



Title	Production of collagenase inhibitor by the growth cartilage of embryonic chick bone : isolation and partial characterization
Author(s)	安井, 夏生
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33272">https://hdl.handle.net/11094/33272</a>
rights	© 1981. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license.
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	安井夏生
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5620 号
学位授与の日付	昭和 57 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	成長軟骨の産生するコラゲナーゼ・インヒビター
論文審査委員	(主査) 教授 小野 啓郎 (副査) 教授 佐野 栄春 教授 松本 圭史

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

長管骨の発生過程ではまず軟骨組織のみよりなる骨原基が形成され、ある程度の形態形成が行われた後、骨幹部中央より両骨端に向って骨に置換されてゆく。この軟骨が骨に移行する部を成長軟骨と呼ぶ。ところで軟骨基質はⅡ型、骨基質はⅠ型コラーゲンから成ることが知られており、軟骨から骨に置きかわる移行部ではコラーゲンの置きかえ、すなわちⅡ型の分解とⅠ型の合成がバランスよく行われるはずである。コラーゲン分解代謝の鍵を握ると考えられているコラゲナーゼが、この部においてどのような形で存在し、またその活性がどのように調節されているかは知られていない。本研究では、鶏胚骨発生過程において骨組織で活発なコラゲナーゼ産生が行われる一方、移行部成長軟骨で強力なコラゲナーゼ・インヒビターが産生されていることを見出し、このインヒビターの性状と骨コラゲナーゼの活性調節に対する役割を検討した。

#### 〔方法ならびに結果〕

Hamburger-Hamilton に従って分類した Stage 33~43 鶏胚脛骨および大腿骨骨原基を無菌的にとり出し、骨端、成長軟骨、骨幹に分けて器官培養を行った。2 日目ごとに培地交換を行いそれぞれの培地についてコラゲナーゼとその阻害活性を測定した。コラゲナーゼ活性の測定は中性 37°C にてゲル化させた<sup>14</sup>C-ラベルコラーゲンをを用いた。骨原基全体が軟骨組織のみより成る Stage 36 (10 日) 以前の培地にはコラゲナーゼ活性が認められず、軟骨基質の破壊と骨および骨髄形成が盛んとなる Stage 38 (12 日) 以後の骨幹部にはじめて強いコラゲナーゼ活性を認めた。この骨コラゲナーゼは他の動物コラゲナーゼと同様、潜在型 (M. W. 約 5 万) として存在しており、Na I に透析後活性型 (M. W.

約4万)となり、低分子成分との complex が示唆された。両骨端軟骨にはコラゲナーゼ活性が認められず、骨との移行部での軟骨コラーゲンの分解吸収には骨組織由来のコラゲナーゼが関与している可能性が考えられた。一方、この移行部成長軟骨は強いコラゲナーゼ阻害物質を産生することがわかり、このものは軟骨コラーゲンの分解速度の調節に役立っていると考えられた。このコラゲナーゼ・インヒビターの性状を明らかにする目的で培地 690 ml より分離精製を試みたところ、DEAEセルロースカラムを素通りし、CMセルロースカラムに吸着する画分にインヒビターが回収された。これを Sephadex G75 superfine カラムにてゲル濾過を行うと、M. W. 約25000 に一致してインヒビション活性のピークが得られた。この画分を用いてコラゲナーゼとの量比を変えて反応させると、酵素とインヒビターの間には一定の stoichiometry があること、またこのインヒビターは chick bone 由来のコラゲナーゼは効率よく阻害するが、細菌性コラゲナーゼは全く阻害しないことがわかった。さらにこのインヒビターは種々のゼラチナーゼおよびトリプシンのゼラチン水解活性をも強く阻害すること、キモトリプシンによりインヒビターが失活すること、熱処理には比較的安定なことがわかった。

〔総括〕

1. 鶏胚成長軟骨よりコラゲナーゼ・インヒビターを分離した。このインヒビターは分子量約25000の熱に比較的安定な塩基性タンパク質で、動物コラゲナーゼの他にゼラチナーゼ、トリプシンなどを阻害するが、細菌性コラゲナーゼは阻害しないことがわかった。
2. 低分子成分がはずれて活性型となった骨コラゲナーゼが、このインヒビターの local capacity を超えて存在する場合に限り、コラーゲン分解が進むという multistep な調節機構は軟骨から骨に置きかわる移行部において、マトリックスコラーゲンの分解と合成のバランスを保つために好都合であると考えられた。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は骨の発生過程において軟骨から骨に置きかわる際に、マトリックスの主成分であるコラーゲンの分解代謝の調節がどのように行われているかについて検討したものである。軟骨基質のコラーゲン分解が骨由来のコラゲナーゼによって行われ、その活性調節に成長軟骨の産生するコラゲナーゼ・インヒビターが役立っている可能性を示した。さらにこのインヒビターを分離し、その性状について明らかにしたことは、コラゲナーゼの活性調節機構、ひいては内軟骨性骨形成過程の解明に大きく寄与するものとする。