

成長期のヒト骨組織内における γ -carboxyglutamic acid 含有蛋白の局在に関する研究*

— 蛋白質の精製, 抗体の精製, 及び免疫組織学的研究 —

太田 貴之 松山 敏勝
札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 石井清一 教授)

小川 勝洋
旭川医科大学病理学第1講座

Immunocytochemical Localization of Bone γ -carboxyglutamic Acid Containing Protein in the Developing Human Bone

— Purification of the Protein, Preparation of the
Antibody, and Immunocytochemical Analysis —

Takayuki OHTA, Toshikatsu MATSUYAMA
Department of Orthopaedics, Sapporo Medical College.
(Chief: Prof. S. Ishii)

Katsuhiro OGAWA
Department of Pathology (Section 1), Asahikawa Medical College.

ABSTRACT Localization of bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein (BGP), also called osteocalcin, was investigated immunocytochemically by light and electron microscopy in human bones in various developmental stages using antihuman BGP antibodies. In the bones of 12 weeks fetus, osteoblasts strongly stained in the areas of endochondral and intramembranous bone formation. In the bones of late fetal stages, newborn, and adult, BGP was predominantly localized in the osteoid and bone matrix in the ossifying front. Osteoblasts and osteocytes also stained positive, but less dominantly than those in the early fetus. By electron-microscopy, BGP was localized in the cisternae of ER and the Golgi apparatus of osteoblasts and osteocytes, and collagen fibers of the osteoid and bone matrix. These observations indicate that BGP is synthesized by osteoblasts most actively in the early fetal life and then deposited to collagen fibers of osteoid and bone matrix.

(Received September 3, 1988 and accepted September 26, 1988)

Key words: Bone gla protein, Osteocalcin, Immunocytochemistry, Calcification, Osteogenesis.

1 緒 言

Bone γ -carboxyglutamic acid containing protein (以下 BGP) は, 骨組織に存在する非コラーゲン性蛋白の主要な成分であり¹⁾, ニワトリ²⁾, ウシ³⁾, メカジキ⁴⁾, ラット⁵⁾, サル⁶⁾ など様々な種類の動物の骨から精製さ

れ, 蛋白質としての物理科学的性質が詳しく検討されている。

γ -carboxyglutamic acid (以下 gla) は, glutamic acid の γ 位がカルボキシ化された特殊なアミノ酸で, BGP はカルシウムイオン結合能を有する 2 ないし 3 個の gla 残基を含むため⁷⁾, 石灰化あるいは骨化に何らか

* 本研究は, 森 道夫教授の指導のもとに札幌医科大学病理学第2講座で行われたものである。

の関与をしていると考えられているが、一方、BGP が石灰化を阻害するという報告⁸⁾や、破骨細胞に対して chemotaxis 作用を示すという報告⁹⁾¹⁰⁾などがある。その生理機能の詳細に関しては不明な点が多い。ヒト BGP については、1980 年 Poser *et al.*¹¹⁾によって、家兎抗ウシ BGP 抗体をリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィーで精製されており、1985 年には松山と小川¹²⁾が、直接ヒトの骨から BGP の精製に成功している。また抗ウシ BGP 抗体はヒト BGP と交差性があるため¹³⁾、これを用いたラジオイムノアッセイ法によって、BGP は骨肉腫などの腫瘍細胞から分泌されることが明らかにされ¹⁴⁾、BGP の腫瘍マーカーとしての意義が注目されるようになった。またヒト BGP 抗体を用いた免疫組織学的検索によって、種々の化骨組織に BGP が証明され、石灰化と骨化の鑑別や、腫瘍の病理組織学的診断にも応用が試みられている¹⁵⁾。このような臨床的、あるいは病理学的な BGP の変化の意義を理解するためにも、BGP の生理的な機能を知ることが必要と思われる。骨成形と BGP の局在の関係を明らかにすることは、BGP の生理機能を知るための重要な手がかりとなりうるものと考えられる。正常の骨組織における BGP の局在については、ラット骨組織を用いて Broncker *et al.*¹⁶⁾が、ヒト骨組織を用いて松山と小川¹²⁾が、それぞれ免疫組織化学的に検索し、Camarda *et al.*¹⁷⁾はラット骨組織における BGP の局在を電顕的免疫組織化学で検索している。しかし、Broncker *et al.*と、松山と小川の報告には、軟骨細胞や破骨細胞の局在に関して相違が認められるなど、その組織内局在には、一定の見解が得られていない。特に後者では軟骨細胞に BGP が陽性になっているが、この点は Broncker *et al.*と異なるだけでなく、Price *et al.*³⁾の生化学的な検索の結果とも一致しない。このような BGP の組織内局在の相違が、検索した種の差によるものなのか、あるいは作製した抗体の特異性によるものかを検討するため、我々はまず、抗ヒト BGP 抗体の特異性を一層高めることを試みた。そこでヒト骨から BGP を精製する際、DEAE Sephadex の代わりに、より吸着性の良い DEAE cellulose を使い、さらに re-chromatography を行うことにより、Single peak を示し、かつ SDS-PAGE で単一バンドを示す BGP を得、これを用いて松山と小川が作製した抗ヒト BGP 抗体をアフィニティクロマトグラフィーで精製した。この精製抗ヒト BGP 抗体を用い、正常ヒト骨組織を検索したところ、軟骨組織とは反応しないことが確かめられ、上記の相違点の一部は解決された。そこでこの精製抗体

を用い、正常ヒト骨組織の発育過程における BGP の局在を光顕及び電顕免疫組織化学的に検索し、その組織内局在および細胞内局在から、BGP と石灰化の関係について考察した。

2 実験材料及び方法

2.1 BGP の精製

Gundberg *et al.*¹⁸⁾の方法に準じて BGP を抽出した。15～30 歳の骨肉腫の患者の腫瘍部分を除く切断肢を用いた。結合組織を除去し、得られた皮質骨 (100 g) を 1 cm に細切した。それを Freezer mill (Spex 社)にて液体窒素で冷却したのちに粉碎し、粉状にした。この 100 g を Tris 緩衝液プロテアーゼインヒビター・カクテル (benzamidine, 10 mM: 6-aminocaproic acid, 10 mM: p-hydroxymercuri benzoic acid, 0.1 mM: phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.5 mM, Tris-HCl, 20 mM, pH 7.8) 4℃で 1 時間水洗し、可溶成分を除去した。6,000 g×20 分の遠心でえられた沈澱に、同量のプロテアーゼインヒビターを含む 0.5 M EDTA 1,000 ml を加え 40 時間攪拌した。この上清を同量のプロテアーゼインヒビターを含む 50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液で 4℃下に透析し、凍結乾燥した。この試料を同緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.9×90 cm) (Pharmacia 社)にかけ、分子量 10,000 前後に相当する分画を集めた。これを 70 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液で平衡化した DE-53 (1.5×35 cm) (Whatman 社)を用いてイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。カラム吸着成分を 70 mM～700 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液の連続濃度勾配で溶出し、得られた分画を 200 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液で平衡化した DE-53 を用いて 200 mM～500 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液の連続濃度勾配で溶出して精製 BGP とした。純度の検定は電気泳動 (SDS-PAGE) とアミノ酸分析によって行った。アミノ酸分析は最終精製物の一部を 6N HCl で窒素置換後に減圧封管し、110℃で 24 時間酸加水分解した。格精製段階における蛋白定量はウシの血清アルブミンを Standard として、Lowry *et al.*¹⁹⁾の方法に従って行った。

2.2 抗体の精製

この精製 BGP をリガンドにして、CNBr 活性化セファロース 4 B (pharmacia-LKB, Upsala, Sweden) のアフィニティアラムを作製し、これを用いて松山と小川¹²⁾により作製された抗ヒト BGP ウサギ血清をアフィニティ精製した。アフィニティカラムの作製は以下の手順で行った。0.4 g のゲルを 1 mM HCl で 15 分

間洗浄し、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液と 0.5 M 塩化ナトリウムを含む coupling buffer (pH 8.5) で平衡化した。リガンド (精製ヒト BGP 1 g) を coupling buffer に溶解し、4℃で 20 時間混和した。作製したカラムを 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (PB) (pH 8.0) で 15 分間洗浄後、0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) で 2 時間室温で blocking し、3 MKSCN を含む 50 mMPB (pH 6.0) で洗浄した。さらにリン酸緩衝食塩水 (PBS) (0.13 M NaCl, 3.2 mM Na₂PO₄, 6.7 mM Na₂PO₄, pH 7.2) で洗浄した。このアフィニティカラムに抗ヒト BGP 抗体を室温で 1 時間反応させた後、PBS で洗浄し、3 MKSCN を含む 50 mMPB で溶出させた。そして直ちに PBS で平衡化した Sephadex G-25 M カラムで脱塩した。

抗体の特異性は EDTA 脱灰液と精製 BGP を Phastgel (Pharmacia 社) で電気泳動後、ニトロセルロース膜 (東洋濾紙社) に 100 mA, 40 分転写し、PBS で 10 倍に希釈した抗ヒト BGP 抗体により免疫染色¹²⁾することにより検討した。

2.3 標本作製法

材料は胎生 12 週および胎生 17 週の優生保護法による人口流産の胎児、および心房中隔欠損症で死亡した生後 2 カ月の男児のそれぞれから大腿骨遠位端の成長帯の一部を得、periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液²⁰⁾で 4℃ 6 時間固定した。これらを 20% ポリエチレングリコール (MW: 20,000±5,000) に浸漬後、液体窒素にて凍結した。また固定した組織の一部を森ら²¹⁾の方法に従い、15% グリセロールを含む 0.3 MEDTA で -5℃ 下にて 5 日間脱灰した。20% しょ糖と 20% ポリエチレングリコールで洗浄後、液体窒素で凍結した。

2.4 免疫組織化学

2.4.1 光顕的免疫組織化学

Cryostat で凍結切片を作製した。これを内因性 peroxidase を阻止するため、0.6% 過酸化水素水を含むメタノール溶液に浸漬した。次に 5% スキムミルク (雪印乳業) PBS に 30 分浸漬後、アフィニティ精製抗ヒト BGP 抗体、peroxidase-conjugated 抗ウサギヤギ IgG を順次反応させた。発色は complete Graham-Karnovsky medium (0.03% 3,3'-diaminobenzidine, 0.01% H₂O₂, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6)²³⁾ に浸漬することにより行った。

2.4.2 免疫電顕

PLP で固定した組織を -20℃ 下でエタノール脱水系列を通した後、-4℃ で LR White に一晚浸漬後、

40℃ で包埋した。LKB ultra microtome で作製した超薄切片を、4℃ 下に 5% ウシ胎児血清で 5 分間 incubation した後、抗ヒト BGP 血清と 6 時間反応させた。0.05% Tween PBS で洗浄後、15 nm の金コロイドで標識した抗ウサギ IgG ヤギ血清を 6 時間反応させ、未染色のまま JEM 100 C 電子顕微鏡で観察した。

3 結 果

3.1 BGP の精製

EDTA 脱灰粗蛋白を Sephadex G-100 でゲル濾過し、4つのピークを得た (Fig. 1)。これらのうち Void volume から数えて 3 つめのピークは、sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分子量 11,000—17,000 であった (Fig. 4)。これを DE-53 でイオン交換クロマトグラフィをし、5つのピークを得た (Fig. 2)。これらのうち 5 つめのピークを更にイオン交換し、単一のピークを得た (Fig. 3)。このピークは SDS-PAGE で分子量 12,000 (Fig. 4) を示し、更にアミノ酸分析ではグリシン、アラニン、システイン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、リシン、ヒスチジンは完全に一致し、アスパラギン酸やグルタミン酸など BGP の特徴となるアミノ酸が豊富で、Poser *et al.*¹¹⁾ の報告したヒト BGP のそれとほぼ一致した (Table 1)。

Table 1 Amino acid composition of the final BGP preparation.

	Residues/Mol.
Asp	7
Thr	1
Ser	1
Glu	8
Pro	5
Gly	3
Ala	3
half-Cys	2
Val	3
Met	0
Ile	1
Leu	5
Tyr	4
Phe	2
Lys	0
His	1
Arg	3
Trp	—

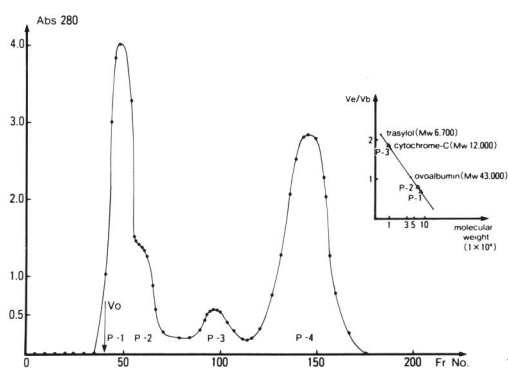


Fig. 1 Sephadex G-100 column chromatography of 0.5 M EDTA-extracted human cortical bone and the molecular weight of its eluate calibrated with standard proteins. About 100 mg of protein was applied to a 2.9×90 cm column at 4°C and eluted at 17 ml/hr.

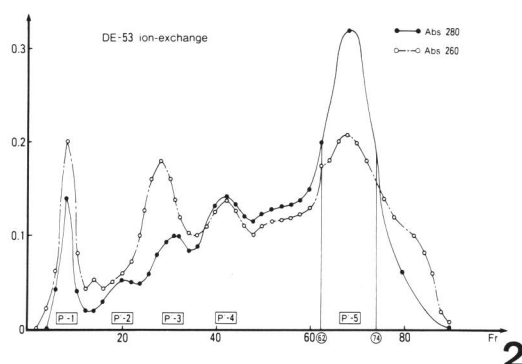


Fig. 2 DE-53 column chromatography of Sephadex G-100 eluate. Approximately 30 mg protein of p-3 fraction (Fig. 1) was applied to the column (1.5×36 cm) and eluted at 4°C with a linear gradient of NH_4HCO_2 (70 mM-700 mM). Flow rate was 30 ml/hr. Molecular weight of P-5 was estimated 12,000.

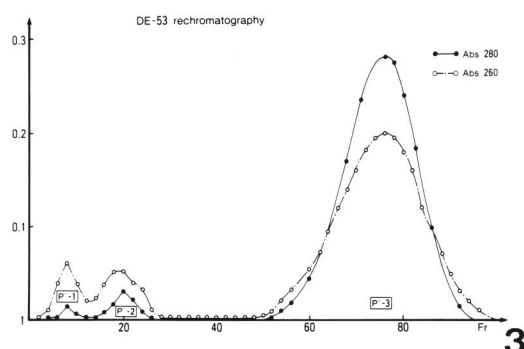


Fig. 3 DE-53 column chromatography of P-5. Approximately 10 mg protein of P-5 fraction (Fig. 2) was applied to the same sized column and eluted at 4°C with a linear gradient of NH_4HCO_3 (200 mM-500 mM). Rechromatography of DE-53 resulted in a single symmetrical peak fraction.

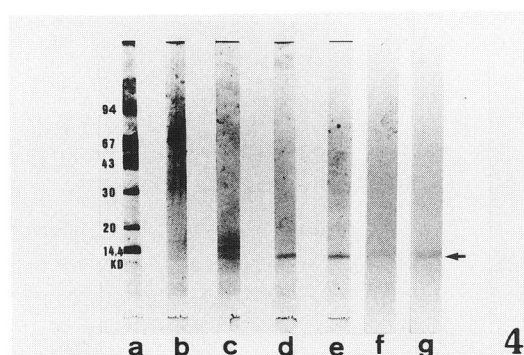


Fig. 4 A gradient SDS-PAGE of the purified BGP. Lane a is calibration. Lane b is EDTA-extracts of human bones. Lane c is P-3 fraction of Sephadex G-100. Lane d is P-5 fraction of DE-53 ion exchange column chromatography. Lane e is the fraction of DE-53 rechromatography. BGP was demonstrated as a single band (arrow) (Mw; 12,000). Lane a-e were stained with Coomassie Brilliant Blue staining. Lane f is EDTA, guanidine-HCl extract reacted to anti human BGP antibody (Western blotting). Lane g is purified BGP reacted to anti human BGP antibody (Western blotting).

3・2 抗ヒト BGP 抗体の特異性

脱灰粗蛋白を SDS-PAGE 後 Western Blotting し、抗ヒト BGP 抗体で免疫染色すると BGP にのみ特異的な反応がみとめられた (Fig. 4)。

3・3 光顕的免疫組織化学

胎生 12 週の新脱灰ヒト骨組織において、抗ヒト BGP 抗体は骨芽細胞の細胞質に慢性に強く反応した。内軟骨性骨化部及び膜性骨化部の骨梁はわずかにしか認められず、そのまわりの類骨には、反応は全く認められなかった (Fig. 5 a)。胎生 17 週の胎児の新脱灰大腿骨遠位端では、骨梁は胎生 12 週のそれに比べてかなり

成熟しており、骨芽細胞や類骨基質は抗ヒト BGP 抗体によって強く染色された (Fig. 5 c)。生後 2 ヶ月では胎生 17 週とほぼ同様の染色性が認められた (Fig. 5 e)。胎生 17 週と生後 2 ヶ月のいずれにおいても、抗ヒト BGP 抗体との反応は骨芽細胞、骨細胞、類骨基質に陽性であったが、破骨細胞、軟骨細胞、軟骨基質には陰性であった。類骨は脱灰骨基質よりも強く染色された

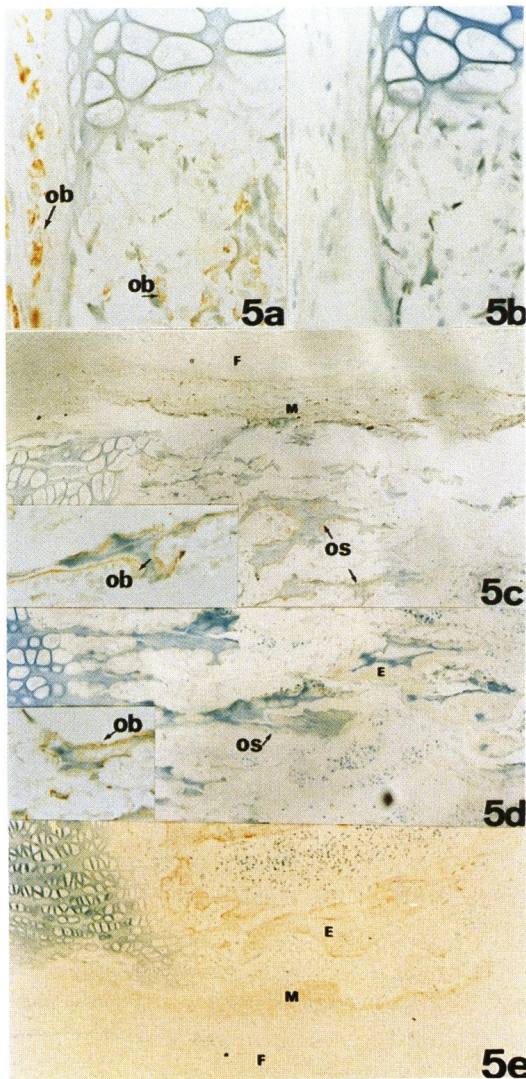


Fig. 5 Growth plate of the femur of developing human bones (undemineralized). (a) The bone tissue of a 12 week fetus immunostained with the anti human BGP antibody. Endochondral Osteoid (os). Osteoblasts (ob). The osteoblast stained strongly but the osteoid and bone matrix are negative. (b) 12 week fetus, control. The serial section of (a) incubated with preimmune serum. No reaction products are seen. (c) the bone tissue of a 17 week fetus immunostained with the anti human BGP antibody. The osteoid stained most intensely. (inset) Higher magnification. The osteoblasts are weakly stained. Fibrous tissue (F), Membranous bone (M), Endochondral bone (E). (d) 40 week fetus. The staining pattern is comparable to that of the 17 week fetus. (e) 2 month child (demineralized).

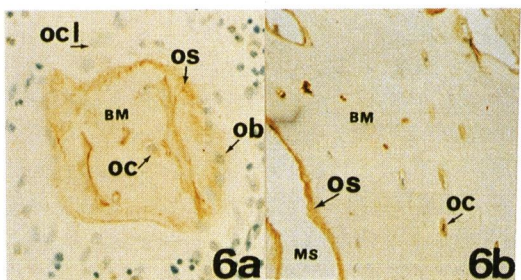


Fig. 6 Immunostains for BGP in the growth plate of a 2 month child. (a) Demineralized. (b) Undemineralized. the intensity of the staining becomes enhanced by demineralization. Bone matrix (BM) Osteocyte (oc), Osteoclast (ocl), Marrow space (MS).

(Fig. 6 a, b). 0.3 M の EDTA で 5 日間脱灰することにより骨基質の染色性に増強が認められたが、類骨基質の染色性には変化がみられなかった。(Fig. 6 a, b). 膜性骨化部において、細胞の染色性はほぼ同様であったが、骨基質は内軟骨性骨化部のそれよりも強く染色された。しかし対照として用いた正常家兎血清の IgG 分画を 1 次抗体として用いたものでは、反応物は認められなかった (Fig. 5 b)。

3・4 免疫電顕

免疫電顕の材料には、胎生 12 週の胎児の非脱灰骨組織を用いた。基質形成を活発に行っている骨芽細胞は形成期の骨芽細胞といわれ、一般に立方形または円錐形をしている、埋め込まれたばかりの類骨中にみられる幼若な骨細胞は類骨細胞と呼ばれ、周囲の類骨に石灰化が起これば、幼若骨細胞となる。形成期の骨芽細胞ならびに幼若骨細胞は、その細胞質中に発達した粗面小胞体を持ち、ミトコンドリアが散在しているが、Post-embedding 法で検索すると、BGP の局在を示す金コロイド粒子は骨芽細胞と骨細胞の粗面小胞体の内腔に局在していた (Fig. 7)。BGP の局在を示す金コロイド粒子は、コラーゲン線維上にび慢性に認められた。しかし、コラーゲン性初期石灰化部位と考えられている hole zone 並びに石灰化球には、特異的な局在は認められなかった (Fig. 8)。

4 考 察

骨組織に存在するカルシウム結合蛋白である BGP は、骨化あるいは石灰化に関与すると考えられているが、その生理的機能が十分解明されていないばかりでなく、正常骨組織内における局在についても、一致した見解が得られていない。また胎児期から生後に至る、生体の最も活発な成長期における BGP の局在を検討した報告もない。そこで我々は、先ず松山と小川が作製した抗ヒト BGP 抗体の特異性を高めるため、BGP の精製に際して、イオン交換樹脂に DE-53 を用い、さらに rechromatography を施行することにより、精製 BGP を作製した。我々が行ったヒト BGP の精製法は、Gundberg *et al.*¹⁸⁾ の方法に従っているが、その一部に改良を加えた。即ち、より多くの protease inhibitor (0.5 mM PMSF, 10 mM benzamidin) を精製課程で用いた。次にイオン交換樹脂には DE-53 を用い、さらに rechromatography を行うことにより、単一の対照性の溶出パターンを得ることができた。この溶出パターンは DEAE-A 25 を用いたときよりも、より分離されていることが確認された¹²⁾。このようにして精製した BGP

は SDS-PAGE で、分子量 12,000 の単一バンドを示し、DEAE-A 25 を用いたときより、より精製されたものと考えられる。この BGP のアミノ酸分析の結果は、抗ウシ BGP 家兎抗体をリガンドとしたアフィニティカラムにより精製された Poser *et al.* のヒト BGP のそれとほぼ一致した。そこでこの精製 BGP をリガンドとして抗ヒト BGP 抗体をアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、抗ヒト BGP 特異抗体を得た。このようにアフィニティ精製した抗ヒト BGP 抗体は、免疫組織化学的にも軟骨組織と反応せず、抗体の特異性が向上したことが分かった。これは生化学的に軟骨組織に Gla 残基がほとんど含まれないとする Price *et al.*³⁾ の報告に一致する。そこでこの抗体を用いて、骨形成が始まる胎生 12 週から生後 2 カ月までのヒトの大腿骨遠位端の骨化前線における BGP の局在を検索した。その結果、BGP が骨化前線に特異的に局在することが認められた。即ち、BGP は胎生 12 週では骨芽細胞に強く陽性で、類骨には陰性であり、17 週から生後にかけては骨芽細胞より類骨基質に強く認められた。

Hauschka *et al.*²²⁾ が胎生期から生後に至るニワトリの骨組織における BGP 含量の増加率はその初期で最大になることを報告している事を考慮すると、BGP は骨形成の初期において、骨形成に関与する一つの因子である可能性がある。また胎生 12 週において類骨に染色性が認められなかった理由は不明であるが、Bronckers *et al.*¹⁶⁾ は、ラットの骨組織において、BGP は骨芽細胞、骨細胞、骨基質に局在するが、類骨にはその局在は認められないと報告している。このように骨芽細胞中の BGP と骨基質中の BGP が同定できて、両者の間にある類骨基質中に BGP が存在しないということは理論的に矛盾するように思われるが、類骨中の BGP は何等かの理由で、免疫組織学的には十分検出できない状態にあることが想察される。我々の検索で、胎生 17 週目以降の類骨には BGP が免疫学的に証明されたことから、固体発生的に、あるいは系統発生的に、検出し難い要因が存在するのかも知れないが、今回の検索では明らかにすることができなかった。この点は、今後さらに検出法の感度を高めるなどして追求されなければならない。

Price *et al.*¹⁴⁾ はラットの骨肉種に由来する細胞株の培養上清中に BGP が存在することを報告し、骨芽細胞が BGP を分泌している事を示唆した。さらに Camarda *et al.*¹⁷⁾ は骨芽細胞の電顕免疫組織化学で、BGP が粗面小胞体および Golgi 装置など、分泌蛋白の合成分泌に関与する細胞内小器官内に局在することを報告して

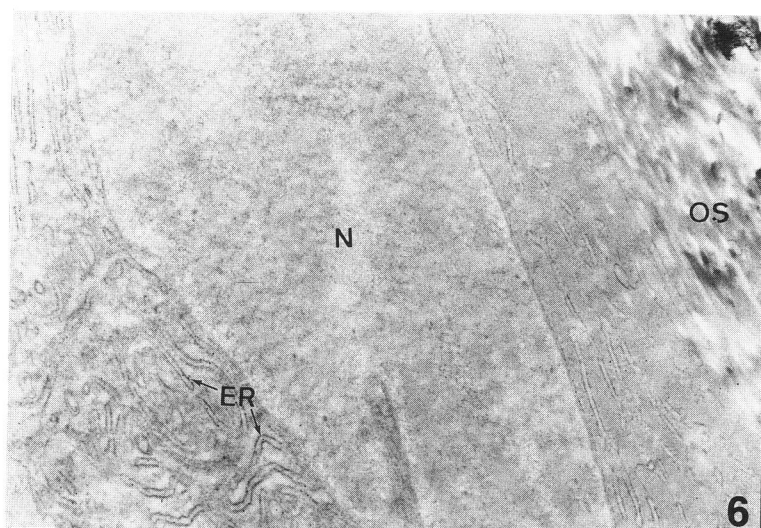


Fig. 7 The electronmicrographs stained for BGP. Osteoblast. Gold particle are in ER and Golgi cisternae. Nucleus (N). Endoplasmic reticulum (ER). Osteoid (OS). ($\times 10,000$)

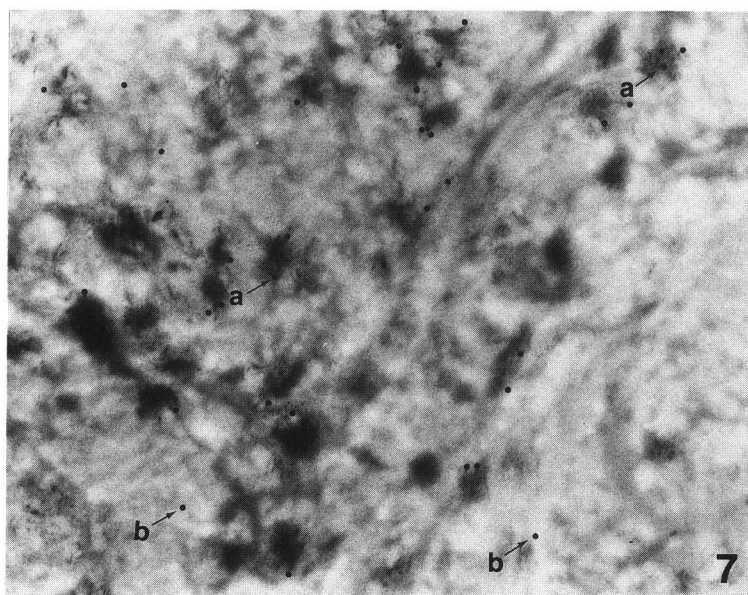


Fig. 8 Undemineralized bone with immunogold method. Gold particles are seen in the mineralization nodules (a) and other parts of the osteoid (b) and bone matrix.

いる。今回の免疫電顕による検索で、BGP は骨芽細胞ならびに骨細胞の粗面小胞体の内腔に局在していた。これらは Leblond と Weinstock²⁴⁾ が、³H-プロリンを用いた電顕オートラジオグラフィーにより、プロリンが粗面小胞体、Golgi 装置を経由して経時的に類骨基質中に分泌される過程を視察していることを考慮すると、BGP も同様の経過を経て細胞外に分泌されている可能性が示唆される。また Price *et al.*²⁵⁾ は同じラットの骨肉腫に由来する細胞株を用いて、分子量 9,000 の BGP 前駆蛋白を報告している。BGP 前駆蛋白が細胞内のどの部位で修飾され、分泌型の BGP 蛋白になるかは明らかにされていないが、我々の抗ヒト BGP 抗体が細胞内の粗面小胞体と細胞外基質の BGP のいずれとも反応したことは、我々の精製した抗ヒト BGP 抗体が、BGP と、その前駆蛋白とに共通するエピトープを認識している可能性を示唆している。骨組織の石灰化の過程は未だ不明の点が多いが、現在その初期石灰化部位として考えられているものは、基質小胞性石灰化における基質小胞 matrix vesicle²⁶⁾ と、コラーゲン性石灰化における hole zone²⁷⁾ である。BGP は骨組織におけるカルシウムイオン結合蛋白であるため、発見当初より骨組織の石灰化に関与すると考えられてきた。今回の免疫電顕による検索では、類骨から骨基質への移行部において、BGP は初期石灰球ならびにコラーゲン線維間に認められたが、基質小胞内には認められず、また hole zone には認められたが、hole zone に特に強い局在を示すことはなかった。BGP の反応産物は、hole zone 以外の部分にも認められた。このように、初期石灰化部位と考えられる場所に特異的な BGP の局在を認めることは出来なかった。BGP の生合成には、Gla 残基形成に関与するビタミン K、プロリンのヒドロキシル化に関与するビタミン C、BGP 合成を促進するビタミン D が関与するといわれている²⁸⁾。Price *et al.*²⁹⁾ はラットにビタミン K 拮抗剤であるワーファリンを投与し、BGP の生合成を抑制して、血中の BGP レベルを低下させることにより、骨端線の早期閉鎖とカルシウムの過度の沈着を起こさせた。さらに Hauschka *et al.*⁸⁾ は、brushite から hydroxyapatite への結晶の変換が、BGP により阻害されることを報告している。以上のことから考えると、BGP は石灰化に積極的に関与するというより、むしろ石灰化をコントロールしている可能性が示唆される。骨形成と BGP との関係は、免疫組織化学的に、成熟した類骨に強く BGP の染色が認められ、骨芽細胞や骨細胞の粗面小胞体にその局在が認められたことと、上記の Price *et al.*²⁹⁾ の報告において、BGP

の欠乏が骨端線の早期閉鎖を起こさせることを考慮すると、BGP は骨形成に重要な役割を演じていることが考えられる。さらに最近、骨形成を司る細胞は骨芽細胞だけでなく、破骨細胞も骨形成に関与していることが示されている。これは骨芽細胞の分化が、破骨細胞由来の coupling factor に依存するという説³⁰⁾ である。また Mundy *et al.*¹⁰⁾ 並びに Moor *et al.*⁹⁾ は各々 BGP が破骨細胞に対し、chemotaxis 作用を発現することを報告している。骨形成の機序は未だ不明であるが、BGP が骨芽細胞によって合成分泌され、骨形成部位に選択的に高濃度に存在すること、骨形成に関与する細胞間に、相互作用を持つことなどからも、BGP は骨形成に重要な働きをなしていることが示唆される。

5 ま と め

- 1) ヒト皮質骨の EDTA 脱灰描出、Sephadex G-100 ゲル濾過、DE-53 イオン交換クロマトグラフィーにより、ヒト BGP を精製した。この精製では BGP は SDS-PAGE で推定した分子量は 12,000 であった。アミノ酸分析で、これまでの報告とほぼ一致した。
- 2) 精製 BGP をリガンドとして抗ヒト BGP ウサギ抗体をアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。
- 3) 胎生 12 週から生後 2 カ月までのヒト骨組織について免疫組織学的に BGP の局在分布を検索した。胎生 12 週では骨芽細胞にその局在が認められ、類骨、軟骨細胞、破骨細胞、線維芽細胞には、その局在は認められなかった。胎生 17 週以降では骨芽細胞、骨細胞、類骨にその局在は認められた。
- 4) 脱灰することにより、骨基質の染色生に増強が認められた。
- 5) 免疫電顕による検索で、BGP は骨芽細胞、骨細胞の小胞体、ゴルジ装置内と類骨の初期石灰化球、コラーゲン線維上に認められた。

謝 辞

御指導・御校閲いただきました本病理学第二講座、森道夫教授ならびに整形外科科学講座、石井清一教授に深謝いたします。

また、本研究に貴重な御助言をいただきました病理学第二講座の諸先生、整形外科科学講座、中原正雄助教授、ならびに材料を提供していただきました。整形外科科学講座、薄井正道助教授、ならびに国立札幌病院整形外科山脇慎也先生、標本の作製にたずさわった研究

補助員の方々に感謝いたします。

参考文献

1. Hauschka, P. V. and Gallop, P. M.: Purification and calcium-binding properties of osteocalcin, the γ -carboxyglutamate-containing protein of bone. In: Wasserman, R. H., Corrado, R. A., Carafoli, E., Fretsinger, R. H., MacLennan, D. H. and Siegel, F. L.: Calcium-binding proteins and calcium function. Proceedings of the international symposium on calcium-binding proteins and calcium function in health and disease, June 5-9, 1977, North-Holland, New York (1978).
2. Hauschka, P. V., Lian, J. B. and Gallop, P. M.: Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**, 3925-3929 (1975).
3. Price, P. A., Otsuka, A. S., Poser, J. W., Kristaponis, J. and Raman, N.: Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **73**, 1447-1451 (1976).
4. Price, P. A., Otsuka, A. S., and Poser, J. W.: Comparison of γ -carboxyglutamic acid-containing proteins from bovine and sword fish bone: Primary structure and Ca^{2+} binding. In: Wasserman, R. H., Corrado, R. A., Carafolini, E., Fretsinger, R. H., MacLennan, D. H. and Siegel, F. L.: Calcium-binding proteins and calcium function. Proceedings of the international symposium on calcium-binding proteins and calcium function in health and disease, June 5-9, 1977, North-Holland, New York (1978).
5. Otawara, Y., Hosoya, N., Kasai, H., Okuyama, N. and Moriuchi, S.: Purification and characterization of calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid from rat bone. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** **26**, 209-219 (1980).
6. Hauschka, P. V., Carr, S. A. and Bieman, K.: Primary structure of monkey osteocalcin. **Biochemistry** **21**, 638-642 (1982).
7. Poser, J. W. and Price, P. A.: A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. **J. Biol. Chem.** **254**, 431-436 (1979).
8. Hauschka, P. V., Lian, J. B. and Gallop, P. M.: Direct identification of the calcium binding amino acid γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**, 3925-3929 (1975).
9. Malone, J. D., Teitelbaum, S. L., Griffin, G. L., Senior, R. M. and Kahn, A. J.: Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. **J. Cell Biol.** **92**, 227-230 (1982).
10. Mundy, G. R. and Poser, J. M.: Chemotactic activity of the γ -carboxyglutamic acid containing protein in bone. **Calcif. Tissue Int.** **35**, 164-168. (1983).
11. Poser, J. W., Esch, F. S., Ling, N. C. and Price, P. A.: Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. **J. Biol. Chem.** **155**, 8685-8691 (1980).
12. 松山敏勝, 小川勝洋: ヒト骨中 γ -Carboxyglutamic acid 含有蛋白に関する研究—蛋白の精製抗体の作製, 及び免疫組織化学的研究— **札幌医学雑誌** **54**, 625-635 (1985).
13. Price, P. A. and Nishimoto, S. K.: Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **77**, 2234-2238 (1980).
14. Price, P. A. and Baukol, S. A.: 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 increases synthesis of the vitamin-K dependent bone protein by osteosarcoma cells. **J. Biol. Chem.** **255**, 6579-6583 (1980).
15. 松山敏勝, 太田貴之, 石井清一, 薄井正道, 浅野 奨, 山脇慎也: Bone Gla Protein (BGP) による骨原性腫瘍, 石灰化疾患の鑑別診断への応用. **日整会誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc)** **61**, 3 (1987).
16. Bronckers, A. L. J. J., Gay, S., Dimusio, M. L. and Butler, W. T.: Immunolocalization of γ -carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. **Coll. Relat. Res.** **5**, 273-281 (1985).
17. Camarda, A. J., Butler, W. T., Finkelman, R. D. and Naci, A.: Immunocytochemical localization of γ -carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. **Calcif. Tissue Int.** **40**, 349-355 (1987).
18. Gundberg, C. M., Hauschka, P. V., Lian, J. B. and Gallop, P. M.: Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. **Methods Enzymol.** **107**, 516-544 (1984).
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**, 265-275 (1955).
20. Maclean, I. M. and Nakane, P. K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy **J. Histochem. Cytochem.** **22**, 1077-1083 (1974).
21. 森 士朗, 手島卓一, 沢井高志, 京極方久: 硬組織に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色のための脱灰法の開発. **病理と臨床** **4**, 667-

- 670 (1986))
22. Hauschka P. V. and Reid M. L.: Timed appearance of a calcium binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in developing chick bone. **Dev. Biol.** **65**, 426-434 (1978)
23. Graham, R. C. and Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. **J. Histochem. Cytochem.** **14**, 291-302 (1967)
24. Leblond, C. P. and Weinstock, M.: Radioautographic studies of bone formation, In: Bourne, G. H.: The biochemistry and physiology of bone. Vol 3. Development and growth 2nd ed. 181, Academic press, New York, London, (1971)
25. Nishimoto, S. K. and Price, P. A.: Secretion of the vitamin-K-dependent protein of bone by rat osteosarcoma cells. Evidence for an intracellular precursor. **J. Biol. Chem.** **255**, 6579-6583 (1980)
26. Anderson, H. C.: Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. **J. Cell Biol.** **35**, 81 (1967)
27. Fion-Jackson, S.: The fine structure of developing bone in the embryonic fowl. **Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]** **146**, 270-280 (1957)
28. Lian, J. B., Glimcher, M. G., Roufosse, A. H., Hauschka, P. V., Gallop, P. M., Cohen-Solal, L. and Reit, B.: Alterations of the γ -carboxyglutamic acid and osteocalcin concentrations in vitamin D deficient chick bone. **J. Biol. Chem.** **257**, 4999-5003 (1982)
29. Price, P. A., Williamson, M. K., Haba, T., Dell, R. B. and Jee, W. S. S.: Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**, 7734-7738 (1982)
30. Farley, J. R., Masuda, T., Wergedal, J. E. and Baylink, D. J.: Human skeletal growth factor: Characterization of the mitogenic effect on bone cells *in vitro*. **Biochemistry** **21**, 3508-3513 (1982)
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学整形外科科学講座 太田貴之