

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22592316
 研究課題名（和文） 放射能標識とプロテオミクスによる白血球細胞表面のジンジパイン標的分子の解析
 研究課題名（英文） Analysis of gingipains target molecule of the white corpuscle cell surface by radioactivity mark and proteomics.
 研究代表者
 大林 武久 (OHBAYASHI TAKEHISA)
 熊本大学・医学部附属病院・非勤診療医師
 研究者番号：80304997

研究成果の概要（和文）：成人型歯周病の主要原因細菌Porphyromonas gingivalis放出のジンジパイン（システインプロテアーゼ）が、白血球機能に関わる細胞表面分子の切断により免疫寛容となる機構解明のため、白血球細胞膜上の機能タンパク質を放射性同位元素による標識とプロテオミクスの手法を駆使し、歯周病に対する影響を調べ、歯周病の予防法・治療法開発を目指した。RI標識ならびにジンジパイン処理につき手技・条件を改良し続行中であるが、特異的なタンパク質の同定に至らず、今後も継続研究を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：The gingipains of the cystein protease which Porphyromonas gingivalis which is leading cause bacteria of adult type periodontosis emits aims at the mechanism elucidation which serves as immune tolerance by cutting of the cell surface molecule in connection with a white corpuscle function. Full use of the technique of the sign according the functional protein on a white corpuscle cell membrane to radioisotope and proteomics was made, influence on periodontosis was investigated, and the prevention method and cure development of periodontosis were aimed at. Although technique and conditions are improved per RI sign and gingipains processing and it is under continuation, continuous research is due not to result in identification of specific protein but to continue be done.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：成人型歯周病・*Porphyromonas gingivalis*・システインプロテアーゼ・

ジンジパイン・白血球細胞表面タンパク・RI 標識・プロテオミクス・予防および治療法開発

1. 研究開始当初の背景

歯周病は齲歯が減少した今日の歯牙喪失の主因であり、健康な歯牙の長期保存は、高齢化の進む先進諸国の Quality of Life を高めるために重要である。しかしそればかりでなく、最近では歯周病はまさに「万病の元」であり、糖尿病や狭心症・心筋梗塞、早産などの密接な関連が明らかにされ、その発症機構の解明と予防法ならびに治療法の確立は、切迫した社会の要請となっている。歯周病は、主要原因菌 *P. gingivalis* が深く歯周組織に入り込み、歯槽骨を溶解し、血流にまで浸潤することにより種々の症状を引き起こすが、本菌がどのような機構により宿主の免疫系から逃れるのか不明である。これまでに我々は、*P. gingivalis* が産生・放出するプロテアーゼ・ジンジパインが、歯周病発症・進展と密接に関係することを明らかにしてきた。歯周病の成立には、*P. gingivalis* が免疫系から逃れて歯周組織に定着し、感染を持続することが必須である。ジンジパイン欠損株は補体系への感受性が亢進し、またジンジパインは免疫細胞を誘引するサイトカインやケモカインなどを分解することから、ジンジパインは *P. gingivalis* の免疫逃避に関与することが推定された。しかし病変部における、これらのサイトカインやケモカインは極めて低濃度であり、生理的な条件下ではジンジパインとほとんど反応しない。そこで我々は、白血球膜上の免疫応答に関わるタンパク質

をジンジパインが切断することにより、当該免疫細胞の機能が低下し、*P. gingivalis* の免疫逃避が成立するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

成人型歯周病の主要原因細菌 *Porphyromonas gingivalis* が放出するシステインプロテアーゼのジンジパインが、白血球機能に関わる細胞表面分子の切断することにより免疫系から本菌が逃避する免疫抑制機構を解明するため、ターゲットとなる白血球細胞膜上の機能タンパク質を、放射性同位元素を用いる標識とプロテオミクスの手法を駆使してこれを網羅的に解析・同定し、これらの細胞表面分子が関係する白血球の機能、および歯周病に関わる種々の病態に対する影響を調べることにより、歯周病の予防法および治療法を開発に資することを目的とする。

3. 研究の方法

健常人ボランティア末梢血より好中球または単球を調製し、細胞表面タンパク質を放射性ヨウ素で温和に RI 標識。ヨウ化後の細胞を 2 等分し、一方はジンジパインで、他方は緩衝液のみで処理した。軽い遠心により上清と細胞ペレットに分離し、それぞれを同時に 2 次元電気泳動にかけた。泳動後、ゲルを蛍光色素により全タンパク質の蛍光染色した。次いでゲルを X 線フィルムにあて、ジンジパイン処理の有無で放射性スポットのパターンを比較した。

4. 研究成果

現在においても細胞に対する RI 標識ならびにジンジパイン処理につき手技・条件を変化させて改良し続行中であるが、白血球細胞表面タンパク質よりの特異的な放射性スポットのパターンについて同定には至っておらず、今後とも実験の継続を行う予定である。

この研究と並行して、本研究のターゲットであるジンジパインと同じシステインプロテ

アーゼに属するスタホパイン（黄色ブドウ球菌が放出）について、その酵素効果について研究を行い、興味ある結果を得、学会発表ならびに論文発表を行っている。スタホパインの新たな病原作用として、フィブリノゲンお

よび I 型コラーゲンの分解作用を明らかにした。これらの作用は、黄色ブドウ球菌敗血症に合併する凝固能低下で起こる出血傾向の

誘発や、細菌性心内膜炎などの発症に関与する感染部での組織破壊に、スタホパインが関与する可能性を示唆する。したがって、スタ

ホパインは黄色ブドウ球菌感染症治療のターゲットとして有望であり、その活性阻害剤

は黄色ブドウ球菌、特に MRSA などの薬剤耐性菌感染症への新たな治療薬に発展することが期待される。

また、糖尿病治療において血糖コントロール作用で注目されている消化管ホルモンであるインクレチンに対するジンジパインの阻害作用について、新しい知見を示唆する実験を行っている。

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)

- ① Takehisa Ohbayashi, Atsushi Irie, Yoji Murakami, Magdalena Nowak, Jan Potempa, Yasuharu Nishimura, Masanori Shinohara, and Takahisa Imamura
Degradation of fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from *Staphylococcus aureus*
Microbiology、査読あり157巻、2011、786 - 792

[学会発表] (計 4 件)

- ① 大林 武久、今村 隆寿、篠原 正徳、(黄色ブドウ球菌プロテアーゼ・スタホパインのフィブリノゲンとコラーゲン分解作用)、第 57 回日本口腔外科学会総会学術大会、2012. 10. 19、パシフィコ横浜会議センター (神奈川)
- ② Takehisa Ohbayashi, Atsushi Irie, Yoji Murakami, Jan Potempa, Masanori Shinohara, Takahisa Imamura (Degradation of Fibrinogen and Collagen by Staphopains: Implications in Impaired Plasma Clotting and Tissue Destruction Caused by Staphylococcus aureus Infection)、Seventh General Meeting of the International Proteolysis Society、2011. 10. 17、Hilton San Diego Resort and Spa, San Diego, CA, USA
- ③ 今村 隆寿、大林 武久、村上 洋嗣、(黄色ブドウ球菌病原因子 staphopains の病原作用解析 - フィブリノゲンおよびコラーゲン分解作用)、第 100 回日本病理学会総会、2011. 4. 28、パシフィコ横浜会議センター (神奈川)
- ④ 大林 武久、今村 隆寿、入江 厚、村上 洋嗣、篠原 正徳、(黄色ブドウ球菌システインプロテアーゼの凝固系および結合組織破壊作用の研究 - フィブリノゲンとコラーゲン分解作用解析-)、第 65 回日本口腔科学会総会、2011. 4. 22、タワーホール船堀 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 武久 (OHBAYASHI TAKEHISA)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師
研究者番号：80304997

(2) 研究分担者

今村 隆寿 (IMAMURA TAKAHISA)
熊本大学・生命科学研究部・准教授
研究者番号：20176499

入江 厚 (IRIE ATUSI)
熊本大学・生命科学研究部・講師
研究者番号：30250343

篠原 正徳 (SHINOHARA MASANORI)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：90117127