Osaka University Knowledge Archive

Title	軟骨に存在する組織特異的成長因子の精製と分子クローニング
Author(s)	田中, 秀穂
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38658
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 1 】

氏　　名	田　中　秀　穂（たなかひでほ）
博士の専攻分野の名称	博　士（学　術）
学位記番号	第　10904　号
学位授与年月日	平成 5 年 7 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	**軟骨に存在する組織特異的成長因子の精製と分子クローニング**
論文審査委員	（主査） 教　授　鈴木不二男 （副査） 教　授　栗栖浩二郎　　助教授　小川　裕三　　講　師　山本　照子

論文内容の要旨

［目　的］

軟骨組織には塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）が含まれ，軟骨細胞の増殖制御に重要な役割を演じていることが知られている。一方，鈴木らはウシ胎仔軟骨より抽出される低分子量蛋白質成分が培養軟骨細胞のプロテオグリカン合成ならびにDNA合成を促進することを明らかにしてきた。さらに，この蛋白質成分がbFGFの存在下に培養軟骨細胞のDNA合成を相乗的に促進することから，軟骨組織中にはbFGFと異なる未知の成長因子が存在していること指摘した。本研究では，ウシ胎仔骨端軟骨抽出物からこの活性因子を完全精製してChondromodulin-I（ChM-I）と命名し，その前駆体cDNAをクローニングしてChM-Iの全一次構造を決定した。

［方法と結果］

ウシ胎仔四肢の骨端軟骨組織を採取して，1Mグアニジン塩酸中で抽出した。次に，アセトン分画，限外濾過により分子量10-50kDa画分を得た。さらに，ゲル濾過，ヘパリン親和性カラムクロマトグラフィー，逆相HPLCを組み合せてChM-Iを完全精製した。ChM-Iは，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上，見かけの分子量約25 kDaを示すCoomassie Brilliant Blueに低染色性の幅広いバンドを示す糖蛋白質であった。精製ChM-Iをウサギ成長軟骨培養系に添加するとプロテオグリカン合成，及びDNA合成が促進された。また，ChM-IはbFGFの存在下に相乗的にDNA合成を促進した。

次に，精製ChM-I末端のアミノ酸配列およびエンドペプチダーゼ消化断片のアミノ酸配列をエドマン分解法により決定した。これらのアミノ酸配列をもとに，ウシ骨端軟骨cDNAをPCR法により増幅してChM-I cDNA部分断片を得た。さらに，このcDNA断片をプローブにしてウシ胎仔骨端軟骨λgt10cDNAライブラリーをスクリーニングして完全長ChM-I cDNAをクローニングした。cDNAの塩基配列から，ChM-Iは，335残基のアミノ酸からなる膜蛋白質型前駆体のC末端部分を121残基としてコードされていることが明らかとなった。

ノーザンブロット解析により発現組織を検索したところ，軟骨には約1.7kbのChM-I mRNAが高レベルで発現していることが明らかになった。これに対して，脳，骨格筋，腎，肝など軟骨以外の組織での発現は検出できなかっ

た。次に，抗 ChM-I ペプチド抗体を作成してウシ胎仔尾骨における ChM-I 遺伝子の発現局在を検索した。その結果，ChM-I は軟骨組織に広く発現し，軟骨細胞外基質に分泌，蓄積されていることが明らかになった。特に，骨端成長板では，増殖軟骨細胞層から肥大化軟骨細胞層にかけて ChM-I 遺伝子の明らかな発現増強が認められた。興味深いことに，石灰化軟骨細胞層では ChM-I の発現は消失していた。

［考察と結論］

本研究により，長らく実体が不明であった軟骨組織中の成長因子 Chondromodulin-I(ChM-I)を完全精製することに成長し，その実体を分子レベルで明らかにした。すなわち，ChM-I は見かけの分子量約25kDa の糖蛋白質でウサギ成長軟骨培養系のプロテオグリカン合成ならびに DNA 合成を著明に促進した。ChM-I 前駆体 cDNA のクローニングに成功して，その塩基配列から前駆体蛋白質の全一次構造を明らかにした。ChM-I の発現は成熟した軟骨細胞に特異的で，軟骨細胞で生合成された ChM-I は，細胞外基質に分泌，蓄積されることが判明した。特に，骨端成長板の増殖軟骨細胞層から肥大化軟骨細胞層にかけて発現増強が認められること，石灰化軟骨細胞層で発現が消失することなどから，ChM-I が内軟骨性骨形成の過程でも重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

軟骨細胞は自ら増殖・分化制御因子を産生していると推測されていたが，その実体は長らく不明のままであった。そこで田中君はウシ胎仔軟骨より未知の因子の探索を試みた結果，分子量が約25kDa の糖蛋白質でウサギ成長軟骨細胞培養系のプロテオグリカン合成および DNA 合成を著明に促進する新規因子の完全精製に成功し，これを Chondromodulin-I（ChM-I）と命名した。さらに ChM-I 前駆体 cDNA の分子クローニングにも続けて成功し，その塩基配列から前駆体蛋白質の全一次構造を明らかにした。

ChM-I の発現は軟骨組織に特異的であり，骨端成長板の増殖軟骨層から肥大軟骨層にかけて強く発現していること，しかし石灰化軟骨層ではその発現が消失していることを明らかにした。従って ChM-I が内軟骨性骨形成の過程でも重要な役割を担っていることが示唆された。以上のように本論文は軟骨細胞の増殖・分化の制御機構を解明する上で，重要かつ，新たな知見を加えたものであり，博士（学術）の学位請求に十分値するものと認める。