

唾液中Histatin 5のキニーネ受容に対する効果

和田 裕 一¹ 山 森 徹 雄^{1,2}

The Effect of Salivary Histatin 5 on the Reception of Quinine

Hirokazu WADA¹ and Tetsuo YAMAMORI^{1,2}

Bitter substances are important for the palatability of foods and beverages commonly consumed by humans, and for animals in general, they act as signals for the presence of poisonous compounds in foods. As histatin 3, 5 and 6 in saliva bind to quinine, a bitter substance, we herein examined whether these peptides act as carrier proteins to transport bitter substances to receptors, or they mask the action of bitter compounds.

Fifty subjects were divided into a high-threshold group and a normal-threshold group according to Pfaffmann's averaged threshold values for quinine sulfate. The concentrations of histatin 5 in stimulated parotid saliva were quantified by ELISA. To examine the effects of histatin 5 on bitter taste sensitivity, a bitter taste sensitivity test was performed after oral prerinse with histatin 5 solution. Binding of bitter taste substances and histatin 5 were confirmed by binding assay ; solutions of bitter substances were mixed with histatin 5 and filtered through centrifugal filters with molecular weight cutoff of 1000.

1. ELISA revealed that subjects with high quinine threshold had significantly lower histatin 5 concentrations in saliva compared to those in the normal-threshold group ($p < 0.01$, two tailed).
2. Oral prerinse with histatin 5 solution significantly decreased the bitterness threshold ($p < 0.01$, two tailed).
3. Histatin 5 bound to quinine sulfate in a concentration-dependent manner.

These results indicate that human salivary histatin 5 functions as a carrier of quinine sulfate.

Key words : salivary histatin 5, carrier protein, bitter taste

緒 言

苦味受容体が最初に出現したのはカンブリア紀の腔腸動物と推測され、イソギンチャクがキニー

ネに対して拒絶反応を示すことから、苦味の拒絶は系統発生的に自然な反応¹⁾といわれている。

近年、ヒトゲノム解析の進歩に伴い苦味受容体の候補遺伝子ファミリー・T2Rsが同定された^{2,3)}。

受付：平成23年6月30日，受理：平成23年7月20日
奥羽大学大学院歯学研究科口腔機能学領域口腔機能回復学専攻¹
奥羽大学歯学部歯科補綴学講座²
(指導：清野和夫教授)

Department of Oral Rehabilitation, Ohu University
Graduate School of Dentistry¹
Department of Prosthetic Dentistry, Ohu University
School of Dentistry²
(Director : Prof. Kazuo SEINO)

しかし、これは一部の苦味物質に対してのみであり、キニーネなどの苦味物質に対してはいまだに明らかにされていない。また、苦味の受容機構についても統一した見解が得られていないのが現状である。

苦味物質の構造は多種多様であり、食品の嗜好性において重要な物質である反面、人体にとっては毒物のシグナル⁴⁾でもある。そのため、回避的に体内に取り込まれた苦味物質を排除する機能が存在すると考えられてきた。すなわち唾液中タンパク質が苦味物質と結合あるいは包含することでマスキング作用をするという説⁵⁾と、唾液中タンパク質が苦味物質と結合して味受容器へ運ぶキャリアーとして作用するという説^{6,7)}である。

苦味物質は疎水性であるという共通の性質を有し、アルカロイドのような塩基性でかつ疎水性の大きい物質ほど低濃度で強い苦味を呈する。疎水性を有する苦味物質が唾液中に分散し受容されるためには受容器まで運搬する要素が必要であり、その一つに唾液中に存在するタンパク質が挙げられている。

苦味物質の一つであるキニーネとアガロースゲル電気泳動にて挙動を共にする唾液中タンパク質として、馬場⁸⁾は Histatin 3, 5, 6 と Proline rich peptide PE (PRP-PE) を検出した。このうち Histatin 5 は精神的ストレス負荷後にその濃度が減少する⁹⁾ことが示されたが、唾液中 Histatin 5 のキニーネに対する機能の解明には至っていない。苦味受容機構を解明するためには苦味物質と唾液中タンパク質との相互関係を追究する必要がある。

そこで本研究では、唾液中 Histatin 5 がキニーネ感受性に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 唾液中 Histatin 5 濃度の測定

1) 被験者

被験者は本学歯学部学生と教職員の中から全身状態が良好で、齲蝕、歯周疾患がなく、健常歯列を有し、かつ喫煙歴のない成人男性50名（平均年齢21.3±1.6歳）を選択した。

被験者間の口腔内環境と pH を一定にするため、

被験者には味覚感受性試験と唾液試料採取の2時間前から飲食や激しい運動を禁止させた。

2) 味覚感受性試験

試験液として硫酸キニーネ（和光純薬工業、東京）を溶質、超純水を溶媒とした硫酸キニーネ水溶液を作製した。試験液の濃度は1.0 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M の10段階に設定し、倍数希釈列とした。なお、閾値による分類には8 μ M 溶液を基準とした。

味覚感受性試験には全口腔法¹⁰⁾を採用し、自然な飲食物摂取に近い状態で個人における全体的な味の判断を数値化した。また苦味の知覚は長時間残存しやすいので、低濃度溶液から検査を開始し、苦味として認識した濃度を閾値とする濃度上昇法にて測定した。

Pfaffmann の味覚閾値の平均値¹¹⁾を基準として、被験者を味覚感受性の高閾値群と正常閾値群とに分類した（図1）。

3) Histatin 5濃度の測定法

被験者から久保木式採唾器（YK-I 型、三東医科工業、東京）を用いて耳下腺唾液を酸味（レモンドロップ、味覚糖本舗、大阪）刺激下にて採取した。採取した唾液は直ちにフィルターにて不純物を除去し、エッペンドルフチューブに分注後、-60℃にて凍結保存した。

唾液中 Histatin 5濃度の測定には ELISA 法を用いた。荒木田⁹⁾が作成したプロトコル（図2）に準じて以下の手順で測定した。まず、96穴マイクロプレートのウェルに、コーティングバッファー（0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH9.5）で2倍に希釈した原唾液を100 μ l 注入し、1～2時間静置した。その後、5%スキムミルク（雪印乳業、札幌）を用いてブロッキング（4℃, 12時間）を行った。1次抗体として anti-Histatin 5 を5%スキムミルクで250倍に希釈して添加し、1時間反応させた後、Dulbecco's PBS(-)（日本製薬、東京）にて洗浄した。2次抗体として PBS-Tween（Tween 20, 0.1%）で30倍に希釈したビオチン標識抗マウス IgG 抗体（ZYMED Lab., San Francisco）と30分間反応させ、再び PBS にて洗浄した。次に PBS-Tween にて3,000倍に希

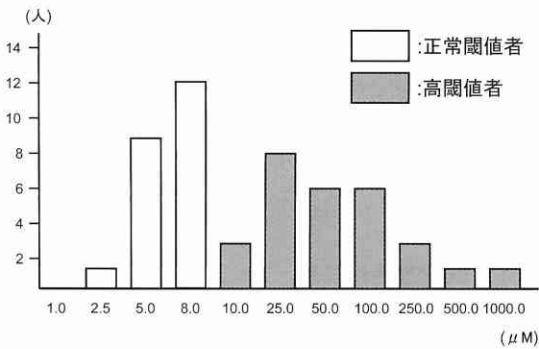


図1 被験者の分布

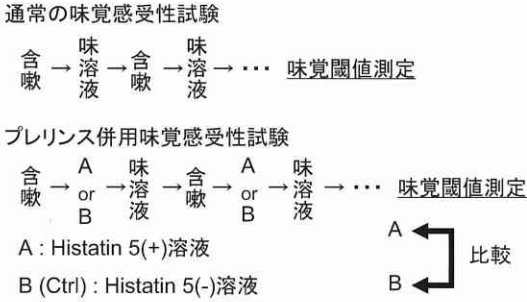


図3 通常の味覚感受性試験とプレリンスを併用した味覚感受性試験の手順

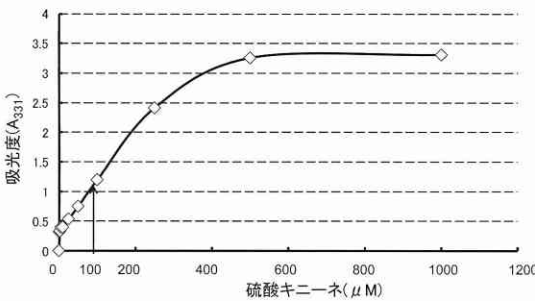


図4 キニーネ濃度と吸光度との関係



図2 唾液中Histatin 5濃度の測定

積した HRP 標識ストレプトアビジン溶液 (ZYMED Lab., SanFrancisco) を加えて30分間反応させ、PBS にて洗浄後 TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethyl Benzidine, ZYMED Lab., SanFrancisco) 溶液を加えて10～15分間放置した。1N 塩酸にて反応を停止させマイクロプレートリーダー (Model 550, BIORAD, 東京) により吸光度 (450nm) を測定して唾液中 Histatin 5濃度を求めた。

以上の方法により、味覚感受性試験で分類した被験者の群間における唾液中 Histatin 5濃度の差を比較した。

2. Histatin 5 ペプチドによるプレリンスを併用した味覚感受性試験

1) 被験者

プレリンス前後における苦味感受性の変化を比較するため本学教職員の中から全身、口腔が健常

でかつ喫煙歴のない成人男性17名 (平均年齢23.9 ±3.3歳) を被験者として選択した。

2) プレリンス溶液

プレリンス溶液は Histatin 5合成ペプチド含有とした。コントロールにはペプチドを含まない溶液を用いた。ペプチドには Histatin 5合成ペプチド (H-3144, Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf)を用い、超純水を溶媒として100 μg/ml の濃度に調整した。

3) プレリンスを併用した味覚感受性試験

通常の味覚感受性試験では、味溶液毎に水で含漱し、できるだけ口腔内に残存した味溶液を洗い流す必要がある。本研究では、一時的に口腔内の Histatin 5の量を増加させて苦味感受性を測定するため、水による含漱と味溶液による味質の評価との間にプレリンスという手順を加えた (図3)。一回の実験ではペプチド含有プレリンス溶液とコントロール溶液のいずれか一方を用い、被験者にはどちらを用いるかを伏せ、無作為に異なる日の同時時間帯において3回の試験を施行した。

3. Histatin 5 合成ペプチドとキニーネの結合の測定

1) 試 薬

ペプチド溶液は Histatin 5 合成ペプチド (H-3144, Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf) を 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度に調整した。なお苦味物質は硫酸キニーネ (和光純薬工業, 東京) を 100 μM の濃度に調整した。硫酸キニーネ水溶液が閾値の平均値である 8 μM ではバックグラウンドの影響が強く、正確な測定が不可能であるため、測定には検量線上の濃度 (図 4, 矢印) を選択した。

2) 遠心濾過

混合溶液の濾過には分画分子量が 1000 の遠心式限外濾過フィルター・Microsep™ Centrifugal Devices 1K (Pall Corp., Ann Arbor) を用いた。遠心分離は高速冷却遠心機 (himac CR22G, 日立ハイテクノロジーズ, 東京) を用い、4 $^{\circ}\text{C}$, 7500g, 100 分の条件とした。

3) 硫酸キニーネの濃度測定

濾液中の硫酸キニーネの濃度測定には紫外可視分光光度計 (V-570, 日本分光株式会社, 東京) を用いた。まず、硫酸キニーネ水溶液の吸収スペクトルを測定し、固定波長を求め、検量線を作成した。この検量線をもとに濾液中の硫酸キニーネ濃度を測定した。

4) Histatin 5 と硫酸キニーネ間の結合の評価法

まず、硫酸キニーネ水溶液単体の濾液の吸光度 (a) を測定した。次に、硫酸キニーネ-Histatin 5 ペプチドの混合溶液における濾液の吸光度 (b) を測定した。この (a) と (b) の比率をキニーネのフィルター通過率として求め、100% から差し引いた値を両者間の結合程度とした。

4. 統計解析

硫酸キニーネに対する正常閾値群と高閾値群の 2 群間における唾液中 Histatin 5 濃度の差の検定には Unpaired t-test を、プレリンス前後におけるキニーネ感受性の差の比較には Paired t-test を用いた。また、Histatin 5 合成ペプチドとキニーネの結合の評価における差の検定では、測定結果に対して、Kruskal Wallis H-test を用いた。そ

の後、有意差が認められた条件に対して Bonferroni 補正 Mann-Whitney U-test による多重比較を用いた。

なお、本研究は奥羽大学倫理審査委員会による承認を受け実施した (承認番号 54)。

結 果

1. 味覚感受性試験

苦味の感受性別に被験者を分類するために Pfaffmann の平均値 (8 μM) を指標とし、閾値が平均値より高い者を高閾値群、一方平均値以下の者を正常閾値群とした。その結果、正常閾値群 22 名、高閾値群 28 名に分類された。

正常閾値群における閾値の平均値は $6.67 \pm 1.73 \mu\text{M}$ で、高閾値群では $120.71 \pm 202.74 \mu\text{M}$ であった。また閾値測定における最大値は 1000 μM 、最小値は 2.5 μM であった (図 1)。

2. キニーネ感受性と唾液中 Histatin 5 濃度

全被験者から採取した耳下腺唾液中の Histatin 5 濃度を ELISA 法にて測定した。その結果、正常閾値群の平均値は $7.2 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ ($n=22$)、高閾値群の平均値は $3.8 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ ($n=28$) であった。両群間の平均値の差を検定した結果、正常閾値群に比較して高閾値群は有意に低い ($p < 0.01$) ことが示された (図 5)。

この結果は苦味閾値が高い被験者は唾液中に分布する Histatin 5 量が少ないことを示しており、唾液中に含まれる Histatin 5 の量がキニーネ感受性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

3. キニーネ感受性に対する Histatin 5 ペプチドプレリンスの効果

ウェーバー・フェヒナーの法則に則り、キニーネ溶液の濃度を対数に変換しキニーネ感受性の比較を行った。その結果、コントロールの平均閾値は 40.8 μM ($n=17$) であったのに対し、プレリンス後は 16.9 μM ($n=17$) であった。両群間の平均値の差を検定した結果、コントロールに比較してプレリンス後の閾値は有意に低い ($p < 0.01$) ことが示された (図 6)。

この結果から、Histatin 5 合成ペプチドがキニーネと結合することでキニーネ感受性が上昇することが考えられた。

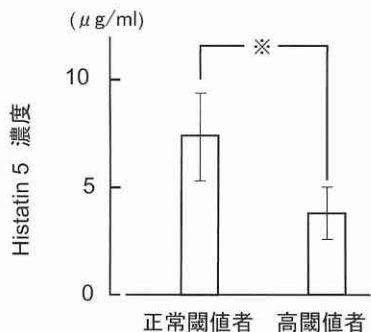


図5 キニーネ感受性と唾液中Histatin 5濃度との関係 (※:p<0.01)

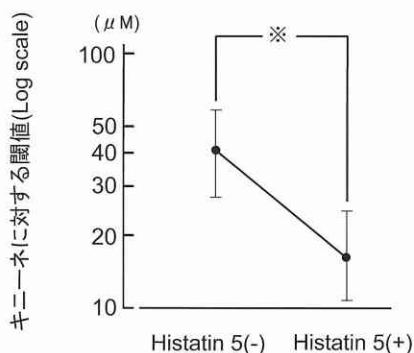


図6 Histatin 5プレリンスによるキニーネ感受性の変化 (※:p<0.01)

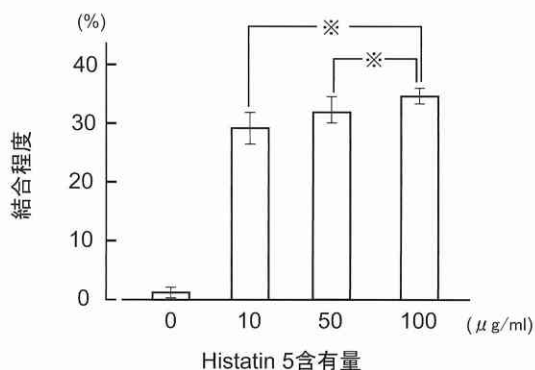


図7 キニーネとHistatin 5との結合程度 (※:p<0.05)

4. 硫酸キニーネと Histatin 5 間での結合

1) 検量線

硫酸キニーネの吸収スペクトルを測定した結果、331nm に吸収極大波長を得たため、これを固定波長に設定した。

次に、 $1.0 \mu\text{M}$ から $1000 \mu\text{M}$ の濃度に設定した硫酸キニーネ水溶液の吸光度を測定し、縦軸を吸光度、横軸を硫酸キニーネ濃度とするグラフを作成した (図4)。このグラフにおいて、硫酸キニーネ濃度が $25 \mu\text{M}$ から $250 \mu\text{M}$ の範囲でほぼ直線性を示したことから、これを検量線とした。

2) 硫酸キニーネと Histatin 5 の結合の評価

$100 \mu\text{M}$ 硫酸キニーネ水溶液の濾液の吸光度を測定した値を (a)、 $100 \mu\text{M}$ 硫酸キニーネに 10, 50, $100 \mu\text{g/ml}$ Histatin 5 溶液を添加した混合溶液の濾液の吸光度を測定した値を (b) とし、(a) と (b) の比率をキニーネのフィルター通過率として求めた。その結果、10, 50, $100 \mu\text{g/ml}$ Histatin 5 溶液を添加したとき、キニーネの結合程度はそれぞれ $29.42 \pm 1.05\%$ 、 $30.76 \pm 0.96\%$ 、 $33.12 \pm 0.82\%$ であった (図7)。Histatin 5 を添加しない場合の値が $0.46 \pm 0.21\%$ であったことから、Histatin 5 はキニーネと結合することが明らかとなった。

考 察

1. 唾液中タンパク質と味覚との関連について

唾液中タンパク質と味覚との関連については古くから研究され、Henkin ら¹²⁾ は耳下腺唾液由来で炭酸脱水素酵素VI型と相同性を有する亜鉛結合タンパク質 (Gustin) が味覚に関与することを報告している。島崎¹³⁾ は炭酸脱水素酵素VI型に対する抗体を作成し、唾液中亜鉛結合タンパク質濃度を ELISA 法によって測定する方法を報告した。その中で、耳下腺唾液中亜鉛結合タンパク質濃度の測定が亜鉛欠乏性味覚障害の診断に有用であることを示唆している¹⁴⁾。

味物質との直接的な関係については、Bennick ら^{15,16)} および Prinz ら¹⁷⁾ により Histatins と PRPs がタンニンと沈殿形成することで渋味を発生し、体内への吸収を抑制する作用を有することが報告されている。また、馬場⁸⁾ はアガロースゲル電気泳動において硫酸キニーネと挙動を共にする唾液中タンパク質として Histatin 3, 5, 6 および PRP-PE を検出した。

Histatins は Oppenheim ら^{18~20)} によって名称が統一されたヒスチジン残基に富む唾液中タンパ

ク質であり、Histatin 1から Histatin 12まで分類される。Histatin はヒトを含めた霊長類のみに存在し、組織学的には耳下腺、顎下腺の腺房細胞に局在することが証明されている²¹⁾。また、顎下腺唾液や舌下腺唾液に比較して耳下腺唾液に多く含有しており²²⁾、全唾液と比較しても耳下腺唾液中の Histatin 5濃度が有意に高いことが報告されている²³⁾。その生化学的特質により、強力な抗菌活性²⁴⁻²⁷⁾、歯周炎に対する臨床的効果²⁸⁻³⁰⁾、金属イオンとの結合能^{27,31-33)} および創傷治癒過程への関与^{27,34)} が報告されるようになった。

Histatin 5が苦味物質と関連していることは馬場⁹⁾、荒木田ら⁹⁾の報告から明らかであるが、苦味物質の受容においてマスキング作用をしているのか、キャリアーとして作用しているのかは明らかにされていない。

2. 唾液中 Histatin 5 とキニーネ感受性との関連

苦味物質と唾液中 Histatin 5との関係を追究するため、本研究ではまず、苦味感受性と唾液中 Histatin 5濃度との関連を検討した。その結果、硫酸キニーネに対する高閾値群の唾液中 Histatin 5濃度は正常閾値群に比較して有意に低い値を示した。これはキニーネの苦味を感じにくい被験者の唾液中には Histatin 5が少ないことを意味している。このことから唾液中 Histatin 5はキニーネの感受性に影響を与える作用を有していることが考えられる。

次に、Histatin 5がキニーネ感受性にどのような影響を与えているかを検討するため、Histatin 5合成ペプチド溶液によるプレリンス後のキニーネ感受性を検討した。その結果、Histatin 5ペプチド含有溶液によるプレリンス後においてキニーネ感受性の上昇を認めた。このことから唾液中 Histatin 5がキニーネ感受性を上昇させる作用を有していることが示された。

3. Histatin 5 と硫酸キニーネ間での結合について

硫酸キニーネと Histatin 3, 5, 6が挙動を共にすることが馬場⁹⁾によって報告されたことから、硫酸キニーネと Histatin 5間は結合している可能性が高い。そこで本実験では Maehashi ら³⁵⁾の方

法を参考とし、両者間の結合の有無を Histatin 5の分子量と硫酸キニーネの分子量の差を利用して検討した。

硫酸キニーネの分子量は約300で、Histatin 5の分子量は約3000である。このことから分画分子量1000の遠心式限外濾過フィルターを用いて両者の結合を検討した。その結果、Histatin 5はキニーネと濃度依存的に結合することが確認された。このことから口腔内において Histatin 5とキニーネが共存する条件下では両者間で結合することが示された。

Histatin 5と結合することで生理活性を示す主な因子にはタンニン、金属イオン、そしてカンジダ菌などが挙げられる。タンニン酸は Histatin 5の N 末端、C 末端両方に結合することで渋味を有する沈殿物を形成する¹⁶⁾。亜鉛や銅などの金属イオンは Histatin 5のアミノ酸配列中に有する特異的なモチーフ (ATCUN) に結合することでカンジダ菌に対する抗菌作用に関与する可能性が示されている³²⁾。

キニーネに対する唾液中 Histatin 5のアミノ酸配列中の結合部位に関しては不明である。一方、タンニンとタンパク質間の結合に関する見解として、アルギニンとヒスチジンがタンニンと沈殿物を形成することが示唆され³⁶⁾、核磁気共鳴を用いた研究でアルギニンがタンパク質とタンニン間の相互作用に寄与することが示された³⁷⁾。さらにタンニンの芳香環部分とアルギニン、リジンそしてヒスチジンの側鎖間で疎水的相互作用が生じているとされ、これらのアミノ酸は Histatin 5の全アミノ酸の約60%を占めることから、タンニンと Histatin 5との相互作用に強く関連していることが示唆されている⁴⁾。

キニーネもまた芳香環を有しており、Histatin 5との間で同様の相互作用が考えられ、本研究でキニーネと Histatin 5間で結合を示す結果が得られたことから、両者間で疎水的相互作用が生じている可能性が高い。

苦味物質の受容は味物質が G タンパク質共役型受容体に結合後、セカンドメッセンジャーを介し、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させるという Ca^{2+} シグナリング機構が関与しているとされている³⁸⁾。

この情報伝達機構の中でもキニーネが受容体へ結合する過程で唾液中 Histatin 5が強く関与していることが考えられる。つまり唾液中に分布する Histatin 5がキニーネと結合物を形成することで唾液に分散させ受容に寄与すると考えられる。

本研究で Histatin 5とキニーネとの結合が確認され、口腔内の Histatin 5量を増加させた被験者においてキニーネに対する苦味感受性の上昇を認めた。また、苦味感受性の低下を認める者がいなかったことからマスキングとしての可能性が低い。これらのことから唾液中 Histatin 5はキニーネを味受容器まで運搬するキャリアータンパクとしての機能を有することが示唆された。

結 論

硫酸キニーネと Histatin 5との関係および Histatin 5の硫酸キニーネに対する作用を検討したところ、以下の結論を得た。

1. 遠心式限外濾過フィルターを用いた実験から、硫酸キニーネと Histatin 5 との結合が確認された。

2. 硫酸キニーネに対する正常閾値者群に比較して高閾値者群では唾液中 Histatin 5濃度が有意に低い値を示した。

3. Histatin 5ペプチド含有溶液によるプレリンスにより、硫酸キニーネに対する味覚閾値は有意に低い値を示した。

以上のことから、唾液中 Histatin 5は、硫酸キニーネと結合することで、受容体まで運搬するキャリアータンパク質として作用することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに際し、終始御懇篤なる御指導をいただきました奥羽大学大学院歯学研究科口腔機能学領域口腔機能回復学講座清野和夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に当たり御協力いただきました歯科補綴学講座教職員各員と被験者の皆様に深く感謝申し上げます。

本論分の一部は、第43回日本味と匂学会（平成21年9月 旭川市）および88th International Association for Dental Research（平成22年7月 Barcelona）において、要旨は第49回奥羽大学歯学会（平成22年6月 郡山市）において発表した。

文 献

- 1) Garcia, J. and Hankins, W. G. : The evolution of bitter and acquisition of toxiphobia. In Olfaction and taste V (Ed., Derek A. Denton, John P. Coghlan) ; 39-45 Academic Press New York 1975.
- 2) Matsunami, H., Montmayeur, J. P. and Buck, L. B. : A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **404** ; 601-604 2000.
- 3) Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrasekar, J., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. : A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **100** ; 693-702 2000.
- 4) 鳥居邦夫, 沖山 敦 : 食物嗜好と栄養. 最新味覚の科学 (小川 尚, 佐藤昌康編) ; 211-225 朝倉書店 東京 1997.
- 5) Mehansho, H., Ann, D. K., Butler, L. G., Rogler, J. and Carlson, D. M. : Induction of proline-rich proteins in hamster salivary glands by isoproterenol treatment and an unusual growth inhibition by tannins. *J. Biol. Chem.* **262** ; 12344-12350 1987.
- 6) 松尾龍二 : 唾液と味覚感受性. 最新味覚の科学 (小川 尚, 佐藤昌康編) ; 48-57 朝倉書店 東京 1997.
- 7) Schmale, H., Holtgreve-Grez, H. and Christensen, H. : Possible role for salivary gland protein in taste reception indicated by homology to lipophilic-ligand carrier proteins. *Nature* **343** ; 366-369 1990.
- 8) 馬場園子 : 苦味に関連する唾液中タンパク質の検出. 奥羽大歯学誌 **30** ; 189-196 2003.
- 9) 荒木田安弘, 山森徹雄 : 精神的ストレス負荷による唾液中苦味関連タンパク質の変化. 奥羽大歯学誌 **34** ; 137-144 2007.
- 10) 山内由紀, 遠藤壮平, 酒井文隆 : 全口腔味覚検査 (第1報) —基礎的検討および主成分分析— 日本耳鼻咽喉科学会会報 **98** ; 119-129 1995.
- 11) Pfaffmann, C., Bartoshuk, L. M. and Mcburney, D. H. : Taste psychophysics. In Handbook of sensory physiology IV chemical senses 2 taste (Ed., Beidler, L. M.) ; 75-101 Springer-Verlag Berlin 1971.
- 12) Henkin, R. I., Lippoldt, R. E., Bilstad, J. and Edelhoch, H. : A Zinc protein isolated from human parotid saliva. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72** ; 488-492 1975.
- 13) 島崎伸子 : ヒト炭酸脱水酵素VI型の合成ペプチドに対する抗体による唾液中の亜鉛結合タンパク質の検出. 奥羽大歯学誌 **27** ; 215-224 2000.
- 14) 島崎伸子, 富田 寛, 山森徹雄, 石橋寛二 : 唾液中亜鉛結合タンパク質 (Gustin) による味覚障害の診断について. 味と匂誌 **16** ; 469-470 2009.
- 15) Yan, Q. and Bennick, A. : Identification of histatins as tannin-binding proteins in human

- saliva. *Biochem. J.* **311** ; 341-347 1995.
- 16) Naurato, N., Wong, P., Lu, Y., Wroblewski, K. and Bennick, A. : Interaction of tannin with human salivary histatins. *J. Agric. Food Chem.* **47** ; 2229-2234 1999.
 - 17) Prinz, J. F. and Lucas, P. W. : Saliva tannin interactions. *J. Oral Rehabil.* **27** ; 991-994 2000.
 - 18) Oppenheim, F. G., Yang, Y. C., Diamond, R. D., Hyslop, D., Offner, G. D. and Troxler, R. F. : The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J. Biol. Chem.* **261** ; 1177-1182 1986.
 - 19) Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D. and Troxler, R. F. : Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. *J. Biol. Chem.* **263** ; 7472-7477 1988.
 - 20) Troxler, R. F., Offner, G. D., Xu, T., Vanderspek, J. C. and Oppenheim, F. G. : Structural relationship between human salivary histatins. *J. Dent. Res.* **69** ; 2-6 1990.
 - 21) Takano, K., Malamud, D., Bennick, A., Oppenheim, F. and Hand, A. R. : Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4** ; 399-405 1993.
 - 22) Campese, M., Sun, X., Bosch, J. A., Oppenheim, F. G. and Helmerhorst, E. J. : Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Arch. Oral Biol.* **54** ; 345-353 2009.
 - 23) Wang, P. L., Kanehira, T., Ohura, K., Tani, H. and Kuboki, Y. : Measurement of histatins in the saliva of healthy humans. *J. Oral Biol.* **41** ; 591-595 1999.
 - 24) 三浦 直 : ヒスタチン由来の抗菌性ペプチド. 歯界展望 医歯薬出版 東京 **96** ; 884-885 2000.
 - 25) Santarpia, R. P., 3rd, Pollock, J. J., Renner, R. P. and Gwinnett, A. J. : *In vivo* antifungal efficacy of salivary histidine-rich polypeptides : preliminary findings in a denture stomatitis model system. *J. Prosthet. Dent.* **66** ; 693-699 1991.
 - 26) Melino, S., Gallo, M., Trotta, E., Mondello, F., Paci, M. and Petruzzelli, R. : Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry.* **45** ; 15373-15383 2006.
 - 27) Sun, X., Salih, E., Oppenheim, F. G. and Helmerhorst, E. J. : Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. *FASEB J.* **23** ; 2691-2701 2009.
 - 28) Mickels, N., McManus, C., Massaro, J., Friden, P., Braman, V., D'Agostino, R., Oppenheim, F., Warbington, M., Dibart, S. and Van, D. T. : Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **28** ; 404-410 2001.
 - 29) Van, D. T., Paquette, D., Grossi, S., Braman, V., Massaro, J., D'Agostino, R., Dibart, S. and Friden, P. : Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis : a phase-2 multi-center study. *J. Clin. Periodontol.* **29** ; 168-176 2002.
 - 30) Paquette, D. W., Simpson, D. M., Friden P., Braman, V. and Williams, R. C. : Safety and clinical effects of topical histatin gels in humans with experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **29** ; 1051-1058 2002.
 - 31) 井上 倫, 新原英嗣, 菊池徳則, 長谷川嘉一 : ヒト唾液タンパク質の鉄結合能. 歯学 **86** ; 612-615 1998.
 - 32) Gusman, H., Lendenmann, U., Grogan, J., Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G. : Is salivary histatin 5 a metalloprotein? *Biochim. Biophys. Acta.* **1545** ; 86-95 2001.
 - 33) Grogan, J., McKnight, C. J., Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G. : Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Lett.* **491** ; 76-80 2001.
 - 34) Oudhoff, M. J., Bolscher, J. G., Nazmi, K., Kallay, H., van't Hof, W. V., Amerongen, A. V. and Veerman, E. C. : Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB J.* **22** ; 3805-3812 2008.
 - 35) Maehashi, K., Matano, M., Nonaka, M., Udaoka, S. and Yamamoto, Y. : Riboflavin-binding protein is a novel bitter inhibitor. *Chem. Senses.* **33** ; 57-63 2008.
 - 36) Mitaru, B. N., Reichert, R. D. and Blair, R. : The binding of dietary protein by sorghum tannins in the digestive tract of pigs. *J. Nutr.* **114** ; 1787-1796 1984.
 - 37) Murray, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H. and Haslam, E. : Study of the interaction between salivary prolinerich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **219** ; 923-935 1994.
 - 38) 中島清人, 勝川秀夫, 畠 哲崇, 杉村忠敬 : 味覚受容機構における分子生物学的急展開. 岐阜歯科学会雑誌 **30** ; 172-182 2004.

著者への連絡先 : 和田裕一, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科補綴学講座
 Reprint requests : Hirokazu WADA, Department of Prosthetic Dentistry, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan