

学位論文題名

ヒト唾液中のヒドロキシアパタイト反応性タンパク質
ヒスタチンの精製および機能に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】ヒト唾液中に存在するポリペプチド、ヒスタチンはヒドロキシアパタイト(HAP)への高い親和性ならびに抗菌活性をはじめとする様々な細胞活性を有することから、エナメル質表面の獲得皮膜形成への関与ならびに口腔内微生物叢の制御因子の1つとして機能していることが知られている。

本研究ではHAPクロマトグラフィーを用いたヒスタチンの精製法を新しく開発した。また有機化学的にヒスタチン5の合成、ウサギを免疫して抗体を作成し、摘出されたヒト唾液腺組織に対し、免疫組織化学的染色を行った。また唾液より分離精製したヒスタチン、および合成ヒスタチンを用いて、*Porphyromonas gingivalis*由来トリプシン様酵素への影響を調べた。さらに、あらかじめHAPに全唾液、耳下腺唾液およびヒスタチンなどで浸漬処理をし、カラムに充填してクロマトグラフィーを行い、*Streptococcus mutans*のHAPへの付着性の影響を調べた。

【材料と方法】久保木式採唾管を用いて酸刺激下にて耳下腺唾液、コットンロール法にて全唾液を採取し、6M相当の尿素粉末を添加して濾過後(0.45 μ M)、直接HAPクロマトグラフィーを行った。このうちHAPに親和性の強い2つの分画を逆相高速液体クロマトグラフィーにて更に精製し、自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。

次に耳下腺唾液より分離精製したヒスタチン1, 3, 5を用いて、*P. gingivalis* 381菌体より抽出したトリプシン様酵素の活性への影響を合成基質を用いて調べた。また固相ペプチド合成法(Merrifield法)により、有機化学的にヒスタチン5を合成した。これをウサギに免疫して抗体を作成し、唾液腺におけるヒスタチンの局在を知るために唾液腺(耳下腺、口唇腺、顎下腺)の免疫組織化学的染色を行った。

カラムに充填した顆粒状HAP(無処理、全唾液処理、耳下腺処理、合成ヒスタチン5処理、硫酸プロタミン処理)に、BHI培地にて18時間培養、集菌後、洗浄、超音波処理した*S. mutans*

MT8148菌懸濁液をチャージし、リン酸緩衝液による直線濃度勾配にて菌の遊離状態を測定し、HAPへの菌の付着状態を調べた。

【結果と考察】 エドマン法によるアミノ酸配列の決定により、純粋なヒスタチン1, 3, 5であることが判明し、6 M尿素変性下によるHAPクロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーにより、採取直後の新鮮唾液からわずか2段階のクロマト操作で、ヒスタチンの精製が可能になったことが明らかとなった。

精製したヒスタチン1, 3, 5のいずれも、*P. gingivalis* 381由来のトリプシン様酵素に対し、強力な阻害作用が認められた。さらに酵素反応分析の結果、阻害作用はヒスタチン5 > ヒスタチン3 > ヒスタチン1の順に強く(ヒスタチン濃度: $10^{-1} \mu\text{M}$ の時)、至適pHは7.0であった。また抗体を用いた唾液腺の免疫染色により、唾液腺終末部の漿液細胞内の分泌顆粒が特異的に染め出されることが判明した。

S. mutans MT8148を用いたHAPカラム法による菌付着実験では、リン酸緩衝液による濃度勾配によって、無処置HAPの場合、菌は3つのピークに分かれて遊離した。それぞれのピークはグラム染色後の光学顕微鏡観察により、菌体の凝集度の違いによるものであることが推定された。さらにHAPカラムの唾液処理することによって菌のHAPへの親和性は著しく増強されることがわかり、今回開発された新しい方法によって唾液中に*S. mutans* MT8148のHAPへの付着を増強する因子が存在することが明確に証明された。またヒスタチン単独による処理でも唾液処理と同じ実験結果が得られたため、ヒスタチンはこの付着増強因子の重要な一成分であることが示唆された。

【結論】 本研究によって、HAPクロマトグラフィーによるヒスタチン分離精製法が簡便、迅速なことから、このペプチドの分離精製法として有用なことが、ヒスタチン1, 3, 5のいずれもが*P. gingivalis*由来のトリプシン様酵素に対する強力なインヒビターであること、*S. mutans* MT8148のHAPへの付着に対し、ヒスタチンは重要な付着増強因子の1つであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 宏
副 査 教 授 久保木 芳 徳
副 査 教 授 松 本 章

論文審査は、主査および副査全員の出席のもとで、口頭諮問によって提出論文の内容と関連分野について行われた。

歯や歯周組織の健康維持，あるいは齲蝕，歯周疾患の発生および進行には，三大要因の一つである宿主要因がかかわっている。宿主要因のうち唾液成分の要因がどのようにかかわっているかを明らかにすることは臨床上也必要である。

唾液中のタンパク質はポリペプチドも含めて現在40種類以上知られ，一部は明らかにされているが大部分は近年，ようやくその諸性質のいくつかが解明されたに過ぎない。

ヒト唾液中に存在するポリペプチドで，ヒドロキシアパタイト（HAP）への高い親和性を有することが知られているヒスタチンについて，唾液から簡便かつ迅速な分離・精製法を開発することと，歯や歯周組織の健康維持，あるいは齲蝕，歯周疾患の発生および進行にかかわる唾液の機能，ヒスタチンの役割を明らかにする目的で本研究は行われている。

研究方法としては，久保木式採唾管を用い酸刺激下にて耳下腺唾液，コットンロール法にて全唾液を採取し，6 M相当の尿素粉末を添加して濾過後(0.45 μ M)，直接 HAP クロマトグラフィーを行った。このうち HAP に親和性の強い2つの分画を逆相高速液体クロマトグラフィーにて更に精製し，自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。

次に耳下腺唾液より分離精製したヒスタチン1，3，5を用いて *P. gingivalis* 381菌体より抽出したトリプシン様酵素の活性への影響を合成基質を用いて調べた。また固相ペプチド合成法（Merrifield 法）により，有機化学的にヒスタチン5を合成した。これらをウサギに免疫して抗体を作成し，唾液腺におけるヒスタチンの局在を知るために唾液腺(耳下腺，口唇腺，顎下腺)の免疫組織化学的染色を行った。

カラムに充填した顆粒状 HAP（無処理，全唾液処理，耳下腺処理，合成ヒスタチン5処理，硫酸プロタミン処理)に，BHI 培地にて18時間培養，集菌後，洗浄，超音波処理した *S. mutans* MT 8148菌懸濁液をチャージし，リン酸緩衝液による直線濃度勾配にて菌の遊離状態を測定し，HAP への菌付着状態を調べた。

エドマン法によるアミノ酸配列の決定により、純粋なヒスタチン1, 3, 5であることを明らかにし、6M尿素変性下によるHAPクロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーにより、採取直後の新鮮唾液からわずか2段階のクロマト操作で、ヒスタチンの精製を可能とした。

精製したヒスタチン1, 3, 5のいずれも、*P. gingivalis* 381由来のトリプシン様酵素に対し、強力な阻害作用が認められた。さらに酵素反応分析の結果、阻害作用はヒスタチン5 > ヒスタチン3 > ヒスタチン1の順に強く(ヒスタチン濃度: $10^{-1} \mu\text{M}$ の時), 至適pHは7.0であった。また抗体を用いた唾液腺の免疫染色により、唾液腺終末部の漿液細胞内の分泌顆粒が特異的に染め出されることを明らかにした。*S. mutans* MT8148を用いたHAPカラム法による菌付着実験では、リン酸緩衝液による直線濃度勾配によって、無処理HAPの場合、菌の3つのピークに分かれて遊離した。それぞれのピークはグラム染色後の光学顕微鏡観察により、菌体の凝集度の違いによるものであることが推定された。さらにHAPカラムを唾液処理することによって菌のHAPへの親和性は著しく増強されることがわかり、今回開発された新しい方法によって唾液中に*S. mutans* MT8148のHAPへの付着を増強する因子の存在すること明確に証明された。またヒスタチン単独による処理でも唾液処理と同じ実験結果が得られたため、ヒスタチンはこの付着増強因子の重要な一成分であることが示唆された。

本研究によって、簡便で迅速なヒスタチン精製法を確立したことは、その分離、精製を必要とする研究を容易にした。また、ヒスタチン5がpH7.0~7.5で*P. gingivalis* 381由来のトリプシン様酵素に対して最大の活性阻害を示したことは、唾液中のヒスタチンが、歯周ポケットを形成していない歯肉において歯周病の発症を抑制する因子として機能している可能性を示唆した。さらに、齶蝕原性細菌*S. mutans* MT8148のヒドロキシアパタイトへの付着増強因子であることを見だしたことは、唾液中のヒスタチンは*S. mutans*のエナメル質の付着を容易にする因子として作用することも示唆した。以上のことは予防歯科の分野の発展に寄与するものであり高く評価される。

審査にあたって、本論文の内容の説明、本研究の意義、発展および関連分野に関する質問にも、明確で満足すべき回答が得られた。

本論文は予防歯科の分野はもとより、歯科医学の進歩に寄与するところ大であり、本学位申請者は博士(歯学)の学位を授与されるに十分値するものと認めた。