



ビタミンD欠乏、加齢状態におけるリン蛋白質の変化

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 昌則 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1385

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 108号	学位授与年月日	平成 3年10月18日
氏 名	鈴木 昌 則		
論文題目	ビタミンD欠乏、加齢状態におけるリン蛋白質の変化		

医学博士 鈴木昌則
論文題目

ビタミンD欠乏、加齢状態におけるリン蛋白質の変化

論文の内容の要旨

骨において約10%存在する非コラーゲン性蛋白質が石灰化において重要な役割を持つと推論されている。リン蛋白質は非コラーゲン性蛋白質の一つであり、骨・歯・エナメル質などの石灰化組織より抽出されるリン酸化アミノ酸を持つ糖蛋白質である。骨では骨芽細胞より産出され、石灰化前線に存在し、ハイドロオキシアパタイトに親和性を持ち、飽和カルシウム・リン酸溶液中のコラーゲン線維の石灰化速度の調節することより、石灰化の initiation に重要な役割を演じていると考えられている。そこでビタミンD欠乏と成熟、加齢という骨変化において骨リン蛋白質がどのような変化を示しているかを検討したので報告する。

〔材料と方法〕 ビタミンD欠乏実験では生後1日令より4週間ビタミンD欠乏食を投与した鶏と正常食を与えた鶏の中足骨骨幹部を採取した。加齢実験においては胎生16日令、生後14週令、1年令、2年令、3年令鶏の長管骨骨幹部を採取した。これらの骨は軟部組織を除去した後、0.5 M EDTA pH7.7にて4℃2週間脱灰し、透析・凍結乾燥した。このEDTA抽出物を6 M 尿素を含む0.05M tris-HCl pH8.2に溶解してDEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーにて分画し、リン蛋白質含有域を透析・凍結乾燥した。さらに、ビタミンD欠乏実験においては6 M グアニジン塩酸を含む0.05M tris-HCl pH8.2に溶解してSephacryl S-300 分子篩クロマトグラフィーにて分画した。

リン酸化セリンの定量は真空密封下4 N 塩酸106℃6時間加水分解しアミノ酸分析計にて測定した。電気泳動は15% SDS-PAGE を用いて行った。

〔結果〕 ビタミンD欠乏実験において、クロマトグラフィーにより150K, 90K, 60K, 45K, 33K, 32K, 28K, 18K, 15K のリン蛋白質が抽出された。SDS-PAGE 上、D欠群と正常群にて各々のリン蛋白質の分子量に差は認められず、アミノ酸分析においても各々のリン蛋白質のアミノ酸組成、リン酸化程度に差は認めなかった。しかし、蛋白質量は正常群に比べD欠群では減少を示し、とくに低リン酸化リン蛋白質においては減少が大きかった。

加齢実験において、EDTA抽出物のアミノ酸1000残基当たりのリン酸化度は加齢に伴い減少が認められた。クロマトグラフィーにより分画されたリン蛋白質の総量は加齢に伴い減少を示した。SDS-PAGE 上での主なリン蛋白質の分子量は胎生16日令では60K, 45Kであり、生後14週令では32K, 28K, 15Kであり、1年令では15K, 5Kとなり、2年・3年令では5K以下であった。

〔考察〕 ビタミンD欠乏によるリン蛋白質量の変化において低リン酸化群の減少が大きいことより、骨芽細胞のリン蛋白質の生合成はリン酸化の程度の高低によりビタミンDにて異なった制御を受けている可能性が示唆された。また、ビタミンD欠乏による石灰化障害と結び付けて考えると、リン蛋白質はリン酸化の相違により石灰化において異なる働きがあることも考えられた。

加齢実験においての分子量の変化は牛歯象牙質のリン蛋白質の変化と同様で、胎生期に高分子量型が主体であったものが成熟、加齢に伴い低分子量化した。これより、リン蛋白質は成熟期においては高分子量型が骨化過程の初期に重要な役割を演じ、成熟期以後は骨の remodeling において低分子量型がなんらかの役割を演じているか、あるいは成熟期以後の過程で低分子化することにより、コラーゲン線維の特定の部位に石灰化を誘導する可能性も考えられた。

リン蛋白質は石灰化障害や加齢による骨の生理的变化においてそれぞれ特異的な変化を示し、骨芽細胞より産出され、石灰化前線に存在し、コラーゲン線維の石灰化の速度調節することなどを考え合わせると骨形成の重要な指標の一つとなる可能性も示唆された。

論文審査の結果の要旨

骨の有機質の主要成分はコラーゲンであるが、非コラーゲン蛋白質も10%程度存在する。骨リン蛋白質は非コラーゲン蛋白質の一種で、P-Ser 残基、P-Thr 残基と多くの Asp 残基、Glu 残基を持つ一群の酸性糖蛋白質であり、骨芽細胞にて合成されることが明らかにされている。このリン蛋白質の機能面での特徴はヒドロキシアパタイトともコラーゲンとも結合することである。骨や象牙質では本蛋白質が免疫組織化学的に石灰化前線に検出されることや、骨の石灰化はコラーゲン線維の間隙(Hole zone)から起こることと相俟って、骨リン蛋白質は骨石灰化(骨化)開始機構において重要な役割を果たしているのではないかと推定されている。一方、骨はその成熟過程において骨化の程度を増すことや、ビタミンD欠乏により骨の石灰化障害が起こることはよく知られている。ビタミンDの作用としては、腸管からのカルシウムの吸収促進が強調されてきたが、最近では骨芽細胞への直接作用も考えられている。したがって、骨芽細胞で生産され、骨の石灰化機構への関与が推定される骨リン蛋白質がビタミンD欠乏や加齢により如何なる変動を示すかは興味深い問題である。本研究では、以上の観点に立って、鶏の骨リン蛋白質に対するビタミンD欠乏と加齢の影響の解析がなされた。

4週齢の鶏の中足骨骨幹部を用いて行われたビタミンD欠乏実験では、D欠乏による骨リン蛋白質の質的な変化は認められなかった。すなわち、検出されるリン蛋白質の種類、アミノ酸組成、リン酸化の程度等には、D欠乏群と対照群の間に有意な差はなかった。しかし、D欠乏群では単一重量の骨から抽出されるリン蛋白質総量が対照群の約35%に減少しており、特に60K-、33K-、28K-、18K-、15K-骨リン蛋白質の減少が著しかった。一方、胎生16日齢、生後14週齢、1年齢、2年齢、3年齢の鶏の長管骨骨幹部を用いて行われた加齢実験では、加齢により、抽出される総リン蛋白質量が減少するのみならず、リン蛋白質の低分子化が起こることが見出された。すなわち、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)上でローダミンBにより染色されるリン蛋白質の相対分子量は、胎生16日齢では60Kと45K、生後14週齢では32K、28Kおよび15K、1年齢では15Kと5K以下、2年齢と3年齢では5K以下であった。同様の加齢によるリン蛋白質の低分子化は、ヒトおよびウシの象牙質でも報告されている。申請者はこれらの観察結果を総合して、リン蛋白質は成熟期には高分子型として骨化の初期過程(軟骨から骨への変換等)で重要な役割を演じ、成熟期以降は低分子型となり、骨のremodeling等において何らかの役割を果たしているのではないかと推定した。また、以上の実験で、15K-、18K-、28K-および33K-リン蛋白質はオステオポンチン(60K)と、32Kと45Kのリン蛋白質はBSP-II(BSP; Bone sialoprotein, 45K)とそれぞれ同じ系列のリン蛋白質であることが示唆されたので、個々のリン蛋白質のアミノ酸配列を決定することにより、鶏骨では14種類も見出されているリン蛋白質を分類整理することが可能ではないかと考えられた。

以上の内容の本論文および研究発表により、申請者が行った研究は、骨形成機構におけるリン蛋白質役割解明に寄与するもので、興味ある且つ将来の発展性もある優れた研究と高く評価された。

本論文に関連して以下の質問がなされた。

- (1) 骨リン蛋白質の存在部位、リン酸化を受ける部位、およびリン酸化に関与する酵素
- (2) 骨リン蛋白質とヒドロキシアパタイトおよびコラーゲンとの結合様式とリン蛋白質の細胞接着活性に関与するアミノ酸配列等について
- (3) ビタミンD欠乏食が低カルシウム、正常リン含有であることと関連して — リンを正常とした理由
- (4) ビタミンD欠乏食の4週間投与により血清の25(OH)D₃値が検出感度以下になったことと関連して — 鶏での7-デヒドロコレステロールから新規合成される活性型ビタミンDと外来性ビタミンDに由来する活性型ビタミンDの比率、活性型ビタミンDの分子種、ビタミンD欠乏食投与期間中の暗環境等について
- (5) パラトルモン(PTH)のリン蛋白質への影響。ビタミンD欠乏→カルシウム不足→PTH分泌促進→リン蛋白質への影響という可能性を除外出来るか
- (6) 骨の石灰化という表現と骨化という言葉の使い分けの根拠、それぞれの言葉の具体的内容
- (7) この実験で用いられている4週令、14週齢、1年齢、2年齢、3年齢はそれぞれ鶏の一生の中のどの年

(8) 鶏の成熟に伴う骨リン蛋白質の低分子化の機構は高分子型リン蛋白質の分解か、あるいは成熟期鶏では最初から低分子型リン蛋白質が合成されるのか

これらの試問に対して申請者から概ね適切な回答が得られた。

以上により、本研究は学位授与に値すると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市 山	新						
	副査	教授	五十嵐 良	雄	副査	教授	井 上	哲 郎		
	副査	教授	藤 瀬	裕	副査	教授	吉 見	輝 也		