

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | エリスリトールの歯周病原性バイオフィルム形成と<br>Porphyromonas gingivalis 構成タンパク質の発現と<br>代謝に及ぼす影響   |
| Author(s)    | 橋野, 恵衣  |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/58438">https://hdl.handle.net/11094/58438</a>   |
| 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<br>ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利<br>用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文につい<br>て <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 橋野恵衣  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(歯学)  |
| 学位記番号      | 第24498号   |
| 学位授与年月日    | 平成23年3月25日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科分子病態口腔科学専攻   |
| 学位論文名      | エリスリトールの歯周病原性バイオフィーム形成と <i>Porphyromonas gingivalis</i> 構成タンパク質の発現と代謝に及ぼす影響 |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 大嶋 隆<br>(副査)<br>教授 天野 敦雄 准教授 寺尾 豊 講師 野村由一郎                       |

#### 論文内容の要旨

糖アルコールのひとつであるエリスリトールは、非う蝕性、インスリン非刺激性、低緩下性および低カロリー性といった優れた性質を有し、特定保健用食品や医薬部外品を含む様々な分野に応用されている。口腔関連では、う蝕リスクの低減作用や歯垢除去促進作用などといったう蝕に関連する報告等があるものの、エリスリトールが歯周病原性細菌の生育およびそのバイオフィーム形成に及ぼす影響に関する報告はない。本研究では、エリスリトールが歯周病原性バイオフィームの形成と微細構造に及ぼす影響および主要な歯周病原性細菌のひとつであると考えられている *Porphyromonas gingivalis* の菌体構成タンパク質や代謝物質に及ぼす影響について検討した。

本研究では、まず *Streptococcus gordonii* DL1 株と *P. gingivalis* ATCC 33277 株とから構成される混合バイオフィームモデルを用い、10%エリスリトール、キシリトールおよびソルビトールの糖アルコール類とグルコースが混合バイオフィームの微細構造に与える影響について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。糖質非添加対照群および各種糖質添加群では、*S. gordonii* と *P. gingivalis* の分布の特徴が各群によって異なる像を示した。また、*S. gordonii* と *P. gingivalis* のバイオボリュームを算出した結果、エリスリトールは、供試した糖アルコールのなかで、*in vitro* 混合バイオフィームの *P. gingivalis* バイオボリュームを最も顕著に抑制した。

次に、各種糖質が *P. gingivalis* の生育に及ぼす影響を検討した。0.8%各種糖質を添加したタンパク質・ペプチドを含まない最小培地中において、*P. gingivalis* は全く生育せず、供試した

糖質が *P. gingivalis* の生育に利用されないことが確認された。次に、3%BSA 含有最小培地に 10%の各種糖質を添加して *P. gingivalis* を培養したところ、糖質非添加の対照群に対して各種糖質添加群で明らかに *P. gingivalis* の生育抑制がみられた。さらに、3%BSA 含有最小培地に 0.8%、5%、10%エリスリトールをそれぞれ添加し培養したところ、濃度依存的に *P. gingivalis* の生育が抑制される傾向がみられた。

次に、エリスリトールがバイオフィーム形成時の *P. gingivalis* 菌体構成タンパク質の発現に及ぼす影響について、液体クロマトグラフータンデム型質量分析計を用いてプロテオミクス解析を行った。その結果、0.8%エリスリトール群では対照群に対し、主要な代謝経路である解糖系に関連する酵素群の増加、核酸合成経路のひとつであるピリミジン経路に関連する酵素群の減少や鉄代謝関連分子の増加といった傾向がみられた。また、*P. gingivalis* の主要な病原因子のうち、ストレスタンパク質の増加がみられたが、Kgp タンパク質分解酵素および付着関連分子である FimA 線毛や Mfa1 線毛に量的に大きな変化はみられなかった。一方、Rgp タンパク質分解酵素は有意に減少していた。また、*P. gingivalis* が保有する Rgp のアミノ酸残基に対し、リン酸化修飾部位の同定および対照群対 0.8%エリスリトール群におけるリン酸化比較定量を行った。その結果、Rgp アミノ酸配列におけるリン酸化修飾部位は 26 部位存在し、そのすべてがセリン・スレオニン残基であることが認められ、そのほとんどの部位で脱リン酸化の傾向がみられることが示された。

次に、エリスリトールによる Rgp 活性抑制効果について検討した。エリスリトール添加群ではエリスリトール非添加対照群に対し、*P. gingivalis* 菌体の Rgp 活性が濃度依存的に有意に抑制される一方で、*P. gingivalis* 培養上清の Rgp 活性は濃度依存的に有意に増加した。

また、エリスリトールが *P. gingivalis* 菌体内代謝産物に及ぼす影響について、キャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析計を用いたメタボロミクス解析による検討を行ったところ、核酸合成経路であるプリンおよびピリミジン代謝経路の代謝物質の多くがエリスリトール添加群で濃度依存的に減少傾向を示した。また、アミノ酸、糖鎖修飾関連物質や菌体相互作用関連物質においても、エリスリトール添加による量的変化がみられた。

さらに、*P. gingivalis* の産生する最終代謝産物のうち、揮発性硫化物 (VSC) の産生量に及ぼすエリスリトールの影響についてガスクロマトグラフを用いて検討を行った。*P. gingivalis* 培養フラスコ内の気体からは、VSC のうち硫化水素、メチルメルカプタン、硫化ジメチルおよび二硫化ジメチルが検出され、エリスリトール添加群では VSC 産生量が濃度依存的に有意に抑制された。

以上の結果は、エリスリトールが、*S. gordonii*-*P. gingivalis* より構成される混合バイオフィーム

の形成を抑制し、その微細構造に影響を及ぼすことを示している。また、エリスリトールによる Rgp の活性の抑制、解糖系・アミノ酸代謝系などのエネルギー代謝経路への影響、核酸合成の阻害、糖鎖修飾および菌体間情報伝達物質産生への影響が示されたことから、エリスリトールは、*P. gingivalis* の分裂・増殖もしくは菌体外マトリクス産生や菌体間情報伝達に影響を及ぼすことにより、*S. gordonii*-*P. gingivalis* 混合バイオフィーム形成を抑制している可能性の高いことが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、エリスリトールが *Streptococcus gordonii*-*Porphyromonas gingivalis* 混合バイオフィームの形成と微細構造に及ぼす影響と *P. gingivalis* の菌体構成タンパク質や代謝物質に及ぼす影響について検討したものである。その結果、エリスリトールは *P. gingivalis* バイオボリュームを減少させることにより混合バイオフィームの形成を抑制した。また、エリスリトールによる *P. gingivalis* の Rgp 活性およびエネルギー代謝経路への影響、核酸合成の阻害、糖鎖修飾および菌体間情報伝達物質産生への影響が示唆され、エリスリトールが、*P. gingivalis* の増殖もしくは菌体外マトリクス産生や菌体間情報伝達に影響を及ぼすことにより、混合バイオフィーム形成を抑制している可能性の高いことが示唆された。

以上のことから、本研究はエリスリトールによるバイオフィーム形成の抑制機序を解明する上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。