

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20610

研究課題名(和文) バイオフィーム新規制御法による歯周疾患予防

研究課題名(英文) Development of control system for periodontopathic biofilm using SspB peptide

研究代表者

伊藤 龍朗 (ITO, Tatsuro)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：60635126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SspB-歯周病原性細菌-ヒト唾液の三者間における相互作用をin vitroにて検証した。その結果、Mfa1線毛を持つ33277株とSspBペプチドとの結合が、Mfa1線毛を欠くW83株に対して有意に高い値を示した。またP. gingivalisのSspBペプチドへの結合は、唾液中タンパクgp340存在下で有意に増加した。以上より、P. gingivalisのMfa1線毛-SspB-gp340の三者が一体となってP. gingivalisの付着をサポートしているという示唆を得た。本研究成果は歯周疾患予防を目的としたバイオフィーム新規制御法の確立に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand the three-way interaction among *S. gordonii*, *P. gingivalis* and salivary gp340 as a unit, we established a peptide binding assay using SspB (390-T400K-402). *P. gingivalis* 33277 showed the highest binding activity of the tested bacteria, whereas *P. gingivalis* W83, which was deficient in Mfa1 fimbriae, exhibited poor binding activity, as did *S. gordonii*. The binding of SspB (390-T400K-402) peptide in saliva- or gp340-treated *P. gingivalis* was significantly higher than that in non-treated cells. The SspB (390-T400K-402) peptide binding assay revealed that initial attachment of *P. gingivalis* to the substrata of *S. gordonii* may require gp340-mediated SspB-Mfa1 interactions. The assay is available to assess the relationships among SspB, Mfa1 and salivary gp340 as a unit. Taken together, a peptide binding assay using SspB (390-T400K-402) presented herein may provide important insights into the development of control system for periodontopathic biofilm.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学 バイオフィーム SspBペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

小児う蝕の減少および軽症化傾向の一方で、歯周疾患における低年齢での増加傾向が近年問題視されている。歯周疾患をはじめとする口腔内感染症は、口腔細菌により形成された生態系であるバイオフィルムに起因しており、ペリクルや口腔粘膜へ細菌が付着することから始まる。また口腔内バイオフィルムは薬剤耐性遺伝子のリザーバーであり、従来の殺菌的・静菌的な制御法とは異なる新規バイオフィルム制御法の確立が望まれている。

### 2. 研究の目的

*S. gordonii*が有するSspBは、ペリクル中の特定成分gp340に対する付着因子として機能する。一方でSspBには、*Porphyromonas gingivalis*のレセプターとしての側面もある。*P. gingivalis*のバイオフィルム形成量は*S. gordonii*存在下で顕著に増加することから、SspB-*P. gingivalis*間の相互作用がキーになると考えられている[1]。そこで我々はこの関係性に着目し、SspB相同ペプチド[2]を利用する着想に至った。本研究では(1)ペプチド結合アッセイを確立すること、(2)SspB-歯周病原性細菌-ヒト唾液の三者間における相互作用を、(1)のアッセイを用いて検証する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

ペプチド結合アッセイにはELISA法を用い、以下の検証を試みた。

(1) SspB 相同ペプチドの *P. gingivalis* への特異的結合能

(2) SspB 相同ペプチドの *P. gingivalis* Mfa1 線毛への結合能

(3) SspB 相同ペプチド-*P. gingivalis*-ヒト唾液三者間の相互作用

### 4. 研究成果

SspB相同ペプチドの *P. gingivalis* への結合は、口腔常在菌と比較して有意に高い値を示した(図1)(33277:*P. gingivalis*, Sg: *S. gordonii*, Sm: *S. mutans*, An: *A. naeslundii*; \* $p < 0.05$ )。

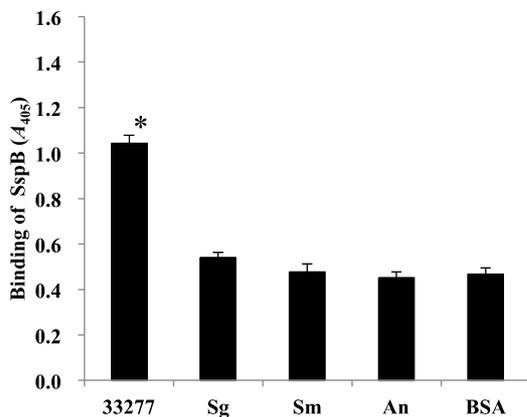


図1 SspB相同ペプチドの *P. gingivalis* への特異的結合能

*P. gingivalis* 菌株間の比較においては、Mfa1線毛を持つ33277株とSspBペプチドとの結合が、Mfa1線毛を欠くW83株に対して有意に高い値を示した(図2)(33277:*P. gingivalis* Mfa1線毛発現株, W83: *P. gingivalis* Mfa1線毛欠損株, Sg: *S. gordonii*; \* $p < 0.05$ )。

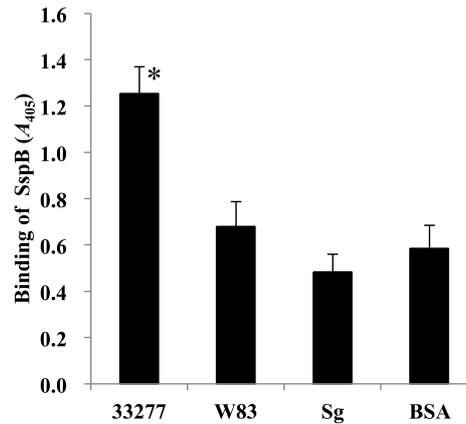


図2 SspB相同ペプチドの *P. gingivalis* Mfa1 線毛への結合能

また *P. gingivalis* の SspB 相同ペプチドへの結合は、唾液中タンパク gp340 存在下で有意に増加した(図3)(SRCRP2: gp340ペプチド; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

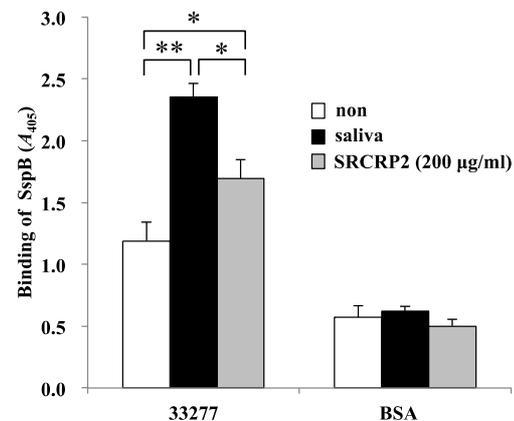


図3 SspB相同ペプチド-*P. gingivalis*-ヒト唾液三者間の相互作用

以上より、歯周病原性細菌、SspB、ヒト唾液の三者の関係性に着目したアッセイが確立されたと考えられる。また、本研究結果により、*P. gingivalis* の Mfa1 線毛-SspB-gp340 の三者が一体となって *P. gingivalis* の付着をサポートしているという示唆を得た。本研究結果は *P. gingivalis* の付着とバイオフィルム形成について新たな示唆を得た事から、歯周疾患予防を目的としたバイオフィルム新規制御の確立に貢献すると考えられる。

### <引用文献>

Richard J. Lamont, Azza El-Sabaeny, Yoonsuk Park, Guy S. Cook, J. William Costerton and Donald R. Demuth, Role of the

*Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology*. 148: 1627-1636, 2002.

Tomoyuki Hamada, Masatsugu Kawashima, Haruo Watanabe, Junji Tagami, Hidenobu Senpuku, Molecular interactions of surface protein peptides of *Streptococcus gordonii* with human salivary components. *Infection and Immunity*. 72 (8): 4819-26, 2004.

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4件)

Tatsuro Ito, Takahiro Ichinosawa, Takehiko Shimizu. Streptococcal Adhesin SspA/B Analogue Peptide Inhibits Adherence and Impacts Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*. *PLOS ONE*. 12: e0175483, 2017. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0175483

Takahiro Ichinosawa, Hideo Yonezawa, Hidenobu Senpuku, Tatsuro Ito, Takehiko Shimizu. Molecular Interaction of the Analogous Peptide SspB (390-T400K-402) derived from *Streptococcus gordonii* Surface Protein Peptide with Periodontal Bacteria. *International Journal of Oral-Medical Science*. 15:160-167, 2017. (査読有)  
DOI: <https://doi.org/10.5466/ijoms.15.160>

Tatsuro Ito, Takahiro Ichinosawa, Nana Ikematsu-Ito, Chihiro Watanabe, Takehiko Shimizu. Streptococcal SspB Peptide Analog Inhibits Saliva-Promoted Adhesion and Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*. *Open Journal of Stomatology*. 6: 81-89, 2016. (査読有)  
DOI: 10.4236/ojst.2016.63010

Tatsuro Ito, Hidenobu Senpuku, Takahiro Ichinosawa, Nana Ikematsu-Ito, Nao Kimura, Takehiko Shimizu. SspB peptide assay reveals saliva-mediated *Porphyromonas gingivalis* attachment. *Open Journal of Stomatology*. 5: 259-267, 2015. (査読有)  
DOI: 10.4236/ojst.2015.511032

[学会発表](計7件)

伊藤 龍朗, 市野澤 隆宏, 清水 武彦, 初期付着阻害による齲蝕原性バイオフィルム抑制効果の検討, 日大口腔科学会第17回学術大会, 日本大学松戸歯学部(千葉県松戸市), 2017年9月3日

伊藤 龍朗, 市野澤 隆宏, 清水 武彦, SspA/B ペプチドによる *Streptococcus mutans* のバイオフィルム抑制効果の検討, 第55回日本小児歯科学会大会, 西日本総合展示場新館(福岡県北九州市), 2017年5月25~5月26日

Tatsuro Ito, Kazuhisa Okamoto, Masanobu Hara, Takahiro Ichinosawa, Takehiko Shimizu. Streptococcal SspB peptide analog inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. 10th Biennial Conference of PDAA 2016, 東京ドームホテル(東京都文京区), 2016年5月26日~5月28日

伊藤 龍朗, 市野澤 隆宏, 清水 武彦, 新規バイオフィルム実験モデルの確立へ向けて, 日本小児歯科学会関東地方会第30回記念大会・総会, シェーンバツハ・サポー(東京都千代田区), 2015年9月13日

市野澤 隆宏, 伊藤 龍朗, 清水 武彦, SspB ペプチドによる *Streptococcus mutans* のバイオフィルム制御法の確立, 日大口腔科学会第15回学術大会, 日本大学松戸歯学部(千葉県松戸市), 2015年9月6日

Tatsuro Ito, Takahiro Ichinosawa, Nana Ikematsu-Ito, Takehiko Shimizu. Establishment of SspB peptide binding assay for *Porphyromonas gingivalis* colonization processes. IAPD 2015 Conference, Glasgow, United Kingdom, 2015年7月1日~7月4日

伊藤 龍朗, 市野澤 隆宏, 荒井 延子, 伊藤(池松)奈々, 清水 武彦, 歯周病リスク診断用ペプチド結合アッセイの確立, 第53回日本小児歯科学会大会, 広島国際会議場(広島県広島市), 2015年5月21日~5月22日

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 龍朗 (ITO, Tatsuro)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号：6 0 6 3 5 1 2 6

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

泉福 英信 (SENPUKU, Hidenobu)  
国立感染症研究所・細菌第一部第六室・室長  
研究者番号：2 0 2 5 0 1 8 6