

# アドレノメデュリンの抗菌作用による口腔バイオフィルムの形成抑制効果に関する研究

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス (HBS) 研究部

口腔保健支援学分野

教授 尾崎和美

(共同研究者)

徳島大学大学院 HBS 研究部 歯科保存学分野 助教 湯本 浩通

徳島大学大学院 HBS 研究部 歯科保存学分野 助教 細川 義隆

## はじめに

アドレノメデュリン (Adrenomedullin:以下, ADM) は 1993 年にヒト褐色細胞腫より発見された新規生理活性ペプチドであり, その後も血管新生作用あるいは関節リウマチの発症や進行の抑制作用など, 様々な免疫調節機構に参与していることが明らかにされつつある。我々もこれまでに, 関節リウマチと同様, 骨吸収を特徴とする炎症性疾患である歯周病の病変局所における ADM の発現を解析し, 歯周病の病態形成に参与する Th1 細胞浸潤と ADM との関連性を明らかにした<sup>1)</sup>。一方, ADM には抗菌作用があることも近年報告されており, 口腔細菌に対する抗菌効果についても, その解明と治療薬としての応用に期待が寄せられている。本研究では, バイオフィルム感染症であるう蝕と歯周病に焦点を当て, これら疾患の主要な原因菌に対する ADM および関連ペプチドの抗菌効果を検証するとともに, ADM を発現する形質転換株を作製し, その細胞粗抽出液から精製したタンパクの検証を行った。

## 対象と方法

### 1. ADM および関連ペプチドの口腔細菌に対する抗菌効果の検証

*Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* B13, *Lactobacillus casei* ATCC4646, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 および *Porphyromonas gingivalis* W83 を供試菌株とし, ADM (1-52) とその関連ペプチドである ADM (1-12, 13-52, 16-52 および 22-52) の抗菌効果 (連続希釈による最小発育阻止濃度測定) を, 96 穴プレートを用いた微量液体希釈法にて検証した。すなわち, ミュラーヒントンブロス (グラム陽性菌用) あるいはヘミンおよびビタミン K3 (メナジオン) を添加したブレインハートインフュージョンブロス (グラム陰性菌用) を用いて前培養した細菌懸濁液を, 同一培地で連続希釈した上記

の各ペプチドが  $100 \mu\text{l}$  添加されたウェル中に  $1 \times 10^4$  個の割合となるよう接種し、嫌気培養 ( $35^\circ\text{C}$ , 16~18 時間) を行った。そして各ウェル (連続希釈された各種濃度のペプチドが添加されたウェル) における細菌数の増加程度すなわち抗菌効果の程度を、分光光度計を用いて測定した吸光度として評価した。

## 2. ADM 発現形質転換株の作製

ADM を構成する 52 個のアミノ酸配列をコードする遺伝子 (dsDNA) を鋳型とし、制限酵素 (BamH I および EcoR I) を付加したプライマーを用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行い、増幅された PCR 産物を精製した。なお、プライマー (sense 鎖) は ADM (1-52) および関連ペプチドの 1 つである ADM (13-52) を上記の鋳型から増幅できるように設計した 2 種類を用いた。精製した PCR 産物を、その両端を上記の制限酵素で消化処理した上で、T4 DNA Ligase を用いて GST 融合タンパク発現用ベクターのマルチクローニングサイトへ組み込んだ。このベクターをコンピテントセル (*Escherichia coli* BL21 株) に形質転換した後、選択培地 (アンピシリン含有 Luria-Bertani 寒天培地) 上へ播種した。最後に、生育した形質転換株 (コロニー) 中のプラスミド内に目的の遺伝子がクローニングされていることを PCR で確認後、以下の実験に供した。

## 3. ADM および関連ペプチドの発現誘導ならびに検証

クローニングに成功した形質転換株を 0.2% グルコース添加 LB 液体培地にて予備培養し、至適な細胞密度になった時点でアラビノース (終濃度: 0.2%) および IPTG (終濃度: 0.5mM) を培地に添加し、続けて振盪培養 ( $37^\circ\text{C}$ , 4 時間) することによって GST 融合 ADM (1-52) および ADM (13-52) の発現を誘導した。

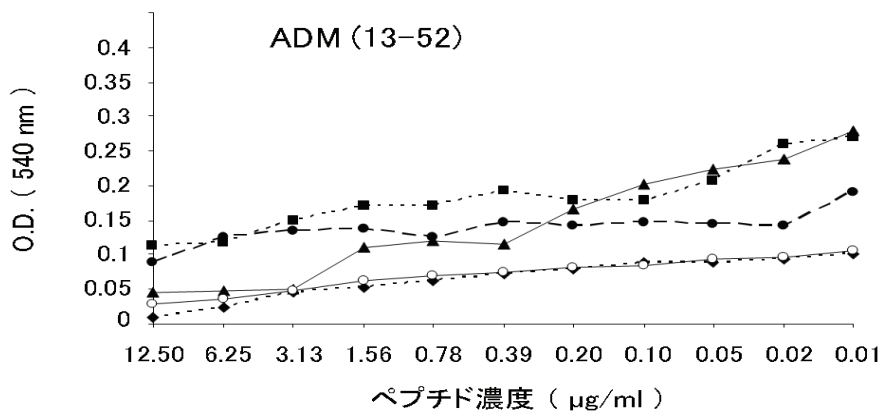
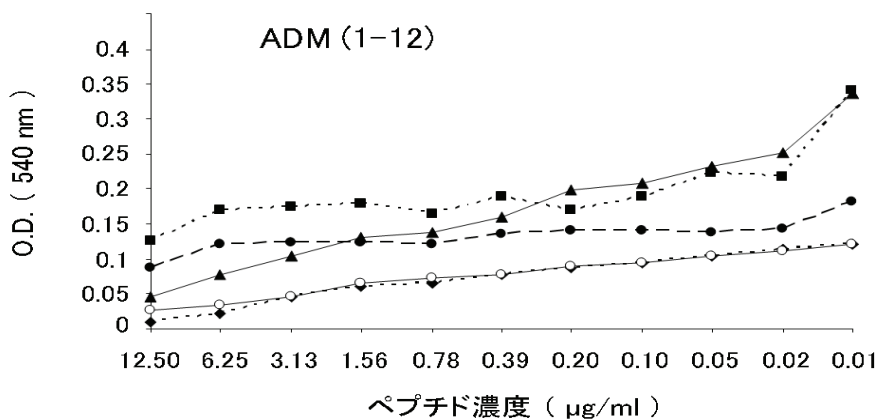
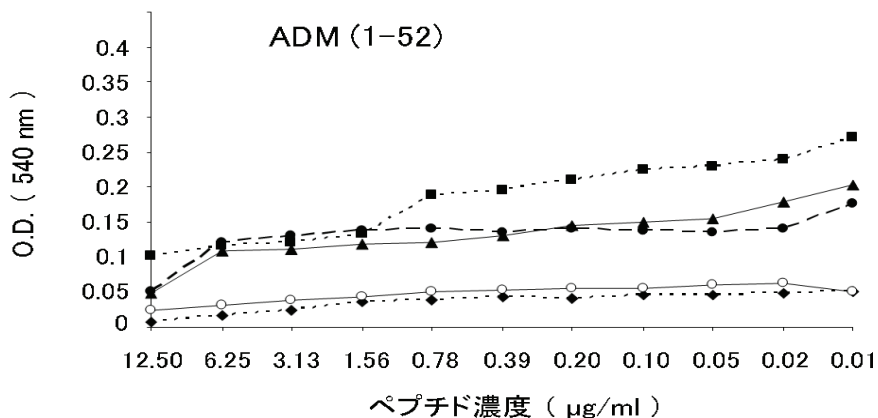
培養終了後の種々の処理を経て大腸菌から抽出した細胞粗抽出液 (タンパク質混合物) を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、目的タンパクの発現を確認した。さらに、磁性体粒子を用いて目的タンパクを精製した後、抗 ADM ウサギポリクローナル抗体を用いて Western Blot を行った。

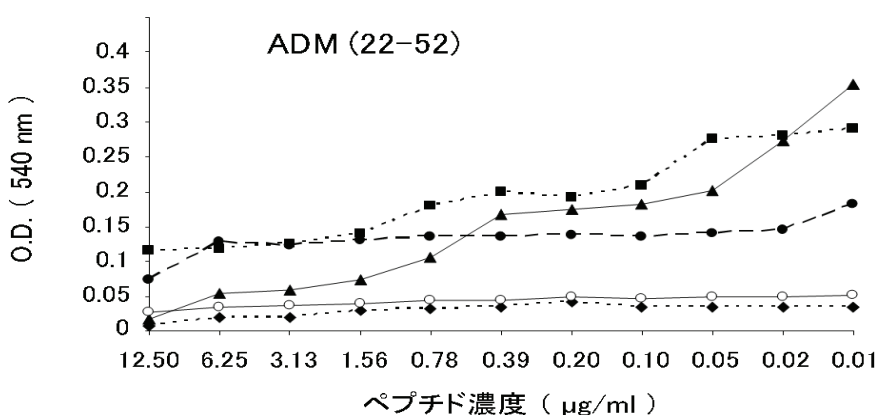
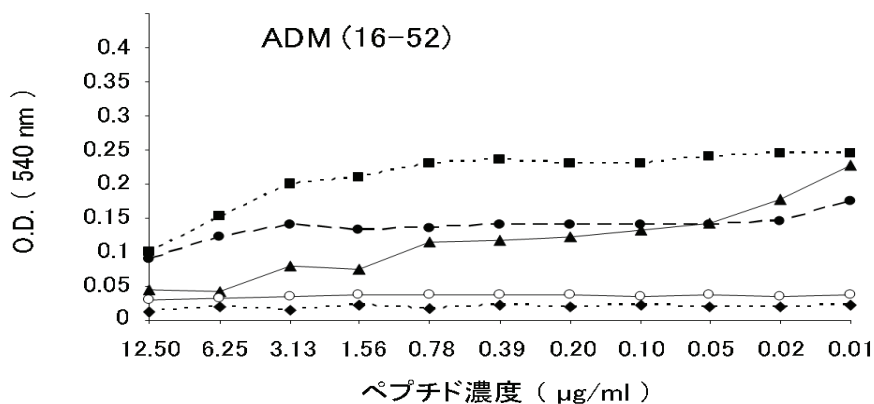
## 結果

### 1. 各種 ADM に対する抗菌効果

口腔細菌に対する ADM および関連ペプチドの抗菌効果の結果を図 1 に示した。総じて、グラム陽性菌である *S. mutans* および *S. sobrinus* に対しては、高濃度の ADM を添加した場合に強い静菌作用が認められたが、低濃度 ( $0.78 \mu\text{g/ml}$  以下) においてはその作用が比較的弱かった。また、同じグラム陽性菌である *L. casei* に対しては、低濃度の ADM においても、*Streptococcus* の 2 菌種より

強い静菌作用を示した。一方、グラム陰性菌である *P. gingivalis* の 2 菌種に対しては、いずれの濃度の ADM においても、グラム陽性の 3 菌種と比較して、より強い静菌作用を示した。本研究で使用した ADM および関連ペプチドのうち、実験に供した全ての細菌に対し、相対的に広範囲の濃度でより強い静菌作用を示したのは ADM (13-52) および ADM (16-52) であった (図 1)。





- ▲— *Streptococcus mutans* UA159
- ◆·· *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277
- *Streptococcus sobrinus* B13
- *Porphyromonas gingivalis* W83
- *Lactobacillus casei* ATCC4646

図 1. 各種 ADM の口腔細菌に対する抗菌効果

## 2. ADM 発現形質転換株の作製および精製した GST 融合タンパクの検証

ADM および関連ペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌でのタンパク発現を確認した結果を図 2 に示した。予備培養（誘導前）後のアラビノースおよび IPTG の添加に続く振盪培養（誘導後）によって GST 融合タンパクを発現させることに成功した（図 2A）。また、抗 ADM ウサギポリクローナル抗体を用いた Western Blot を行うことによって、発現誘導後に抽出したタンパク質混合物ならびに精製後の分画の双方に、ADM (1-52) および ADM (13-52) のアミノ酸配列が含まれていることが明らかとなった（図 2B）。

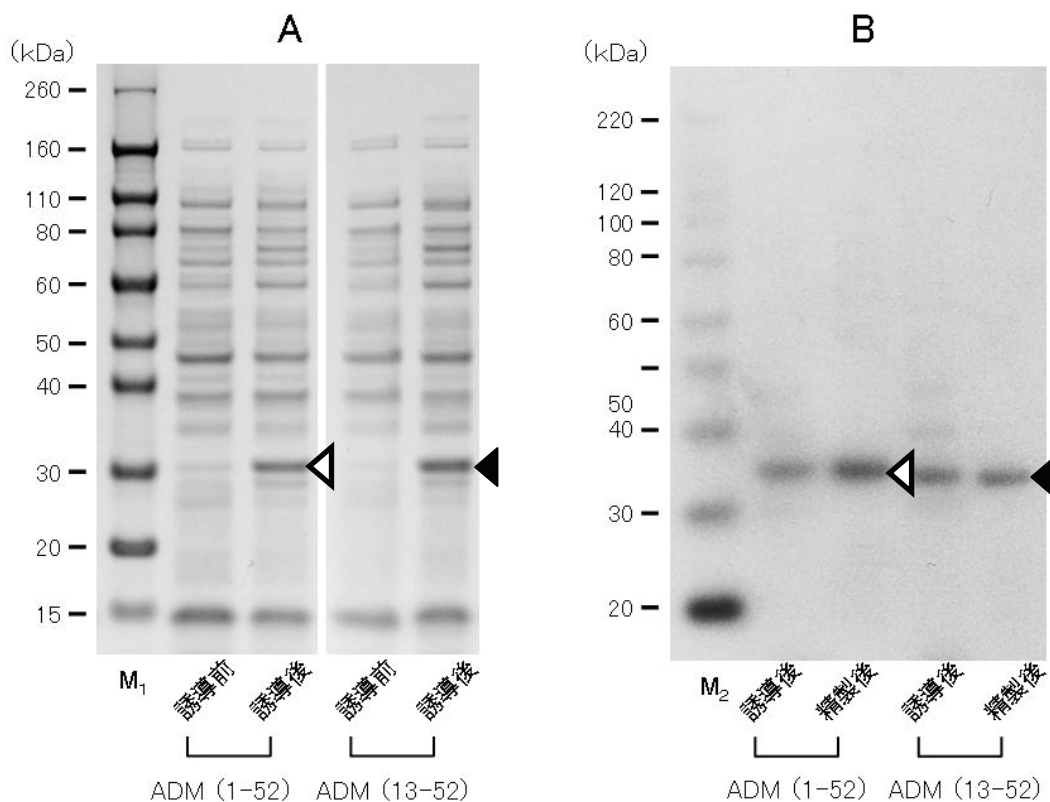


図 2. ADM 発現形質転換株における GST 融合 ADM の発現

(A) SDS-PAGE による ADM の発現 (CBB 染色)

(B) 抗 ADM ポリクローナル抗体を用いた Western Blot

◁ : GST 融合 ADM(1-52)      ◀ : GST 融合 ADM(13-52)

### 考察

ADM には抗菌作用があり、また defensin あるいは LL-37 と同様に、口腔組織においても発現していることがこれまでに報告されている<sup>2,3)</sup>。本研究においても、ADM (1-52) およびその関連ペプチドである ADM (13-52) と ADM (16-52) は、他のペプチドと比較して多くの細菌に対して相対的に広範囲の濃度で静菌作用を示した (図 1)。これは大腸菌に対する同様の結果と一致していた<sup>4)</sup>。

抗菌ペプチドの作用機序として、分子内に存在するジスルフィド結合に由来する陽性荷電が、陰性に荷電した細菌の膜構造に影響を与えて小孔を形成することで細胞傷害を引き起こすことが考えられている。本研究で用いたペプチドのうち、ジスルフィド結合が保存されている上記 3 種、特に立体構造的にジスルフィド結合がペプチド表層近くに位置すると思われる ADM (13-52) ならびに ADM (16-52) が、他のペプチドよりも強い静菌作用を示したことから、ADM の

抗菌作用も同様の機序によるものと考えられる。このような機序から、グラム陽性菌より薄い菌体膜構造を有するグラム陰性菌に対しては、ADMの静菌作用が強いことが推察され、今回の実験においてもこれを裏付ける傾向が示された(図1)。ADMおよびその関連ペプチドが種々の口腔細菌に対して広範囲の濃度で静菌作用を示したという結果は、これらのペプチドがう蝕あるいは歯周病の発症に関わる口腔バイオフィルムの形成に抑制的に働くことを示唆するものである。加えて、本研究により形質転換株によるADMの発現が可能となったことから、今後はその抗菌効果のみならず、口腔免疫の調節機構にADMがどのように関与しているのかをさらに詳細に検討していく必要があると考えられる。

## 要約

ADMの抗菌効果をその関連ペプチドとともに検証した結果、口腔細菌のうちグラム陰性菌に対する静菌作用がグラム陽性菌のそれよりも相対的に強いことが明らかとなった。これは、ADMが口腔バイオフィルムの形成に抑制的に働くことを示唆するものである。また形質転換株によるADMの誘導産生に成功し、その抗菌効果や免疫調節機構への関与に関する検討が可能となった。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご援助をいただきました財団法人大和証券ヘルス財団に厚く御礼を申し上げます。

## 文献

- 1) Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : Adrenomedullin suppresses tumor necrosis factor alpha-induced CXC chemokine ligand 10 production by human gingival fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.*, 152: 568-575, 2008.
- 2) Dale BA, Fredericks LP. : Antimicrobial Peptides in the Oral Environment: Expression and Function in Health and Disease. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 7: 119-134, 2005.
- 3) Kapas S, Bansal A, Bhargava V, Maher R, Malli D, Hagi-Pavli E, Allaker RP. : Adrenomedullin expression in pathogen-challenged oral epithelial cells. *Peptides*, 22: 1485-1489, 2001.
- 4) Allaker RP, Grosvenor PW, McAnerney DC, Sheehan BE, Srikanta BH, Pell K, Kapas S. : Mechanisms of adrenomedullin antimicrobial action. *Peptides*, 27: 661-666, 2005.