

(64)

氏名(生年月日)	シラ 白	ガ 髪	ヒロ 宏	シ 司
本籍				
学位の種類	博士(医学)			
学位授与の番号	乙第1311号			
学位授与の日付	平成4年10月16日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)			
学位論文題目	シュウ酸カルシウム結晶発育を阻害するヒト尿中蛋白のアフィニティー精製			
論文審査委員	(主査)教授 二瓶 宏 (副査)教授 東間 紘, 新田 澄郎			

論文内容の要旨

目的

尿中のカルシウム, シュウ酸濃度は正常人においてもしばしば過飽和状態である。それにもかかわらず尿路結石形成に至らない理由を尿中高分子インヒビター(CGI)の存在に求め, そのアフィニティー精製と同定を目的とした。

方法

Tamm-Hornfall 糖蛋白を凝集除去した健常ヒト尿を DEAE セルロースと混じ, バッチイオン交換を行うカラムイオン交換の開始材料とした。ひき続き DEAE セルロースカラムで200分画以上の蛋白群に分けた。この分画を [^{14}C] シュウ酸を利用し, シュウ酸 Ca 結晶発育阻害活性を定量化するアッセイ系を用いて阻害能力(IA)を測定した。最大 IA 値を示す蛋白分画をラットに免疫し, そのリンパ節を用いてモノクロナル抗体を作製した。目的とするクローン選択は ELISA を用い, カラムイオン交換で分画化した蛋白を抗原とし, IA ピークに反応が一致するものを選択した。得られたモノクロナル抗体を用いてアフィニティーカラムを作製し, イオン交換後の半精製した蛋白群からヒト CGI をアフィニティー精製した。

結果

アフィニティー精製できたヒト CGI は *in vitro* で免疫学的にも, また機能的にも強い活性を有することが確認できた。16%ポリアクリルアミドゲル上では分子量50kDaを示し, ウェスタンブロットでも同一部に確認された。アミノ酸配列は現在までヒト蛋白では確認されておらず, N 末端アミノ酸配列がヒトのオステ

オポンティンやラクトポンティンと同一であることが判明したためユロポンティンと命名した。他のポンティン蛋白の特性と同様にアスパラギン酸に富む AARP (aspartic acid-rich protein) であった。

考察および結論

ユロポンティンがシュウ酸 Ca 結晶発育阻害を示すことが判明したため, ポンティン蛋白は全てミネラルゼーション局面を調節する重要な蛋白群である可能性がでてきた。多細胞生物が液性状態下で過飽和なミネラルの溶解や析出度をコントロールできることは, 生命活動を続けるためにも重要な機能であろう。本蛋白を含めた一連のポンティン蛋白は, 骨をはじめとして生体随所におけるミネラルゼーションの進展, 再構築や結晶析出の調節をつかさどっているのではないかと考える。

シュウ酸 Ca 結晶の発育を強く阻害する新たな AARP スーパーファミリーの一員(ユロポンティン)をヒト尿中より分離同定した。尿路結石症の分子病, 遺伝性疾患, 先天性疾患としての側面を捕えるためにも, ユロポンティンおよび同抗体の臨床応用が期待される。

論文審査の要旨

尿中のカルシウム、シュウ酸濃度は正常人でもしばしば過飽和状態にある。にもかかわらず、尿路結石形成に至らないのは尿中に高分子のインヒビターが存在するためと考え、そのアフィニティー精製と同定を行った。

健常なヒトの尿から Tamm-Horsfall 糖蛋白を除去し、DEAE セルロースカラムで200分画以上の蛋白群に分けた。これらの分画について、 ^{14}C -シュウ酸 Ca の結石発育を指標として、阻害能力を測定した。最大阻害能力を示す分画をラットに免疫し、リンパ節からモノクロナル抗体を作製した。これを利用して得られたインヒビターは分子量50kDa の蛋白で、免疫学的にも機能的にも強い活性を有することが確認された。アスパラギン酸に富むポンティンスーパーファミリーの一員で、ユロポンティンと命名した。尿路結石の遺伝学的研究や臨床応用につながる、学術的に価値ある研究である。

主論文公表誌

シュウ酸カルシウム結晶発育を阻害するヒト尿中蛋白のアフィニティー精製
東京女子医科大学雑誌 第62巻 第6・7号
535-542頁 (平成4年7月25日発行)

副論文公表誌

- 1) Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: Another member of the aspartic acid-rich protein superfamily (ユロポンティンによるインビトロ、シュウ酸カルシウム結晶発育の抑制: アスパラギン酸に富む蛋白スーパーファミリーの新たな一員). Proc Natl Acad Sci USA 89 (1): 426-430 (1992) Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrell CH, Shebotie JR, Foreman JW, Przysiecki C, Neilson EG, Hoyer JR
- 2) 尿路結石形成の尿中インヒビター—CGI: シュウ酸カルシウム結晶発育阻害因子—. 小児臨

- 42 (5): 987-996 (1989) 白髪宏司
- 3) Tamm-Horsfall 蛋白の免疫生化学. 腎と透析 27 (4): 625-630 (1989) 白髪宏司
- 4) Tamm-Horsfall 蛋白と逆流腎症. 小児内科 23 (5): 779-783 (1991) 白髪宏司
- 5) Tamm-Horsfall protein, uromodulin—Immunoregulatory mechanism—. Annual Review 腎臓1992. (越川昭三編)pp48-54, 中外医薬社, 東京 (1992) 白髪宏司
- 6) "Intact nephrons" as the primary origin of proteinuria in chronic renal disease, Study in the rat model of subtotal nephrectomy (慢性腎疾患における蛋白尿の主たる源は“正常ネフロン”からである, 腎亜全摘出ラットモデルでの検討). J Clin Invest 82 (11): 1614-1623 (1988) Yoshioka T, Shiraga H, Yoshida Y, Fogo A, Glick AD, Deen WM, Hoyer JR, Ichikawa I