

指導教授氏名	指導役割
(自署)	研究の総括的指導
(自署)	
(自署)	

学位論文要旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野	歯周病態学分野	身分 大学院生	氏名	中村 綾
論文題名	天然由来レクチンと唾液の糖結合特性による口腔バイオフィルムの制御			
論文内容の要旨 (2000字程度)				
<p>【緒言】</p> <p>口腔バイオフィルムは強固な三次元構造と高い薬剤耐性を持ち、特に高齢者では物理的除去が困難となる。そのため、清掃を補完する新たな制御法が求められている。唾液は歯面にペリクルを形成し、<i>Streptococcus mutans</i> (<i>S. mutans</i>) などの初期付着やバイオフィルム形成に関与する。また、唾液中の糖タンパク質が有する糖鎖構造は、細菌の初期付着を左右する。さらに、レクチンは糖鎖を特異的に認識するタンパク質であり、<i>Agaricus bisporus</i> agglutinin (ABA) はGalβ1-3GalNAc (Core1構造) を認識し<i>S. mutans</i>の付着を抑制すると報告されている。しかし、ABAが結合する唾液中の糖タンパク質と、糖鎖認識による初期付着抑制機構は未解明である。</p> <p>本研究では、ABAの唾液糖タンパク質に対する結合特異性を分子レベルで解明することを目的とした。</p> <p>【材料と方法】</p> <p>1. 唾液提供参加者, 試料採取・処理 健常成人17名から日を変えて3回、安静時唾液を採取し、上清と沈殿に分画して使用した。全ての実験は岡山大学生命倫理審査(研2507-075)の承認を得て実施した。</p> <p>2. バイオフィルム付着抑制効果の評価 96ウェル平底プレートに唾液上清または沈殿を100 μL添加し、37°Cで2時間静置して被膜を形成した。PBSで洗浄後、ABA (100 μg/mL)、フェチュイン (100 μg/mL)、CPC (0.01%), PBS (対照)を加えて37°Cで1時間反応させた。再度PBSで洗浄後、1×10⁷ CFU/mLの<i>S. mutans</i>を加え18時間培養した。</p> <p>培養後、0.1%クリスタルバイオレットで染色し、570 nmで吸光度を測定した。さらに、各参加者の唾液タンパク濃度とABAによる付着抑制効果との相関を解析した。</p> <p>3. ABA結合タンパク質の検出 日間変動が小さい1名の唾液から、SDS-polyacrylamide gel electrophoresisとレクチンブロッキングで検出した。</p> <p>4. ABA結合タンパク質候補の選択と質量分析 前述(項目3)のシグナルに対応するバンドを銀染色、Coomassie Brilliant Blue染色、Periodic acid-Schiff染色で確認し、切り出したゲルを用いて、nano-liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flightによる質量分析を行った。</p> <p>5. タンパク質同定解析 質量分析データはMascotでUniProtヒトデータベースを検索し、Mascot Identity Threshold</p>				

($p < 0.05$) を満たすタンパク質を同定した。

6. レクチン結合候補タンパク質の機能評価

ウシ顎下腺ムチンとヒト唾液由来 α アミラーゼを用い、*S. mutans*のバイオフィーム付着量を、ABA添加の有無で前述（項目2）と同様に定量した。

7. 統計解析

2群比較にはWelchの*t*検定、3群以上にはKruskal-Wallis検定とDunn法を用いた。ABAによる付着抑制効果と唾液タンパク濃度との関連はSpearmanの順位相関で評価した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

1. バイオフィーム付着抑制効果

上清分画では全参加者でABA添加によって、細菌付着量が有意に減少した。一方、沈殿分画においてもABAによる細菌付着は抑制されたが有意差はなかった。また、両分画とも抑制効果には個人差がみられたが、ABAの抑制効果と唾液中総タンパク濃度との間に相関はなかった。

2. ABA結合タンパク質の検出および候補

レクチンブロッキングでは、全唾液、上清、沈殿の3分画で250–270 kDa、60–70 kDa、そして約20–25 kDa付近に明瞭なABA結合シグナルを検出した。

3. 同定されたタンパク質

切り出したゲルの質量分析から、250–270 kDaのバンドからは高分子ムチン類であるMucin 5B (MUC5B)、Mucin 7 (MUC7)、そしてDeleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1)が、60–70 kDaのバンドからは α アミラーゼ (AMY1B)が同定された。一方、20–25 kDaのバンドではZymogen granule protein 16 homolog BやCysteine-rich secretory protein 3を含む複数のタンパク質が検出されたが、ペリクルの構成成分としての報告がなく、候補タンパク質から除外した。

4. レクチン結合候補タンパク質の機能

ウシ顎下腺由来ムチンは62.5–500 $\mu\text{g/mL}$ で*S. mutans*の付着を抑制したが有意差はなく、1,000 $\mu\text{g/mL}$ では抑制が消失した。一方、ヒト唾液由来 α アミラーゼでは12.5–200 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で付着量にほとんど変化はなかった。また、どちらもABA添加による付着抑制効果に、濃度依存性はなかった。

【考察】

本研究では、ABAは唾液の上清分画で有意な付着抑制効果を示した。これは、唾液中の可溶性糖タンパク質と特異的に相互作用し、細菌の初期付着段階を選択的に抑制することを示唆する。付着抑制効果には個人差がみられたが、総タンパク濃度とは相関しなかった。このことから、可溶性唾液糖タンパク質が有する糖鎖構造の質的な差が作用機序に関与している可能性がある。

質量分析の結果、ABAはMUC5B、MUC7、そしてDMBT1といった主要ムチン類に加えて、 α アミラーゼにも反応することが示唆された。ムチン類にはGal β 1-3GalNAc構造を持つO型糖鎖が豊富であり、 α アミラーゼはGal終末構造を含むN型糖鎖を持つ。ABAはこれらに反応し、初期付着を抑制した可能性がある。

精製タンパク質を用いた機能評価では有意な付着抑制効果はなく、濃度依存性もなかった。これは、本研究でペリクルの多層構造や高い糖鎖密度を十分に再現できていないことが影響したと考えられる。また、唾液は加齢に伴いムチン量や糖鎖修飾が変化することが知られており、ABA結合能も年齢差の影響を受ける可能性がある。

今後は、参加者数の拡大と年齢層別の検討により、ABAが標的とする唾液糖タンパク質の多様性と付着抑制機序のさらなる解明が必要である。

【結論】

ABAの結合候補として、唾液中の複数の糖タンパク質、特にMUC5B、MUC7、DMBT1などの高分子ムチン類およびAMY1Bが同定された。ABAはこれらとの相互作用を介して*S. mutans*の初期付着を抑制する可能性が示唆された。