

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	小武家 誠司
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
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			
論文審査担当者			
主 査	教 授	吉子 裕二	印
審査委員	教 授	高田 隆	
審査委員	准教授	柴 秀樹	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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 - アスパラギン酸 (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</p>			

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。

申請論文では以下の内容を示している。

- 1) 293 EBNA 細胞に遺伝子導入を行い、通常型 DPP タンパク質、SSD 繰り返し配列短縮型 DPP タンパク質及び、RGD 配列改変型 DPP タンパク質を発現させることに成功した。また、陰イオン交換クロマトグラフィー及び Ni-NTA agarose を用いて組み換えタンパク質を精製し、実験に供するに十分な純度を確認した。
- 2) ニッケルキレートプレートを用いた ELISA 法にて発現した各種組み換えタンパク質の発現量を測定した結果、SSD 繰り返し配列を短縮するにしたがって発現量が増加する傾向を示した。
- 3) 各種組み換えタンパク質を 96 ウェルプレートにコートして、MG63 及び MC3T3-E1 細胞を播種し細胞接着能を検討した。各種改変型 DPP 組み換えタンパク質は細胞接着能を示さなかったが、NaOH によって断片化することで RGD 配列依存的な細胞接着能を発現した。
- 4) DPP 由来の各種 RGD 配列近傍合成ペプチドを作製し、これらによる細胞接着阻害効果を評価した結果、RGD 配列隣接の N 又は C 末端が 1 塩基残して解放された合成ペプチドのみ RGD 配列依存的な細胞接着阻害効果を示した。
- 5) *in vivo* 細胞外基質石灰化モデルを用いた各種組み換え 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を検討した結果、各種組み換えタンパク質は Type I collagen と比較してリン酸カルシウムを多く蓄積した。また、各種組み換えタンパク質をハイドロキシアパタイト粉末と共に実験に供した場合、SSD 繰り返し配列の長さ按比例してカルシウムイオンの蓄積量が増加する傾向を示した。

これらの結果から、DPP は分解された後 RGD 配列を介したインテグリン依存的細胞刺激による機能発現を惹起することが示唆された。また、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することで、リン酸カルシウムの蓄積を促進することが示唆された。

本研究は、哺乳類細胞を用いた組み換え DPP タンパク質の発現・精製法を確立し、その機能領域の解析を行ったものである。これにより DPP は細胞外基質の石灰化に直接関与すると共に、近傍細胞を刺激する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示された。これは今後の硬組織再生治療における新しい再生材料の開発に寄与するものと考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。