The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Fusobacterium nucleatum菌体への唾液タンパク質スタセリンの結合領域の解析
Author(s)	関根, 伸一
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44025
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【6】

氏　　名	関　根　伸　一（せき　ね　しん　いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　17724　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学　位　論　文　名	*Fusobacterium nucleatum* 菌体への唾液タンパク質スタセリンの結合領域の解析
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　雫石　聰 （副査） 教　授　天野　敦雄　　講　師　川井　直彦　　講　師　中川　一路

論　文　内　容　の　要　旨

グラム陰性偏性嫌気性菌である *Fusobacterium nucleatum* は、歯周疾患部位の歯肉縁下プラークから高頻度に検出される菌のひとつであり、免疫抑制因子、細胞毒性因子や付着因子など種々の歯周病原性を有することが報告されており、歯肉炎の発症や歯周炎への進展に関わると考えられている。*F. nucleatum* が口腔へ定着する過程において、本菌と唾液タンパク質との結合がその初期付着に重要な役割を果していることが推測される。しかし、現在のところ、本菌が結合する唾液タンパク質の同定やその結合機序の詳細については明らかにされていない。43アミノ酸残基からなる酸性リンタンパク質であるスタセリンは、耳下腺や顎舌下腺より分泌され、歯の再石灰化の促進や歯石形成阻害などの機能をもつほか、獲得ペリクルを構成する主たるタンパク質のひとつとして、口腔細菌の定着の場を提供するといわれている。本研究では、スタセリンが *F. nucleatum* 菌体と強い結合性を有することを示し、さらに、本菌とスタセリンの結合機序の一端を明らかにするために、スタセリン分子の本菌との結合領域を検索した。

著者はまず、ヒト顎舌下腺唾液のどのタンパク質成分が *F. nucleatum* ATCC10953株菌体と結合するかを調べるために、ウェストウェスタン法により、ヒト顎舌下線唾液とヨード標識した本菌とを反応させ、オートラジオグラフィーで判定した。その結果、スタセリン、高プロリン糖タンパク質（PRGP）および酸性高プロリンタンパク質（酸性PRP1）と分子量が一致する部位にバンドが認められた。さらに、これら3つの唾液タンパク質をRamasubbuらの方法（1993）に従い精製し、得られたタンパク質をニトロセルロース膜に吸着させ、ヨード標識菌体をドットブロット法により結合させた。その結果、3つの唾液タンパク質は全て本菌と結合したが、これらのドットについて、NIHイメージによりスタセリンの輝度を100%、対照として用いたウシ血清アルブミンの輝度を0%に設定し、PRGPと酸性PRP1の輝度を評価したところ、PRGPのそれは82%、酸性PRP1のそれは47%を示し、スタセリンが *F. nucleatum* 菌体と最も強く結合する唾液タンパク質のひとつであることが示された。

スタセリン分子のどの領域が本菌との結合に関与しているのか検索するために、スタセリンおよびその3分割ペプチドであるペアチド1-14、ペプチド14-26およびペプチド26-43をインヒビターとして、ヨード標識菌体のスタセリン被覆ハイドロキシアパタイトビーズへの結合阻害を調べた。その結果、ペプチド14-26に最も強い阻害を、また、ペプチド1-14とペプチド26-43にも弱い阻害活性が認められた。しかし、スタセリンはほとんど阻害活性を示さなかった。さらに、スタセリンの7分割ペプチドであるペプチド1-6、ペプチド6-14、ペプチド14-21、ペプチド19-26、

ペプチド 26-34、ペプチド 32-39 およびペプチド 38-43 を結合阻害実験に供試したところ、ペプチド 32-39 は 68%、ペプチド 19-26 は 77%まで抑制した。しかし、N 末端部分を構成するペプチド 1-6 とペプチド 6-14 を含むその他のペプチドには明らかな阻害活性は認められなかった。

さらに、ペプチド 19-26（GPYQPVPE）について、最小結合領域を検索するために、N 末端または C 末端からのデリーションペプチドを合成し、同様の阻害実験を行った。ペプチド 19-26 より N 末端の Gly-Pro および C 末端の Glu を欠落させても、その阻害効果はペプチド 19-26 とほぼ同程度であったが、それ以上のアミノ酸残基を欠くと阻害活性をほとんど示さなくなった。さらに、YQPVPE の Tyr と Glu の役割を調べるために、それぞれのアミノ酸を Ala に置き換えた AQPVPE および YQPVPA をインヒビターとしたところ、両ペプチドは YQPVPE と同程度の結合阻害効果を示した。このことは YQPVPE の配列において、Tyr および Glu 阻害を示すのに必須のアミノ酸ではなく、QPVP が最も重要な配列である可能性が示唆された。次に、ペプチド 32-39（QPYQPQYQ）の最小結合領域をそのデリーションペプチドを用いて調べたところ、N 末端の Gln を欠落させても、その阻害効果はほとんど変わらなかったが、さらに N 末端または C 末端のアミノ酸残基を欠落させると、阻害活性はほとんどみられなくなった。

以上の結果より、*F. nucleatum* ATCC10953 株菌体は、唾液タンパク質のなかで、スタセリンと最も強く結合することが示された。さらに、スタセリン分子内には、本菌との複数の結合領域の存在が推測され、それらの最小結合領域は YQPVPE と PYQPQYQ であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は唾液タンパク質スタセリン分子内の *Fusobacterium nucleatum* 菌体に対する結合領域について検索したものである。その結果、*F. nucleatum* 菌体は、唾液タンパク質のなかで、スタセリンと特異的に強く結合することが示された。さらに、スタセリン分子内には、本菌との結合部位として少なくとも 2 ケ所存在し、それらの最小結合領域が YQPVPE と PYQPQYQ であることが明らかとなった。

この論文は、*F. nucleatum* の口腔内への定着メカニズムを解明するうえで、重要な知見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。