

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16946

研究課題名（和文）天然由来レクチンを用いた唾液アミラーゼ糖結合性の探索と解明

研究課題名（英文）Exploration and elucidation of salivary amylase carbohydrate-binding properties using natural lectins

研究代表者

伊東 有希（信田有希）（Shinoda-Ito, Yuki）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80771162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：レクチンは糖結合性タンパクの総称で、様々な生理活性作用をもつ。その中でもGal 1-3GalNAc認識レクチンは口腔バイオフィーム形成を阻害することが明らかとなっている。本研究では、唾液アミラーゼを介したバイオフィーム形成における、天然由来レクチンの影響を検討し、Agaricus bisporus lectin (ABA)とConcanavalinAに唾液アミラーゼとの結合があることがわかった。また、唾液アミラーゼ存在下ではStreptococcus mutansのバイオフィーム形成量は増える傾向にあったが、ABAの有無で唾液アミラーゼ存在下でのバイオフィーム形成量に差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔清掃の不十分な要介護高齢者など、衛生状態が悪化した口腔内にはバイオフィームが蓄積し、全身疾患のリスクが増大する。そこで、医療従事者による口腔衛生管理が必要だが、人的・時間的問題からその徹底は困難なため、その負担軽減のための対策が急務である。海藻レクチンやマッシュルームレクチンなどの天然由来レクチンは口腔バイオフィーム形成を抑制する傾向があり、この社会的問題を解決する糸口になる可能性がある。唾液アミラーゼは消化酵素の一つだが、その一方で細菌に結合することで齲蝕発生の増悪因子となることが知られている。唾液アミラーゼというバイオフィーム発生の足場を制御することで、より効率的な齲蝕抑制を目指す。

研究成果の概要（英文）：Lectin is a sugar-binding proteins and have various bioactive activities. Among them, Gal 1-3GalNAc-recognizing lectins have been shown to inhibit oral biofilm formation. In this study, we investigated the effects of naturally-derived lectins on salivary amylase-related biofilm formation, and Agaricus bisporus lectin (ABA) and concanavalinA were suggested to bind to salivary amylase. Biofilm formation of cariogenic Streptococcus mutans tended to increase in the presence of salivary amylase compared to the absence of ABA (No significant difference), however there was no difference in biofilm formation in the presence of ABA and salivary amylase compared to the absence of ABA and the presence of salivary amylase.

研究分野：歯科保存学

キーワード：lectin carbohydrate-binding oral biofilm

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、自身による口腔清掃の不十分な要介護高齢者が増加している。口腔衛生状態が悪くなると、口腔内にはバイオフィームが蓄積し、全身疾患のリスクが増大する。そこで、医療従事者による口腔ケアが必要だが、人的・時間的問題からその徹底は困難なため、その負担軽減のための口腔バイオフィーム感染症対策が急務である。

上記背景から、これまで我々の研究室では口腔細菌の歯面への初期付着に着目し、天然由来レクチンの口腔バイオフィーム形成に関する網羅的解析の結果から、海藻レクチンやマッシュルームレクチンなどの Gal β 1-3GalNAc (Core 1 構造, Gal: ガラクトース, GalNAc: N アセチルガラクトサミン) 認識レクチンが、唾液成分中に含まれる O 型糖鎖の一つである Gal β 1-3GalNAc に結合することで口腔バイオフィームの形成を阻害する傾向を得てきた。

しかしながら、これらのレクチンが唾液成分中のいずれの成分に結合し、バイオフィーム形成を抑制しているのか、具体的な結合様式や機序はまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、天然レクチンの唾液中の結合成分をより詳細に解明することを大きな目的とし、その端緒として唾液アミラーゼに着目した。唾液アミラーゼは唾液中に含まれる成分の一つで、糖質を加水分解する消化酵素であるが、その一方で細菌に結合することで齲蝕発生の増悪因子となることが知られている。唾液アミラーゼ間の結合を検討するとともに、齲蝕発生においてレクチンがアミラーゼに与える影響を検討した。

3. 研究の方法

唾液由来アミラーゼは市販のものを使用し、PBS 中で最終濃度が 2.5 μ g/mL となるように調整し使用した。*Streptococcus mutans* は 0.5% Yeast 添加の tryptic soy broth (TSBY) 中で対数増殖期になるまで培養し用いた。

1) 唾液アミラーゼと天然由来レクチン間結合の有無の確認

唾液由来アミラーゼを固相化したマイクロプレート上に、Phosphate buffered saline (PBS) 中に溶解させ濃度勾配を付与したビオチン化天然由来レクチンを分注し、ELISA 法を用いて唾液由来アミラーゼとレクチン間の結合の有無を検討した。

2) 唾液アミラーゼ存在下での口腔バイオフィームへの影響の検討

唾液由来アミラーゼを固相化したマイクロプレート上に 1% sucrose 含有 yeast 添加 Tryptic soy broth (TSBYs) 中で 1×10^7 CFU/mL になるよう調整した *Streptococcus mutans* を添加し、18 時間培養後、クリスタルバイオレット溶液を用いてバイオフィームを染色し、99.5% エタノール中に溶出した同染色剤の吸光度を測定した。

3) 唾液アミラーゼとレクチン結合下での口腔バイオフィームへの影響の検討

上記 1) で結合を確認したレクチンのうち *Agaricus bisporus* lectin (ABA) を PBS 溶液中に濃度勾配を付与して溶解させた。唾液アミラーゼを固相化したマイクロプレート上に、調整した ABA 溶液を分注し、唾液アミラーゼと ABA を結合させた。その後、ウェルを PBS で洗浄後に TSBYs 中で 1×10^7 CFU/mL になるよう調整した *Streptococcus mutans* を添加し、18 時間培養後、クリスタルバイオレット溶液を用いてバイオフィームを染色し、99.5% エタノール中に溶出した同染色剤の吸光度を測定した。

4. 研究成果

1) 唾液アミラーゼと天然由来レクチン間の結合

ELISA 法を用いた唾液アミラーゼと天然由来レクチン間の結合の有無を検討したところ、1.0 μ g/mL 以上の ABA、および 0.1 μ g/mL 以上の ConcanavalinA (ConA) が有意に唾液アミラーゼと結合することがわかった。

2) 唾液アミラーゼ存在下での口腔バイオフィルムへの影響

クリスタルバイオレット染色法を用いた唾液アミラーゼ存在下でのバイオフィルム量の定量では、アミラーゼ非存在下と比較してアミラーゼ存在下の方がバイオフィルム量が多い傾向にあった(有意差はなかった)。

3) 唾液アミラーゼとレクチン結合下での口腔バイオフィルムへの影響

ABA 添加群と非添加群のバイオフィルム形成量に差はなかった。一方で、唾液アミラーゼ存在下と唾液アミラーゼ非存在下を比較すると ABA 添加の有無に関わらず、唾液アミラーゼ非存在下ではバイオフィルムが脆弱で、洗浄時剥離されやすく、アミラーゼがバイオフィルム形成における足場として重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------