



骨Phosphoproteinの分離、精製とその生化学的特性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内山, 明好 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1294

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 17号	学位授与年月日	昭和62年 1月23日
氏 名	内 山 明 好		
論文題目	骨 phosphoprotein の分離、精製とその生化学的特性に関する研究		

論文の内容の要旨

Phosphoproteinは、石灰化組織に存在する非コラーゲン性タンパク質の一つであり、このうち骨に存在するphosphoproteinはリン酸化セリン(P-Ser)、リン酸化トレオニン(P-Thr)を含有することを特徴とする酸性タンパク質である。タンパク質内にリン酸基を有することや、 ^{31}P NMRによる分析にてカルシウムとの結合能を有することから、骨の石灰化に重要な役割を果たしているものと考えられている。骨phosphoproteinに関する文献では、異なった分子量のタンパクが存在することは報告されているが、分子量の分布や、異なった分子量のタンパク質間の相互関係、などは依然として明らかではない。このため、異なった分子量のphosphoproteinをそれぞれ精製し、それらタンパク質間の相互関係や、生化学的特性をさらに明確にすることを目的として、本研究を行った。

(方法) 14週令ニワトリ中足骨を液体窒素下に粉碎し、0.5M EDTAにて脱灰した。脱灰液を透析、凍結乾燥し、4Mグアニジン塩酸に溶解し、Sephadex G-100にてゲルろ過を行った。つづいてDEAE-Cellulose、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、さらに、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、このゲルよりタンパク質を抽出する方法にて最終的な糖製を行った。次に、生化学的特性を更に詳しく知る目的にて、EDTA脱灰液を透析、凍結乾燥したサンプルを6M尿素にてDEAE陰イオン交換クロマトグラフィー、6Mグアニジン塩酸にてSephacryl S-300ゲルろ過を行い精製した。

(結果および考察) Sephadex G-100クロマトグラフィーでは9個のピークにわかれ、各々のピークを精製し、13K、14K、15K、28K、33K、70KダルトンのPhosphoproteinを得た。またクロマトグラフィーのみにて精製したものでは、15K、28K、28/33Kダルトンを得た。これらの異なる分子量のタンパク質についてアミノ酸分析を行い比較したところ、14K、15K、33Kは近似したアミノ酸組成を持っていた。象牙質のphosphoproteinでは、動物の成熟にともない低分子量化してくるとの報告があるが、骨においても精製過程や成熟過程において低分子量化してくることが考えられる。さらに、高分子量のphosphoproteinは構造上、低分子量のタンパクが会合しており、低分子化に際し、これが解離するのではないかと推察される。一方異なったアミノ酸組成を有する分画もあり、単一の分子量から低分子化してくるものばかりでなく、遺伝的に異なるタンパク質も存在することが示唆された。また、ガラクトサミン、グルコサミンの分析では、これら2種のアミノ糖の比は、各分子量のphosphoproteinにそれぞれ特徴的で、すなわち、phosphoproteinは糖タンパク質の一種であり、糖の構成比が異なるタンパク質が存在することからも、遺伝的に異なるphosphoproteinの存在が示唆される。phosphoproteinは、通常、コラーゲンに特有であるヒドロキシプロリンを含まないが、70Kの分画のみヒドロキシプロリンを含有しており、コラーゲンとの強固な結合が示唆された。しかし他の分画との比率より全体の10%以下と考えられる。

(まとめ)

1. にわとり中足骨より13K-70Kダルトンに分布する分子量の異なるPhosphoproteinを分離、精製した。
2. 高分子量のphosphoproteinが成熟過程、或は精製過程において低分子化すると同時に、遺伝的に異なる分子種のタンパク質が存在することが、分子量の多様性に関与していると考えられる。
3. phosphoproteinの一部は、コラーゲンと強固に結合し、複合体を形成していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

骨タンパクの90%はコラーゲンであるが、のこりのタンパク質についてはよく知られていない。しかし、Glimcherと共同研究者は、非コラーゲンタンパクの中にリン酸化タンパク質(以下PPrと略)を認め、このものが骨の石灰化に関与するかどうかを明らかにするためにその精製を行ってきた。Spector & Glimcher(1972)は仔ウシとニワトリの骨組織から数種のPPrを抽出した。また、Cohen-Solalら(1979)はニワトリ中足骨からPPrを抽出し、リン酸化はセリン(Ser)とトレオニン(Thr)に起こっていることを明らかにした。Lee & Glimcher(1981)は分子量12,000(以下12Kのように略)のPPrを精製し、このものがリン酸化セリン(P-Ser)、リン酸化トレオニン(P-Thr)を含有しアスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)に富むことを明らかにした。しかし、他のPPrについては精製が困難で分析が行われていなかった。本申請者は、ニワトリ中足骨から従来の手法に従い高濃度のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を用いて非コラーゲンタンパクを抽出し、その精製に際して今回新たに二つの方法を導入した。

1) 4Mグアニジン中のセファデックスによる分子濾過→DEAE-セルロースによる分画→TSKカラムを用いたHPLC→SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)。2) 6M尿素中のDEAE-セファセルクロマトグラフィー→6Mグアニジン中のセファクリルによる分画→同繰り返し→SDS-PAGE。SDS-PAGEの総タンパクのバンドの染色はクマシーブリリアントブルー法、PPrの染色はローダミンB法を用いた。P-Ser、P-Thrの測定については4N HCl、105℃、6時間、全アミノ酸のそれについては6N HCl、106℃、24時間の加水分解を行い、アミノ酸分析機で分析した。

第一の精製法により分子量13K、14K、15K、28K、33K、70KのPPrが得られた。第二の方法では15K、28K、33KのPPrが得られた。それぞれについてアミノ酸分析を行った結果、アミノ酸組成の類似性から上記PPrは6種に分類可能であることが明らかになった。これらのPPrは生体で会合していると思われる。なお、70KのPPrはコラーゲンと固く結合していると考えられた。また、リン酸と結合したアミノ酸はいずれの場合もセリンとトレオニンのみであることが分かった。以上のように、本研究は骨PPrの従来の研究をさらに一歩進めたものであり、その貢献は十分な評価に値するものである。また、次のような点に関し質疑が行われた。

1. 試料の調製法
2. PPrの抽出法
3. P-Ser、P-Thrの定量法
4. P-Ser/P-Thr比および各タンパク間のアミノ酸組成に関する解釈
5. PPrの解離、抽出、分離操作とアミド結合、リン酸エステル結合の安定性
6. PPrを会合させている力、コラーゲンとの結合性の内容
7. PPrの糖タンパク性

これらの質疑に対する申請者の応答はおおむね適切であった。以上から本論文は医学博士の学位論文としてふさわしいものであることを全委員が一致して判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也		
	副査	教授	茂木	克俊	副査	教授
					井上	哲郎
	副査	教授	藤瀬	裕	副査	助教授
					鈴木	修