



## ウシ軟骨オステオポンチンの分離、精製とその生化学的特性、および免疫組織化学的局在

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 勝野, 浩 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1008">http://hdl.handle.net/10271/1008</a>

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	医博第 155号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏名	勝野 浩		
論文題目	ウシ軟骨オステオポンチンの分離、精製とその生化学的特性、および免疫組織化学的局在		

医学博士 勝野 浩

## 論文題目

ウシ軟骨オステオポンチンの分離、精製とその生化学的特性、および免疫組織化学的局在

## 論文の内容の要旨

骨は約80%の無機質と約20%の有機質から構成されている。この有機質のうち約90%はコラーゲンで、残りの10%は非コラーゲン性タンパク質である。これらには、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸を含有するグラタンパク質（オステオカルシン、BGP）、アパタイトとコラーゲンの両者に強い親和性を示すオステオネクチン、多くのリン酸基をもつフォスフォプロテインなどがある。これらタンパク質の生理的役割はいまだ不明であるが、石灰化に何らかの重要な役割をはたしているのではないかと考えられている。

これらの非コラーゲン性タンパク質のなかでも、フォスフォプロテインはアスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸（Glu）を多く含む糖タンパク質で、リン酸化セリン（P-Ser）、リン酸化スレオニン（P-Thr）を介してアパタイトと親和性を持ち、飽和カルシウム、リン酸溶液にて平衡化したコラーゲン繊維の石灰化の速度を調節する作用を持つことから、石灰化との関与が強く示唆されるタンパク質である。

骨のフォスフォプロテインは、数種類の分子量のものが報告されているが、なかでもシアル酸を含む2つのタンパク質が近年注目をあびている。これらは、オステオポンチン（OPN）、骨シアロプロテイン（BSP）と呼ばれるもので、共にそのアミノ酸配列中に Arg-Gly-Asp（RGD）の細胞接着配列を持つことで注目されている。

オステオポンチンは、前駆骨芽細胞、骨芽細胞により産生される、骨や歯に特有なタンパク質と考えられていたが、近年の免疫組織化学的研究により軟骨、腎臓、小腸にも存在することが確認された。しかし量的に少ないことからこれら組織からオステオポンチンを分離、精製した報告はみられない。

本研究では、ウシ石灰化軟骨から HCl 脱灰抽出、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過、および逆相 HPLC によってオステオポンチンを分離、精製することに成功した。

この軟骨オステオポンチンは、SDS-PAGE で分子量66KDa に相当する部分に単一のバンドとして泳動された。同時に作製した抗ウシ骨オステオポンチンポリクローン抗体を用いたウエスタンブロッティングで交差反応を示した。アミノ酸分析ではアスパラギン酸、グルタミン酸を多く含有し、またリン酸化セリンリン酸化スレオニンを含有していたが、その割合は骨オステオポンチンより少なかった。N末端アミノ酸配列は1番目から7番目まで、C-DNA クローニングによるウシ骨オステオポンチンのもものと完全に一致していた。このことは、軟骨と骨のオステオポンチンが、遺伝子的に全く同一か、あるいは均一なものである可能性を示唆している。

更に、前述の抗ウシ骨オステオポンチンポリクローン抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行った。その結果、ウシ脛骨 growth plate の石灰化が起こっていない部位では、軟骨細胞は染色されるものの、その周囲の matrix は染色されなかった。このことから軟骨のオステオポンチンは、骨で作られたのではなく、軟骨内で軟骨細胞より産生された可能性が考えられる。そして、この軟骨細胞で産生されたオステオポンチンは、そのまま細胞内に留まり、何らかのきっかけで放出されるものとする。さらに Von Kossa で染色される石灰化軟骨では、軟骨細胞だけでなく、周囲の matrix まで染色されているが、これは軟骨細胞内のオステオポンチンが、石灰化にともない細胞より放出され、ハイドロキシアパ

タイトと結合しているものと考え。オステオポンチンがハイドロキシアパタイトと結合する機序はまだ知られていないが、リン酸基、連続したアスパラギン酸、あるいはシアル酸を含んだ糖鎖が結合部位ではないかと考えられている。そして軟骨細胞から放出されたオステオポンチンがこれらを介してハイドロキシアパタイトと結合することにより軟骨の石灰化が始まる可能性が考えられる。

以上のことから、本研究よりオステオポンチンは、石灰化、特にその initiation に何らかの形で関与している可能性があきらかになった。

## 論文審査の結果の要旨

骨の有機基質の10%は非コラーゲンタンパク質であり、細胞間基質の構造化と石灰化の調節に重要な働きをしていると考えられている。osteopontin は最初ウシの骨組織に見出されたシアロタンパク質で、当初は bone sialoprotein I とよばれた。もう一つのシアロタンパク質である bone sialoprotein II は現在単に bone sialoprotein (BSP) とよばれている。両者は哺乳類の骨組織の主要なリン酸化糖タンパク質である。

osteopontin は骨芽細胞によってつくられ、基質に沈着することが示された。しかし、骨だけでなく、腎臓、子宮、皮膚、内耳などにも分布することがわかった。osteopontin はそのアミノ酸配列に RGD (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸) を有し、破骨細胞表面のビトロネクチン受容体に結合すると思われる。

申請者はこれまで osteopontin 抽出の材料となっていなかった軟骨からはじめて osteopontin を抽出、精製し、生化学的解析を行った。リン酸化セリン、リン酸化トレオニン含量はやや少なかったものの、分子量と N 末端部分のアミノ酸配列からこのものは既知の骨 osteopontin と同じか、またはきわめて近いものであると思われる。また、免疫組織化学的にも軟骨細胞内に osteopontin を証明した。osteopontin のくわしい関与機構はまだ明らかにはなっていないが、それが軟骨の石灰化、骨の形成とリモデリングに関与していることは確実であり、今回はじめて軟骨から osteopontin 様タンパク質を単離したことは評価に値する。

研究発表と質疑に引き続き以下の試問を行なった。

- 1) 試料の破碎法
- 2) 抽出操作中の抽出液の外観の変化
- 3) タンパク質分解の予防としてなぜ PMSF を使ったか
- 4) SDS-PAGE の条件
- 5) osteopontin の分子量についてのこれまでの報告
- 6) osteopontin の組織分布
- 7) 免疫組織化学における対照
- 8) osteopontin の糖鎖
- 9) osteopontin 発現の調節
- 10) osteopontin の発現と個体発生の時期
- 11) 石灰化の進行と osteopontin 発現の時間経過
- 12) osteoclast に osteopontin が発現しているという報告の評価と骨のリモデリングにおける osteopontin の役割
- 13) osteopontin と osteocalcin は複合体をつくるか

- 14) 軟骨における osteopontin の役割
- 15) osteopontin は骨代謝のマーカーとなるか
- 16) 骨の幹細胞の分化と osteopontin の発現
- 17) 加齢、性と osteopontin
- 18) 臨床応用

これらの試問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、本論文は博士（医学）の学位論文としてふさわしいものであることを、審査委員会委員全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 五十嵐 良雄 副査 教授 井上 哲郎  
副査 教授 藤瀬 裕 副査 助教授 室 博之