

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 —

松 山 敏 勝

札幌医科大学整形外科学講座 (主任 石井清一 教授)

小 川 勝 洋

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Human Bone γ -Carboxyglutamic Acid-Containing Protein

— Purification, Production of the Specific Antibody and
Immunohistochemical Localization in the Human Ossifying Front —

Toshikatsu MATSUYAMA

Department of Orthopedic Surgery, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. S. Ishii)

Katsuhiro OGAWA

Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. M. Mori)

Bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein (BGP) has an ability to bind calcium ion, being a major component of noncollagenous protein in bone tissue. Although BGP has been isolated from various species, purification of BGP from the human bone by Poser *et al.* was only successful by means of the immunoabsorbent method. It is a major difficulty to isolate human BGP by the procedures available for other species (extraction with 0.5 M EDTA, pH 8.0, Sephadex G-100 gel filtration, and DEAE Sephadex A-25 ion exchange chromatography) because of degradation of proteins by proteases during prolonged decalcification. We succeeded in the isolation of human BGP by the use of a protease inhibitor. Molecular weight of the purified human BGP was about 8,500-9,000. It showed an altered electrophoretic mobility in the presence of calcium ion. Amino acid analysis revealed that one molecule contains 2 γ -carboxyglutamic acid residues. These physio-chemical properties were consistent with those of BGP, previously isolated from other species. Antisera raised in rabbits to the human BGP reacted to the solid phase fixed BGP even at the dilution of 1/27,000 in ELISA. Immunohistochemical study demonstrated that BGP was localized in the cytoplasm of osteoblasts, osteocytes, hypertrophic chondrocytes and osteoclasts, and the periphery of osteoid matrix in the ossifying front of human bone tissue. These findings support the hypothesis that BGP has a major role in the ossification of bone tissue.

(Received September 12, 1985 and accepted September 30, 1985)

Key words: γ -Carboxyglutamic acid, Bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein, BGP, Human cortical bone, Calcium-binding protein

* 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講座で行なわれたものである。

1 結 言

骨組織は69%の無機質、22%の有機質ならびに9%の水より構成される。有機質の90%はtype I collagenで、残りが非コラーゲン蛋白である。Bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein (以下BGPと略す)は、非コラーゲン蛋白の主要な成分であり、その20%を占める¹⁾。 γ -Carboxyglutamic acid (以下Glaと略す)は、glutamic acid (以下Gluと略す)の γ 位がカルボキシル化された特殊なアミノ酸で、Gla残基の2個のカルボキシル基は Ca^{2+} イオンと結合する性質を有している²⁾。

BGPは多くの動物より分離され、その物理化学的性質やアミノ酸組成についての多くの報告があるが、その生理的な働きについては未だ不明な点が多い³⁻⁴⁾。BGPの分離・精製は、1975年 Hauschka *et al.*⁵⁾ がニワトリで成功して以来、現在までに、ウシ⁶⁾、メカジキ⁷⁾、ラット⁸⁾ 及びサル⁹⁾ で行なわれている。ヒトBGPについては、1980年 Poser *et al.*¹⁰⁾ が、家兎抗ウシBGP抗体をリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した報告のみである。これは、ヒト骨の入手が困難な他に、他の動物種より脱灰に時間がかかる上、骨髄内 protease 活性が高いために蛋白の分解がおこることによると考えられる。今回、我々はこの点に留意して、protease inhibitor を使用し、さらに低温にて操作を行なうことにより、従来より動物で行なわれてきた方法 (EDTA 脱灰抽出, Sephadex G-100 によるゲル濾過, DEAE Sephadex A-25 によるイオン交換クロマトグラフィー) を用いてヒトBGPを分離することに成功した。さらに、家兎抗ヒトBGP抗体を作製し、この抗体を用いた酵素抗体法によりヒト骨組織中の石灰化前線におけるBGPの組織内局在を明らかにした。

2 実験方法

2.1 実験材料

56歳より86歳までの剖検症例7例の病理検査の目的で採取した大腿骨と腸骨皮質骨の病変のない一部を、骨髄と結合織を取り除いて用いた。

2.2 精製法

Price *et al.*⁶⁾ の方法に準じて精製を行なった (Fig. 1)。材料を、2~3 mm に細切し、脱イオン水で水洗し、可溶成分を除去した。これを Polytron RT10/35 で、粉碎し、5~10 倍量の脱イオン水で4℃、2時間水洗した。6,000 g×20 分の遠心で得られた沈澱を透析膜

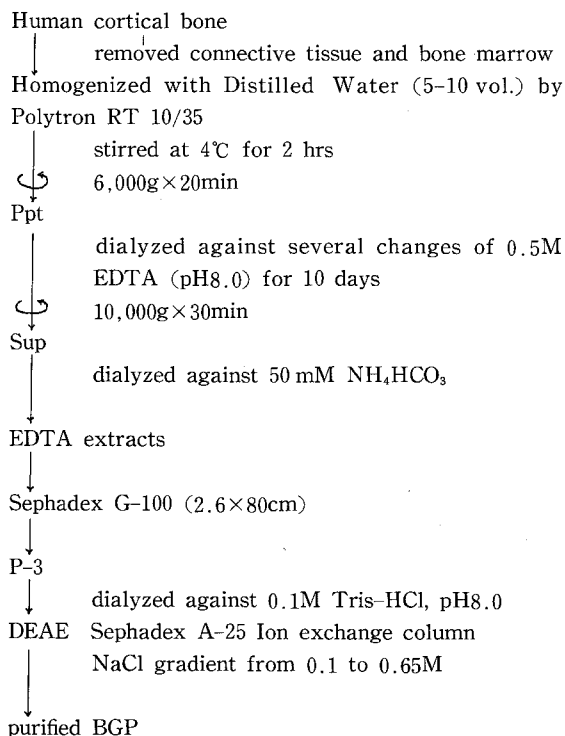


Fig. 1 Procedure for purification of BGP.

(Spectropor 社 cut off mol. wt. 1,000)に移し、0.5 M-EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 8.0, 4℃の条件で10日間、透析脱灰した。透析外液の交換は2日に1度行なった。次に試料を100,000 g×30分遠心して、その上清を50 mM NH_4HCO_3 , pH 7.6, 4℃で透析したのち、限外濾過器 (Amicon 社 UH-1, cut off mol. wt. 1,000) で濃縮し、脱灰粗蛋白とした。この試料の150 mgを、50 mM NH_4HCO_3 , pH 7.6 buffer で平衡化した Sephadex G-100 column (2.9×80 cm) (Pharmacia 社) にか、14 ml/時間、4 ml/tube の条件下で溶出し、分子量約10,000 前後に相当する分画を集めた。この分画を限外濾過器 (Amicon 社 UH-1) で濃縮したのち、0.1 M Tris HCl, pH 8.0 で透析し、上記の buffer で平衡化した DEAE Sephadex A-25 column (1.0×10 cm) (Pharmacia 社) を用いてイオン交換カラムクロマトグラフィーを行なった。カラム吸着成分を、0.1 M より0.75 M の NaCl の連続濃度勾配で30 ml/時間、4.5 ml/tube の条件下で溶出して精製BGPとした。精製BGPは、さらに脱イオン水で透析脱塩を行ない、凍結乾燥試料として-80℃に保存した。

2.3 精製純度の検定

純度の検定は、電気泳動とアミノ酸分析によって行なった。また、各精製段階での蛋白定量は Lowry *et al.*¹¹⁾ の方法で測定した。

2.3.1 電気泳動

Weber-Osborn¹²⁾ の方法に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、分子量を測定した。BGP は Ca^{2+} イオンの存在下で泳動度が変化することが知られているところから、Kakiuchi *et al.*¹³⁾ の方法に従い、泳動緩衝液とゲル内に 1 mM CaCl_2 を添加し、易動度の変化を観察した。

2.3.2 アミノ酸分析

各精製段階の試料及び標準となる合成 Gla (Calbiochem 社) を、それぞれ約 200~300 μg 秤量し、酸およびアルカリ加水分解した。酸加水分解は、6N-HCl で窒素置換後に減圧封管し、110°C で 24 時間行なった。アルカリ加水分解は、試料をポリプロピレンチューブ (Nunc 社) にとり、2.5 N-NaOH 0.4 ml を添加した後、Pyrex 社製試験管内で窒素置換して減圧封管し、110°C で 24 時間の加水分解を行なった。各精製段階のアミノ酸の定量を日立 835 型高速アミノ酸分析を用いて ninhydrin 発色により実施した。Gla は Glu のカルボキシル化により生成されるので各試料の Gla/(Glu+Gla) $\times 100$ の値を % γ -carboxylation 値として、各精製段階の精製純度の比較に用いた。

2.4 抗体の作製

Worobec *et al.*¹⁴⁻¹⁵⁾ の方法に準じ、50%(w/v) polyvinyl pyrrolidone (Mw. 40,000 : 半井化学) 1.5 ml に、0.5 ml の 0.15 M NaCl に溶解した 1 mg 精製 BGP を加え、37°C で 2 時間混和した。これを、2 ml Freund complete adjuvant (Difco 社) と混合して emulsion を作製し、2 匹の家兎の背部皮下に注射した。免疫は 2 週間おきに計 5 回行なった。

2.5 抗体価の検討

抗体価の検定は ELISA 法¹⁶⁾ で行なった。精製 BGP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をポリスチレン製 96 穴の immunoplate (Dynatech 社) の各 well あたり 50 μl 滴下し、4°C、湿箱内で一晚吸着させた。その後、2% skim milk (雪印乳業) PBS で各 well を満たし 37°C で 1 時間放置した。0.05% Tween-PBS (以下 T-PBS) で 4 回洗浄後、PBS で段階希釈した抗 BGP 抗体を 50 μl 加え、37°C で 2 時間反応させた。つぎに、T-PBS で 4 回洗浄し、PBS で 500 倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ Ig ブタ抗体 (DAKO 社) を各 well あたり 50 μl 加え、37°C、2 時間反応させた。さらに、T-PBS で洗浄後 0.04% o-phenylene diamine

(片山化学)、0.01% H_2O_2 含有 0.1 M リン酸クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を各 well あたり 100 μl 添加し、37°C の暗所で 30 分間呈色反応を行なった。反応は、各 well あたり 50 μl 4N- H_2SO_4 を加えて停止し、オートリーダー MR-580 (Dynatech 社) で 490 nm の吸光度を測定した。対照としては非免疫家兎血清を用いた。

2.6 抗体特異性の検討

EDTA 脱灰粗蛋白液と精製 BGP を Davis¹⁷⁾ の方法に従って、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。ついで、Towbin *et al.*¹⁸⁾ の方法に準じて、nitrocellulose 膜 (東洋濾紙社) に、0.2 A、60 V、4 時間 blotting した。泳動 buffer は 25 mM Tris \cdot 192 mM glycine buffer を用いた。試料を blotting した nitrocellulose 膜は PBS で 500 倍に希釈した抗 BGP 血清により免疫染色を行なった。

2.7 抗 BGP 血清による免疫組織化学

BGP の骨組織における組織内分布を Sternberger *et al.*¹⁹⁾ の方法に従って PAP 法により検索した。

2.7.1 標本作製法

左腓骨骨肉腫で切断した 15 歳男性の手術材料の正常脛骨骨端部を試料とした。骨組織を 10% ホルマリンで固定し、3 mm 幅にスライスして 0.5 M-EDTA, pH 8.0 で脱灰した。脱灰液は 2 日に 1 度交換し、1 週間継続した。脱灰完了後、組織をパラフィン包埋し、厚さ約 4 μm に薄切して酵素抗体法に用いた。

2.7.2 酵素抗体法

パラフィン薄切切片を、ベンゼンで脱パラフィン後、0.6% H_2O_2 メタノール溶液に 30 分浸漬し、内因性 peroxidase を阻止した。つぎに、PBS で洗浄後、5% skim milk (雪印乳業) PBS に 30 分浸漬した。軽く PBS で洗浄後、抗 BGP 抗体、または抗 type I collagen 抗体 (Advance 社) を PBS でそれぞれ 200 倍、100 倍に希釈して、室温で 2 時間、湿箱の中で反応させた。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、50 倍希釈の抗ウサギ Ig ブタ血清 (DAKO 社) を 2 次抗体として、室温で 1 時間、湿箱の中で反応させた。PBS で洗浄後、50 倍希釈のウサギ PAP 複合体血清 (DAKO 社) を 3 次抗体として、室温で 1 時間、湿箱の中で反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ反応基質液 (0.01% H_2O_2 加 3, 3'-diaminobenzidine, 50 mM Tris \cdot HCl, pH 7.6) 中で 2~3 分反応させた。PBS で洗浄後、メチルグリーンあるいはヘマトキシリンで核染し、脱水・透徹・封入後に鏡検した。対照として非免疫家兎血清を 1 次抗体として用い、同様の操作を行ない比較した。

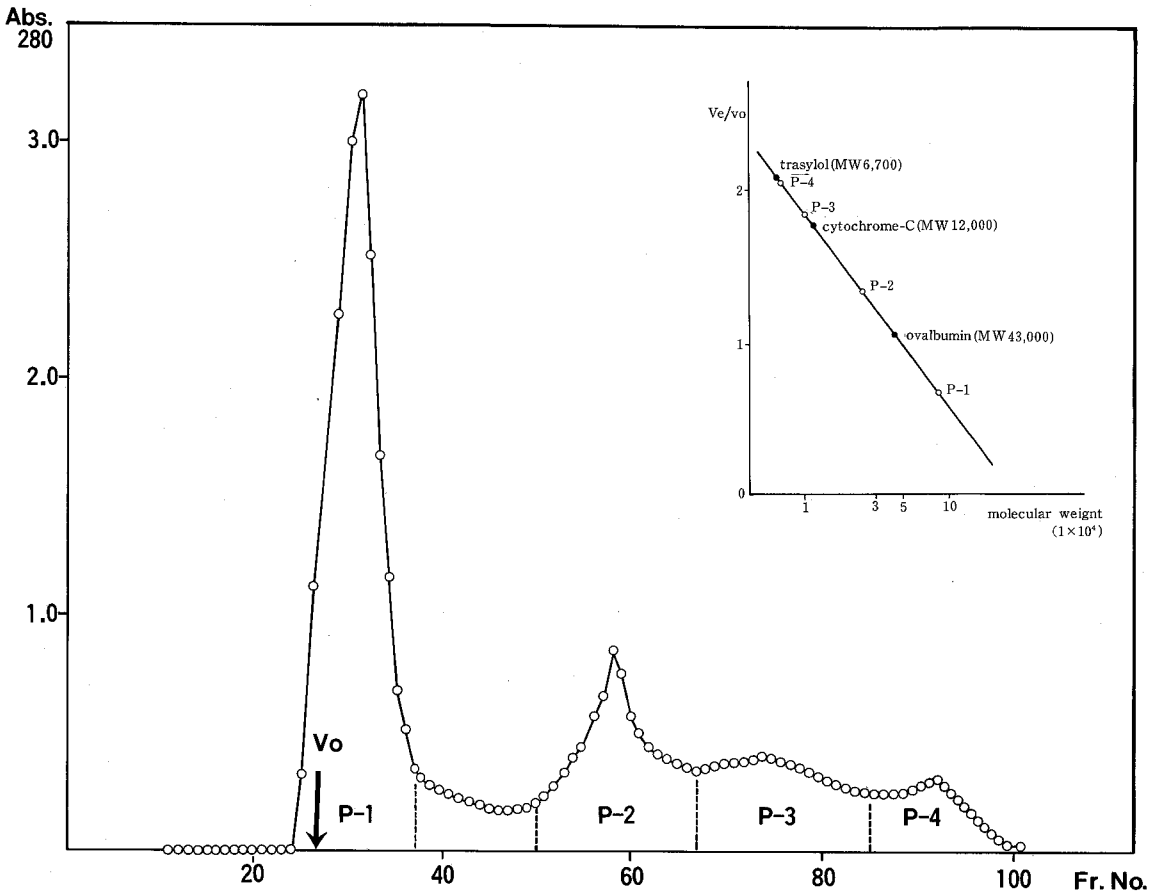


Fig. 2 Gel filtration of 0.5M-EDTA extracts by Sephadex G-100 column chromatography. Insert is the calibration with standard proteins. P-3 was estimated as a molecular weight of 10,000.

3 結 果

3.1 BGP の精製

Sephadex G-100 によるゲル濾過では4つのピーク (P-1, 2, 3, 4) が得られた (Fig. 2)。これらのうち、P-3 は分子量約 10,000 に相当し、アミノ酸分析で高いGla 残基の存在を認めたため、次の精製過程に用いた。この分画について DEAE Sephadex A-25 によるイオン交換クロマトグラフィーを行なったところ5つの分画 (P-3-1, 2, 3, 4, 5) が得られた (Fig. 3)。

3.2 精製 BGP の純度の検討

3.2.1 電気泳動

DEAE Sephadex A-25 の各分画について Weber-Osborn の方法に準じて 15% SDS-PAGE を行なったところ、P-3-4 が分子量 8,500~9,000 の単一バンドを示した。また、Kakiuchi *et al.*¹³⁾ による Ca^{2+} 添加の系では無添加の系に比べ泳動が明らかに遅延することが

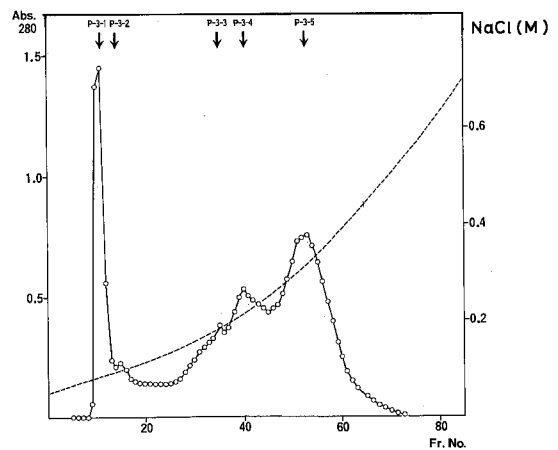


Fig. 3 DEAE Sephadex A-25 column chromatography of P-3 fraction in Fig. 2. BGP was eluted at P-3-4.

確認された (Fig. 4-A, B).

3.2.2 アミノ酸分析

標準アミノ酸と合成 Gla の溶出位置は, Gla, Glu がそれぞれ約 19 分, 24 分に溶出し, Gla の ninhydrin に対する color factor は Glu の 42% であった. また, Gla は酸加水分解で Glu の位置に溶出することを確認した. P-3-4 を酸ならびにアルカリ加水分解し, アミノ酸 1,000 残基あたりの各アミノ酸残基を求め, さらに分子量から, 精製 BGP 1 分子あたりのアミノ酸残基数を求めた (Table 1).

その結果, 精製 BGP の γ -carboxylation は, 22.7% で, Gla は 1 分子あたり 2 個含まれていた. 他のアミノ酸組成についても Poser *et al.*¹⁰ のヒト BGP の報告とはほぼ一致していた.

3.2.3 各精製段階での精製比

蛋白の収量は, 粉碎皮質骨 100 g あたり, EDTA 脱灰抽出の段階では 223.7 mg, Sephadex G-100 ゲル濾過の P-3 分画では 48.5 mg, DEAE Sephadex A-25 イオン交換クロマトグラフィーの P-3-4 分画では 14.2 mg であった. また, γ -carboxylation は P-3-4 で 22.7% で, EDTA 脱灰抽出の段階より, ほぼ 2.9 倍の上昇を認めた (Table 2).

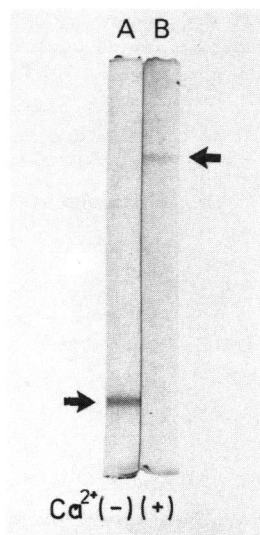


Fig. 4 Ca^{2+} -dependent electrophoretic mobility of purified BGP was performed according to the method of Davis (7.5% in acrylamide, pH9.4).

A; absence of 1 mM CaCl_2
B; presence of 1 mM CaCl_2

Table 1 Amino acid composition of purified BGP.

Amino acid	Residues/1000 Res.*	Residues/Mol. Wt.**	Residues/Mol.
Gla	39.4***	1.94	2
Asp	132.9	6.50	7
Thr	32.4	1.59	1
Ser	23.8	1.17	1
Glu	134.8	5.60	6
Pro	96.0	4.70	5
Gly	63.5	3.12	3
Ala	53.5	2.63	3
half-Cys	35.0	1.70	2
Val	54.5	2.67	3
Met	8.7	0.43	0
Ile	23.4	1.15	1
Leu	78.0	3.82	4
Tyr	91.0	4.44	4
Phe	33.0	1.62	2
Lys	28.6	1.40	1
His	19.5	0.95	1
Arg	52.9	2.59	3
Trp	5.0	0.25	0

* These values are the averages of two 24-h. hydrolyses.

** Residues per molecule expected from molecular weight.

*** Determined by alkaline hydrolysis.

Table 2 Protein recovery and purification index of BGP from human bone.

Purification step	Protein contents* (mg/100 g of bone tips)	% γ -carboxylation**
EDTA extracts	223.7	7.8
Sephadex G-100 P-3	48.5	12.4
DEAE Sephadex A-25 P-3-4	14.2	22.7

* Measured by Lowry *et al.*¹³⁾** Equal to the ratio; $100 \times \text{Gla} / (\text{Gla} + \text{Glu})$.

3.3 抗 BGP 蛋白の作製とその特異性の検討

上記の方法で免疫した家兎より、ELISA 法によって、精製 BGP と 27,000 倍稀釈まで反応する抗 BGP 抗体が得られた (Fig. 5).

また、脱灰粗抽出蛋白を 10% PAGE 後、nitrocellulose 膜に Western blotting し、抗 BGP 抗体で免疫染色したところ、BGP にのみ特異的に反応することが確認された (Fig. 6).

3.4 BGP の骨組織における組織内分布

正常ヒト骨組織における BGP と type I collagen の局在を比較したところ type I collagen は骨膜および骨皮質全体に線維状局在を示した (Fig. 7-a). 一方、

BGP は、骨芽細胞の細胞質と、層状骨に近接した細胞外基質に線維状局在を示した (Fig. 7-b). 内軟骨性骨化部では、type I collagen は、軟骨層下層いわゆる lower hypertrophic zone から、骨幹部側の基質中に陽性に認められた (Fig. 7-c). これに対して、BGP は、lower hypertrophic zone の肥大化軟骨細胞の細胞質と類骨基質の辺縁に沿って陽性に認められた (Fig. 7-d). さらに成熟骨梁では、type I collagen が骨梁全体に陽性であったのに対して BGP は、lacunae 内の骨細胞の細胞質、lacunae の辺縁、及び骨梁に沿って存在する骨芽細胞の細胞質に微細顆粒状に局在が認められた (Fig. 8-a). また、破骨細胞の細胞質に粗大顆粒状に局在が認められた (Fig. 8-b).

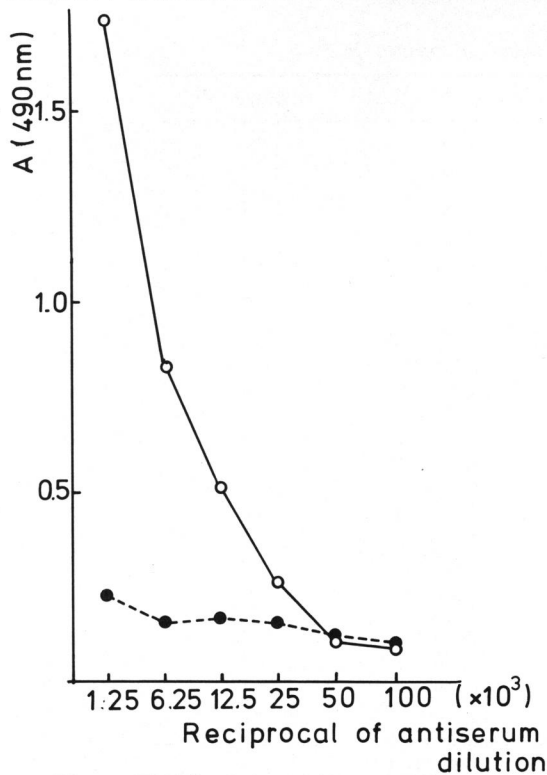


Fig. 5 ELISA of the rabbit anti-BGP serum. Open circle ; anti-BGP serum. Closed circle ; normal rabbit serum.

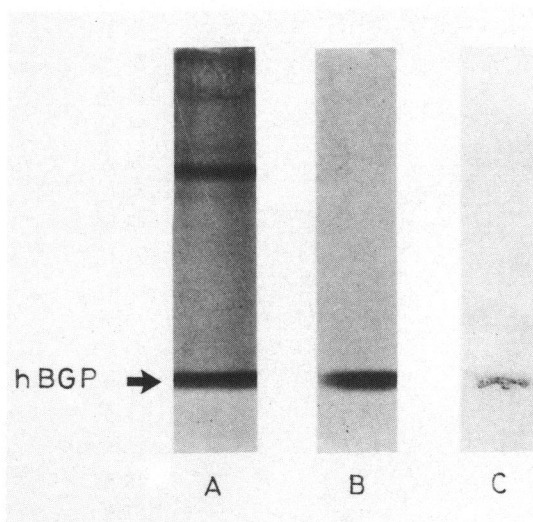


Fig. 6 Western immunoblotting of BGP. A ; Comsie blue staining of EDTA extracts. B ; Comsie blue staining of purified BGP. C ; Immunostaining of the EDTA extracts by rabbit anti-BGP (dilution $\times 500$).

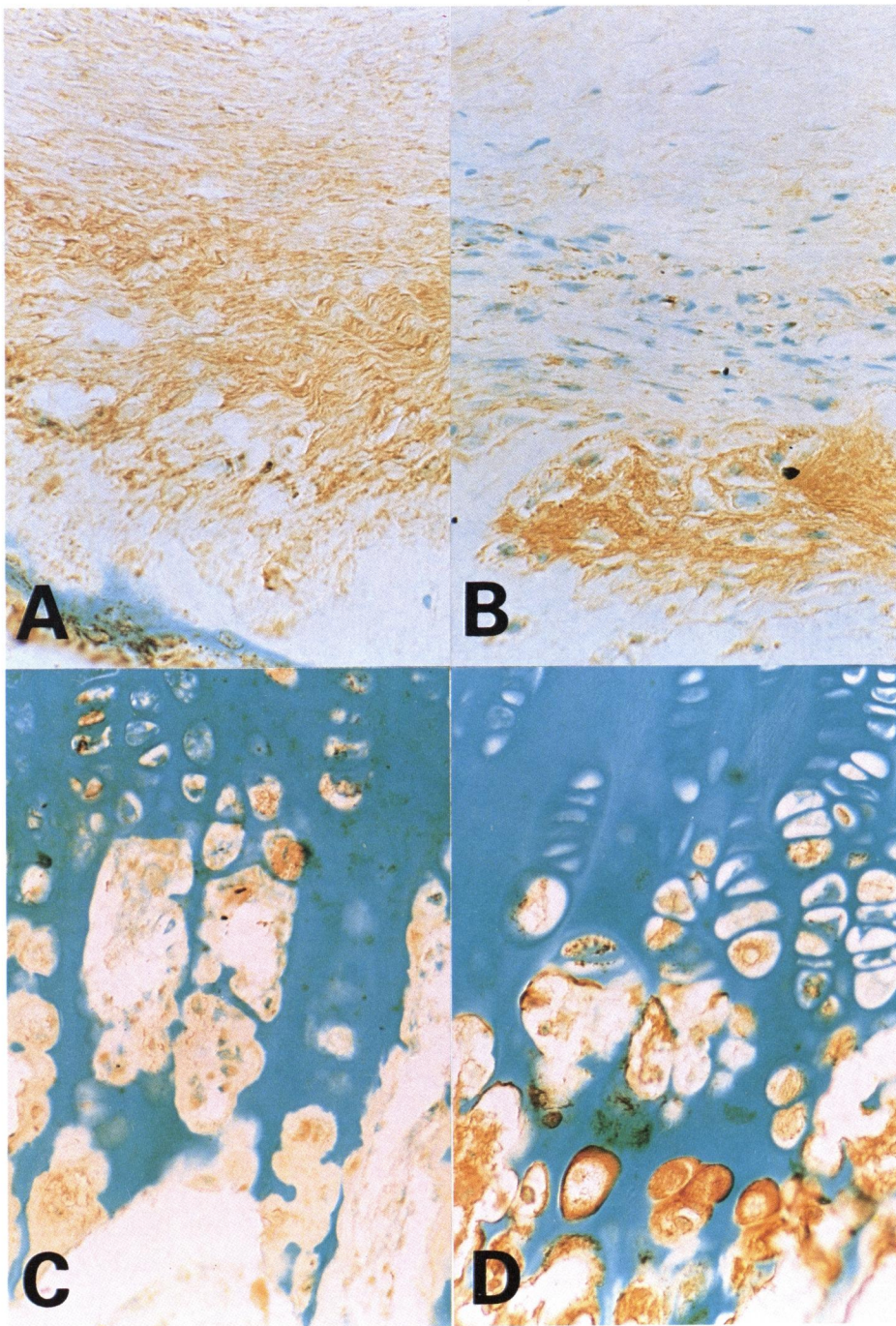


Fig. 7 Immunoperoxidase staining of intramembranous (A, B) and enchondral (C, D) ossifying regions ($\times 230$).

- A ; Dense periosteal matrix and osteoblasts were stained positively with anti-type I collagen.
 B ; Fibrous matrix near ossifying front and osteoblasts were stained positively with anti-BGP .
 C ; Matrix below hypertrophic chondral region was stained with anti-type I collagen.
 D ; Peripheral matrix below hypertrophic chondral region and hypertrophic chondrocyte were stained with anti-BGP.

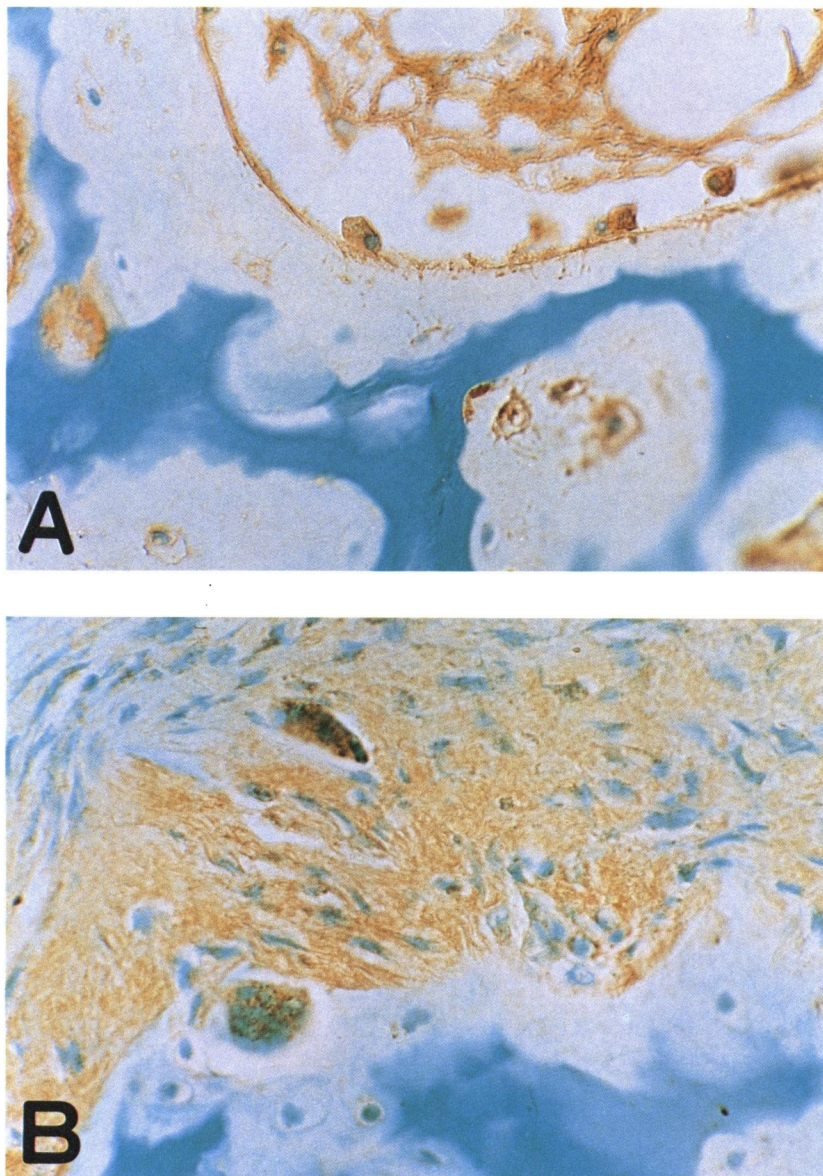


Fig. 8 Immunoperoxidase staining with anti-BGP ($\times 448$).
 A; Osteoblast and osteocyte.
 B; Osteoclast.

4 考 察

4・1 BGP の物理化学的特性

BGP の生体内における最も重要な特性は、 Ca^{2+} 結合能であるが、 Ca^{2+} イオンとの解離定数 (Kd) は約 10^{-4} M と比較的低い⁷⁾。その上、BGP は合成の初期では carboxyl 化されておらず分泌過程で microsome に存在する carboxylase により Glu 残基が γ -carboxylation を受けることにより、Gla 残基に変化して Ca^{2+} 結合能

を獲得する²⁰⁾。このため、calmodulin などの細胞内 Ca^{2+} 結合蛋白と異なり、BGP は細胞内では Ca^{2+} 結合能は乏しく、細胞外に分泌されてから機能を発揮すると考えられている²¹⁻²²⁾。この特性は細胞外で石灰化が開始される骨組織においては、きわめて重要である。

しかし、骨組織がどのようにミネラルを獲得し、アパタイト結晶沈着を導くかについては現在まで多くの研究があるにもかかわらず、その詳細はまだまだ明らかでない²³⁻²⁶⁾。 Ca^{2+} イオンと強い結合能を有する BGP は、

初期石灰化に関与すると考えられている。しかし、胎生期石灰化骨端部では、石灰化に遅れて BGP 含量が上昇するところから、BGP は石灰化に積極的に関与しないという説もある²⁷⁻²⁸⁾。一方、骨粗鬆症や副甲状腺機能亢進症などの骨吸収が亢進する疾患の血清 BGP 値が上昇することから、BGP は石灰化よりはむしろ骨吸収の調節に関与しているとの説もある²⁹⁾。このような BGP の生理的役割についての見解が不統一な理由は、BGP の骨組織中での産生、分泌、分解などの経路が十分明らかにされていないことにも一因があると思われる。

BGP は分子量がおよそ 6,000 で、各種動物 BGP の一次構造の解析によると約 50 残基のアミノ酸よりなる³⁰⁾。分子内において Gla 残基は主に N 末端側に含まれており、N 末端側のアミノ酸配列は種間で比較的共通している。これに対し、C 末端側はアミノ酸の配列に相違があり、peptide mapping による解析では、抗原決定基は、多様性のある C 末端側に存在するため、各種動物間には免疫学的交差性が乏しいことが明らかにされた³¹⁾。ヒト BGP は、ウシ BGP と免疫交差性を有するが、他の動物 BGP との交差性は乏しい。最近、BGP は、骨粗鬆症・骨 Paget 病・副甲状腺機能亢進症あるいは転移性骨癌などの骨疾患の血清で上昇することより、抗 BGP 抗体を用いて BGP を血清診断に利用しようとする試みが進められているが³²⁻³³⁾、これには、現在、ヒト BGP と共通抗原性を有する抗ウシ BGP 抗体が利用されている。

4.2 ヒト BGP の精製とその特異抗体の作製

現在、BGP は種々な動物から分離・精製されているが、ヒト骨よりの分離に成功した報告は Poser *et al.*¹⁰⁾ の抗ウシ BGP 抗体をリガンドとしたアフィニティーでの報告のほかは見当たらない。これはヒト骨の入手が困難な他に、他の動物種よりも脱灰に時間がかかる上、骨髄内 protease 活性が高いために蛋白の分解が起こることによる。今回、我々はこの点に留意して、剖検材料より、ヒト皮質骨を Polytron で粉碎後、EDTA 透析外液を 2 日おきに交換することにより完全に脱灰をした。また、全操作を、4°C で行ない、精製段階では protease inhibitor である phenylmethylsulfonyl fluoride を添加し、BGP を精製した。精製 BGP は、電気泳動から推定される分子量は 8,500-9,000 である。また、Ca²⁺ イオン添加により泳動遅延が観察され、これまで報告されている動物の BGP の特性と類似していた。アミノ酸組成は、Poser *et al.*¹⁰⁾ のヒト BGP とほぼ一致していた。しかし、% γ -carboxylation は 22.7% で、彼らの報告した 26.1% よりやや低値であっ

た。Carboxylation の程度には加齢による差があることが知られており、動物 BGP では高齢になるほど Gla 残基が減少することが知られている¹⁰⁾。このため Ca²⁺ イオン結合能が低下し、骨粗鬆症が生じるという説もある³⁴⁾。したがって、今回我々の分離した BGP と、Poser *et al.*¹⁰⁾ の BGP の % γ -carboxylation の違いは、BGP の純度の違いというよりも、carboxylation の程度に個体差があることによるものと思われる。

4.3 骨組織中での BGP の局在分布

Lian and Friedman²⁰⁾ は、ニワトリ胎仔頭蓋骨の microsome 分画中に carboxylase 活性を証明し、このことより、BGP は骨細胞より産生されることを推定した。Nishimoto and Price³⁵⁾ は、骨端部の器官培養系で BGP と tropocollagen の産生比を調べたところ、1:1 であることから、BGP は tropocollagen と同時に分泌されることを証明した。また、Linde and Hansson³⁶⁾ は、免疫組織化学的に象牙芽細胞の粗面小胞体とゴルジ装置に BGP の局在を証明した。しかし、骨組織における BGP の局在は、その生理機能を知る上に重要であるにもかかわらず、これまで明らかにされなかった。今回、抗ヒト BGP 血清による免疫組織化学的方法により、ヒト骨組織の石灰化前線における BGP の局在を検索した。BGP は、骨芽細胞、骨細胞、肥大化軟骨細胞の細胞質に陽性に認められ、さらに、これらの細胞に近接する類骨基質辺縁にも強い局在が認められた。しかも、破骨細胞の細胞質にも粗大顆粒状に存在していた。これらの所見は BGP の代謝には、骨芽細胞の他、軟骨細胞、骨細胞を含む ossification front の多くの細胞が関与していることを示している。また、BGP が、類骨辺縁に線維状に強く染まるのに対し、類骨そのものの染色性が弱いことから、細胞外に分泌された BGP は類骨形成過程で分子内修飾を受ける可能性が示唆された。さらに、BGP の代謝過程には、破骨細胞の関与の可能性も示唆された。

今後、我々の作製した抗 BGP 抗体を probe とした免疫組織化学的解析が、骨石灰化機構の解明に役立つと考える。

5 ま と め

1) ヒト皮質骨の EDTA 脱灰抽出、Sephadex G-100 ゲル濾過、DEAE Sephadex A-25 イオン交換クロマトグラフィーにより、ヒト BGP を精製することに成功した。この精製 BGP は、電気泳動で推定した分子量は 8,500-9,000 で、Ca²⁺ イオン添加により著明な泳動の遅延を認めた。

2) 精製 BGP のアミノ酸分析では、一分子あたり 2 個の Glu 残基が含まれており、そのアミノ酸組成もこれまでの報告とほぼ一致していた。

3) 精製 BGP を抗原として、家兎を用いて抗体を作製した。ELISA 法では精製 BGP と 27,000 倍稀釈まで反応する抗体が得られた。また、Western immunoblotting により EDTA 脱灰抽出粗蛋白との反応を調べ、BGP とのみ特異的に反応することを確認した。

4) ヒト正常骨組織について、免疫組織化学的に BGP の局在分布を検索した。膜性骨化、内軟骨性骨化いずれの部位でも石灰化前線の骨芽細胞、骨細胞、肥大化軟骨細胞の細胞質と、類骨基質に沿う間質に局在が認められた。また、破骨細胞の細胞質にも粗大顆粒状に局在が認められた。

謝 辞

御指導・御校閲いただきました本学病理学第二講座 森 道夫教授ならびに整形外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東京大学保健栄養学講座細谷憲政教授ならびに堤ちはる先生、さらに終始懇切なる御助言、御教示いただきました本学学生化学第二講座阿部 晃先生ならびに病理学第二講座の諸先生、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。

本論文の要旨は、第 13 回日本整形外科基礎研究会において発表した。

文 献

- 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., Corradino, R. A., Carafoli, E., Kretsinger, 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).
- Vermeer, C.: The Vitamin K-dependent carboxylation reaction. *Mol. Cell. Biochem.* **61**, 17-35 (1984).
- Delmas, P. D., Stenner, D. D., Romberg, R. W., Riggs, B. L. and Mann, K. G.: Immunochemical studies of conformational alterations in bone γ -carboxyglutamic acid containing protein. *Biochemistry* **23**, 4720-4725 (1984).
- Hauschka, P. V. and Carr, S. A.: Calcium-dependent α -helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* **21**, 2538-2547 (1982).
- 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).
- 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).
- Price, P. A., Otsuka, A. S. and Poser, J. W.: Comparison of γ -carboxyglutamic acid-containing proteins from bovine and swordfish bone: Primary structure and Ca^{++} -binding. In: Wasserman, R. H., Corradino, R. A., Carafoli, E., Kretsinger, 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).
- 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).
- Hauschka, P. V., Carr, S. A. and Biemann, K.: Primary structure of monkey osteocalcin. *Biochemistry* **21**, 638-642 (1982).
- 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.* **255**, 8685-8691 (1980).
- 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 (1951).
- Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969).
- Kakiuchi, S., Sobue, K. and Yamazaki, R.: Ca^{2+} -dependent modulator proteins from *Tetrahymena pyriformis*, *Sea Anemone*, and *Scallop* and guanylate cyclase activation. *J. Biol. Chem.* **256**, 19-22 (1981).
- Worobec, R. B., Wallace, J. H. and Huggins, C. G.: Angiotensin-antibody interaction-I induction of the antibody response. *Immunochemistry* **9**, 229-238 (1972).

15. Worobec, R. B., Wallance, J. H. and Huggins, C. G.: Angiotensin-antibody interaction-II thermodynamic and activation parameters. *Immunochemistry* **9**, 239-251 (1972).
16. Engvall, E.: Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Methods Enzymol.* **70**, 419-439, (1982).
17. Davis, B. J.: Disc electrophoresis-II Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427 (1964).
18. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354 (1979).
19. Sternberger, L. A., Hardy, Jr. P. H., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antihorseradish complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 315-333 (1970).
20. Lian, J. B. and Friedman, P. A.: The Vitamin K-dependent synthesis of γ -carboxyglutamic acid by bone microsomes. *J. Biol. Chem.* **253**, 6623-6626 (1978).
21. 片山幸一: γ -カルボキシングルタミン酸含有蛋白の生合成. *代謝* **19**, 855-872 (1982).
22. Hauschka, P. V.: Osteocalcin in developing bone systems. In: Suttie, J. W. Vitamin K metabolism and Vitamin K-dependent proteins. 227-236, Univ. Park Press, Baltimore (1980).
23. Poser, A. S.: Bone mineral on the molecular level. *Fed. Proc.* **32**, 1933-1937 (1973).
24. Howell, D. S.: Calcification mechanisms. *Israel J. Med. Sci.* **12**, 91-97 (1973).
25. Bernard, G. and Marvaso, V.: Matrix vesicles as assay for primary tissue calcification in vivo and in vitro. In: Ascenzi, A., Bonucci, E. and Bernard de B.: Matrix vesicles. Proceedings of the third international conference on matrix vesicles. Monteluco, Spoleto, June 7-11, 1981. 5-11, Wichtig Editore s. r. l., Milano, Italy (1981).
26. Wuthier, R. E.: A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin. Orthop.* **169**, 219-242 (1982).
27. Hauschka, P. V. and Reid, M. L.: Timed appearance of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in developing chick bone. *Devel. Biol.* **65**, 426-434 (1978).
28. Hauschka, P. V., Frenke, J., DeMuth, R. and Gundberg, C. M.: Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J. Biol. Chem.* **258**, 176-182 (1983).
29. Fernlund, P. and Stenflo, J.: Identification of γ -carboxyglutamic acid during automated sequenator degradation of proteins. In: Suttie, J. W. Vitamin K metabolism and Vitamin K-dependent proteins. 161-165, Univ. Park Press, Baltimore (1980).
30. 森内幸子, 太田原洋子: γ -カルボキシングルタミン酸含有蛋白の構造と機能. *代謝* **19**, 855-862 (1982).
31. 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).
32. Price, P. A., Parthemore, J. G. and Deftos, L. J.: New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J. Clin. Invest.* **66**, 878-883 (1980).
33. Gundberg, C. M., Lian, J. B., Gallop, P. M. and Steinberg, J. J.: Urinary γ -carboxyglutamic acid and serum osteocalcin as bone markers: Studies in osteoporosis and Paget's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**, 1221-1225 (1983).
34. Key, L., Carnes, D., Cole, S., Holtrop, M., Barshavit, Z., Shapiro, F., Arceci, R., Steinberg, J., Gundberg, C., Kahn, A., Teitelbaum, S. and Anast, C.: Treatment of congenital osteopetrosis with high-dose calcitriol. *New Engl. J. Med.* **310**, 409-415 (1984).
35. Nishimoto, S. K. and Price, P. A.: Proof that the γ -carboxyglutamic acid-containing bone protein is synthesized in calf bone. *J. Biol. Chem.* **254**, 437-441 (1979).
36. Linde, A. and Hansson, H. A.: Localization of Gla-proteins during calcification. In: Bernard, B. D., Sottocava, G. L., Sandri, G., Carafoli, E., Taylor, A. N., Vanaman, T. C. and Williams, R. J. P.: Calcium-binding proteins. 1983 Proceedings of the fourth international symposium on calcium-binding proteins in health and disease held in Trieste, Italy, May 16-19, 1983, Elsevier Sci. Pub., New York (1983).

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 松山敏勝