



Title	Characterization of protein components of human urinary crystal surface binding substance
Author(s)	本多, 正人
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40898
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

氏 名	ほん だ まさ ひと 本 多 正 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 5 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 3 月 9 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	Characterization of protein components of human urinary crystal surface binding substance (ヒト尿中の結晶表面吸着物質中に含まれる蛋白に関する検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥山 明彦 (副査) 教 授 綱野 信行 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

上部尿路結石のなかで、尿酸カルシウム結石は最も頻度が高く、しばしば再発し、形成機序として、1. 結晶核形成 2. 結晶成長・凝集 3. 固化のステップを経るとされるが詳細は不明である。このなかで結石形成には結晶成長・凝集の段階が重要なステップであると考えられている。元来ヒト尿には結晶成長・凝集抑制作用があり、結石内には蛋白や酸性ムコ多糖が含まれていることから (Urol. Res. 21; 187-192, 1993), これら尿中の蛋白や酸性ムコ多糖が結石形成にとって抑制的に働く可能性が示唆されている。また実験的にヒト尿中で尿酸カルシウム結晶形成を惹起させた時に、生じる結晶に付着した高分子物質 (Crystal Surface Binding Substance: CSBS) は蛋白や酸性ムコ多糖を含み、強い尿酸カルシウム結晶成長・凝集抑制作用を有することが判明している (Urol. Res. 18; 387-392, 1990)。本研究の目的は CSBS 中に含まれる蛋白を解析することにより、尿酸カルシウム結晶成長抑制蛋白の同定を目的とする。

[方法ならびに成績]

1. CSBS の作製：複数の健常成人男子の尿を採取、これに塩化カルシウムと尿酸ナトリウムを加えて尿酸カルシウム結晶形成を惹起させ6時間震盪後、生じた結晶を EDTA で溶解、6kDa の濾過膜を用いた限外濾過にて脱塩濃縮、凍結乾燥して CSBS を作製した。

2. CSBS 中の結晶成長抑制活性を持つ蛋白分画の採取：DEAE Sepharose CL6B を用いたイオン交換クロマトグラフィーにて CSBS から尿酸カルシウム結晶成長抑制活性を有する蛋白分画を分離、採取した。

3. ヒドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーによる蛋白の分離および各分画の結晶成長抑制活性の測定：上記2の操作で得られた蛋白分画をヒドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーで、溶出に用いたリン酸ナトリウム濃度を30, 60, 125, 250, 500 mM と変化させ、5分画化した。SDS-PAGE により500 mM 分画は分子量約30kDa の単一蛋白から、60 mM 分画は主として分子量約67kDa の蛋白からなることが判明した。その他の分画にはまだ複数の蛋白が含まれていた。各分画毎の抑制活性は、125, 250, 500 mM 分画は強い抑制活性を、30, 60 mM 分

画は弱い抑制活性を示した。特に125 mM 分画は低濃度でも強い抑制活性が維持された。

4. Amino acid sequence analysis : 分離された500 mM 分画中の分子量約30kDa, および60m M 分画中の分子量約67kDa の蛋白のアミノ酸配列は, それぞれ prothrombin および osteopontin と72%, 89% 合致した。

5. 結石に含まれる蛋白と CSBS との関連について: カルシウム結石に含まれるとされる諸蛋白の CSBS 中での存在の有無および, 強い抑制活性を呈した125 mM 分画への関与について western blot で検討した。human serum albumin, α 1-acid glycoprotein, α 1-microglobulin, α 2-HS glycoprotein, retinol binding protein, transferrin, Tamm-Horsfall mucoprotein, prothrombin, α 1-antitrypsin, β 2-microglobulin について検討したが, α 1-antitrypsin, β 2-microglobulin をのぞいた 8 種類の蛋白が CSBS 中に含まれていた。しかしこれらの蛋白の125 mM 分画の持つ強い抑制活性への関連性はないものと考えられた。

[総括]

1. ヒト尿から得た CSBS 中には少なくとも 9 種類以上の蛋白が含まれ, 尿酸カルシウム結晶成長抑制活性を有する複数の蛋白が存在し, 結石形成の抑制に関与しているものと推測された。
2. CSBS 中に存在する蛋白のうち prothrombin および osteopontin 類似蛋白を同定し, 特に prothrombin 類似蛋白は強い尿酸カルシウム結晶成長抑制活性を有することが証明された。
3. 上記以外にも, より強い尿酸カルシウム結晶成長抑制活性を有する未知の蛋白の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文はヒト尿中に存在し, 尿路結石形成に抑制的に作用する蛋白について解析した研究成果を報告している。正常人尿中には結石形成を予防する蛋白が存在し結石形成を抑制しているという知見は非常に興味深く, また再発性尿路結石患者の尿中におけるそれらの蛋白の作用発現とを比較検討することにより, 結石の予防治療に結び付く可能性を有している。本論文では結石形成抑制蛋白として prothrombin 類似蛋白を尿中から分離同定した以外に, これ以外にも尿中の未知の結石形成抑制蛋白の存在を明らかにしている。これらの蛋白の存在は, 現在不明である尿路結石形成機序を解明する手掛かりとなる知見であり, これら結石形成抑制蛋白の存在を明らかにした本論文は学位に値すると思う。