The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Streptococcus gordoniiによるPorphyromonas gingivalis線毛と唾液酸性高プロリンタンパク質の結合を阻害するペプチドの分泌
Author(s)	片岡, 宏介
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169598
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 9 】

氏　　名	片岡宏介（かたおか こうすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　15087　号
学位授与年月日	平成12年2月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	*Streptococcus gordonii* による *Porphyromonas gingivalis* 線毛と唾液酸性高プロリンタンパク質の結合を阻害するペプチドの分泌
論文審査委員	（主査） 教授　雫石　聰 （副査） 教授　恵比須繁之　助教授　川端　重忠　講師　天野　敦雄

論文内容の要旨

有力な歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis* は、その主たる付着性構造物である線毛を介して、唾液ペリクル中の特定の唾液タンパク質成分と強固に結合することにより、口腔の様々な表面への初期付着を果たしていると考えられる。しかし、現在のところ、これら結合の歯周病発症における役割とそれに関与する結合機序の詳細は明らかにされていない。唾液酸性高プロリンタンパク質（acidic proline-rich proteins：PRPs と記す）は、唾液ペリクルの主要な構成成分であり、なかでも PRPs のひとつである PRP1 と *P. gingivalis* 線毛とは、強い親和性を有することが明らかにされている。本研究では、*P. gingivalis* 線毛に対する PRP1 の分子内の結合領域を検索した。さらに、*P. gingivalis* の口腔内への定着抑制モデルを提供するために、この結合領域ペプチドを口腔常在菌である *Streptococcus gordonii* の形質転換株に分泌させ、このリコンビナントペプチドが *P. gingivalis* の線毛を介する結合に及ぼす影響を調べた。

著者はまず、ヒト顎舌下腺唾液から精製した PRP1 をリジルエンドペプチダーゼにより消化処理し、得られた3種の PRP1 フラグメントを膜に吸着させ、ドットブロット法による *P. gingivalis* 線毛との結合実験を行った。PRP1 カルボキシル基（C）末端部分のフラグメントが強い結合を示し、特にC末端側21アミノ酸残基ペプチド（このペプチドを pPRP-C と記す）が最も強固な結合を示した。また、溶液中のこれら3種のフラグメントによるトリチウム標識した *P. gingivalis* 菌体およびヨード標識した線毛の PRP1 被覆ハイドロキシアパタイト（HA）への結合の阻害を調べたところ、pPRP-C が最も強い阻害を示した。次に、線毛との結合を示した PRP1 のC末端側75-150アミノ酸残基を5分割したペプチド（peptide 75-89、peptide 90-106、peptide 107-120、peptide 121-129および pPRP-C）をそれぞれ合成し、そのペプチドをプレート上に固相化し、線毛との直接的な結合を ELISA 法により評価したところ、peptide 121-129を除く4種のペプチドに強い結合が認められた。また、この5種のペプチドのうち、pPRP-C のみが線毛の PRP1 被覆 HA への結合の阻害を示した。この peptide 121-129を除く4種のペプチドには PQGPPQ という共通アミノ酸配列が認められ、この領域が結合に関与している可能性が考えられた。しかし、peptide 75-89、peptide 90-106、peptide 107-120には、PQGPPQ の後続に QGGH というアミノ酸配列を有しており、この QGGH アミノ酸残基が線毛との結

合部位を隠蔽している可能性が推測された。さらに、pPRP-C を 3 分割したペプチドを合成し、線毛の PRPl 被覆 HA への結合阻害実験に供したところ、peptide 138-145（GRPQGPPQ）によって pPRP-C と同等の阻害効果が認められた。GRPQGPPQ のデリーションペプチドを合成し、それらを用いた線毛の PRPl 被覆 HA への結合阻害能からペプチド上の最小結合領域を推定したところ、Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-Gln が本結合に関する最小領域であることが示唆された。

この最小結合領域を含む pPRP-C ペプチドを口腔常在菌である *S. gordonii* の形質転換株に分泌させるために、pPRP-C の核酸配列に相当するオリゴヌクレオチドを合成し、*S. gordonii* と大腸菌とのシャトルベクターである pVA838に挿入することにより、pMNK-5 ベクタープラスミドを構築した。このプラスミドを *S. gordonii* G9B 株にエレクトロポレーション法で形質転換後、その形質転換株による培養上清中へのリコンビナント pPRP-C の分泌を、ウエスタンブロッティング法により確認し、その濃度は ELISA 法により4.3 nmol/ml と推定された。この培養液を濃縮した標品（r-Sg 粗標品と記す）溶液を調製し、*P. gingivalis* 菌体および線毛の PRPl 被覆 HA への結合阻害実験に供試したところ、濃度依存的に結合を抑制した。さらに、合成 pPRP-C ペプチドと r-Sg 粗標品溶液による *P. gingivalis* と数種の口腔レンサ球菌との共凝集への影響を、Cisar ら (1979) の肉眼による判定方法を用いて行ったところ、*P. gingivalis* と供試した *S. gordonii*、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus oralis*、*Streptococcus sanguis* および *Streptococcus downei* とのそれぞれの共凝集を著明に抑制した。

以上の結果より、*P. gingivalis* 線毛の PRPl 分子内での最小結合領域は Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-Gln であることが示された。そして、*S. gordonii* 形質転換株が分泌した r-pPRP-C は、*P. gingivalis* 線毛の PRPl 被覆 HA への付着を阻害するだけでなく、*P. gingivalis* と口腔レンサ球菌との共凝集も阻害することが示され、これらの実験系が、*P. gingivalis* の口腔内への定着抑制モデルとして有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、唾液酸性高プロリンタンパク質（PRPs）の主要成分である PRPl 分子内の *Porphyromonas gingivalis* 線毛に対する結合領域について検索した。さらに、明らかにした結合領域ペプチドを *Streptococcus gordonii* の形質転換株に分泌させ、このリコンビナントペプチドが *P. gingivalis* の線毛を介する結合に及ぼす影響について調べた。

その結果、*P. gingivalis* 線毛の PRPl 分子内での最小結合領域は Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-Gln であることが明らかとなった。また、*S. gordonii* 形質転換株が分泌したリコンビナントペプチドは、*P. gingivalis* 線毛の PRPl 被覆ハイドロキシアパタイトへの付着を阻害するだけでなく、*P. gingivalis* と口腔レンサ球菌との共凝集も阻害することを示した。

この論文は、*P. gingivalis* の口腔内への定着抑制モデルのひとつを提供するものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものと認める。