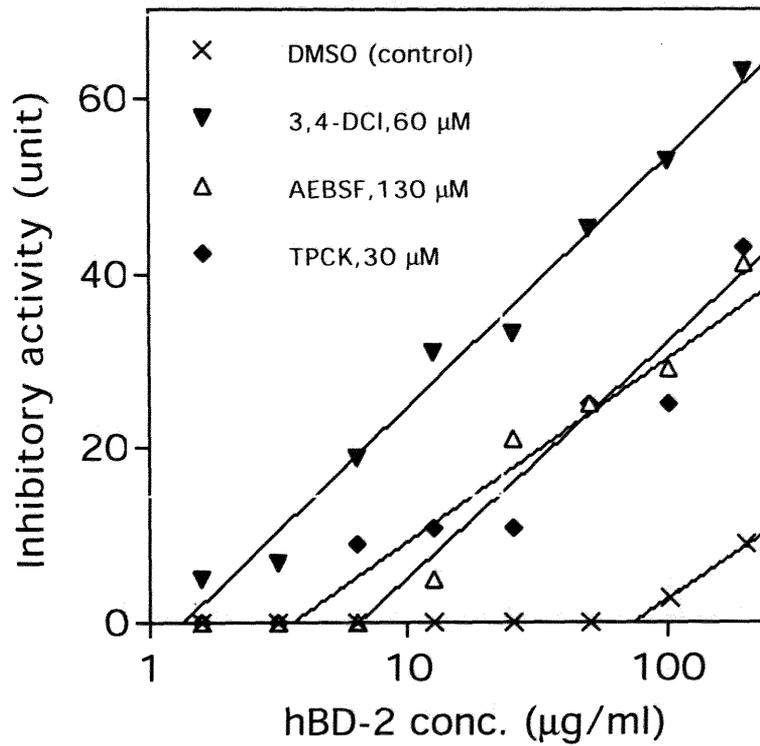


Figure 8. Suppression of the resistance of *S. anginosus* ATCC 33397^T to hBD-2 by Protease inhibitors.

The results of Radial diffusion assays with some protease inhibitors are shown.

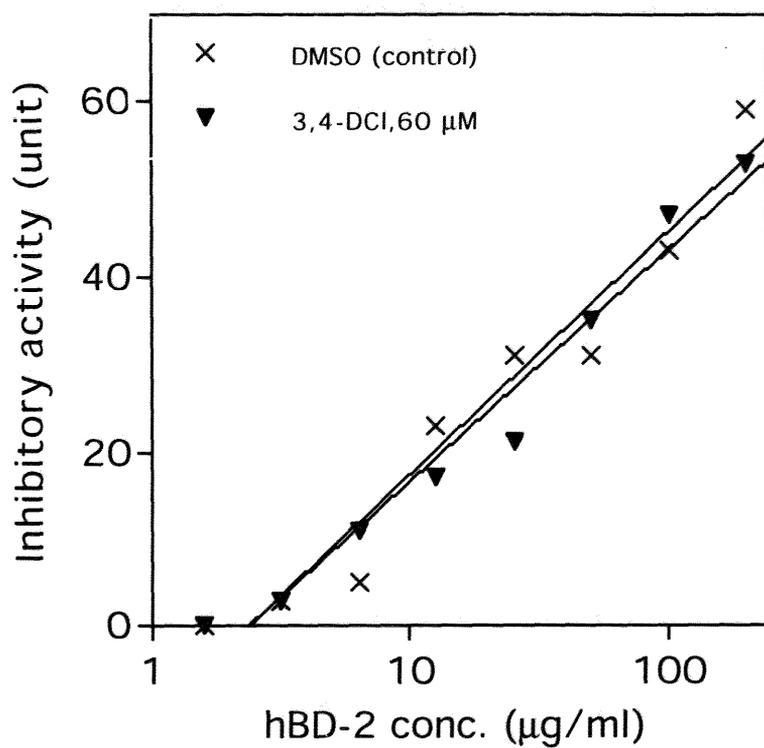


Figure 9. Suppression of the resistance of *S. mutans* MT8148 to hBD-2 by 3,4-DCI.

The results of Radial diffusion assays with 3,4-DCI and DMSO are shown. *S. mutans* was also done as a hBD-2-sensitive control.

下で hBD-2 にたいして感受性となった。抗菌活性は、*S. mutans* の場合、15 種類の阻害剤と DMSO のみの何れの場合も変化しなかった (data not shown)。

阻害剤の存在下で阻止円形成試験を行う事によって、セリンプロテアーゼ阻害剤、特にキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤のみが hBD-2 に対する抵抗性を弱めることが出来た。これらの結果から、*S. mitis* や *S. anginosus* の様な口腔レンサ球菌の hBD-2 抵抗性の機構についてキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性の関与が明らかとなった。

第四節 考察

第一項 hBD-2 の口腔細菌に対する抗菌活性

我々は、口腔レンサ球菌 21 菌種について阻止円形成法による hBD-2 感受性の検討を行い、レンサ球菌属内で 60 倍以上の感受性の違いがあることを見出した (Table 6)。hBD-2 はグラム陰性菌と酵母に対して効果的に殺菌効果を持つことが既に報告されている (13, 14, 18) が、我々は *S. mutans* と *S. sobrinus* を含むグラム陽性のう蝕性のレンサ球菌に対しても、hBD-2 は殺菌能力を有していることを見出した。また、hBD-2 は、病原性細菌として知られる *S. pneumonia* や *S. pyogenes* 等に対して効果を持つことが分かった。グラム陽性のう蝕性細菌に対して、hBD-2 はグラム陰性菌の代表である *E. coli* と同等の殺菌効果があることも非常に重要である。

一方、hBD-2 に対して抵抗性のある *S. mitis* や *S. anginosus* はキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤の存在下では *S. mutans* と同程度まで感受性となった。このことは hBD-2 に対する抵抗性の機構には何らかのプロテアーゼ活性が関与している事を示唆している。これらのことから微生物の宝庫である口腔内では、抗菌ペプチドや様々な防御因子に対する感受性が細菌叢内での生存比率を決定していると思われる。

第二項 口腔細菌叢に対する defensin の影響

我々は、*S. mitis* や *S. anginosus* がヒトの体表面で生き延びるための hBD-2 からの自己防衛として、抵抗性メカニズムとしてのプロテアーゼの存在を示唆してきた。しかしながら、defensin は 3 つの分子内ジスルフィド結合を持つことが報告されており (37, 38)、また微生物由来のプロテアーゼによる分解に対しては抵抗性があるという報告もある (39)。

一方、 α -defensin である human neutrophil defensin は、N-あるいは C-末端の数残基を欠失させることで抗菌活性が変わることも報告されている (40)。従って hBD-2 の不活性化には、何らかのプロテアーゼによる直接的な hBD-2 の分解の影響が先ず考えられるが、その他にも hBD-2 の抗菌活性を妨害する例えば細菌の膜構造を修飾する酵素の活性化の為のプロセッシングに対する間接的な影響 (41) の可能性も挙げられる。

乳児の口腔では、最も早く定着する菌叢はレンサ球菌であり、中でも *S. mitis* が最優勢である (35)。*S. anginosus* についても、歯の生える前の子供では 3 分の 1 の子供で定着している事が報告されている (42)。宿主に対するこのような耐性メカニズムの存在により、乳児期初期における口腔細菌叢の優勢菌の選択理由がそれらの菌種の抵抗性によって説明でき、それらの菌種の hBD-2 に対する高い耐性によって、その後も口腔内で生き残っていくためには有利であると思われる。

我々の結果は、*S. mitis* や *S. anginosus* の様な hBD-2 耐性菌の生存機構の可能性がキモトリプシン様セリンプロテアーゼの産生による hBD-2 の

不活性化によるということを示唆している。実際に出生時や乳児期の口腔において、ヒトの発達時の唾液や歯肉組織での hBD-1 および hBD-2 のレベルについては報告されていないが、ヒツジについては出生後の発達段階で口腔の β -defensin 発現が増加している (43) ことが知られている。

反対に、グラム陰性菌や真菌の定着率の増加が寝たきり老人の口腔で見ついている事(44)は、唾液中の hBD-2 濃度の低下によるものであるということも有り得ることである。*S. anginosus* は咽頭癌組織中で見つかり、この菌種の癌の発達に対する役割が示唆されている (45, 46)。このことは、他の菌に比べて、*S. anginosus* が咽頭組織に対して定着しやすいことを示しており、生体防御に対して有利になる機構を持っていることを裏付けている。

第三項 今後の展望

ヒトの発達段階、性別や健康状態による唾液中の hBD-2 濃度を測定するために ELISA の様な迅速な hBD-2 アッセイの開発が必要であろう。唾液中の hBD-2 濃度は 0.15 $\mu\text{g/ml}$ である(16, 47)から、我々の *S. mutans* にたいする colony counting assay の結果 (LD_{50} of hBD-2 は、0.03 $\mu\text{g/ml}$ および LD_{90} of hBD-2 は、0.5 $\mu\text{g/ml}$) より、唾液中の hBD-2 濃度は *S. mutans* に対する抗う蝕性をもつ濃度範囲である事を示唆している。

このように hBD-2 は、虫歯の予防や治療に重要な役割果たすことが期待できる。hBD-2 は誘導性であることは知られており(13-16)、特定の種類のアミノ酸(48)を摂取することにより、口腔の hBD-2 の発現レベルを増やすことは可能であると考ええる。hBD-2 発現を増強する食品成分の摂取は、う蝕や歯周病の様な口腔疾患の予防において広範囲に効果があると思われる。

第三章 抗菌ペプチドの食品成分による誘導増強効果

第一節 緒言

自然免疫に関わるヒトデフェンシンは、細菌感染に対する最前線の防御機構としての中心的な役割を持っていることが知られている(49)。ヒトの defensin ファミリーは、6つのシステイン残基によって3つの分子内ジスルフィド結合をもつ塩基性ペプチドとして特徴づけられ α 及び β サブファミリーに分類されている。

α -Defensin は 1985 年に初めて見いだされて(50)から、現在までに 6 つの分子が発見されており(5)、好中球のアズール顆粒や小腸の Paneth's 細胞の分泌顆粒中に分布し、また女性の生殖器の上皮細胞にも存在している(23)。全ての α -defensin は恒常的に発現している。

1995 年に、 α -defensin とはシステイン残基による分子内ジスルフィド結合の組み合わせが異なる β -defensin が、ヒトの血液濾過液から発見された(10)。

Human β -defensin-1 (hBD-1) は、様々な上皮系の組織に恒常的に発現している(7, 9, 10)。一方、hBD-2 はヒトの皮膚で見つかり(13)、更にその後、肺、口腔粘膜、唾液や他の組織でも見つかっている(22, 51, 52)。この数年で、更に4つの新たな human β -defensin である hBD-3 から hBD-6 が発見され、それらの組織特異的発現が報告されてきている(12, 25, 26)。

hBD-2 は、グラム陰性菌や病原性の酵母に対して効果的な殺菌作用を持つことが知られている(13, 14)。hBD-2 の抗菌活性は他の α -および β -

defensin と比較して 10 倍以上である (14)。

hBD-2 は、*E. coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*S. aureus*、*Candida albicans* 等の病原性の微生物が感染した場合や、前炎症性サイトカインの産生によって誘導される (13, 14)。しかしながら、幾つかのアミノ酸やその誘導体が、牛の上皮細胞において β -defensin の誘導に効果がある (48) と知られている以外は、食品や食品由来成分による hBD-2 の誘導効果に関しては未だ何の報告もない。我々は、敗血症や日和見感染等の感染症の予防の充進に役立つ機能性食品の開発を目的として hBD-2 の誘導性に着目し、特定の食品摂取によって、その産生レベルの増幅をコントロールする可能性を検討した。食品による HFK 細胞中の hBD-2 mRNA レベルの増加を食品単独および、食品と大腸菌の相乗的な刺激効果について調べた。その結果、食品由来の微生物の中で酵母が最も顕著な hBD-2 mRNA 誘導効果を示すことを見出した。さらに、穀物と大腸菌による共刺激により、hBD-2 mRNA レベルを大腸菌のみの誘導効果よりも遙かに高く増加させることが分かった。

第二節 材料と方法

第一項 ヒト初代培養表皮角化細胞からの RNA 抽出

ヒト初代培養表皮角化 (HFK) 細胞は、Human Corneal Growth Supplement (Cascade Biologics, Inc., Portland OR, アメリカ) に、ウシ脳下垂体抽出物 (bovine pituitary extract)、ラット上皮成長因子 (murine epidermal growth factor)、ヒドロコルチゾン (hydrocortisone)、ウシインスリン (bovine insulin)、ウシトランスフェリン (bovine transferrin) が含まれるものを添加した EpiLife 培地 (Cascade Biologics, Inc., Portland OR, アメリカ) によって、5% CO₂、37°C 条件下で培養した。

2.5x10⁵ cells/ml の密度で 6 穴プレートに接種した HFK 細胞を 24 時間前培養し、さらにサンプル添加あるいは無添加で 16 時間培養した。細胞からの total RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN K.K., 日本) を用いて、抽出操作はキットのマニュアルに従って行った。

第二項 定量 PCR

試験物質の有無による様々な条件下で培養した HFK 細胞より抽出した total RNA から、逆転写反応により cDNA を合成した。hBD-2 と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA を TaqMan methodology(49)を利用した、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems、日本) によってリアルタイム定量 PCR 法により測定した。定量 PCR の増幅は TaqMan Universal PCR Master Mix (Perkin Elmer Applied Biosystems、Japan) を用いて 25 μ l スケールで行った。増幅反応時の温度条件はマニュアルにしたがって行った。即ち、50°C で 2 分間反応させ、94°C で 10 分間の変性後、94°C、15 秒と 60°C、60 秒の温度サイクルを 45 回繰り返した。

第三項 プライマーの設計

hBD-2を検出するためのアッセイに用いたプライマー (forward: 5'-ctt cca ggt gtt ttt ggt ggt a-3'; reverse: 5'-gac tgg atg aca tat ggc tcc-3') およびプローブ (5'-agg cga tcc tgt tac ctg cct taa gag-3') は、既知の hBD-2 配列 (Accession No. Z71389) を Primer Express 1.5 Software (Perkin-Elmer Applied Biosystems、日本) によって設計した。設計したプライマーおよびプローブの配列を Table 8 に示した。更に、Figure 10 には、hBD-2 mRNA 上のプライマーおよびプローブの位置を示した。このプローブは 5'-端に FAM (6-carboxy-fluorescein)、3'-端に TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) の蛍光色素が二重標識されている。GAPDH を測るにあたっては TaqMan GAPDH Control Reagents (Perkin-Elmer Applied Biosystems、日本) を用いた。

Table 8. Nucleotide sequence of defensin PCR primers and probe.

Gene	Accession number*	Forward primer	Reverse primer	Probe	Product length (bp)
hBD-2	Z71389	5'-ctt cca ggt ggt ttt ggt ggt a-3'	5'-gac tgg atg aca tat ggc tcc-3'	5'-agg cga tcc tgt tac ctg cct taa gag-3'	72

*Refers to the accession numbers on EMBL database.

第四項 hBD-2 発現量の標準化

実験時のサンプル間の cDNA 濃度の誤差を標準化するため、刺激の有無による培養後の HFK 細胞の hBD-2 mRNA レベルを、hBD-2/GAPDH の遺伝子のコピー数の比によって求めた。さらに、hBD-2 cDNA の増幅の際、genomeDNA 由来の増幅を防ぐために、reverse primer の配列を exon-intron junction 上に設計し、reverse primer がゲノムの hBD-2 遺伝子上ではアニーリング出来ないようにしている。市販の GAPDH primer についても、intron 配列を含むことによって genome 上での増幅領域を長くして増幅しにくくすることで、genome 由来の増幅を防いでいる。

第五項 hBD-2 cDNA standard の調製

コピー数測定標準として用いた hBD-2 cDNA は、以下のように調製した。最初に未刺激時の HFK 細胞より抽出した total RNA より、逆転写により cDNA を合成した。さらに、Figure 10 に示すように末端に制限酵素サイトを導入した hBD-2 (Accession No. Z71389) 特異的なプライマーにより、PCR を行った。特異プライマーの配列を Table 9 に示した。増幅された断片を制限酵素処理してから、pRc/CMV vector (Invitrogen) に導入後、塩基配列を確認した。GAPDH (Accession No. M33197) についても同様に行った。これらのプラスミド DNA を、定量 PCR の標準として用いた。

Table 9. Nucleotide sequence of defensin specific primers.

Gene	Accession number*	Forward primer	Reverse primer
hBD-2	Z71389	5'-GCA AGC TTC Ata tga ggg tct tgt atc tcc tct tct cgt-3'	5'-GCT CTA Gat cat ggc ttt ttg cag cat ttt gtt cca-3'

*Refers to the accession numbers on EMBL database.

第六項 食品サンプル調製

KANEKA Corp より入手した *Saccharomyces cerevisiae* (KANEKA Yeast Red) を、100 mg/ml となるように蒸留水に懸濁した。それを遠心分離 (15,000 x g、20 min) によって水溶性と不溶性に分け、滅菌後 HFK 細胞の hBD-2 誘導試験に用いた。凍結乾燥大腸菌粉末 (SIGMA) も同様に 10 mg/ml となるように蒸留水に溶かし、滅菌後試験に用いた。

同様に、粉末状のアマランス、アワ、ダイズ、およびゴマを、100 mg/ml に蒸留水に懸濁して滅菌した。加熱処理後のアマランス穀粒粉末 (100 mg/ml) を、等量のエーテルを加えてエーテル抽出により、水層とエーテル層に分離した。エーテル層は、完全にエーテルを蒸発させた後に、残った画分を蒸留水に懸濁した。それぞれの画分は、滅菌した後に hBD-2 mRNA の誘導試験に供した。水層は、粘性を除くために、さらに *Bacillus subtilis* 由来の液化型 amylase (EC 3.2.1.1; 生化学工業製) による酵素処理 (50°C、3 h、0.05 mg/ml) を行った。アミラーゼ処理後、遠心分離 (15,000 x g、20 min) によって分離した上清と沈渣を、試験に供した。分画の流れを Figure 11 に示した。

Amaranth powder (100%)

Ether extract (20 vol. x 3)

Fat (10%)

Defatted amaranth (90%)

Autoclave (121 °C, 20min)

Amylase treatment (liquidize form amylase, 50°C, 3h)

Defatted amylase treated amaranth (90%)

Centrifugation (12,000 r.p.m., 20 min)

Soluble fraction (67.5%)

Insoluble fraction (22.5%)

Figure 11. Fractionation procedure.

Amaranth was successively subjected to ether extraction, followed by amylase digestion after autoclaving, to fractionate the active material(s). These underlined fractions were assayed for the activity of boosting hBD-2 mRNA induction in HFK cells / in the presence of *E. coli* powder.

第三節 結果

第一項 hBD-2 mRNA 検出系の確立

我々は、加熱処理した大腸菌体粉末が、培養した HFK 細胞の hBD-2 レベルを著しく誘導すること (13) を、mRNA の測定により再確認した (data not shown)。大腸菌による hBD-2 mRNA 誘導効果を positive control として、我々は、HFK 細胞中の hBD-2 mRNA レベルを増加させる食品の迅速で高感度なスクリーニングを可能とする、リアルタイム定量 RT-PCR 測定系を確立した。このアッセイで測定可能な hBD-2 mRNA 濃度の範囲は、プラスミドベクターにクローニングした standard hBD-2 cDNA の希釈系列を用いることによって評価した。

standard hBD-2 cDNA の希釈系列を用いたリアルタイム定量 RT-PCR 測定系の代表的な結果を、Figure 12 に示した。蛍光は Taq polymerase の 5'-3' exonuclease 活性によって、hBD-2 cDNA に結合したプローブの FAM と TAMRA の標識された断片が分解されて生成され、蛍光強度は増幅された hBD-2 cDNA の量に反映する。増幅反応が進むにつれて hBD-2 cDNA 断片が増加していくことにより、5'-3' exonuclease 反応の速度、つまり蛍光の生成速度が最大になり、プラトーに達する (Figure 12, panel A)。この結果から、測定に供した cDNA 濃度が高いほど、蛍光が検出可能になるのに必要な増幅サイクル数は減少していく事を示している。任意の ΔR_n ($\Delta R_n = 2 \times 10^{-1}$, つまり 5'-3' exonuclease 活性の最大反応速度の約 20%) に達する増幅サイクル数と、供した cDNA の濃度のログは逆相関を示し、

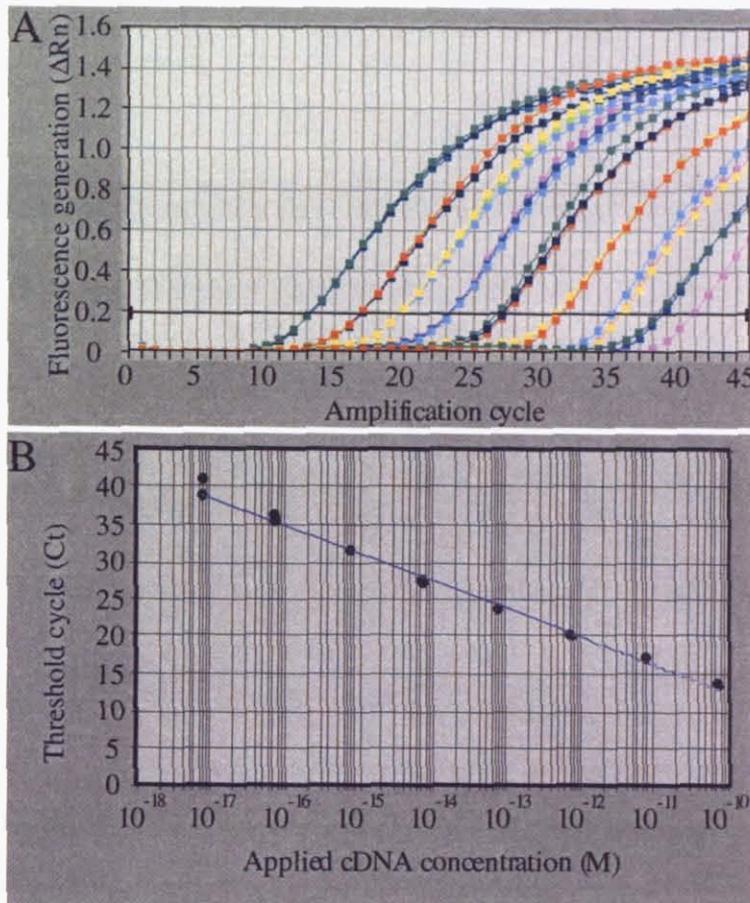


Figure 12. Typical results of real-time quantitative PCR assay with standard hBD-2 cDNA.

The assay was performed with standard hBD-2 cDNA of different concentrations (8×10^{-18} - 8×10^{-10} M), which were prepared by serial 10-fold dilutions. The relationship between fluorescence generation (ΔR_n) and amplification cycle is shown (panel A).

The logarithm of applied cDNA concentration was plotted against the threshold amplification cycle (Ct) required to reach an arbitrary ΔR_n level ($\Delta R_n = 2 \times 10^{-1}$, i.e., about 20% of the maximal velocity of the 5'-3' exonuclease reaction; indicated by a horizontal solid line in panel A) (panel B).

Results of triplicate measurements were superimposed.

相関係数は $r^2=0.995$ であった (Figure 12、panel B)。この結果から、この測定系で hBD-2 mRNA レベルを、 8×10^{-18} M (37 サイクル増幅) および 8×10^{-10} M (13 サイクル増幅) の濃度範囲で、正確に決定することが出来る事が明らかとなった。つまり、standard hBD-2 cDNA を用いて測定することによって、刺激した HFK 細胞中の hBD-2 mRNA レベルを決定することが可能となった。

第二項 hBD-2 誘導効果における食品由来微生物の効果

hBD-2 mRNA レベルを増加させる事の出来る食品由来の微生物を検討するため、我々は種々の微生物をスクリーニングし、試験した食品由来の微生物の中で酵母が最も顕著な HFK 細胞中の hBD-2 mRNA 誘導効果を示すことを見出した。

酵母粉末を 5 mg/ml の終濃度への培地添加により、HFK 細胞中の hBD 2 mRNA の誘導レベルは未刺激時と比較して、大腸菌での刺激と同程度までに達する約 40 倍に増加した (data not shown)。hBD-2 mRNA 誘導の原因となる酵母中の成分を同定するために、酵母粉末を水で抽出し、遠心分離によって水溶性画分と不溶性画分に分離し、そして各画分に対して誘導活性の試験を行った。測定の結果、hBD-2 mRNA 誘導活性は本質的に不溶性画分に存在した (Figure 13)。酵母から hBD-2 mRNA 誘導活性成分を可溶化するための DMSO を含む幾つかの有機溶媒による抽出は成功しなかったことから、細胞壁画分のような酵母中の不溶性の成分が HFK 細胞刺激の活性成分であることが示唆された。加熱処理した微生物の接触や、上記で述べたようなそれらの不溶性の画分の接触と同様に、hBD-2 誘導はヒトの細胞に於いては微生物による感染に対して起こる事 (53) は知られている (Figure 13)。hBD-2 誘導に関与する成分が、微生物の細胞質成分やそこから分泌されるものよりも表面に位置することはより合理的であると考えらる。

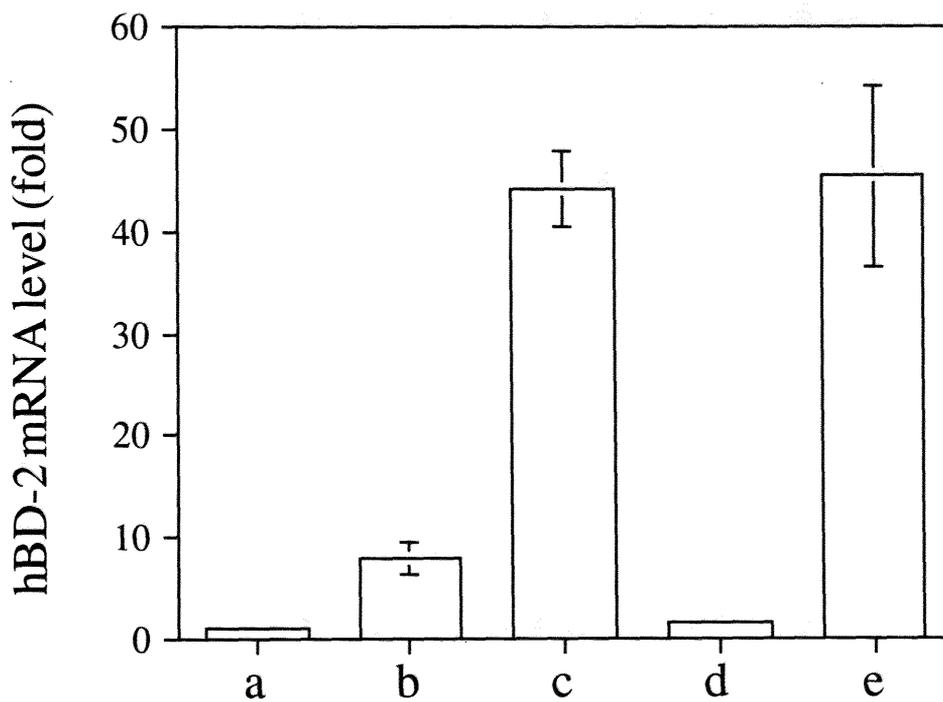


Figure 13. The effects of yeast powder on hBD-2 mRNA induction in HFK cells.

Heat-inactivated yeast powder, as well as its water-soluble and -insoluble fractions, was examined for activity of hBD-2 mRNA induction. The total RNA extracted from HFK cells after 16-h stimulation with each test material was subjected to reverse transcription. The resulting cDNA was quantified for hBD-2 and GAPDH by the TaqMan PCR method. The amount of hBD-2 cDNA determined was standardized with that of GAPDH cDNA in each test, and the induction effect was expressed in terms of increment fold as compared with the nonstimulated level. The stimulation with *E. coli* was shown for comparison. The stimulation effects with (a) no additive, (b) 0.75 mg/ml *E. coli*, (c) 5 mg/ml whole yeast, (d) 5 mg/ml water-soluble fraction of yeast, and (e) 5 mg/ml water-insoluble fraction of yeast, are shown. The error bar indicates the standard deviation for triplicate measurements.

第三項 大腸菌と穀物による hBD-2 発現に対する相乗的な共刺激効果

さらに我々は、様々な微生物由来以外の食品より、HFK 細胞中の hBD-2 mRNA 誘導が可能なものをスクリーニングした。アマランス、アワ、ダイズ、およびゴマの様な数種類の穀物の粉末と大腸菌を、HFK 細胞に対して共刺激する事により、hBD-2 mRNA レベルを大腸菌のみで達成するものよりも遙かに高く増加させることが分かった。0.2-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアマランス、アワ、ダイズ、およびゴマ粉末の共刺激による hBD-2 mRNA レベルの増加は、それぞれ 6.1、2.5、3.3、および 3.3 倍であり、大腸菌単独での値よりも高値を示した (Figures 14~17, *solid bars*)。hBD-2 mRNA レベルは無刺激時と比較して、大腸菌のみでの増強効果は 10 倍程度であるのに対して、HFK 細胞に対する *E. coli* と穀類粉末による相乗的な刺激によって 25-33 倍高くなった。しかしながら、上記の穀類の粉末は、HFK 細胞に対して大腸菌を加えない場合は、hBD-2 mRNA の誘導効果は見られなかった (Figures 14~17, *open bars*)。これらの結果は、穀類の粉末は、微生物依存的な hBD-2 mRNA 誘導活性を増強することを示している。

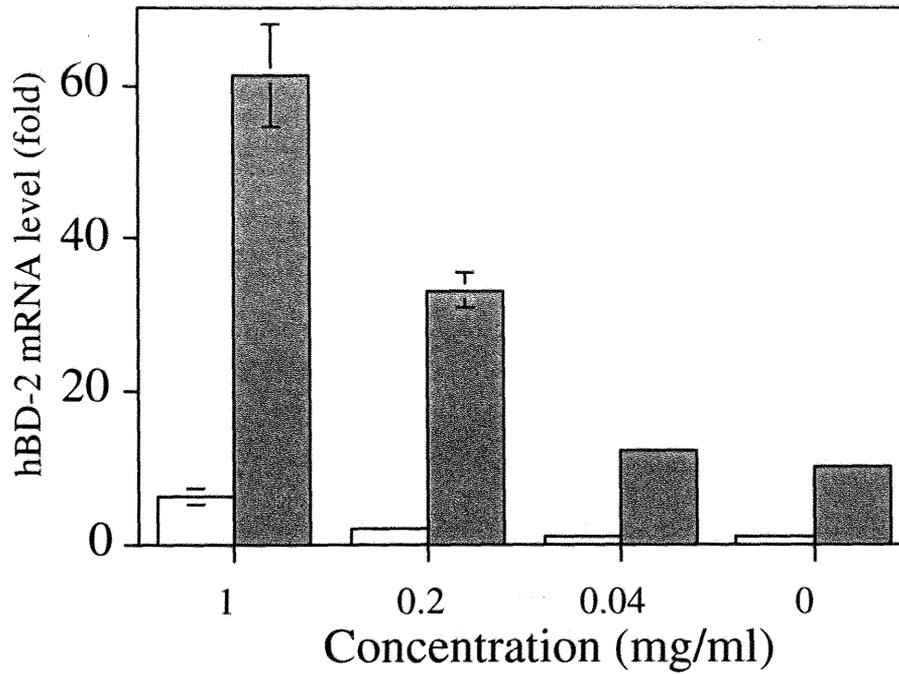


Figure 14. Effects of stimulation with amaranth grain powder on the level of hBD-2 mRNA in HFK cells.

HFK cells were cultured with the autoclaved suspension of pulverized amaranth grain, in the presence (solid bars) and absence (open bars) of 0.5 mg/ml sterilized *E. coli* powder. The amount of hBD-2 cDNA determined was standardized with that of GAPDH cDNA in each test as described in Figure 13. The error bar indicates the standard deviation for triplicate measurements.

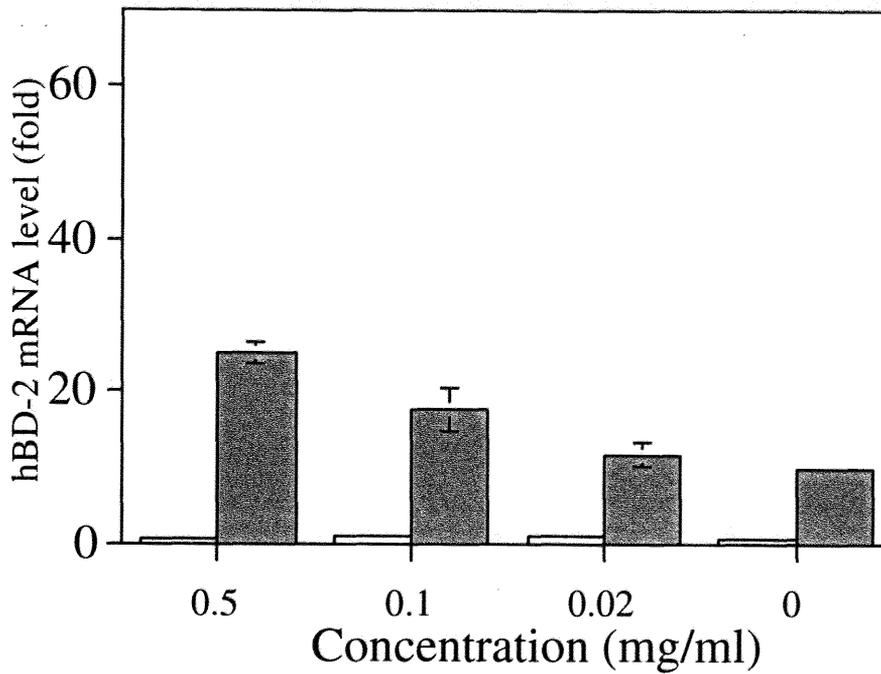


Figure 15. Effects of stimulation with millet grain powder on the level of hBD-2 mRNA in HFK cells.

HFK cells were cultured with the autoclaved suspension of pulverized millet grain, in the presence (solid bars) and absence (open bars) of 0.5 mg/ml sterilized *E. coli* powder. The amount of hBD-2 cDNA determined was standardized with that of GAPDH cDNA in each test as described in Figure 13.

The error bar indicates the standard deviation for triplicate measurements.

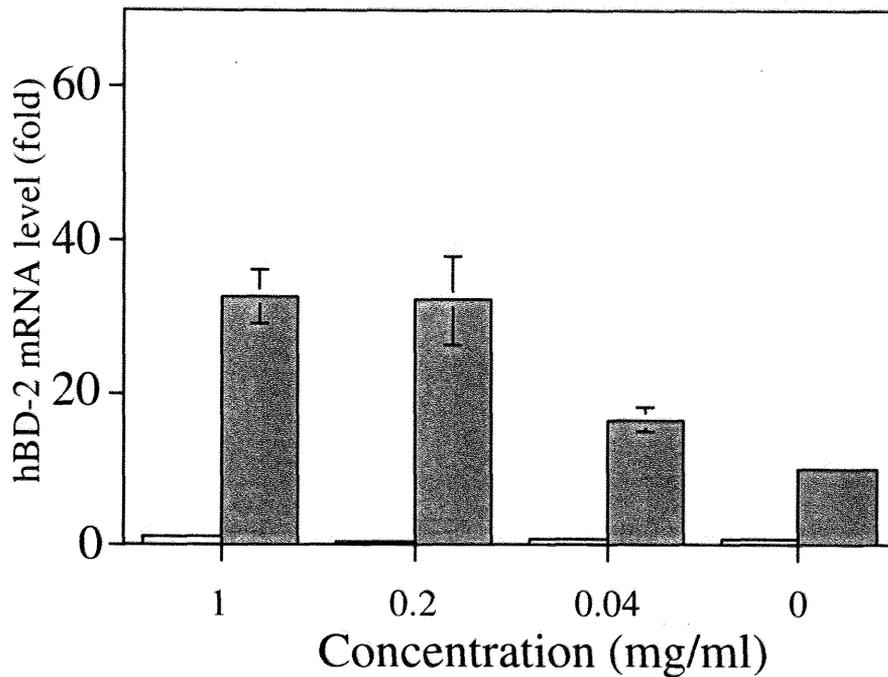


Figure 16. Effects of stimulation with soybean grain powder on the level of hBD-2 mRNA in HFK cells.

HFK cells were cultured with the autoclaved suspension of pulverized soybean grain, in the presence (solid bars) and absence (open bars) of 0.5 mg/ml sterilized *E. coli* powder. The amount of hBD-2 cDNA determined was standardized with that of GAPDH cDNA in each test as described in Figure 13.

The error bar indicates the standard deviation for triplicate measurements.

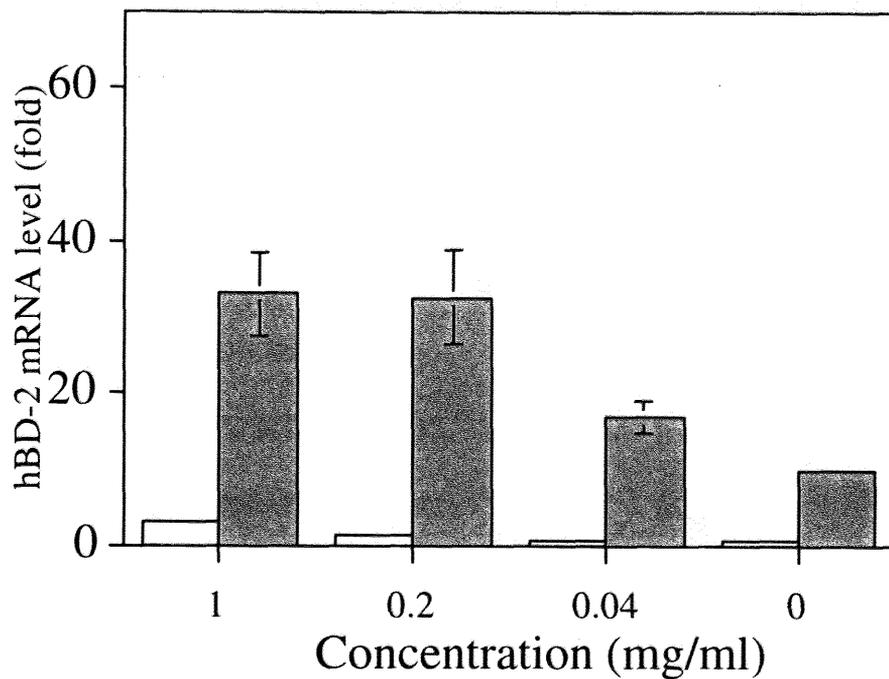


Figure 17. Effects of stimulation with sesame grain powder on the level of hBD-2 mRNA in HFK cells.

HFK cells were cultured with the autoclaved suspension of pulverized sesame grain, in the presence (solid bars) and absence (open bars) of 0.5 mg/ml sterilized *E. coli* powder. The amount of hBD-2 cDNA determined was standardized with that of GAPDH cDNA in each test as described in Figure 13. The error bar indicates the standard deviation for triplicate measurements.

第四項 アマランス中の hBD-2 増強活性成分の分画

アマランスによる誘導増強効果が穀類の中で最も高かったため (Figure 14)、hBD-2 誘導効果を増強することの出来るアマランス粉末中の活性成分の分画を試みた。アマランス穀粒の主要成分は、デンプン (56-78%) と油脂 (6.5-12.5%) である (54) ことから、活性成分の分離のため、アマランス粉末に対して連続的にエーテル抽出とオートクレーブ後のアミラーゼ処理を行った。分画操作の流れを Figure 11 に示す。アマランス粉末のエーテル抽出によって、全重量の約 10% の脂溶性成分が分離された。しかしながら、大腸菌との共刺激による試験で、エーテル抽出によって得られた成分中には、HFK 細胞中の hBD-2 mRNA の誘導を増強する成分はないことが示された (Figure 18)。

乾燥重量で約 90% を占めるエーテル抽出によって抽出されなかった残渣を、水に懸濁しオートクレーブした際、可溶化したデンプンにより粘度が高まり、その為、遠心分離による不溶性成分の分離が阻害された。アミラーゼ処理によってオートクレーブ処理したエーテル非抽出画分の粘性は効果的に減少し、遠心分離により不溶性画分の分離が可能であった。アミラーゼ処理後の不溶性画分と水溶性画分と同時にアミラーゼ処理前のエーテル抽出画分および非抽出画分について、大腸菌末の存在下で HFK 細胞中の hBD-2 mRNA 誘導の増強活性を試験した。この試験により、大腸菌のみでの刺激と比較して、エーテル抽出画分のアミラーゼ処理前と処理後の共刺激による hBD-2 mRNA 誘導増強活性は、それぞれ 2.3 および 3.5 倍であ

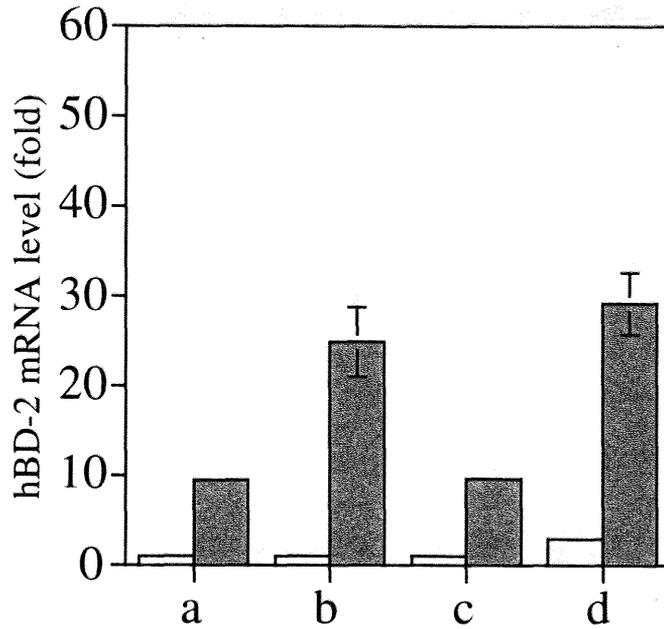


Figure 18. Effects of stimulation with amaranth fractions on hBD-2 mRNA enhancement in HFK cells. (1)

The ether-extractable and -unextractable fractions of amaranth powder were suspended in water and examined for their activity to enhance hBD-2 mRNA level in HFK cells, where the stimulation of the cells was performed in the presence (solid bars) and absence (open bars) of 0.5 mg/ml sterilized *E. coli* powder. The effects of (a) no addition, (b) 0.2 mg/ml amaranth powder, (c) ether-extractable fraction, corresponding to (b), and (d) ether unextractable fraction, corresponding to (b), are shown. The error bar indicates the standard deviation of triplicate measurements

ることが示された (Figure 19)。同時に、大腸菌のみでの刺激と比較して、エーテル抽出アミラーゼ処理後の水溶性画分と不溶性画分の共刺激による hBD-2 mRNA 誘導増強活性は、それぞれ 3.7 および 1.0 倍であった。これらの結果から、穀類の増強活性は本質的に不溶性の残渣に有ることが示唆された (Figure 19)。アマランス粉末は、エーテル抽出およびアミラーゼ処理後に、hBD-2 mRNA 誘導増強活性を増加する傾向にあった (Figures 18 ~19)。

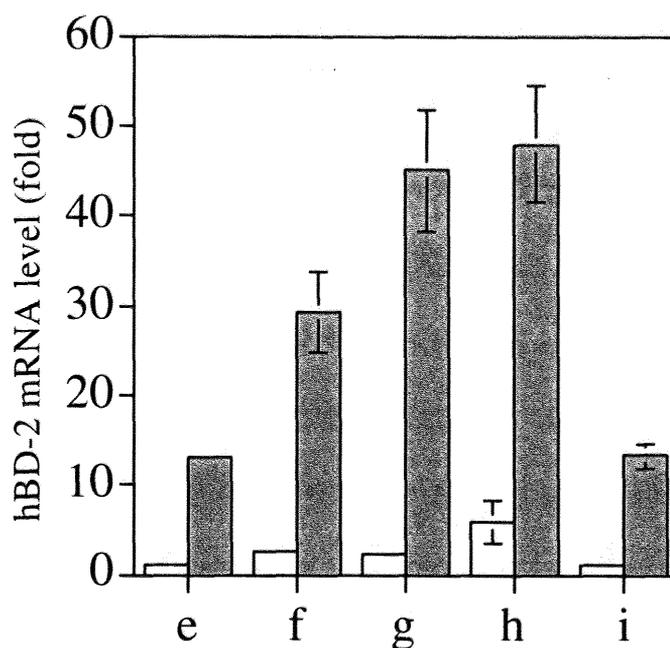


Figure 19. Effects of stimulation with amaranth fractions on hBD-2 mRNA enhancement in HFK cells. (2)

The ether-unextractable fraction of amaranth powder was subjected to amylase digestion, and the soluble and insoluble fractions were examined for their activity to enhance hBD-2 mRNA level in HFK cells in the presence (solid bars) and absence (open bars) of 0.5 mg/ml sterilized *E. coli* powder.

The effects of (e) no addition, (f) ether-unextractable fraction before amylase treatment, (g) ether-unextractable fraction after amylase treatment, (h) insoluble fraction after amylase treatment and (i) soluble fraction after amylase treatment, are shown.

The error bar indicates the standard deviation of triplicate measurements

第四節 考察

第一項 測定系の特徴

我々は、hBD-2 mRNA レベルを増幅する活性を持つ食品のスクリーニングを可能とする、迅速で高感度なリアルタイム定量 RT-PCR 測定法を確立した。リアルタイム PCR を使った hBD-2 mRNA の定量方法は、既に Lehmann らによって報告されている (55) が、本論文で報告している方法は、優れた再現性と同時に高感度と正確性を提供するものである。この試験方法は、Lehmann らの方法よりも 500 倍の高感度である、 8×10^{-18} および 8×10^{-10} M の広い範囲での mRNA 濃度の測定を可能とした (Figure 12)。reverse primer への exon-intron 結合部の導入によって、genomic DNA 由来の hBD-2 遺伝子の増幅の可能性を排除することができ、DNase 処理を除いた簡便な試験方法を可能とした。

standard hBD-2 cDNA によるキャリブレーションによって試験の再現性と正確性が保証された。hBD-2 mRNA/GAPDH mRNA 比を算出して補正を行うことによって、培養細胞の培養ロット差あるいはウェル間差における、抽出した total RNA の絶対量を変動させる可能性を持つ初代培養の HFK 細胞を使うこの測定法の唯一の弱点を除外する事が出来た。

hBD-2 mRNA を初代培養の HFK 細胞と同等以上に発現できる細胞株の検索を試みたが、検討した全ての株に於いて HFK 細胞よりも hBD-2 mRNA の発現量は低かった。現在我々は、hBD-2 発現の高いままの HFK 細胞の不死化を試みている。

第二項 食品関連素材からの hBD-2 の誘導

本研究では、我々は hBD-2 mRNA 誘導活性を持つかもしれない食品関連微生物に対してスクリーニングを行ない、そして、5 mg/ml の酵母粉末による HFK 細胞刺激が、無刺激時に対して約 40 倍の hBD-2 mRNA を誘導する事が出来ることを見出した。この酵母による誘導活性は、大腸菌による刺激と同程度顕著であった。ここまで行われてきた hBD-2 誘導効果の研究は、病原性の微生物に集中しており、この誘導に関しては、特にグラム陰性菌は、病原性の酵母 (*C. albicans*) と同じく、効果があることが知られていた(13)。

パン酵母 (*S. cerevisiae*)、ヨーグルトの乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、大豆発酵の納豆菌 (*B. subtilis* var. *natto*) の様に食品の発酵での微生物利用は、世界中の様々な食文化の中で長い歴史がある。このような食品関連の微生物が、hBD-2 発現を刺激することにより生体防御にとって重要な役割を果たしているかもしれないと言うことは、特にそのような食品中の微生物が直接接触する hBD-2 産生細胞がある口腔や消化管において可能性が高い。

この研究で強調されるのは、病原性微生物だけではなく、パン酵母についても hBD-2 mRNA を誘導でき、酵母は微生物感染に対する人体の防御のできる機能性食品の開発にとって有望な成分の候補である事である。本質的に hBD-2 を誘導する酵母中の活性は不溶性画分中に存在することが明らかとなった事は、この活性に関与する成分は細胞壁に局在することを示

唆している (Figure 13)。生菌の感染に対する応答として、hBD-2 が細胞中で誘導されることは知られている為(53)、上記で述べたような分画実験の結果は、hBD-2 誘導に関わる成分が微生物の細胞質や分泌物中よりむしろ表面に局在することを矛盾なく示唆している。

本研究のもう一つの重要な発見は、アマランス、アワ、ダイズ、およびゴマの様ないくつかの穀類がヒトの細胞に対して大腸菌との共刺激によって hBD-2 mRNA の誘導を顕著に増強することである。穀類の粉末による増強効果は、大腸菌のみの効果と比較して 2.5-6.1 倍の hBD-2 mRNA 誘導であった (Figures 14~17)。一方、大腸菌無しではこれらの穀類には hBD-2 mRNA 誘導効果はなかった。これらの結果は、これらの穀類が hBD-2 発現増強によって病原性微生物に対する生体防御に参加できることを示唆している。

アマランス穀粒粉末にたいするエーテル抽出およびアミラーゼ処理の数段階の分画の結果、アマランス穀粒の増強活性は本質的に不溶性画分に有ることがわかった (Figures 18, 19)。DMSO を始めとする様々な抽出溶媒で、アマランス穀粒の活性成分の可溶化の全ての試みは成功しなかったが、活性成分の分析をさらに押し進めることにより、有用性に優れた活性成分を得ることが出来ると考える。

第三項 NF- κ B pathway の活性化を経た hBD-2 の誘導

ヒトの Toll-like receptors (TLRs) は、*Drosophila* の生体防御に必要な Toll receptor のホモログとして発見され(56)、この TLRs は獲得免疫の一部と言うよりも自然免疫の key molecule と考えられている。TLRs 分子群は、LPS(57)、 β -グルカン(58)、幾つかのマンノース含有炭水化物(59)、ペプチドグリカン(60)、および細菌由来 DNA(61)の様な、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識することで、病原微生物の侵入の可能性を宿主に対して警告することもまた報告されている。

TLRs 分子群の発現や機能については、様々な血球系細胞では示されているものの、非血球系細胞での同様な研究報告はほとんどない。しかしながら、ヒトの角化細胞も、PAMPs 認識機能を有する TLRs を発現する事が出来ることを最近 Song らが報告した(62)。

TLRs 分子群のシグナル伝達は核内転写因子である NF- κ B を介するといふことは知られている(63)。さらに、hBD-2 遺伝子の上流プロモーター領域には NF- κ B response element が存在する(64)。従って、微生物の刺激による hBD-2 の誘導は、NF- κ B pathway の活性化(65)と同時に起こる。

食品由来の酵母による hBD-2 mRNA 誘導が成功したことによって、非病原性微生物の中の何らかの PAMPs 様成分が、病原性微生物と類似の方法で TLRs 分子群によって認識されている可能性が高い。

一方、穀粒粉末は大腸菌の存在しない場合の hBD-2 mRNA 誘導活性はな

かったことから (Figures 14~17)、これらの穀類由来の活性成分は、TLRs 分子群に認識されていないと考えられる。穀粒の増強活性を引き起こすメカニズムとして、hBD-2 mRNA の誘導増強は、TLRs から NF- κ B への大腸菌認識シグナルを伝達する MyD88(66)、IRAK(67)、および TRAF6(68)の様な下流のシグナル伝達分子群の穀類による活性化であると考えられる (Figure 20)。もう一つの穀類による活性化の候補としては、Krisanaprakornkit の研究によって、NF- κ B をブロックした中で、MAP-kinase pathway の活性化によって hBD-2 は誘導される事が示された(51)ことから、NF- κ B よりむしろ p38、JNK および ERK の様な分子を介した転写因子 AP-1 の活性化による、MAP-kinase pathway の活性化(69)が考えられる。上記の様に異物認識のシグナル伝達分子の中で、何れかの分子が穀物により活性化されることで、誘導増強に関わっていると考えられる。

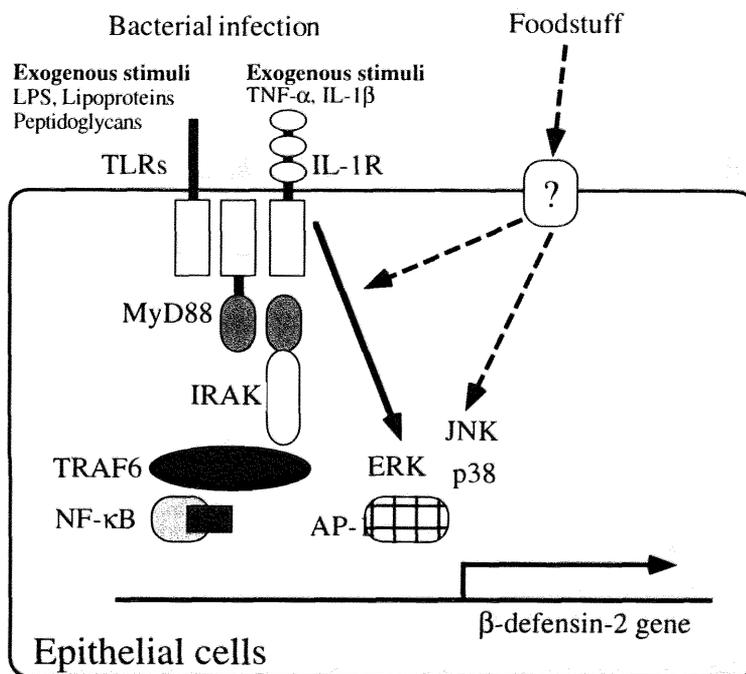


Figure 20. Putative cellular pathways of food-mediated defensin expression.

The diagram shows the putative pathways involved in food-mediated hBD-2 expression. The schematic was assembled using gene expression data from food and bacterial treatment and previous literature.

第四項 本研究の応用

本研究の結果は、アマランス、アワ、ダイズ、およびゴマは、微生物のない場合は hBD-2 mRNA の誘導効果を持たないが、微生物の感染が成立している場合は、hBD-2 mRNA の発現を増強出来ることを明らかにした。上記で述べた食品による HFK 細胞内の hBD-2 mRNA の誘導と増幅に関する発見は、*in vivo* での効果を確認する必要があるものの、口腔や消化器官内では食物が直接接触出来ることから、有効に働く可能性が高いと考えられる。つまりこれらの誘導増強システムを利用する、口腔、皮膚、呼吸器その他の組織に於いて微生物感染に対して体を防御する事の出来る機能性食品の開発の新たな可能性を開いた。このような誘導増強活性を持つ穀類を日常的に摂取することによって、細菌感染に対する応答に高いレベルの敏速な hBD-2 mRNA の誘導が可能な状態に体を維持することができ、人の健康維持に役立つと考えられる。さらに、これらの穀類や酵母のような食用微生物を含む食品の相乗的な誘導効果を持つ組み合わせを日常摂取することで、口腔、腸管上皮細胞中の hBD-2 mRNA 誘導効果を促進する事が出来る可能性が高いと考えられる。この活性に関連する機能性食品の開発は現在進行中である。

第四章 総括

hBD-2 の有用性については、既に様々な報告がなされているが、抗菌活性については、グラム陰性菌とくに大腸菌や緑膿菌、真菌ではカンジダ等に対する高い抗菌効果が報告されている。これらの菌は日和見感染時によく見られる菌であることから hBD-2 の日常的な潜在的有用性がわかる。本研究では、これらの日和見菌以外に新たにう蝕性レンサ球菌に対して抗菌活性を持つことを見出し、一方で常在性のレンサ球菌に対しては影響がないことから hBD-2 の口腔内での有効性についても明らかとなった。

さらに、hBD-2 は、抗菌活性以外でも樹状細胞刺激活性を持つことから、感染初期における免疫応答にも自然免疫と獲得免疫の橋渡しとして重要な役割を担っている事が分かっている。これらのことから、体内での hBD-2 産生を高めることは健康維持にとって有用であり、我々は、日常的な食品摂取によってこの様な hBD-2 産生を高める事が出来れば生体防御にとって有効な機能性食品としての開発が可能であると考えた。

そこで、hBD-2 産生を上皮系細胞で測定できる *in vitro* 実験系を確立し、食材をスクリーニングしたところ、パン酵母や穀類に誘導増強活性が存在することが明らかとなった。更に、穀類に於いてはそれ自身では hBD-2 誘導刺激活性を持たないにも関わらず、菌体成分と同時に添加することにより誘導効果の増強を引き起こす活性を持つことが明らかとなった。これらの誘導および増強活性を利用して、自然免疫を活性化することによって感染の防御能を高めておくことが出来ると思われる。

今後、日本は高齢化社会に入り、多くの高齢者は加齢と共に免疫力が低下し、感染症に罹患しやすくなる。本研究で見出されたような成分を利用した自然免疫誘導増強食品の摂取が、病気にかかりにくい体を維持し、健康管理を行っていく上で重要であると思われる。

要旨

阻止円形成試験による hBD-2 の細菌に対する生育阻害の検討によって、hBD-2 がヒトの口腔で主要なう蝕原因菌とされている *Streptococcus mutans* と *S. sobrinus* に対して抗菌効果を有することを明らかにした。

一方、ヒトの口腔で主要な常在細菌である *S. mitis* は、mitis group 内の *S. constellatus*、*S. anginosus* および *S. intermedius* を含む他の菌種は高感受性であるにもかかわらず、入手先の異なる 2 株を試験したところ hBD-2 に対して抵抗性があることがわかった。hBD-2 は、非う蝕原性の菌に対して多少は効果を示すが、う蝕原性レンサ球菌に対して生育を阻害し、口腔からう蝕の原因を除去する事によって虫歯の予防に利用できる可能性がある。

S. mitis および *S. anginosus* の hBD-2 に対する高い抵抗性は、3,4-Dichloroisocoumarin (3,4-DCI) の様な proteinase inhibitor の存在下で阻止円形成試験を行うことによって減少し、高感受性に変わった。この現象は tosylphenylalanine chloromethylketone (TPCK)、や 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) では弱い傾向にあった。

これらの結果は、chymotrypsin-like serine proteinase 活性による hBD-2 に対する口腔細菌における生存機構の発生を示唆しており、細菌は hBD-2 に対してタンパク分解による自己防御機構を獲得してい

ることが考えられた。

我々は、ヒト表皮角化細胞中の hBD-2 レベルを増加させる食品素材の迅速で高感度なスクリーニングを可能にする、リアルタイム定量 PCR 法を確立した。hBD-2 cDNA を標準として使うことによる hBD-2 mRNA の適正検出範囲は、 8×10^{-18} M (37-cycle 増幅) から 8×10^{-10} M (13-cycle 増幅) であった。この測定系によって、培養液への酵母粉末添加により細胞を刺激することで大腸菌による刺激と同様の誘導である、約 40 倍の hBD-2 mRNA レベルの増加が認められた。酵母中の活性成分は水に対して不溶性であった。

大腸菌とアマランス、アワ、ダイズ、ゴマの様な穀類との相乗的な細胞に対する共刺激によって、hBD-2 mRNA の誘導は大腸菌のみの刺激に対して 6.1、2.5、3.3、3.3 倍にそれぞれ顕著に増幅された。アマランス穀粒に対する数段階の分画の結果、エーテル抽出、およびアミラーゼ消化によってアマランス穀粒の誘導増強効果は不溶性の画分にあることが示された。食品成分による上皮細胞に対する顕著な hBD-2 mRNA 誘導増強効果は、口腔、皮膚、呼吸器官等への微生物感染に対して体を保護することのできる、機能性食品の開発の新たな可能性を開いた。

参考文献

1. Arai, S. 1989. 機能性食品 その概念と研究の現状. バイオサイエンスとインダストリー147:27-30.
2. Ganz, T., and Lehrer, R.I. 1995. Defensins. *Pharmacol Ther* 66:191-205.
3. Weinberg, A., S. Krisanaprakornkit, and B. A. Dale. 1998. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:399-414.
4. Ganz, T., and Lehrer, R.I. 1994. Defensins. *Curr Opin Immunol* 6:584-9.
5. Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, and T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11:105-28.
6. Martin, E., Ganz, T. and Lehrer, R.I. 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* 58:128-36.
7. Zhao, C., I. Wang, and Lehrer, R.I. 1996. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396:319-22.
8. McCray, P. B., Jr., and L. Bentley. 1997. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:343-9.

9. Valore, E. V., C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633-42.
10. Bensch, K. W., M. Raida, H. J. Magert, P. Schulz-Knappe, and W. G. Forssmann. 1995. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368:331-5.
11. Goldman, M. J., G. M. Anderson, E. D. Stolzenberg, U. P. Kari, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88:553-60.
12. Yamaguchi, Y., T. Nagase, R. Makita, S. Fukuhara, T. Tomita, T. Tominaga, H. Kurihara, and Y. Ouchi. 2002. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 169:2516-23.
13. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1997. A peptide antibiotic from human skin [letter] [see comments]. *Nature* 387:861.
14. Singh, P. K., H. P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B. A. Conway, E. P. Greenberg, E. V. Valore, M. J. Welsh, T. Ganz, B. F. Tack, and P. B. McCray, Jr. 1998. Production of beta-defensins by human airway epithelia [published erratum appears in *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 1999 Mar 2;96(5):2569]. Proc Natl Acad Sci U S A 95:14961-6.
15. Bals, R., X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 1998. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874-80.
 16. Mathews, M., H. P. Jia, J. M. Guthmiller, G. Losh, S. Graham, G. K. Johnson, B. F. Tack, and P. B. McCray, Jr. 1999. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 67:2740-5.
 17. Schroder, J. M., and J. Harder. 1999. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31:645-51.
 18. Hiratsuka, T., M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, and S. Matsukura. 1998. Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249:943-7.
 19. van Wetering, S., P. J. Sterk, K. F. Rabe, and P. S. Hiemstra. 1999. Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunol* 104:1131-8.
 20. Krisanaprakornkit, S., A. Weinberg, C. N. Perez, and B. A. Dale. 1998. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect*

Immun 66:4222-8.

21. Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, A. Weinberg, R. P. Darveau, B. W. Bainbridge, and B. A. Dale. 2000. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 68:2907-15.
22. Bonass, W. A., A. S. High, P. J. Owen, and D. A. Devine. 1999. Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol* 14:371-4.
23. Quayle, A. J., E. M. Porter, A. A. Nussbaum, Y. M. Wang, C. Brabec, K. P. Yip, and S. C. Mok. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152:1247-58.
24. Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [see comments]. *Science* 286:525-8.
25. Garcia, J. R., A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R.

- Bals, and W. G. Forssmann. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 15:1819-21.
26. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-13.
27. Hardie, J. M., and P. D. Marsh. 1978. Streptococci and the human oral flora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 7:157-206.
28. Lehrer, R. I., M. Rosenman, S. S. Harwig, R. Jackson, and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137:167-73.
29. Qu, X. D., S. S. Harwig, A. M. Oren, W. M. Shafer, and R. I. Lehrer. 1996. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins. *Infect Immun* 64:1240-5.
30. Cole, A. M., and T. Ganz. 2000. Human antimicrobial peptides: analysis and application. *Biotechniques* 29:822-6, 828, 830-1.
31. Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura, and T. Ezaki. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus* [published erratum appears in *Int J Syst Bacteriol* 1995 Oct;45(4):882]. *Int J Syst Bacteriol*

45:406-8.

32. Whiley, R. A., and D. Beighton. 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 13:195-216.
33. Cole, A. M., T. Ganz, A. M. Liese, M. D. Burdick, L. Liu, and R. M. Strieter. 2001. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167:623-7.
34. Fernandez, R. C., and A. A. Weiss. 1996. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1041-3.
35. Nyvad, B., and M. Kilian. 1990. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 24:267-72.
36. Kilian, M., J. Reinholdt, H. Lomholt, K. Poulsen, and E. V. Frandsen. 1996. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *Apmis* 104:321-38.
37. Mandal, M., and R. Nagaraj. 2002. Antibacterial activities and conformations of synthetic alpha-defensin HNP-1 and analogs with one, two and three disulfide bridges. *J Pept Res* 59:95-104.
38. Raj, P. A., and A. R. Dentino. 2002. Current status of defensins and

- their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett* 206:9-18.
39. Brissette, C. A., and S. A. Lukehart. 2002. *Treponema denticola* Is Resistant to Human beta-Defensins. *Infect Immun* 70:3982-4.
40. Raj, P. A., K. J. Antonyraj, and T. Karunakaran. 2000. Large-scale synthesis and functional elements for the antimicrobial activity of defensins. *Biochem J* 347:633-41.
41. Peschel, A. 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10:179-86.
42. Smith, D. J., J. M. Anderson, W. F. King, J. van Houte, and M. A. Taubman. 1993. Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol Immunol* 8:1-4.
43. Huttner, K. M., D. J. Brezinski-Caliguri, M. M. Mahoney, and G. Diamond. 1998. Antimicrobial peptide expression is developmentally regulated in the ovine gastrointestinal tract. *J Nutr* 128:297S-299S.
44. Senpuku, H., A. Sogame, E. Inoshita, Y. Tsuha, H. Miyazaki, and N. Hanada. 2003. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* 49:301-9.
45. Sasaki, H., T. Ishizuka, M. Muto, M. Nezu, Y. Nakanishi, Y.

- Inagaki, H. Watanabe, and M. Terada. 1998. Presence of *Streptococcus anginosus* DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer. *Cancer Res* 58:2991-5.
46. Sakamoto, H., H. Naito, Y. Ohta, R. Tanakna, N. Maeda, J. Sasaki, and C. E. Nord. 1999. Isolation of bacteria from cervical lymph nodes in patients with oral cancer. *Arch Oral Biol* 44:789-93.
47. Diamond, D. L., J. R. Kimball, S. Krisanaprakornkit, T. Ganz, and B. A. Dale. 2001. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods* 256:65-76.
48. Fehlbaum, P., M. Rao, M. Zasloff, and G. M. Anderson. 2000. An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12723-12728.
49. Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-80.
50. Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76:1427-35.
51. Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, and B. A. Dale. 2002. Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells:

- the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol* 168:316-24.
52. Dunsche, A., Y. Acil, R. Siebert, J. Harder, J. M. Schroder, and S. Jepsen. 2001. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 30:154-8.
53. Wada, A., N. Mori, K. Oishi, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Hamanaka, M. Nagashima, I. Sekine, K. Ogushi, T. Niidome, T. Nagatake, J. Moss, and T. Hirayama. 1999. Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on *cag* pathogenicity island. *Biochem Biophys Res Commun* 263:770-4.
54. Guzman-Maldonado, H., and O. Paredes-Lopez. 1998. Functional Products of Plants Indigenous to Latin America: Amaranth, Quinoa, Common Beans, and Botanicals, p. 293-328. In G. Mazza (ed.), *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. Technomic Publishing, Pennsylvania.
55. Lehmann, O. J., I. R. Hussain, and P. J. Watt. 2000. Investigation of beta defensin gene expression in the ocular anterior segment by semiquantitative RT-PCR. *Br J Ophthalmol* 84:523-6.
56. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A

- human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7.
57. Ingalls, R. R., H. Heine, E. Lien, A. Yoshimura, and D. Golenbock. 1999. Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. *Infect Dis Clin North Am* 13:341-53, vii.
58. Czop, J. K., and J. Kay. 1991. Isolation and characterization of beta-glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 173:1511-20.
59. Fraser, I. P., H. Koziel, and R. A. Ezekowitz. 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10:363-72.
60. Jin, Y., D. Gupta, and R. Dziarski. 1998. Endothelial and epithelial cells do not respond to complexes of peptidoglycan with soluble CD14 but are activated indirectly by peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 from monocytes. *J Infect Dis* 177:1629-38.
61. Heeg, K., T. Sparwasser, G. B. Lipford, H. Hacker, S. Zimmermann, and H. Wagner. 1998. Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to

- immune cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:464-9.
62. Song, P. I., Y. M. Park, T. Abraham, B. Harten, A. Zivony, N. Neparidze, C. A. Armstrong, and J. C. Ansel. 2002. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 119:424-32.
63. Belvin, M. P., and K. V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:393-416.
64. Liu, L., L. Wang, H. P. Jia, C. Zhao, H. H. Q. Heng, B. C. Schutte, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz. 1998. Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222:237-44.
65. Becker, M. N., G. Diamond, M. W. Verghese, and S. H. Randell. 2000. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta -defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 275:29731-6.
66. Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp. 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 273:12203-9.
67. Wesche, H., X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark, and Z.

- Cao. 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 274:19403-10.
68. Wang, Q., R. Dziarski, C. J. Kirschning, M. Muzio, and D. Gupta. 2001. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun* 69:2270-6.
69. McDermott, E. P., and L. A. O'Neill. 2002. Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *J Biol Chem* 277:7808-15.

謝辞

本研究を進めるに当たり、情熱あふれる激励と懇切なるご指導を賜り、発表の機会を与えて下さった（株）森永生科学研究所社長 橋爪 秀一博士に深く感謝いたします。また、学位取得に当たり大変お世話になりました千葉大学理学部化学科 小山 範征教授に深く感謝いたします。

さらに本研究を進めるに当たり、基礎的な部分から懇切丁寧なご助言とご指導をいただいた森永製菓（株）研究所栄養機能開発研究室主任研究員 加藤 正俊博士に厚く御礼申し上げます。

口腔細菌の実験については、国立感染症研究所口腔科学部（現国立保健医療科学院口腔保健部）にて行われたものであり、同部長 花田 信弘博士、同室長 今井 奨博士、同研究員 江藤 亜紀子博士には大変お世話になりました。また、いろいろとご助言ご協力いただいた同研究員 矢野 明博士、現・奈良女子大学大学院 助手 森田 映子博士、株式会社 BML 研究員 井田 博久氏に感謝いたします。口腔保健部の全ての皆様に心より御礼申し上げます。

尚、本研究は筆者が森永製菓株式会社研究所 栄養機能開発研究室にて研究員として在籍時に行われたものであり、ご指導そしてご配慮いただいた同研究室室長 亀井 徳優博士を始め、栄養機能開発研究室の室員の皆さんに心より感謝いたします。

最後に、私の研究生活を経済的且つ精神的に支え、真の理解者として応援してくれた妻、陽子に感謝いたします。

2004年1月