

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	杉本 穂波
論文審査 委員氏名	主査 後藤 滋巳 副査 鈴木 崇弘 濱村 和紀 宮澤 健		
論文題名	骨芽細胞から開口分泌される骨代謝関連 タンパク質の生物発光イメージング		

インターネットの利用による公表用

矯正歯科治療の歯の移動は骨代謝によって成り立っており、骨代謝関連タンパク質の性質を理解することは、効率的な歯の移動法を開発する上で重要な意義を有している。骨代謝関連タンパク質であるオステオカルシン、BMP2、RANKLなどは骨代謝において重要な役割を果たしている。これらの骨代謝関連タンパク質は遺伝子発現調節が精力的に研究されてきた一方で、分泌動態とその制御機構は未だほとんど不明である。本研究では、骨代謝関連タンパク質の分泌動態とその制御機構を解明することを目的とし、「生物発光イメージング法」を用いて、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 からのオステオカルシン、BMP2 および RANKL の分泌動態を可視化した。本研究では、GLase の融合タンパク質の開口分泌により生じる発光スポットの消失を解析し、オステオカルシンと BMP2 の拡散性の違いを検討した。また、BMP2 の N 末端塩基性アミノ酸残基を欠失させた変異体 (Δ 3BMP2-GLase) を用いて、BMP2 の拡散性に関わる責任配列を解析した。

結果を以下に示す。

1. MC3T3-E1 細胞における OC-GLase および BMP2-GLase の生物発光イメージング

OC-GLase および BMP2-GLase の開口分泌を示す発光スポットは、一過性に出現して消失した。OC-GLase は周囲に広がりながら急速に拡散する消失パターンを示したのに対し、BMP2-GLase は拡散性の低いものであった。

2. MC3T3-E1 細胞における RANKL-GLase の生物発光イメージング

分泌型タンパク質である OC-GLase および BMP2-GLase とは異なり、膜タンパク質である RANKL-GLase は細胞全体が持続的な発光を示した。

3. OC-GLase および BMP2-GLase のプロセッシングと分泌

ウェスタンブロット解析の結果、OC-GLase と BMP2-GLase は分泌過程でプロ型から成熟型に適切にプロセッシングされて、培養液中に分泌されることが確認された。

4. MC3T3-E1 細胞における OC-GLase と BMP2-GLase の分泌効率の比較

OC-GLase は BMP2-GLase よりも培養上清の発光活性が高く、分泌効率が高いことが示された。OC-GLase の分泌効率は、GLase の非融合タンパク質と同様であったことから、OC と比較して、BMP2 の分泌量は抑制されている可能性が示唆された。

5. OC-GLase と BMP2-GLase の分泌効率の比較

発光強度の経時変化を解析したところ、BMP2-GLase の発光スポットは OC-GLase よりも持続時間が長いことが示された。

6. Δ 3BMP2-GLase 変異体の可視化

Δ 3BMP2-GLase は野生型 BMP2-GLase と同様に適切にプロセッシングされており、発現量および分泌効率も BMP2-GLase と同等であった。その一方で、 Δ 3BMP2-GLase の発光スポットの消失は BMP2-GLase に比べて速いことが示された。

7. 開口分泌における OC-GLase、BMP2-GLase および Δ 3BMP2-GLase の拡散特

性の定量的解析

BMP2-GLase の半減期はOC-GLase 及び Δ 3BMP2-GLase より有意に長いことが示された。OC-GLase と Δ 3BMP2-GLase の半減期の間には有意差は認められなかった。

以上の結果より、本研究は、分泌タンパク質であるオステオカルシンと BMP2、および膜タンパク質である RANKL のそれぞれ異なる開口分泌動態を示した初めての報告であり、欠失させた BMP2 の N 末端塩基性アミノ酸配列が BMP2 の分泌後の拡散性の低さに関与していることを示唆している。

以上のことから本研究成果は、骨代謝機構の解明に向けた基礎研究に加えて、治療薬開発への貢献が期待されるなど、効率的な歯の移動を行いうる一助になる可能性があることを示している。これは、歯科矯正学のみならず関連諸分野に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。