

氏名(本籍)	しょう だ あき ひと (大阪府)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第1,208号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	BIOCHEMICAL STUDIES ON BONE MORPHOGENETIC PROTEINS IN <i>XENOPUS LAEVIS</i> EMBRYOS (アフリカツメガエル初期胚における骨形成因子の生化学的性質)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上 和雄
副査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文

論 文 の 要 旨

形質転換増殖因子 (transforming growth factor- β , TGF- β) スーパーファミリーに属する骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP) の骨や軟骨の形成を促進するタンパク質として知られているが、アフリカツメガエル初期胚中に mRNA として存在していることが確認されている。最近、ツメガエル BMP-4 の mRNA をツメガエル胚の背側に微量注入すると、頭部背側構造が欠落し、腹側化することが明らかにされ、初期発生の形態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。初期胚における BMP の生物学的役割を明らかにするためには、BMP タンパク質の生化学的性質を解析することが重要である。本研究では初期胚の中の BMP の生化学的性質を解明することを目的とした。

ツメガエル初期胚中における BMP のタンパク質レベルでの発現を免疫学的手法を用いて調べるために、BMP-2 に対する特異抗体の作製を試みた。BMP-2 の C 末端 11 アミノ酸に対する合成ペプチドを抗原として、ウサギに免疫しポリクロナール抗体を得た。この抗体と発生段階の胚より調製した抽出液を使って初期胚に存在する BMP-2 を検出したところ、ツメガエル BMP-2 は未受精卵からオタマジャクシになるまで分子量 30,000 の単量体として存在していた。この結果は成熟タンパク質として予想される分子量の 18,000 より大きく、TGF- β ファミリーに特徴的な二量体を形成していなかった。しかし、初期胚抽出液を数時間酸処理することによって、抗体で検出される分子量は 18,000 へと変化した。このことから、分子量 30,000 のタンパク質は、成熟タンパク質へのプロセッシングが行われていない前駆体であると考えられた。

また、この抗体を用いて初期胚中の局在を調べたところ、胚全体にわたって存在していることがわ

かった。次に、成体臓器での BMP-2 の発現をみたところ、骨以外の心臓や腎臓などの臓器でも発現していることがわかった。このほか、脳でも発現量が多いことから、BMP がその名の由来である骨誘導活性以外に、何らかの重要な生理作用を担っている可能性が示唆された。ツメガエル初期胚の抽出液をゲル濾過、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、調製用電気泳動法、逆相 HPLC を用いて単量体系 BMP-2 を精製し、アミノ末端シークエンスを決定したところ、哺乳類のものよりもアミノ末端側でプロセッシングを受けていることがわかった。また、N 型糖鎖切断酵素である N-グリコナーゼ処理により、分子量の変化が見られなかったことから、N 型糖鎖は持っていないことがわかった。これらの骨芽細胞における活性を測定したところ、アルカリフォスファターゼ誘導活性は認められなかった。

さらに、精製を進めてゆく過程で初期胚抽出液から二量体型の BMP-2 も検出され、その存在量は単量体型に比べて 5 % 以下と非常に少ないことがわかった。そしてこの二量体型 BMP-2 を部分精製し活性を測定したところ、ヒトやウシの BMP-2 と同程度の骨誘導活性があることがわかった。哺乳類において BMP は常に二量体型で活性を持っており、単量体型はほとんど観察されない。初期胚、あるいは両生類で BMP-2 は、まず十分な量の単量体型として合成され、それらが酵素によるプロセッシングを受けた後、二量体化することによって発生過程で局所の BMP 活性を調節するというメカニズムの存在が示唆された。

また、レセプターを用いた新しい精製法を開発し、精製を行うことを試みた。この方法を用いることによりツメガエル初期胚における BMP を簡便に精製することができるようになり、活性化機構について迅速に解析をおこなってゆくことが可能となった。

審 査 の 要 旨

本研究では、ツメガエル初期胚における BMP-2 のタンパク質レベルでの挙動を調べ、活性化型 BMP-2 を検出することに成功した。ツメガエル初期胚において BMP-2 はまず分子量の大きい単量体の形で分泌され、それが酵素によるプロセッシングを受けた後、二量体を形成することによって活性化されているメカニズムの存在を示したことは意義ある成果である。

また、レセプターを用いた新しい精製法を開発し、完全精製を行うとに成功した。この方法を用いることによりツメガエル初期胚における BMP を簡便に精製することができるようになり、活性化機構について迅速に解析をおこなってゆくことが可能となった。本研究の成果は初期胚における細胞増殖因子の活性化の研究に大きく貢献するものと考えられる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。