The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウス骨肉腫由来の骨形成因子の精製と同定
Author(s)	伊藤, 恭彦
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36385
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	伊藤恭彦（いとう やすひこ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 8545 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**マウス骨肉腫由来の骨形成因子の精製と同定**
論文審査委員	(主査) 教授 崎山 文夫 (副査) 教授 浅野 朗　教授 堀尾 武一

論文内容の要旨

1. はじめに

異所性骨形成という，本来骨にはない部分（例えば筋組織中）の骨化が臨床的に所見されている。この異所性の骨形成現象の実験系も確立されており，膀胱粘膜上皮，腎盂上皮，担のう上皮などの上皮組織の筋膜下への移植によって，移植後約3週間目に骨形成が起る。また，上皮組織以外にも骨や軟骨などの硬組織にこの異所性の骨形成能があり，この硬組織（ウシの正常骨）を材料として骨形成活性を有する物質（蛋白質）の精製が試みられて来た。私達のグループでも，この骨形成因子の精製をマウスのＢＦＯ骨肉腫（Dunnの骨肉腫由来）を用いて試みて来た。本研究では同所性，異所性の骨形成因子の化学的本体を明らかにし，骨形成の機作を理解することを目的として，マウスＢＦＯ骨肉腫から骨形成因子の単離・精製を試み，純化した骨形成活性能を有する蛋白質の構造を解明することができた。以下にその概要を述べる。

2. 骨形成因子の精製と同定

ｉ）骨形成因子の精製

マウスＢＦＯ骨肉腫組織３６ｇを脱脂し，５０－８０％のアセトン分画，２Ｍグアニジン塩酸塩による抽出，抽出画分の透析による不溶化画分の調製，Sephacryl Ｓ－２００カラムによるゲル沪過 SynChropak ＣＡ－３００陽イオン交換ＨＰＬＣ ＹＭＣ Ｐacked Ｃolumn（C_4）逆相ＨＰＬＣにより骨形成因子を精製した。この精製した活性画分は，ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ均一であったので Edman 分解に供した。その結果Ｎ末端９残基までが同定されその配列はＡＡＬＲＰＬＶＫＰ－であった。

ii）骨形成因子のアフィニティークロマトグラフィーを用いた高度精製と同定

i）で得た骨形成能を持つ画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥはほぼ均一であったが，なお若干の夾雑物が認められたので，さらに純度の高い標品を収率よく調製することが必要であった。そこで先に精製した活性画分のＮ末端９残基のアミノ酸配列を有すペプチドを化学合成し，このペプチドをハプテンとして抗体を調製し，それをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを用いて骨形成因子を精製することにした。その結果，ＳＤＳ－ＰＡＧＥ的により純度が高く，その骨形成活性測定の結果でもより成熟した骨を作ることができる比活性の高い標品を得ることができた。またその蛋白質のＮ末端アミノ酸配列分析は１５残基以上同定可能であった。Ｎ末端部１５残基の配列はＡＡＬＲＰＬＶＫＰＫＩＶＫＫＲ－であった。また同一標品のアミノ酸組成も測定した。

3. 考　察

上記のＮ末端１５残基のアミノ酸配列を蛋白質一次構造データベース（ＮＢＲＦ）で検索したところ，本配列はマウスリボソーム蛋白質Ｌ３２の最初のメチオニンを除くＮ末端１５残基の配列と完全に一致した。またアミノ酸組成分析の結果も　ｃDNA の塩基配列から得られたＬ３２蛋白質のアミノ酸組成値と酷似していた。すなわちマウス骨肉腫由来の骨形成因子はＬ３２様蛋白質であると結論した。しかしアミノ酸組成値では，スレオニンやグリシンがＬ３２蛋白質と若干相異しており，Ｌ３２蛋白質との異同については骨形成因子の全一次構造の解析を待ちたい。今後は本因子の遺伝子のクローニングとその産物の活性発現の確認が必要である。

本骨形成因子は既知の成長因子様の骨形成因子とは異なった真の骨形成因子と考えられる。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の骨格は骨組織により形成され，骨組織は成体となって完成した後も，破骨細胞による分解吸収と骨芽細胞による骨基質の産生が繰返えされている。このような正常な骨形成のほかに，異所性の骨形成が知られており，ある種の上皮組識や骨，軟骨などの硬組織の筋膜下への移植によって骨形成が起る。さらに　これらの骨形成には蛋白性の骨形成因子が関与することがすでに見いだされ，その因子の精製の試みが正常骨について行なわれてきた。しかし，この因子の存在量が著しく少いために，いくつかの単離精製が報告されているものの，完全な骨形成能をもつ蛋白性因子の純化には至っていない。そこで，伊藤君は，正常骨より含量が多いと考えられる骨肉腫を材料として，骨形成因子を精製することにした。

伊藤君は最新の方法を使って精製を進めたが　原料及び含量において制限があったため難航をきわめた。しかし，僅少量の精製因子の部分一次構造の知見をもとにしてその特異抗体を作製し，それを用いて高活性の骨形成因子を効率よく調製することに成功した。さらに，この標品の構造解析を進め，マウスリボソームＬ３２蛋白質との相同構造を見いだした。

このように，超微量で且つ難溶性の骨形成因子の精製とその部分的構造の決定を行った研究内容は，同因子の化学的本体の解明だけでなく，骨形成の生化学的，生理学的メカニズムの解明に資するものであり本論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。