

学 位 論 文 題 名

Electrophoretic gels of dentin matrixproteins as diffusion media
for *in vitro* mineralization.

(電気泳動ゲルを用いた試験管内石灰化系による象牙室マトリクス蛋白の研究)

学位論文内容の要旨

目 的

硬組織の石灰化は多くのマトリクス蛋白質によってコントロールされている。その中でI型コラーゲンは最も豊富なマトリクス蛋白であり線維化することによりギャップゾーンを形成しリン酸カルシウム結晶沈着の起始点となる。一方で骨グラ蛋白 (BGP)、オステオネクチン、象牙質ホスホホリンなどの酸性非コラーゲン蛋白は結晶の形成、成長を制御していると考えられている。

例えばBGPは分子量6000のタンパク質で、分子内にグルタミン酸がカルボキシル化されたGlaを3残基持ちカルシウムイオンを結合することにより石灰化に関与すると考えられている。又、象牙質の主要な非コラーゲン蛋白であるホスホホリンはアスパラギン酸とホスホセリンの繰り返し構造からなる酸性リン蛋白である。硬組織の非コラーゲン蛋白は酸性アミノ酸に富むものが多く、コラーゲンやハイドロキシアパタイトに結合し結晶の特定の面に吸着することにより結晶の形態を修飾すると考えられている。

従来、石灰化の研究のために試験管内実験系が用いられてきた。試験管内石灰化には主に溶液で行なうもの、アガロース、ゼラチンなどのゲル中で行なうものがある。例えばTermineらはタンパク質を溶解したバッファー中でリン酸カルシウムを形成させモニタリングすることにより蛋白の石灰化に対する効果を調べた。又、Boskeyらはタンパク質を含むゼラチンゲル中でリン酸カルシウムを形成させタンパク質の機能を調べた。従来の方法では必要とするタンパク質の量が多く、複数のタンパク質を含む画分から石灰化に影響を与えるタンパク質を検出することは不可能だった。我々はポリアクリルアミド電気泳動ゲルを石灰化の場として用いた簡単迅速な試験管内石灰化システムを開発し石灰化メカニズムに骨の非コラーゲン蛋白がどのように関与しているかを明らかにした (Jpn J Oral Biol, 1993)。本研究ではさらに象牙室の非コラーゲン蛋白の石灰化に対する機能を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

ラット象牙質より軟組織を除き粉碎し0.5MEDTAで脱灰抽出した混合マトリクス蛋白とカラムクロマトグラフィーにより精製した蛋白質を試料として用いた。又象牙質脱灰抽出物からKubokiらのカルシウム沈澱法によりホスホホリンを除いた画分をカルシウムスープとして用いた。

先ずSDS12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いゲルを10%スルホサリチル酸で固定した。ゲルをバッファーで洗った後、更に次の二つの方法でゲル内にリン酸カルシウムを形成した。

1、自然拡散法；ゲルを20mM第二リン酸カリウム、165mM塩化カリウム10mMHEPESバッファーpH 7.4で30分室温でインキュベートした後、20mM塩化カルシウム、165mM塩化カリウム、10mM HEPESバッファーpH 7.4でインキュベートした。

2、電気拡散法；上記の2つのバッファーを含浸させた、濾紙（0.8-1.0mm）でゲルを挟みセミドライプロットティング装置で5mA、5分間通電した。

この時点でゲルは肉眼で白濁した。形成されたリン酸カルシウムを可視化するためにアリザリンレッドSで染色しタンパク質をクーマジープリリアントブルー、ステインズオールで染色したものと比較し観察した。更にタンパク質を含む部位のゲルを切り出し残ったカルシウムイオンとリン酸イオンを除くため蒸留水で洗った後凍結乾燥した。ゲルの重量を測定した後、6%酢酸で脱灰した後、ゲル内のカルシウム量とリン量を各々OCPC法、Fiske Subbarow法で測定した。更に、象牙質ホスホホリンの脱リン酸化を行いその石灰化に対する効果を調べた。脱リン酸化はホスホホリンを 10Uウシ腸アルカリホスファターゼを含む0.1MTris-HCl, pH8.2, バッファー中でインキュベートすることにより行ない、78%のリン酸が除かれた。ゲル内のリン酸カルシウム結晶を走査型電顕で観察しX線回折を行った。データはt検定により統計処理をした。

結果

2つの方法により形成されたリン酸カルシウムはアリザリンレッドにより強く染色された。アリザリンレッドにより染色された部位はリン酸カルシウム形成の促進、染色されない部位は抑制が起こっていると考えられた。ゲルの横断面を観察すると自然拡散法のゲルではリン酸カルシウムはゲルの表面に形成され、電気拡散法ではゲルの内部に形成された。

予備実験としてタンパク質を含まないゲルを用いると、リン酸カルシウムの形成量は自然拡散法においては10mM以上ではカルシウムとリンの濃度積に依存して増加し、電気拡散法では通電時間にはほぼ比例した。リン酸カルシウム結晶の形成はゲル内の蛋白質存在部位に応じて促進又は抑制された。既知の非コラーゲン蛋白の中で象牙質ホスホホリンはリン酸カルシウム形成を促進した。又、ラット象牙質のカルシウムスープの60KDaの未同定のバンドで抑制が見られた。

生化学的測定では、ホスホホリンは自然拡散法でリン酸カルシウム形成を濃度依存的に促進した。1週間のタイムコースにおいても同様であった。ゲル内に形成されたリン酸カルシウム結晶はSEMで径30 μ m程度の結晶の球状の集合体として観察され、X線回折により結晶はヒドロキシアパタイトであることが示唆された。ホスホホリンの脱リン酸化によりその石灰化に対する効果は減少した。

考察と結論

本法では自然的、又は電氣的な力でカルシウムイオンやリン酸イオンがゲル中を拡散し電気泳動されたタンパク質と反応することによりリン酸カルシウム形成のコントラストができたと考えられる。従来行なわれてきた石灰化システムと比

較して本法はタンパク質を電気泳動したポリアクリルアミドゲルを石灰化の媒体として用いることにより複数のマトリクス蛋白質の混在した画分より石灰化阻害能、又は石灰化促進能を有する蛋白質をスクリーニングし、検出することが可能となった。溶液を用いた系と比較してもゲルを用いた系はカルシウムイオンとリン酸イオンがゲルのマトリックスを拡散することによりより生理的条件に近いと考えられる。

又、以前の著者らの骨のマトリクス蛋白を用いた研究ではBGP、オステオネクチンは石灰化抑制能を示したが象牙室のマトリクス蛋白ではホスホリンは石灰化促進能を持つことがわかった。そして石灰化に対する機能においてリン酸基などのカルシウムイオンを結合する構造が重要であることがわかった。ラット象牙質カルシウムスープの60KDaの石灰化を抑制するタンパク質は同定はされなかったが、60KDaのバンドは α 2HS糖タンパクであるかもしれない。

今後の展望として、本法を応用することにより血清や唾液中の石灰化に影響を与える蛋白質を検出することが可能となると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 久保木 芳 徳

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 渡 邊 継 男

学 位 論 文 題 名

Electrophoretic gels of dentin matrixproteins as diffusion media
for *in vitro* mineralization.

(電気泳動ゲルを用いた試験管内石灰化系による象牙室マトリクス蛋白の研究)

審査はいずれの担当者も口頭試問により提出論文の内容とそれに関連した学問分野について行った。

硬組織の石灰化は多くの基質蛋白によって制御されている。コラーゲンは最も豊富な基質蛋白であり線維化しリン酸カルシウム結晶沈着の起始点となる。一方非コラーゲン蛋白は酸性度が強く、コラーゲンに結合し核形成に関与したり、ハイドロキシアパタイト結晶面への吸着で結晶形態を修飾すると考えられている。従来、石灰化研究には溶液中やゲル中に行なう試験管内系が用いられてきた。従来の方法は多量の蛋白を必要とし、複数の蛋白画分から石灰化に影響する蛋白を検出するのは不可能だった。申請者らは以前、電気泳動ゲルを用いた試験管内系を開発し石灰化への骨非コラーゲン蛋白の関与を報告した(Jpn J Oral Biol, 1993)。本研究は更に詳細な実験法の検討と象牙質非コラーゲン蛋白の石灰化に対する機能を明らかにすることを目的としている。

(材料と方法) ラット象牙質EDTA脱灰抽出混合マトリクス蛋白、象牙質の主要な非コラーゲンリン蛋白ホスホホリン及び象牙質脱灰抽出物からカルシウム沈澱法により得られた画分を試料とし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、次の二つの方法でリン酸カルシウムを形成している。

1、自然拡散法；ゲルを20mM第二リン酸カリウムを含むバッファーで30分インキュベートした後、20mM塩化カルシウムを含むバッファーでインキュベートした。

2、電気拡散法；上記の2つのバッファーを含浸させた濾紙でゲルを挟みセミドライブロットティング装置で5mA、5分間通電した。

形成されたリン酸カルシウムをアリザリンレッド染色し蛋白をクーマジーブリリアントブルー、ステインズオール染色したものと比較し、ゲル内の、カルシウム量とリン量を比色定量法で測定している。更にホスホホリンの脱リン酸化を行い石灰化に対する効果を調べ、リン酸カルシウム結晶を走査型電顕で観察している。

(結果) ゲル内のリン酸カルシウムはアリザリンレッドに染色され、染色部はリン酸カルシウム形成の促進、非染色部は抑制が起こっていると考えられた。ゲル横断面を観察すると自然拡散法ではリン酸カルシウムはゲル表面に、電気拡散法ではゲル内部に形成された。

リン酸カルシウムの形成量は自然拡散法ではイオンの濃度積に依存して増加し、電気拡散法では通電時間に比例した。リン酸カルシウム形成はゲル内の蛋白部位で促進、抑制された。ホスホホリンはリン酸カルシウム形成を促進し、カルシウム沈殿後の上清の60KDaの蛋白で抑制が見られた。生化学的測定では、ホスホホリンは自然拡散法でリン酸カルシウム形成を濃度依存的に促進した。脱リン酸化ホスホホリンでは石灰化への効果は減少した。又、リン酸カルシウム結晶は径30 μm の結晶の球状の集合体だった。

(考察と結論) 本法では自然的、電氣的にイオンがゲル中を拡散し蛋白と反応してリン酸カルシウムのコントラストができたと考えられる。以前の申請者らの骨マトリクス蛋白の研究ではBGP、オステオネクチンは石灰化抑制能を示したが、本実験ではホスホホリンは石灰化促進能を示した。又、石灰化にはリン酸基などのカルシウムイオンを結合する構造が重要であることがわかった。カルシウムスープの60KDaの蛋白は $\alpha 2\text{HS}$ 糖蛋白であるかもしれない。

従来の石灰化系と比べ本法は電気泳動ゲルを石灰化の場として用い、複数の蛋白を含む画分より石灰化阻害能、促進能を持つ蛋白の検出を可能とした。溶液系と比較してもゲル系はイオンがゲルのマトリックスを拡散するので生理的条件に近いと考えられる。又、本法を応用することにより血清や唾液中の石灰化に影響を与える蛋白を検出することが可能となると思われる。

質問は(1)本実験に到った経緯と本論文の主張点、(2)自然拡散法と電気拡散法の違いについて、(3)様々な非コラーゲン蛋白の石灰化に対する機能についての文献上の報告について、(4)このような石灰化の促進、抑制のメカニズムについて、など多岐にわたった。石灰化の歴史的背景の説明、本研究の意義、発展、及び関連分野に関する質問にも、満足すべき解答が得られた。以上の結果から、本論文は歯科医学の進歩、発展に寄与するところ大であり、本学位申請者は博士(歯学)の学位を授与されるに十分値するものと認めた。