

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名 大 島 恵 二 郎
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 乙 第 278 号
学位授与年月日 令和 6 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 Proteome analysis of high affinity mouse saliva proteins to hydroxyapatite
(ヒドロキシアパタイト高親和性マウス唾液タンパク質のプロテオーム解析)
Heliyon 第 8 巻 第 8 号 E10077 doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10077
論文審査委員 主査 教授 山 越 康 雄
副査 教授 朝 田 芳 信 副査 教授 大 島 朋 子

内 容 の 要 旨

【緒 言】

健康な歯を維持することは生涯健康を維持する上で重要な役割を果たす。日本の小児の齲蝕経験と有病率はかなり減少しているが、成人では毎日の口腔ケアを怠っていないにもかかわらず加齢とともに増加している。その理由として各個人の正確な齲蝕感受性の理解に基づいた予防対策が欠如している可能性がある。そこで、近交系マウスを用いた研究を行ったところ、同一飼育環境下で BALB/cA は齲蝕感受性が高く、C3H/HeN は低いことが示された。2 系統間で齲蝕原因菌の定着率と齲蝕発症率が異なっていたことは、ペリクル構成唾液タンパク質に相違があることが考えられたので、これら 2 系統のマウス唾液タンパク質でヒドロキシアパタイト (HAP) に吸着した唾液タンパク質の違いを特定するためにプロテオーム解析を行い、齲蝕抑制関連タンパク質候補として同定を試みた。

【材料および方法】

マウスからの唾液採取：

BALB/cA, C3H/HeN の 2 種のマウス雄 8 週齢から、硫酸ピロカルピンとイソプレテレノールで刺激して全唾液を採取した。

HAP-HPLC：

全唾液サンプルは Hydroxyapatite-HPLC カラム (HAP-HPLC) を用いて分画した。HAP-HPLC 吸着タンパク質の溶出はリン酸カリウム緩衝液のステップワイズとリニアグラジェントで溶出し、脱塩処理後、解析用サンプルとした。

SDS-PAGE：

HAP-HPLC の分画タンパク質を 12%ポリアクリルアミドゲル SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

泳動後の全タンパク質の染色は CBB 染色と銀染色、糖タンパク質は糖染色、リン酸化タンパク質はリン酸化染色により検出を行った。

ディファレンシャル 2 次元電気泳動：

BALB/cA, C3H/HeN の HAP-HPLC の各溶出分画を Cy3, Cy5 蛍光標識して同量ずつ混合し、2D-PAGE を行い蛍光検出でタンパク質を可視化した。

MALDI-TOF MS 分析による Peptide Mass Fingerprinting：

2D-PAGE で切り出したスポットを MALDI-TOF MS 分析し、MASCOT 解析を行うことで、タンパク質を同定した。

ポリクローナル抗体の作成：

データベースに公開されているマウスカーボニックアンヒドラーゼ 6 (CAVI) タンパク質のアミノ酸配列の一部を合成し、

それを抗原としてウサギポリクローナル抗体を作成した。

糖鎖分析とウエスタンブロッティング：

HAP-HPLC 溶出分画について、脱糖鎖酵素で処理前後のサンプルを用い、CA VI ポリクローナル抗体でウエスタンブロッティング解析を行った。

MALDI-TOF MS 分析による糖鎖分析：

HAP-HPLC 溶出分画のタンパク質から PNGaseF、シアリダーゼ処理で分析用の糖鎖を調整し、MALDI-TOF/MS にて解析を行った。

ELISA でタンパク質の定量：

HAP-HPLC のリニアグラジェント溶出分画を CA VI 抗体の ELISA 法で定量した。

遺伝子解析：

各マウスの耳下腺、顎下腺を摘出し、total RNA を抽出後 cDNA を合成し、CA VI 特異的プライマーでの PCR で DNA 断片を増幅し、塩基配列をサンガー法で読み取った。

CD スペクトル解析：

HAP-HPLC 溶出分画を Far-UV circular dichroism (CD) により、CD スペクトル解析した。

緩衝力の測定：

HAP-HPLC 溶出分画の緩衝力は 10 mM NaHCO₃ に CO₂ を飽和溶解させた溶液 500 μ l に各脱塩分画タンパク質 10 μ l (濃度 mg/ml) を加え pH の変化を pH 電極で測定した。

統計解析：

バンド分子量、HAP 高親和性タンパク質量、緩衝能は、Mann-Whitney U テストによる統計解析を行った。

【結 果】

HAP-HPLC 分析：

HAP に強く吸着しているタンパク質は、唾液 1 ml の総タンパク質に対する割合で比較したところ、C3H/HeN は BALB/cA の 2 倍以上であった。

SDS-PAGE 分析：

40 KDa 付近のバンドの移動度は、BALB/cA より C3H/HeN が遅くなっていることが認められ、糖鎖の付加が観察されたが、明らかなリン酸基の付加は検出されなかった。

ディファレンシャル 2 次元電気泳動：

40 KDa 付近のタンパク質を比較すると BALB/cA の方が C3H/HeN より分子量が小さいだけでなく、等電点も低いことが明らかとなった。

MALDI-TOF MS 分析による Peptide Mass Fingerprinting：

40 KDa 付近のタンパク質は、CA VI に対してスコア 85 以上、期待値 2.5-e5 以下、ペプチドマッチング 10 以上、シーケンスカバー率 45% 以上であった。

唾液の CA VI の確認 (ウエスタンブロッティング)：

CA VI ポリクローナル抗体に反応したバンドが確認され、C3H/HeN の CA VI は BALB/cA のそれより若干移動度が遅くなっていた。

HAP-HPLC 分画の ELISA による CA VI 定量：

リニアグラジェント分画の ELISA による定量の結果、CA VI の溶出時間は C3H/HeN の方が遅いため強く吸着し、吸着量も多いことが示された。

糖鎖修飾の分析 (ウエスタンブロッティング, MALDI TOF/MS 分析)：

分画を脱糖鎖酵素で処理した結果、両系統とも CA VI は低分子量にシフトしていた。糖鎖を MALDI TOF/MS 解析した結果、N 型であったが両系統で構造の異なる糖鎖が同定された。

cDNA のシーケンス解析：

両系統マウスの唾液腺からの cDNA をシーケンス解析しデータベースとアライメント比較した結果、96 番コドン塩基が、C3H/HeN ではデータベースと同一配列の CTT (ロイシンをコード) であったが、BALB/cA では ATT (イソロイシンをコード) であった。

CD スペクトル解析：

CD スペクトル解析のピークレベルに差が認められ、タンパク質としての立体構造に差があることが示唆された。

緩衝力の測定：

CAVIの酵素活性はBALB/cA より C3H/HeN の方が高いことが示された。さらに、脱糖鎖酵素で消化後の酵素活性の比較を行ったところ、両系統ともに消化前に比較して活性が下がったが、BALB/cA より C3H/HeN の方が高い活性であることが示された。

【考 察】

CAVIは、炭酸脱水酵素（カルボニックアンヒドラーゼ）ファミリーの1員で、分泌液中に存在し、口腔内で細菌などの産生する水素イオンを重炭酸イオンと反応させ水と二酸化炭素にかえて酸を中和する。ヒト唾液中にも存在し、歯のエナメル質表面に吸着し、初期段階から長時間にわたりペリクル構成タンパク質として存在していることが報告されている。また、ヒトにおいて唾液のCAVI量とDMFTは逆相関関係にあると報告がなされている。これらのことから、CAVIはペリクル構成初期段階から安定に存在し、常にpHを緩衝しエナメル質を保護することで、齲蝕抑制に関与していると考えられる。一方、いくつかのペリクルタンパク質は歯面を保護する反面、初期付着菌のアンカーリングのターゲットとなることも知られている。*Streptococcus mutans* のアドヘジンであるPACは、ペリクルを構成しているProlin-rich proteinsをレセプターとして付着する。マウスの2系統間のCAVIについて、我々の行った*S. mutans*の凝集試験では、凝集効果が確認されなかったので定着を促さず、齲蝕抑制効果を妨げる作用はないと考えられる。

CAVIの重炭酸系の緩衝力に関わる作用について、マウス系統間でCAVI酵素活性の比較は今までに報告がない。そこで、系統間で酵素活性の比較をしたところ、BALB/cA より C3H/HeN の方が有意に高いことが見出された。この活性の違いは一つの異なるアミノ酸と修飾糖鎖のN-グルカンの差と推定された。

われわれの結果から、C3H/HeNのCAVIはエナメル質にペリクル様タンパク質として吸着した状態で、量、酵素活性ともにBALB/cAに比べ、有意に高くなっていると予想された。したがって、プラーク中のpHが低下した場合でも、HAP表面ではCAVIの酵素活性作用で、pHを緩衝しエナメル質脱灰臨界pHまで低下せず、齲蝕の発生を抑制する可能性が考えられた。ヒトの齲蝕抑制効果のデータ等を考えあわせるとCAVIの存在量よりも、活性が重要な役割を担っていることが考えられる。

以上のことからHAPに強く吸着するCAVIは齲蝕抑制タンパク質として機能し、齲蝕感受性に寄与している可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

日本の小児の齲蝕経験と有病率は減少しているが、成人では加齢と共に増加傾向が見られ、その理由として、個人の齲蝕感受性の理解に基づいた予防対策が欠如している可能性がある。本研究では、齲蝕感受性の高いマウス（BALB/cA）及び低いマウス（C3H/HeN）を用いて、両者の齲蝕抑制に関連する唾液タンパク質の同定及び構造の差異についてプロテオーム解析にて検証することを試みた。

上記2系統のマウスより採取した唾液試料をヒドロキシアパタイト（HAP）カラムを用いて分画し、SDS電気泳動（SDS-PAGE）後の各種染色にて各溶出画分の翻訳後修飾について調べた。次に、最もHAPに親和性のある画分に対して2次元電気泳動（2D-PAGE）、ウェスタンブロット（WB）、質量分析、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、円偏光二色性（CD）スペクトル解析を行い、主要タンパク質の同定、HAPに対する吸着能、翻訳後修飾及び2次構造の差異、翻訳後修飾が与える緩衝力を調べた。また、同定された主要タンパク質の相補DNA塩基配列を調べて、2系統のマウス間のアミノ酸配列を比較した。

C3H/HeNマウスの唾液はHAPに強く吸着するタンパク質を多く含み、SDS-PAGEと2D-PAGEにより、C3H/HeNのタンパク質がBALB/cAよりも分子量と等電点が低いことが確認された。このタンパク質は、質量分析及びWBにより炭酸脱水酵素6（CA6）であることが判明し、ELISAによりC3H/HeNのCA6がより多くHAPに吸着されることが示唆された。糖鎖修飾の解析では、両系統のCA6で異なる糖鎖が同定され、唾液の緩衝力に影響を及ぼすことが判明した。さらに塩基配列解析によりロイシンとイソロイシンをコードするコドンに両系統で違いがあり、CDスペクトル解析により、CA6の二次構造に差があることが示唆された。これらの所見は、HAPに強く吸着するCA6が齲蝕抑制タンパク質として齲蝕感受性に寄与していることを示唆していた。

以上、本研究は CA6 が齲蝕抑制タンパク質として機能することが示されたことにより、CA6 を活用した齲蝕予防法の改善や口腔ケアに関連する歯科材料及び口腔内の環境を調整する製品の開発に繋がる可能性があり、口腔の健康状態の向上が期待されることが考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値が有ると判定した。