



Title	骨基質タンパク質のリン酸化と石灰化の関係について
Author(s)	石田, 健
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59295
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

【14】

氏 名	いし だ けん
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯学)
学 位 記 番 号	第 25022 号
学 位 授 与 年 月 日	平成24年3月22日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	骨基質タンパク質のリン酸化と石灰化の関係について
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 前田 芳信 (副査) 教 授 豊澤 悟 准教授 前田 隆史 講 師 相川 友直

論 文 内 容 の 要 旨

骨基質中の非コラーゲン性タンパク質には酸性リンタンパク質が豊富に含まれている。酸性リンタンパク質を構成する全アミノ酸の約20-30%は、アスパラギン酸やグルタミン酸の酸性アミノ酸であり、pHが中性領域にある生体内では負に荷電する。また、酸性リンタンパク質は、カゼインキナーゼ(CK)IIによりリン酸化されるモチーフを豊富に含み、CKIIにより酸性リンタンパク質中のセリンがリン酸化されると、さらに高度に負に荷電する。このように高度に負に荷電した酸性リンタンパク質は Ca^{2+} との強い結合能を獲得して、ハイドロキシアパタイト形成の核となり、石灰化に関与すると考えられているが、実際には石灰化における酸性リンタンパク質のリン酸化の意義は分かっていない。

骨基質中の酸性リンタンパク質には、オステオポンチン(OPN)、骨シアロタンパク(BSP)、Dentin matrix protein 1 (DMP1)が知られている。これらの酸性リンタンパク質の1モル当たりの無機リン酸量の比較から、DMP1が最も高度にリン酸化されており、DMP1は強力な負荷電体として骨の石灰化に密接に関与すると考えられる。そこで、本研究では、骨組織や石灰化培養系を用いてDMP1のリン酸化状態やその分布を *in situ* 解析により検討し、次に、CKIIによる骨基質タンパク質のリン酸化が石灰化に及ぼす影響について検討を行った。

【材料と方法】

(1) 免疫染色によるリン酸化部位の検討：Wistar系ラット（オス4週齢）大腿骨の脱灰凍結切片を作製し、リン酸化セリン（ホスホセリン）に対する抗体を用いて、免疫染色を行った。また potato acid phosphatase により、脱リン酸化処理した組織切片を用いて、ホスホセリンに対する免疫反応の信頼性を検討した。

(2) DMP1とリン酸化部位の局在検討：骨組織およびマウス前骨芽細胞株(MC3T3-E1)培養系におけるリン酸化部位とDMP1の共局在部位を、抗ホスホセリン抗体と抗DMP1抗体を用いた蛍光二重染色にて検討した。

(3)細胞培養を用いた骨基質タンパク質のリン酸化状態の検討：MC3T3-E1細胞を用いた石灰化培養系からタンパク質を抽出し、抽出タンパク質中のホスホセリンとDMP1をウェスタンブロット法にて解析した。また、抗体の代わりに、セリンを含めた全てのリン酸化体を認識する Phos-tag™を用いて抽出タンパク質のリン酸化タンパク質を検出した。

(4) CKIIによるリン酸化が石灰化に及ぼす影響についての検討：CKII阻害剤(Tetrabromocinnamic Acid)を用いて、MC3T3-E1細胞の石灰化培養系におけるCKII阻害実験を行い、CKII阻害剤添加2-4週間後にアリザリンレッド染色を行い、石灰化レベルを評価した。

【結果と考察】

(1) 骨組織におけるリン酸化部位を *in situ* 解析し、骨梁辺縁部と骨細胞周囲基質にホスホセリン陽性反応を認めた。また脱リン酸化処理を行った組織切片では、ホスホセリン陽性反応が減弱し、この免疫反応の信頼性を確認した。

(2) DMP1とホスホセリンの蛍光二重染色を行ったところ、骨組織では骨細胞周囲基質にDMP1とホスホセリンの共局在が認められ、MC3T3-E1細胞の石灰化培養系では石灰化領域にホスホセリンとDMP1の共局在が確認され、骨基質中のDMP1がリン酸化されていることが示唆された。

(3) MC3T3-E1細胞の石灰化培養系からの抽出タンパク質には、ウェスタンブロット法により、分泌後に二つに切断されるDMP1のC端断片を示す65kDaバンドが認められた。同一のPVDF膜を用いたウェスタンブロット法によるホスホセリン検出から、この65kDaバンド位置にはホスホセリンの免疫反応も認められたことから、DMP1のC端断片のリン酸化が示唆された。

(4) 石灰化培養系における CKII 阻害実験では、DMP1 のリン酸化抑制が認められ、阻害剤添加 2、3 週間後に、形成された石灰化物の総面積と石灰化物一個あたりの平均面積はコントロール群と比較して有意に低下した。このことから MC3T3-E1 細胞の石灰化過程において、CKII による酸性リントタンパク質のリン酸化が石灰化に重要であることが推察された。

【結論】骨基質に含まれる酸性リントタンパク質の一つである DMP1 が骨の石灰化過程においてリン酸化されていることが *in situ* で明らかとなった。また DMP1 のリン酸化には、CKII が関与し、DMP1 を含めた酸性リントタンパク質のリン酸化は石灰化に促進的に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨基質タンパク質のリン酸化と石灰化の関係について検討したものである。骨基質タンパク質の中で、酸性リントタンパク質は高度にリン酸化されて負に荷電して Ca^{2+} 結合能を持つため、骨の石灰化促進に重要と考えられている。そこで酸性リントタンパク質のひとつである dentin matrix protein 1 (DMP1) に着目して、骨組織や組織培養の *in situ* 解析により DMP1 のリン酸化状態を明らかにした。また酸性リントタンパク質をリン酸化する casein kinase II (CKII) 阻害実験では骨芽細胞様細胞の石灰化を抑制することから、酸性リントタンパク質のリン酸化は石灰化促進に重要であることが示唆された。

以上の結果は、酸性リントタンパク質のリン酸化は骨の石灰化促進に重要であることを示したもので、骨の石灰化機序を理解する一助となることから、極めて重要な研究であり、博士（歯学）の学位を授与するに値すると認める。