

平成22年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791415
 研究課題名（和文） 免疫機構を賦活する口腔上皮-PMMA系義歯界面デザインと
 簡便・高効率構築法を探る
 研究課題名（英文） Biomaterials immunization using a novel peptide that binds to a PMMA
 denture
 研究代表者
 小牧 健一郎（KEN-ICHIRO KOMAKI）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：40361109

研究成果の概要（和文）：ファージディスプレイ法により PMMA に対し結合するペプチド候補を示す 18 ファージが得られた。その中の 7 ファージは同一のペプチドシーケンスであった。その優位なファージはワイルドタイプファージ（M13KE）との PMMA 粉末への結合比較実験を行ったところ、有意に親和性を持つことが明らかになり、また、重合 PMMA 表面に対しても同様の結果が得られた。PMMA 表面に生体にいって有効な生体分子を構築することは臨床に重大な意味を持つと考えられる。今後、そのペプチドと機能分子を融合させたタンパクを合成し、PMMA 表面に生体活性を付与できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We used a peptide library for isolating peptide aptamers against PMMA powder. We observed that 7 of 18 phages displayed on their surfaces peptides having the identical sequence. We confirmed that the predominant phage retained the ability to bind to PMMA powder and also PMMA plate. The binding of biomolecules that bring active biological function to the surface of PMMA is critical clinically. Using fusion proteins of the isolated peptide motif and functional biomolecule, we expect to add the ability to immunize on PMMA surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：PMMA ペプチド インターフェイス

1. 研究開始当初の背景

(1) 着想に至った経緯

①口腔内状態、咀嚼機能および食行動が高齢者の身体的、精神的な面から健康にかかわっている知

見が報告されている。

②歯科補綴治療は高齢者の心身賦活への役割を担っている。一方で、補綴物が二次的に感染症さらには誤嚥性肺炎といった重篤な疾病を引き起こす

原因となっていることもある。

③上記より、一般的な義歯ベース材料として、その利便性から最も使用されている PMMA の表面に、生体機能分子を利用した、口腔内において免疫機構賦活作用を発揮するバイオマテリアルインターフェイス構築の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) PMMA 表面へ高効率かつ簡便な生体機能分子構築法を確立する。

一般的な歯科技工方法で重合された PMMA に対して、リンカー部となるアミノ酸配列のセレクションをおこない、それを利用することで高効率かつ簡便に PMMA 表面に生体分子の構築を可能にする。

(2) リンカー融合機能分子の機能評価。

リンカーを利用し PMMA 表面での機能分子の機能評価をおこなう。

3. 研究の方法

(1) PMMA 表面へ特異的結合を示すリンカー部アミノ酸配列のセレクション。

ファージディスプレイ法により行う。

(2) リンカー部融合機能分子の機能評価。

リンカー部および機能分子部を合成により製作し行う。

4. 研究成果

(1) パニング操作後、選択されたペプチドのアミノ酸配列。

①全部で 18 ファージクローンの解析を行ったところ、7 つが同じアミノ酸配列(clone2)を提示していた。(図 1) ②アミノ酸出現頻度(%)の比較
パニング後(黒)とライブラリー(白)のアミノ酸出現頻度(%)を比較したところ、タイロシン(Y)、アスパラギン酸(D)およびヒスチジン(H)にあきらかな増加(2倍以上)が見られた。一方、プロリン(P)では減少が認められた。(図 2)

(2) ファージディスプレイにより選択された各クローンの PMMA 粉末に対する相対的親和性(Relative affinity)。

①PMMA 粉末に対する相対的親和性

ELISA により得られた各クローンの吸光度値(Absorbance)をペプチド非提示ファージ(M13KE)のそれと比較し親和性に換算した。clone2 のみが M13KE よりも 2 倍の親和性を示した、このことから clone2 が提示するペプチド配列が PMMA 粉末と結合するモチーフとなる可能性が示唆された。(図 3)

②重合 PMMA 表面に対する相対的親和性

重合 PMMA 表面に対しても clone2 の相対的親和性は粉末と同程度の結果が示された。(図 4)

(3) 各変異体の PMMA 粉末に対する相対的親和

性

①clone2 の各変異体(図 5)

Fclone2: clone2 の前半 6 アミノ酸の役割を調べるため後半 6 アミノ酸をグリシン(G)に置換

Bclone2: clone2 の後半 6 アミノ酸の役割を調べるため前半 6 アミノ酸をグリシン(G)に置換

②clone2 と PMMA との結合に関連する重要なアミノ酸を理解するため、ELISA により各変異体および M13KE の吸光度値(Absorbance)を clone2 のそれと比較し親和性に換算した。ペプチドの前半あるいは後半の 6 アミノ酸のみを保存した Fclone2 および Bclone2 では、親和性の消失が示された。(図 6)

考察

1.

PMMA とペプチドの結合には、ペプチドのプロトン供与体となるアミノ酸と PMMA のエステル部との水素結合が重要であるといわれている(Serizawa T, ら^{1,2)})。今回の結果からも全てのクローンにプロトン供与体となるアミノ酸が含まれていることよりその可能性が考えられる。しかし、立体特異的構造を有する PMMA 表面との結合に関連する重要なアミノ酸である、リシン(K)とアルギニン(R)また、それらプロトン供与アミノ酸の間に存在しペプチド構造を強固にしているプロリン(P)は、パニング後の出現頻度が減少している。今回の結果からは、結合に関連する重要なアミノ酸種類、配列は立体特異的構造を有する PMMA 表面に対するそれと明らかに異なると考えられる。

2.

clone2 は立体特異的構造を有していない重合 PMMA 表面に対しても親和性を示し、今後義歯床表面へ生体機能分子を構築する足場となる可能性が示された。

3.

今回の変異体の実験では clone2 と PMMA との結合に関連する重要なアミノ酸は前半あるいは後半部分のみに限定されず、clone2 を構成するアミノ酸全体の性質が重要である可能性が示唆された。

1) Serizawa T, Sawada T, Matsuno H et al. A peptide motif recognizing a polymer stereoregularity. *J Am Chem Soc* 127(40):13780-13781, 2005.

2) Serizawa T, Sawada T, Kitayama T Peptide motifs that recognize difference in polymer-film surfaces. *Angew.Chem.Int.* 46:723-726, 2007.

clone 1	E S S H F D P S R Q K M	1/18
clone 2	S W M T G F S F W D Y E	7/18
clone 4	A Y H I N Q L G A P P A	1/18
clone 5	M S Y P H D T A H E Y W	1/18
clone 6	S M T H T Q L A P F Q L	1/18
clone 7	S S T H H G R H S D Q T	1/18
clone 8	D H R A Y V D I Q P T R	1/18
clone 9	T T W D L D W G G A M A	1/18
clone 11	T N D S S S V S K T P T	1/18
clone 13	H N V E K T N V I H T T	1/18
clone 16	D M H W G T I T H S S S	1/18
clone 18	A T D H G M R H M K W G	1/18

図 1 : 選択されたペプチドのアミノ酸配列

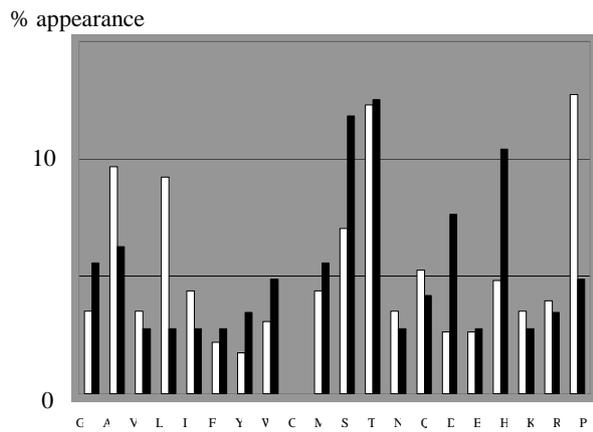


図 2 : アミノ酸出現頻度(%)の比較

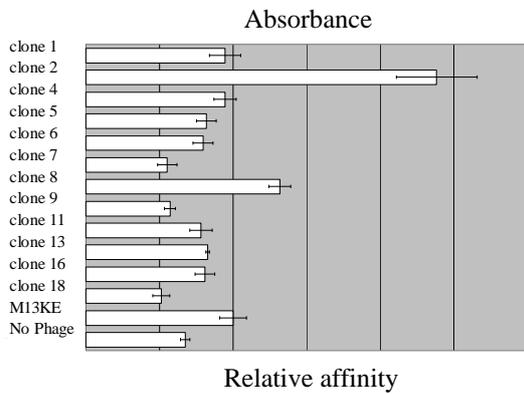


図 3 : PMMA 粉末に対する相対的親和性

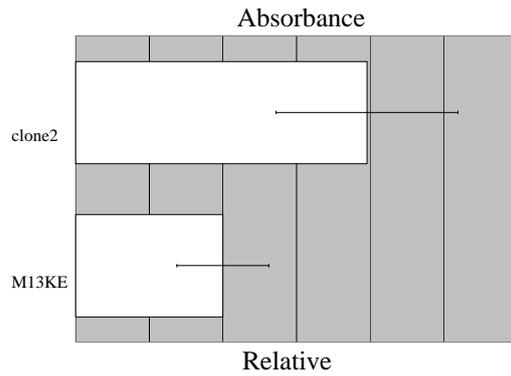


図 4 : 重合 PMMA 表面に対する相対的親和性

clone2	S	W	M	T	G	F	S	F	W	D	Y	E
Fclone2	S	W	M	T	G	F	G	G	G	G	G	G
Bclone2	G	G	G	G	G	G	S	F	W	D	Y	E

図 5 : clone2 の各変異体

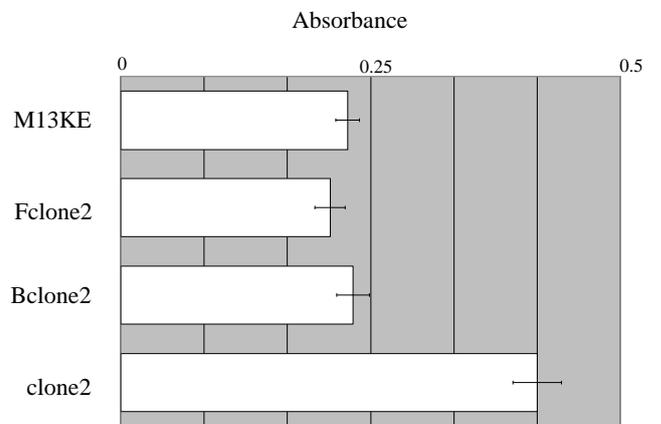


図 6 : 各変異体の PMMA 粉末に対する相対的親和性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

①

小牧健一朗、土谷昌広、坪井明人、服部佳功、渡邊誠、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) 表面に結合するペプチドモチーフの単離、日本補綴学会学術大会、2008 年 6 月 7 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小牧 健一朗 (KEN-ICHIRO KOMAKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40361109

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：