



Title	Streptococcus oralis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ルム形成の阻害
Author(s)	岩崎, 未央
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49779
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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

【38】

氏名	いわ 崎 み 央
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 22860 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	Streptococcus oralis 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
論文審査委員	(主査) 教授 栗石 聡 (副査) 教授 天野 敦雄 准教授 寺尾 豊 講師 野杣由一郎

論文内容の要旨

主要な初期デンタルバイオフィーム形成菌の一つである *Streptococcus oralis* の菌体表層に存在する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)は歯周病細菌である

Porphyromonas gingivalis の線毛と特異的で高親和性の結合能を有している。本研究では、まず、*S. oralis* GAPDH における *P. gingivalis* 線毛への結合部位を同定した。次に、その結合部位に相当する合成ペプチドを作製し、*S. oralis* をはじめとする種々の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成に及ぼす影響について調べることを目的とした。

S. oralis GAPDH における *P. gingivalis* 線毛への結合部位を同定するために、*S. oralis* ATCC 9811 株のリコンビナント GAPDH (rGAPDH) を作製し、リシルエンドペプチダーゼ処理により得られた rGAPDH 断片を HPLC により分画後、各画分の *P. gingivalis* リコンビナント線毛 (rFimA) に対する結合活性を BIAcore を用いて測定した。強い結合活性を示した画分[結合定数 (K_a) = $3.54 \times 10^7 \text{M}^{-1}$]のアミノ酸配列をアミノ酸シーケンス、アミノ酸組成分析および質量分析法により決定した結果、*S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH アミノ酸残基 163-216 の領域と一致した。さらに、この画分を種々の酵素により切断し、上記と同様の方法で rFimA への結合活性を測定したところ、*S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH の *P. gingivalis* 線毛との結合部位は、高親和性の結合を示したアミノ酸残基 166-183 ($K_a = 4.51 \times 10^7 \text{M}^{-1}$) に存在すると推定された。

次に、この結合部位のアミノ酸配列を基に合成ペプチド (Pep 166-183: DNFGVVE GLMTTIHAYTG) を作製し、種々の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* との混合バイオフィーム形成に及ぼす影響について調べた。ヘキシジウムイオダイド染色した口腔レンサ球菌を唾液被覆したウェルチャンバーにて嫌気培養した後、フルオレセインイソチオシアネート染色した *P. gingivalis* ATCC 33277 株を加え、さらに培養することによりバイオフィームを形成させた。合成ペプチドによる阻害実験には、*P. gingivalis* を合成ペプチドとあらかじめ反応させたものを用いた。バイオフィームを共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、ペプチドによるバイオフィーム形成阻害率は画像解析ソフト Imaris を用いて求めた。コントロールには Pep 166-183 の疎水性アミノ酸をアラニンに置換したペプチド (DNAGAAEGAATTAHAYTG) を用いた。口腔レンサ球菌としては、*S. oralis* ATCC 9811 株とともに、その GAPDH と非常に相同性の高い GAPDH を有し、かつ、強い菌体表層 GAPDH 活性を示す *S. oralis* ATCC 10557 株、*Streptococcus gordonii* G9B 株、*Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 株および *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909 株について供試した。その結果、Pep 166-183 は供試したすべての口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* ATCC 33277 株とのバイオフィーム形成を濃度依存的に阻害した。さらに、*P. gingivalis* ATCC 33277 株 (I 型) とは異なる線毛型に属する *P. gingivalis* OMZ 314 株 (II 型) や 6/26 株 (III 型) と *S. oralis* ATCC 9811 株とのバイオフィーム形成に及ぼす Pep 166-183 の影響についても検討した。その結果、Pep 166-183 により *S. oralis* ATCC 9811 株と *P. gingivalis* OMZ 314 株や 6/26 株とのバイオフィーム形成も濃度依存的に阻害された。一方、コントロールペプチドはこれらのバイオフィーム形成にはほとんど影響を及ぼさなかった。なお、*P. gingivalis* W 50 株 (IV 型) や HNA 99 株 (V 型) と *S. oralis* ATCC 9811 株との

混合バイオフィーム形成量は非常に少なく、Pep 166-183 がこれらのバイオフィーム形成に及ぼす阻害効果については検討できなかった。

以上の結果より、*S. oralis* GAPDH における *P. gingivalis* 線毛への結合部位はアミノ酸残基 166-183 に存在することが示され、なかでも疎水性アミノ酸残基が両菌間の相互作用に重要な役割を果たしていることが推測された。また、Pep 166-183 は、種々の口腔レンサ球菌と様々な線毛型の *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成を濃度依存的に阻害したことから、*S. oralis* GAPDH の本結合部位ペプチドは *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成に重要な役割を果たすことが示され、*P. gingivalis* の口腔内定着阻害剤として応用できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、*Streptococcus oralis* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) における *Porphyromonas gingivalis* 線毛への結合部位を同定し、さらに、その結合部位に相当する合成ペプチドを用いて、種々の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成に及ぼす影響について調べた。その結果、*S. oralis* GAPDH における *P. gingivalis* 線毛への結合部位はアミノ酸残基 166-183 に存在することが明らかにされた。また、その結合領域を基に作製した合成ペプチドは、種々の口腔レンサ球菌と様々な線毛型の *P. gingivalis* とのバイオフィーム形成を濃度依存的に阻害することが示された。

以上のことから、本研究は、*P. gingivalis* の口腔内定着への口腔レンサ球菌 GAPDH の関わりを解明するうえで、重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。