

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592670

研究課題名（和文） 人工的石灰化ナノ粒子合成と歯石沈着モデルの確立

研究課題名（英文） Establishment of artificial synthesis of Nano bacteria and dental calculus

研究代表者 野村 義明 (Yoshiaki Nomura)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587

研究成果の概要（和文）：

ウシ血清中では、ナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質はすべてハイドロオキシアパタイト強く結合し、一種類のみがハイドロオキシアパタイトに陽イオン結合し、残りのタンパク質はハイドロオキシアパタイトにアフィニティー結合していた。ハイドロオキシアパタイトに対して陽イオン結合しているタンパク質の単離精製に成功した。残りのタンパク質はゲル濾過クロマトグラフィーにより分離を試みたがその電気泳動像は必ずしも分子量に従って分離されなかった。

研究成果の概要（英文）：

We tried to purify the proteins that react to the monoclonal antibody for the Nano bacteria from the bovine serum. These proteins strongly bind to the hydroxyapatite. Among these proteins, one of them binds to hydroxyapatite by cationic reactions and others are bind to hydroxyapatite by affinity reactions for the calcium. We success in the purification of the protein that bind to hydroxyapatite by cationic reactions. By the gel filtration chromatography, other proteins that bind to the hydroxyapatite by affinity reactions for the calcium were collected in fixed fractions, however, we could not single out these proteins. By the mass analysis, these proteins included the components of the common fatty acid complexes that related to the life style diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2010年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2011年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：石灰化、ナノ粒子、歯学、社会医学

1. 研究開始当初の背景

ナノバクテリアは生体内での異所性石灰化に関与する生命体として発見された。しかし、実験結果の再現性が乏しく生命体であることは否定された。さらにナノバクテリアのモノクロナール抗体に反応するタンパク質が同定されたが、これらのタンパク質が何らかの形で生体内での異所性石灰化に関与している可能性が高いため、ナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質の精製、同定を試みた、

2. 研究の目的

ナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質の精製および同定。

3. 研究の方法

ウシ血清を用いて様々なクロマトグラフィーの手法でナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質の精製を行った。用いたクロマトグラフィーの方法は陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシパタイトクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー（ヘパリンカラム、Chibaclone Blue）ゲル濾過クロマトグラフィーである。タンパク質の分析はSDS電気泳動で行い、ナノバクテリアモノクロナール抗体との反応性についてはウエスタンブロットによって確認した。

4. 研究成果

ウシ血清からのナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質の精製を行った。その結果、ナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するウシ血清中のタンパク質はすべてヒドロキシパタイト強く結合する性質を有していた。これらのタンパク質のうち種類のみがヒドロキシパタイトに陽イオン結合しており、残りのタンパク質はヒドロキシパタイトのカルシウムに対して親和性を有しアフィニティー結合していることが明らかとなった。これらのタンパク質のうちヒドロキシパタイトに対して陽イオン結合しているタンパク質の単離精製に成功した(図1)。残りのタンパク質はすべて陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂をはじめとする市販の様々なクロマトグラフィー用の樹脂に対して同一の性質を示しこれらの樹脂を用いたクロマトグラフィーによる単離は不可能であった。また、これらのタンパク質はヒドロキシパタイトを用いたクロマトグラフィーにおいても高濃度のリン酸を使用しないと流出せず、ヒドロキシパタイトに対する結合力が強力であることが明らかとな

った。

分子量を基準に分離できるゲル濾過クロマトグラフィーにより分離を試みたところナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質は一定のフラクションに集中して回収され、そのフラクションのSDS電気泳動像は必ずしも分子量に従って分離された泳動像ではなかった(図2)。このことから、ナノバクテリア抗体に反応するタンパク質のうちヒドロキシパタイトに対してアフィニティー結合するタンパク質はウシ血清内では単一のタンパク質ではなく複合体として存在していることが示唆された。

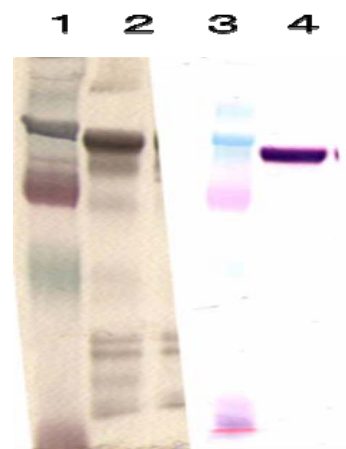


図1 単離に成功したナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質

1, 3 分子量マーカー

2 SDS電気泳動像 (銀染色)

4 一次抗体にナノバクテリアモノクロナール抗体を用いたウエスタンブロット像

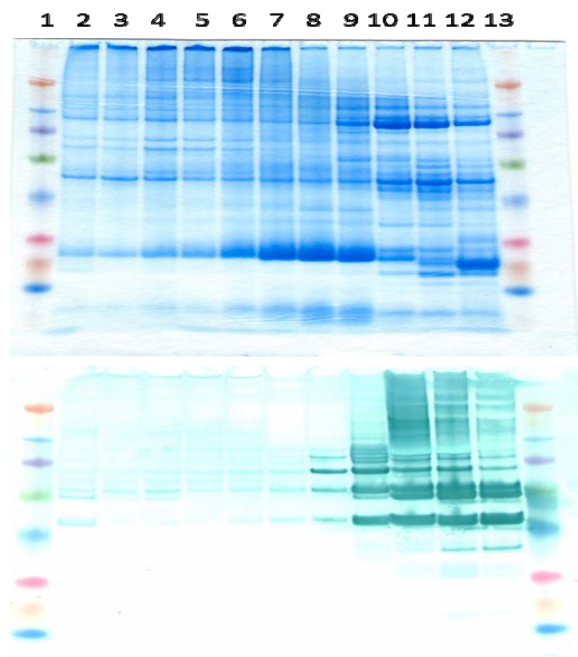


図 2 ハイドロオキシアパタイトにアフィニティー結合したタンパク質のゲル濾過による分離像

上段: SDS 電気泳動像 (クマシーブルー染色)
下段: 一次抗体にナノバクテリアモノクロナール抗体を用いたウエスタンブロット像
列の番号が大きくなるほど溶出時間が長い (分子量が小さい) しかし、上段の SDS 電気泳動像から必ずしも分子量に従って分離されているわけではない。

そこで SDS 電気泳動ゲルから切り出しを行い質量分析によりタンパク質の同定を試みたところ、これらのタンパク質の一部は日と血清中にも存在する脂質複合体の一部であることが明らかとなった(図 3)。

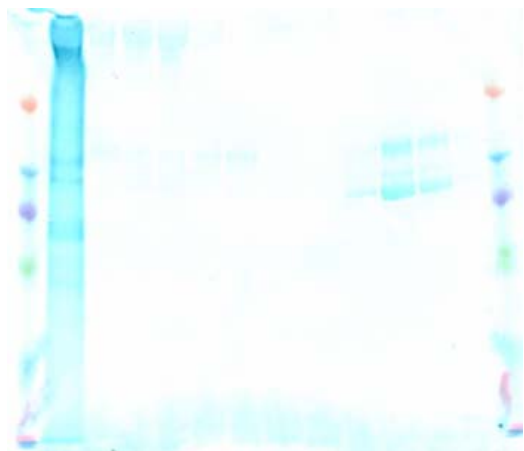


図 3
図 2 と同じサンプルの脂質複合体に対するモノクロナール抗体によるウエスタンブロット像

左端はポジティブコントロール
ナノバクテリアモノクロナール抗体に反応性が強いサンプルほど脂質複合体モノクロナール抗体に対する反応性も強い。

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 5 件)

1: *Streptococcus troglodytae* sp. nov., from the Chimpanzee Oral Cavity. Okamoto M, Imai S, Miyanohara M, Saito W, Momoi Y, Abo T, Nomura Y, Ikawa T, Ogawa T, Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Watanabe A, Watanabe S, Hayashi M, Tomonaga M, Hanada N. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012 Mar 23. [Epub ahead of print]

2: Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Y, Sanggarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, Noda K, Takano Y, Nakamura Y, Hanada N. *Histochem Cell Biol*. 2012 Feb 11. [Epub ahead of print]

3: Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. Nomura Y, Shimada Y, Hanada N, Numabe Y, Kamoi K, Sato T, Gomi K, Arai T, Inagaki K, Fukuda M, Noguchi T, Yoshie H. *Arch Oral Biol*. 2012 Apr;57(4):413-20..

4: HSPA1A is upregulated in periodontal ligament at early stage of tooth movement in rats. Arai C, Nomura Y, Ishikawa M, Noda K, Choi JW, Yashiro Y, Hanada N, Nakamura Y. *Histochem Cell Biol*. 2010 Oct;134(4):337-43.

5: Mechanism of active eruption of molars in adolescent rats. Oikawa T, Nomura Y, Arai C, Noda K, Hanada N, Nakamura Y. *Eur J Orthod*. 2011 Jun;33(3):221-7.

[学会発表] (計 7 件)

1. 第 61 回日本口腔衛生学会総会、横須賀市、口腔衛生学会雑誌 62 巻 2 号 Page245 (2012. 04) iPS 細胞の安全性に関する検討 第 2 報 核型異常について、野村義明, 石川美佐緒, 新井千博, 八城祐一, 野田晃司, 山口貴央, 阿保備子, 角田衣理加, 山田秀則, 今井奨, 中村芳樹, 花田信弘

2. 第 60 回日本口腔衛生学会総会、松戸市、口腔衛生学会雑誌 61 巻 4 号 Page481 (2011. 08) iPS 細胞の安全性に関する検討、野村義明, 石川美佐緒, 新井千博, 八城祐一, 野田晃司, 山口貴央, 阿保備子, 角田衣理加, 山田秀則, 今井奨, 中村芳樹, 花田信弘

3. 第 60 回日本口腔衛生学会総会、松戸市、口腔衛生学会雑誌(0023-2831)61 巻 4 号 Page435(2011. 08) チンパンジー口腔由来のレンサ球菌の性状に関する研究 宮之原真由, 今井奨, 齋藤渉, 山口貴央, 阿保備子, 野村義明, 桃井保子, 花田信弘

4. 第 60 回日本口腔衛生学会総会、松戸市、口腔衛生学会雑誌(0023-2831)61 巻 4 号 Page454(2011. 08) 唾液検査を用いた歯周病検診受診者の意識と行動の調査 花田信弘, 矢吹義秀, 小林憲司, 古藤真実, 福澤

洋一, 谷村秀樹, 中曾根隆一, 野村義明

5. 第53回歯科基礎医学会総会、岐阜市、
Journal of Oral Biosciences 53 卷 Suppl.
Page152 (2011.09)、ヒト歯根膜線維芽細胞
からの iPS 細胞の樹立 石川美佐緒, 野村義明,
八城祐一, 新井千博, 山口貴央, 村田
貴俊, 野田晃司, 石川雄一, 花田信弘, 中
村芳樹

6. 第53回歯科基礎医学会総会、岐阜市、
Journal of Oral Biosciences 53 卷 Suppl.
Page157(2011.09) ムタナーゼとデキストラ
ナーゼ両遺伝子の連結によるバイオフィル
ムの分解 角田衣理加, 野村義明, 村田貴
俊, 今井奨, 津守秀明, 花田信弘

7. 第53回歯科基礎医学会総会、岐阜市、
Journal of Oral Biosciences(1349-0079)53
卷 Suppl. Page126(2011.09) Ca9-22 細胞への
硫化水素暴露により発現が上昇する PHLDA1
村田貴俊, 角田衣理加, 野村義明, 今井奨,
花田信弘

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村義明 (Yoshiaki Nomura)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587

(2) 研究分担者

花田信弘 (Nobuhiro Hanada)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

(3) 連携研究者

なし