

学 位 論 文 題 名

Evaluation of susceptibility of dentin phosphoproteins to proteases and heat treatment

(象牙質リンタンパク質のプロテアーゼ及び熱処理に対する感受性の検討)

学位論文内容の要旨

【目的】象牙質ホスホリン(Dentin phosphophoryn, PP)は、象牙質特有の酸性蛋白質である。PP のアミノ酸組成は、きわめて特徴的であり、分子のほとんどがセリン(40~50%)とアスパラギン酸(30~40%)により構成され、実際には、このセリンのほとんどがリン酸化され、ホスホセリンの状態で存在している。骨基質中には、これに類似したタンパク質さえ見いだされていない。PP は、強酸性タンパク質であり、カルシウムイオン、およびハイドロキシアパタイトに対して親和性を持つことから、象牙質の石灰化に重要な役割を果たすと考えられている。

これまでの研究により、歯の成熟に伴い PP が分解を受け、分子量分布が広がること、また、象牙質中に Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) が存在することが示されている。我々は既に、ゲル電気泳動法で高感度染色法を使用し、ラットの PP の成熟変化を示した(Nakajima *et al.*, Jpn. J. Oral Biol., 41: 137-141, 1999)。しかし、PP の分解機構に関しては不明な点が多い。本研究では、PP のプロテアーゼ(MMP-2、トリプシン)及び熱処理に対する感受性を、ゲル電気泳動法で高感度染色法を用いて検討することにより、歯の成熟に伴う PP の分解機構を考察した。MMP-2 は、象牙質中に含まれると考えられている MMPs の代表として、また、トリプシンは PP がリジン、アルギニン残基を含むため、活性の高いプロテアーゼとして使用した。

【材料と方法】材料として、本研究に対し、インフォームドコンセントの得られた患者の第3大臼歯、および、生後2ヵ月齢の Wistar-King 系ラットの切歯を使用した。

ヒト第3大臼歯は、抜歯後、軟組織、歯髄等を機械的に取り除き、歯冠と歯

根に分割した。それぞれの分割片を液体窒素下で粉碎し、TBSにて洗浄後、4M 塩酸グアニジン、さらに、0.5M EDTA にて抽出／脱灰した。これらの抽出／脱灰操作は、すべて低温下（4℃）で、プロテアーゼインヒビターを併用して行った。それぞれの EDTA 抽出物を電気泳動後、ゲルを高感度染色法で分析した。

高感度染色法とは、電気泳動後のゲルをアルシアンブルー染色後、続けて銀染色を行う二重染色法であり、従来、非常に染色しにくかった酸性タンパク質を ng のオーダーまで検出できる染色法である (Nakajima *et al.*, 1999)。

また、ラット切歯より同様に、EDTA 抽出物を抽出し、イオン交換クロマトグラフィーにより PP のみを分離した。酵素的分解として、ヒトリコンビナント MMP-2、又は、トリプシンとラット PP を 37℃で 4 時間、又は、15 時間インキュベートし、非酵素的分解として、ラット PP を 60℃で 24 時間インキュベートした。それぞれのサンプルを電気泳動後、ゲルを高感度染色法で分析した。

【結果】ラットとヒトの EDTA 抽出物を比較すると、ラットでは明確なバンド（74K, 70K）が形成されているが、ヒトでは明確なバンドは確認できず、散漫性の染色性を示した(70~30K)。ヒト第 3 大臼歯の EDTA 抽出物を比較すると、双方とも散漫性の染色性を示した。染色性のピークは 67K に見られ、なだらかに低分子量側へシフトしていた。歯冠と歯根を比較すると、歯冠の方が歯根より分子量分布が、低分子量側へシフトしていた。

イオン交換クロマトグラフィーにより分離したラット PP のバンドは、74K, 70K に見られた。酵素的分解のサンプルは MMP-2、トリプシンとも主要なバンドに変化は無く PP の分解は見られなかった。非酵素的分解のサンプルでは主要なバンドは形成されず、広範に散漫性の染色性を示し(94~20K)、PP の分解が見られた。

【考察】本研究で、PP であると判断したバンドおよび散漫性の染色性は、銀染色単独では染まらず、二重染色法では染色された。また、過去のさまざまな研究報告と分子量分布が一致した。そのため、これらのバンドおよび散漫性の染色性が PP であると判断した。

ラットとヒトの EDTA 抽出物を比較すると、ラットでは明確なバンドが形成されているが、ヒトでは明確なバンドは確認できず、散漫性の染色性を示した。これは、ヒト PP の分解を示唆するものである。また、ヒト第 3 大臼歯の EDTA 抽出物を比較すると、歯冠の方が歯根より分子量分布が、低分子量側へシフトしていた。歯冠、歯根とも同じ条件で処理し、各ステップにプロテアーゼイン

ヒビターを使用したことを考えると、この違いは、歯冠の方が歯根より早く形成されたためであり、ヒト象牙質基質蛋白質が、in vivo で分解を受けることを示している。

また、酵素的分解のサンプルは MMP-2、トリプシンとも主要なバンドに変化は無く PP の分解は見られなかった。PP はプロテアーゼに耐性を示し、これは、PP がホスホセリン残基を多く含有し、ホスホセリン残基がプロテアーゼのリジン、アルギニン残基への接近を阻止しているためだと考えられる。

我々は、ヒト歯冠部の PP が高度な分解を受けることを確認した。今回、ラット PP で、MMP-2 を用いてヒト歯冠部の PP の様な高度な分解を作り出すことは出来なかった。MMP-2 は、in vitro において、PP を散漫性の染色性を示すまでには分解出来ないと考えられる。

一方、熱処理後のラット PP の泳動パターンは、ヒト歯冠部の PP の泳動パターンと非常に良く似ていた。そのため、PP の分解は、非酵素的分解が中心であると考えられる。非酵素的分解の最も適当なプロセスは β 脱離反応である。 β 脱離反応は、ホスホセリンを多く含むタンパク質に起こりやすい。 β 脱離反応は、中性 pH ではゆっくりと進行するが、象牙質の長い成熟過程に於いて、カルシウムイオンの蓄積を伴い重要なレベルに達すると考えられる。PP は、石灰化の潜在的なインヒビターと考えられているので、その分解は、象牙質の成熟過程におけるハイドロキシアパタイトの結晶成長を促進すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 森 田 学

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Evaluation of susceptibility of dentin phosphoproteins to proteases and heat treatment

(象牙質リントタンパク質のプロテアーゼ及び熱処理に対する感受性の検討)

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

象牙質には、有機成分として象牙質リントタンパク質 (Dentin phosphophoryn, PP) と呼ばれる特徴的なタンパク質が存在する。この PP は、アミノ酸組成の大部分がセリンとアスパラギン酸であり、またセリンのほとんどがリン酸化された強酸性タンパク質である。PP はカルシウムイオン、およびハイドロキシアパタイトに対して親和性を持つことから、象牙質の石灰化に重要な役割を果たすと考えられている。これまでの研究により、歯の成熟に伴いその分子量分布が広がることから PP が分解を受けていることが示されているが、この分解機構に関しては不明な点が多かった。

本研究では、この PP についてプロテアーゼ及び熱処理に対する感受性を、高感度染色法を用いた解析を行った。ヒトの PP は、インフォームドコンセントの得られた患者の第 3 大臼歯を歯冠と歯根に分割し、4M 塩酸グアニジン、0.5M EDTA による抽出／脱灰操作によりサンプルを得た。得られたサンプルは、電気泳動の後、学位申請者らによって開発された高感度染色法により分析した。高感度染色法とは、電気泳動後のゲルをアルシアンブルー染色後、続けて銀染色を行う二重染色法であり、従来、非常に染色しにくかった酸性タンパク質を ng のオーダーまで検出できる染色法である。ラット PP は、生後 2 ヶ月齢の Wistar-King 系ラットの切歯より、ヒトと同様に EDTA による抽出を行い、さらにイオン交換クロマトグラフィーを用いて PP 分画を得た。これら抽出／脱灰操作はすべて低温下 (4℃) で、プロテアーゼインヒビターを併用して行った。酵素的分解として、ヒト組換え matrix metalloprotease(MMP)-2 またはトリプシンとラット PP を 37℃ で 4 時間もしくは 15 時間インキュベートした。非酵素的

分解として、ラット PP を 60℃ で 24 時間インキュベートした。それぞれのサンプルを電気泳動後、ゲルを高感度染色法で分析した。

PP であると判断したバンドおよび散漫な染色性は、銀染色単独では染まらず二重染色法では染色されたこと及び過去の報告との分子量分布の一致から、PP であると判断した。ラットとヒトの EDTA 抽出物を比較すると、ラットでは明確なバンド (74K, 70K) が認められたが、ヒトでは散漫な染色パターン (70~30K) で明確なバンドは確認できなかった。これは、ヒト PP の分解を示唆していた。次に、ヒトの歯冠と歯根部の EDTA 抽出物を比較したところ、歯冠部の方が歯根部より分子量分布が低分子量側へシフトしていた。この結果は、ヒト歯冠部の PP が生体内で分解を受けていることを意味すると考えた。

イオン交換クロマトグラフィーにより分離したラット PP のバンドは、MMP-2 処理もしくはトリプシン処理を行っても、バンドに変化は認められず、これらプロテアーゼに対し耐性を示すことが明らかになった。これは PP のホスホセリン残基がプロテアーゼのリジン、アルギニン残基への接近を阻止したためと考察した。一方、熱処理後の PP は広範に散漫な染色パターン (94~20K) を示す分解が認められ、この染色パターンは、ヒト歯冠部の PP の染色パターンと類似していた。この非酵素的分解は、ホスホセリンを多く含むタンパク質に起こりやすい β 脱離反応によるものであらうと考えられた。以上の結果から、象牙質の長い成熟過程に於いて PP は、酵素的な分解よりも β 脱離反応による非酵素的機構により分解され、その分解が象牙質の成熟過程におけるハイドロキシアパタイトの結晶成長を促進している可能性が考えられた。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、本研究の背景となる硬組織の石灰化機構、基質タンパク質の石灰化における役割、PP の精製法とその同定法、二重染色法の方法ならびにその原理と利点、PP の分解の生理的意義、プロテアーゼの基質認識、象牙質の再生を目指す今後の研究の方向性と将来の展望など、論文内容および関連事項について多岐にわたるものであったが、いずれの質問に対しても適切かつ明快な解答が得られた。

本論文は、象牙質に特徴的な PP に関する分解機構の一端を明確に示した点が評価され、この業績は、象牙質のみならず硬組織の形成、石灰化機構の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士 (歯学) の学位を授与されることがふさわしいと認められた。