原 著

ヒト顎舌下腺唾液より分離精製したシア
ル酸を多く含む糖タンパク質と
口腔細菌との結合性

Binding of Oral Bacteria with the Sialic Acid-rich
Glycoprotein Purified from Human
Submandibular-Sublingual Saliva

高 垣 勝* 竹 下 哲 生*
柴 田 聡 明* 常 光 旭*

Masaru TAKAGAKI*, Tetsuo TAKESHITA*,
Satoaki SHIBATA* and Akira TSUNEMITSU*

概要：唾液中の糖タンパク質は、獲得被膜の構成成分として歯垢の基質形成に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究においては、唾液糖タンパク質と口腔細菌の結合性を明らかにする目的で、ヒト顎舌下腺唾液よりシアル酸を多く含む糖タンパク質を高速液体クロマトグラフィーを用いて分離し、 $[^{14}\text{C}]$ で標識したこの糖タンパク質標品を用いて口腔細菌との結合性を調べた。

その結果、ヒト顎舌下腺唾液より得たシアル酸を多く含む糖タンパク質は、分子量、約110,000のサブユニットから成る4量体を構成しており、供試菌株のうち通性嫌気性菌の *Streptococcus sanguis* および嫌気性菌群の *Bacteroides gingivalis* と高い結合性がみられた。しかし、菌体を加熱処理するとすべての菌株において、糖タンパク質と口腔細菌の結合性は、著しく低下したが、トリプシンで菌体を処理した場合は、通性嫌気性菌と嫌気性菌との間には、著しい差異がみられた。

索引用語：ヒト顎舌下腺唾液、口腔細菌、シアル酸、糖タンパク質、結合性

結 言

唾液に存在する糖タンパク質は、歯面に形成される獲得被膜の構成成分であり、口腔細菌の歯面への付着に重要な役割を持っている¹⁻⁵⁾。口腔細菌の獲得被膜への付着機構に関して、Rölla らは、 Ca^{2+} が負に荷電した菌体表層と獲得被膜の間を架橋し、静電的な付着機構を考へており⁶⁾、この考え方を支持する研究者も多い⁷⁻¹⁰⁾。

しかし、菌体表層の糖質に存在する水酸基と、獲得被膜上のカルボキシル基ならびに硫酸基との間に生ずる水素結合によって付着する機構を想定する学者もある¹⁾。近年、菌体表層に存在するレクチン様物質が、獲得被膜への結合に関与しているのではないかという報告がいくつかみられ¹¹⁻¹⁸⁾、柴田ら¹⁴⁾や永田ら¹⁵⁾はヒト耳下腺唾液よりプロリン含量の多い糖タンパク質を分離・精製し、口腔レンサ球菌との間にレクチン様結合があることを指摘

* 大阪大学歯学部予防歯科学講座（主任：常光旭教授）

* Department of Preventive Dentistry, Osaka University Faculty of Dentistry (Director: Prof. Akira TSUNEMITSU)

昭和60年7月22日受付

している。

このように、口腔細菌の獲得被膜への付着機構に関して、種々の考え方が示されているが、供試した菌種と使用した唾液の種類、つまり全唾液、耳下腺唾液、あるいは顎舌下腺唾液を用いたかによって、また、用いた唾液糖タンパク質の純度によって、種々の菌種との間の相互作用が異なっている。文献的には、口腔レンサ球菌と唾液との凝集を調べ、付着機構ないしは吸着機構を論じたものが多く¹⁸⁻²⁰⁾、口腔内嫌気性菌と唾液との相互作用を調べた報告は数少ない^{21,22)}。

そこで、本研究は口腔レンサ球菌以外に嫌気性菌を用い、唾液の中でも獲得被膜形成の際、主役を果たしていると考えられるシアロ糖タンパク質を多く含む顎舌下腺唾液との相互作用を調べることに焦点を絞った。そのため、ヒト顎舌下腺唾液よりシアロ酸を多く含む糖タンパク質を分離し、そのペプチド鎖に存在するリジン基を^[14C]で標識し、各種の口腔細菌との結合性を追究した。

実験材料ならびに方法

1. ヒト顎舌下腺唾液的採取

27歳の健康な男子(血液型O型)より、氷冷下で顎舌下腺唾液を採取した。採取には、シリコン精密印象材(Optosil, Xantopren, Bayer Dental, West Germany)を用いて口腔底部の印象を採得、舌下小丘を被うマウスピースを作製し、それを用いて吸引採取した。採取後、直ちに-20°Cにて凍結を行い、必要量になるまで凍結保存した。

2. 顎舌下腺由来の糖タンパク質の分離精製

1) 唾液標品の調整

-20°Cにて凍結保存しておいた採取唾液を4°Cの条件下で解凍、20,000×gで20分間遠心した後、得られた上清をろ過(TOYO MEMBRANE FILTERS, PORE SIZE 0.2μm, 東洋濾紙株式会社, 東京)し、顎舌下腺唾液標品とした。

2) Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System, Mono Qカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィ

20mM 酢酸アンモニウム塩緩衝液(pH 7.5)にて平衡化したMono Qカラム(5×50mm, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)に顎舌下腺唾液標品を2倍希釈して吸着させ、同一緩衝液にてよく洗浄後、1M炭酸水素アンモニウム塩を含む同緩衝液で吸着画分を直線濃度勾配溶出法にて溶出させた。流速は

1 ml/min で1分間ごとに分取し、タンパク質の検出は波長280nmの吸光度を測定することにより行った。

3) Shim-pack Diol-300によるゲルろ過

イオン交換クロマトグラフィーにより得られた吸着画分のうちシアロ酸および糖含量の多い画分を分離し、蒸留水により透析し凍結乾燥法にて濃縮した後、LC-4 A LIQUID CHROMATOGRAPH(島津製作所, 京都)を使用し、0.2M酢酸アンモニウム塩緩衝液(pH 7.5)にて平衡化したShim-pack Diol-300カラム(7.9×500 mm, 島津製作所)にてゲルろ過を行った。流速は、0.5 ml/minとし、1分間ごとに分取した。分析にはC-R2AX CHROMATOPAC(島津製作所)を使用した。

3. SDS-ポリアクリルアミドディスク電気泳動

電気泳動は、Laemmliの方法²³⁾に準じ、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecylsulfate, 以下SDSと略す)を含む10%および7.5%のポリアクリルアミドゲルを支持体として行った。ゲルをガラスカラム(0.4×10.5cm)に調整し、トリス-塩酸塩緩衝液(pH 8.8)を用い、1.5 mA/tube, 4°C, の条件下で5時間電気泳動を行った。この後タンパク質は、クマシーブリリアントブルーにて染色、糖はZachariusらの方法²⁴⁾に準じてperiodic acid-Shiff (PAS)染色を行った。

4. 分子量の測定

顎舌下腺唾液糖タンパク質の分子量は、ゲルろ過法およびSDS-ポリアクリルアミドディスク電気泳動法により測定した。

ゲルろ過法による測定は、Shim-pack Diol-300カラム(7.9×500mm)を0.2M酢酸アンモニウム塩緩衝液(pH 7.5)で平衡化し、同溶液に溶解した標準物質を展開させた。流速は、0.5 ml/minで、1分間ごとに分取した。標準物質としては、チログロブリン、フェリチン、カタラーゼ、乳酸脱水素酵素(GEL FILTRATION CALIBRATION KIT, Pharmacia Fine Chem.)を使用した。

SDS-ポリアクリルアミドディスク電気泳動法による分子量の測定は、0.1% SDSを含む10%のポリアクリルアミドゲルを支持体として、5%メルカプトエタノール存在下で標準物質を電気泳動して行った。標準物質には、α-ラクトアルブミン、トリプシンインヒビター、カーボニックアンヒドラーゼ、オプアルブミン、ウシ血清アルブミン、ホスホリラーゼb (Pharmacia Fine Chem.)を使用した。

5. 糖、タンパク質およびシアロ酸の定量

ヘキソースはフェノール硫酸法²⁵⁾、タンパク質は

Lowry らの方法を改良した Hartree の方法²⁶⁾, シアル酸はレソルシノール法^{27,28)}により定量した。

標準物質として、ヘキソースには D-グルコース、タンパク質はウシ血清アルブミン、シアル酸には N-アセチルノイラミン酸 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA) を使用した。

6. ガスクロマトグラフィーによる糖の分析

1) メタノリシス

糖タンパク質中の中性糖、アミノ糖およびシアル酸を塩化水素-メタノールを用い、各糖をメチルグリコシド化し、定量分析を行った²⁹⁻³²⁾。アミノ糖については、反応中に脱アセチル化されるため、ガスクロマトグラフィーによる定量分析の前に、再アセチル化を行った。

約 0.25 μ mol の糖を含む試料をバイアル中で乾固させ、これに 1.5N 塩化水素-メタノール (和光純薬工業株式会社, 大阪) 0.5ml を入れ、窒素置換後、すばやく密栓を行った。90°C, 24時間加熱後、室温にもどし、固体の炭酸銀を加えて中和を行い、無水酢酸 0.1ml を加え充分攪拌し、室温で 6 時間放置した。遠心操作により上清を分離し、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固させ、デシケータ中で乾固保存した。

2) トリメチルシリル化

試料を 24 時間乾燥させた後、50 μ l の TMS 化剤 (ピリジン-1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサメチルジシラザン-トリメチルクロロシラン, 5 : 1 : 1, v/v, 和光純薬工業株式会社) を加え、充分混和した後、室温で 30 分間反応させた。

3) ガスクロマトグラフ分析

水素炎イオン検出器付ガスクロマトグラフ GC-4 CMPF 型 (島津製作所) および日立 056 型記録計 (日立製作所, 東京) を使用した。カラムは、3% SE-30 を被覆した 80~100 メッシュのクロモゾルブ W をガラス製 U 字型カラム (0.3×200cm) に充填したものを用い、注入口温度を 240°C に維持し、カラム温度を毎分 0.5°C 上昇させ 140~200°C の昇温分析を行った。

7. 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質の [¹⁴C] による標識

陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過により得た顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質は、Jentoft と Dearborn の方法³³⁾ により [¹⁴C] で標識した。凍結乾燥後、-20°C で保存しておいた試料に 0.2M 再結晶化シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液 200 μ l を加え、[¹⁴C] ホルムアルデヒド (New England Nuclear Laboratory, Boston, USA) を 200 μ l (120.8

μ Ci/2.26 μ mol) を加え、37°C で 1 時間反応させた。さらに [¹⁴C] で標識していない 37% ホルマリン溶液を 600 μ l 加え 37°C で 23 時間反応させた。未反応物質は、蒸留水で平衡化したバイオ・ゲル P-4 カラム (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA, 0.75×90cm) で除去した。

8. 供試菌株

通性嫌気性菌群は、大阪大学歯学部予防歯科学講座で保有し、ブレイン・ハート・インフュージョン・アガー (Difco Laboratories, Detroit, USA) の高層培地に穿刺培養した後、4°C 冷所保存し、1 カ月ごとに新たに穿刺継代培養したものを用いた。*Bacteroides gingivalis* 381 株, *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 15930 株, *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 25845 株および *Capnocytophaga* AL 2-6-2 株は、サンスター株式会社基礎研究所より、*Eikenella corrodens* 1073 株は、大阪大学歯学部口腔治療学講座より分与を受けた。

9. 顎舌下腺唾液由来糖タンパク質の口腔細菌への結合性

通性嫌気性菌群は、10ml のブレイン・ハート・インフュージョン・ブロス (Difco) に移植後 37°C で 24 時間培養し、さらに 100ml の同液体培地に移植、37°C で 24 時間培養を行い、10,000×g, 20 分間の遠心操作により集菌した。*Bacteroides gingivalis* 381 株, *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 15930 株, *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 25845 株および *Capnocytophaga* AL 2-6-2 株は、30mg/ml のトリプチケース (BBL), 1mg/ml の酵母エキース末 (BBL), 5 μ g/ml のヘミン, 1ng/ml のメナジオンを含む液体培地 10ml に接種し、嫌気的条件下で 37°C, 48 時間培養し、さらに 100ml の同液体培地に移植、同様に嫌気的条件下で 37°C, 48 時間培養し、10,000×g, 20 分間の遠心操作により集菌した。*Eikenella corrodens* 1073 株は、30mg/ml のトリプチケース (BBL), 3 μ g/ml のヘミン, 2mg/ml 硝酸カリウムを含む液体培地 10ml に接種し、嫌気的条件下で 37°C, 48 時間培養し、さらに 100ml の同液体培地に移植、同様に嫌気的条件下で 37°C, 48 時間培養し、10,000×g, 20 分間の遠心操作により集菌した。集菌した菌体は、0.15M 塩化ナトリウムを含む 0.01M リン酸ナトリウム塩緩衝液 (Phosphate buffered saline, 以下 PBS と略す) (pH 7.5) で 3 回洗浄後、0.01M PBS に懸濁、波長 660nm における吸光度が 1.6 になるよう調整し、その 0.5ml を [¹⁴C] 標識した顎舌下腺唾液由来糖タンパク質 10 μ l と 4°C で 2 時間反応させた。反応後、さらに菌体を

0.01M PBS にて3回洗浄し, Tissue solubilizer (Packard SOLUENE-350, PACKARD INSTRUMENT COMPANY INC., IL., USA) 0.5ml に溶解後, キシレン・シンチレーション液 (キシレン 7.0l, ノニオン 3.0l, エタノール 913 ml, 2,5-ジフェルニオキサゾール 40.2g, 1,4-ビス [2-(5-フェニルオキサゾリン)]-ベンゼン 2.0g) 12ml を加えて, シンチレーション・カウンター (1215 RACKBETA LIQUID SCINTILLATION COUNTER, LKB WALLAK, Sweden) により, 放射能を測定した。菌体の熱処理は, 100°C で10分間加熱し同様の方法で, [14 C] 標識糖タンパク質との結合性を調べた。トリプシン (Trypsin from Bovine Pancreas Type I, Sigma Chemical Co.) による処理は, 0.5ml の各菌体浮遊液に, トリプシン0.5ユニット (pH 7.6の緩衝液中で, 25°C で反応させ1分間に α -N-ベンゾイル-L-アルギニン・エチルエステルのA₂₅₆を0.06さげる量を1ユニットとする。) を加え, 37°C で90分間反応させ, 菌体の洗浄後, 結合性を調べた。エチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩 (sodiummethylenediaminetetraacetate, 以下 EDTA と略す) による処理は, 最終濃度 30mM となるように EDTA (半井化学, 京都) を加え 20時間放置し, 後同様の方法で結合に対する影響を調べた。

実験結果

1. 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質の分離・精製

1) 顎舌下腺唾液の陰イオン交換クロマトグラフィによる分画

陰イオン交換クロマトグラフィである Mono Qカラムに吸着させた画分を 0-1.0M炭酸水素アンモニウム塩の連続的な直線型濃度勾配法により溶出させたときの分画パターンを Fig. 1 に示した。炭酸水素アンモニウム塩濃度約0.2Mで著明な溶出ピークが検出された。シアル酸および糖がこのピークに存在することを確認後, この画分を集め, 蒸留水にて12時間透析を行い, 凍結乾燥し, -20°C にて保存した。

2) ゲルろ過による分画

上記の Mono Qに吸着した画分の Shim-pack Diol-300によるゲルろ過分画パターンを Fig. 2 に示した。Void volume のやや後に, ヘキソースおよびシアル酸を多く含む画分が流出した。この画分を顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質とし, 蒸留水にて透析後, 凍結乾燥し-20°C にて保存した。この画分に

Fig. 1 FPLC profile of human submandibular-sublingual saliva on Mono Q ion exchange column. Elution was performed with a gradient of 0-1.0M NH_4HCO_3 in 20mM ammonium acetate buffer (pH 7.5). 1.0ml fractions were collected at flow rate of 1.0ml/min.

Fig. 2 Gel chromatography profile of Mono Q binding fraction on Shim-pack Diol-300 column; elution was carried out with 0.2M ammonium acetate buffer (pH 7.5). 1ml fractions were collected at a flow rate of 0.5ml/min. (—) absorbance at 280nm, (·····) hexose, (---) sialic acid.

シアル糖タンパク質である分泌型 IgA が含まれているかどうか, 確認のため Ouchterlony 法³⁴⁾による, 抗ヒト分泌型 IgA ヤギ血清 (CAPPEL LABORATORIES, INC., USA) との沈降反応を行ったが, 反応は認められなかった。

分離精製の各段階におけるタンパク質, ヘキソースおよびシアル酸の収量を Table 1 に示した。この結果, タンパク質 (Hartree の方法による測定) とヘキソース, ならびにシアル酸の比が, 29:4:3 (w/w) の糖タ

Table 1 Purification of human submandibular-sublingual saliva sialoglycoprotein

Step	Protein (mg)	Hexose (mg)	Sialic acid (mg)
Submandibular-sublingual saliva* (25ml)	13.40	1.90	0.50
Ion exchange chromatography on Mono Q	4.11	0.64	0.43
Gel filtration chromatography on Diol-300	1.46	0.20	0.15

* Human submandibular-sublingual saliva was centrifuged at 20,000×g for 20min and supernatant was filtrated with MEMBRANE FILTERS (pore size 0.2 μm, TOYO ROSHI CO., LTD.).

ンパク質が得られた。また、粗標品のシアル酸に対し、精製標品中のシアル酸として、約30%が回収された。

2. 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質の一般的性状

1) 分子量

ゲルろ過法による分子量測定の結果、顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質は、ほぼ Ferritin と同じ位置に溶出され、分子量は、約440,000と推定された。

2) メタノリシス

糖タンパク質中の中性糖、アミノ糖およびシアル酸をメチルグリコシド化し、ガスクロマトグラフィーにより分析した結果、フコース、ガラクトース、N'-アセチルグルコサミン、N'-アセチルガラクトサミン、N'-アセチルノイラミン酸が検出された (Fig. 3)。

Fig. 3 Gas chromatography profile of the sialic acid-rich glycoprotein sample Packing: 3% SE-30/Chromosorb W, Column: 0.3×200cm glass, Column temp. 140°C-200°C (0.5°C/min)

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

アクリルアミド濃度が7.5%および10.0%の支持体を用いた。Fig. 4は、10.0%のものであるが、Bromphenol blue (BPB) に対する相対移動度が、0.35に著明なバンドを認めた。これは、糖染色にも染まり、推定される分子量は、約110,000であった。

4) メルカプトエタノールの影響

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the sialic acid-rich glycoprotein sample: a) Coomassie brilliant blue, b) PAS

試料は、S-S 結合を切断するため、還元剤であるメルカプトエタノールを加え 80°C、5 分間加熱前処理したが、これらの処理を行わずに電気泳動した場合でも、著明な差は、ほとんど認められなかった。

3. 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質と口腔細菌との結合性

1) 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質の $[^{14}\text{C}]$ による標識

$[^{14}\text{C}]$ で標識した顎舌下腺唾液由来糖タンパク質の放射能は、533dpm/μl、タンパク質量 (Hartree の方法による測定) は、2.6μg/ml であった。

2) 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質と口腔細菌との結合性のスクリーニング

供試菌株に結合した顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質量を Table 2 に示した。

糖タンパク質と菌体間の結合の度合は大きく 3 つのグループに分けられた。

Table 2 Interaction of purified sialoglycoprotein with oral bacteria

Strain	Radioactivity dpm
<i>S. mutans</i>	
HS1	1068
E 49	576
FA1	630
BHT	635
Ingbritt	806
10449	665
OMZ 176	830
LM 7	613
P 4	426
SE 11	671
OMZ 175	480
K1R	497
OMZ 65	1552
6715	926
HS 6	498
CHT	1170
<i>S. mitis</i>	
ATCC 9811	1477
ATCC 9895	787
ATCC 15909	1201
ATCC 15910	596
ATCC 15911	370
ATCC 15912	473
ATCC 15913	1352
<i>S. sanguis</i>	
M 5	1639
ST 6	1558
ATCC 10557	1371
ST 3R	1450
<i>Lactobacillus</i>	
casei	936
plant	602
<i>Actinomyces</i>	
T14V	429
<i>B. gingivalis</i>	
381	3378
<i>B. melaninogenicus</i>	
ATCC 15930	906
ATCC 25845	822
<i>Capnocytophaga</i>	
AL 2-6-2	1111
<i>E. corrodens</i>	
1073	1005

Abbreviations : *Streptococcus* ; (S.),
Bacteroides ; (B.), *Eikenella* ; (E.)

A. 1000dpm 以上の高い結合性を示したもの
 B. 500以上1000dpm の中等度の結合性を示したもの

C. 500dpm 未満の低い結合性を示したもの
 個々の糖タンパク質との結合性を比較した結果、
Streptococcus Sanguis (以下 *Streptococcus* を *S.* と略す) および嫌気性菌群は高い結合性を示し、とりわけ
Bacteroides gingivalis 381株は、*S. sanguis* の約2倍の結合性を示した。*S. mutans* は、中等度の結合性を示す菌株が多かったが、HS1, OMZ 65, CHT の各菌株では高い結合性を示した。*S. mitis* は、菌株間の結合性に大きな差がみられ、ATCC 9811, 15909, 15913の各菌株では1200dpm を越える結合性を示したが、15911株では400dpm 以下の低い結合性を示した。

4. 顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質と口腔細菌との結合性に影響を及ぼす因子

1) 耐熱性

菌体を100°C, 10分間加熱し、4°C に冷却後、顎舌下腺唾液由来のシアル酸を多く含む糖タンパク質との結合性を調べた。Table 3, 4に示したように、AグループおよびBグループのほとんどすべての菌株とも、結合性は、加熱により著しく減少した。

2) トリプシンによる菌体処理

Table 3, 4に示すように、*S. mutans* では、HS1, OMZ 176, 6715, CHT 各菌株での結合性が減少したが、他の菌株では影響なかった。*S. mitis* では、ATCC 9811, 15909, 15913の各菌株で結合性が減少した。*S. sanguis* では、調べた菌株すべてにおいて減少がみられた。嫌気性菌では、*Eikenella corrodens* 1073株で軽度の結合性の減少がみられた。

3) EDTA および2価金属イオンの影響

EDTA および2価金属イオン (Ca^{2+}) の結合性に対する影響を Table 3, 4, 5に示した。各菌体浮遊液中に最終濃度30mM になるよう EDTA (半井化学) を加え4°C で20時間放置した。菌体を充分洗浄した後、結合性を調べた結果、*S. mutans* では、OMZ 176株、*S. mitis* では、ATCC 15910, 15913の各菌株、*S. sanguis* では、ST 6株、嫌気性菌では、*Capnocytophaga* AL 2-6-2株で結合性に減少がみられた。さらに菌体の EDTA 処理後、 Ca^{2+} を加えて結合性の変化をみると、*S. mutans* OMZ 176株、*Capnocytophaga* AL 2-6-2株では、結合性の回復がみられた。

Table 3 Effect of heating, trypsin, EDTA and Ca^{2+} treatment on binding in the case of high binding to bacteria (Group A)

Strain	No-treatment	Heating	Trypsin	EDTA	Ca^{2+}
	Relative value				
	%	%	%	%	%
<i>S. mutans</i>					
HS1	100	36	41	84	105
OMZ 65	100	25	90	130	
CHT	100	35	53	90	63
<i>S. mitis</i>					
ATCC 9811	100	35	53	76	81
ATCC 15909	100	37	50	84	71
ATCC 15913	100	51	35	67	67
<i>S. sanguis</i>					
M5	100	37	72	82	88
ST 6	100	39	51	67	64
ATCC 10557	100	37	66	76	72
ST 3R	100	48	71	89	61
<i>B. gingivalis</i>					
381	100	13	105	86	74
<i>Capnocytophaga</i>					
AL 2-6-2	100	39	79	67	91
<i>E. corrodens</i>					
1073	100	35	74	94	82

The values in the Table show the relative values when the value for untreated cells is 100.

Ca^{2+} was added to the EDTA treated sample at 1mM concentration and the mixture was incubated at 4°C for 2 hours.

Table 4 Effect of heating, trypsin, EDTA and Ca^{2+} treatment on binding in the case of moderate binding to bacteria (Group B)

Strain	No-treatment	Heating	Trypsin	EDTA	Ca^{2+}
	Relative value				
	%	%	%	%	%
<i>S. mutans</i>					
FA1	100	73	143	224	
10449	100	54	79	146	
OMZ 176	100	48	72	69	157
LM 7	100	65	115	176	
SE 11	100	64	89	153	
6715	100	51	37	87	58
<i>S. mitis</i>					
ATCC 15910	100	88	72	66	80
<i>B. melaninogenicus</i>					
ATCC 15930	100	43	117	112	111
ATCC 25845	100	47	199	98	95

Table 5 Effect of heating, trypsin, EDTA and Ca^{2+} treatment on binding in the case of low binding to bacteria (Group C)

Strain	No-treatment	Heating	Trypsin	EDTA	Ca^{2+}
	Relative value				
	%	%	%	%	%
<i>S. mutans</i>					
OMZ 175	100	101	94	146	
K1R	100	101	128	242	
HS 6	100	88	105	198	
<i>S. mitis</i>					
ATCC 15911	100	140	110	153	191
ATCC 15912	100	89	95	121	160

考 察

我々は、ハイドロキシアパタイトと親和性が強いといわれている、顎下腺唾液や舌下腺唾液中に含まれる粘性の高い酸性糖タンパク質（ムチン）が、口腔細菌とエナメル質の結合に重要な役割を果たしていると考え、この糖タンパク質を顎下腺唾液から分離精製することを試み、その生物学的活性を調べた。

氷冷下で集めた顎下腺唾液（血液型O）より、遠心操作、高速液体クロマトグラフィーを用いたゲルろ過、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、シアル酸を多く含む糖タンパク質画分を得た。この画分は、Shim-pack Diol-300を用いたゲルろ過法により、分子量、約440,000、また SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりサブユニット分子量、約110,000と推定された。福原²²⁾は、分子量約140,000の *Eikenella corrodens* 1073株を凝集するヒト顎下腺唾液因子を報告しており、また Morris³⁵⁾は、血清および歯肉溝浸出液中に存在する *S. sanguis* を凝集させる、分子量約100,000の酸性糖タンパク質を部分精製しているが、今回得たサブユニットの分子量はこれらと近い値を示している。したがって、ゲルろ過により得られた分子量、約440,000の画分は、4量体として存在していたものと考えられる。Prakobphol³⁶⁾は、分子量200,000-250,000の顎下腺唾液由来の低分子量のムチン型糖タンパク質を報告しているが、これは、この2量体でないかと思われる。SDS-ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動に際し、還元処理を行った場合と行わなかった場合を比較してみたが、ほとんど差を認めなかった。

菌体と糖タンパク質の結合性をみるために、菌体の懸濁液は、約10mg/ml 濃度のものを用いた。低濃度である

と [^{14}C] の取り込みに十分な差が認められないと考え、この条件を選んだわけであるが、遠心操作による集菌過程や糖タンパク質と反応させた後の洗浄の際に、数種の *S. salivarius* 株において自己凝集を起こすものもあり実験結果から除外した。

シアル酸を多く含む顎下腺唾液糖タンパク質と口腔細菌の結合性をみると、通性嫌気性菌群においては、*S. sanguis* の糖タンパク質に対する結合性が非常に高く、次いで *S. mitis*, *S. mutans* という順であった。Appelbaum³⁷⁾は獲得被膜で被われた歯面のかわりに唾液で被覆したハイドロキシアパタイトを用い、*in vitro* で口腔細菌の吸着能を調べ、*S. sanguis* の吸着能が非常に高く、次いで *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. faecalis*, *S. mutans* の順であることを報告しているが、この報告に似た結果を示した。嫌気性菌群においては、供試菌株のいずれも糖タンパク質との高い結合性を認めたが、とくに *Bacteroides gingivalis* 381株は、他の嫌気性菌の約3倍の結合性を示した。*Bacteroides gingivalis* や *Eikenella corrodens* などの嫌気性菌が、頬粘膜上皮細胞に強い付着能を有することは、Okuda³⁸⁾ や Yamazaki³⁹⁾により報告されている。

この糖タンパク質との結合性の程度をもとに、供試菌株を3つのグループに分けたが、加熱やトリプシンで菌体を処理した後、結合性に影響のみられたのは、最も結合性の高いグループ（Aグループ）で、他の2グループでは、菌体処理による影響が少なかった。これは、菌体と糖タンパク質間の主たる結合様式が、最も結合性の高いグループと他のグループで異なっているからではないかと思われる。この最も結合性の高いAグループの菌株についてみていくと（Table 3）、いずれの菌体も加熱処理により著しくその結合性の低下がみられた。またト

リブシン処理を行うと、通性嫌気性菌のうち *S. mutans* と *S. mitis* は約50%, *S. sanguis* は約60%まで結合性が低下している。嫌気性菌において加熱処理では、通性嫌気性菌と同じ程度まで結合性が低下したが、トリブシン処理では、通性嫌気性菌ほど結合性の低下は認めなかった。とくに *Bacteroides gingivalis* 381株は、加熱処理により結合性が12.6%まで低下したが、トリブシン処理による影響は、みられなかった。これは、菌体表層の構造の差、糖タンパク質と菌体との結合性の差が、通性嫌気性菌の *S. mutans*, *S. mitis* と嫌気性菌の間にあると思われる。EDTA の影響であるが柴田ら¹⁴⁾のヒト耳下腺唾液中に存在するプロリン量の多い塩基性糖タンパク質と *S. mitis* ATCC 9811株の結合性をみた実験では、25%まで結合性が低下しているが、本実験ではそれほど著明な影響のみられた菌株は認めず、2価陽イオンの添加による結合性の回復もみられなかった。

これら糖タンパク質と口腔細菌の結合について、Rölla ら⁶⁻¹⁰⁾はカルシウムイオンを介した静電的な機構により獲得被膜へ細菌が付着すること、および菌体表層に結合した多糖と獲得被膜との間の水素結合を介し、細菌が付着することを報告している。また口腔細菌の菌体表層に存在するタンパク質あるいは糖タンパク質と獲得被膜中の糖残基との間のレクチン様結合により口腔細菌が吸着することを示唆する報告も数多くなされており、Liljemark ら⁴⁰⁾や Wheeler ら⁴¹⁾はトリブシンで *S. sanguis*, *S. mutans*, *Actinomyces viscosus* の菌体をトリブシンで処理することにより唾液で被覆したハイドロキシアパタイトへの菌体吸着量が減少することを報告しており、Yamazaki ら³⁹⁾は、*Eikenella corrodens* の菌体を加熱(100°C, 10min)あるいは、トリブシン処理すると、頬粘膜上皮への付着能が失われることを報告している。また Gibbons ら¹¹⁾は、*S. mutans* 菌体をガラクトースやメリピオースで前処理すると唾液で被覆したハイドロキシアパタイトへの吸着量が減少することから、獲得被膜中の *S. mutans* 吸着部位は、唾液糖タンパク質に含まれている α -D-ガラクトシド残基ではないかと報告しており、Murray ら⁴²⁾は、糖鎖構造に NeuNAc および Gal を含むヒト唾液糖タンパク質に特異的なレクチンを *S. sanguis* より抽出している。これら唾液糖タンパク質が獲得被膜の構成成分として口腔細菌の歯面への吸着を促進しているという以外に、唾液糖タンパク質が歯の表面を保護し菌の付着を抑制するという Magnusson⁴³⁾や Simonson ら⁴⁴⁾の報告もある。

これまで、唾液中に存在する口腔細菌と結合する物質

として、血液型物質⁴⁵⁾、プロリン量の多い塩基性糖タンパク質¹⁴⁾、リゾチーム⁴⁶⁾、分泌型 IgA⁴⁷⁾などが見出されており、その構造や生物学的性質について報告されてきたが、今回顎舌下腺唾液中より分離したシアル酸を多く含む糖タンパク質は、構造における不均一性などの問題をかかえており、生物学的性質等と合わせ、さらに詳細な解明が必要であると考えている。

文 献

- 1) Sonju, T. and Rölla, G.: Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hour on cleaned human teeth *in vivo*, Caries Res., 7; 30-38, 1973.
- 2) Armstrong, W. G.: The composition of organic films formed on human teeth, Caries Res., 1; 89-103, 1968.
- 3) Leach, S. A., Critchley, P., Kolendo, A. B. and Saxton, C. A.: Salivary glycoproteins as components of the enamel integuments, Caries Res., 1; 104-111, 1968.
- 4) Leach, S. A.: Release and break down of sialic acid from human salivary mucin and its role in the formation of dental plaque, Nature, 199; 486-487, 1963.
- 5) Leach, S. A.: In Dental Plaque, W. D. Mchugh ed., E and S. Livingstone, Edinburgh, 143-156, 1970.
- 6) Rölla, G.: Inhibition of adsorption-general considerations, In H. M. Stiles, W. L. Loesche and T. C. O' Brien (ed.), Microbial Aspect of Dental Caries (a special supplement to Microbiology Abstracts), Information Retrieval Inc., Washington, D. C., vol. 11; p. 309-324, 1976.
- 7) Nordbo, H., and Rölla, G.: Desorption of salivary protein from hydroxyapatite by phytic acid and glycerophosphate and the plaque inhibiting effect the two components *in vivo*, J. Dent. Res., 51; 800-802, 1972.
- 8) Pruitt, K. M., Jamison, A. D. and Caldwell, R. C.: Possible basis for the cariostatic effect of inorganic phosphate, Nature (London), 335; 1349, 1970.
- 9) Rölla, G. and Melsen, B.: Desorption of protein and bacteria from hydroxyapatite by fluoride and monofluorophosphate, Caries, Res. 9; 66-73, 1975.
- 10) Bolton, R. W.: Adherence of oral streptococci to hydroxyapatite *in vivo* via glycerol-teichoic acid, Arch. Oral Biol., 25; 111-114, 1980.
- 11) Gibbons, R. J. and Qureshi, J. V.: Inhibition of adsorption of *Streptococcus mutans*

- strains to saliva-treated hydroxyapatite by galactose and certain amines, *Infect. Immun.*, **26** ; 1214-1217, 1970.
- 12) Kondo, W., Sato, M. and Sato, N.: Properties of the human salivary aggregating factor for *Leptotrichia buccalis* cells, *Arch. Oral Biol.*, **23** ; 453-458, 1978.
 - 13) Qureshi, J. V. and Gibbons, R. J.: Difference in the adsorptive behavior of strains of *A. viscosus* and *A. naeslundii* to saliva-treated hydroxyapatite, *J. Dent. Res.*, **58** ; Special Issue A, I. A. D. R. Abstr., 996, 1979.
 - 14) 柴田聡明: ヒト耳下腺唾液中に存在するプロリン量の多い塩基性糖タンパクの構造とその口腔連鎖球菌との結合性, *阪大歯学誌*, **24** ; 192-210, 1979.
 - 15) 永田 清: *Streptococcus sanguis* ATCC 10557 株の菌体表面に存在するレクチンの分離・精製とその性質, *阪大歯学誌*, **28** ; 129-147, 1983.
 - 16) Gibbons, R. J. and Spinell, D. M.: Saliva-induced aggregation of plaque bacteria, McHugh, W. D. ed., *Dental plaque*, E & S Livingstone, Edinburgh, 207-216, 1970.
 - 17) Hay, D. I., Gibbons, R. J. and Spinell, D. M.: Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque, *Caries Res.*, **5** ; 111-123, 1971.
 - 18) Ericson, T., Carlen, A. and Dagerskog, E.: Salivary aggregation factors, Stile, H. M., Loesche, M. J. and O'Brien, T. C. ed., *Microbial aspect of dental caries*, Information Retrieval Inc., Washington, 151-162, 1976.
 - 19) Levine, M. J., Harzberg, M. C., Levine, M. S., Ellison, S. A., Stinson, M. W., Li, H. C. and Van Dyke, T.: Specificity of salivary-bacterial interactions, Role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, **19** ; 107-115, 1978.
 - 20) Hogg, S. D. and Embery, G.: The isolation and partial characterization of a sulphated glycoprotein from human whole saliva which aggregates strains of *Streptococcus sanguis* but not *Streptococcus mutans*, *Arch. Oral Biol.*, **24** ; 791-797, 1979.
 - 21) Qureshi, J. V. and Gibbons, R. J.: Differences in the adsorptive behavior of human strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* of saliva-treated hydroxyapatite surfaces, *Infect. Immun.*, **31** ; 261-266, 1981.
 - 22) 福原弘善: *Eikenella corrodens* を凝集するヒト顎舌下腺唾液因子の精製とその性状, *日歯周誌*, **26** ; 49-70, 1983.
 - 23) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227** ; 680-685, 1970.
 - 24) Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels, *Analyt. Biochem.*, **30** ; 148-152, 1969.
 - 25) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analyt. Chem.*, **28** ; 350-356, 1956.
 - 26) Hartree, E. F.: Determination of protein, A modification of the Lowry method that gives linear photometric response, *Analyt. Biochem.*, **48** ; 422-427, 1972.
 - 27) Tuppy, H. Gottschalk, A.: "Glycoproteins", ed. by A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, Part A, p. 403, 1972.
 - 28) Svennerholm, L.: "Methods in Enzymology", ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, Vol. 6 ; p. 459, 1963.
 - 29) Clamp, J. R., Bhatti, T., Chambers R. E.: "Methods of Biochemical Analysis", ed. by D. Glick, Interscience, New York, Vol. 19 ; p. 229, 1971.
 - 30) Clamp, J. R., Bhatti, T., Chambers, R. E.: "Glycoproteins", ed. by A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, p. 300 ; 1972.
 - 31) Chambers, R. E., Clamp, J. R.: *Biochem. J.*, **125** ; 1009, 1971.
 - 32) Bhatti, T., Chambers, R. E., Clamp, J. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **222** ; 339, 1970.
 - 33) Jentoft N. and Dearborn D. G.: *J. Biol. Chem.*, **254** ; 4359-4365, 1979.
 - 34) Ouchterlony, O.: Recent progress in microbiology, **7** ; 163, 1959.
 - 35) Morris, E. J. and McBride, B. C.: Aggregation of *Streptococcus sanguis* by a Neuraminidase-sensitive component of serum and crevicular fluid, *Infect. Immun.*, **42** ; 1073-1080, 1983.
 - 36) Prakobpho, A., Levine, M., Tabak, L. A. and Reddy, M. S.: Purification of a low-molecular-weight, mucin-type glycoprotein from human submandibular-sublingual saliva, *Carbohydrate Research*, **108** ; 111-122, 1982.
 - 37) Appelbaum, B., Golub, E., Holt, S. C. and Rosan, B.: In vitro studies of dental plaque

- formation, Adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite, *Infect. Immun.*, **25** ; 717-728, 1979.
- 38) Okuda, K., Slots, J. and Genco, R. J. : *Barteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies, cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells, *Curr. Microbiol.*, **6** ; 7-12, 1981.
 - 39) Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okuda, H. : *Eikenella corrodens* adherence to human buccal epithelial cells, *Infect. Immun.*, **31** ; 21-27, 1981.
 - 40) Liljemarm, W. F. and Schauer, S. V. : Studies on the bacterial components which bind *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite, *Arch. Oral Biol.*, **20** ; 609-615, 1975.
 - 41) Wheeler, T. M., Clark, W. B. and Birdsell, D. S. : Adherence of *Actinomyces viscosus* T14V and T14AV to hydroxyapatite surfaces *in vitro* and human teeth *in vivo*, *Infect. Immun.*, **25** ; 1066-1074, 1979.
 - 42) Murray, P. A., Levine, M. J., Tabak, L. A. and Reddy, M. S. : Specificity of salivary-bacterial interactions: Evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a NeuAc 2.3Gal 1.3GalNac sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106** ; 390-396.
 - 43) Magnusson, I., Ericson, T. and Prutt, K. : Effect of salivary agglutinins on bacterial colonization of tooth surfaces. *Caries Res.*, **10** ; 113-122, 1976.
 - 44) Simonson, L. G. and Reiher, D. A. : Effect of human saliva and various compounds on the adsorption of the bacterium *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite, *Arch. Oral Biol.*, **26** ; 143-146, 1981.
 - 45) Gibbons, R. J. and Qurshi, J. V. : Selective binding of blood group-reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms, *Infect. Immun.*, **22** ; 665-671, 1978.
 - 46) Pollock, J. J., Iacono, V. J., Bicker, H. G., Mackay, B. J., Katona, L. I. and Taichman, L. B. : The binding aggregation and lytic properties of lysozyme, p. 325-352, In H. M. Stiles, W. E. Loesche and T. C. O' Brien (ed.), *Microbial Aspects of Dental Caries* (a special supplement to *Microbiology Abstracts*), vol. 11, Information Retrieval Inc., Washington, D. C., 1976.
 - 47) Liljemarm, W. F., Bloomquist, C. G. and Ofstehage, J. C. : Aggregation and adherence of *Streptococcus sanguis*, Role of human salivary immunoglobulin A, *Infect. Immun.*, **26** ; 1104-1110, 1979.

Abstract: Binding of oral bacteria with the sialic acid-rich glycoprotein purified from human submandibular-sublingual saliva. Masaru TAKAGAKI, Tetsuo TAKESHITA, Satoaki SHIBATA and Akira TSUNEMITSU. Glycoproteins in saliva play an important role in dental plaque formation. This study deals with the binding of oral bacteria with the sialic acid-rich glycoprotein purified from human submandibular-sublingual saliva. Sialoglycoprotein was isolated and purified from human submandibular-sublingual saliva by fast protein liquid chromatography followed by high performance liquid chromatography (HPLC). The molecular weight of the purified sample, consisting of four subunits, was estimated to be 440K daltons by both the HPLC and SDS-disk electrophoresis. Both *Streptococcus sanguis* and *Bacteroides gingivalis* had high binding affinity to sialoglycoprotein. When the cell surfaces of both bacteria were treated with trypsin at 37°C for 90 minutes, the decrease of radioactivity was less in *Streptococcus sanguis* than *Bacteroides gingivalis*. No radioactivity was detectable in the 2 pieces of bacteria after heating at 100°C for 10 minutes, indicating the lost of binding ability.

Key words: Human submandibular-sublingual saliva, Oral bacteria, Sialoglycoprotein, Binding activity