

氏名	玉 木 直 文
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2168 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ヒト耳下腺唾液中のリン酸カルシウム沈殿促進物質
論文審査委員	教授 福井 一博 教授 鈴木 一臣 教授 渡邊 達夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

唾液には、エナメル質の結晶成長や再石灰化の作用があり、カルシウムの供給源として齲蝕の発生予防に関与していると考えられている。カルシウムは唾液腺から分泌され、エナメル質や歯垢の石灰化部位まで可溶化した状態で運ばれている。唾液中でのカルシウム結合タンパクによる、リン酸カルシウム沈殿抑制作用については、これまでにいくつかの研究がなされている。

多田は、唾液タンパクのリン酸カルシウム沈殿抑制能を相対的に比較するため、リン酸カルシウム沈殿抑制活性を定量する方法を確立した。この時、唾液に含まれている数種のリン酸カルシウム沈殿抑制タンパクを精製する過程において、リン酸カルシウム沈殿を促進させる物質が存在することが判明した。

本研究では、リン酸カルシウム沈殿促進物質を精製し、その性状を検討することを目的とした。

【材料および方法】

1. リン酸カルシウム沈殿量の定量

11mM リン酸二水素カリウム溶液 2.5ml に、1mg/ml ハイドロキシアパタイト結晶混濁液 0.25ml を混合した。上記の混合液に、125mM イミダゾール緩衝液に溶解した 24mM 塩化カルシウム溶液 0.5ml と唾液試料 0.25ml を加え、反応を開始した。25℃で 30 分間インキュベートし、 $\phi=0.45\mu\text{m}$ セルロースメンブレンフィルターで沈殿物を濾過した。濾液 0.1ml を直ちにイミダゾール緩衝液で 50 倍に希釈し、カルシウム濃度を原子吸光分光光度計を用いて測定した。初期濃度からカルシウム濃度の減少量を、沈殿量とした。促進活性の 1 ユニットは、25℃で 1 分間にカルシウムの濃度を 1ppm 減少させる量とした。

2. リン酸カルシウム沈殿促進物質の精製

健康成人 (15 人) の耳下腺開口部より、吸引採取した。採取した唾液 (約 2 L) は、遠心後、限外濾過し、凍結乾燥して -20℃で保存した。使用直前に緩衝液に溶解し、唾液試料とした。

DEAE Sephadex[®] A-25 に試料を添加し、0.025M NaCl を含む 50mM トリス-塩酸緩衝液で溶出させた。その後、0.025M から 0.5M への NaCl 濃度勾配で展開した。活性画分を回収し、ゲル濾過クロマトグラフィー (Biogel[®] P-2) を用いて精製した。

3. タンパク定量

Hartree らの方法に従った。標準タンパクには牛血清アルブミンを使用した。アミノ酸の濃度の定量は、Böhlen らの方法に従った。標準アミノ酸にはヒスチジンをを用いた。

4. リン酸定量

リンーモリブデン反応を用いた、無機リン酸の比色定量法を用いた。

5. アミノ酸分析

エドマン分解によりアミノ酸シークエンサー (Applied Biosystems Model 476A) を用いて、アミノ酸分析をした。

6. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

メタノール:クロロフォルム:17% アンモニア (2:2:1) を溶媒として、120 分間展開した。発色には Fluorescamine® を用いた。

7. 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

逆相カラムを用いて、10mM 酢酸アンモニウム溶液から 10mM 酢酸アンモニウム+60%アセトニトリルへの直線濃度勾配で溶出させた。

【結果および考察】

- ① ヒト耳下腺唾液中に、リン酸カルシウムの沈殿を促進させる物質があることを見出した。陰イオン交換クロマトグラフィーの時に塩濃度勾配法を用いると、低分子高プロリン含有タンパクとスタセリンとの間に促進物質が溶出した。
- ② リン酸カルシウム沈殿促進物質は、限外濾過画分よりも 50 倍高い比活性を示した。なお回収率は 58% で、4.5mg の標品を得た。
- ③ TLC の結果、二つのスポットが見られた。一つはヒスチジンであり、もう一つには促進活性が認められ、目的の物質であることが示された。RP-HPLC の結果、三つのピークが認められた。保持時間から、2.7 分のは緩衝液の成分であるトリスであり、3.8 分のはヒスチジンであった。さらに、4.8 分の一番大きなピークを回収し、リン酸カルシウム沈殿促進活性を測定したところ促進活性があり、今回目的としている物質であることが分かった。なお、ヒスチジンは分解産物であると考えられる。
- ④ ゲル濾過クロマトグラフィーにより、分子量は約 227Da と算定された。
- ⑤ リン酸カルシウム沈殿促進物質の同定を試みた。アミノ酸組成としては、ヒスチジンが認められた。さらに、ヒスチジンを標準としたアミノ酸濃度と同モル濃度のリン酸が検出された。以上の結果より、フォスホヒスチジン様物質であることが推測された。
- ⑥ リン酸カルシウム沈殿量の経時的変化をみた。試料を添加した場合は、反応直後からコントロールよりもリン酸カルシウム沈殿量が多く、30 分で最大であった。
- ⑦ リン酸カルシウム沈殿促進活性の濃度依存性をみた。添加試料とリン酸カルシウム沈殿促進活性との量-反応関係は、添加試料が 3 μ g まではほぼ直線に増加した。
- ⑧ 100 $^{\circ}$ C、30 分間のインキュベート後も、試料の活性は変化がなく、熱に対して安定であった。
- ⑨ pH による安定性は、pH7.0 から 11.0 までの間で安定であることが示された。

【結論】

今回、ヒト耳下腺唾液からリン酸カルシウムの沈殿を促進させる物質を分離、精製し、その性質を調べた。ヒスチジンとリン酸分子を 1 対 1 で含有していることが分かり、フォスホヒスチジン様物質であることが推測された。

論文審査結果の要旨

唾液はエナメル質の結晶成長や再石灰化の作用があり、カルシウムの供給源として齲蝕の発生予防に関与していると考えられている。唾液に含まれている数種のリン酸カルシウム沈殿抑制タンパクを精製する過程において、リン酸カルシウムの沈殿を促進させる物質が存在することが判明した。本研究では、リン酸カルシウム沈殿を促進させる物質を精製し、その性状を検討したものである。

限外濾過、イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーによって、ヒト耳下腺唾液から促進物質を精製した。精製した促進物質を、薄層クロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィーによって均一性を確認した。ゲル濾過法で算出された分子量は、約227 Daであった。構成成分を解析した結果、ヒスチジンとリン酸分子を1対1のモル濃度で含有しており、フォスホヒスチジン様物質であることが明らかになった。促進物質は、100°Cで30分間でも促進活性に変化がなく、pH7.0~11.0で安定であることが示された。

本論文は、唾液中のリン酸カルシウム沈殿促進物質を分離・精製し、エナメル質の結晶成長や再石灰化に関与する新たな物質が存在することを示したものであり、石灰化機構を解明する上で極めて重要な知見である。したがって、本論文は博士(歯学)の学位を授与する価値があるものと認めた。