

氏名・(本籍)	伊藤修一(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第92号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	In vitroにおけるリントンパク質による 石灰化誘導に関する研究
論文審査委員	主査教授 松田浩一 副査教授 大野弘機 副査教授 矢嶋俊彦

論文内容の要旨

【緒言】

象牙質基質の石灰化においてリントンパク質は主要な役割を果たしていると考えられているがその詳細は未だ明確にはされていない。本研究では、リントンパク質-agarose beads複合体によるin vitro石灰化モデル実験系を用いて、各種リントンパク質の石灰化誘導活性を、石灰化誘導の際の基質-石灰化物結晶間のinterfacial tensionを測定することにより比較、検討した。さらに、リントンパク質中のリン酸基が石灰化誘導に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】

本研究ではリントンパク質として、卵黄由来のphosvitin, 象牙質リントンパク質であるphosphophorynは8ヶ月齢牛歯象牙質よりButlerの方法に従って抽出、精製した。osteopontinは搾乳後、加熱殺菌していない牛乳からSengerらの方法に従って抽出、精製した。それぞれのリントンパク質をvinylsulfoneを用いてagarose beads (Sephacrose 4B, Pharmacia Biotech) に架橋結合し、結合型リントンパク質を得た。Malachite green法を用いてリン酸分析することにより架橋結合したリントンパク質量を測定した。同時にリントンパク質をagarose beadsに単に吸着させた試料を作製した。それぞれの試料を自発的沈着の起こらないハイドロキシアパタイトに対する飽和度7.53, 7.59, 7.65および7.74を有する準安定カルシウム・リン酸溶液中で37°Cにてインキュベートした。なお飽和度は、コンピュータプログラムWATEQ4Fを用いて計算した。それぞれの試料により

誘導された石灰化物中のカルシウム量を原子吸光計(Model-5100, Parkin-Elmer)を用いて経時的に測定して石灰化誘導時間を決定した。また、誘導された石灰化物を走査型電子顕微鏡(日本電子, JSM-T100型)を用いて観察した。さらに、微少領域X線回析装置(RINT2000, 理学電気)を用いて線源銅K α 線, 管電圧40kV。管電流100mAで回析角45°-15°の範囲で測定し、誘導された石灰化物を同定した。

得られた結果をもとに、Nielsenのnucleation theory (1967)を用いてハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionを測定した。

次に、結合型リントンパク質の一部を白イモ由来酸性フォスファターゼを用いて部分的に脱リン酸して、50%, 70%, 90%脱リン酸化結合型リントンパク質を得た。これらの試料も同様に準安定カルシウム・リン酸溶液中で37°Cにてインキュベートして石灰化誘導時間を決定した。誘導された石灰化物を同様に走査型電子顕微鏡観察, X線回析により分析した。さらにハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionを計算した。

【結 果】

結合型リントンパク質は全て(phosvitin-agarose beads, phosphophoryn-agarose beads, osteopontin-agarose beads複合体)準安定溶液中で石灰化を誘導した。準安定溶液の飽和度が高くなるほど、それぞれの試料による石灰化誘導時間が短縮された。それぞれの試料により誘導された石灰化物は板状結晶物であった。誘導された石灰化物の微少領域X線回析パターンはハイドロキシアパタイトのパターンと一致していた。phosvitinに

よるハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionは92.3ergs/cm²であった。phosphophorynの場合、interfacial tensionは90.1ergs/cm²であった。osteopontinの場合、interfacial tensionは94.7ergs/cm²であった。リンタンパク質をagarose beadsに吸着させた試料は石灰化を誘導しなかった。

次に、リンタンパク質を脱リン酸した場合、脱リン酸の程度が高いほどハイドロキシアパタイト誘導時間が延長した。そして90%脱リン酸化リンタンパク質はハイドロキシアパタイトを誘導しなかった。Intactな(脱リン酸していない) phosphophorynの場合、ハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionは90.1ergs/cm²であったが、50%脱リン酸化phosphophorynでは、90.7ergs/cm²、70%脱リン酸化phosphophorynでは、94.0ergs/cm²であり、リンタンパク質の脱リン酸化に伴って、ハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionは上昇した。

[考 察]

本研究で使用したリンタンパク質は全て agarose beadsに不動化することにより準安定溶液中でハイドロキシアパタイトを誘導した。しかし、リンタンパク質を

agarose beadsに吸着させた試料は石灰化を誘導しなかった。溶液中で遊離したリンタンパク質は自己凝集体を形成することが知られている。これらのことから、リンタンパク質が石灰化を誘導するためには、多価陰イオン(リン酸基、カルボキシル基)表面を溶液中に曝して、カルシウム・リンクラスターイオンを結晶化できるようなコンフォメーションが必要であり、このコンフォメーションはリンタンパク質をなんらかの不溶性基質に結合させた場合に得られるものと考えられる。

Christoffersenらの報告によると、ハイドロキシアパタイト上の結晶成長の際のinterfacial tensionは90.1ergs/cm²であり、特に結合型phosphophorynにおいて得られた値はこれに匹敵しており、結合型phosphophorynが高いハイドロキシアパタイト誘導能を有することが明らかになった。

また、脱リン酸に伴って、結合型リンタンパク質によるハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionは上昇し、90%脱リン酸化リンタンパク質がハイドロキシアパタイトを誘導しなかったことから、結合型リンタンパク質においてリン酸基がハイドロキシアパタイト誘導に主要な役割を果たしている事が明らかになった。

学位論文審査の要旨

象牙質基質の石灰化においてリンタンパク質は主要な役割を果たしていると考えられている。これまでに、結合型リンタンパク質が、自発的に沈着しない石灰化溶液中で石灰化を誘導するための活性化エネルギーを引き下げ、容易に石灰化を起こす事ができる事が報告されている。活性化エネルギーの関数であるinterfacial tensionは石灰化誘導能を評価する一つとして有用である。本研究では、結合型リンタンパク質によるin vitro石灰化モデル実験系を用いて、各種リンタンパク質の石灰化誘導活性を、石灰化誘導の際の基質-石灰化物結晶間のinterfacial tensionを測定することにより比較、検討した。さらに、リンタンパク質中のリン酸基が石灰化誘導に及ぼす影響を検討した。本研究では、リンタンパク質として、ホスビチン、フォスフォフォリン、オステオポンチンを用いた。それぞれのリンタンパク質をagarose beadsに架橋結合し、結合型リンタンパク質を得た。さらに、結合型リンタンパク質の一部を部分的に脱リン酸して、50%、70%、90%脱リン酸化結合型リンタンパク質を得た。これらの試料を準安定カルシウム・リン酸溶液中で

37°Cでインキュベートして石灰化誘導時間を決定した。誘導された石灰化物を走査型電子顕微鏡、微少領域X線回析装置により分析した。さらに石灰化誘導に関するinterfacial tensionを計算した。結合型リンタンパク質は全て準安定溶液中で石灰化を誘導し、溶液の飽和度が高くなるほど、石灰化誘導時間が短縮した。それぞれの試料によって誘導された石灰化物は板状結晶物であり、石灰化物の微少領域X線回析パターンはハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionは、これまで報告されていた値と一致していた。リンタンパク質の脱リン酸化に伴って、ハイドロキシアパタイト誘導に関するinterfacial tensionは上昇した。これらの結果から結合型リンタンパク質が高いハイドロキシアパタイト誘導能を有しており、リン酸基が核形成に対して主要な役割を果たしているということが示唆された。

以上の結果から、論文は歯科医学の進歩発展に寄与することが大であり、審査の結果学位授与に値するものと判定する。