

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 9 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792115

研究課題名（和文） 歯周病細菌の種々の口腔内定着経路を遮断する
広範囲作用ペプチドの探索と応用研究課題名（英文） Search and application of peptides which interrupt several
periodontopathic oral colonization mechanisms widely

研究代表者

岩崎 未央（IWASAKI MIO）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70570290

研究成果の概要（和文）：本研究は、口腔細菌やヒト細胞の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase における *Porphyromonas gingivalis* 線毛と結合する部位はほぼ同じ領域に存在することを明らかにし、そのアミノ酸配列を基に作製したペプチドは *P. gingivalis* の口腔内定着阻害素材として応用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was found that the binding site in human cellular glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for *P. gingivalis* fimbriae exists in the same domain as in oral bacterial GAPDH. It was suggested that the peptide synthesized based on the amino acid sequence corresponding to the binding site might be applicable as an inhibitory agent against *P. gingivalis* colonization in oral cavity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学

1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* が

口腔内に定着するためには、本菌と他の口腔細菌やヒト細胞、種々の宿主タンパク質など

との付着や結合が重要である。これまでの研究で、*P. gingivalis* 線毛は代表的な口腔内早期定着菌の一つである *Streptococcus oralis* の菌体表層に存在する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と特異的で高親和性の結合能を有することが明らかとなっている。また、*S. oralis* GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合領域のアミノ酸配列を基に作製したペプチドは種々の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成を阻害することが報告されている。

2. 研究の目的

ヒト GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合領域を詳細に検討し、既に同定している口腔レンサ球菌 GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合領域のアミノ酸配列と比較し、共通かつ最小結合領域を決定する。決定した最小結合領域のアミノ酸配列を基に *P. gingivalis* 線毛と結合する最適かつ安定したペプチドをデザインする。デザインしたペプチドを合成し、*P. gingivalis* と他の口腔細菌とのバイオフィーム形成および *P. gingivalis* とヒト細胞との相互作用に及ぼす影響を検討し、歯周病細菌の口腔内定着を阻害する素材として応用できるペプチドの開発を目指す。

3. 研究の方法

まず、種々の酵素によりヒト GAPDH を切断し、ヒト GAPDH フラグメントを作製した。作製したフラグメントを分離・精製し、各フラグメントのアミノ酸配列を決定した。各フラグメントと *P. gingivalis* 線毛との結合活性を、生体分子間相互作用解析装置を用いて解析し、ヒト GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合部位を同定した。同定したヒト細胞

GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合部位および既に同定されている *S. oralis* GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合部位のアミノ酸配列を比較し、共通するアミノ酸配列から合成ペプチドを作製し、*P. gingivalis* と口腔細菌とのバイオフィーム形成および *P. gingivalis* と正常ヒト歯周靱帯線維芽細胞 (HPdLF) との相互作用に及ぼす影響を検討した。*P. gingivalis* のバイオフィーム形成やヒト細胞への付着・侵入は共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細菌量を画像処理ソフトにより解析することでペプチドの阻害効果を検討した。さらに、RNA 干渉により GAPDH の発現量を抑制した HPdLF を作製し、*P. gingivalis* を感染させ、同菌の付着・侵入能を測定することにより、*P. gingivalis* のヒト細胞への付着・侵入に及ぼす GAPDH の影響を確認した。

4. 研究成果

ヒト GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合領域を同定した結果、*S. oralis* GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合領域とほぼ同じ領域に存在することが明らかとなった。そこで、この結合領域のアミノ酸配列を基に作製した合成ペプチドを用い、*P. gingivalis* と口腔細菌とのバイオフィーム形成に及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡により調べた結果、このペプチドは、*Actinomyces viscosus* など強い菌体表層 GAPDH 活性を有している種々の口腔細菌と *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成を阻害することがわかった。この結果は、口腔レンサ球菌だけではなく複数の口腔細菌菌体表層に存在する GAPDH が *P. gingivalis* 線毛と結合し、その結合には GAPDH の同じ部位が関与していることを示している。したがって、本研究で作製したペプチドは、*P. gingivalis* と種々の口

腔細菌とのバイオフィーム形成を阻害する有力なバイオフィーム形成阻害剤として応用できるものと考えられる。また、*P. gingivalis*のHPdLFへの感染の影響について共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べたところ、本ペプチドは*P. gingivalis*のHPdLFへの付着・侵入を阻害することが示された。さらに、RNA干渉によりGAPDHの発現を抑制したHPdLFを用いて*P. gingivalis*を感染させたところ、ヒト細胞GAPDHは*P. gingivalis*の付着・侵入に関与している可能性があることが示唆された。以上の結果をまとめると、本研究で同定したペプチドは、*P. gingivalis*と種々の口腔細菌とのバイオフィーム形成を阻害することおよび*P. gingivalis*のヒト細胞への付着・結合を阻害し、*P. gingivalis*感染を抑制する可能性があることから、歯周病細菌*P. gingivalis*に対する有力な口腔内定着阻害素材および歯周病細菌感染抑制剤として応用できる可能性が示唆され、歯周病予防に大いに寄与するものと考えられる。今後は、今回探索したペプチドをより効率的に*P. gingivalis*の口腔内定着を阻害するように改良し、改良したペプチドによる*P. gingivalis*と細菌や宿主成分との相互作用に及ぼす影響をより詳細に検討するとともに、*P. gingivalis*の病原因子に与える影響など付着以外のGAPDHの機能に及ぼす影響についても研究を展開していきたい。

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 岩崎未央、永田英樹、口腔レンサ球菌のGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase から同定された

*Porphyromonas gingivalis*の線毛に結合するペプチドによるバイオフィーム形成の阻害、大阪大学歯学雑誌、査読無、55巻、2011、91-96

[学会発表] (計4件)

- ① Kazuhiko Maeda、Identification of *Porphyromonas gingivalis* client proteins with *Streptococcus oralis* GAPDH、第58回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、2010年11月21日、北九州市
- ② 関根伸一、Flt3 ligand cDNAおよびCpG ODNは粘膜アジュバントとして*P. gingivalis*抗原特異的抗体反応を誘導する、第53回秋季日本歯周病学会学術大会、2010年9月19日、高松市
- ③ Hideki Nagata、GAPDH peptide inhibits *P. gingivalis* biofilm formation with oral bacteria、88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research、July 15、2010、Barcelona、Spain
- ④ Ei Hashino、Effect of erythritol on periodontopathic biofilm development、88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research、July 15、2010、Barcelona、Spain

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 未央 (IWASAKI MIO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70570290