蔞酸カルシウム結晶に対するオステオポンチンの構造的特徴

近畿大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 栗田 孝教授)

梅 川 徹

STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF OSTEOPONTIN FOR CALCIUM OXALATE CRYSTAL

Tohru Umekawa

Department of Urology, Kinki University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi Kurita)

(Background) I investigated which structural segment of osteopontin (OPN), a matrix component of urinary stones, is significantly related to the formation of urinary stones.

(Methods) I prepared several kinds of OPNs under various conditions and compared the effects of these OPNs on calcium oxalate (CaOx) crystal using RI counts obtained by the seed crystal method and diluted urine method. Furthermore, I performed scanning electron microscopic (SEM) observation of CaOx crystals used in these experiments and evaluated the effects of OPN based on morphological changes in CaOx crystals. The following OPNs were used in this study: human recombinant OPN (rOPN), human native OPN (nOPN) purified from human milk, denatured OPN (dOPN) obtained by adding organic solvent during the course of nOPN purification, and asiario OPN (aOPN) obtained by removing sialic acid after enzymatic digestion of nOPN.

(Results) When the effects of OPNs (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were evaluated by the seed crystal method, the following inhibitory activities were observed: nOPN (82%), aOPN (56%), dOPN (49%) and rOPN (15%). When the effects of OPNs (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were evaluated by the undiluted urine method, the following inhibitory activities were observed: nOPN (38%), aOPN (27%), dOPN (21%) and rOPN (0%). Furthermore, using nOPN, I performed SEM observation of CaOx crystals and found that nOPN mainly inhibited CaOx crystal aggregation.

(Conclusion) Since the inhibitory activity of nOPN was observed not only in the seed crystal method, but also in the undiluted urine method, it was suggested that nOPN may play an important role in the living body during the course of urinary stone formation. Moreover, the inhibitory activity of OPN was not due to its primary structure, but it was closely related to its higher-order structure and side chains including sialic acid. Furthermore, it was clarified that the inhibitory activity of OPN mainly resulted from inhibition of CaOx crystal aggregation rather than growth inhibition in these crystals.

Key words: osteopontin, seed crystal method, undiluted urine method

要旨: (背景と目的) 尿路結石のマトリックス成分の一つであるオステオポンチン (OPN) の構造上のどの部分が結石形成に深く関与するのかを検討した。

(材料と方法) RI カウントを用いたシードクリスタル法と全尿法で、蔞酸カルシウム結晶に与える影響を種々の条件で作成した OPN で比較検討した。またこれらの結晶を走査電子顕微鏡で観察し、その作用機序を結晶の形態的变化から検討した。材料には、ヒトの recombinant OPN (rOPN)、ヒト母乳から精製した native OPN (nOPN)、denatured OPN (dOPN) と asiario OPN (aOPN) である。

(結果) シードクリスタル法の結晶は、蛋白濃度が 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で抑制活性は、nOPN (82%)、aOPN (56%)

%), dOPN (49%), rOPN (15%)であった。全尿法では、150 $\mu\text{g/ml}$ の OPN 濃度で抑制活性は、nOPN (38%), aOPN (21%), dOPN (21%), rOPN (0%)。さらにこの時の nOPN について、結晶を電子顕微鏡で観察したところ、nOPN は蓚酸カルシウム結晶の凝集を主に抑制している事が判明した。

(結論)nOPN はシードクリスタル法のみならず全尿法でも抑制活性を有していたことにより、生体内でも結石形成に対して重要な役割をはたしている可能性が示唆された。またこの抑制活性は蛋白の一次構造によるものではなく、OPN の高次構造や側鎖のシアル酸が深く関与していると考えられた。さらにこの抑制活性は、電顕の結果から主に結晶の凝集の阻害によるものである可能性が示唆された。

キーワード：オステオポンチン、シードクリスタル法、全尿法

緒 言

骨をはじめとする硬組織石灰化のメカニズムに関しては、一人の研究者ごとに一つの石灰化の仮説があると言われているのと同様に、尿路結石の発生原因やそのメカニズムについても、近年多くの新しい知見がもたらされたが、判然としない部分もなお多い。結石が形成される過程において重要な蛋白質であるマトリックスには、nephrocalcin¹⁾, osteopontin (OPN)²⁾, calprotectin³⁾, α_1 antitrypsin⁴⁾, uronic acid rich protein⁵⁾, human prothrombin activation peptide F 1⁶⁾, α_2 HS-Glycoprotein⁷⁾, inter α trypsin inhibitor⁸⁾ などがあげられる。これらの多くは、in vitro で蓚酸カルシウム (CaOx) 結晶の成長や凝縮を抑制する可能性のある尿中物質、つまり crystal matrix protein⁹⁾ や human urinary crystal surface binding substance⁷⁾ として発見されたが、OPN は分子生物学的手法を用い尿路結石中から同定された物質である⁹⁾。さらに OPN は実際に結石患者から抽出した結石からも抽出・同定された¹⁰⁾。

OPN は、1986 年に Oldberg ら¹¹⁾ がラットの培養骨肉腫細胞からその cDNA を分離したもので、生体内の生理的な石灰部位 (骨、歯肉、内耳の耳石等) や、病的な石灰部位 (癌細胞の石灰化、腎結石、動脈硬化¹²⁾ 等) での重要な役割が明らかにされつつある。さらに癌細胞の転移をはじめとする細胞接着因子としての役割に関する研究もある¹⁰⁾。

OPN がどのような意義を持って結石内にとりこまれたか、結石形成においてどのような役割を担っているのかは、不明な点が多い¹⁴⁾。この解答の一部を得るには、基礎的な実験として純化した OPN が CaOx 結晶の成長や凝集にどのような影響があるのか、またいかなる OPN の構造的特徴がそれに寄与しているかを調べる基礎的な実験が必要である。今回の検討では抽出法の違いにより三次元構造を保たせた native OPN (nOPN) と有機溶媒を用いた抽出によりその高次構造

を変性させた denatured OPN (dOPN)、さらには nOPN に対して酵素的に側鎖のシアル酸を除去した asialo OPN (aOPN)、側鎖を全く有さずまた高次構造も異なり蛋白の一次構造のみが同じという意味で recombinant OPN (rOPN) を用いて、CaOx 結晶の成長に与える影響の違いをシードクリスタル法¹⁵⁾ と全尿法¹⁶⁾ で検討すると同時に、走査型電顕 (scanning electron microscopy: SEM) でもそれらを形態的に観察した。

対象と方法

1. Recombinant OPN 作成

腎細胞癌のため腎摘除術を施行した症例の正常部分の腎組織から ISOGEN-LS (ニッポンジーン) で total RNA を抽出した。今回の OPN の reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) には、OPN に対する特異的な primer (outer upstream primer (77—94): 5'-CAGTGATTTGCTTTTGCC-3', outer downstream primer (1206—1223): 5'-GAC-ATAACCCTGAAGCTT-3', inner upstream primer (116—133): 5'-ATGGATCCATACCAGTTAAAC-AGGCT-3', inner downstream primer (992—1009): 5'-GGAAGCTTTTAATTGACCYCAGAAGA-3') を用い、全長の OPN cDNA¹¹⁾ を得るため nested PCR を行った (inner upstream primer のアンダーラインは BamHI, inner down stream primer では HindIII のサイトを示している)。Total RNA 1 μg を用いて逆転写反応を RNA LA PCR Kit (TaKaRa) で行った。この反応液 (全量 20 μl) の組成、5 mM. MgCl_2 , 1 X. RNA PCR buffer, 1 mM. dNTP Mixture, 1 U/ μl . RNase Inhibitor, 0.25 U/ μl . Reverse Transcriptase, 1 μM . outer downstream primer, 2.5 μl . RNase Free dH_2O である。これを 42.0°C で 60 分間、99.0°C で 5 分間反応させた (GeneAmp PCR System, PERKIN ELMER)。逆転写反応後の反応液 20 μl に試薬を添加し、計 100 μl (2.5 mM. MgCl_2 , 1X. LA PCR buffer, 2.5 U/100 μl 。

TaKaRa LA Taq, 63.5 μ l. RNase Free dH₂O, 1 μ M. outer upstream primer) とし第1回目のPCR反応は94℃で2分間, 94℃で30秒, 60℃で30秒, 72℃で90秒とし28サイクル行った. 第2回目は, 第1回目のPCR産物2 μ lに滅菌蒸留水75.5 μ lと以下の試薬を加え全量を100 μ l (0.5 μ M. inner down and upstream primer, 1X. EX Taq buffer, 0.2 mM. dNTP Mixture, 2.5 U/100 μ l. Ex Taq)とし, 94℃で2分間, 94℃で30秒, 60℃で30秒, 72℃で90秒の反応を30サイクル行った. このPCR産物を1.5% アガロースゲルに展開し, その塩基配列が既知のOPNと一致すると確認後, pMOSBlue T-vector Kit (Amersham) にてクローニング, さらに Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) でrOPNを合成した. つまり, BamHIとHindIIIのサイトを有する先の全長OPN cDNAをプラスミド (pMAL-c 2) にリゲーションし, 大腸菌 (JM 109) にトランスフォームさせ培養した. さらに Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranoside (IPTG, TaKaRa) にて蛋白合成を促進させ, maltose binding protein (MPB) と連続したrOPNを合成した. 大腸菌の crude cell extract から MBP-rOPN の fusion 蛋白を amyrose resin affinity column で精製し factor Xa で切断後, Q Sepharose column で分離し rOPN の N 末端アミノ酸配列の確認を行った.

2. ヒト母乳からの OPN の精製¹⁷⁾

ヒト母乳300 ml に対し Diethylaminoethyl (DEAE)-Trusacryl を 50 m 加え 0.1 nM p-APMSF (Sigma) の存在下 4℃で2時間攪拌し, 沈殿物をろ紙で取り, 0.2 M. NaCl を含む 0.01 M 磷酸ナトリウム溶液 (pH 7.0) 200 ml で洗浄, この沈殿に 0.4 M NaCl を含む 0.01 M 磷酸ナトリウム溶液 (pH 7.0) 100 ml で粗な OPN を溶出した. これを Sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE, 10% gel, 0.8 mm, 100 V) で展開し, 蛋白の N 末端を分析した (gas phase protein sequencer 477 A, Applied Biosystems). さらに 0.15 M 磷酸ナトリウム (pH 7.0) で透析し, これに 1/10 量のクエン酸バリウム (塩酸バリウム: 15 g, クエン酸ナトリウム: 3.5 g/H₂O: 100 ml) を加え OPN を吸着させ, 0.2 M 磷酸ナトリウム (pH 6.8) で nOPN を溶出し蒸留水で透析し nOPN を得た.

dOPN は, 先の粗な OPN を 0.15 M 磷酸ナトリウム (pH 7.0) で透析し逆相高速クロマトグラフィーで抽出した (Column: CHEMOSORM 300-7L, 4.6 $\times$ 250 mm,

Fig. 1 Seed crystal method and undiluted urine method.

7 μ m, 300 A, Flow rate : 1.0 ml/min, Buffer A : 0.1 % TFA, in H₂O, Buffer B : 0.1% TFA, 70% acetonitrile in H₂O, Gradient : 0% B for 5 min, 0~70% B in 60 min). 精製した nOPN と dOPN は, 同様に SDS-PAGE にて純度を検討した.

aOPN の作成は, nOPN 10 mg に対し 1 単位のシアリダーゼ (Seikagakukogyo) を 1 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.3, 37℃) で 24 時間反応させ, 15,000 回転で 10 分間遠沈した上澄みを蒸留水で透析後, 凍結乾燥し実験に用いた. 実際にこれらの nOPN と aOPN がどれくらいのシアリ酸を含むかを, ランピア SIAL キット (富士レビオ株式会社) で測定した.

3. シードクリスタル法と全尿法 (Fig. 1) により, 先に得られた各種の OPN の抑制活性を測定した. シードクリスタル法には, 1.0 mM. CaCl₂, 0.2 mM. Na₂C₂O₄ (NaOx), 5.0 mM. NaCacodylate, 0.15 M. NaCl, pH 6.00 の人工尿を, 全尿法にはヒト尿を限外濾過フィルター (Millipore) で分子量 10,000 以上の物質を除去した ultrafiltrated urine を用いた. 両方法ともに ¹⁴C でラベルした Ox で放射線活性の減少を液体シンチレーション

Fig. 2 Osteopontin (OPN) analysis by means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). These PCR products were run individually on 1.5% agarose gel. Lane 1 is a standard marker (100 base-pair ladder, ▲: 800 bp). Lane 2 is a band of outer primer amplification (1,129 base pair). Lane 3 is a band of inner primer amplification (833 base pair). Lane 4 is a blank control without cDNA.

カウンター (Wallac, LKB) にて測定した。全尿法は個々の尿の activity product ration が異なり、違う尿を用いる場合は supersaturation level を揃える必要がある。従って、シードクリスタル法同様に同じ尿で一度に計4回実験を行った。シードクリスタル法では 30 $\mu\text{g/ml}$ 、全尿法では 200 $\mu\text{g/ml}$ の OPN 濃度で、各種 OPN の抑制活性を一元配置分散分析法で統計学的検定をし、各組み合わせは Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) で検討した。放射能活性の減少のみでは、OPN が CaOx 結晶の成長や凝集に対する程度抑制するのかが判断がつかない。従って nOPN を対象とした全尿法で、ultrafiltrated urine 20 ml に対

Fig. 3 SDS-PAGE analysis (10% gel, 8 mm thickness, Coomassie Brilliant Blue stain). Lane 1: crude extract of *E. coli* (host) which induced by IPTG, lane 2: purified fusion protein (recombinant osteopontin with maltose binding protein) eluted from amyrose column with maltose, lane 3: recombinant osteopontin after factor Xa cleavage eluted from Q-sepharose column.

して 15 mM 蓼酸ナトリウムを 1.2 ml 加え、CaOx 二水化物結晶を作成し結晶の形態変化を SEM (JSM-840, 日本電子) で観察した。

結 果

1. rocombinant OPN の合成

RT-PCR で得られた DNA を電気泳動し (Fig. 2), そのシークエンスの結果から OPN の全長の塩基配列と完全に一致することを確認した。大腸菌の crude cell extract (Fig. 3, lane 1) から MBP-rOPN を amyrose resin affinity column で精製した後 (Fig. 3, lane 2), factor Xa で MBP と rOPN の結合を切断した。Q Sepharose column で MBP と rOPN の分離を行い (Fig. 4), rOPN の N 末端のアミノ酸配列が OPN と一致することを確認した。この rOPN は SDS-PAGE の結果 36 kDa であった (Fig. 3, lane 3)。

2. OPN の精製

ヒト母乳より抽出した粗な OPN を SDS-PAGE で展開した結果である (Fig. 5)。アミノ酸配列を解析する

Fig. 4 Q-Sepharose gel chromatography of recombinant osteopontin and maltose binding protein with NaCl gradient elution.

Fig. 5 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoretic band pattern of crude extracts from human milk protein (10% gel, 8 mm thickness, Coomassie Brilliant Blue stain).

と、82 kDaの蛋白はOPN (全長)であった。他に154番目までのアミノ酸が欠落した、つまり、ヘパリン結合部位で切断されたOPN (band B, 40 kDa)が存在した。最も量が多かったのはベータカゼイン (32 kDa)であった。また分子量の小さい蛋白質も数種類認められた。これらをさらにバリウムで精製したnOPNとアセトニトリルを用いた逆相カラムで精製したdOPNを得て (Fig. 6), 同様にSDS-PAGEで展開し、その純度を調べた (Fig. 7)。デンストメーター (LAS-1000, 富士フィルム) での解析の結果, 96%以上の純度でnOPNとdOPNが得られた。混入した残りの蛋白のほとんどは, band Bであった。aOPN作成の結果は, nOPN

Fig. 6 Reversed-phase chromatography of denatured osteopontin (d-OPN) from human milk in silica column (C_{18}) with acetonitrile gradient elution. Protein rich fractions containing d-OPN (★) were pooled for further analysis.

のシアル酸含有量が5%であったものが, シアリダーゼ消化後は1%になった。

3. シードクリスタル法と全尿法の結果

シードクリスタル法では, 各種OPNの濃度が30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ で, nOPN: 86.1 ± 7.3 (%), 平均 $\pm$ 標準偏差, aOPN: 58.7 ± 5.2 , dOPN: 51.1 ± 2.9 , rOPN: 17.8 ± 2.8 , ピロリン酸: 65.1 ± 5.6 の抑制活性であった (Fig. 8)。全尿法の結果は同様に, OPN濃度が200 $\mu\text{g}/\text{dl}$ で, nOPN: 47.4 ± 4.7 , aOPN: 32.1 ± 2.3 , dOPN: 22.0 ± 2.7 , rOPN: 5.2 ± 0.6 , ピロリン酸: 86.5 ± 3.2 であった (Fig. 9)。両実験系ともに一元配置分散分析を用いた検定の結果, 全体として各種のOPN間に有為なばらつきが認められた ($p < 0.01$)。さらにFishers's PLSDでそれぞれの2群間を比較した結果, 全尿法のnOPNとaOPNの間とaOPNとdOPNの間には統計学的に有為な差が認められなかったが, 前者が後者よりも値が大きい傾向があった。それ以外の群間の組み合わせでは, 全て有為な差が認められた ($p < 0.01$)。陽性のコントロールとして用いたpyrophosphoric acid (和

Fig. 7 SDS-PAGE pattern of purified osteopontin (OPN) from crude extracts from human milk (10 % gel, 8 mm thickness, Coomassie Brilliant Blue stain). Lane 1: native OPN, lane 2: denatured OPN.

Fig. 8 Inhibitory activity in seed crystal method.

光純薬)は、既に報告されているのと同程度の抑制活性であった¹⁵⁾。

4. SEMによるCaOx結晶の観察の結果 (Fig. 10 a, b)

nOPN (200 μg/dl)を対象とした全尿法でCaOx結晶を観察した結果、nOPNを添加すると凝集はほぼ完全に停止しており結晶数も少ない傾向にあった。結晶の成長については明らかに阻害しているとは断定できなかった。

考 案

われわれは尿路結石のマトリックス成分は腎組織成分の一つであるとの仮説を立て、腎組織のcDNAと尿路結石蛋白に対するポリクローナル抗体を作成しSanger法で尿路結石のマトリックス成分をクローニングするとともに、その塩基配列とアミノ酸配列を決

Fig. 9 Inhibitory activity in undiluted urine method.

定した。その結果、これらの一つがOPNであることを明らかにした^{18) 19)}。さらに尿路結石中のマトリックスからOPNを初めて分離精製した⁹⁾。また実験的に作成した結石形成ラットモデルでは、遠位尿細管上皮細胞を中心としたOPN mRNAの発現が増加することをmouse cRNA probeによるin situ hybridization法で確認した^{20) 21)}。このOPN mRNA発現の増加は、実験的に誘発した腎盂腎炎や水腎症でも起こることがNorth blot法で確認されており、動物実験レベルではあるが興味を持たれる^{22) 23)}。犬の遠位尿細管由来の細胞であるMDCK細胞は、CaOx結晶と能動的な接着を行うが、これにOPNが大きく関与することも明らかとなった²⁴⁾。しかし実際にOPNは結石形成においてpromoterかあるいはinhibitorなのかといった基本的な部分においてもなお、明確に説明できない点が残る。

以前よりOPNを始めとして尿路結石の形成に関与すると考えられるマトリックス成分が次々と試験管レベルで単離されているが、これらが生体内での結石形成においてどのような機能を果たしているのかを単純に解釈することは困難である^{26) 27)}。OPNに関しては、各種の石灰化部位とOPN mRNA発現の強い部位とが良く一致する一方で、OPNはハイドロキシアパタイト結晶の成熟を逆に抑制するとの報告もある²⁹⁾。この様にOPNは周囲の状況に応じてCaを放出したり蓄積したりするという二面性を持つ可能性があり、石灰化における機能や、何かの組織が石灰化したという一部の事実だけでOPNの役割すべてを論じることは危険である。従って、OPNの尿路結石発生における役割を明らかにするには、純化したOPNの生化学的な基礎的検討やその遺伝子発現、さらに組織化学的な検討が

Fig. 10 Scanning electron microscopic findings of calcium oxalate dehydrate crystals at 180 minutes after addition of an overload of sodium oxalate to the undiluted urine method.

A (left side). ultrafiltrated urine (UF) as a control ($\times 1,000$)

B (right side). UF+osteopontin (native, 150 $\mu\text{g/ml}$, $\times 1,000$)

総合的になされるべきである。

OPN は約 35,000 のポリペプチドを骨格に持つ蛋白であり、アミノ酸組成の特徴としてはカルシウムイオンに親和性を有するアスパラギン酸・グルタミン酸が全体の 50% 以上と非常に多いことがあげられる。さらにセリンリン酸が 1 分子中に 12 個、スレオニンリン酸が 1 個と極めて高度にリン酸化されている^{29)~31)}。また側鎖の糖質は 16.6% (W/W)、なかでもシアル酸が 4.4% (W/W) と多い。さらに N 末端にはシグナル配列があり OPN がまさに細胞外に分泌されるタンパク質であることを示している。

今回の検討では側鎖を全く有さない OPN という観点から rOPN を作成した。これは側鎖のみならずその立体構造も大きく異なり、酸性アミノ酸を多く含むという nOPN のアミノ酸一次構造上の特徴のみが同じということである。ヒト母乳由来の OPN を今回用いたのは、尿より容易かつ大量に nOPN を回収できるためである¹⁷⁾。しかし OPN が分泌される組織が違った場合、主に側鎖のリン酸化の状態などが若干変化することが予想される。アミノ酸の一次配列の差はほとんどないと考えられるが、尿中の nOPN についての検討は今後の課題と考える。OPN の側鎖のシアル酸は、

シードクリスタル法で抑制活性を有する可能性がすでに報告されている³²⁾。これを酵素で切断した aOPN を作成して検討の対象の一つとした。また OPN の精製過程で有機溶媒を用いた逆相 HPLC で精製し、結果としてその水素結合やイオン結合などの非共有結合を破壊し高次構造を変化させた dOPN も検討材料とした。今回の結果から、nOPN>aOPN>dOPN>rOPN の順にシードクリスタル法・全尿法ともに抑制活性が高かった。つまり、側鎖も高次構造も形成しない rOPN が最も抑制活性が低く、次いで側鎖は有するが高次構造のみが変性した dOPN、高次構造は保っているがシアル酸のみが欠損した aOPN 酸性アミノ酸、nOPN の順に活性を有する結果であった。酸性アミノ酸が多いという一次構造上の特徴を OPN は有するが、これのみではほとんど活性はなく、側鎖や高次構造が極めて重要であることが示唆された。

シードクリスタル法で抑制活性がある物質は散見されるが³¹⁾⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾、全尿法で抑制活性がある蛋白は prothrombin fragment F1 などが報告されているにすぎない⁶⁾。シードクリスタル法は再現性もあり簡便な方法だが、溶液が尿酸とカルシウムから構成されているために in vitro の状態とはかけ離れており、スク

リーニング的手法であるといえる。抑制活性がシードクリスタル法で認められたとしても、全尿法で活性がなければ結石形成に関して重要な蛋白とは考えにくい。Chambers 等の報告³³⁾によると OPN の尿中濃度は通常 10~40 µg/ml 程度である。ある蛋白の抑制活性をシードクリスタル法で検討する場合、その蛋白の生理的な尿中濃度は実験における至適濃度にはよいであろうが、果たして本当にそれだけでよいのだろうか。つまり尿中結石や腎の石灰化の多くが腎臓の一部に起こるように、何らかの機転(詳細は原因不明であるが)により一部の尿細管上皮細胞で、OPN の産生が強く亢進する可能性がある。この時その部位の尿細管中の、いわゆる原尿中 OPN 濃度は、先の生理的な値よりも局所で数倍高くなることが予想される。今回の実験結果では、全尿法にて 300 µg/ml の濃度で約 60% の抑制活性を nOPN が有していたことは、以上の理由により結石形成に関与する重要な物質として意味があると考えられる。

結晶の形態を SEM で検討し、OPN の CaOx 結晶に与える抑制活性は結晶凝集に起因することを明らかにした。また、コールターカウンターを用いた検討が追加して必要であると考えられる。結晶の成長については、今回の実験系ではコントロールのものと大差はなかったために、SEM の観察からは明らかに阻害すると結論は得られなかった。

生体内においても OPN が CaOx 結晶に対して今回のような *in vitro* の実験と同じ働きをするとは言い切れない。特に何らかの基質の上に OPN が結合したような実験系²⁶⁾ ²⁷⁾の開発により、もちろんこの方が全尿法よりもさらに生体(尿細管や集合管内など)に近いと考えられるが、OPN の結石形成に関わるいくつかの仮説に対して今後有益な情報がえられるものと期待される。

結 論

1. ヒト母乳から native OPN を精製し、さらに denatured OPN, asiario OPN を作成するとともに、recombinant OPN を合成した。

2. シードクリスタル法と全尿法で、各種 OPN が尿酸カルシウム結晶の増大に与える影響を検討した。両方法ともに、結晶に対する抑制活性は、native OPN > asiario OPN > denatured OPN > recombinant OPN の順に強かった。

3. 全尿法における走査型電顕での結晶の観察結果より、OPN は尿酸カルシウム結晶の凝集を主に抑制する

ことが示唆された。

4. 尿酸カルシウム結晶に対する抑制活性には、OPN の高次構造、次いでシアル酸などの側鎖の存在が重要であるが、蛋白の一次構造それ自体では、ほとんど抑制活性を有しないことが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った近畿大学医学部泌尿器科学教室・栗田 孝教授ならびに市立貝塚病院・井口正典先生に深謝いたします。

なお、本研究は平成 10 年度の「財団法人大阪難病研究財団」の助成によるものである。

文 献

- 1) Nakagawa, Y., Abram, V., Kedzy, F.J., Kiser, E.T. and Coe, F.L.: Purification and Characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. *J. Bio. Chem.*, **258**, 12594—12600, 1983.
- 2) Kohri, K., Suzuki, Y., Yoshida, K., Yamamoto, K., Amasaki, N., Yamate, T., Umekawa, T., Iguchi, M., Sinohara, H. and Kurita, T.: Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 859—864, 1992.
- 3) Umekawa, T. and Kurita, T.: Calprotectin-like protein is related to soluble organic matrix in calcium oxalate urinary stone. *Biochem. Mol. Bio. Int.*, **34**, 309—313, 1994.
- 4) Umekawa, T., Kohri, K., Amasaki, N., Yamate, T., Yoshida, K., Yamamoto, K., Suzuki, Y., Sinohara, H. and Kurita, T.: Sequence of urinary protein, identical to alpha-one antitrypsin, which lacks 22 amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 1049—1053, 1993.
- 5) Atmani, F., Lacour, B., Jungers, P., Drucke, T. and Daudon, M.: Reduced inhibitory activity of uronic-acid-rich protein in urine of stone formers. *Urol. Res.*, **22**, 257—260, 1994.
- 6) Suzuki, K., Moriyama, M., Nakajima, C., Kawamura, K., Miyazawa, K., Tsugawa, R., Kikuchi, N. and Nagata, K.: Isolation and partial characterization of crystal matrix protein as a potent inhibitor of calcium oxalate crystal aggregation: evidence of activation peptide of human prothrombin. *Urol. Res.*, **22**, 45—50, 1994.
- 7) Honda, M., Yoshioka, T., Yamaguchi, S., Yoshimura, K., Miyake, O., Utsunomiya, M., Koide, T. and Okuyama, A.: Characterization of protein components of human urinary crystal surface binding substance. *Urol. Res.*, **22**, 355—360, 1997.
- 8) Tang, Y., Grover, P.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Ryall, R.L.: Is nephrocalcin related to the urinary derivative (bikunin) of inter- α -trypsin inhibitor? *Br. J. Urol.*, **76**, 425—430, 1995.

- 9) Yamate, T., Umekawa, T., Iguchi, M. and Kurita, T. : Detection of osteopontin as matrix protein in calcium-containing urinary stones. *Acta Urol. Jpn.*, **43**, 623—627, 1997.
- 10) 郡健二郎, 廣田誠一, 伊藤尊一郎, 梅川 徹, 栗田孝 : 尿路結石の石灰化の分子機構. *細胞工学*, **13** : 1082—1089, 1994.
- 11) Oldberg, A., Franzen, A. and Heingard, D. : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8819—8823, 1986.
- 12) Hirota, S., Imakita, M., Kohri, K., Ito, A., Morii, E., Adachi, S., Kim, H., Kitamura, Y., Yutani, C., and Nomura, S. : Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. *A. J. Pathol.*, **143**, 1003—1008, 1993.
- 13) Chambers, A.F., Hota, C. and Prince, C.W. : Adhesion of metastatic, ras-transformed NIH 3 T 3 cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. *Cancer Research*, **53**, 701—706, 1993.
- 14) 山手貴詔, 梅川 徹, 井口正典, 栗田 孝, 郡健二郎 : 尿路結石症の分子生物学的診断. *臨泌*, **52**, 213—221, 1998.
- 15) Robertson, W.G. and Peacock, M. : Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone-formers. *Clinical Science*, **43**, 499—506, 1972.
- 16) Ryall, R.L., Hibberd, C.M. and Marshall, V.R. : A method for studying inhibitory activity in whole urine. *Urol. Res.*, **13**, 285—289, 1985.
- 17) Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Paradopoulos, A. and Tenen, D.G. : Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochem. Bio. Acta.*, **996**, 43—48, 1989.
- 18) Kurita, T. and Umekawa, T. : Urinary stone—matrix ; osteopontin and calprotectin —. *Acta Med. Kinki Univ.*, **20**, 267—278, 1995.
- 19) Kohri, K., Fujita, K., Itoh, T., Tawad, T., Sakakura, T., Umekawa, T. and Kurita, T. : Purification and characterization of urinary stone protein. *Aktuelle Urologie*, **27**, 27—29, 1996.
- 20) Umekawa, T., Kohri, K., Kurita, T., Hirota, S., Nomura, S. and Kitamura, Y. : Expression of osteopontin messenger RNA in the rat kidney on experimental model of renal stone. *Biochem. Mol. Bio. Int.*, **35**, 223—230, 1995.
- 21) Umekawa, T., Yamate, T., Amasaki, N., Kohri, K. and Kurita, T. : Osteopontin mRNA in the kidney on an experimental rat model of renal stone formation without renal failure. *Urol. Int.*, **55**, 6—10, 1995.
- 22) Amasaki, N., Yamate, T., Umekawa, T., Ishikawa, Y., Kajikawa, H. and Kurita, T. : Regulation of the expression of OPN mRNA in the rat as an experimental model of renal stone disease. *Int. Urol.*, **3**, 88—91, 1996.
- 23) Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshioka, K., Iguchi, M., Yamate, T., Umekawa, T., Suzuki, Y., Sinozara, H. and Kurita, T. : Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J. Bio. Chem.*, **268**, 15180—15184, 1993.
- 24) Yamate, T., Kohri, K., Umekawa, T., Amasaki, N., Ishikawa, Y., Iguchi, M. and Kurita, T. : The effect osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to madin-darby canine kidney cells. *Eur. Urol.*, **30**, 388—393, 1996.
- 25) 久保木芳徳, 藤沢隆一 : 石灰化の機序とその障害. *The Bone*, **5**, 27—34, 1991.
- 26) Doi, Y., Okuda, R., Takezawa, Y., Shibata, S., Moriwaki, Y., Wakamatsu, N., Shimizu, N., Moriyama, K. and Shimokawa, H. : Osteopontin, inhibiting de novo formation of apatite in the presence of collagen. *Calcif. Tissue Int.*, **44**, 200—208, 1989.
- 27) Fujisawa, R., Kuboki, Y. and Sasaki, S. : Effects of dentin phosphophoryn on precipitation of calcium phosphate in gel in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, **41**, 44—47, 1987.
- 28) Boskey, A.L., Maresca, M., Ullrich, W., Doty, S.B., Butler, W.T. and Prince, C.W. : Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro : inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Mineral*, **22**, 147—159, 1993.
- 29) Craig, A.M. and Denhardt, D.T. : The Murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) : promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene*, **100**, 163—171, 1991.
- 30) Manuel, M.P., Prince, C.W., Gay, S., Austin, R.L. and Butler, W.T. : 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) antigenicity at ectopic sites in newborn rats : kidney and nervous tissues. *Cell Tissue Res.*, **251**, 23—30, 1988.
- 31) Singh, K., Devouge, M.W. and Mukherjee, B.B. : Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J. Bio. Chem.*, **265**, 18696—18701, 1990.
- 32) 紺屋英児, 梅川 徹, 栗田 孝, 井口正典, 片岡喜代徳 : カルシウム含有上部尿路結石患者における血清及び尿中シアル酸濃度の測定. *日泌尿会誌*, **88**, 917—922, 1997.
- 33) Bautista, D.S., Denstedt, J., Chambers, A.F. and Harris, J.F. : High frequency of electrophoretic mobility variations of osteopontin in the urine of patients with calcium oxalate kidney stones. *J. Urol.*, **153**, 491, 1995.

(1998年8月21日受付, 12月17日受理, 特別掲載)