原 著 論 文

Hydroxyapatite とアミノ酸の相互作用について

川崎 彰人 河野 敬一 寺田 善博 平安 亮造

Interaction of Hydroxyapatite with Amino Acids

Akihito Kawasaki, Keiichi Kawano, Yoshihiro Terada and Ryojō Hirayasu

Abstract : The interaction of Hydroxyapatite (HAP) with organic molecules is biologically important. Some proteins display a high adsorption affinity for HAP and they have been implicated in the mineralization of bone. In order to understand the interaction of HAP with proteins, it is important to know which amino acid side-groups are involved in the protein-HAP interaction and what type of interaction takes place.

We investigated the interaction of HAP with amino acids and their derivatives by crystal growth experiment. The rate of crystal growth was measured by adding seed crystals of HAP (synthetic apatite) to a solution of CaCl_2 and KH_2PO_4 , pH 7.4 at 37°C. Basic amino acids, acidic amino acids and amino acids with polar side-groups inhibit the rate of crystal growth.

These findings suggest that amino acid side-groups, such as carboxyl group, amino group, hydroxyl group and imidazole, are related to the affinity for HAP.

Key words : Hydroxyapatite, amino acid, crystal growth, inhibition

I. 緒 言

近年、歯科インプラントは臨床で盛んに行われているが、インプラント材料の骨誘導能¹⁻³⁾・骨伝導能^{4,5)}および骨の石灰化のメカニズムを考える上で、apatite と骨の有機基質との関連を明らかにすることは、重要である。

骨の有機成分の主体は、蛋白質と多糖体であり、構成蛋白質として collagen が大部分を占めている。そのほか、微量成分であるが、Gla 蛋白⁶⁻⁸⁾・リン蛋白や apatite と collagen の両方に強い親和力を持つ osteonectine⁹⁾ などの存在が報告されており、石灰化との関連で注目されている。

今回、われわれはこれらの蛋白質と apatite との関連を明らかにするために、蛋白質の構成単位であるアミノ酸を取り上げ市販の合成 apatite を用いて、反応溶液を pH-stat にて pH 7.4 に維持するのに要した NaOH の消費量から各種アミノ酸の apatite 結晶成長阻止能を調べた。

II. 実験方法

試薬はすべて市販のものをを用い、アミノ酸として非極性アミノ酸である Alanine, Tryptophane, Methionine, Proline, Phenylalanine (Takara Kohsan), Valine, Leucine, Isoleucine (半井化学)、極性アミノ酸である Glycine (Sigma), Serine, Threonine (Takara Kohsan), Asparagine, Glutamine (半井化学)、酸性アミノ酸である Aspartic acid, Glutamic acid (半井化学)、塩基性アミノ酸である Lysine, Arginine, Histid-

九州大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任 : 平安亮造教授)
The 1st Dept. of Prosthetic Dentistry, Faculty of Dentistry, Kyushu Univ. (Chief : Prof. Ryojō Hirayasu)
昭和 63 年 12 月 5 日受付

図1 Bio-Gel HTP の SEM 像

図2 Bio-Gel HTP のX線回折ピーク

ine (半井化学), その他 β -alanine, γ -amino-butyric acid, ϵ -amino-caproic acid, Hydroxy-Proline (Taka-ra Kohsan), Imidazole (半井化学): N-acetyl-Histidine, N-acetyl-Glycine (東京化成) を用いた。

Apatite の種結晶として市販の合成 Hydroxyapatite (HAP) である Bio-Rad 社の Bio-Gel HTP を用いた。図1, 2は Bio-Gel HTP の SEM 像およびそのX線回折ピークを示す。SEM 像より種結晶は $10\sim 100\mu\text{m}$ の板状を呈しており, X線回折ピークより Dicalcium Phosphate, Octacalcium Phosphate, Tricalcium Phosphate など HAP 以外のリン酸カルシウムの結晶は含まれていなかった。なおこの種結晶の比表面積は $60\text{m}^2/\text{g}$ であった。

溶液作成に際しては, CO_2 の混入を極力さけるために, 脱イオン・蒸留後, 煮沸した水を使用した。なお, すべ

図3 自動滴定装置 RTS 822 (Radiometer Co.)

ての溶液は, 使用前に $0.22\mu\text{m}$ の membrane filter を通した。

HAP 種結晶の成長実験は, Romberg¹⁰⁾ およびその他¹¹⁻¹⁵⁾の方法を改良して行った。

図3は本実験で用いた Radiometer 社の自動滴定装置である。

0.15M の NaCl 溶液 65ml と 5.85mM KH_2PO_4 溶液 5ml に各種アミノ酸 100mg , 一部のものについては 50mg を加え, control と pH を同様に調節したのちに種結晶 2mg を加えた。

37°C に30分後に昇温した後に, 1時間 37°C で N_2 gas 雰囲気中で攪拌し, アミノ酸と種結晶が平衡に達した後に, pH 7.4 に調節した。

この際, 系がアミノ酸を加えたことによって希釈されないように注意した。

その後, 37°C にあらかじめ保存しておいた 9.75mM の CaCl_2 5ml を加え, 反応を開始した。反応後, 1時間 37°C N_2 gas 雰囲気中で pH-stat を用いて, 反応溶液を pH 7.4 に保ち, 次式で示されるごとく¹⁰⁾, 0.025N の NaOH 消費量で, アミノ酸による HAP の結晶成長阻止能を検討した。

Ca^{2+} と PO_4^{3-} の濃度は, Romberg¹⁰⁾ およびその他¹¹⁻¹⁵⁾の報告をもとに HAP 以外のリン酸カルシウムの結晶が生じないように選択した。

III. 実験結果

図4, 5は非極性アミノ酸である Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Proline, Phenylalanine, Tryptophan, Methionine の実験結果である。いずれも Control と変化なく種結晶の成長を阻害していないことが示

図 4 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Leucine, L-Valine, L-Alanine, L-Isoleucine)

図 6 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (Hydroxy-L-proline, L-Threonine, L-Serine)

図 5 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Tryptophane, L-Proline, L-Methionine, L-Phenylalanine)

図 7 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Alanine, ε-amino-caproic acid, γ-amino-butyrac acid, β-alanine, N-acetyl-Glycine, L-Glycine)

された。

図 6 は側鎖に水酸基をもつ Hydroxy-proline, Serine, Threonine の実験結果である。Serine, Threonine には成長阻害作用がみられたが、Hydroxy-proline には阻害作用はみられなかった。

図 7 は極性アミノ酸である Glycine とその誘導体である N-acetyl-Glycine, β-alanine, γ-amino-butyrac acid, ε-amino-caproic acid の実験結果である。γ-amino-butyrac acid や ε-amino-caproic acid は、control とほとんど変わらなかったが β-alanine, N-acetyl-

Glycine, Glycine に成長阻害作用がみられた。

図 8 に極性アミノ酸である Asparagine・Glutamine の実験結果を示す。Asparagine には、成長阻害作用がみられたが Glutamine には阻害作用はみられなかった。

図 9 は塩基性アミノ酸の Lysine, Arginine, Histidine の実験結果である。Lysine, Arginine に比べ Histidine に強い成長阻害作用がみられた。

図 10 に Histidine の誘導体である N-acetyl-Histidine, Histamine, Imidazole 各 50 mg 添加時の結果を示す。いずれも強い成長阻害作用がみられた。

図 8 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Glutamine, L-Asparagine)

図 10 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Histidine, N-acetyl-Histidine, Histamine, Imidazole)

図 9 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Arginine, L-Lysine, L-Histidine)

図 11 Seeded solution を pH 7.4 (37°C) に維持するのに要した NaOH (0.025 N) 消費量の時間変化 (L-Glutamic acid, L-Asparatic acid)

図 11 は酸性アミノ酸である Glutamic acid と Aspartic acid の実験結果である。Glutamic acid に比べ Aspartic acid に強い阻害作用がみられた。

IV. 考 察

今回われわれは骨の有機成分である蛋白質と HAP との相互作用を理解するための基礎的研究として、アミノ酸を取り上げ HAP 種結晶の成長阻害実験から検討を行った。

本実験ではどのような構造を持つアミノ酸が HAP と相互作用を及ぼすかを調べるうえで、Screening 的な検

索を目的とした。各阻害剤の濃度はモル濃度ではなく質量濃度を一定としたが、阻害作用を示した阻害剤のモル濃度が阻害作用を示さなかったもののモル濃度よりも極端に大になることはなかった。したがって、今回の実験では、質量濃度を一定としても十分であると考えた。

今回は Cystine, Tyrosine については、溶解度の関係から成長阻害実験は行えなかった。

HAP は六方晶系の構造を持ち a 面, b 面上に C-site と呼ばれる正の電荷を帯びた 2 個の Ca 原子からなる構造を持ち, C 面上に P-site と呼ばれる三つの PO_4^{3-} に付属した, それぞれの負の電荷を帯びた六つの O 原子が

らなる構造を持つ^{16,17)}。

HAP の種結晶の成長が阻害されるのは、阻害物質が HAP に吸着することによって、HAP の表面上にあるこれら結晶成長部位がブロックされるために生じると考えられる。

Bernardi ら^{18,19)}の非極性アミノ酸は HAP に吸着しなかったという実験結果と、われわれの成長阻害実験の結果とを考え合わせるとこのことが裏づけられる。

極性アミノ酸である Glycine に成長阻害作用がみられ、非極性アミノ酸の Alanine には阻害作用がみられなかったことから Glycine と Alanine は構造的には側鎖の構造が $-H$ か $-CH_3$ でわずかに異なるだけであるが、このわずかの差が HAP に対する親和性の違いを生み出し、Glycine が Alanine よりも HAP の P-site により強く吸着する結果、HAP の結晶成長を阻害したものと考えられる。あるいは、HAP の OH-site²³⁾ に Glycine ion が置換するために結晶成長が阻害されたのではないと思われる。

側鎖に水酸基を持つ Serine, Threonine に阻害作用がみられたことは、Bernardi ら^{18,19)}の吸着実験の結果と相応している。このことから水酸基が結晶成長に関与していることが示唆されるが、Hydroxy-proline に成長阻害作用がみられなかったことから側鎖の構造に関連しているものと思われる。

Glycine とその誘導体の成長阻害実験の結果からアミノ基と、カルボキシル基の間のメチレン基の数が多いほど阻害作用が小さくなることがわかった。このことから、アミノ基とカルボキシル基の位置的關係が結晶成長に影響を及ぼしていることがわかる。また Glutamine と Asparagine の結果から、側鎖にメチレン基の数が多い Glutamine には阻害作用がみられなかったことから側鎖の長さも関係するものと思われる。

塩基性アミノ酸はいずれも成長阻害作用を示したことから、側鎖のアミノ基が関与していることが示唆される。特に Histidine に強い阻害作用がみられ、さらにイミダゾール基を有する Histidine の誘導体にも強い阻害作用がみられたことから、イミダゾール基が結晶成長に影響を及ぼしていることが考えられる。

イミダゾールは、電子供与体であり金属イオンと配位結合することが知られているので、HAP の Ca^{2+} と結合することによって結晶成長部位がブロックされるために阻害作用が生じるものと思われる。

酸性アミノ酸である Aspartic acid と Glutamic acid は、いずれも Bernardi ら^{18,19)}の吸着実験の結果と相応

して両者とも成長阻害作用がみられた。このことから側鎖のカルボキシル基が関与しているものと思われ、しかも側鎖のメチレン基の数の少ない Aspartic acid の阻害作用が Glutamic acid よりも大きいことからカルボキシル基だけでなく側鎖の長さも関連していることが伺われる。

今回は吸着実験に関しては Bernardi ら^{18,19)}の実験結果をもとに考察を加えた。先に述べたように、HAP の結晶成長阻害作用は HAP 表面上の結晶成長部位がブロックされるために生じることが考えられるが、骨コラーゲンを構成するアミノ酸の 1 つである Hydroxy-proline が HAP に特異的な吸着を示すことが知られているにも拘わらず²⁰⁾、今回の実験では阻害作用を示さなかったことから吸着 site の観点からだけでなく、HAP の等電点²¹⁾、HAP 結晶の格子欠陥²²⁾、HAP のイオンの表面拡散²³⁾からさらに追求する必要があり今後の検討課題としたい。

V. 結 論

今回われわれは、apatite と骨の有機成分であるタンパク質との相互作用を明らかにするためにその構成単位であるアミノ酸に注目して、apatite との関連について結晶成長阻害の観点から検討を行い以下の点が判明した。

1. 非極性アミノ酸には成長阻害はみられず、極性アミノ酸、酸性アミノ酸に成長阻害作用がみられた。
2. 成長阻害には、カルボキシル基やアミノ基のみならず、水酸基やイミダゾール基が関与していることが推測される。
3. 成長阻害には 2. に述べた基の存在のみならず側鎖の構造も関与していると思われる。

本論文の要旨の一部は、昭和 62 年 5 月、第 77 回日本補綴歯科学会学術大会において発表した。研究の一部は、昭和 61 年度文部省科学研究費 (No. 61771599) によった。

文 献

- 1) 原 宜興ほか：リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用 3. 実験的歯周炎への hydroxyapatite の応用, 日歯周誌, 26 : 542~555, 1984.
- 2) 田村博宣：水酸化アパタイト顆粒による顎骨補填に関する病理組織学的研究, 口科誌, 34 : 652~673, 1985.
- 3) 永井教之ほか：合成水酸化アパタイトのラット顎骨補填時における病理組織学的研究, 日口外誌, 31 : 1352~1361,

- 1985.
- 4) 須田立雄ほか：骨の科学，224～225，医歯薬出版，東京，1985.
 - 5) 天児民和訳：骨折治癒の機序，58，医学書院，東京，1971.
 - 6) Posner, J.W. and Price, P.A. : A method for decarboxylation of γ -carboxyglutamic acid in proteins, *J Biol Chem*, 254 : 431～436, 1979.
 - 7) Posner, 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.
 - 8) Delmas, P.D., Stenner, 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.
 - 9) Termine, J.D., Belcort, A.B., Conn, K.M. and Kleinman, H.K. : Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone, *J Biol Chem*, 256 : 10403～10408, 1981.
 - 10) Romberg, R.W., Werness, P.G., Riggs, B.L. and Mann, K.G. : Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins, *Biochemistry*, 25 : 1176～1180, 1986.
 - 11) Nancollas, G.H. and Tomazic, B. : Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals. Effect of super-saturated and ionic medium, *J Physical Chemistry*, 78 : 2218～2225, 1974.
 - 12) Branko, T. and Nancollas, G.H. : The seeded growth of calcium phosphate. Surface characterization and the effect of seed material, *J Colloid Interface Sci*, 50 : 451～461, 1975.
 - 13) Doi, Y. and Eanes, E.D. : Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in super-saturated solution seeded with apatite, *Calcif Tissue Int*, 36 : 39～47, 1984.
 - 14) Doi, Y., Eanes, E.D., Shimokawa, H. and Termine, J.D. : Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins in vitro, *J Dent Res*, 63 : 98～105, 1984.
 - 15) Aoba, T. and Moreno, E.C. : Preparation of hydroxyapatite crystals and their behavior as seeds for crystal growth, *J Dent Res*, 63 : 874～880, 1984.
 - 16) 川崎 力：ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィの基本原理とそのHPLCへの応用，インファケム，5 : 24～32, 1984.
 - 17) 川崎 力：ハイドロキシアパタイト結晶粒子を充填剤とする高速液体クロマトグラフィー，セラミックス，20 : 195～202, 1985.
 - 18) Bernardi, G. and Kawasaki, T. : Chromatography of polypeptides and roteins on hydroxyapatite columns, *Biochim Biophys Acta*, 160 : 301～310, 1968.
 - 19) Bernardi, G., Giro, M.G. and Gaillard, C. : Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns : Some new developments, *Biochim Biophys Acta*, 278 : 409～420, 1972.
 - 20) Hata, M., Marumo, F. and Aoki, H. : Epitaxial growth of L-hydroxyproline on apatite : Report of the research laboratory of engineering material, Tokyo institute of technology, 8 : 1～15, 1983.
 - 21) Bell, L.C., Posner, A.M. and Quirk, J.P. : The point of zero charge of hydroxyapatite and fluorapatite in aqueous solution, *J Colloid Interface Sci*, 42 : 250～261, 1973.
 - 22) Chuong, R. : Experimental study of surface and lattice effects on the solubility of hydroxyapatite, *J Dent Res* 52 : 911～914, 1973.
 - 23) 金澤孝文ほか：アパタイトの材料科学，Gypsum & Lime, 210 : 261～273, 1987.