

学位論文

各種改変型 Dentin phosphoprotein の
組み換えタンパク質精製とその機能解析

学位申請者 小武家誠司

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科
創生医科学専攻
先進医療開発科学講座 歯周病態学分野

主指導教官 栗原英見 教授

2013 年度

謝 辞

本研究のご指導及び御校閲を賜りました本学応用生命科学部門歯周病態学
栗原 英見 教授に謹んで感謝の意を表します。

また本研究の遂行ならびに論文作成においてご指導、ご鞭撻いただきました
本学総合健康科学部門小児歯科学 香西 克之 教授、基礎生命科学部門細胞
分子薬理学 兼松 隆 教授、基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学 高田
隆 教授、基礎生命科学部門硬組織代謝生物学 吉子 裕二 教授、応用生命
科学部門歯周病態学 柴 秀樹 准教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行ならびに論文作成に際し、直接御指導いただきました本
学総合健康科学部門健康増進歯学 鈴木 茂樹 助教に深く感謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたりベクターの供与を受けました Dr. Yoshi Yamada,
National Institute of Dental and Craniofacial Research/National Institute of
Health, USA に深く感謝いたします

また、常日頃より心温かいご支援を頂きました本学総合健康科学部門健康増
進歯学の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた祖父母、
両親と兄に心から感謝いたします。

2013 年 3 月

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻

先進医療開発科学講座歯周病態学

小武家 誠司

目 次

第1章 序 論	3
第2章 実 験	
第1節 通常型 DPP タンパク質、 インテグリン結合領域改変型 DPP タンパク質及び SSD 繰り返し配列改変型 DPP タンパク質の作製	6
第2節 各種組み換え DPP タンパク質の細胞接着能の検討	13
第3節 DPP 由来各種 RGD 近傍合成ペプチドによる 細胞接着阻害能の検討	17
第4節 各種組み換え DPP タンパク質の <i>in vitro</i> における 細胞外基質石灰化への効果の検討	20
第3章 考 察	24
図	28
参考文献	52

第1章 序 論

硬組織再生治療は、外傷や疾患等によって生じた硬組織欠損に適応され、硬組織及びその周囲組織の構造及び機能を回復させる治療法であり、口腔領域では歯槽骨・セメント質・歯周靭帯の再生や象牙質歯髓複合体を形成することを目指したものがある。現在の歯科領域における再生治療法は **Guided tissue regeneration (GTR)** 法や **Emdogain®** 療法による歯周組織再生誘導法が臨床で用いられており、保存修復学的手法としては、水酸化カルシウム製剤による被蓋硬組織形成を伴った直接覆髓法も広義の意味で再生療法の一つとされる。しかし、**GTR** 法及び **Emdogain®** 療法では III 度の根分岐部病変や 1 壁性の骨欠損等の、欠損周囲残存骨からの十分な血液及び細胞の供給が困難な症例への適応は困難である [1]。また、水酸化カルシウム製剤による直接覆髓法は修復象牙質が菲薄かつ脆弱である [2]。このような背景から、より積極的に欠損部周囲の細胞に働きかけ、欠損部の再生を誘導し得る材料を開発することは、これら硬組織疾患の治療に有用である。

Dentin phosphoprotein (DPP) は硬組織特異的に存在する非コラーゲン性タンパク質であり、特に象牙質に豊富に存在する。ヒト象牙質は重量比で無機質が約 70%、有機質が約 20%、水分が約 10% で構成されている。有機質に含まれるタンパク質は主に **Type I collagen** であり、重量比で有機質の約 90% を占める [3]。非コラーゲン性タンパク質の中で最も多量に存在し、重量比でその約 50% を占めているのが **DPP** である [4~9]。**DPP** はヒト常染色体 4q21 に存在する **Dentin Sialophosphoprotein (DSPP)** 遺伝子にコードされており、**Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING)** ファミリーに属している [10~12]。**SIBLING** ファミリーは **DSPP**, **Dentin**

matrix protein 1 (DMP1), Bone sialoprotein (BSP), Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), Osteopontin (OPN) からなり、これらタンパク質は骨及び象牙質等の硬組織に高発現し、硬組織形成に重要な働きを担うと考えられている。

DSPP 遺伝子異常はヒト象牙質形成不全症 Dentinogenesis imperfecta (DGI) 及び象牙質異型性症 Dentin dysplasia (DD) を引き起こし、常染色体優性遺伝を示すことが知られている [13~17]。DGI は低石灰化を伴う象牙細管の異常な走行により脆弱な象牙質が形成され、早期の露髄、エナメル質の崩壊などが惹き起こされる。DD は歯根形成障害及び歯髄結石などが惹き起こされる。また、*Dspp* 遺伝子ノックアウトマウスでは、DGI に類似した表現型が報告されており、さらに硬組織石灰化を抑制する Biglycan 及び Decorin の象牙芽細胞による発現が増加し、肥厚した象牙前質に蓄積していることが確認され、正常硬組織では DSPP が Biglycan 及び Decorin の発現制御を担っていることが示唆されている [18, 67, 68]。

DSPP 遺伝子から転写・翻訳された DSPP は、翻訳産物の大半が Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) family により分解されて DPP となり象牙質に沈着する [19~24]。DPP はアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) からなるインテグリン結合配列を N 末端側に持ち、アミノ酸配列中心に高度にリン酸化された約 200 の連続したセリン-セリン-アスパラギン酸 (SSD) 繰り返し配列という二つの特徴的な領域を持つことがアミノ酸配列から明らかとなっており、我々の生体に存在するタンパク質の中で最も酸性度の高いタンパク質の一つであるとされる [30]。更に SSD 繰り返し配列の持つ高いカルシウム結合能により、DPP が細胞外基質の石灰化に重要な因子として働くと考えられている [25~27, 66]。一方、最近の報告において DPP は単に

基質の石灰化に寄与するだけでなく、細胞分化や形質転換を誘導する因子であることが明らかとなってきた [28, 29]。DPP は前骨芽細胞において Smad 1 のリン酸化を BMP 非依存的に促進し、 *Smad 6*, *Distal-less homeobox 5 (Dlx5)*, *Runt-related transcription factor 2 (Runx2)* などの標的遺伝子の発現を誘導することが報告されている。このように、DPP は細胞外基質、細胞刺激因子双方の機能を持つことから、硬組織再生に有用性が高いと考えられる。

また、DPP は哺乳類細胞での組み換えタンパク質の作製が非常に困難とされており [21]、哺乳類細胞の DPP 組み換えタンパク質を用いた実験報告は極めて少ない [21, 22]。そこで本研究では、組み換え DPP タンパク質の将来的な硬組織疾患治療への利用を想定し、哺乳類細胞による組み換え DPP タンパク質の高効率作製法を樹立し、また各種改変型 DPP タンパク質も同時に作製し、これら組み換えタンパク質を用いて硬組織再生に有益な構造を模索するための基礎的研究を行った。

第2章 実験

第1節 通常型 DPP タンパク質、インテグリン結合領域改変型 DPP

タンパク質及び SSD 繰り返し配列改変型 DPP タンパク質の作製

第1項 概要

組み換えタンパク発現用哺乳類細胞上清から陰イオン交換クロマトグラフィー及び 6xHis タグアフィニティー精製法によって各種組み換えタンパク質を作製した。また、6xHis に対する ELISA 法を用いて、各上清中の各種組み換えタンパク質発現量を定量・比較した。

第2項 材料及び方法

1) 細胞及び細胞培養

Epstein Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA) を導入したヒト胎児腎臓由来細胞株 293 EBNA を組み換えタンパク質作製に使用した。培養には 10 % fetal bovine serum (FBS) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) , 1 % penicillin-streptomycin (PS) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 及び 1 % L-glutamine (L-Gln) (Life Technologies) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (Life Technologies) を用いた。細胞株は 5 % CO₂, 37 °C の条件下で維持した。

2) pBluescript-DPP ベクターの作製

マウス切歯から RNAiso (TAKARA BIO Inc., Otsu, Japan) を用いて total RNA を抽出し、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis kit (TAKARA BIO Inc.) を用いて逆転写反応を行い complementary DNA (cDNA) を獲得した。得られた cDNA を鋳型として、制限酵素 Hind III サイトを付与した forward(5'-CGA TAAGCTTGATGATCCCAAGAGCAGCGACGAATCTAATGG AAGTGACGGAAGT-3')と BamH I を付与した reverse (5'-CGAGGGATCCCT AATCATCACTGGTTGAGTGGTTACTGTCACTGCCTTCACTGTC-3') primer を用いて KOD-Plus-Neo (TOYOBO Co., Ltd, Osaka, Japan) により DPP coding region を増幅した。得られた増幅産物を制限酵素 Hind III/ BamH I で処理した後、1.2 % agarose gel, TAE buffer にて電気泳動を行い、0.05 mg/ml 臭化エチジウムにて染色した。約 1.7 kb のバンドを採取し、ゲルに含まれる DNA を抽出し、その DNA を pBluescript II SK+ ベクター (図 1) に対して T4 DNA Ligase (TAKARA BIO Inc.) を用いてライゲーションし、pBluescript-DPP ベクターを確立した。得られたベクターを E. coli HST 08 Premium Competent Cells (TAKARA BIO Inc.) に形質転換しベクターを増幅した。DNA シークエンス解析により pBluescript-DPP ベクターの塩基配列を確認した (図 3)。

3) 通常型 DPP 及び SSD 繰り返し配列短縮型 DPP 発現ベクターの作製

pBluescript-DPP ベクターから Hind III/ BamH I で切り出した DPP coding region を上記と同様の方法で DNA をゲルから抽出し、pCEPPur Δ ベクター (図 1) に T4 DNA Ligase を用いてライゲーションし、組み換え DPP タンパク質発現ベクターを樹立した。pBluescript-DPP ベクターの解析結果と比較して

完全に一致するものを pCEP-Full とした。

また、DPP を組み込んだベクターをコンピテントセルに導入する際に、一定の割合で短縮された SSD 繰り返し配列を持つコロニーが出現した。この現象を利用し SSD 繰り返し配列短縮型 DPP 発現ベクターを作製した。pCEP-Full と比較して塩基対数が減少しているものを 3 種選択し、長いものから pCEP-Long, -Middle, -Short とした。DNA シーケンス解析を行い pCEP-Full と配列を比較した。

4) インテグリン結合領域改変型 DPP 発現ベクターの作製

pBluescript-DPP ベクターをテンプレートに、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いてインテグリン結合領域である RGD 配列中の D をコードする塩基配列を、E をコードする塩基配列に置換し、非インテグリン結合型 RGE (アルギニン-グリシン-グルタミン酸) を持つ pCEP-RGE を得た。

5) 293 EBNA 細胞への遺伝子導入及び培養上清の回収

pCEP-Full, -Long, -Middle, -Short, -RGE それぞれを 293 EBNA 細胞に X-treme GENE HP (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて遺伝子導入し、puromycin (5 µg/ml) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 存在下で 2 日間選択培養を行った後に、生存・増殖した細胞を puromycin (0.5 µg/ml) 存在下で維持し安定発現株とした。得られた安定発現株は 15 cm ディッシュ 10 枚に播種し、コンフルエントになるまで培養した後に、5 % FBS, 1 % PS, 1 % L-Gln, 1× ITS (Insulin 5 µg/ml, Transferrin 5 µg/ml, Selenious acid 5 ng/ml) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 含有 DMEM 培地に交換

し 2 日間培養した。その後、無血清 DMEM 培地 (1 % PS, 1 % L-Gln, 1 × ITS) で 5 日間培養し上清を回収した。培地は 24 時間毎に交換・回収した。

6) 組み換えタンパク質の精製

回収した無血清培養上清は、 Tris-HCl (pH 7.6) で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー (Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) にて粗分画・精製した。その後、 Tris-HCl (pH 7.6) で平衡化した 5 及び 1 ml サイズの Hi Trap Q Column (GE Healthcare UK Ltd.) にて更に精製・濃縮を行った。その後、0.1~1.0 M NaCl 含有 Tris-HCl で分画を行った後に、目的組み換えタンパク質の存在する分画を、抗 DPP 抗体を用いたウエスタンブロット法にて検出した。その後 50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 10 mM イミダゾール溶液に対して透析を行った後に、Ni-NTA agarose (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて目的組み換えタンパク質を最終精製した。得られた組み換えタンパク質をリン酸緩衝溶液 (PBS) に対して透析を行い、組み換えタンパク質溶液とした。純度をウエスタンブロット法及び Stains-all 染色 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) で検討し、濃度を BCA assay kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) にて測定した。

7) SDS-PAGE、Stains-all 染色及びウエスタンブロット法

各種精製組み換えタンパク質サンプルは dithiothreitol で変性させ後、NuPAGE® Bis-Tris 4-12% gel (Life technologies), MOPS buffer (Life technologies) で電気泳動を行い分離した。組み換え DPP タンパク質は酸性度が高く、クマシーブリリアント染色での検出が困難であるため、ゲルを 25 % イソプロパノールで 180 分固定した後に、Stains-all (Sigma-Aldrich) で染色し

た。また同様に分離した精製タンパク質を PVDF メンブレンに転写し、DPP タンパク質の C 末端アミノ酸残基を認識するラビット抗 DPP ポリクロナール抗体を用いて DPP タンパク質を検出した。

8) 組み換え DMP-1 タンパク質の作製

マウス切歯由来の mRNA から DMP-1 遺伝子を獲得し、上記と同様の方法を用いて組み換え DMP-1 タンパク質 (rDMP-1) を精製した。

9) 組み換えタンパク質発現量の測定

得られたそれぞれの安定発現細胞株を 15 cm ディッシュ上でコンフルエントになるまで培養した後に、無血清培地に交換後 24 時間で上清を回収した。6xHis を利用した Immobilizer™ Nickel-chelate clear plate (Thermo Scientific Nunc, Waltham, MA, USA) を用いて、0~800 ng/ml の範囲で段階希釈した精製済み rDPP-Short タンパク質(pCEP-Short 由来) から検量線を作成し、各培養上清中の組み換えタンパク質量を定量した。

10) 統計学的解析

得られたデータを平均 ± 標準偏差 (SD) とし、分散分析 (ANOVA) と Tukey の方法による多重検定を行い、有意確率を $P<0.05$ とした。

第3項 結果

アガロース電気泳動にて、様々な長さに短縮された *Dpp* 遺伝子を確認した (図 2)。最も長い塩基数を持つコロニーから得られた塩基配列(pCEP-Full) のシーケンス解析を行ったところ、その塩基配列から推測されるアミノ酸配列は Consensus CDS データベースの DPP アミノ酸配列と一致した。また、SSD 繰り返し配列が短縮された長さの異なるベクターを 3 種 (長いものから pCEP-Long : -Middle : -Short と表記) 選択し、それらのシーケンス解析結果から SSD 繰り返し配列の長さの比は pCEP-Full : -Long : -Middle : -Short = 100 : 60.87 : 35.87 : 4.08 となった。それぞれのシーケンス配列を 図 3 に示した。

遺伝子導入された 293 EBNA 細胞の培養上清を回収し、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画で粗精製を行ったところ、0.4 ~ 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl の分画ですべての DPP タンパク質が溶出された (図 4)。クロマトグラフィーは容積の大きいものから小さいものへ異なるカラムで 3 回行うことでタンパク質溶出液を濃縮した。最終ステップとして用いた His-tag アフィニティー精製により、精製前後で比較すると、低分子量のタンパク質が効率的に除去され、全長 DPP 組み換えタンパク質 rDPP-Full (pCEP-Full 由来) は約 64 kDa, rDPP-Long (pCEP-Long 由来) は約 50 kDa, rDPP-Middle (pCEP-Middle 由来) は約 40 kDa, rDPP-Short (pCEP-Short 由来) は約 27 kDa に Stains-all 染色でそれぞれシングルバンドを示し、純度の向上が確認できた (図 5)。精製された各組み換えタンパク質は、抗 DPP 抗体を用いたウェスタンブロット解析にて Stains-all 染色で検出したバンドと同位置の分子量

を示したことから、本実験で得られた各種組み換えタンパク質は実験に供するのに十分な純度であることが明らかとなった (図 6)。

ELISA 法による無血清培養上清中の組み換えタンパク質の濃度を測定した結果から(図 7)、 rDPP-Full とモル比で比較すると、rDPP-RGE (pCEP-RGE 由来) は有意な差が認められず、rDPP-Long は約 5.2 倍、 rDPP-Middle は約 7.1 倍、 rDPP-Short は約 11.1 倍の量の組み換えタンパク質を産生していることが明らかとなり、SSD 配列の長さでタンパク質の産生量は逆相関する事が示唆された。更に、rDPP-Full と rDMP-1 の無血清培養上清中の発現量を、精製組み換えタンパク質の濃度測定から計算し比較した。rDPP-Full は培養上清中 0.125 $\mu\text{g/ml}$ であるのに対し、 rDMP-1 は 1.408 $\mu\text{g/ml}$ であることが推算された。

第 2 節 各種組み換え DPP タンパク質の細胞接着能の検討

第 1 項 概 要

精製済み各種組み換えタンパク質をコートしたプレート上に細胞を播種し、その接着細胞数を定量的に評価した。

第 2 項 材料及び方法

1) 細胞及び細胞培養

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 clone4 と、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 MG63 を本実験に使用した。培養にはそれぞれ 10 % FBS, 1 % PS, 1 % L-Gln 含有 Alpha modification of Eagle's minimum essential medium (α -MEM) (Life Technologies) 及び DMEM high glucose (Life Technologies), を使用し、5 % CO₂, 37 °C の条件下で維持した。

2) 細胞接着実験

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Life Technologies) で 100 nM にそれぞれ希釈した rDPP-Full, rDPP-Short, rDPP-RGE, rDMP-1, vitronectin (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 溶液で Immulon™ 4HBX 96 well プレート (Thermo Scientific) を 4 °C 18 時間コートした (50 μ l / well)。その後、1 % BSA (bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich) / DPBS 溶液 100 μ l で 37 °C 1 時間ブロッキングを行った。各種細胞を 5 mM EDTA, 含有 DPBS 溶液中で 20 分間室温静置後、無血清培地

RPMI 1640 (Life Technologies) で懸濁し回収した。その後、 5×10^4 個/50 μl /well の細胞を無血清下でプレートに播種した。37 °C 1 時間静置後、無血清培地で 2 回洗浄し未接着細胞を除去した。接着細胞は 3.7 % ホルムアルデヒドで 10 分間固定後 0.2 % クリスタルバイオレット染色液にて 10 分間室温で染色した。各ウェルは 3 回蒸留水で洗浄した後に一晚室温で乾燥した。各 well に 150 μl の 1 % SDS 溶液を加え 2 時間室温で振盪させた後、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo Scientific) を用いて吸光度 (570nm) を測定し細胞接着数を定量した。更に、二価陽イオン添加による細胞接着能への影響の検討には、無血清培地で細胞を懸濁する際に、それぞれ 1 mM MnCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 を添加した。

4) 断片化 rDPP-Full, rDPP-Short, rDPP-RGE の細胞接着実験

以後の実験に使用する NaOH 濃度の検討のため、BSA を 0.03 N, 0.3 N または 1.5 N の NaOH で室温 16 時間処理し、BSA の分解程度を銀染色によって解析した。次に、rDPP-Full, rDPP-Short, rDPP-RGE を 0.3 N NaOH 溶液で室温 16 時間静置後に溶液を HCl で中和し、100 nM に調製された各組み換えタンパク質溶液 50 μl でプレート (Immulon 4HBX) を 4 °C 18 時間コートした。その後、上記の細胞接着実験と同様の手法で細胞接着量を定量した。

5) 統計学的解析

得られたデータを平均 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。また、分散分析 (ANOVA) と Tukey の方法による多重比較検定を行い、有意確率を $P < 0.05$ とした。

第3項 結果

20 または 100 nM の rDMP-1 及び vitronectin をコートしたプレート上では、MC3T3-E1 (図 8 A) 及び MG63 細胞 (図 8 B) の有意な接着を認めた。一方、DPP-Full に対しては MC3T3-E1 及び MG63 細胞の明らかな接着を認めなかった (図 8 A, B)。次にインテグリン依存的細胞接着能を促進する二価陽イオンの効果を検討したが、rDPP-Full への MG63 及び MC3T3-E1 細胞の接着は $MnCl_2$, $CaCl_2$ 及び $MgCl_2$ を添加しても現出しなかった (図 9)。また、rDPP-Short 及び rDPP-RGE をコートしたプレートにおいても rDPP-Full 同様に明らかな細胞接着を認めなかった (図 10)。

そこで、DPP は分解されることによってその細胞接着能を示すようになるのではと考えた。まず、DPP の生理的な分解産物を模倣するために、NaOH で各種組み換え DPP タンパク質の加水分解を行い、その分解産物の細胞接着能を検討した。始めに BSA の分解を指標に、実験に供する NaOH 濃度決定を銀染色法により解析した。図 11 に示す通り、レーン 4 の NaOH 非処理群と比較すると、レーン 1 の 1.5 N NaOH 処理群では、55 kDa 以上にみられた非分解 BSA が完全に分解され、明瞭なバンドが認められなかった。また、レーン 3 の 0.03 N NaOH 処理群では、明らかな分解を認めず非処理群と同等であった。一方、レーン 2 の 0.3 N NaOH 処理群では約 10 及び 16 kDa 付近に明瞭なバンドを認め、BSA がこれらサイズのポリペプチドに効率的に分解されていることが示唆された。そこで、この 0.3 N NaOH の濃度で各種組み換え DPP タンパク質の加水分解を行い、生理的分解を模倣した。図 12 に示す通り、分解された rDPP-Full と rDPP-Short をコートしたプレートでは MC3T3-E1

及び MG63 細胞の接着促進が見られた。また、興味深いことに、断片化された rDPP-RGE は細胞接着能を示さなかった。すなわち、分解された rDPP-Full と rDPP-Short が接着能を示し、分解された rDPP-RGE は示さなかったことから、DPP は成体内で分解されることで RGD 配列依存的に細胞接着を発現することが示唆された。

第3節 DPP 由来各種 RGD 近傍合成ペプチドによる細胞接着阻害能の検討

第1項 概要

前節までの結果を踏まえ、RGD 近傍のアミノ酸切断が RGD 依存性の細胞接着能の現出に必須であると考え、その開裂部位を、合成ペプチドによる細胞接着阻害実験によって検討した。

第2項 材料及び方法

1) DPP 由来各種 RGD 近傍合成ペプチドの作製

15 種の合成ペプチドを 95 % 純度保証でオペロンバイオテクノロジーに委託し合成した。各種合成ペプチドのアミノ酸配列を以下に示す。Pep-1 (SRGDA), RGD 両端に 1 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-2 (SGSRGDASY), RGD 両端に 3 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-3 (NESGSRGDASYTS), RGD 両端に 5 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-4 (SANESGSRGDASYTSDE), RGD 両端に 7 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-5 (SESANESGSRGDASYTSDESS), RGD 両端に 9 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-6 (GSRGDAS), RGD 両端に 2 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-7 (GSRGDASY), RGD N 末端に 2 アミノ酸, C 末端に 3 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-8 (SGSRGDAS), RGD N 末端に 3 アミノ酸, C 末端に 2 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-9 (SESANESGSRGEASYTSDESS), Pep-5 の RGE 非活性型ペプチド、Pep-10 (SDESDTNESESANESGSRGDA), RGD N 末端に 16 アミノ酸, C 末端に 1 アミノ酸付与されたペプチド Pep-11

(SDESDTNSSESANESGSRGEA), Pep-10 の RGE 非活性型ペプチド、Pep-12 (SRGDASYTSDESSDDDNDSDSH), RGD N 末端に 1 アミノ酸, C 末端に 16 アミノ酸付与されたペプチド、Pep-13 (SRGEASYTSDESSDDDNDSDSH), Pep-12 の RGE 非活性型ペプチド。各種合成ペプチドのアミノ酸配列の比較を表 1 に示す。

2) 試 薬

環状 GRGDSP (RGD 依存性細胞接着阻害因子) は AnaSpec (Fremont, CA, USA) から購入し、本実験では細胞接着阻害効果の比較に使用した。

3) 細胞接着阻害実験

Immulon™ 4HBX 96 well プレートを上記同様の方法で vitronectin (100 nM) コートした。各種細胞を 5 mM EDTA, 含有 DPBS 溶液で 20 分間室温静置後、無血清 RPMI 1640 で懸濁することで回収した。懸濁した細胞は 1 mM の合成ペプチドで室温 15 分間プレインキュベート後、50 μ l の無血清培地中に 5×10^4 個の細胞量でプレートに播種した。37 °C 1 時間培養後、無血清培地で 3 回洗浄し未接着細胞を除去した後に、上記同様に細胞接着量を定量した。

4) 統計学的解析

得られたデータを平均 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。また、分散分析 (ANOVA) と Tukey の方法による多重比較検定を行い、有意確率を $P < 0.05$ とした。また、比較対象とするサンプル (各図に記載) を細胞接着量 100 % とし、その他のサンプルを百分率で表示した。

第3項 結果

図 13 A, B に示す通り、RGD 配列から両端に 1, 3, 5, 7, 9 残基付加した合成ペプチドのうち、両端 1 残基付与の Pep-1 のみが、MG63 及び MC3T3-E1 細胞の vitronectin への接着を阻害し、この細胞接着阻害効果は、環状 GRGDSP の効力とほぼ同等であった。RGD 両端 3 残基付加では阻害効果を示さず、両端 1 残基付加で示したことから、次に、RGD 配列両端に 2 残基付加した合成ペプチド Pep-6 の阻害効果を検討した。図 13 C, D に示す通り、Pep-6 は Pep-1 ほどの阻害効果を示さず、N 末端又は C 末端どちらかが 2 残基付加した Pep-7 及び Pep-8 も、いずれも両端に 1 残基付加した Pep-1 と同等の接着阻害を示さなかった。さらに、N 末端が保存され C 末端が 1 残基である Pep-10 と、C 末端が保存され N 末端が 1 残基である Pep-12 では、どちらも細胞接着阻害を示した (図 14)。しかし、RGD 配列を RGE にそれぞれ置換した Pep-11 及び Pep-13 では細胞接着阻害を示さず、この阻害効果は RGD 配列依存的であることが示唆された (図 14)。

以上から、DPP の RGD 配列がインテグリンに結合し機能を発現するためには、RGD 配列から 1 及び 2 残基目間でのアミノ酸切断が必須であり、N 末又は C 末端側どちらか一方の分解が必要であることも明らかとなった。

第4節 各種組み換え DPP タンパク質の *in vitro* における 細胞外基質石灰化への効果の検討

第1項 概要

R. Dorvee. & L. Boskey. らによって確立された Hydrogel-based double-diffusion system を用いて無細胞状況下の生体硬組織細胞外基質を模したゼラチンゲル内で、沈着したリン酸カルシウムのカルシウムイオン量及び、リン酸イオン量を測定することによって DPP タンパク質のリン酸カルシウム沈着促進能を検討した [39~41]。このシステムは Dynamic system に分類され、Static system [42, 43] と比較すると、リン酸カルシウム沈着の促進及び抑制両方を比較することが可能であり、未知のサンプルを検証するのに有効である。

第2項 材料及び方法

1) 細胞外基質を模倣したゲルの作製

6 cm に切断した 10ml ディスポーザブルピペット (Becton, Dickinson and Company) に、10% (w/v) ゼラチンゲル (Type A, bloom 225, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), 150mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma-Aldrich), 0.01% sodium azide (Nacalai Tesque) を充填したものを用意した。Type I collagen は Collage™ (CollPlant Ltd., Kiryat Shmona, Israel) を使用した。中央部には、BSA, Type I Collagen, rDPP-Full, -Long, -Middle, -Short 単体またはハイドロキシアパタイト粉末 (Sigma-Aldrich, 粒径 200 nm 以下) と混合したものをそれぞれ添加したゼラチンゲルを配置した。この際、ゼラチンの濃

度は 10%、ハイドロキシアパタイトの濃度は 0.25 mg/ml となるように調整した。

2) 細胞外基質石灰化モデル及び石灰化実験

上記のゲルを充填したピペットの両端にそれぞれ送液チューブを連結し、一方にはカルシウム溶液 (100 mM CaCl_2 (Nacalai Tesque) , 150 mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma-Aldrich) , 0.01% sodium azide) を、もう一方にはリン酸溶液 (100 mM $(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$ (Sigma-Aldrich) , 150 mM Tris-HCl pH 7.4 (Sigma-Aldrich) , 0.01% sodium azide) を、それぞれ 4L のリザーバーから送液ポンプ (MasterFlex 7554-80, Yamato Scientific Co., Ltd, Tokyo, Japan) で循環させた (図 15)。

送液開始後 24 および 120 時間後に各ゼラチンゲルをピペットから取り出し、組み換えタンパク質を添加した部位を中心に 150 μl 分のゲルを切り出した。更に切り出したゲルを 2N HCl で 50 °C 120 分間加水分解した。加水分解により液化したサンプル中のカルシウムイオンとリン酸イオン量をそれぞれ QuantiChrom™ Calcium Assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) と Malachite Green phosphate Assay kit (BioAssay Systems) を使用して定量した。

3) 統計学的解析

得られたデータを平均 \pm 標準偏差 (SD) とし、分散分析 (ANOVA) と Dunnett の方法による多重比較検定を行い、有意確率を $p < 0.05$ とした。

第3項 結果

まず、10%ゼラチンゲルのみで、カルシウム溶液とリン酸溶液両方を循環させ、24 及び 120 時間後にゼラチンゲルのカルシウム補充側から 0~3 mm, 10~13 mm, 25.5~28.5 mm, 30.5~33.5 mm, 47~50 mm, 57~60 mm に位置するゲルを回収した。また、カルシウム溶液のみと、リン酸溶液のみを循環させたゼラチンゲルからも同様にゲル断片を回収した。時間経過によって中央部のイオン濃度が上昇していく様子が観察された(図 16)。カルシウムイオンの濃度勾配はリン酸イオンの有無にかかわらず経時的にカルシウムイオン供給側から直線的に減少した状態に平衡化され、またリン酸イオンの濃度勾配はカルシウムイオンの有無にかかわらず経時的にリン酸イオン供給側から直線的に減少した状態に平衡化することが明らかとなった。ゲルの中央部に石灰化物沈着を促進させる物質が存在しているならば、石灰化物沈着開始時期が早まり、120 時間後には石灰化物の蓄積量でその促進能を比較できることが示唆された。

次に、各種 DPP 組み換えタンパク質によるリン酸カルシウム形成への影響を検討するため、それぞれ rDPP-Full, rDPP-Long, rDPP-Middle, rDPP-Short, Type I Collagen をゲルに 50 µg/ml 添加し、120 時間後にゲルを回収した。タンパク質充填部のカルシウムイオン、リン酸イオンの蓄積は、共に Type I Collagen と比較して rDPP-Full において有意に増加していた。しかし、rDPP-Full は rDPP-Long, rDPP-Middle, rDPP-Short に対してはカルシウム、リン酸イオン共に有意差を認めなかった(図 17)。次に、組み換えタンパク質によるリン酸カルシウム結晶成長への影響を検討するため、結晶のコアとなるハイドロキシアパタイト粉末と共に、rDPP-Full, rDPP-Long, rDPP-Middle,

rDPP-Short, BSA をそれぞれ $15.625 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ (rDPP-Full 100 ng/ml 相当) ゲルに添加し、120 時間後にゲルを回収した。ゲルの回収部位は実験開始時よりも濃い白色沈着物が確認され、ハイドロキシアパタイトを核としたリン酸カルシウムの成長が示唆された。図 18 B に示す通り、リン酸イオンの蓄積は各種タンパク質添加サンプル間に有意差を認めなかった。一方、カルシウムイオンの蓄積では図 18 A に示す通り、rDPP-Full は BSA に対して有意に増加したが、rDPP-Long, rDPP-Middle, rDPP-Short に対してはその傾向を示すものの有意差を認めなかった。つまり、組み換え DPP タンパク質は単体でリン酸及びカルシウムイオンの集積を促進し、ハイドロキシアパタイト存在下では、核周囲のカルシウムイオン濃度の上昇を促すことが示唆された。

次に、ハイドロキシアパタイト存在下でカルシウムイオンまたはリン酸イオンのみを循環させた場合についても検討した。いずれの条件に置いても、添加タンパク質の種類に関わらず、ハイドロキシアパタイト添加部位は実験開始時から回収するまで色調に変化が無く、カルシウムイオンまたはリン酸イオンの集積が見られなかった。興味深いことに、有意差は認められなかったものの、カルシウムの蓄積は rDPP-Full 添加ゲルにおいて、rDPP-Long, rDPP-Middle 及び rDPP-Short 添加ゲルと比較して高い傾向を示した (図 19)。つまり、組み換え DPP タンパク質は、カルシウムイオンを誘引または結合する能力を持つことが示唆され、SSD 繰り返し配列の長さに比例してイオン蓄積量が増加する傾向を示した。

第3章 考察

哺乳類細胞を用いた組み換えタンパク質は、適切な翻訳後修飾とフォールディングを受け天然状態に近い形態で産生され、臨床応用を目的とした機能性タンパク質を作製するにあたり有益な手法である。本研究で作製した組み換え DPP タンパク質は Stains-all 染色で強酸性を示す深青色を呈したことから、SSD 繰り返し配列中の大部分のセリン残基がリン酸化修飾されているとされる象牙質由来 DPP に近い生理学的状態であると言える [61]。RGD 配列を持つ細胞外基質タンパク質の多くはそれぞれ固有のインテグリン受容体を介して細胞刺激を惹起する [44~48]。全ての SIBLING タンパク質は RGD 配列を持ち DMP-1 は $\alpha\beta3$ 、BSP は $\alpha\beta3$ 及び $\alpha\beta5$ 、OPN は $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ 及び $\alpha5\beta1$ などといった受容体を介して細胞接着等の発現に関与している [12, 31, 32, 38, 49~51, 55]。しかし、本実験結果から DPP は RGD 配列を含有するものの、インテグリン依存的細胞接着を増強することが知られている二価陽イオン ($MnCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$) [36, 37] 添加の有無に関わらず、DMP-1 や vitronectin のような細胞接着能を示さなかった (図 8)。そこで、DPP 固有の SSD 繰り返し配列の長い構造がインテグリンとの結合を阻害している可能性を推測した。しかし rDPP-Short を用いた実験 図 10 においても細胞接着能を示さなかったため、SSD 繰り返し配列は細胞接着に影響がないことが示された。

近年の研究から、SIBLING タンパク質である OPN, DMP-1 及び MEPE は細胞外で特定のプロテアーゼによる分解を受けることで RGD 配列やその他の機能領域が活性化されることが報告されている [31~35, 51~54]。そこで DPP も同様に活性化されるのではと考え、本研究においては NaOH による加水

分解で、このプロテアーゼ分解を模倣し、分解された DPP は RGD 配列依存的に細胞接着能を現出することを明らかにした (図 12)。他の SIBLING タンパク質と異なり、DPP 分泌後の細胞外における切断・活性化については十分に明らかにされていない。そこで、DPP が RGD 依存的に細胞接着能を発現するためのアミノ酸切断部位の同定を、合成ペプチドを用いた細胞接着阻害実験によって行った。その結果、RGD 配列近傍の N 末端側の G/S 間、もしくは C 末端側の A/S 間、いずれかが分解することでインテグリン依存的細胞接着が発現することが示唆された (図 14 A, B)。興味深いことに、生体内 DPP の一定量は断片化され存在しているとの報告があり [58~62]、ExPasy-ProtParam [56, 57] を用いたアミノ酸配列の疎水性解析では、RGD 配列近傍は高い親水性を示した (GRAVY value: マウス N 末端側 8 残基 = -2.175, マウス C 末端側 8 残基 = -1.278) ことから、分子表面に露出する RGD 近傍配列が、未知のプロテアーゼによる分解・切断を受け、RGD が分子表面に露出し、インテグリン受容体への会合が可能になると推測される。現在、DPP を分解するプロテアーゼとして唯一 Meprin 1 β (MEP 1 β) が存在するが、その開裂部位は本研究で着目している部位と異なる [20]。また骨芽細胞上清に大腸菌由来 DPP タンパク質を長期投与することによって硬組織形成分化を誘導するという報告があり [29]、本研究結果で存在が示唆されたプロテアーゼは、骨芽細胞様細胞の培養上清や細胞表面または生体の細胞外基質に存在していると考えられ、これを同定し、組み換え DPP タンパク質と共投与することで、より効率的にインテグリン依存的細胞刺激による機能発現を惹起できる可能性がある。

DPP の機能発現に分解が必要であることから、一つの仮説が考えられる。象牙質に沈着している未分解の DPP は、齶蝕等で象牙質が破壊された際に放出され象牙細管を通過し歯髄に到達し未同定のプロテアーゼに分解され活性化され

る。そして、インテグリンを介して未分化細胞を象牙芽細胞へと分化誘導し、修復象牙質を形成することが示唆される。未分解 DPP は細胞刺激因子とならないことで、過剰な細胞分化を避け、歯髄狭窄を抑制すると考えられる。

DPP のカルシウム結合能は SSD 繰り返し配列のリン酸化セリンに起因すると考えられており [25, 26]、そのため SSD 繰り返し配列の長短によってカルシウム蓄積量が増減する傾向を示したと考えられる (図 18, 19)。図 17, 18 から DPP はハイドロキシアパタイトによる石灰化核の有無に由らず、SSD 繰り返し配列のリン酸化セリンがカルシウムイオンを誘引及び結合し、蓄積することでリン酸カルシウムの沈着を促進することが示唆され、rDPP-Full が硬組織形成に最も効果的に機能することが示唆された。また、タンパク質の立体構造も石灰化誘導に影響すると考えられ SIBLING の一つである BSP は連続するグルタミン酸構造を持ち、ポリグルタミン酸タンパク質の二次構造がβシート様構造を呈し石灰化誘導を促進するという報告がある [42]。SSD 繰り返し配列の立体構造もカルシウムイオンと結合する際、同様のβシート様構造を形成し石灰化物の蓄積に影響する可能性が考えられている [25, 66]。本研究では、組み換えタンパク質の立体構造解析を行っていないため、DPP の立体構造及び SSD 繰り返し配列の短縮による構造変化は不明のままであるが、SSD 繰り返し配列を短縮した場合、その構造そのものあるいは硬組織形成能に影響があるのかを検討することは、硬組織誘導材料としてより効果的な構造を模索する上で今後の課題である。

図 17 ではリン酸カルシウム沈着促進能を比較するため、高濃度 (50 µg/ml) の組み換えタンパク質を用いた。また、ラット前歯から抽出した DPP は低濃度で石灰化を促進し、高濃度で石灰化を抑制するという過去の報告があるため [65]、予備実験を rDPP-Full のみ低濃度 (10 ng/ml ~ 10 µg/ml) で行い、カル

シウムの蓄積量が最も多かった 100 ng/ml ($15.625 \times 10^{-1} \mu\text{M}$) を選択し、図 18, 19 に示すヒドロキシアパタイト添加条件の実験を行った。そのため、図 18, 19 と比較して 図 17 の実験はカルシウム蓄積量が多い傾向を示したと考えられる。

本研究ではリン酸カルシウムの蓄積量をカルシウムイオン及びリン酸イオンの蓄積量に分けて測定し比較しており、沈着物の結晶構造解析を時間経過ごとに行っていないため、沈着の初期段階にヒドロキシアパタイト核が形成されているのか、石灰化核がヒドロキシアパタイト結晶に成長しているのかは不明である。しかし、過去に行われた同様の実験では、リン酸カルシウムのアモルファスを石灰化核に用いれば、ヒドロキシアパタイトの形成を確認したという報告がある [63~65]。そのため本研究において、沈着初期段階にアモルファスが形成され、120 時間後にヒドロキシアパタイト結晶が形成沈着している可能性が示唆された。また、本実験結果から、SSD 繰り返し配列は長いほど石灰化誘導に有利で、短いほど発現・精製に有利であるため、今後、硬組織形成細胞の石灰化誘導実験及びマウス骨折モデルでの骨折治癒において、本研究で作製した各種組み換えタンパク質の投与による影響を検討し、その有用性を *in vivo* で比較検討していく必要がある。

以上のことから、DPP は細胞外基質の石灰化に直接関与するのみならず、近傍細胞に積極的に働き掛け得る分子であることが明らかとなった。このことから DPP は硬組織再生治療に大きく寄与することが期待される。

図 1. 使用した発現ベクターの構造

各種ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) に存在する Hind III 及び BamH I 領域を制限酵素で切断し、そこへ各種 DPP coding region をライゲーションした。MCS: マルチクローニングサイト, pUC ori: 大腸菌複製起点, lac Z: *lacZ* 遺伝子, P lac: lac プロモーター, P CMV: Cytomegalovirus 由来プロモーター, EBNA-1: *Epstein Barr virus nuclear antigen 1* 遺伝子, Ori iP: Epstein Barr virus 由来複製起点, BM40 SP: 分泌シグナルペプチド, 6xHis: ヒスチジンタグ, Ampicillin Resist: アンピシリン耐性, Puromycin Resist: ピューロマイシン耐性。

図 2. 形質転換後の短縮された *Dpp* DNA

1.2 % agarose gel, TAE buffer, 0.05 mg/ml 臭化エチジウム染色像。各コロニーは SSD 配列が短縮された、異なったサイズの配列 *Dpp* DNA を持つ。① pCEP-Short, ② pCEP-Middle, ③ pCEP-Long, ④ pCEP-Full.

図 3. DNA シークエンス解析結果からのアミノ酸配列の推測

青文字はインテグリン結合領域 RGD を示す。赤文字は SSD 繰り返し配列を示す。数字はアミノ酸残基数を示す。rDPP-Full は 497 残基であり、(図 3 A) は N 末端側を (図 3 B) は C 末端側を示す。SSD 繰り返し配列の長さの比は Full : Long : Middle : Short = 100 : 60.87 : 35.87 : 4.08 であった。

図 4. 陰イオン交換クロマトグラフィー溶出分画

各種組み換え DPP タンパク質の分画抽出物を抗 DPP 抗体を用いたウエスタンブロット法にて検出した。0.4~0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl の分画で DPP タンパク質の溶出が確認できた。① 培養上清, ② フロ

ースルー, ③ 0.25 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, ④ 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, ⑤ 0.4 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, ⑥ 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, ⑦ 0.6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, ⑧ 1.0 M NaCl, 20 mM Tris-HCl.

図 5. アフィニティー精製 : His タグ

各種組み換えタンパク質の粗精製液は精製後に低分子量のタンパク質が除去されシングルバンドを示した。① 粗精製液, ② フロースルー, ③ 50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 10 mM イミダゾール溶液洗浄, ④ PBS 洗浄, ⑤ 250 mM イミダゾール, 0.3 M NaCl 溶出液.

図 6. 精製タンパク質の純度検討

各種精製組み換えタンパク質は Stains-all 染色で単一なバンドを認め、抗 DPP 抗体を用いたウエスタンブロットにより目的タンパク質であることが確認された。1. rDPP-Full, 2. rDPP-RGE, 3. rDPP-Long, 4. rDPP-Middle, 5. rDPP-Short.

図 7. 培養上清中の発現タンパク質量 : ELAISA 法

各種組み換えタンパク質の SSD 繰り返し配列の長さの減少に伴い、タンパク質の発現量は増加した。n = 3, 平均値 ± SD. p < 0.05, Tukey's test. 同一文字間に有意差なし.

図 8. 組み換えタンパク質に対する細胞接着量

各種タンパク質 20 または 100 nM でコーティングしたプレートに MC3T3-E1 (A), MG63 (B) を播種した。n = 3, 平均値 ± SD. *** p < 0.001, Tukey's test. rDMP-1 と比較.

図 9. 二価陽イオン添加時の細胞接着量

各種タンパク質 100 nM でコーティングしたプレートに それぞれ 1

mM MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂ を添加した培地に懸濁した MC3T3-E1 (A), MG63 (B) を播種した。n = 3, 平均値 ± SD. *** p<0.001 . Tukey's test. rDMP-1 と比較.

図 10. rDPP-Short, rDPP-RGE に対する細胞接着量

各種タンパク質 100 nM でコーティングしたプレートに MC3T3-E1 (A), MG63 (B) を播種した。n = 3, 平均値 ± SD. *** p<0.001, Tukey's test. rDMP-1 と比較.

図 11. BSA の加水分解処理: 銀染色

40 ng の BSA を 16 時間加水分解し、Tricine gel (Life technologies) にて SDS-PAGE 及び銀染色を行った。1. BSA + 1.5 N NaOH, 2. BSA + 0.3 N NaOH, 3. BSA + 0.03 N NaOH, 4. BSA.

図 12. 断片化した組み換えタンパク質に対する細胞接着量

0.3N NaOH にて断片化した各種組み換えタンパク質 (150 nM) でプレートをコーティングし、MC3T3-E1 (A), MG63 (B) を播種し 90 分培養した。n = 3, 平均値 ± SD. *** p<0.001, Tukey's test.

表 1. 各種合成ペプチドのアミノ酸配列

マウス由来の DPP を参考にして、合成ペプチドを作製した。RGD 配列を中心にしてアミノ酸配列を比較した。

図 13. 各種合成ペプチドによる細胞接着阻害

vitronectin 100 nM をコートしたプレートに、1 mM の各種合成ペプチドで 15 分プレインキュベーションした MC3T3-E1 (A, C), MG63 (B, D) を播種した。n = 3, 平均値 ± SD. *** p<0.001 Tukey's test. Pep-2 (100 % とする) と比較.

図 14. 各種合成ペプチドによる細胞接着阻害

vitronectin 100 nM をコートしたプレートに、1 mM の各種合成ペプチドで 15 分プレインキュベーションした MC3T3-E1 (A), MG63 (B) を播種した。n = 3, 平均値 ± SD. *** p < 0.001. Tukey's test. Pep-5 (100% とする) と比較.

図 15. 細胞外基質石灰化モデル

10 % ゼラチンゲル内の各種タンパク質の配置はリン酸溶液接触部から中央へ 32~34 mm の位置に設定した。

図 16. ゼラチンゲル内におけるイオン拡散

10 % ゼラチンゲル内の 24, 120 時間後のカルシウムイオン (A) 及びリン酸 (B) イオンの量を示す。Ca²⁺ はカルシウム溶液のみを循環させた場合。PO₄³⁻ はリン酸溶液のみを循環させた場合。Ca²⁺/PO₄³⁻ は両方の溶液を循環させた場合。n = 3, 平均値 ± SD.

図 17. 組み換えタンパク質添加時の Ca²⁺, PO₄³⁻ の蓄積

各種組み換えタンパク質 50 µg/ml をゲル中央部に添加し、120 時間後に回収したゲル中のカルシウムイオン (A), リン酸イオン (B) 量を測定した。n = 2, 平均値 ± SD. * p < 0.05, Dunnett's test. rDPP-Full と比較.

図 18. ハイドロキシアパタイト添加時の Ca²⁺, PO₄³⁻ の蓄積量

各種組み換えタンパク質 15.625×10⁻¹ µM (rDPP-Full 100 ng/ml 相当) をハイドロキシアパタイト 0.25mg/ml と共に ゲル中央部に添加し 120 時間後にゲルを回収した。n = 3, 平均値 ± SD. ** p < 0.01, Dunnett's test. rDPP-Full と比較.

図 19. ハイドロキシアパタイト添加、カルシウム溶液又はリン酸溶液のみ循環させた場合の Ca²⁺, PO₄³⁻ の蓄積量

各種組み換えタンパク質 $15.625 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ (rDPP-Full 100 ng/ml 相当) をヒドロキシアパタイト 0.25mg/ml と共にゲル中央部に添加し、120 時間後にゲルを回収した。n = 3, 平均値 \pm SD. ANOVA 有意差なし.

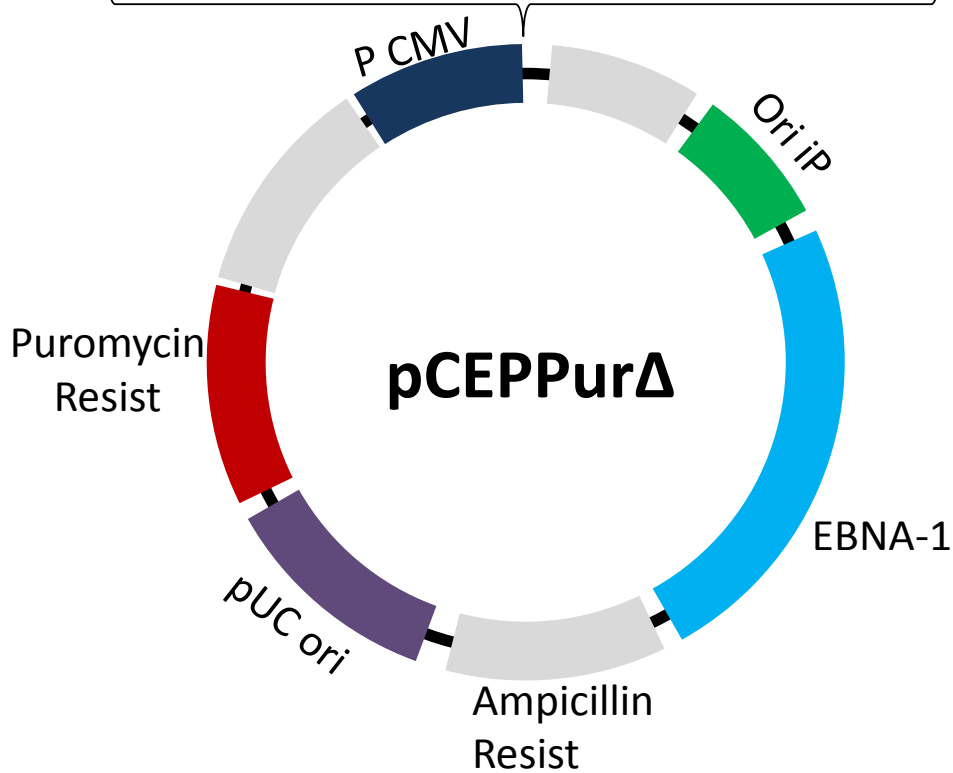
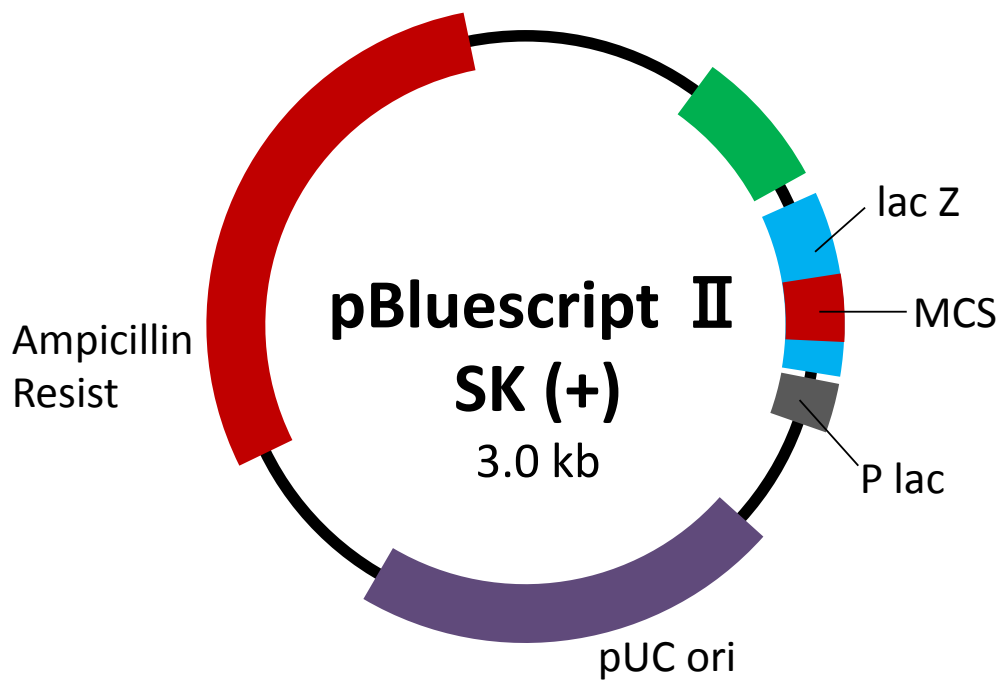


図 1. 使用した発現ベクターの構造

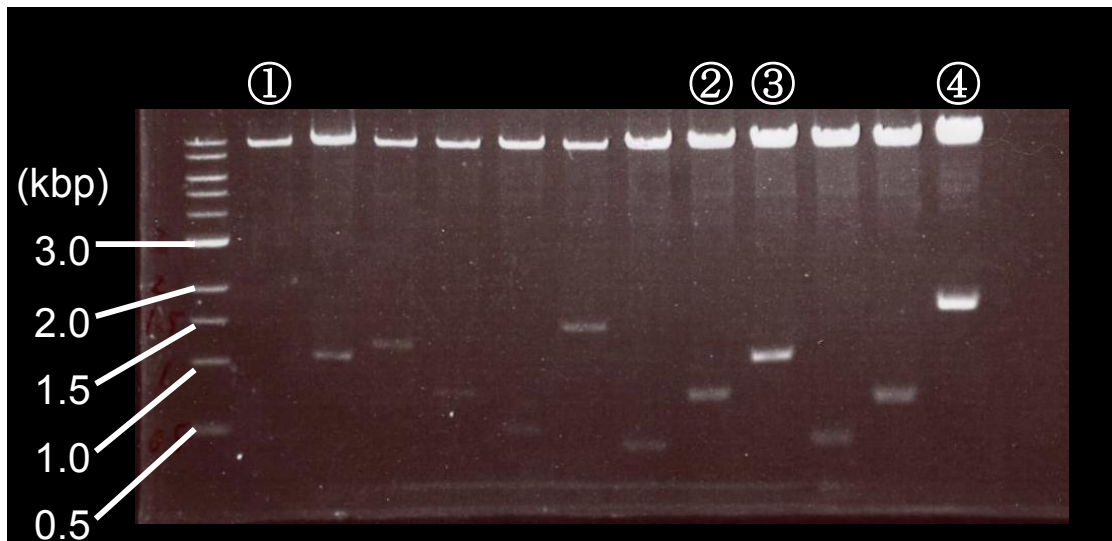


図 2. 形質転換後の短縮された *Dpp* DNA

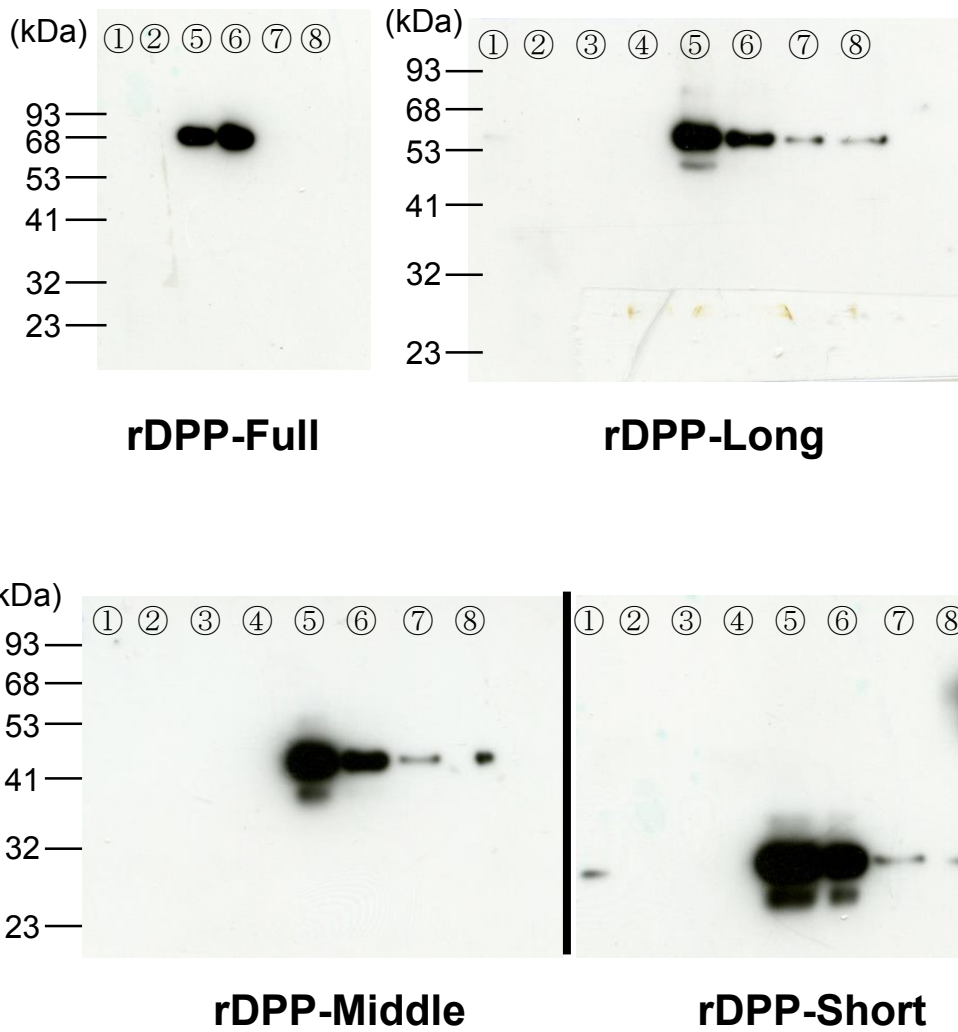


図 4. 陰イオン交換クロマトグラフィー溶出分画

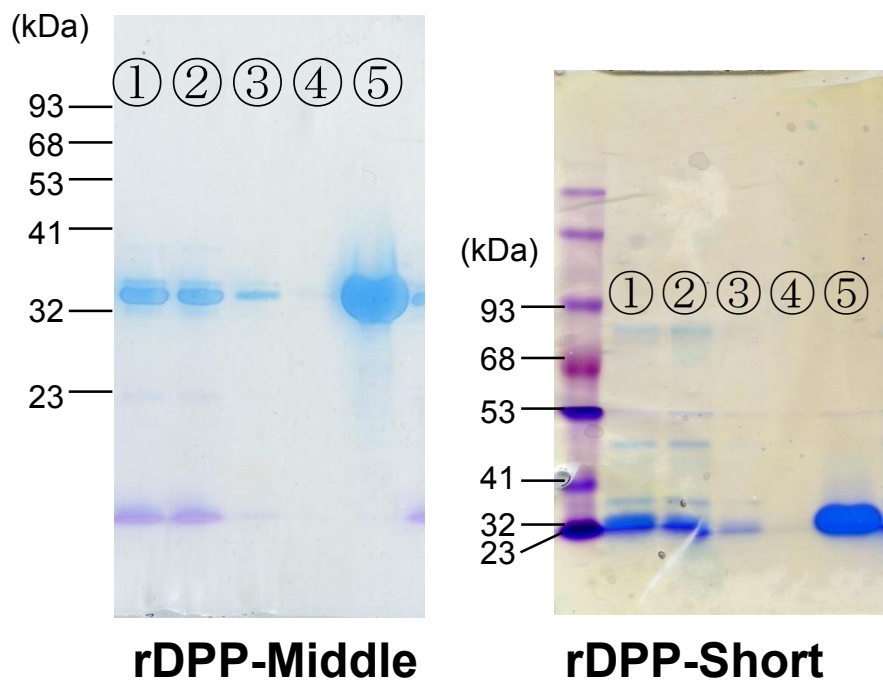
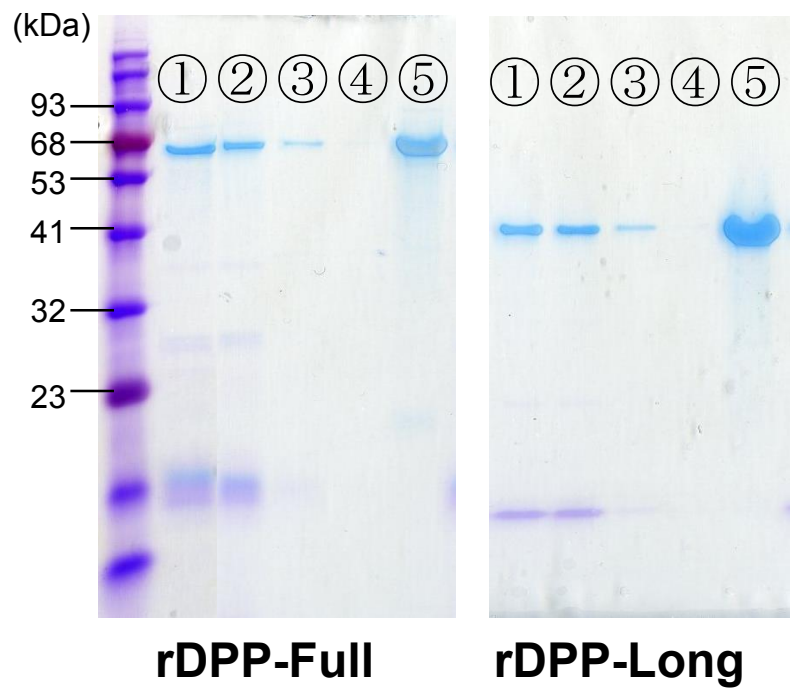


図 5. アフィニティー精製 : His タグ

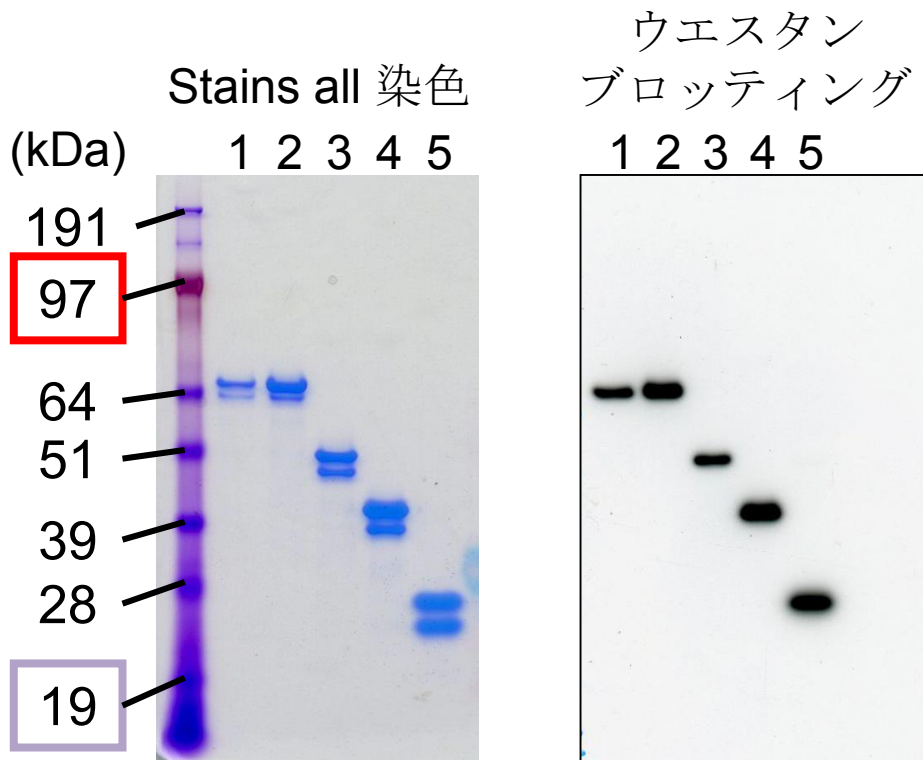


図 6 精製タンパク質の純度検討

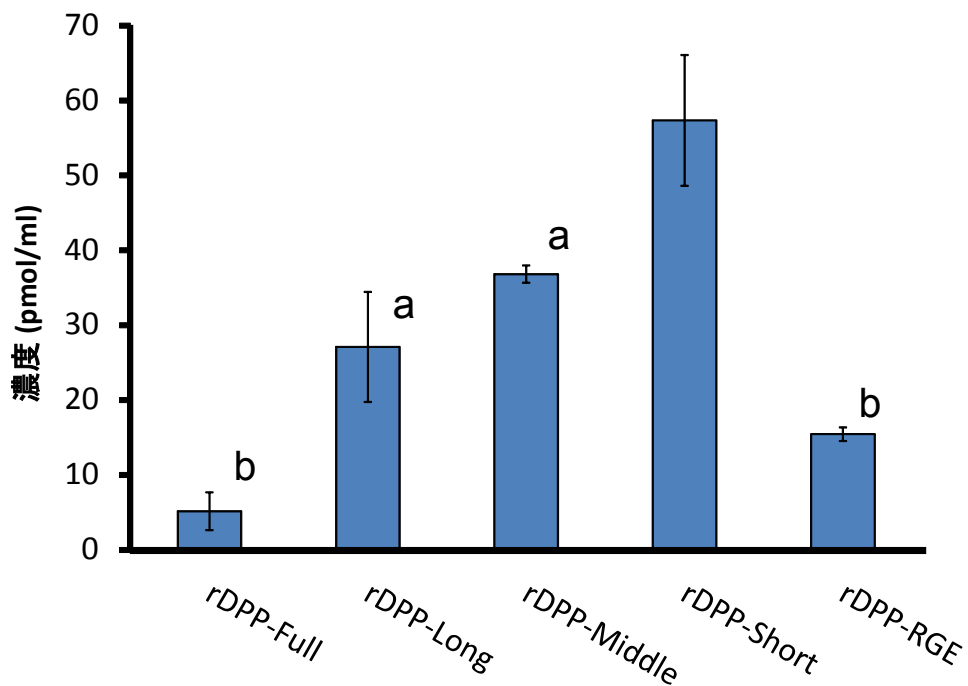


図 7. 培養上清中の発現タンパク質量: ELISA 法

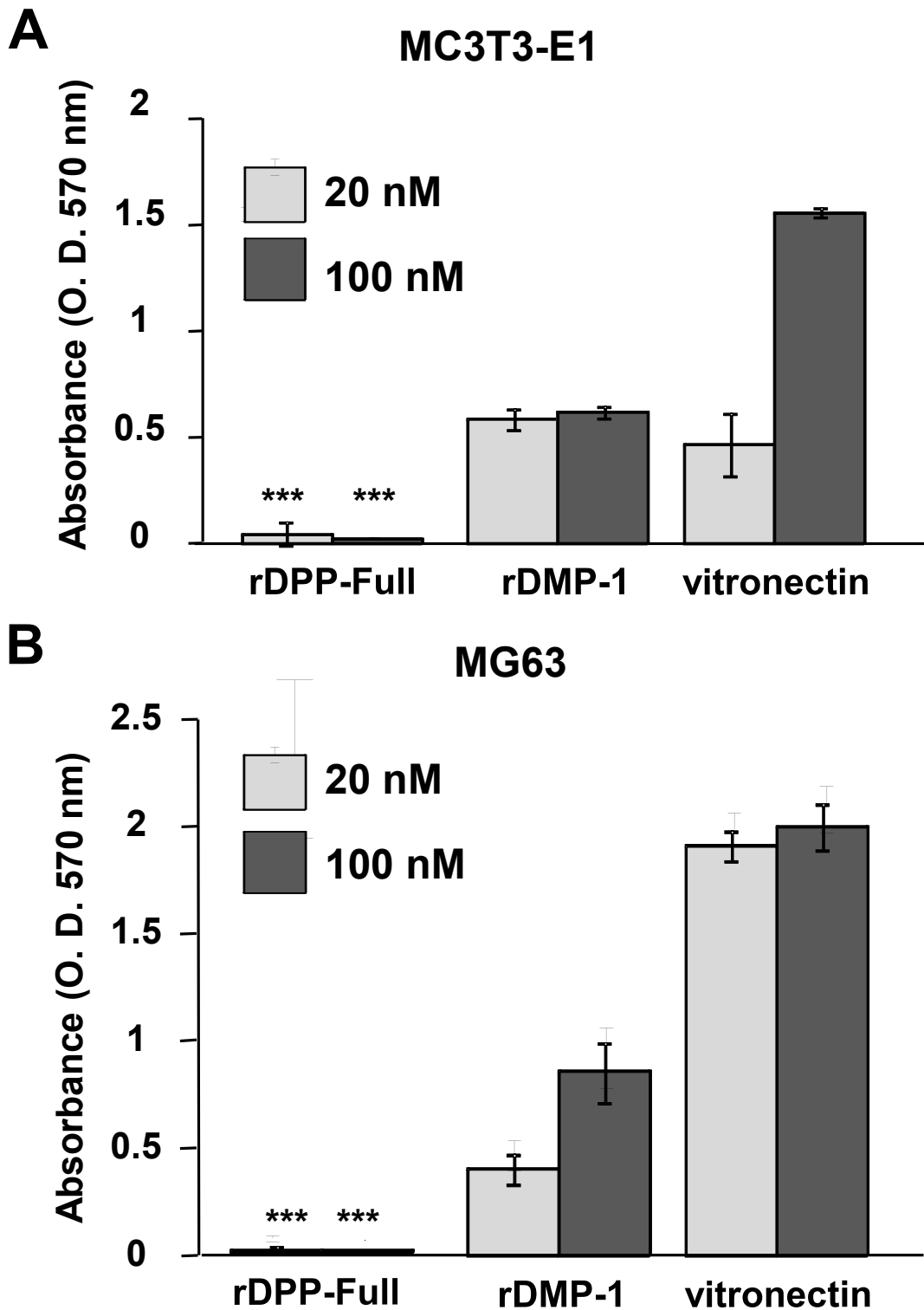


図 8. 組み換えタンパク質に対する細胞接着量

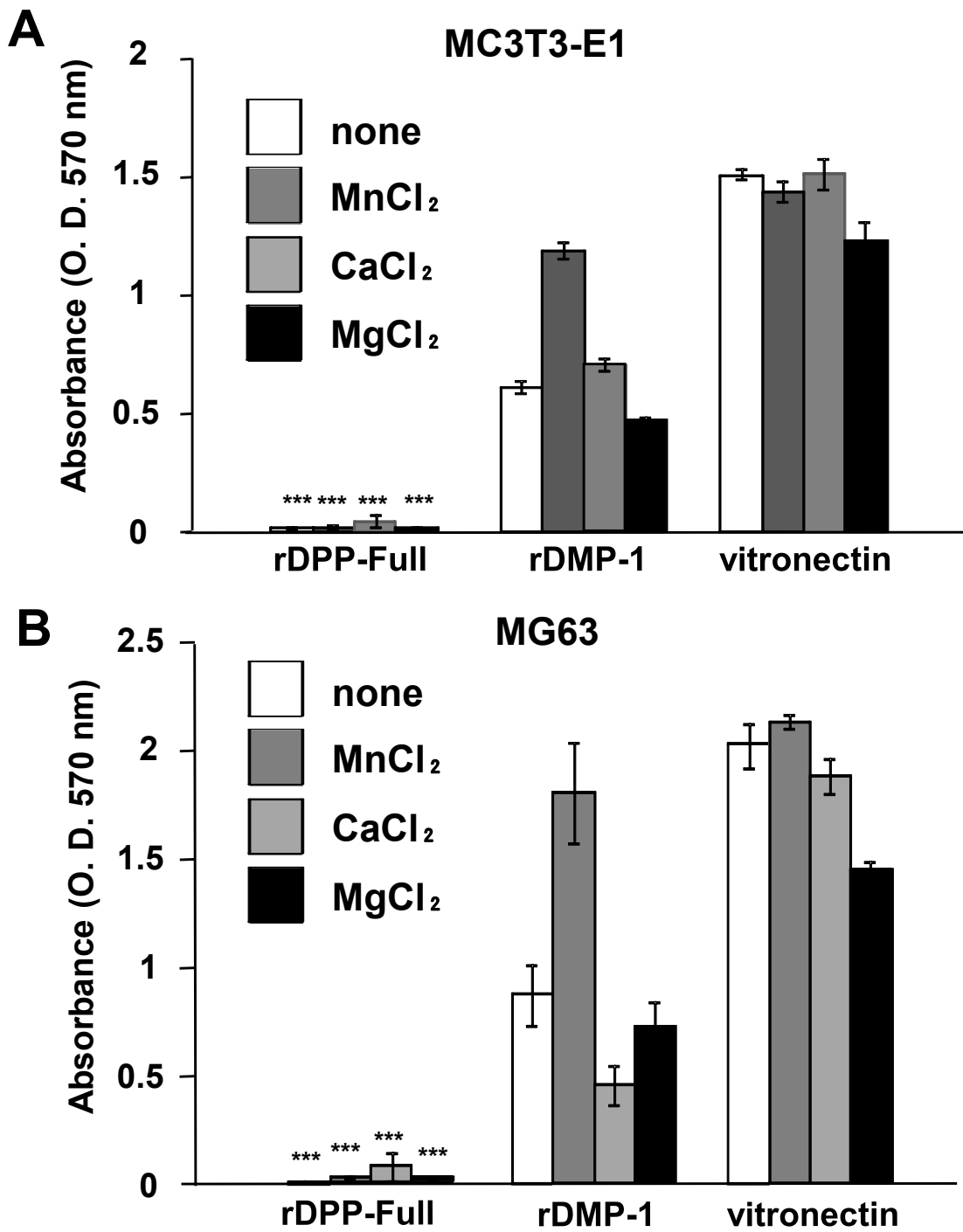


図 9. 二価陽イオン添加時の細胞接着量

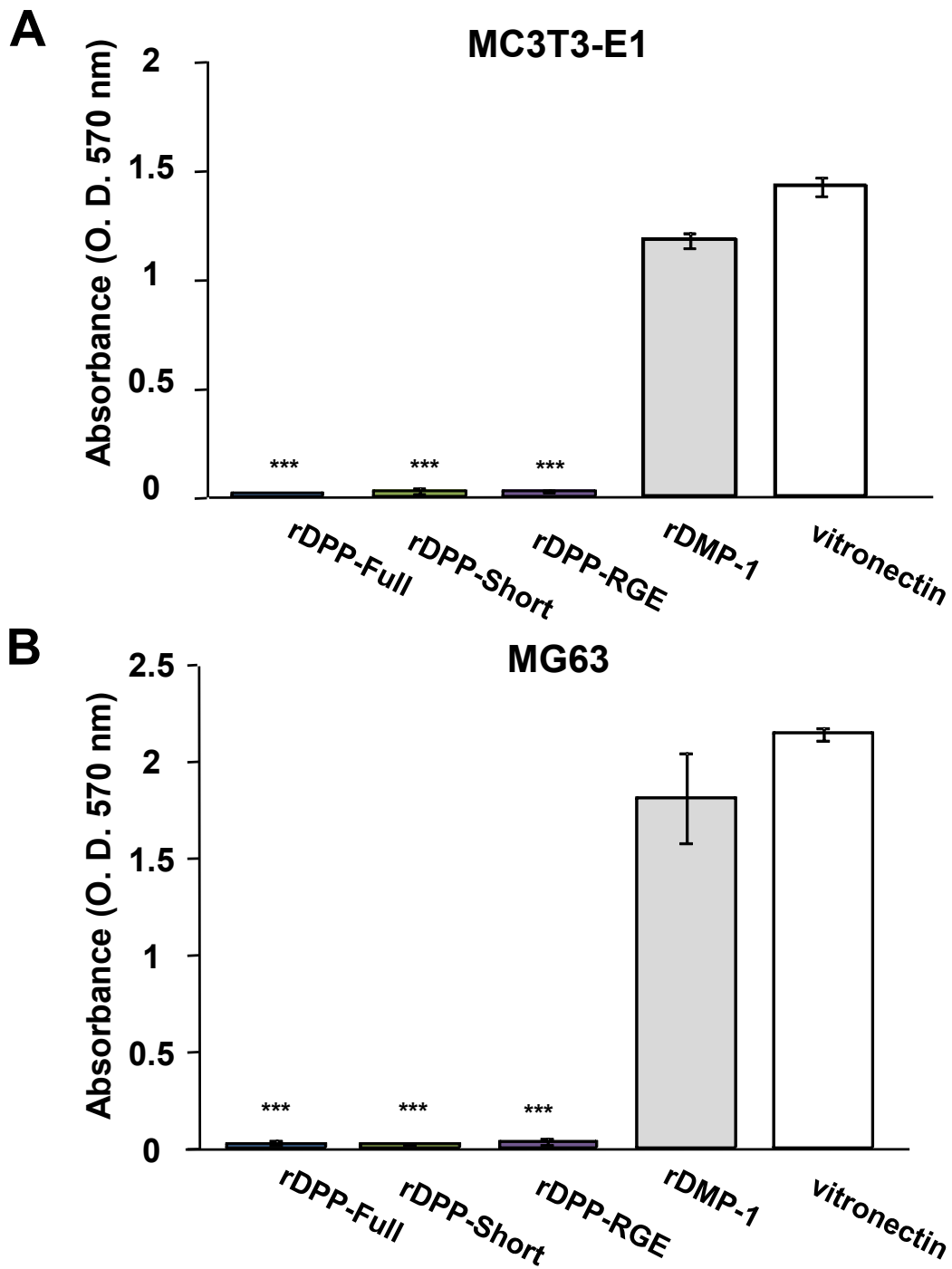


図 10. rDPP-Short, rDPP-RGE に対する細胞接着量

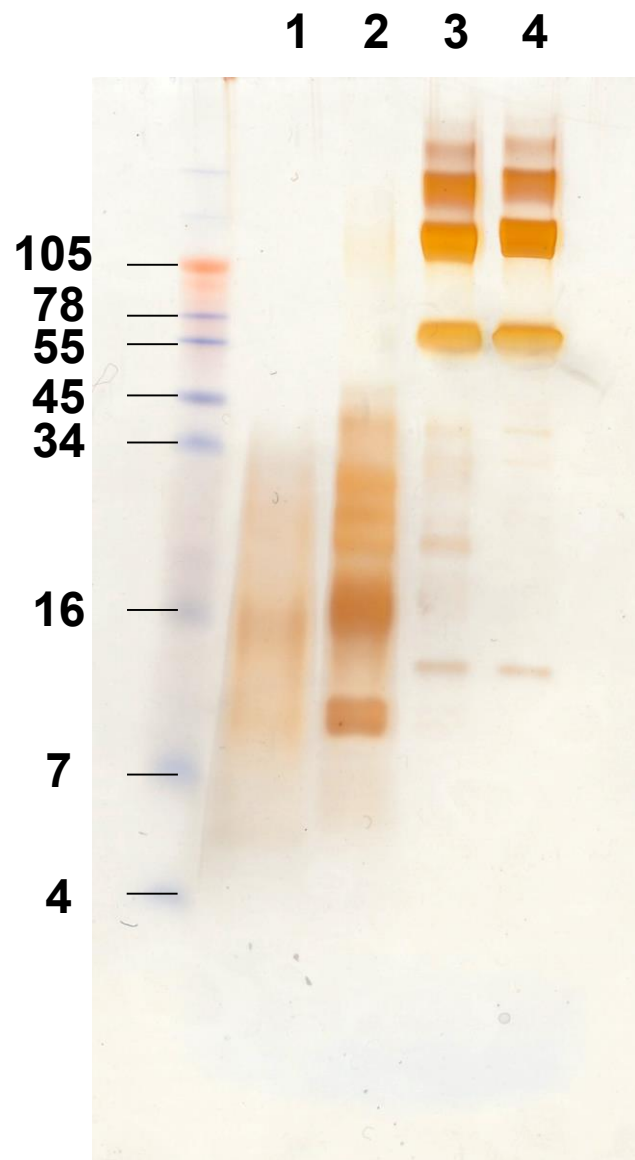
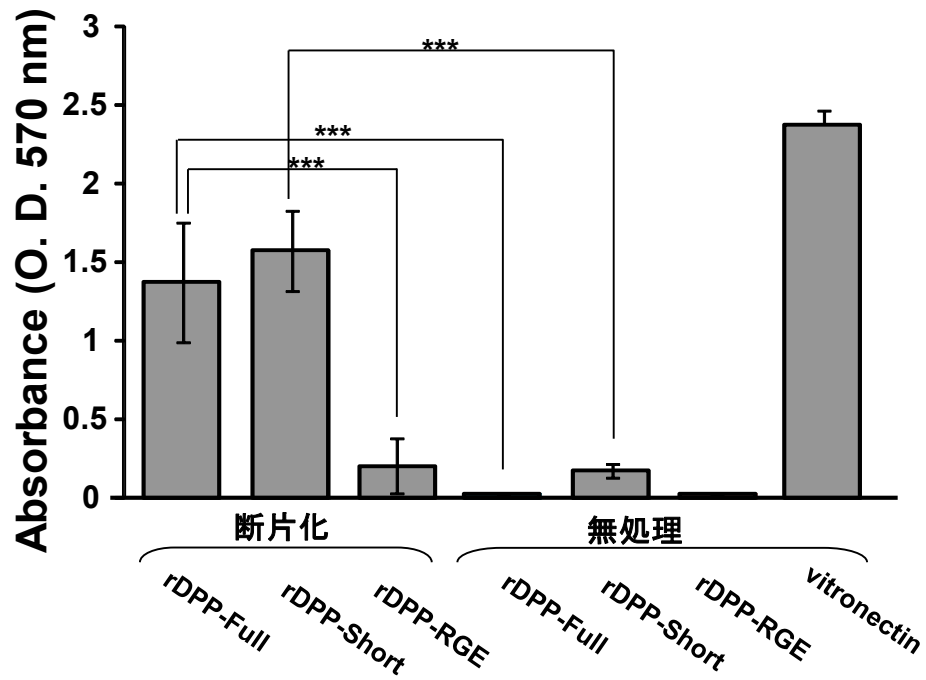


図 11. BSA の加水分解処理: 銀染色

A MC3T3-E1



B MG63

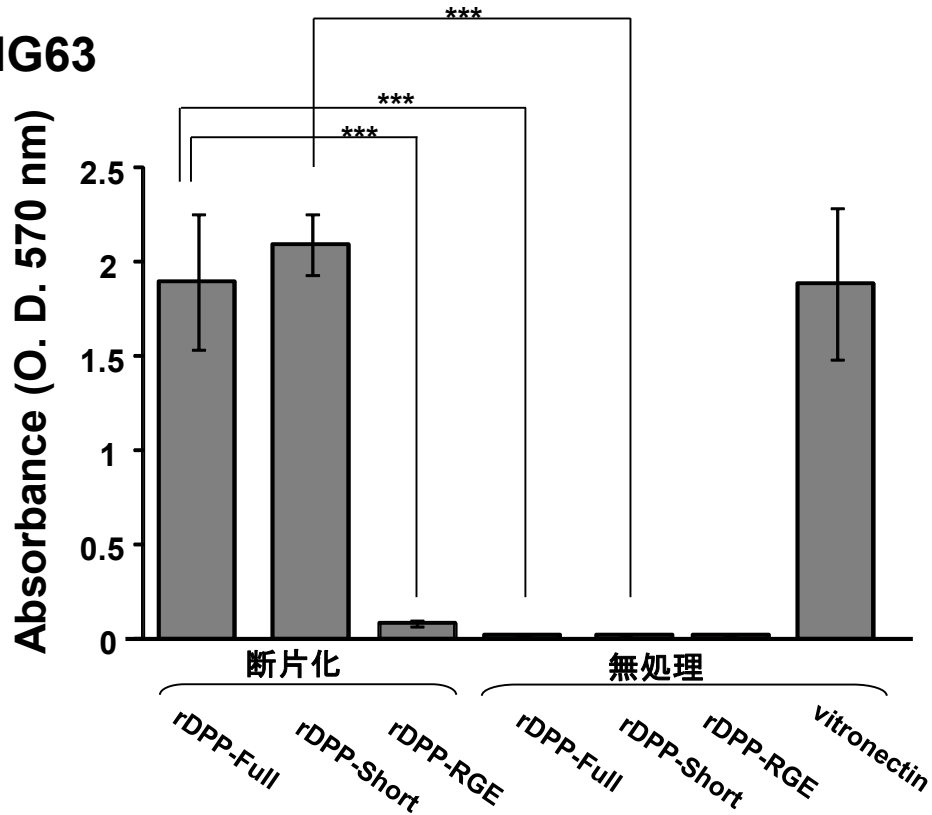
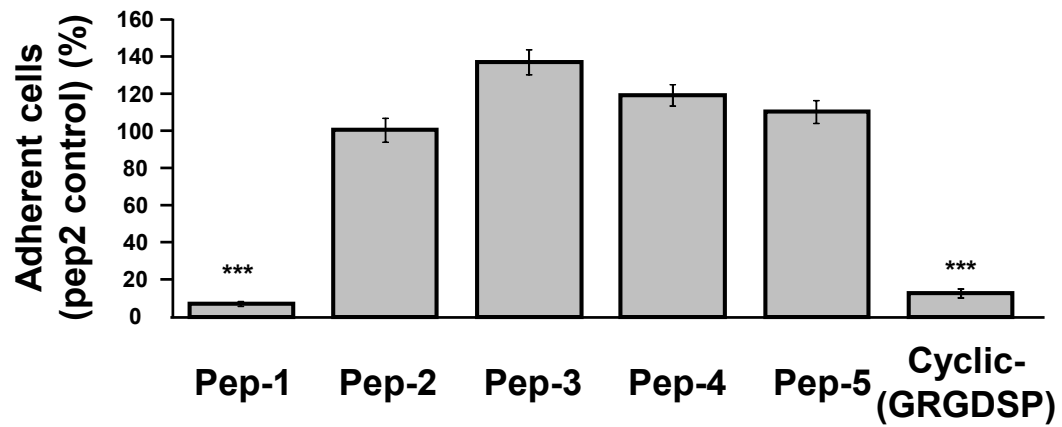


図 12. 断片化した組み換えタンパク質に対する細胞接着量

Pep-1	SRGDA
Pep-2	SGSRGDASY
Pep-3	NESGSRGDASYTS
Pep-4	SANESGSRGDASYTSDE
Pep-5	SESANESGSRGDASYTSDESS
Pep-6	GSRGDAS
Pep-7	GSRGDASY
Pep-8	SGSRGDAS
Pep-9	SESANESGSRGEASYTSDESS
Pep-10	SDESDTNSESANESGSRGDA
Pep-11	SDESDTNSESANESGSRGEA
Pep-12	SRGDASYTSDESSDDDNDSDSH
Pep-13	SRGEASYTSDESSDDDNDSDSH

表 1. 各種合成ペプチドのアミノ酸配列

A MC3T3-E1



B MG63

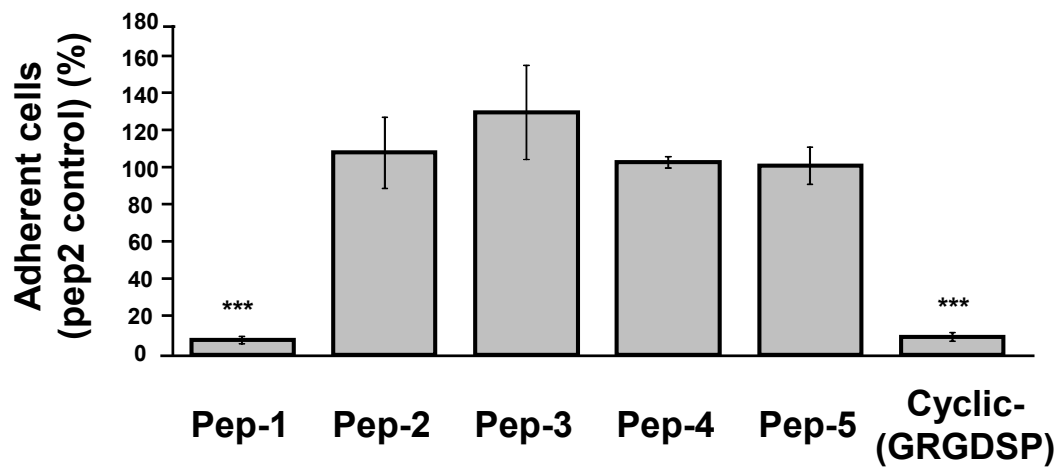
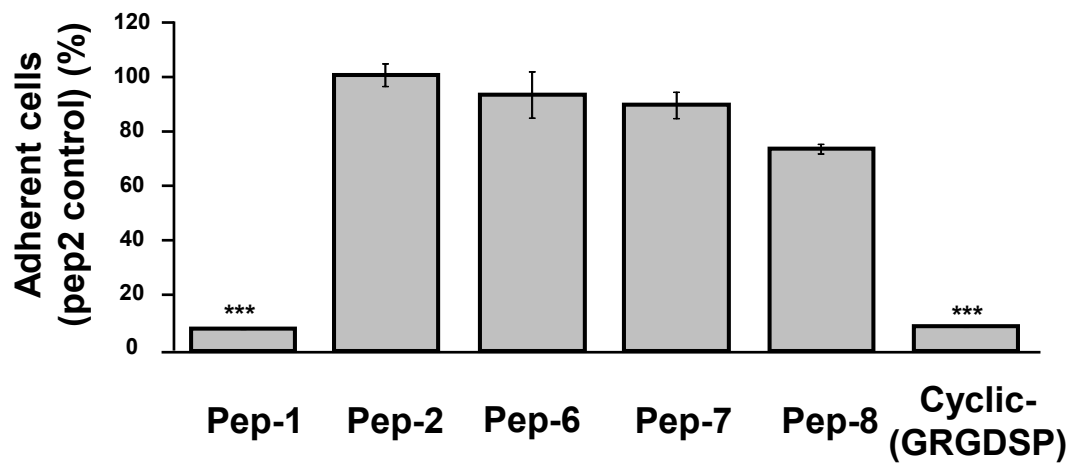


図 13. 各種合成ペプチドによる細胞接着阻害

C MC3T3-E1



D MG63

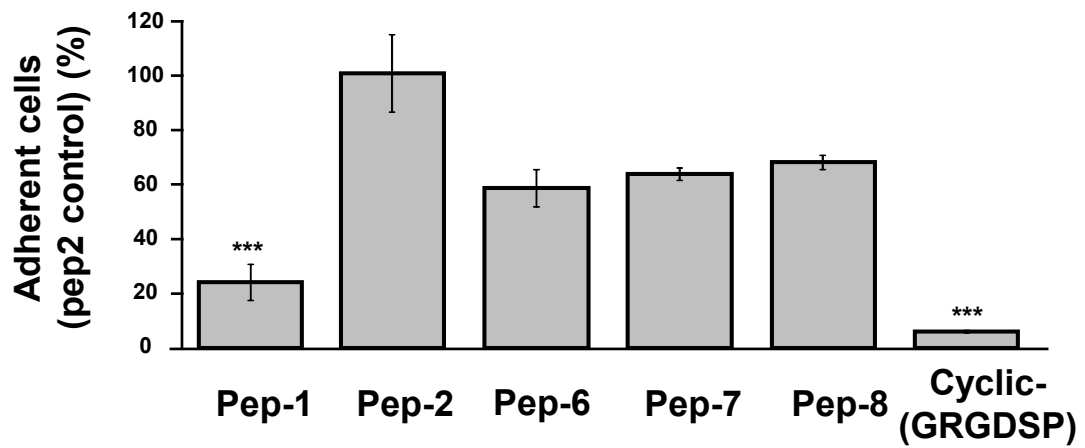
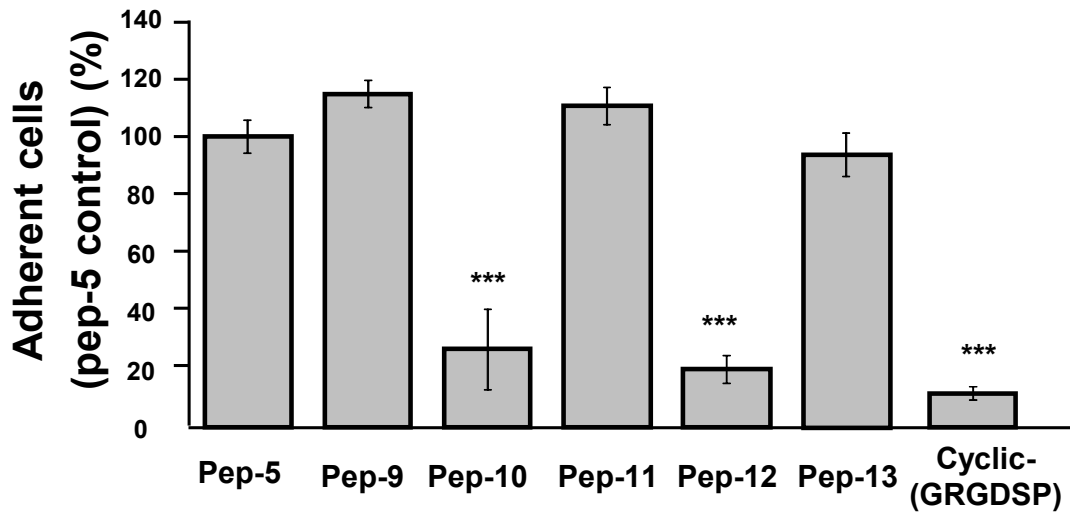


図 13. 各種合成ペプチドによる細胞接着阻害

A MC3T3-E1



B MG63

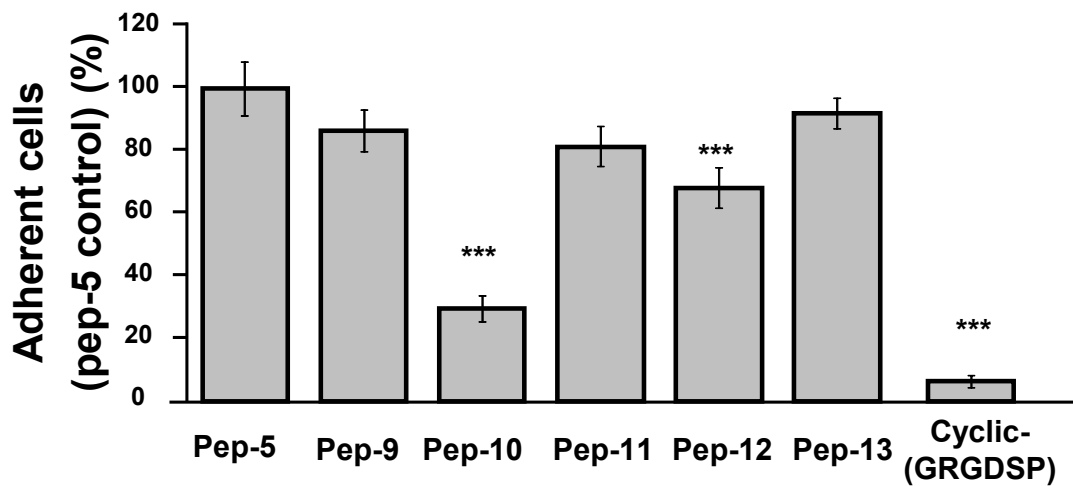


図 14. 各種合成ペプチドによる細胞接着阻害

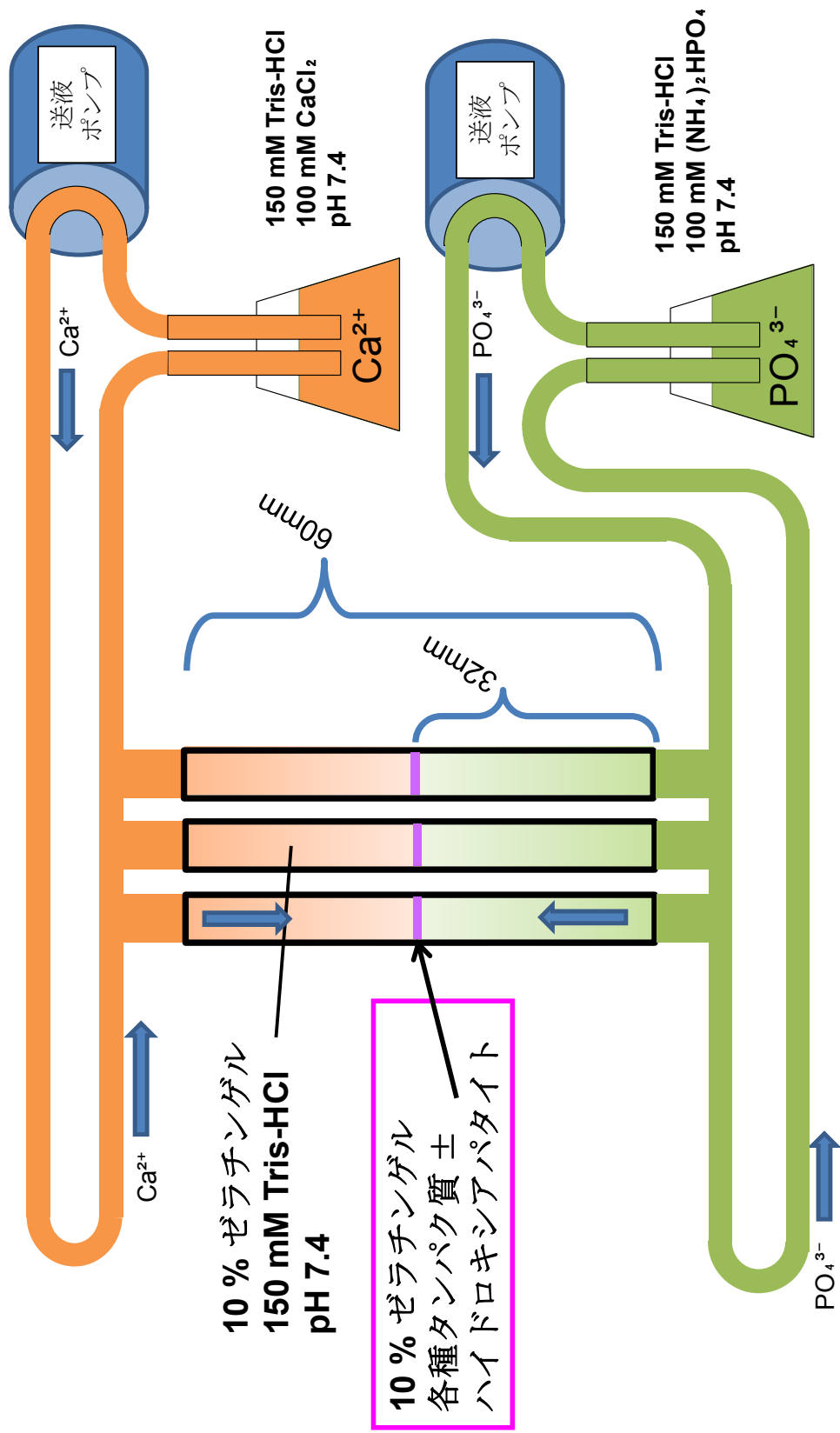


図 15. 細胞外基質石灰化モデル

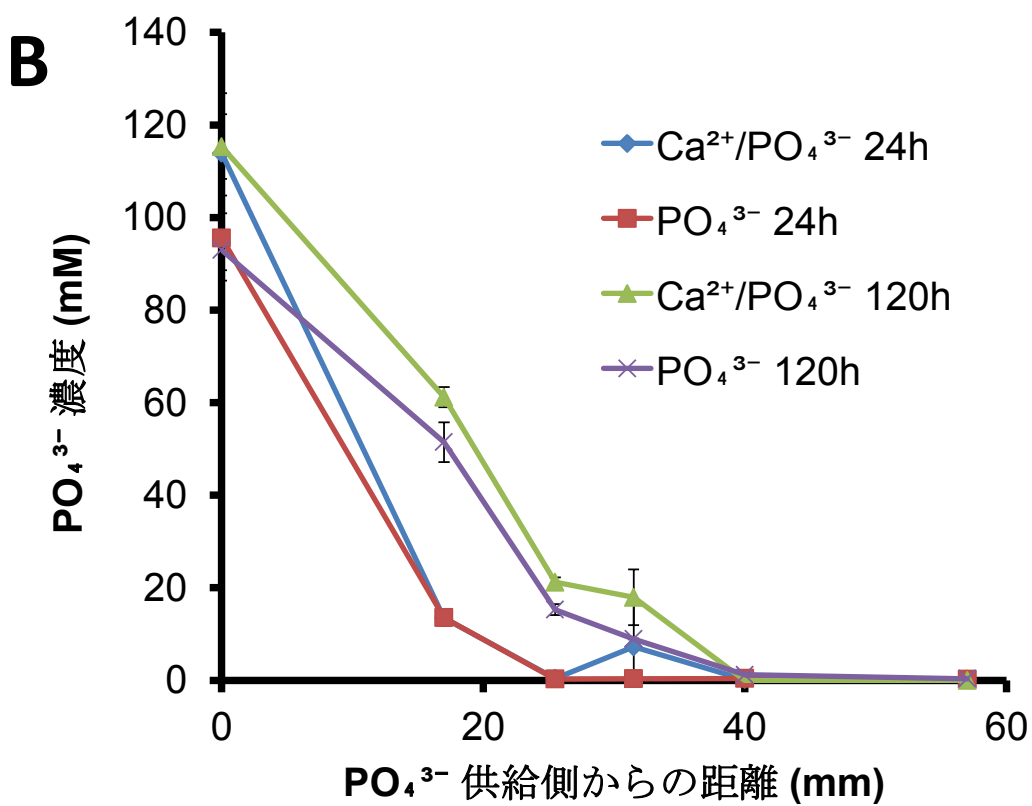
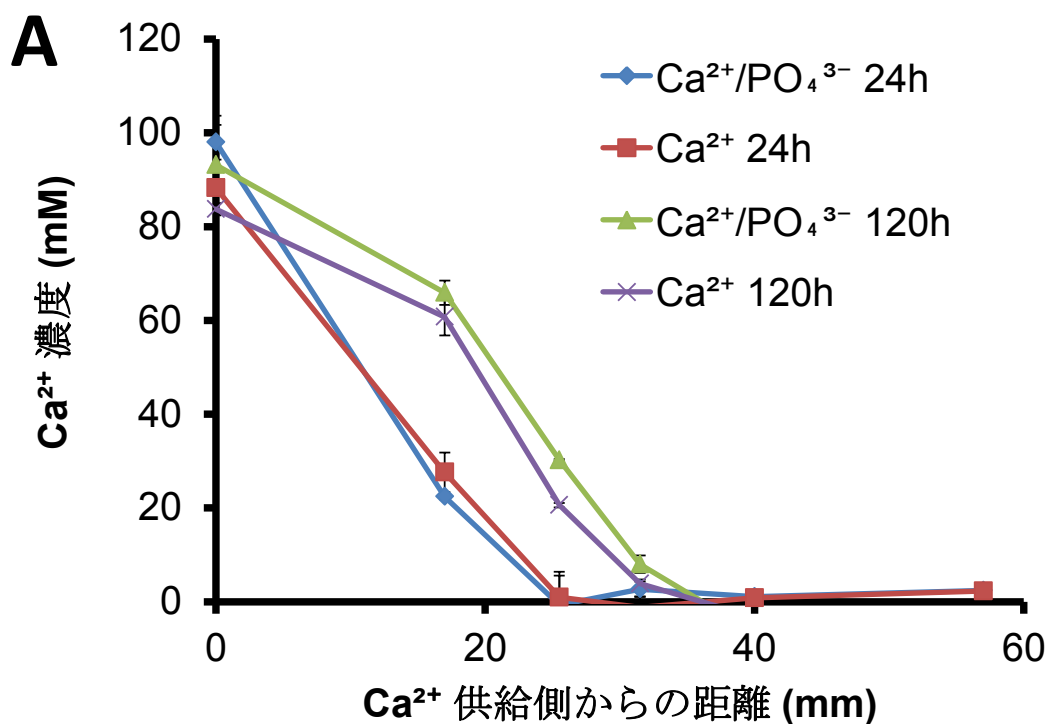


図 16. ゼラチンゲル内におけるイオン拡散

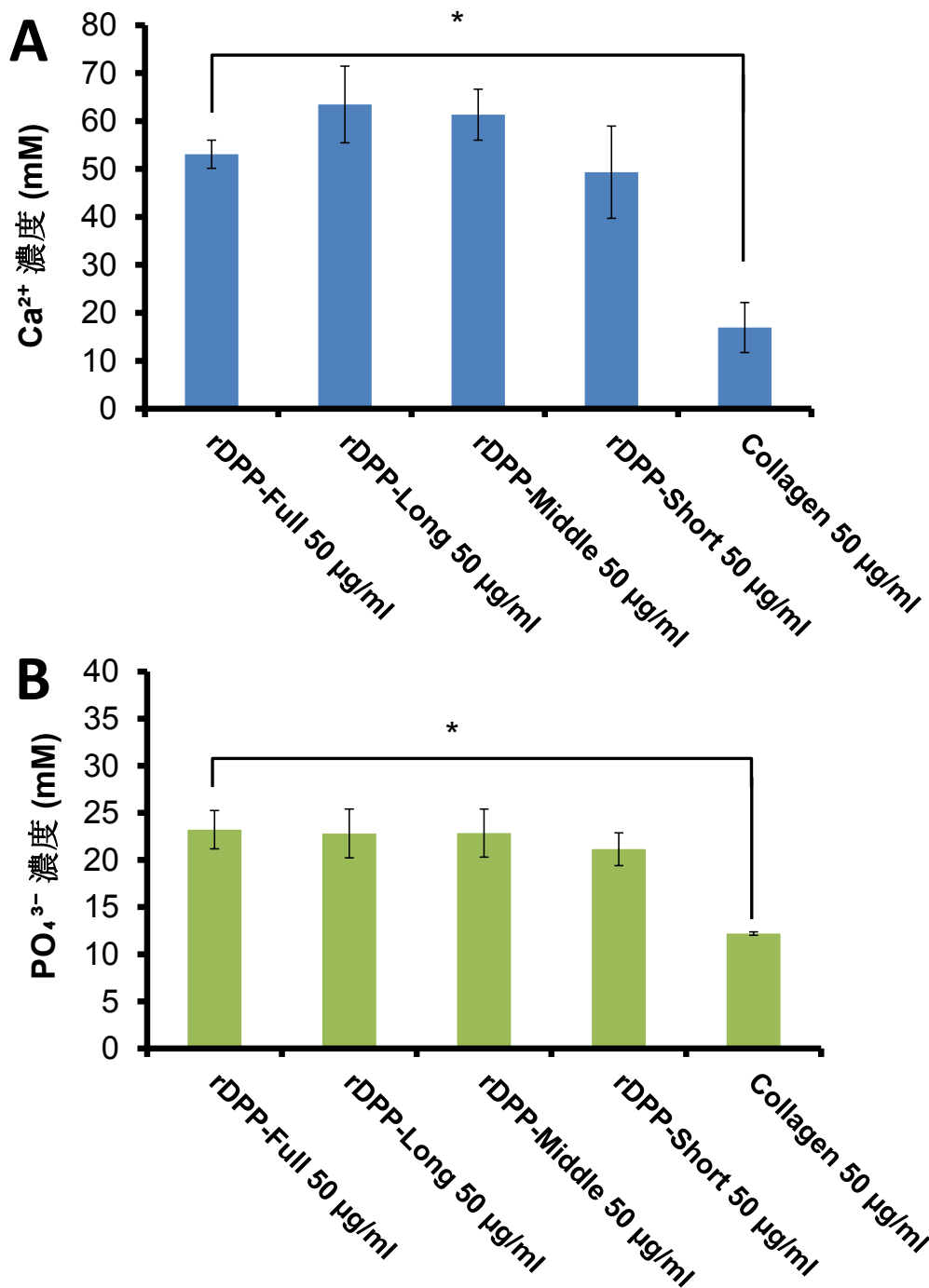


図 17. 組み換えタンパク質添加時の
Ca²⁺, PO₄³⁻ の蓄積

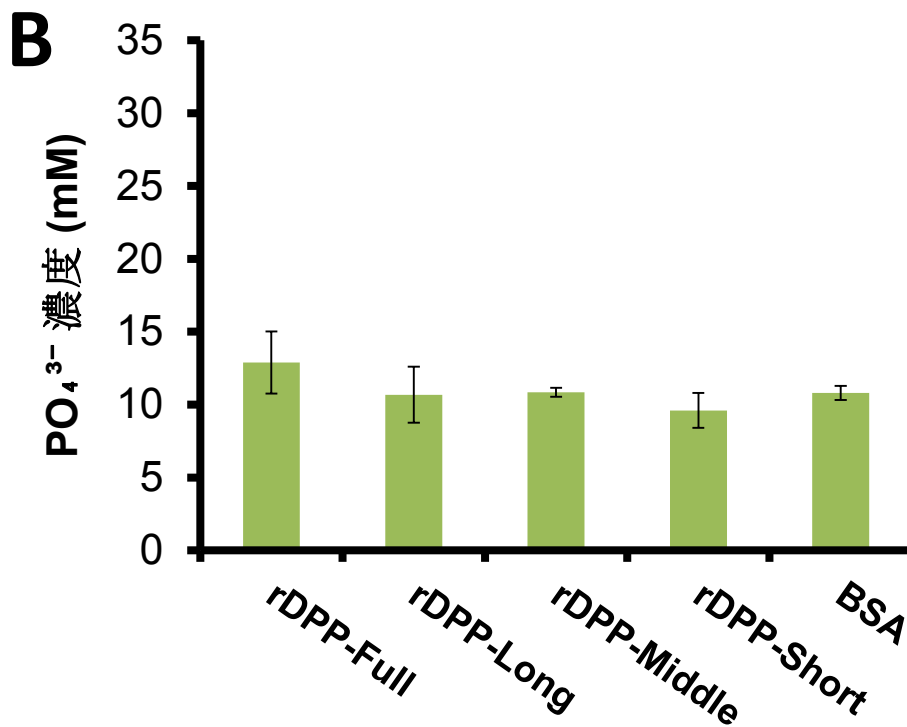
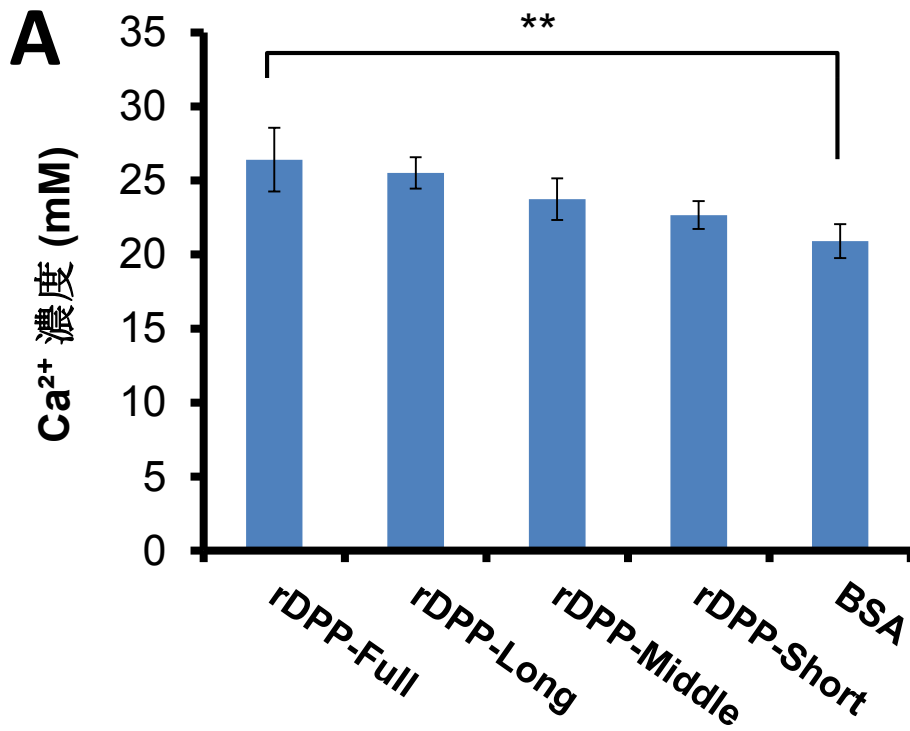


図 18. ハイドロキシアパタイト添加時の Ca²⁺, PO₄³⁻ の蓄積量

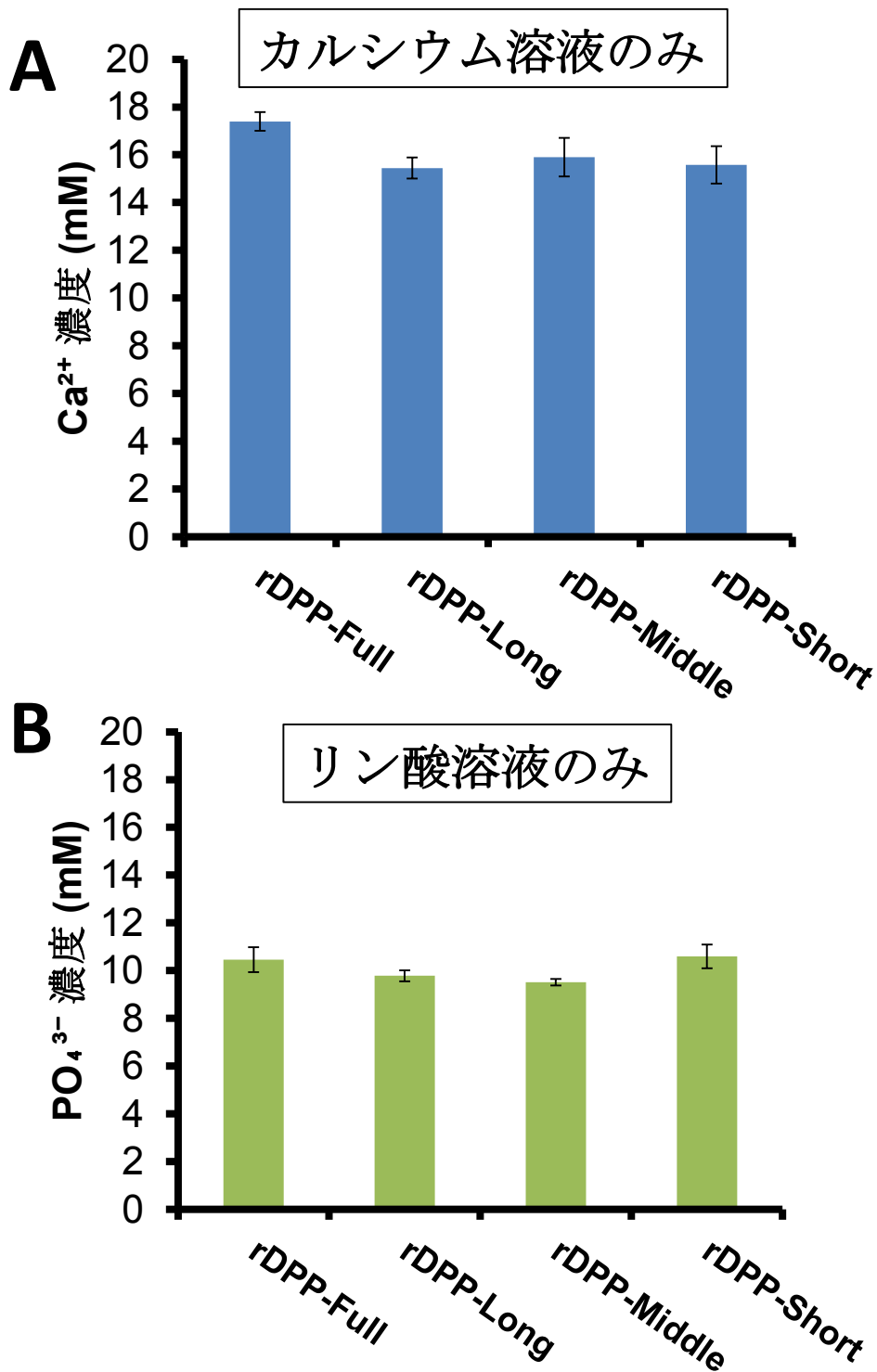


図 19. ハイドロキシアパタイト添加、カルシウム溶液
又はリン酸溶液のみ循環させた場合の
Ca²⁺, PO₄³⁻ の蓄積量

参考文献

1. 小野 善弘. コンセプトをもった予知性の高い歯周外科処置 改訂第 2 版., 2013.
2. Khayat, A. A comparative study of dentin bridge formation following pulpotomy using calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate in young dogs., *Iran J Vete Res.* 5: 47-54. 2004.
3. Antonio, N. Ten Cate's Oral Histology: development, structure, and function 7th ed., 2008.
4. MacDougall, M. Production and characterization of antibodies against murine dentine phosphoprotein., *J Bioch.* 232: 493-500, 1985.
5. Jontell, M. Comparative studies of phosphoprotein preparations from rat incisor dentin., *Prep Bioch.* 10: 235-253, 1980.
6. Termine, J. D. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix protein., *J Biol Chem.* 255: 9769-9772, 1980.
7. Lyaruu, D. M. Neonatal hamster molar tooth development: Extraction and characterization of amelogenins, enamelin and soluble dentin proteins., *Calc Tiss Int.* 34: 86-96. 1982.
8. Richardson, W. S. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity., *J Dent Res.* 56: 233-237. 1977.
9. Butler, W. T. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method., *Coll Res.* 1: 187-199. 1981.
10. Fisher, L. W. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin., *Bioch Bioph Res Comm.* 280: 460-465. 2001.

11. Butler, W. T. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins., *Int J Dev Biol.* 39: 169-179. 1995.
12. Bellahcène, A. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer., *Nat Rev Cancer.* 8 (3): 212-226. 2008.
13. Hang, X. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta shields type II., *Natu Gene.* 27: 151-152. 2001.
14. Xiao, S. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP., *Natu Gene.* 27: 201-204. 2001.
15. Suzuki, S. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct role in dentin mineralization., *Matr Biol.* 28: 221-229. 2009.
16. McKnight, D. A. Overlapping *DSPP* mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta., *J Dent Res.* 87: 1108-1111. 2008.
17. McKnight, D. A. A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human *DSPP* gene., *Huma Muta.* 29: 1392-1404. 2008.
18. Sreenath, T. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta Type III., *J Boil Chem.* 278: 24874-24880. 2003.
19. MacDougall, M. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4., *J Biol Chem.* 272 (2): 835-842. 1997.
20. Tsuchiya, S. Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dsp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp)., *J Bone Mine Rese.* 26: 220-228. 2011.

21. Von Marschall, Z. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1)., *Matrix Biology*. 29: 295-303. 2010.
22. Robert, T. Y. The Efficiency of dentin sialoprotein-phosphophoryn processing is affected by mutations both flanking and distant from the cleavage site., *J Biol Chem*. 288: 6024-6033. 2013.
23. Sweeney, A. M. Structural basis for the substrate specificity of bonemorphogenetic protein 1 / Tolloid-like metalloproteases., *J Mol Biol*. 384: 228-239. 2008.
24. Hopkins, D. R. The bone morphogenetic protein 1 / Tolloid-like metalloproteinases., *Matr Biol*. 26(7): 508-523. 2007.
25. Stetler-Stevenson W. G. Bovine dentin phosphophoryn calcium ion binding properties of a high molecular weight preparation., *Calc Tiss Int*. 40: 97-102. 1987.
26. Zanetti, M. Ca²⁺-Binding studies of the phosphoprotein from rat- incisor Dentine., *Eur J Bioc*. 113: 541-545. 1981.
27. He, G. Phosphorylation of phosphophoryn is crucial for its function as a mediator of biomineralization., *J Biol Chem*. 280: 33109-33114. 2005.
28. Jadowiec, J. Extracellular matrix-mediated signaling by dentin phosphophoryn involves activation of the Smad pathway independent of bone morphogenetic protein., *J Biol Chem*. 281: 5341-5347. 2006.
29. Jadowiec, J. Phosphophoryn regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway., *J Biol Chem*. 279: 53323-53330. 2004.

30. McKnight, D. A. Molecular evolution of dentin phosphoprotein among toothed and toothless animals., *BMC Evol Biol.* 9: 299. 2009
31. O'Regan, A. W. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro., *J Immu.* 162: 1024-1031. 1999.
32. Agnihotri, R. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin)., *J Biol Chem.* 276: 28261-28267. 2001.
33. Chaussain, C. MMP2-cleavage of dmp1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cells., *Eur Cell Mater.* 18: 84-95. 2009.
34. Sun, Y. Failure to process dentin matrix protein 1 (DMP1) into fragments leads to its loss of function in osteogenesis., *J Biol Chem.* 285: 31713-31722. 2010.
35. Sun, Y. DMP1 processing is essential to dentin and jaw formation., *J Dent Res.* 90: 619-624. 2011.
36. Mould, A. P. Regulation of integrin alpha 5 beta 1-fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} ., *J Biol Chem.* 270: 26270-26277. 1995.
37. Stuiver, I. Divalent cations regulate the organization of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on the cell surface., *J Cell Phys.* 168: 521-531. 1996.
38. Mogford, J. E. Vascular smooth muscle alpha v beta 3 integrin mediates arteriolar vasodilation in response to RGD peptides., *Circ Res.* 79: 821-826. 1996.
39. Dorvee, J. R. Rediscovering hydrogel-based double-diffusion systems for studying biomineralization., *Crys Eng Comm.* 14: 5681-5700. 2012.

40. Tartaix, P. H. In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions., *J Boil Chem.* 18: 18115-18120. 2004.
41. Boskey, A. L. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel., *Bone Mine.* 22: 147-159. 1993.
42. Hunter, G. K. Modulation of crystal formation by bone phosphoprotein: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein., *Bioch J.* 302: 175-179. 1994.
43. Hunter, G. K. Nucleation and inhibition hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins., *Bioch J.* 317: 59-64. 1996.
44. Ruoslahti, E. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins., *Scie.* 238: 491-497. 1987.
45. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins., *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12: 697-715. 1996.
46. Felding-Habermann, B. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer., *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 1853-1858. 2001.
47. Xiong, J. P. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta3., *Scie.* 294: 339-345. 2001.
48. Xiong, J. P. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand., *Scie.* 296: 151-155. 2002.
49. Kulkarni, G. V. Promotion of selective cell attachment by the RGD sequence in dentine matrix protein 1., *Arch Oral Biol.* 45: 475-484. 2000.

50. Cheng, S. L. Regulation of α V β 3 and α V β 5 integrins by dexamethasone in normal human osteoblastic cells., *J Cell Bioc.* 77: 265-276. 2000.
51. O'Regan, A. W. The role of osteopontin in lung disease., *Cyto Grow Fact Rev.* 14: 479-488. 2003.
52. Yokosaki, Y. The integrin α 9 β 1 binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin., *J Biol Chem.* 274: 36328-36334. 1999.
53. Wang, H. G. MEPE activated by furin promotes pulpal cell adhesion., *J Dent Res.* 90: 529-534. 2011.
54. Rowe, P. S. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihinin., *Bone.* 34: 303-319. 2004.
55. Pytela, R. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derive from fibronectin., *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 5766-5770. 1985.
56. Okamoto, O. Dermato-pontin promotes epidermal keratinocyte adhesion via α 3 β 1 integrin and a proteoglycan receptor., *Bioch.* 49: 147-155. 2010.
57. Kyte, J. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein., *J Mol Biol.* 157: 105-132. 1982.
58. Masters, P. M. In vivo decomposition of phosphoserine and serine in noncollagenous protein from human dentin., *Calc Tiss Int.* 37: 236-241. 1985.
59. Chang, S. R. Characterization and identification of a human dentin phosphophoryn., *Calc Tiss Int.* 59: 149-153. 1996.
60. Yamakoshi, Y. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo., *J Biol Chem.* 281: 38235-38243. 2006.

61. Yamakoshi, Y. Porcine dentin sialophosphoprotein: length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability., *J Biol Chem.* 283: 14835-14844. 2008.
62. Yamakoshi, Y. Dentinogenesis and dentin sialophosphoprotein (DSPP)., *J Oral Bios.* 51: 134-142. 2009.
63. Fujisawa, R. Effects of dentin phosphophoryn on precipitation of calcium phosphate in gel in vitro., *Calc Tiss Int.* 41: 44-47. 1987.
64. Termine, J. D. Phosphoprotein modulation of apatite crystallization., *Calc Tiss Int.* 31: 247-251. 1980.
65. Boskey, A. L. Concentration-dependent effect of dentin phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth., *Bone and Mine.* 11: 55-65. 1990.
66. Milan, A. M. Adsorption and interactions of dentine phosphoprotein with hydroxyapatite and collagen., *Eur J Oral Sci.* 114: 223-231. 2006.
67. Hoshi, K. The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils., *J Bone Mine Res.* 14: 273-280. 1999.
68. Boskey, A. L. Effects of bone CS-proteoglycans, DS-decorin, and DS-biglycan on hydroxyapatite formation in a gelatin gel., *Calci Tissu Int.* 61: 298-305. 1997.