

Title	Identification of peptide motif that binds to the surface of zirconia
Author(s)	橋本, 和彦
Journal	歯科学報, 112(2): 234-235
URL	http://hdl.handle.net/10130/2780
Right	

氏名(本籍)	橋本和彦 (東京都)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1928号(甲第1178号)
学位授与の日付	平成23年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Identification of peptide motif that binds to the surface of zirconia
掲載雑誌名	Dental Materials Journal 第30巻 6号 935~940頁 2011年11月
論文審査委員	(主査) 井上 孝教授 (副査) 新谷 誠康教授 東 俊文教授 石原 和幸教授 吉成 正雄教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

ジルコニアは、生体適合性、耐摩耗性、圧縮強さに優れ、さらに、天然歯に似た色調や金属アレルギーを起ささないなどの性質から、チタンに代わるインプラント材料として注目を集めている。しかしながら、ジルコニアはチタンと比較して十分なオッセオインテグレーションが得られないとの報告があり、ジルコニアと生体反応について不明な点も存在していることから、現在ジルコニア表面の機能向上に向けて研究が進められている。以前の研究において、Kokubunらは、MolCraftを利用してチタン結合ペプチドモチーフ(minTBP-1)と細胞接着モチーフ(RGD)を組み込んだ人工タンパク質を開発し、チタン表面の生物学的な機能化に成功した(Kokubun et al, Biomacromolecules, 2008)ことから、ジルコニアにおいても同様のアプローチで研究を行うことを考えたが、現在までにジルコニア結合ペプチドモチーフを同定したという研究報告はみられない。

今回われわれは、ジルコニア表面の生物学的機能化を進めるにあたり、その第一段階としてジルコニア表面に接着性をもつ人工ペプチドの同定を行ったので報告する。

2. 研究方法

ジルコニア結合ペプチドモチーフの単離には、12-merのペプチドを提示したファージからなるペプチドファージライブラリーキット(Ph. D-12, New England Biolabs)および標的材料としてのイットリア安定化ジルコニアビーズ(TZ-B, ϕ 125 μ m, TOSOH)を用いて、バイオパニングを行った。単離したジルコニア結合ペプチド提示ファージおよび直径13mmのジルコニア円板(TZP, 直径13mm, 厚さ0.5mm, TOSOH)を用いて、円板に結合したファージの割合を概算してジルコニアへの結合能を評価した。ジルコニアに対してペプチドを介して結合しているかどうかを、水晶発振子マイクロバランス(QCM-D, Q-sence)およびジルコニアをスパッタ蒸着させたジルコニアセンサーを用いて評価した。

3. 研究成績および結論

ジルコニア結合ペプチド提示ファージを単離するためにバイオパニングを行った。ファージライブラリー溶液を加えてTZ-Bにファージを結合させ、結合しなかったファージを洗浄して除去し、結合したファージを溶出して大腸菌に感染させて増幅する行程(biopanning)を4サイクル繰り返すことで、TZ-Bに結合するペプチド提示ファージを濃縮した。4サイクル目で得られたファージクローンのDNAを解析し、ファージに提示さ

れたペプチドのアミノ酸配列を同定したところ、24クローン中5クローンが12-merではなく、58-merのポリペプチドを提示していた。われわれはこのファージクローンをΦ#17と命名した。このΦ#17は、ペプチドを提示していない野生型ファージ・Φ#447と比較して、TZP円板に対して結合したファージの割合が約300倍高い値を示したことから、ジルコニアに対して高い結合能を持つことがわかった。続いて、水晶発振子マイクロバランス測定法にてジルコニアに対する結合様式の評価を行った。Φ#17を含む溶液をジルコニアセンサー表面に加えると、表面の粘弾性(energy dissipation)が直ちに上昇したが、Φ#447の場合は粘弾性に大きな変化はみられなかった。この急激な粘弾性の上昇は、Sanoらが行ったチタンセンサーを用いた以前の研究結果と類似していた(Sano et al, JACS, 2003)ことから、Φ#17は自らが提示したジルコニア結合ペプチドを介してジルコニアセンサーに結合していることが考えられた。

これらの実験結果から、われわれはジルコニアに結合するペプチドモチーフの同定に成功した。

論 文 審 査 の 要 旨

本研究は、インプラント材料としてチタンとは異なった特性を持つジルコニアに対して結合するペプチドを、ファージディスプレイ法を用いて探索し、そのアミノ酸モチーフを明らかにしただけではなく、結合に活性がある部位の生物学的・物理化学的な検討を行い、また、ジルコニア結晶を安定化させるために加えているイットリアではなくジルコニア本体に結合するものであることを、QCMを用いて証明した内容のものである。

本審査委員会は、平成23年7月26日に行われ、まず橋本和彦大学院生から論文内容の説明がなされた。その後、各審査委員より次のような質問がなされた。1) biocompatibilityの定義について、2) ペプチドの吸着機構について、3) ミュータントファージを作製したときに、切断したDNAの制限酵素サイトについて、4) コントロールとして使用したペプチド非提示のファージクローンについて、5) ポリペプチドに含まれるリンカーとしてのアミノ酸について、6) ジルコニアの表面改質方法についてなどの質疑が行われたが、概ね妥当な回答が得られた。さらに、方法の補足、用語の変更、付図およびその説明の補足など多くの修正すべき点が指摘され、訂正が行われた。

その結果、本論文で得られた結果は今後の歯学の発展に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。