

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659925

研究課題名(和文)ペプチド核酸による歯周病原細菌除去療法の確立

研究課題名(英文)Application of antisense PNA as antibiotics against periodontal pathogens

研究代表者

前田 博史(MAEDA, Hiroshi)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00274001

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)：本課題はキャリアーペプチドを付加したペプチド核酸を歯周病原細菌に対するアンチセンス核酸として設計し、歯周病原細菌に対する抗菌薬として応用するための基礎研究である。今回、キャリアーペプチドの設計と細菌への導入効率を解析した。キャリアーペプチドの配列は既報のアミノ酸配列を参考として、合計64種類を合成した。

ペプチドには蛍光標識を行い、歯周病原細菌*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、ならびに大腸菌への導入効率を評価した。その結果、Tmr-KFFKFFKFFK-NH₂の配列を持つペプチドが高効率に*P. gingivalis*に導入されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this research project is to design peptide nucleic acids (PNA) with a carrier peptide and apply them as species-specific antisense drugs against periodontal pathogens. Prior to the application of antisense PNA, effective carrier peptides were selected. Total of 64 peptides (10 amino acids) were designed by referring to previous reports and were synthesized. Fluorescent label (tmp-red) was added to each peptide, and bacterial uptake of the peptides was examined by measuring the strength of the fluorescence. The synthesized peptides were incubated with periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Escherichia coli*, and the fluorescence inside the bacterial cells was measured. As a results, a peptide with the sequence of Tmr-KFFKFFKFFK-NH₂ demonstrated the most effective uptake of *P. gingivalis*. This peptide will be an effective carrier for antisense PNA against *P. gingivalis*.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 歯周病原細菌 ペプチド核酸 アンチセンス キャリアーペプチド

1. 研究開始当初の背景

PNA, モルフォリノオリゴマーなどの核酸アナログは、天然核酸である DNA と RNA にハイブリダイズし、核酸同士の 2 重鎖結合よりも強い結合力を示す。このため、PNA を応用した核酸医療の研究はすでに様々な領域での試みがなされている。細菌に対する応用では、大腸菌、サルモネラ、あるいは黄色ブドウ球菌などにおいて、アンチセンス鎖として mRNA に作用させることによって特定遺伝子の発現制御が可能なが示されている。

一方、歯周病は数百種類にも及ぶ口腔内微生物の内因感染が原因となる。すなわち歯周局所は口腔内常在菌に常に曝されている状態にある。このため、一般的な感染症の治療と異なり、細菌を完全に排除することは困難であり、いわゆる 10 数種類の歯周病原細菌を量的にコントロールすることが重要と考えられている。

以上の背景から、特異的な遺伝子制御、細菌種の増殖抑制が可能ながアンチセンス医療の技術を歯周局所の細菌叢、細菌量をコントロールする歯周治療に応用する計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的はアンチセンス PNA を細菌 (歯周病原細菌) に対して応用し、病原遺伝子の発現抑制、あるいは細菌の増殖に必須な遺伝子の発現抑制を行うことである。これによってアンチセンス PNA を応用した歯周病治療薬 (抗菌薬) を開発するための基礎を確立する。

研究の第一段階として、PNA を細菌細胞内に高効率で導入することが可能なキャリアーペプチドの設計、ならびに細菌内への導入効率の解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) ペプチドライブラリーの設計: これまでに細菌細胞への導入効率を向上させることが報告されているペプチド配列 (cell wall/membrane-active peptide: KFFKFFKFFK) キャリアーペプチドを設計した (各 10 残基)。

ペプチド配列は培養液中、組織中において蛋白質分解酵素の影響を受けにくいように、非天然型のアミノ酸を部分的に組み込むように設計した (図 1 参照)。これらのペプチドに加え、これまでに、大腸菌への導入効率が高いことが報告されている KFFKFFKFFK の配列をもったペプチドを加え、合計 64 種類を設計・合成した。

(2) ペプチドの合成: 通法に従い、設計した 64 種類 (各 10 残基) のペプチドを合成した。各ペプチドには蛍光標識を行い

(Tmr-red) 細菌内への導入効率を検討可能にした。

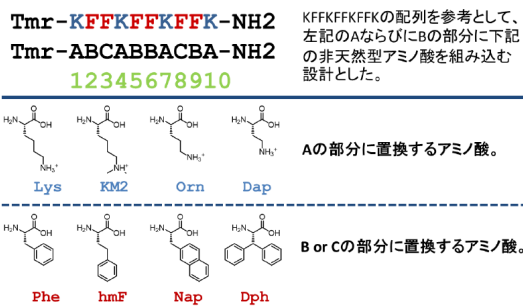


図 1. ペプチドの設計

(3) 供試菌と培養

- Porphyromonas gingivalis* W83 株
- Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 株
- Escherichia coli* XL1-blue 株

P. gingivalis はヘミン、システインとビタミン K を添加した BHI 培地で、*A. actinomycetemcomitans* はトリピチケースソイブロスに酵母抽出物と重炭酸ナトリウムを添加した培地で、*E. coli* は LB 培地で、それぞれ培養した。

(4) 細胞導入試験: Tilley ら (Antimicrob Agents Chemother, 2006) の記載に準じて、培養した *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、ならびに *E. coli* の培養液に合成ペプチドを添加し、一定時間インキュベートした。遠心操作によって菌体を回収し、菌体内に取り込まれなかったペプチドは遠心上清とともに除去した。細菌内に取り込まれたペプチド量は菌体ペレットからの蛍光シグナルを蛍光プレートリーダーで定量測定することによって評価した。

4. 研究成果

(1) ペプチドの合成

蛍光標識した 10 残基からなる 64 種類のペプチドを設計・合成した。設計したペプチドのアミノ酸配列を図 2 に示す。これらのペプチドは細胞導入試験に供試した。

Lys-Phe-Phe ([M+H] ⁺ =1824.96)	KM2-Phe-Phe	Orn-Phe-Phe	Dap-Phe-Phe
Lys-Phe-hmF	KM2-Phe-hmF	Orn-Phe-hmF	Dap-Phe-hmF
Lys-Phe-Nap	KM2-Phe-Nap	Orn-Phe-Nap	Dap-Phe-Nap
Lys-Phe-Dph	KM2-Phe-Dph	Orn-Phe-Dph	Dap-Phe-Dph
Lys-hmF-Phe	KM2-hmF-Phe	Orn-hmF-Phe	Dap-hmF-Phe
Lys-hmF-hmF	KM2-hmF-hmF	Orn-hmF-hmF	Dap-hmF-hmF
Lys-hmF-Nap	KM2-hmF-Nap	Orn-hmF-Nap	Dap-hmF-Nap
Lys-hmF-Dph	KM2-hmF-Dph	Orn-hmF-Dph	Dap-hmF-Dph
Lys-Nap-Phe	KM2-Nap-Phe	Orn-Nap-Phe	Dap-Nap-Phe
Lys-Nap-hmF	KM2-Nap-hmF	Orn-Nap-hmF	Dap-Nap-hmF
Lys-Nap-Nap	KM2-Nap-Nap	Orn-Nap-Nap	Dap-Nap-Nap
Lys-Nap-Dph	KM2-Nap-Dph	Orn-Nap-Dph	Dap-Nap-Dph
Lys-Dph-Phe	KM2-Dph-Phe	Orn-Dph-Phe	Dap-Dph-Phe
Lys-Dph-hmF	KM2-Dph-hmF	Orn-Dph-hmF	Dap-Dph-hmF
Lys-Dph-Nap	KM2-Dph-Nap	Orn-Dph-Nap	Dap-Dph-Nap
Lys-Dph-Dph	KM2-Dph-Dph	Orn-Dph-Dph	Dap-Dph-Dph

図 2. 設計したペプチドのアミノ酸配列

図1のA,B,Cに相当する部分に組み込まれたアミノ酸の種類が示してある。合計64種類のペプチドを合成し、末端を蛍光標識(Tmr-red)した。

(2) 細胞導入試験

ペプチドライブラリーのスクリーニング
 歯周病原細菌 *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, ならびに大腸菌を対数増殖期の後期まで培養し、合成した各ペプチドを添加した。添加後、一定時間(30分、1時間30分、2時間30分)ペプチドと細菌の混合液を37℃でインキュベートした。インキュベート後、遠心操作で菌体を回収し、PBSで菌体を洗浄して、細菌内に取り込まれていないペプチドを除去した。菌体内のペプチド量は蛍光量で評価した。64種類のペプチドは何れも細菌内にある程度取り込まれることが分かった。代表例として結果の一部を図3に示す。64種類のペプチドの中では、大腸菌においてキャリアペプチドとしての効果が確認されている KFFKFFKFFK のアミノ酸配列をもったペプチドが、いずれの細菌種においても最も高い細菌導入効率を示した。*P. gingivalis* の KFFKFFKFFK の取り込み量は大腸菌の約2倍であった。これに対して、*A. actinomycetemcomitans* の取り込み量は大腸菌の約5分の1であった。

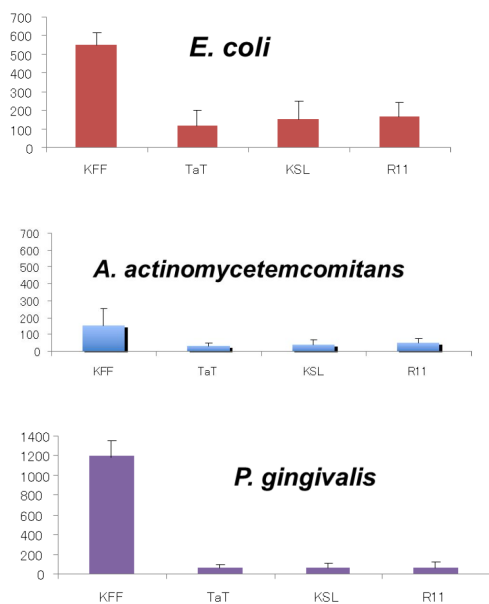


図3 . 合成ペプチドの細菌内への取り込み量。縦軸は菌体からの蛍光量を示す。

ペプチド導入の経時的変化

P. gingivalis ならびに大腸菌のペプチド (KFFKFFKFFK) 取り込み量の経時的な変化を図4に示す。大腸菌ではKFFKFFKFFKの取り込み量が経時的に増加した。これに対して、*P. gingivalis* においては、30分のインキュベート時間では大腸菌の約2倍の取り込み量を示したが、経時的に取り込み量が減少する傾

向を示した。しかしながら、2時間30分のインキュベート時間内では依然として大腸菌よりも高いペプチド取り込み量を示した。

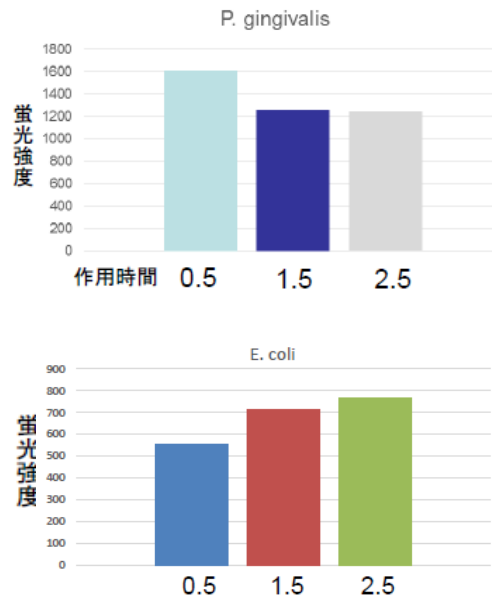


図4 . KFFKFFKFFK 取り込み量の経時的変化。大腸菌では経時的に取り込み量が増加する傾向がみられた。*P. gingivalis* では逆に経時的に取り込み量が減少する傾向がみられた。

結果の考察と今後の展望

アンチセンス PNA の微生物への応用に関しては、大腸菌を標的菌種とした先行研究が展開されている。これらの中で KFFKFFKFFK の配列をもったペプチドがキャリアペプチドとして、大腸菌内への高い導入効率を示すことが報告されている。本研究では、歯周病原細菌に対して、より導入効率の高いペプチド配列を選定することを目的としていたが、結果として KFFKFFKFFK の配列をもつペプチドが最も高い導入効率を示す結果となった。しかしながら、*P. gingivalis* の場合、その導入効率は大腸菌の約2倍であり、このキャリアペプチドを使用することによって、大腸菌と同様に、あるいはそれ以上に高率的に遺伝子発現制御が可能になる可能性が高いと思われる。*A. actinomycetemcomitans* に関しては、KFFKFFKFFK はキャリアペプチドとして有効ではなく、今後、ペプチド配列の再設計とスクリーニングが必要である。

ペプチドの作用時間と取り込み量に関しては、作用時間が長いほど導入効率が向上することが予測されたが、*P. gingivalis* では若干の低下がみられた。これは、同菌が保有するジンジンジンによってペプチドの分解が起こった結果かもしれない。また、ジンジンジンの標的となるリジンを含むペプチドが能動的に *P. gingivalis* の菌体内に取り込まれた可能性もある。ペプチドの菌体内への取り込み機構に関しては、今後の検討課

題と考えている。

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)

松永一幸、工藤値英子、河田有祐、前田博史、高柴正悟、DNA normalization を応用した高感度な細菌叢解析法の検討、日本口腔検査学会雑誌、6巻、2014、23-30.
<http://hdl.handle.net/10130/3299>

[学会発表](計2件)

松永一幸、工藤値英子、河田有祐、前田博史、高柴正悟、DNA normalization を応用した高感度な細菌叢解析法の検討、第34回岡山歯学会学術集会 2013.10.27. 岡山大学歯学部(岡山県・岡山市)。

松永一幸、工藤値英子、河田有祐、前田博史、高柴正悟、T-RFLP 法による高感度な細菌叢解析法確立のための Pilot Study、第138回春季日本歯科保存学会学術大会 2013.6.27. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 博史 (MAEDA Hiroshi)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00274001

(2)研究分担者

高柴 正悟 (TAKASHIBA Shogo)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50226768

苔口 進 (KOKEGUCHI Susumu)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10144776

北松 瑞生 (KITAMATSU Mizuki)
近畿大学・理工学部・講師
研究者番号：60379716

山城 圭介 (YAMASHIRO Keisuke)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30581087
(削除：平成26年3月20日)

(3)研究協力者

峯柴 史 (MINESHIBA Fumi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究員
研究者番号：90346461

磯島 大地 (ISOSHIMA Daichi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・大学院生