

学位論文題名

ウシ骨基質からの高リジントタンパク質の発見と
その細胞接着能の確認

学位論文内容の要旨

緒言

骨・歯等いわゆる硬組織（又は石灰化組織）がどのような機構によってミネラルイオンを沈着し結晶化するかについては、まだ十分には解明されていない。現在までに生物学的石灰化機構を説明するために次のような説が提案されている。すなわち、硬組織が形成されるには、(1) 基質（コラーゲンと非コラーゲン性タンパク質）の分泌・沈着、(2) 基質の修飾、(3) ミネラルイオンの沈着という少なくとも三段階を経過すると仮定する、いわゆる三段階説である。生物学的石灰化は細胞、基質、ミネラルイオン及び制御因子の四大要素が有機的に組み合わさって進行すると考えられる。石灰化機構を解明するために、著者は以上のような考えのもとで骨の各種基質タンパク質の分離・精製を行い、それらの構造と機能に関して研究してきた。その結果、基質タンパク質の主成分の一つであるオステオカルシンの精製法を開発する過程において、未同定の分子量18,000のタンパク質（以下18 Kタンパク質と呼ぶ）を見出した。本論文では、18 Kタンパク質の構造と機能を解明するためにそのアミノ酸配列、分布、コラーゲンとの親和性、細胞接着能ならびに骨芽細胞の増殖分化への影響を調べ、18 Kタンパク質が骨芽細胞の増殖と分化に深く関与することを明らかにした。

材料と方法

精製 ウシの骨粉を塩酸（pH 2）で脱灰後脱灰液をトリスで中和し、吸引濾過して、上清（Tris-sup）を集めた。次にTris-supからSephacryl S-200カラムと逆相高速液体クロマトグラフィーで18 Kタンパク質を

精製した。

構造の分析 18 Kタンパク質をアミノ酸分析計で分析した。部分アミノ酸配列の決定は気相自動アミノ酸配列決定装置を用いて行った。

分布の分析 通法に従って抗18 Kタンパク質抗体を作成し、ヒトの皮膚線維芽細胞（線維芽細胞）、ヒトとラットの骨・歯において18 Kタンパク質の局在性を調べた。

機能の分析 (1) コラーゲンとの親和性の分析： 骨不溶性コラーゲンを用い、コラーゲンカラムを作成した。親和性は溶出塩濃度で評価した。

(2) 細胞接着能の測定： 骨芽細胞様細胞MC3T3-E1（E1細胞）と線維芽細胞を用いて通法に従って行った。

(3) 細胞増殖能の測定： 血清の存在下で細胞を付着させた後、無血清の条件下で18 Kタンパク質を添加し、3日間培養した。細胞増殖能は細胞のDNA量で評価した。

(4) 細胞分化能の測定： 細胞分化能は以下の二種培養法を用いてDNA量あたりのアルカリフォスファターゼ（ALP）活性で評価した。

a) 平板培養： 血清の存在下でコンフルエント後10日目まで培養して、無血清の条件下で18 Kタンパク質を添加し、さらに3日間培養した。

b) コラーゲングル内培養： 18 Kタンパク質を含むコラーゲン溶液を細胞と混合後、加温・ゲル化させた。血清の存在下で35日間培養した。

結果と考察

精製について Tris-supには18 Kタンパク質が主成分であった。精製した18 Kタンパク質は非還元、還元下いずれも単一なバンドとして認められた。18 Kタンパク質は骨非コラーゲン性タンパク質の少なくとも0.02%を占めた。従来のエチレンジアミン酢酸四ナトリウムを用いた抽出法等によると多量に存在する他のタンパク質の陰にかくれて18 Kタンパク質は見過ごされてきたが、今回用いた抽出法ではその存在が注目されるようになった。

構造について。アミノ酸分析の結果により18 Kタンパク質はリジン残基が多く(19.4%)、現在まで知られている骨の基質タンパク質とは異なり、ヒストン等の核内タンパク質と類似している。しかし、このタンパク質は、アミノ酸配列データバンクで検索した結果、ヒストン等のタンパク質とホモロジーがなかったことから新しいタイプのタンパク質である可能性が高い。

分布について。18 Kタンパク質は、骨芽細胞・類骨・象牙芽細胞・象牙前質に検出されたことから細胞外の基質タンパク質のひとつであり、骨芽細胞と象牙芽細胞によって合成されると考えられる。18 Kタンパク質は抗ウシ血清タンパク質抗体と反応しなかったので血液由来のタンパク質ではないと言える。又、線維芽細胞とその基質に検出されなかったことから、18 Kタンパク質は骨と象牙質に特有である可能性がある。

機能について (1) コラーゲンとの親和性：コラーゲンとの親和性はオステオカルシン等骨の主な非コラーゲンタンパク質のうち、18 Kタンパク質が最も高かった。コラーゲンは骨基質の主成分で他のタンパク質や細胞と相互作用すると報告されているので、18 Kタンパク質が骨コラーゲンと結合し、その上で他のタンパク質や細胞との相互作用を調節している可能性がある。

(2) 細胞接着能：18 Kタンパク質はE1細胞又は線維芽細胞の接着を促進した。この接着はアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン合成ペプチドによって阻害されなかったのでインテグリンタイプのレセプターに依存しないと考えられる。しかし、リジンのポリマーも細胞接着を促進したので18 Kタンパク質の細胞接着能は単に豊富なリジンを介してなされているのかもしれない。

(3) 細胞の増殖・分化：E1細胞の増殖期に18 Kタンパク質を加えた場合は、DNA量が上昇した。一方、分化期に18 Kタンパク質を加えた場合はDNA量は変化せず、ALP活性を有意に増加させた。又、骨芽細胞の形態をよく維持でき、生体内の環境に近いコラーゲングル内の培養においても18 Kタンパク質の添加でALP活性が増加した。こ

のことから18 Kタンパク質は骨芽細胞の増殖分化因子として重要な働きがあることがわかった。

結論

1) 18 Kタンパク質をウシの骨から精製し、その一次構造を調べた結果、このタンパク質は新しい、リジンに富むタンパク質である可能性があることがわかった。

2) 18 Kタンパク質は骨不溶性コラーゲンに対し強い親和性を示した。

3) 18 Kタンパク質はマウス骨由来の骨芽細胞様細胞MC3T3-E1やヒト皮膚線維芽細胞の接着を促進した。その接着は細胞接着に必要なアルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列に依存しなかった。

4) 18 Kタンパク質はMC3T3-E1の増殖期にDNA量を、分化期にアルカリフォスファターゼ活性を増加させ、骨芽細胞の増殖と分化に深く関与することがわかった。

5) 組織免疫染色の結果、18 Kタンパク質は、骨芽細胞・類骨・象牙芽細胞・象牙前質に検出されたので骨・象牙質の細胞外基質タンパク質の一つであり、骨芽細胞と象牙芽細胞によって合成されることが考えられる。又、ヒト皮膚や血液から検出されなかったので18 Kタンパク質は骨と象牙質に特有である可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査 教授 久保木 芳 徳
副査 教授 雨 宮 璋
副査 教授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

ウシ骨基質からの高リジントタンパク質の発見と
その細胞接着能の確認

審査は主査および副査の口頭試問、主査による筆記試験によって、本研究の背景・目的・内容・意義について総合的にされた。論文の内容は次の通りであった。

骨・歯等いわゆる硬組織（又は石灰化組織）がどのような機構によってミネラルイオンを沈着し結晶化するかについては、まだ十分には解明されていない。現在までに生物学的石灰化機構を説明するために次のような説が提案されている。すなわち、硬組織が形成されるには、(1) 基質の分泌・沈着、(2) 基質の修飾、(3) ミネラルイオンの沈着という少なくとも三段階を経過すると仮定する、いわゆる三段階説である。生物学的石灰化は細胞、基質、ミネラルイオン及び制御因子の四大要素が有機的に組み合わさって進行すると考えられる。石灰化機構を解明するために、著者は以上のような考えのもとで骨の各種基質タンパク質の分離・精製を行い、それらの構造と機能に関して研究してきた。その結果、基質タンパク質の主成分の一つであるオステオカルシンの精製法を開発する過程において、未同定の分子量18,000のタンパク質（18 Kタンパク質）を見出した。本論文では、18 Kタンパク質の構造と機能を解明するためにそのアミノ酸配列、分布、コラーゲンとの親和性、細胞接着能ならびに骨

芽細胞の増殖分化への影響を調べた。

実験は次の方法で行った。

精製 ウシの骨粉を塩酸 (pH 2) で脱灰後脱灰液をトリスで中和し、吸引濾過して、上清を集めた。次に上清から Sephacryl S-200 カラムと逆相高速液体クロマトグラフィーで 18 K タンパク質を精製した。

構造の分析 18 K タンパク質をアミノ酸分析計で分析した。部分アミノ酸配列の決定は気相自動アミノ酸配列決定装置を用いて行った。

分布の分析 通法に従って抗 18 K タンパク質抗体を作成し、ヒトの皮膚線維芽細胞、ヒトとラットの骨・歯において 18 K タンパク質の局在性を調べた。

機能の分析 (1) コラーゲンとの親和性の分析：骨不溶性コラーゲンをうい、コラーゲンカラムを作成した。親和性は溶出塩濃度で評価した。

(2) 細胞接着能の測定：骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 とヒト皮膚線維芽細胞を用いて通法に従って行った。

(3) 細胞増殖能の測定：血清の存在下で細胞を付着させた後、無血清の条件下で 18 K タンパク質を添加し、3日間培養した。細胞増殖能は細胞の DNA 量で評価した。

(4) 細胞分化能の測定：細胞分化能は以下の二種培養法を用いて DNA 量あたりのアルカリフォスファターゼ活性で評価した。a) 平板培養：血清の存在下でコンフルエント後 10 日目まで培養して、無血清の条件下で 18 K タンパク質を添加し、さらに 3日間培養した。b) コラーゲンゲル内培養：18 K タンパク質を含むコラーゲン溶液を細胞と混合後、加温・ゲル化させた。血清の存在下で 35日間培養した。

その結果、次のことが明らかになった。

1) 18 K タンパク質をウシの骨から精製し、その一次構造を調べた結果、このタンパク質は新しい、リジンに富むタンパク質である可能性があることがわかった。

2) 18 K タンパク質は骨不溶性コラーゲンに対し強い親和性を示した。

した。

3) 18 Kタンパク質はマウス骨由来の骨芽細胞様細胞MC3T3-E1やヒト皮膚線維芽細胞の接着を促進した。その接着は細胞接着に必要なアルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列に依存しなかった。

4) 18 Kタンパク質はMC3T3-E1の増殖期にDNA量を、分化期にアルカリフォスファターゼ活性を増加させ、骨芽細胞の増殖と分化に深く関与することがわかった。

5) 組織免疫染色の結果、18 Kタンパク質は、骨芽細胞・類骨・象牙芽細胞・象牙前質に検出されたので骨・象牙質の細胞外基質タンパク質の一つであり、骨芽細胞と象牙芽細胞によって合成されると考えられる。又、ヒト皮膚や血液から検出されなかったので18 Kタンパク質は骨と象牙質に特有である可能性がある。

本論文に対し、主査および副査から本研究につき、詳細な質問が行われ、更に主査による筆記試験がなされたが、いずれについても適切、明確な回答が得られた。又、今後の研究の進め方についても適切な説明が得られ、専門分野ならびに関連分野に対する見識も十分であることが認められた。

従って、本論文提出者は博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。