膜性化骨部位の Lactate dehydrogenase 含有基質小胞様 顆粒に関する研究

内 藤 徹

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第2専攻 (指導: 横田 誠教授)

九州歯科大学学生化学講座 (指導: 野口知雄教授)

平成3年12月25日受理

Studies on the Lactate Dehydrogenase-containing Vesicles of the Intramembranous Calcification Sites

Toru Naito

Department of Periodontics and Endodontics (Director: Prof. Makoto Yokota)

Department of Biochemistry (Director: Prof. Tomoo Noguchi)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Matrix vesicles are membrane-enclosed structures that initiate mineralization in the extracellular matrix of calcifying tissues. Matrix vesicles in mineralizing tissues contain alkaline phosphatase and related phosphatase activities associated with the plasma membrane; this may be because matrix vesicles may be the extracellular cell-membrane derived microstructures.

Recently, lactate dehydrogenase isoenzymes were found to be located in matrix vesicles of the epiphyseal growth plate of young rabbit leg bones [Hosokawa *et al.* (1988) J. Biol. Chem. 263, 10045-10047]. In addition, lactate dehydrogenase-containing vesicles without alkaline phosphatase were found in the resting zone of the epiphyseal cartilage of young rat rib bones [Ohashi-Takeuchi *et al.* (1990) Biochem. J. 266, 309-312], and in the dentin of bovine tooth germs [Kitamura *et al.* (1991) J. Dent. Res. 70: 1444-1446]. However, there is no report on the presence of lactate dehydrogenase-containing vesicles in the area in which intramembranous bone formation occurs.

In the present study, lactate dehydrogenase-containing vesicles were found to be present in calvaria of mice and calves in which intramembranous bone formation occurs, as follows.

1. Only in the presence of detergents, lactate dehydrogenase activity was detected in the matrix vesicle fraction from the calvaria of young mice, showing that lactate dehydrogenase is located in the vesicles.

2. The matrix vesicle fraction was subjected to sucrose density gradient centrifugation. The sedimentation profiles of lactate dehydrogenase in the presence of Triton X-100 were different from that of alkaline phosphatase, showing that lactate dehydrogenase-containing vesicles were different from matrix vesicles.

3. Osteoblast fraction from mice calvaria was homogenized with isotonic solution and then subjected to sucrose density gradient centrifugation. Lactate dehydrogenase activity was recovered only in the soluble top fraction, but not in sediment, showing that lactate dehydrogenase is located only in the cytosol of osteoblasts. The result shows that lactate dehydrogenase in the vesicles is not simply encapsulated by vesicles from the plasma membranes or membranes of intracellular organelles.

4. Electrophoretic profiles of lactate dehydrogenase isoenzymes from matrix vesicle fraction of mice calvaria were identical with those of cytosolic lactate dehydrogenase of mice calvaria osteoblasts, suggesting that the presence of a mechanism for the specific uptake of cytosolic lactate dehydrogenase into vesicles.

5. Lactate dehydrogenase-containing vesicles were found to be also present in fetal calf calvaria.

Key words : Matrix vesicle / Osteoblast / Intramembranous calcification / Lactate dehydrogenase-containing vesicle / Lactate dehydrogenase

緒 言

歯周治療の最終的な目的は、歯周疾患によって喪失した歯槽骨の再生であるが、骨の石灰化機構はいまだ不明な点が多い。石灰化機構に関する考え方は、Robisonの押し上げ説¹⁾、Neumanらの核形成—触媒機構作用説²⁾などが提唱されてきたが、現在では基質小胞説³⁾が一般的に認められている。この理論は過去50年以上にわたり石灰化の仕組みをめぐる議論されてきた前二説をも矛盾なしに説明し得ると考えられている。

基質小胞は、Anderson (1967)³⁾、Bonucci (1967)⁴⁾により骨端軟骨の細胞外基質中に発見された膜性の小胞器官であり、直径30 nm～300 nmの円形ないし楕円形のオスミウム好染性の小胞である。その後の形態学的研究により、基質小胞は骨端軟骨などの軟骨内仮骨部位だけではなく、膜性化骨部位^{5,6)}、象牙質の石灰化開始部位^{7,8)}、さらには動脈硬化症⁹⁾、骨肉腫¹⁰⁾、軟骨肉腫¹¹⁾などの病的組織における異所性石灰化部位にも認められ、エナメル質のような上皮性の石灰化部位を除いたすべての間葉性の硬組織の石灰化開始期に出現するといわれている。時に、基質小胞の内部にはアパタイトと思われる結晶様構造物が含まれていることが報告されている⁴⁾。

Aliら(1970)¹²⁾が骨端軟骨からのコラゲナーゼ処理と遠心分画法による基質小胞画分の分離法を発表してから、基質小胞についての生化学的研究が可能となった。この小胞には細胞の形質膜由来と思われるいくつかの膜

酵素が存在し、特にalkaline phosphatase (E. C. 3. 1. 3. 1)の高い活性を持つ¹²⁾。またこの小胞には高濃度のリン脂質、特にphosphatidyl serineが含まれている¹³⁾。ピロフォスファターゼ活性を持つalkaline phosphataseは石灰化の阻害剤であるピロリン酸を加水分解し、局所のリン酸濃度を高め¹⁾、phosphatidyl serineはCaと結合することによって石灰化の核として重要な役割を果たしており¹³⁾、ATPaseは小胞膜にあるCa²⁺輸送系にエネルギーを供給すると考えられている¹⁴⁾。他方、基質小胞膜が細胞の形質膜酵素を含むことや、基質小胞膜の脂質構成が細胞の形質膜に類似していることから¹⁵⁾、基質小胞は細胞より発芽(budding)によって形成されるものと考えられている。

最近、Hosokawaら(1988)¹⁶⁾は、ウサギの骨端軟骨の基質小胞がalkaline phosphataseのほかに、細胞のシトソールに存在するlactate dehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 27)を含むこと、さらにこの小胞にはその他のシトソールの酵素が検出されないことを報告した。つづいてTakeuchiら(1990)¹⁷⁾は、軟骨性化骨部位であるラットの肋軟骨骨端部の成長軟骨部にはalkaline phosphataseとlactate dehydrogenaseを含む基質小胞が存在し、静止軟骨部にはalkaline phosphataseを含まずlactate dehydrogenaseのみを含む新たな基質小胞様の顆粒が存在することを報告している。さらにKitamuraら(1991)¹⁸⁾は、ウシの歯牙の象牙前質の石灰化部位にもlactate dehydrogenaseを含む基質小胞

様顆粒が存在することを報告している。

しかし、これまでの基質小胞に関する生化学的研究はすべて軟骨性化骨部位についてのものであり、歯槽骨と石灰化の様式を同じくする膜性化骨部位に関する研究はなされていない。そこで、本研究では膜性化骨部位であるマウスおよびウシ胎仔の頭蓋骨の基質小胞画分の検討を行った。

実験材料と方法

I. 材料

A. 実験動物

ddY 系マウス (2 日齢, 3-4 g) および胎生 4 カ月のウシ胎仔 (450 g) の閉鎖前の前頭骨-頭頂骨縫合部を用いた。

B. 試薬

Sodium pyruvate, p-nitrophenyl phosphate, 細胞分散用コラゲナーゼ (いずれも和光純薬工業), penicillin-streptomycin 混合液 (M. A. Bioproducts, U. S. A.), digitonin (Merk, U. S. A.), Triton X-100 (半井化学工業), β -NADH (オリエンタル酵母工業) を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級を用いた。

II. 方法

A. 酵素活性の測定法

Lactate dehydrogenase (以下 LDH と略す) は, 0.1 M pyruvate と 5 mM NADH を基質として用い, 0.25 M sucrose を含む 0.1 M リン酸カリウム, pH 7.4 中で 37°C で一定時間反応後, NADH の 340 nm の吸光度の減少から測定した²¹⁾。

Alkaline phosphatase (以下 ALP と略す) は, 0.1 M p-nitrophenyl phosphate を基質として, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$ の存在下で 0.25 M sucrose を含む 0.1 M glycine-NaOH, pH 10.5 中で 37°C で一定時間反応後, 1 N NaOH 0.2 ml で反応を止め, p-nitrophenol の 405 nm の吸光度の増加から測定した²⁰⁾。

Aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase (E. C. 2. 6. 1. 1) 活性は L-aspartate と 2-oxoglutarate を基質とし, 一定時間反応後, 生成する oxaloacetic acid を malate dehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 37) と NADH の存在下で NADH の 340 nm の吸光度の減少から測定した²¹⁾。

Alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase (E. C. 2. 6. 1. 2) 活性は L-alanine と 2-oxoglutarate を基質とし, 一定時間反応後, 生成する pyruvate を LDH と NADH の存在下で NADH の 340 nm の吸光度の減

少から測定した²²⁾。

酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の基質の減少もしくは生成物の生成を触媒する酵素量を 1 単位 (Unit) として示した。

B. 基質小胞画分及び骨芽細胞の調製

マウスおよびウシ胎仔の頭蓋の皮膚を剥離し, 佐藤ら (1983)²³⁾ の方法に従って閉鎖前の前頭骨-頭頂骨縫合部を取り出し, 骨膜などの軟組織を除去した。湿重量を測定した後ハサミで細切し, Hirschman ら (1983)²⁴⁾ の方法に準じ, これに 10 ml の collagenase 溶液 (1000 units collagenase/ml, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 M sucrose, 1,000 units penicillin/ml, 1 mg streptomycin/ml を含む 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5) を加え, 37°C で 3 時間, 振盪機で振盪しながらコラゲナーゼ処理を行った。続いて, 処理液をナイロン布でろ過し, Wutthier ら (1978)²⁵⁾ の方法に従って, ろ液をアングルローターを用い分画遠心した (Fig. 1)。以下の操作はすべて 0-4°C で行った。まずコラゲナーゼ処理溶液を 1,000 $\times g$ で 15 分間遠心し, 沈澱を骨芽細胞画分とした。上清を 20,000 $\times g$ で 20 分間遠心後, その上清を 100,000 $\times g$ で 60 分間遠心して, 得られた沈澱を 0.25

Fig. 1 Preparation of matrix vesicles enriched microsomal fraction and cell fraction from mice calvaria. Both fractions were suspended in 0.25 M sucrose/ 20 mM glycyl-glycine buffer, pH 7.5.

M sucrose/ 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5 に懸濁し、 $100,000 \times g$ で 60 分間遠心し、得られた沈澱を基質小胞画分とした。基質小胞画分および骨芽細胞画分は、それぞれ 1 ml の 0.25 M sucrose/ 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5 に懸濁した。

C. マウス骨芽細胞からの人工的な小胞画分の調製

上述の骨芽細胞画分を等張の緩衝液 (0.25 M sucrose / 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5) 中でマイクロホモジナイザー (Physicotron, 日音医理科機械製作所) により 30 秒間ホモジナイズし、細胞の形質膜を選択的に破壊し、さらにハンディマイクロソニック (トミー精工社) を用いて目盛り 5 で、 0°C 、20 秒間超音波処理をし、細胞膜及び細胞内膜成分を破壊した。

D. 基質小胞画分に対する digitonin 処理

Hosokawa ら (1988)¹⁶⁾ の方法に従い、0.25 M sucrose 溶液に 1.2% の digitonin を加え加熱して溶解した後、 2°C に冷却した。この溶液を 0.25 M sucrose 溶液で段階的に希釈し、これに基質小胞画分を等量加え混和した。15 分間静置した後、 $100,000 \times g$ で 30 分間遠心し、上清の LDH 活性を等張緩衝液中 (0.25 M sucrose / 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5) で測定した。

E. ショ糖密度勾配遠心分画による基質小胞の分画と骨芽細胞のオルガネラの分離

基質小胞画分 (0.8 ml) を 4.0 ml の直線的ショ糖密度勾配 (20–54% sucrose (w/w) / 20 mM glycyl-glycine (pH 7.5)) に重層した。

また、分画遠心にて得た細胞画分をマイクロホモジナイザーを用いて、等張の緩衝液中 (0.25 M sucrose/ 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5) で氷冷下にて目盛り 5 のスピードで 15 秒間ホモジナイズし、細胞の形質膜を選択的に破壊した。このホモジネイトを $300 \times g$ で 5 分間遠心して核と未破壊の細胞を取り除いた後、その上清 (0.8 ml) を上記と同様 4.0 ml の直線的ショ糖密度勾配に重層した。

つづいて両者ともバーチカルローター (RPV-50 T, 日立製作所) と 55 P-72 型超遠心機 (日立製作所) を用いて、 $132,000 \times g$ で 70 分間遠心した。遠心後、遠心管の底から 0.3 ml ずつ分画し、直ちに酵素活性を測定した。以上の操作はすべて $0-4^{\circ}\text{C}$ で行った。

E. 骨芽細胞のシトソールの調製

分画遠心によって得られた骨芽細胞画分をマイクロホモジナイザーを用いて、氷冷下にて目盛り 5 のスピードで 15 秒間ホモジナイズした後、 $100,000 \times g$ で 60 分間遠心し、得られた上清をシトソール画分とした。

G. 基質小胞画分からの LDH の抽出

基質小胞画分はマイクロソニックを用いて目盛り 5 で 15 秒間、氷冷下にて超音波処理をした後、 $100,000 \times g$ で 60 分間遠心し、得られた上清を LDH 抽出試料とした。

H. 骨格筋及び心筋からの LDH の抽出

ddY 系マウス (14 日齢) の大腿部骨格筋と心筋を摘出し、0.25 M sucrose/ 20 mM glycyl-glycine, pH 7.5 でよく洗い、ろ紙で軽く水分を切り湿重量を測定した。これに 9 倍量の 0.25 M sucrose/ 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 を加え、ハサミで細かく切り、氷冷下で Potter-Elvehjem homogenizer を用いてホモジナイズした後、ナイロン布でろ過した。ろ液を $100,000 \times g$ で 60 分間遠心し、得られた上清を LDH 抽出試料とした。

I. 電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動を Fritz ら (1970)²⁶⁾ の方法で行った。5% polyacrylamide gel を分離用ゲルとし、50 mM glycine-NaOH, pH 10.0 を泳動用緩衝液として用い、 4°C で 1 時間、1 カラム当り 5 mA で電気泳動を行った。

活性染色は、Nitisewojo ら (1976)²⁷⁾ の方法で行った。泳動後 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 中で pyruvate, NAD と反応後、生じた NADH を、phenazine methosulphate を基質として nitroblue tetrazolium と反応させ、生じた formazan の紫色の発色で活性の易動位置を確認した。

結 果

I. 基質小胞画分における LDH 含有顆粒の存在

2 日齢のマウスの前頭骨-頭頂骨縫合部からコラゲナーゼ処理および分画遠心調製した基質小胞画分では、LDH 活性は界面活性剤 (digitonin あるいは Triton X-100) 存在下においてのみ検出された。そこで、この画分を濃度の異なる digitonin で処理し、LDH の基質小胞画分からの可溶化パターンを調べた (Fig. 2)。0.1 mg/ml 以上の digitonin 濃度で LDH が可溶化されはじめ、1 mg/ml 以上の digitonin 濃度で完全に可溶化された。このことは、基質小胞画分に LDH を含む顆粒が存在していることを示している。

II. LDH 含有顆粒の由来

細胞の形質膜を選択的に破壊し、 $300 \times g$ で 5 分間遠心し、核と未破壊の細胞を除いた後、種々のオルガネラを含む上清を実験方法に従ってショ糖密度勾配遠心分画法にかけた。この結果、Fig. 3 に示すように、LDH 活

Fig. 2 The solubilized profiles of lactate dehydrogenase from isolated matrix vesicles enriched microsomal fraction by digitonin. Stock 1.2% solution of digitonin were prepared just before use by heating in 0.25 M sucrose solution. Stock solution at 0–2 °C was added to the sample and mixed. After 15 min, the suspension was centrifuged at $100,000 \times g$ for 30 min, and the supernatant fluid was carefully removed with a Pasteur pipette. The resulting supernatant was assayed for LDH.

Fig. 3 Sucrose density gradient centrifugation of cell fraction. Cell fraction was prepared from mice calvaria by homogenization with Potter-Elvehjem homogenizer in 3 ml of 0.25 M sucrose/20 mM glycylglycine buffer, pH 7.5 and then subjected to sucrose density gradient centrifugation. After fractionation, LDH activity (●) was determined in the presence of Triton X-100 at a final concentration of 0.2%, and ALP activity (Δ) in the absence of Triton X-100.

Fig. 4 The shema of the formation of matrix vesicles, LDH-containing vesicles and artifact vesicles.

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH-containing vesicles and cytosolic LDH isoenzymes. Matrix vesicles enriched microsomal fraction and cell fraction were isolated from mice calvaria as described in the text, solubilized with 0.2% triton X-100, and centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min and the precipitate discarded. The extract of LDH-containing vesicles (7.5 units of LDH) and the cytosol (7.5 units) were separately subjected to polyacrylamide gel electrophoresis as described in the text.

Fig. 6 Sucrose density gradient centrifugation of the isolated matrix vesicles enriched microsomal fraction from mice calvaria. The fraction was subjected to sucrose density gradient centrifugation as described in the text. LDH activity was determined in the absence (○) and the presence (●) of Triton X-100 at a final concentration of 0.2%, and ALP activity in the absence (△) and the presence (▲) of Triton X-100.

Fig. 7 Sucrose density gradient centrifugation of the isolated matrix vesicles enriched microsomal fraction from fetal calf calvaria. The fraction was subjected to sucrose density gradient centrifugation as described in the text. After fractionation from the bottom of the tube, LDH activity was determined in the absence (○) and the presence (●) of Triton X-100 at a final concentration of 0.2%, and ALP activity in the absence (△) and the presence (▲) of Triton X-100.

性は可溶性画分にのみ回収され、沈降しなかった。このことは、LDH 含有顆粒の LDH が形質膜や細胞内オルガネラに由来するものではないことを示している。

さらにこのことを明確にするために、以下の実験を行った。細胞画分を超音波処理し、細胞の形質膜だけで

なく細胞内膜成分をも破壊した後に分画遠心を行い、基質小胞画分を調製し、終濃度 0.2% Triton X-100 の存在下で LDH 活性を測定したところ、基質小胞画分には LDH 活性が検出された。この活性は界面活性剤 (Triton X-100) の非存在下でも検出された。以上のことから、超音波処理によって形成された LDH 活性を持つ顆粒は、その表面に LDH が人工的に付着していることを示している (Fig. 4)。

Ⅲ. LDH 含有顆粒の LDH のアイソザイムパターン

基質小胞画分の抽出液と細胞のシトソール画分をそれぞれ調製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により LDH のアイソザイムパターンの比較を行った結果を Fig. 5 に示す。その結果、基質小胞画分と細胞のシトソールの LDH はともに 5 個のアイソザイムをすべて含み、同じ泳動パターンを示した。このことは、シトソールの LDH を特異的に取り込む機構が存在することを示唆している。

Ⅳ. LDH 含有顆粒の精製

マウスから分画遠心法により得られた基質小胞画分をショ糖密度勾配遠心分画法でさらに精製すると、Fig. 6 に示すように基質小胞のマーカである ALP 活性は、Triton X-100 の存在下において単一幅広い沈降パターンを示した。この沈降パターンは終濃度 0.2% の Triton X-100 の添加によって変化しなかった。これに対して LDH 活性は、Triton X-100 の非存在下ではどのフラクションにも検出されなかった。ところが終濃度 0.2% の Triton X-100 を添加すると活性が出現し、その沈降パターンは ALP 活性とは異なっていた。以上の結果は、基質小胞画分に基質小胞とは異なる LDH 含有顆粒が存在することを示している。

またシトソールに存在する酵素として、aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase と alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase を測定したが、活性は検出できなかった。

Ⅴ. ウシ胎仔頭蓋骨基質小胞画分の検討

ウシ胎仔頭蓋骨から得られた基質小胞画分を、さらにショ糖密度勾配遠心分画法により分画し、LDH と ALP 活性を Triton X-100 の存在下と非存在下で測定した。Fig. 7 に示すように、LDH 活性は Triton X-100 の非存在下では全く検出されなかった。しかし終濃度 0.2% の Triton X-100 を添加すると LDH 活性が出現した。しかしこの沈降パターンは ALP 活性とは異なっていた。ALP 活性の沈降パターンは Triton X-100 の存在、非存在にかかわらず同一であった。

考 察

形態学的に石灰化の過程は、初期石灰化相である第1相と、それに引き続いて起こる添加的、二次的石灰化である第2相に分けられる。このうち特に、既存のアパタイト結晶に連続的にミネラルの添加が進行する前の、第1相の初期石灰化機構には不明な点が多く、石灰化機構の研究のなかでも最も注目されている。初期石灰化機構には、アルカリフォスファターゼ説、核形成-触媒機構作用説など様々な説が提唱されてきたが、これらを矛盾なく包括する説として Bernard ら (1981)²⁸⁾ により基質小胞説が提唱されるに至っている。

基質小胞は骨端軟骨において Anderson (1967)³⁾、Bonucci (1967)⁴⁾ により発見された直径 30–300 nm の膜性の小胞器官である。その後の形態学的な研究により、骨端軟骨だけでなくエナメル質のような上皮性の石灰化部位以外の硬組織の石灰化開始部位に普遍的に認められることがわかり、初期石灰化との関連が注目されてきた。その後 Ali ら (1970)¹²⁾ により基質小胞の分離法が提唱され、ALP、5'-AMPase, pyrophosphatase, ATPase などの形質膜の酵素が基質小胞内に存在することが明らかになった¹²⁾。また、基質小胞内に存在する脂質が calcium-phosphate phospholipid complexes を形成し、基質小胞内でのカルシウムイオンおよびリン酸濃度を高めている可能性のあることがわかった²⁹⁾。その後、基質小胞中に構築されたミネラルの結晶が析出したり、あたかもそれが基質小胞外に分泌されているような形態学的な所見が発表されたこともあり、骨の初期石灰化機構の研究において基質小胞が注目されることになった³⁰⁾。

しかし、基質小胞はその発見の当初から試料調製時の人工産物である可能性が指摘されており³¹⁾、最近でも様々な固定法によりミネラルの沈着に関係のない細胞の破片等が基質小胞様の構造物として試料中に観察される可能性を示唆する報告がなされている³²⁾。また、基質小胞は細胞より発芽 (budding) により形成されると考えられているが、このような形成機序では Ca-ATP ポンプの方向が逆になり、カルシウムの能動輸送が否定されることなどから基質小胞性石灰化機構を疑問視する考えもある³³⁾。このような背景から、以前より基質小胞の単離法やその機能の検討が基質小胞性石灰化機構を研究していく上で重要視されてきた。

基質小胞は高い ALP 活性を有することから、ALP が基質小胞の指標酵素として用いられてきた。しかし、

ALP は細胞の形質膜や細胞内の膜成分等にも存在し、これらに由来する活性と区別し基質小胞のみを識別して定量することは生化学的には不可能であった。しかし最近 Hosokawa ら (1988)¹⁶⁾ は、基質小胞内に本来シトソールに局在する酵素である LDH が存在していることを明らかにした。これは、LDH を指標酵素とすることによって基質小胞の定量化が可能であることを示唆している。さらに、Takeuchi ら (1990)¹⁷⁾ はラットの静止軟骨部位には ALP を含まず、LDH のみを含んだ新たな基質小胞様顆粒が存在することを明らかにした。しかし、この顆粒が骨の石灰化に関与しているのか、その他の生理機能を演じているのか現在では不明である。これは今後の重要な研究課題であり、さらに膜性仮骨部位の基質小胞および基質小胞様顆粒についての生化学的研究が必要であると思われる。そこで本研究においては、いままですらに検討されてきた軟骨性化骨部位ではなく、膜性化骨を行う部位である頭蓋骨の癒合部位を対象として、この部位の細胞外マトリックスに現れる基質小胞ならびに基質小胞様顆粒について検討を行うことにした。

まず、2 日齢マウスの頭蓋骨より基質小胞画分を調製し、LDH 活性の latency の存在について検討した。この結果、界面活性剤の存在下でのみ LDH 活性が出現し、膜の内部に LDH を含んだ顆粒の存在が示唆された。さらにこの画分をさらにショ糖密度勾配遠心分画法で分画すると、ALP 活性と LDH 活性の沈降パターンが異なっており、基質小胞画分に基質小胞とは異なる LDH 含有顆粒が存在することが明らかになった。さらに本研究では、同様な結果がウシ胎仔頭蓋骨の基質小胞画分についても得られたことから、マウスと同様ウシ胎仔頭蓋骨の基質小胞画分にも基質小胞とは異なる LDH を含む基質小胞様顆粒が存在することが明らかになった。これらの結果から、種にかかわらず、膜性仮骨部位においても基質小胞とは異なる LDH を含んだ顆粒が存在しているものと思われる。

膜性仮骨部位から得られた細胞画分のショ糖密度勾配遠心分画法による細胞内オルガネラの分画の結果、LDH はシトソール画分にのみ検出され沈降しなかった。この結果は LDH を内部に含んだ顆粒は、基質小胞画分調製操作にともなって破壊された細胞の形質膜や細胞内オルガネラに由来したものではなく、*in vivo* で形成されたものであることを示している。シトソールに存在する LDH 以外の酵素として aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase, alanine : 2-oxoglutarate aminotransferase を測定したが、いずれも顆粒には活性は検

出できなかった。さらに他のシトソールに局在する酵素の活性についても検討を行う必要はあるが、顆粒に存在している LDH は、なんらかの機構により選択的に取り込まれたものと思われ、この機構は今後の重要な研究課題である。

マウス頭蓋骨の細胞画分と基質小胞画分から抽出した LDH のアイソザイムパターンをポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べると、いずれの LDH も 5 つのアイソザイムを持ち、また同一の泳動パターンを示した。つまり、細胞のシトソールに由来する LDH のアイソザイムがすべて顆粒内に取り込まれたことを示唆している。LDH のアイソザイムの濃度比を比較したところ、 M_4 , M_3H が主なバンドであることから、骨格筋タイプであることがわかった。

Takeuchi ら (1990)¹⁷⁾ は、静止軟骨部に ALP を持たず LDH のみを持った基質小胞様顆粒が存在する理由として、高い ALP 活性を持つ肥大層軟骨細胞とは異なり、静止軟骨部の軟骨細胞には ALP 活性が検出されなためと考えた。しかし今回の研究で、本来高い ALP 活性を持つ骨芽細胞に関連した石灰化部位において同様に ALP 活性を持たず LDH を含んだ基質小胞様顆粒が存在することは興味深い。この LDH を含む基質小胞様顆粒が基質小胞と同様骨や歯牙の初期石灰化に関与しているのか、他の機能を演じているのかをさらに検討する必要がある。

Ali ら (1970)¹²⁾ により確立された基質小胞の分離法により、基質小胞の生化学的な研究は飛躍的に進んだが、この分離法によって得られる基質小胞の純度に関しては今まで顧みられることはなかった。Takeuchi ら (1990)¹⁷⁾、Kitamura ら (1991)¹⁸⁾ による基質小胞画分の検討は、この画分が単一の顆粒からのみ構成されているのではなく、基質小胞をわずかに含んだ不純な画分にしかすぎないことを示唆している。

形態学的には、基質小胞の多様性が以前より報告されており、また基質小胞の形態学的な観察そのものに疑問を投げかけるような研究も報告されている³²⁾。これらの疑問を明らかにするためにも、基質小胞あるいは LDH を含んだ基質小胞様顆粒の単離と定量が確立されなければならない。この方法の確立によって、骨や歯牙の石灰化機構の研究が飛躍的に発展するであろう。

結 論

本研究では膜性化骨部位より調製した基質小胞画分を検討し、以下の知見を得た。

1. 膜性化骨部位であるマウスの縫合形成前の頭蓋骨から調製した基質小胞画分には LDH 活性が存在していた。この LDH 活性は界面活性剤の存在下でのみ検出された。これは LDH がこの画分中の顆粒の内部に存在することを示している。

2. 膜性化骨部位から得た基質小胞画分のショ糖密度勾配遠心による ALP と latent な LDH の沈降パターンは異なっていた。このことは、基質小胞とは異なり、ALP を含まない LDH 含有顆粒が基質小胞画分に存在することを示している。

3. 細胞画分を調製し、形質膜を選択的に破壊し、ショ糖密度勾配遠心法により細胞画分を行ったところ、LDH は細胞のシトソールにのみ局在し、形質膜や細胞内オルガネラには存在しないことが明らかになった。この結果は、LDH 含有顆粒の LDH が細胞の形質膜や細胞内オルガネラに由来したものではないことを示している。

4. 細胞画分をホモジナイズし、さらに超音波処理をした後、分画遠心により基質小胞画分を調製し、Triton X-100 の存在下で LDH 活性を測定したところ、この画分には LDH 活性が検出されたが、この活性は Triton X-100 非存在下でも変わらなかった。このことは、細胞の破壊によって人工的に顆粒が形成され、これが基質小胞画分に回収され、この画分の LDH は顆粒の外表面に付着していることが明らかになった。

5. 以上の結果は、膜性化骨部位に検出される LDH 含有顆粒が人工の産物ではなく、*in vivo* に形成されたことを示している。

6. 基質小胞画分には LDH 以外に細胞のシトソールに存在する酵素は検出されず、顆粒内に LDH を選択的に取り込むなんらかの機構が存在している可能性があることが示唆された。

7. マウス頭蓋骨から調製した細胞画分と基質小胞画分の LDH のアイソザイムパターンを電気泳動により比較したところ同一のパターンを示した。つまり、細胞のシトソール由来の LDH アイソザイムすべてが顆粒に取り込まれていることが明らかになった。

8. ウシ胎仔頭蓋骨から調製した基質小胞画分にも基質小胞とは異なる LDH 含有顆粒が存在することを明らかにした。このことは、この LDH 含有顆粒が膜性化骨部位に普遍的に存在することを示唆している。

稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えていただいた故山本博武前教授に感謝の意を表します。また、御親切

なる御指導および御校閲を賜った歯科保存学第2講座横田誠教授, ならびに本研究課題を与えられ, 終始懇切なる御指導, 御校閲を賜った生化学講座野口知雄教授に心から感謝の意を表します。あわせて, 種々の御協力, 御指導をいただきました歯科保存学第2講座ならびに生化学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Robison, R.: The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17: 286-293, 1923.
- 2) Neuman, W. F. and M. W. Neuman: The chemical dynamics of bone mineral. Chicago University Press, Chicago, 23-31, 1958.
- 3) Anderson, H. C.: Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* 35: 81-101, 1967.
- 4) Bonucci, E.: Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20: 33-50, 1967.
- 5) Bernard, G. W. and Pease, D. C.: An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *Am. J. Anat.* 125: 271-290, 1969.
- 6) Bonucci, E.: The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop.* 78: 108-139, 1971.
- 7) Eisenmann, D. R. and Glick, P. L.: Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.* 41: 18-28, 1972.
- 8) Sisca, R. F. and Provenza, D. V.: Initial dentin formation in human deciduous teeth. An electron microscope study. *Calcif. Tissue Res.* 9: 1-16, 1972.
- 9) Kim, K. M.: Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and media. *Fed. Proc.* 35: 156-162, 1976.
- 10) Lee, W. R., Laurie, J. and Townsend, A. L.: Fine structure of a radiation-induced osteogenic sarcoma. *Cancer* 36: 1414-1425, 1975.
- 11) Schajowicz, F., Cabrini, R. L., Simes, R. J. and Klein-Szanto, A. J. P.: Ultrastructure of chondrosarcoma. *Clin. Orthop.* 100: 378-386, 1974.
- 12) Ali, S. Y., Sajdera, S. W. and Anderson, H. C.: Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67: 1513-1520, 1970.
- 13) Genge, B. R., Wu, L. N. Y. and Wuthier, R. E.: Differential fractionation of matrix vesicle proteins. *J. Biol. Chem.* 265: 4703-4701, 1990.
- 14) Ali, S. Y. and Evans, L.: The uptake of [^{45}Ca] calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem. J.* 134: 647-650, 1973.
- 15) Wuthier, R. E.: Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 409: 128-143, 1975.
- 16) Hosokawa, R., Uchida, Y., Fujiwara, S. and Noguchi, T.: Lactate dehydrogenase isoenzymes are present in matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 263: 10045-10047, 1988.
- 17) Ohashi-Takeuchi, H., Yamada, N., Hosokawa, R. and Noguchi, T.: Vesicles with lactate dehydrogenase and without alkaline phosphatase present in the resting zone of epiphyseal cartilage. *Biochem. J.* 266: 309-312, 1990.
- 18) Kitamura, C., Terashita, M. and Noguchi, T.: Presence of vesicles containing lactate dehydrogenase in the dentin of bovine tooth germs. *J. Dent. Res.* 70: 1444-1446, 1991.
- 19) Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. and Grassl, M.: Enzymes as biochemical reagents. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 481-482.
- 20) Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. and Grassl, M.: Enzymes as biochemical reagents. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 496-497.
- 21) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: Glutamate-oxaloacetate transaminase. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 727-733.
- 22) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: Glutamate-oxaloacetate transaminase. In: *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H. U.). 2nd English ed. Academic Press, New York, 1974, 752-758.
- 23) 佐藤温重, 野田政樹: 骨形成の基礎に関する研究の手引として 2. 骨形成因子に関する研究. *整形・災害外科*, 26: 1425-1432, 1983.
- 24) Hirschman, A., Deutsch, D., Hirschman, M., Bab, I. A. and Sela, J.: Neutral peptidase activities in matrix vesicles from bovine fetal alveolar bone and dog osteosarcoma. *Calcif. Tissue Int.* 35: 791, 1982.
- 25) Wuthier, R. E., Linder, R. E., Warner, G. P., Gore, S. T. and Borg, T. K.: Non-enzymatic isolation of matrix vesicles: characterization and initial studies in ^{45}Ca and ^{32}P -orthophosphate metabolism. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* 1: 125-136, 1978.
- 26) Fritz, P. J., Morrison, W. J., White, E. L. and Vesell, E. S.: Comparative study of methods for quantitation of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Anal. Biochem.* 36: 443-453, 1970.
- 27) Nitisewojo, P. and Hultin, H. O.: A comparison of some kinetic properties of soluble and bound lactate dehydrogenase isoenzymes at different temperatures. *Eur. J. Biochem.* 67: 87-94, 1976.
- 28) Bernard, G. and V. Marvaso: Matrix vesicles as assay for primary tissue calcification in vivo and in

- vitro. In "Matrix Vesicles" (eds. A. Ascenzi, E. Bonucci and B. De Bernard), Wichtig Editor srl., Milano, 5-11, 1981.
- 29) Boskey, A. L. and Posner, A. S.: Extraction of a calcium phospholipid-phosphate complex from bone. *Calcif. Tissue Res.* 19: 273-283, 1976.
- 30) 小沢英浩: 石灰化機構の微細構造学的知見. 歯基礎医会誌 27: 751-774, 1985.
- 31) Boothroyd, B.: Observations on embryonic chick bone crystals by high resolution transmission electron microscopy. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 106: 290-310, 1975.
- 32) Mitchell, N. S. and Shepard, N. L.: Electron microscopic evaluation of the occurrence of matrix vesicles in cartilage. *Anat. Rec.* 227: 397-404, 1990.
- 33) Anderson, H. C.: Matrix vesicle calcification: Review and Update. In "Bone and mineral research" Vol. 3 (ed. W. A. Peck), Elsevier, 109-146, 1985.