

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 14 日

2020 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## (2) 研究成果の概要

課題名	歯髄創傷治癒を促進するペプチド医薬品の開発		
研究代表者	氏名	高橋 雄介	
	所属機関名・部局名	大阪大学・歯学部附属病院	
	職名	講師	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	鈴木 守 准教授		
<p>われわれがこれまでに同定した、歯髄創傷治癒を促進する分子の一つである Protein S100A7(以下 S100A7)はジスルフィド結合を 1 か所持つタンパク質である。そのため通常の大腸菌培養法による精製では正常な立体構造を構築できないためリフォールディングが必要となる。しかし、リフォールディングは一般的に操作が煩雑でタンパク質の収率が低いと言われている。そこでリフォールディングを避けるため、使用する大腸菌株として Origami2 (DE3) Singles Competent Cells を用い、S100A7 の N 末端にチオドレキシン配列を付与することで正常な立体構造を構築することが可能であると考えた。そしてチオドレキシンを付与した S100A7 の精製後に付与されたチオドレキシンを除去するためチオドレキシン配列と S100A7 配列の間に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入し TEV プロテアーゼを作用させ S100A7 のみを精製することを試みた。まず、チオドレキシン-TEV プロテアーゼ認識配列-S100A7 を発現するプラスミドを構築し、大腸菌に形質転換を行い培養した。得られた大腸菌をコバルトレジンをを用いたアフィニティー精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて更に精製を行うことにより一定量のチオドレキシン-TEV プロテアーゼ認識配列-S100A7 の精製に成功した。しかし、そこ TEV プロテアーゼを作用させてもチオドレキシンと S100A7 を切断することができなかった。今後さらに方法の検討が必要であると考えられる。</p> <p>また、MMP-20 によって分解された DMCs 分解産物中から S100A7 は同定されたが、S100A7 が MMP-20 によって分解を受けているかは不明であったことから、歯髄創傷治癒過程において MMP-20 が S100A7 に与える影響を評価するために、直接覆髄実験をおこなった。8 週齢雄性 Wistar 系ラットを対象に、S100A7 のみを PBS 中に溶解させた溶液と S100A7 と MMP-20 を PBS 中にて反応させた溶液を、ゼラチンスポンジに浸漬させたものを用いて直接覆髄をおこない、マイクロ CT による画像解析と病理組織学的評価を実施した。S100A7 単体もしくは MMP-20 と反応させた S100A7 を用いて直接覆髄後、4 週目において形成された第三象牙質の体積をマイクロ CT で定量・比較した結果、いずれの試料間で有意差は認められなかった。また、H-E 染色による病理組織学的評価でも両試料は類似した傾向を示し、歯髄創傷治癒過程における S100A7 の機能に MMP-20 は影響を及ぼさないことが示唆された。</p> <p>TEV プロテアーゼが精製したチオドレキシン-S100A7 に作用しなかった原因として天然変性予測プログラムである PONDR にて解析を行い検討した結果、TEV プロテアーゼ認識配列に対して TEV プロテアーゼのアクセスが困難であることが判明ため、今後はリンカーを付与しプラスミドを再構築するか、グアニジン塩酸塩を用いて TEV プロテアーゼ認識配列をアクセス可能にするか検討中である。また、覆髄実験の結果より S100A7 は MMP-20 の影響を受けずに歯髄に作用し歯髄創傷治癒を促進していることが示唆されたため、今後は MMP-20 を考慮せず、S100A7 の解析をおこなっていく予定である。</p>			