

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462951

研究課題名(和文) STD-NMR法による接着性モノマーとコラーゲンとの相互作用の分子レベル解析

研究課題名(英文) Monomer-collagen interactions studied by saturation transfer difference NMR.

研究代表者

平石 典子(Hiraishi, Noriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：20567747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：飽和移動差核磁気共鳴測定法(STD-NMR)を用いた接着性モノマーとコラーゲンの相互作用解析では、理化学研究所横浜NMR共用プラットフォームに解析協力を頂いた。(STD) NMR法は、高分子タンパク質と低分子(リガンド)の結合複合体(binding component)の確認、低分子リガンド側の認識部位(エピトープ)の解析が可能である。接着性モノマーとコラーゲン分子レベルで解明し、水溶性のアテロコラーゲンでは、接着性モノマーとの疎水性相互作用が示唆された。また、固体NM測定により、歯質アパタイトと接着性モノマーとの反応が観測された。不溶性のコラーゲンとの相互作用は今後検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The interaction of functional adhesive monomers with collagen is not understood at a molecular/atomic level. We performed saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy to investigate the binding interaction of 10-methacryloyloxydecyl dihydrogenphosphate (MDP), with atelocollagen as a triple-helical peptide model. High STD intensities were detected on the protons in the aliphatic region in MDP. The STD results imply that MDP has a relatively stable interaction with the collagen, because of the hydrophobic interactions between the hydrophobic MDP moieties and the hydrophobic collagen surface. This finding indicates that MDP-collagen complexation accounts for stable dentin bonding. Furthermore, we examined molecular-level interaction of MDP with dentin components by solid-state ^{31}P NMR spectroscopy using a light-cured commercial available MDP-based adhesive. MDP-mineral reaction/binding was confirmed in cured adhesive with dentin. Interaction with collagens needs further studies.

研究分野：歯科保存修復学

キーワード：NMR コラーゲン 象牙質 接着性モノマー 疎水性結合

1. 研究開始当初の背景

象牙質接着は、水、アセトン、エタノール、などの溶媒などに、接着性レジンモノマーを含有したプライマーにより、部分脱灰されたコラーゲン繊維層にモノマーが浸透すると考えられている。しかし接着耐久性の劣化は未だ解決されておらず、特にコラーゲンは、接着性モノマーに保護されていない場合、分解酵素により劣化されるため、接着性の劣化の最大の原因との見解がある。分子レベルでの解析法の一つである NMR(nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴)を応用した歯科接着性モノマーのスクリーニングは、モノマーの加水分解、またはミネラル(ヒドロキシアパタイト)との相互作用が報告されている。しかしながら、このヒドロキシアパタイトと機能性接着性レジンモノマーとの結合層が、象牙質 18%を占めるコラーゲン繊維を十分に取り囲み、分解酵素の Matrix Metalloproteinases の侵害からコラーゲンを保護しているかは不明である。今日まで、接着性モノマーとコラーゲンとの相互作用の、分子レベルでの解析はまだ十分に行われていない。近年、Meyer らにより開発された STD NMR 法は(Meyer and Peters, 2003)リガント - タンパク質間における相互作用の確認、またリガント側の認識部位(エピトープ)分析法として、薬剤 - タンパク質間における結合作用の解析が行われてきた。STD 法は、タンパク質に選択的にラジオ波を照射して飽和させることにより、タンパク質に結合しているリガントに飽和を伝播させ、飽和を伝播されたりリガントのスペクトルを測定し、その測定したスペクトルからタンパク質を飽和していないリガントのスペクトルを差し引いて差スペクトルを得る高度な測定法である。そこで申請者は、接着性モノマーと歯質の相互作用を観点に、歯科接着システムと有機質コラーゲンの相互作用解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

核磁気共鳴を応用した分子レベル分析は、モノマーの加水分解、またはミネラルとの相互作用が報告されているが、象牙質有機質であるコラーゲンと接着性モノマーとの相互作用、その複合体の形成は報告がなく、接着機能の解明において興味深い分析である。飽和移動差核共鳴測定法、Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance、(STD NMR)は、高分子(protein)と低分子(ligand)の相互作用、結合複合体(binding component)の確認、解析に応用される技術である。本研究では、STD NMR 法を用い、コラーゲンと接着性モノマーの相互作用を評価し、さらにコラーゲンに対する接着性モノマーの相互作用部位(エピトープ)を解析し、接着界面でのコラーゲンの劣化抑制の条件を模索した。

3. 研究の方法

NMR 測定は、理化学研究所横浜研究所、NMR 共用プラットフォームの解析協力を得た。STD-NMR の特徴を以下に記載する：1. タンパク質などの高分子(>10 kDa)でも感度が良い、微量のサンプル量測定可能
2. タンパク質(酵素やレセプター)と標的化合物(基質、低分子リガンド及びリガンド模倣ペプチド)を溶液中で混合して測定できる。高分子(protein)と低分子(ligand)の結合複合体(binding component)の確認
3. 低分子リガント - タンパク質間の相互作用解析において、Saturation transfer difference-NMR 法により、低分子リガント側の認識部位(エピトープ)を解析できる。

接着性モノマー2種対象に、溶媒として、DMSO (Dimethyl sulfoxide)を使用した基礎結果と、一般接着性プライマー剤に配合される親水性溶媒モノマーの HEMA を使用した場合と比較し、モノマー - コラーゲン相互作用への影響を比較評価した。コラーゲン分子の monohelical chain のペプチドモデルを Gly Pro Hyp (M.W. 3000)、また N-, C-両末端のテロペプチドを酵素処理し水溶性を高めたアテロコラーゲンを使用した。この水溶性コラーゲンは飽和溶液を 20 倍に希釈して最終サンプルとした。測定は、Bruker 800 MHz equipped with CryoProbe を用い、温度 298K にて行った。1D ¹H 測定: 16384 pts x 8 scans, inter delay (D1)= 3sec
1H STD の測定: 16384 pts x 512 scans, d1 = 3 sec である。

研究期間の後半は、不溶性の象牙質コラーゲンをういて、固体 NMR によるコラーゲンのスペクトラムを測定する実験系に変更した。これは、本来の実験計画にはなかったが、研究概要は歯質コラーゲンとの接着性モノマーの相互作用分析であるので、研究方針を調整することにした。

4. 研究成果

(1) 平成 25 から 27 年
STD-NMR 測定より、接着機能性リン酸モノマーの MDP (10-Methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate)とコラーゲン間に、強力な化学結合ではないが、相互作用が見られた(図 1)。リガント側 MDP の認識部位(エピトープ)分析ではその脂肪族部位に特異的に STD が現れた為(図 2)疎水性引力によるものと示唆できた。接着機能性モノマーにて象牙質を接着した場合、接着界面でコラーゲンと相互作用を結合し、より安定した複合体を構築し、接着強さを生み出すものと示唆できた。しかし、この疎水性相互作用は、親水性溶媒モノマーの HEMA と配合した場合は観測されなかった。HEMA は接着性レジンに含まれる親水性溶媒モノマーだが、機能性モノマー MDP のコラーゲンとの相互作用を弱化する恐れが示唆された(図 3)。

アテロコラーゲンが本来の歯質コラーゲン”線維”とは形態が異なるため、不溶性のコラーゲンを対象にした固体 NMR 測定では、歯質コラーゲンと接着性モノマーとの方向依存性相互作用の「化学シフト異方性」が観測されたが、さらなる検討が必要である

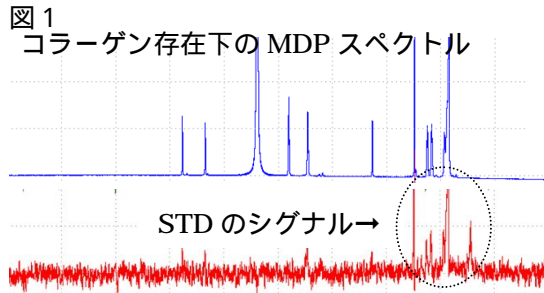
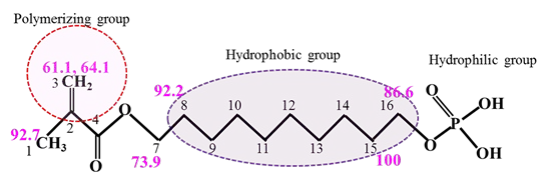
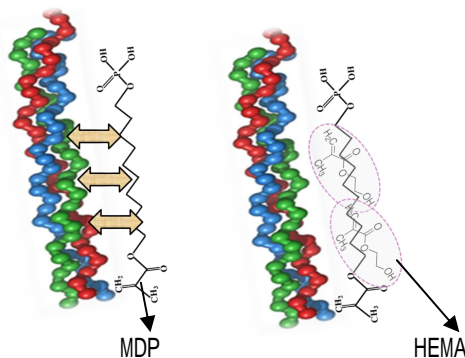


図 2
MDP の Epitope Mapping



STD の Epitope の結果より、MDP モノマーの脂肪酸部位に特異的に結合がみられた。この疎水性結合によって、アテロコラーゲンとの相互作用が示唆できた。図中数値は結合部位の相対的強度を示す。

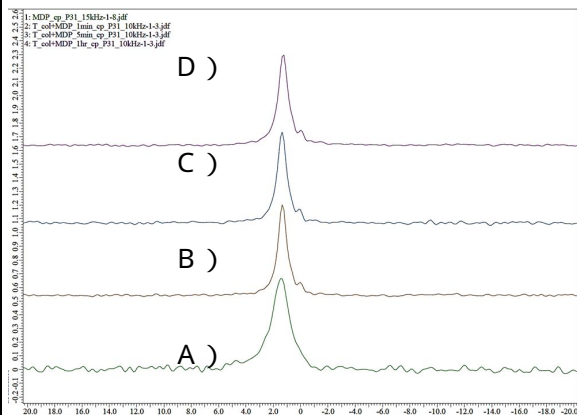
図 3



MDP のアテロコラーゲンへの相互作用
(左図) MDP のみでは脂肪酸の疎水性を利用した相互作用がみられるが、(右図) HEMA 存在下では MDP の脂肪酸に HEMA が配合しその疎水性を阻害するため、相互作用が弱くなる。HEMA 共存化では、露出コラーゲンは MDP モノマーにより安定的に保護されないことが示唆された。

(2)平成 29 年度 延長時
不溶性コラーゲンを使い固体 NMR による NMR 相互作用分析の実験を実施した。アテロコラーゲンに代わり、不溶性のウシ抜去歯由来の天然コラーゲンを器質し、MDP の歯質接着性材料の機能性の分析という観点から、固体 NMR を用いて高感度の ^{31}P により評価を行った。他の発表論文同様に、ハイドロキシアパタイトと化学的に結合し、水に不溶性のカルシウム塩を形成する結果は得られた。コラーゲンと MDP 配合の市販の歯科接着剤を反応された場合は、60 分後も MDP 本来の NMR スペクトラムに変化が見られなかった(図 4)。このように、 ^{31}P の chemical shift では結合性を評価した場合は、MDP のリン酸基末端の結合部位のみ分析対象となるため、MDP の脂肪酸の疎水結合性を評価する為には ^{13}C NMR 分析が今後必要となる。

図 4
 ^{31}P NMR spectra (MDP 由来のリン酸基の ^{31}P chemical shift)



- A) MDP 配合の市販の歯科接着剤のみ光照射により硬化
- B) ウシ抜去歯由来コラーゲンと MDP 配合の市販の歯科接着剤を 1 分間反応させた後、光照射により硬化
- C) ウシ抜去歯由来コラーゲンと MDP 配合の市販の歯科接着剤を 5 分間反応させた後、光照射により硬化
- D) ウシ抜去歯由来コラーゲンと MDP 配合の市販の歯科接着剤を 60 分間反応させた後、光照射により硬化

(MDP 由来のリン酸基の ^{31}P chemical shift に大きな変化は見られない。これは MDP のリン酸基末端の結合部位ではコラーゲンとの結合はないと意味する。しかし、脂肪酸部位との相互作用は ^{13}C による分析が必要である。)

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)

[雑誌論文](計4件 全て査読有)

1. Hiraishi N, Takahiro Maruno, Naoya Tochio, Ryohei Sono, Masayuki Otsuki, Tsutomu Takatsuka, Junji Tagami, Yuji Kobayashi. Hesperidin interaction to collagen detected by physico-chemical techniques. Dent Mater. 33(1):33-42, 2017.

doi: 10.1016/j.dental.2016.09.035

2. Hiraishi N, Tochio N, Kigawa T, Otsuki M, Tagami J. Molecular Level Evaluation on HEMA Interaction with a Collagen Model. Dent Mater. 31(2):88-92, 2015.

doi: 10.1016/j.dental.2014.11.005

3. Hiraishi N, Tochio N, Kigawa T, Otsuki M, Tagami J. Role of 2-Hydroxyethyl Methacrylate in the Interaction of Dental Monomers with Collagen Studied by Saturation Transfer Difference NMR. J Dent. 42(4):484-9, 2014.

doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.016

4. Hiraishi N, Tochio N, Kigawa T, Otsuki M, Tagami J. Monomer-collagen interactions studied by saturation transfer difference NMR. J Dent Res. 92(3):284-8, 2013.

doi: 10.1177/0022034512474310

[学会発表](計4件)

1. Noriko Hiraishi, Fumiaki Hayashi, Tomohiro Takagaki, Junji Tagami. Solid-state NMR investigation on the mineral structure in de/re-mineralized dentin. 95th General Session & Exhibition of the IADR/AADR. March 22-26, 2017. San Francisco, CA

2. Noriko Hiraishi, Fumiaki Hayashi, Tomohiro Takagaki, Masayuki Otsuki, Junji Tagami. Interaction of MDP-based adhesive with dentin studied by solid-state NMR. 94th General Session & Exhibition of the IADR. June 22-25, 2016. Seoul, Korea.

3. Noriko Hiraishi, Naoya Tochio, Masayuki Otsuki, Junji Tagami. Influence of HEMA on Monomer-collagen Interaction Studied by NMR. 93rd General Session & Exhibition of the IADR. March 11-14, 2015. Boston, Mass., USA.

4. Noriko Hiraishi, Naoya Tochio, Masayuki Otsuki, Junji Tagami. Monomers Interaction to Collagen Studied by Saturation Transfer Difference NMR. 5th IAD (国際接着歯学会), June 14-15, 2013. Philadelphia, PA

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平石 典子 (HIRAISHI Noriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：20567747