特集 学生の研究活動報告 - 国内学会大会・国際会議参加記 27

第 11 回バイオ関連化学 シンポジウム

河本高志 Koji KAWAMOTO 物質化学専攻修士課程 1年

1. はじめに

2017年9月7日から9日にかけて東京大学弥生キャンパスにて開催された「第11回バイオ関連化学シンポジウム」に参加した.

そして、「チタン結合部および細胞認識部位を有するペプチドナノファイバーによるチタン表面の修飾」をテーマにポスター発表を行った.

2. 研究背景

インプラントはデンタルインプラントをはじめ、 骨折やリュウマチ等の治療で骨を固定するボルト、 人工関節などの整形外科インプラントにおいて利用 されている。また、インプラントの材料としては生 体適合性が高く、軽量、耐腐食性、強靭性といった 性質をもつ純チタンやチタン合金がよく使用され、 今ではごく一般的に行われる治療法の一つとなって いる。

しかしながら、術後のインプラントの緩みや炎症、感染症のリスクがあり、1980年から2005年にかけてアメリカで行われた調査では歯周病や糖尿病を患っていない健康な人の内3~10%の人が治療に失敗している

そこで、高分子や細胞外マトリックスである I 型コラーゲンやフィブロネクチンなどを利用して早期オッセオインテグレーション(チタンと骨の結合)、より強固な結合を目指して種々の取り組みがなされている。我々は、線維状集合体を形成するアミノ酸配列の両端に、チタン、細胞と特異的に結合する配列を導入したペプチドを用いてインプラントの問題解決を試みた。

3. 実験方法

疎水性残基をもつアミノ酸と親水性残基をもつアミノ酸を交互に配列し、安定的に線維状集合体を形成するペプチド配列を用い、両端にスペーサーとして Aeea(2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール)を設けて、C 末端に細胞と特異的に結合する配列 (Arg-Gly-Asp)、N 末端にチタンと特異的に結合する配列 (His-Lys-His)を修飾した(図1).他に、比較実験のためにチタン結合性部位のみを修飾したペプチドと、細胞認識部位のみをもつペプチドを用意して二次構造・形態評価を行った。また、このペプチドをチタン基板表面へ被膜させて結合率を求めた.

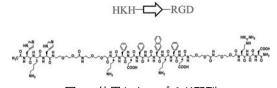


図1 使用したペプチド配列

4. 結果・考察

超純水溶媒中でペプチドを集合化させると、チタン結合性部位をもつペプチドが粒状の集合体となり、目的の線維状集合体形成に至らなかった(図2).

原因としては、ヒスチジンとリシンがそれぞれ正 電荷をもっており、静電反発を引き起こして線維状 集合体形成を阻害したと考えられる.

そこで、リン酸ナトリウム緩衝液を利用して pH 調整することにより集合体の形態制御を試みた.

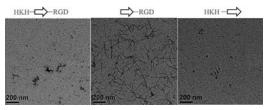
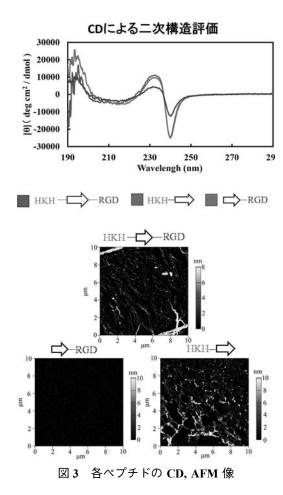


図2 超純水溶媒で集合化させたペプチドの TEM像



pH 3, 5, 7, 9, 11 に調製したリン酸ナトリウム緩衝液中で集合化させた結果, pH 9 において安定的に線維状集合体が得られた。CD(円二色性スペクトル)の二次構造評価より、197,218 nm 付近に正と負のピークが見られたことから β シート構造であると確認した。また、AFM(原子間力顕微鏡)による形態観察より、チタン結合性部位をもつペプチドのチタン表面への線維状集合体の結合を確認した(図 3).

次に、pH9に調整したリン酸ナトリウム緩衝液中で集合化させたペプチド溶液を一定量、チタン基板表面へ乗せた.1時間放置した後に上澄み液を回収してHPLC(高速液体クロマトグラフィー)の分析カラムを用いてピーク面積を求めた。また、チタ

表1 各ペプチドのチタン基板表面への結合率

	ペプチド結合率 (%)
HKH—□ RGD	29 ± 5
нкн—🖒	79 ± 9
□ RGD	5 ± 3

ン基板表面へ被膜させていないペプチド溶液も分析し、ピーク面積の比より結合率を算出した. チタン結合性部位のみをもつペプチドの結合率は高く、細胞認識部位のみをもつペプチドは限定的な結合を示した(表1). チタン結合性部位と細胞認識部位の両方をもつペプチドの結合率はチタン結合性部位のみをもつペプチドと比べて低くなった. これは、pH9の溶液中において RGD 配列と、チタン基板表面が負に荷電していると考えられ、静電反発を引き起こして結合が阻害されていると考える.

まとめ

pH 調整によりチタン結合性部位と細胞認識部位を有するペプチドを安定的に線維状へと集合化させることに成功した. また, ペプチドのチタン表面への被膜実験によりチタン結合性配列の有効性を確認した.

今後は、混合ペプチドを用いたチタン表面への結合評価、XPS装置やゼータ電位測定によってチタン表面への結合性評価、細胞との結合実験を予定している。

6. おわりに

幸せなことに、多くの方にポスターを見ていただき、質問をいただいた。その中で、新たなアイディアを頂き、反省すべき点も見つかった。今後の研究の糧となるように、深く受け止めたい。

最後に,研究指導いただいた富崎欣也教授,研究 室の皆様に厚くお礼申し上げます.