

論 文 内 容 要 旨

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

応用生命科学部門 歯周病態学

(主指導教員：栗原 英見 教授)

統合健康科学部門 小児歯科学

(副指導教員：香西 克之 教授)

基礎生命科学部門 歯科薬理学

(副指導教員：兼松 隆 教授)

小武家 誠司

論文内容要旨

論文題目

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

【背景】

Dentin phosphoprotein (DPP) は硬組織細胞外基質に存在する高度にリン酸化したタンパク質で、主に象牙芽細胞から分泌され、象牙質の形成とその石灰化に必須な役割を果たすと考えられている。また、DPP をコードしている *Dentin sialophosphoprotein (DSPP)* 遺伝子はヒト染色体の 4q21 に存在し、*DSPP* 遺伝子座に何らかの変異が生じると、常染色体優性遺伝の象牙質形成不全症 *Dentinogenesis imperfecta (DGI)* を引き起こすことが報告されている。DPP タンパク質はアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列からなるインテグリン結合配列と、高度にリン酸化されたセリン-セリン-アスパラギン (SSD) の繰り返し配列という二つの特徴的なアミノ酸配列を有する。RGD 配列は fibronectin や vitronectin など他の RGD 配列を持つタンパク質と同様に、インテグリン依存的細胞刺激因子としての機能が期待される。SSD 繰り返し配列は硬組織の細胞外基質石灰化に寄与していると考えられている。しかし、これまでの報告から、組み換え DPP タンパク質の合成は、SSD 繰り返し配列による高い酸性度ゆえに、その発現・精製が非常に困難とされている。そこで本研究は、哺乳類細胞を用いて組み換え DPP タンパク質を発現・精製し、さらに RGD 配列および SSD 繰り返し配列の機能解析を目的とした各種改変型組み換え DPP タンパク質の作製も併せて行い、更にこれら各種組み換えタンパク質を用いて、細胞刺激因子として、また細胞外基質石灰化因子としての機能解析を行うことで、将来的に硬組織誘導材として利用を想定した基礎的研究を行うことを目的とした。

【材料および方法】

1. 組み換え DPP タンパク質の発現・精製：マウス切歯から mRNA を抽出し、DPP の open reading frame を組み換えタンパク質発現ベクター pCEPPur Δ vector に組み込み、N 末端 6xHis タグ付き通常型 DPP の発現 vector を樹立した。更に、Mutagenesis kit (Agilent Technologies) を使用して、通常型 DPP の RGD 配列をコードする塩基配列を RGE (アルギニン-グリシン-グルタミン酸) をコードするように置換し、インテグリン非結合型 DPP-RGE の発現 vector を作製した。続いて、SSD 繰り返し配列をコードする塩基配列が、コンピテントセルに形質転換する際に、はじきだされる特性を利用して、3 種類の異なる長さの SSD 繰り返し配列を持つ DPP-long, DPP-middle, DPP-short の発現 vector を作製した。Epstein Barr Nuclear Antigen を導入したヒト胎児由来細胞株 (293 EBNA) は Epstein Barr Virus 由来複製起点を持つ vector の複製を促進する。その 293 EBNA 細胞に上記の各種発現 vector を遺伝子導入し、puromycin (5 μ g/ml) にて選択培養を行い、得られた安定発現株をそれぞれ各種組み換え DPP タンパク質の発現用細胞と

別紙様式 2

した。これら発現用細胞から無血清培養上清を回収し、イオン交換クロマトグラフィーにて粗精製及び 6×His を用いたアフィニティーにて最終精製を行い、各種組み換えタンパク質を得た。2. 発現タンパク質濃度の測定: 培養上清中の各種組み換えタンパク質の発現量を定量・比較するために、無血清培養上清中のタンパク質量をニッケルキレートコートプレートによる ELISA 法にて定量を行った。3. 細胞接着能の検討: 各種組み換えタンパク質及び vitronectin をコートしたプレートに MC3T3-E1 細胞と MG63 細胞を播種し、ホルムアルデヒドによる細胞固定の後に、クリスタルバイオレットで細胞染色を行った。染色された細胞は SDS で可溶化した後に、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、接着細胞数を比較定量した。4. インテグリン結合能の検討: 各種組み換えタンパク質をコートしたプレートに組み換えインテグリン $\alpha v \beta 3$ を添加し、抗インテグリン抗体を用いた ELISA 法にて各種組み換えタンパク質へのインテグリン $\alpha v \beta 3$ に対する結合能を比較した。5. DPP-RGD 由来ペプチドを用いた細胞接着阻害能の検討: 各種ペプチドでプレインキュベーションした MC3T3-E1 および MG63 細胞を vitronectin でコートしたプレートに播種し、各種ペプチドの細胞接着阻害効果を比較した。6. 細胞外基質石灰化モデル: 6 cm 長のピペットにゼラチンゲルを充填し、中央付近にハイドロキシアパタイトと各タンパク質の混合液をゲルと共に充填した。ゲルを充填したピペットの両端に送液チューブを接続し、片方には塩化カルシウム水溶液 (100 mM) を、もう片方にはリン酸水素アンモニウム水溶液 (100 mM) を別々のポンプで循環させた。5 日後にタンパクを配置したゲルを切断して回収し、塩酸で溶解させ比色定量法にて Ca, P 濃度を測定した。

【結果と考察】

1. 精製された各種組み換え DPP タンパク質は Stains-all 染色と Western blot 法によりシングルバンドを認め、純度の高い酸性タンパク質であることが確認された。2. 通常型のタンパク質発現量と比較して、SSD 配列の短縮に比例し発現量が増加することが明らかとなった。3. vitronectin と比較して各種組み換え DPP タンパク質は細胞接着能を示さなかった。4. ELISA 法から、各種組み換え DPP タンパク質のインテグリン結合能はほとんど認められなかった。すなわち、各種組み換え DPP タンパク質は正常状態ではインテグリン依存的細胞接着能を持たないことが示唆された。5. 各種ペプチドを用いた細胞接着阻害効果の検討から、RGD 配列近傍アミノ酸残基が N 及び C 末端側それぞれ 1 塩基残して切断されると、組み換え DPP の RGD 配列はインテグリン依存的な機能を表出することが明らかとなった。6. SSD 配列の短縮に比例してハイドロキシアパタイトへの Ca 蓄積量が減少する傾向を認めた。以上の結果から、DPP は RGD 配列近傍の特定アミノ酸部位での分解を受け、細胞接着などインテグリン依存的に細胞刺激を行う因子に転換され、また、SSD 繰り返し配列の大きさに比例してタンパク質産生量が減少するが、細胞外基質石灰化を促進することが示唆された。以上のことから、DPP は硬組織再生誘導時に、細胞刺激因子並びに細胞外基質の硬組織形成促進因子としての機能を併せ持つ魅力的な分子であることが本研究によって明らかとなった。