

## 研究者：瀬戸口大介

(所属：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科発生発達成育学講座予防歯科学分野)

## 研究題目：Candida albicans の DMBT1 への結合機序の解明に基づく高齢者 QOL 向上法の開発

### 目的：

近年、高齢者における口腔カンジダ菌による義歯性口内炎や誤嚥性肺炎が注目されており、これらの予防法を開発することは高齢者の QOL の向上につながる。

口腔カンジダ菌による疾病を予防するためには、同菌の口腔内への定着を阻害することが有効である。歯面及び口腔粘膜は様々な唾液タンパク質からなる被膜で覆われている。この唾液由来被膜を構成する成分の一つである DMBT1 は、唾液凝集素や gp-340 としても知られる高分子糖タンパク質であり、唾液腺のみならず身体の様々な部位で発現し、各種病原体と相互作用をすることが知られている<sup>1)</sup>。

齶蝕細菌である *Streptococcus mutants* との相互作用として、液相における DMBT1 による菌体凝集および歯面等の固相に吸着された DMBT1 への菌体付着が知られている。これまで口腔カンジダ菌の 1 つである *Candida albicans* と唾液タンパク質の相互作用については、高プロリン含有タンパク質<sup>2)</sup>とスタセリン<sup>3)</sup>との反応は知られているが、DMBT1 との反応に関して未だ報告はない。そこで本研究では、*C. albicans* と DMBT1 の相互作用およびその反応機序を調べた。

### 材料および方法：

用いた菌株は *C. albicans* NBRC 1385 (NITE、木更津市) であり、サブロー培地で 37℃ にて 18 時間好氣的に培養した後、菌体を回収し PBS (pH 7.0) に懸濁した。DMBT1 は Oho らの方法<sup>4)</sup>に準拠して、ヒト安静時唾液から精製した。*C. albicans* の DMBT1 への結合とその反応機序を解明するため、以下の手順で研究を行った。

1. ビオチン化した *C. albicans* の DMBT1 への結合を、ELISA 法を用いて調べた。
2. DMBT1 ペプチドドメインである各 SRCRP (SRCRP1-7) および SID22 への結合を ELISA 法で調べた。
3. DMBT1 への結合に及ぼす 2 価陽イオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) の影響を調べた。
4. DMBT1 の構成糖および *C. albicans* 表層に存在する糖を用いて結合抑制実験を行い、結合に関与する糖を検索した。

### 結果および考察：

#### 1. *C. albicans* の DMBT1 への結合

*C. albicans* NBRC 1385 は DMBT1 へ結合することが認められ、その反応は菌数依存性であった (図 1)。

また、反応系中に添加した DMBT1 の濃度に依存して、菌体の DMBT1 への結合は抑制された (図 2)。

このことから、*C. albicans* は DMBT1 に特異的に結合することが確認された。

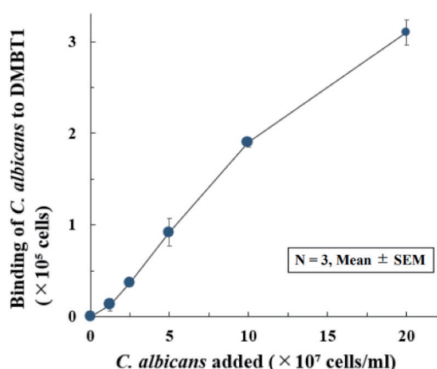


図1 *C. albicans* の DMBT1 への結合

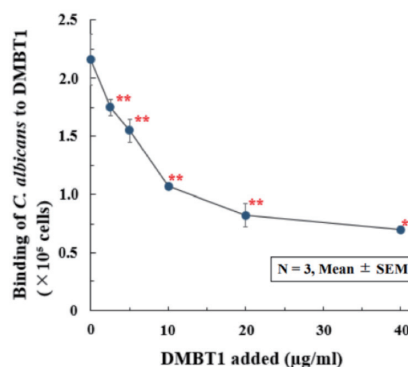


図2 *C. albicans* の DMBT1 への結合に及ぼす反応系中 DMBT1 の作用

## 2. *C. albicans* の DMBT1 ペプチドドメインへの結合

*C. albicans* は DMBT1 のペプチドドメインの中で SRCRP2 へ強く結合することが認められた (表1)。

さらに、SRCRP2 への結合菌数は添加した *C. albicans* の菌数に依存して、増加した (図3)。

表1 *C. albicans* の DMBT1 ペプチドドメインへの結合

Peptide	Binding of <i>C. albicans</i> to peptide ( $\times 10^5$ cells)
SRCRP1	2.22 $\pm$ 0.27
<b>SRCRP2</b>	<b>12.69 <math>\pm</math> 0.26</b>
SRCRP3	2.76 $\pm$ 0.23
SRCRP4	2.03 $\pm$ 0.00
SRCRP5	2.66 $\pm$ 0.16
SRCRP6	2.13 $\pm$ 0.05
SRCRP7	2.49 $\pm$ 0.27
SID22	1.86 $\pm$ 0.22

N = 3, Mean  $\pm$  SEM

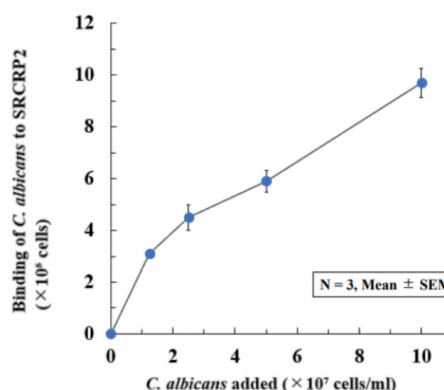


図3 *C. albicans* の SRCRP2 への結合

## 3. *C. albicans* の DMBT1 への結合に及ぼす 2 価陽イオンの影響

2 価陽イオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ )、EDTA を 1mM の濃度で反応系に加えた群、無添加の計 5 群を比較した。 $\text{Ca}^{2+}$  を添加した場合、対照 (無添加) と比較して菌体の DMBT1 への結合が有意に上昇した (表2)。

表2 *C. albicans* の DMBT1 への結合に及ぼす 2 価陽イオンの影響

Cation	Binding of <i>C. albicans</i> to DMBT1 ( $\times 10^5$ cells)
$\text{Ca}^{2+}$	1.52 $\pm$ 0.08*
$\text{Mg}^{2+}$	1.05 $\pm$ 0.03
$\text{Mn}^{2+}$	1.16 $\pm$ 0.02
EDTA	1.04 $\pm$ 0.04
PBS (additive-free)	1.03 $\pm$ 0.04

N = 3, Mean  $\pm$  SEM, \* $P < 0.05$

#### 4. *C. albicans* の DMBT1 への結合に及ぼす糖の影響

反応系に 0.1 M のフコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルノイラミン酸を加えた群、無添加の計 7 群で比較した。

反応系にマンノース、N-アセチルグルコサミンを添加した群は対照（無添加）と比較して、菌体の DMBT1 への

結合が有意に低下した（表 3）。特にマンノースを添加すると、DMBT1 への結合は強く抑制された。また、この結合抑制は、Ca<sup>2+</sup> の存在下で強く認められた。

Sugar	Binding of <i>C. albicans</i> to DMBT1 ( $\times 10^5$ cells)
Fucose	1.57 $\pm$ 0.08
Galactose	1.41 $\pm$ 0.04
<b>Mannose</b>	<b>0.81 <math>\pm</math> 0.03**</b>
N-Acetylgalactosamine	1.36 $\pm$ 0.04
N-Acetylglucosamine	1.28 $\pm$ 0.04*
N-Acetylneuraminic acid	2.35 $\pm$ 0.05
PBS (Additive-free)	1.58 $\pm$ 0.05

N=3, Mean  $\pm$  SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01

#### 5. *C. albicans* の DMBT1、SRCRP2 への結合に及ぼすマンノースの影響

反応系に添加したマンノースの濃度に依存して、菌体の DMBT1 への結合が有意に低下した（図 4）。同様に、菌体の SRCRP2 への結合も有意に低下した（図 5）。これらの結果から、この反応は *C. albicans* の菌体表層に存在するマンノースを介して生じることが示唆された。

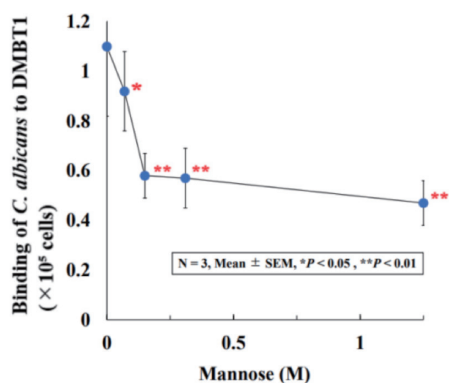


図 4 *C. albicans* の DMBT1 への結合に及ぼすマンノースの影響

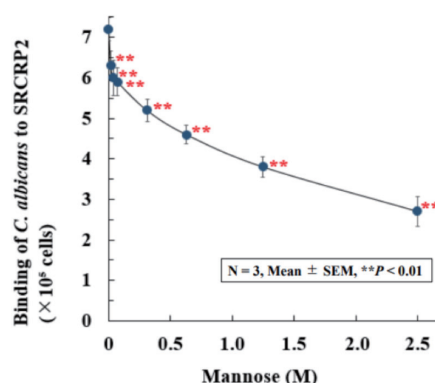


図 5 *C. albicans* の SRCRP2 への結合に及ぼすマンノースの影響

本研究より、*C. albicans* は DMBT1 と結合し、その反応には Ca<sup>2+</sup> が関与することが示唆された。また、反応系中に添加した DMBT1 の濃度に依存して、菌体の DMBT1 への結合が抑制されたことから、*C. albicans* は DMBT1 と特異的に反応することが示された。さらに、DMBT1 ペプチドドメインの中でも SRCRP2 と強く結合し、その反応はマンノースの濃度に依存して抑制された。これらの結果から、*C. albicans* は菌体表層に存在するマンノース含有タンパク質を介して DMBT1 へ結合し、その結合領域は SRCRP2 であることが示唆された。

これまでの研究で *S. mutans* は DMBT1 と Ca<sup>2+</sup> 依存性の結合をし、DMBT1 を構成するペプチドの結合領域は SRCRP2 であることが報告されている<sup>5)</sup>。その機序として Ca<sup>2+</sup> の存在により DMBT1 の立体構造が変化して SRCRP2 領域が露出すると推測されているが、*C. albicans* の DMBT1 への結合も同様の機序が考えられる。現在、*C. albicans* 菌体表層から DMBT1 の結合

に関するマンノース含有タンパク質の分離・精製を行っている。

#### 引用文献：

- 1) Reichhardt MP, Holmskov U, Meri S. SALSA-A dance on a slippery floor with changing partners. *Mol Immunol* 2017;89:100-110.
- 2) O'Sullivan JM, Cannon RD, Sullivan PA, Jenkinson HF. Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. *Microbiol* 1997;143:341-348.
- 3) Johansson I, Bratt P, Hay DI, Schluckebier S, Strömberg N. Adhesion of *Candida albicans*, but not *Candida krusei*, to salivary statherin and mimicking host molecules. *Oral Microbiol Immunol* 2000;5:112-118.
- 4) Oho T, Yu H, Yamashita Y, Koga T. Binding of salivary glycoprotein - secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1998;66:115-121.
- 5) Oho T, Bikker FJ, Nieuw Amerongen AV, Groenink J. A peptide domain on bovine milk lactoferrin inhibits the interaction between streptococcal surface protein antigen and a salivary agglutinin peptide domain. *Infect Immun* 2004;72:6181-6184.

#### 成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

1. 瀬戸口大介、長田恵美、於保孝彦、*Candida albicans* の DMBT1 への結合に関する研究、第 69 回日本口腔衛生学会・総会、誌上開催、2020 年 4 月 24 日～4 月 26 日
2. 瀬戸口大介、於保孝彦、*Candida albicans* の DMBT1 への結合機序の解明、第 62 回歯科基礎医学会学術大会、WEB 開催、2020 年 9 月 11 日～10 月 9 日
3. 瀬戸口大介、於保孝彦、*Candida albicans* の DMBT1 への結合因子の検索、第 70 回日本口腔衛生学会・総会、WEB 開催、2021 年 5 月 27 日～6 月 10 日 発表予定