原	著

骨および象牙質のプロテオグリカンの生化学的研究

荆 木 京 未

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導: 佐々木 哲教授)

(1986年10月6日 受付)

Studies on Proteoglycans in Bone and Dentin

Kyomi Ibaraki

Department of Biochemistry, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Satoshi Sasaki)

Proteoglycans in a smaller size present in the bone and dentin are considered to play some role in the differentiation and calcification. The purpose of this study is to characterize the biochemical and immunological properties of the bone and dentin proteoglycans, especially their core proteins.

The proteoglycans were extracted with EDTA/guanidine HCl from the bovine bone and dentin and purified by the DEAE-Sephacel and Sepharose CL-6B chromatography. The purified proteoglycans were digested with chondroitinase ABC and the core proteins from the dentin proteoglycan were used to raise the monoclonal antibody.

Both the bone and dentin proteoglycans were found to contain glycosaminoglycan and protein in equal amounts. The core proteins of the bone proteoglycan were shown to consist of 45 K, 40 K and 35 K in molecular weight, whereas those of the dentin were 90 K, 70 K, 40 K and smaller. The proteoglycan core proteins of 40 K and smaller sizes in the dentin were immunologically similar not only to those of the bone but also to those of the cartilage, tendon and dental pulp.

I. 緒 言

プロテオグリカン (PG) は細胞外基質 (Extracellular Matrix : ECM) の構成成分としてコラーゲンとともに最も広く分布する有機質成分の一つである。その典型的な分子形態は軟骨のものについて詳細に研究され、分子量 $1 \sim 3 \times 10^6$ の分子の約5~10%の重量を占めるコアタンパク質に、分子量2~2.5万のグリコサミノグリカン鎖が50~100本ついたもので、さらにこの分子はリンクタンパク質とともに非共有結合性にヒアルロン酸と巨大な会合体を形成する (軟骨型 PG)^{1~4)}。

近年、この軟骨型 PG と類似の PG が各種軟組織からも単離され^{3,4)}、同時に同一の組織から構造の異なる複数の分子がみだされている^{3~7)}。このように数々の分子種が報告される中で、分子量10~20万の低分子型のもはコアタンパク質が分子量4~5.5万、このコアタンパク質につく1~4本の糖鎖の大きさも4~5万と、従来の軟骨型 PG とは構造的に大きく異なるものとして、その起源と生理的役割に関心が持たれている。

一方、発生学的な面から ECM と細胞との関わりも活発に研究され、ECM、特に PG が発生初期の器官形成期において上皮と間葉系細胞との相

相互作用のシグナルとして細胞の誘導, 増殖および形態変化(極性化)を惹起することが知られている^{8~17)}。さらに極性化した細胞が配列, 特有のタンパク質分子などを合成, 分解する“分化”した状態になってからも, 細胞および細胞周囲の環境を保つとともに情報伝達, 反応という相互作用において動的な役割を演じていると考えられている^{18~22)}。

ところで, 硬組織の PG は古くから石灰化との関連で注目されていた。骨のものでは Herring¹⁾, 象牙質では Leaver^ら²³⁾によって基質成分の 1 つとして報告されたが, 1980 年, Termine^ら²⁴⁾によって塩酸グアニジン, EDTA/塩酸グアニジンによる硬組織での抽出方法の確立をみるまで, 骨ではほとんど研究されていなかった。一方, 象牙質では軟骨型の PG 研究に準ずる方法で, 主としてグリコサミノグリカン鎖に関する分析がなされ, 1970 年代に Jones^ら²⁵⁾, Smith^ら²⁶⁾によって PG 中のタンパク質が約 6% と報告されて以来, 象牙質 PG は軟骨型に属するものとして扱われてきた。そしてその生理的役割は, 石灰化との関わりから, (1) PG には石灰化抑制作用があり, 内軟骨性骨化または象牙前質の石灰化の際にはこれらの分解除去が行われることによって石灰化が開始する, または, (2) PG には Ca 結合能があり, 石灰化の開始時にはそれまでトラップされていた Ca イオンが放出されて石灰化組織中に取り込まれると考えられていた²⁷⁾。近年, 非コラーゲン性タンパク質の研究が盛んに行われるようになり, 硬組織に特有のいくつかのタンパク質成分が明らかになってきた^{28~30)}。その 1 つとして 1983 年, 低分子型 PG が Fisher^ら³¹⁾により ウシ胎児骨 EDTA 脱灰抽出物よりみいだされ, それはオリゴ糖の付き方の異なる分子量 38, 43K のコアタンパク質に 40K の糖鎖が 1 本または 2 本ついたものであると報告された。さらに, 1 本鎖型のものと 2 本鎖型のものは分子量が同じで起源の異なるコアタンパク質に結合しており, 2 本鎖型のもものは幼若な骨で多く認められると報告している³²⁾。また, 同研究室の Termine^ら^{33, 34)}は遺

伝性の骨形成不全症 (Osteogenesis imperfecta : OI) のウシ骨を用いて OI では PG が減少または欠損することを報告している。さらに, 象牙質でも 1984 年, Rahemtulla^ら³⁵⁾により *in vivo* の ³⁵S-硫酸の取り込みによって骨の PG と同程度の PG が存在することが報告された。しかしながら, 象牙質 PG のコアタンパク質についてはほとんど報告されていない。

そこで本実験では硬組織中の低分子型 PG の構造を主としてコアタンパク質について詳しく知るため骨および象牙質の PG を単離, 精製し, その生化学的性状を知るとともにコアタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製して免疫化学的検索を行った。

II. 実験材料および方法

1. 試料の調製および抽出方法

生後約 1 年の仔ウシの大腿骨および脛骨骨幹部を骨髓・骨膜およびその他の軟組織を除去したのち, 液体窒素下で粉碎, 骨粉とした。象牙質は同齢の仔ウシ下顎骨前歯部より未萌出歯歯胚を採り出し, 歯髄, 歯小囊その他の軟組織および形成期のエナメル質を可及的に除去したのち, さらにプロテアーゼインヒビターとして 0.1 M 6-アミノカプロン酸, 5 mM 塩酸ベンザミジン, 1 mM Phenyl-methane-sulfonyl fluoride (PMSF) を含むリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) を試料に対し約 10 倍加え, 国際電気梯製 UT-30A を用い, 10 分間 3 回氷冷下で超音波洗浄によって軟組織や細胞成分などを取り除き, 骨と同様に液体窒素下で粉碎, 象牙質粉末とした。

さらに, 比較のために用いたウシ胎児骨は約 5~6 カ月齢 (体長 30~50 cm) のウシ胎児の脛骨より同様に軟組織を除去したのち, 骨幹部をメスでスライスし, 同様の超音波洗浄を行ったものを試料とした。萌出歯の象牙質は生後約 1~2 年の仔ウシ下顎前歯を抜去, 歯髄を除いたのち, セメント質を除くため, 歯科用カーボランダムポイントを用いて流水下で歯冠および歯根の外側から厚さ約 1/3 を削除したものを超音波洗浄, 同様の

粉末にし試料として用いた。

種特異性の検索の目的で用いた骨は、ヒトのものでは73歳、女性大腿骨骨幹部骨片を、ラットおよびマウスでは3カ月齢の大腿骨および脛骨骨幹部を用いた。

組織特異性の検索の目的で用いたウシの各軟組織のうち、歯髄は生後約1年の仔ウシ歯胚より得られた歯冠部歯髄を主体とするもので、わずかに含まれる血液成分をキムワイプで拭ったのち、プロテアーゼインヒビターを含むPBSを試料の約20倍加え、4℃、10分間攪拌し、これを3回交換して洗浄を行った。腱および軟骨は前述のウシ胎児より得られたもので、腱は四肢の足根部より、軟骨は、膝関節より骨質を含まぬようスライスしたものを試料とした。これら軟組織も同様に洗浄を施した。

抽出は Termine らの方法²⁴⁾に準じ、組織の湿重量 30g に対し、4 M 塩酸グアニジンを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) (以下これを G 緩衝液とする) を 3l の割合で 72 時間抽出し (G extract), 硬組織についてはさらに、0.5 M EDTA を含む G 緩衝液 (以下これを E 緩衝液とする) 6l で 1 週間、脱灰抽出を行った (E extract)。以上の操作はいずれも 4℃ で行い、緩衝液中には、上記のプロテアーゼインヒビターを加えた。

2. 骨および象牙質プロテオグリカンの精製

1) イオン交換クロマトグラフィー

骨および象牙質の E extract を、YM-10 (分子量 10,000 cut-off, Amicon 社製) を使用し、約 500 倍に濃縮したのち、30,000g、20 分間の遠心分離により上清画分を得、それを 7 M 尿素を含む 0.05 M トリス塩酸 (pH 8.3) に対し透析した。次に同じ緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel (2.5×10 cm) にかけて、0~0.7 M NaCl の直線濃度勾配を用い、全量 500 ml で溶出した。溶出液は、280 nm 吸光度を測定し、5 ml/10 分ごとに分画した。

プロテオグリカン (PG) の確認には、カルバゾール硫酸法^{36~38)}を用い、各画分のウロン酸を測定し、この反応に陽性を示す PG 画分を回収し

た。これを蒸留水に対し透析し、凍結乾燥した。

また、組織特異性の検索のために抽出を行った末萌出歯歯髄、ウシ胎児腱、関節軟骨の G extract も骨および象牙質と同様に DEAE-Sephacel クロマトグラフィーを行い、PG 粗画分とした。

2) ゲル濾過クロマトグラフィー

得られた PG 画分を G 緩衝液で平衡化した Sepharose CL-6B (1.6×100 cm) によりクロマトグラフィーを行った。溶出液は 4 ml/15 分ごとに回収し、同様に透析、凍結乾燥を行った。吸光度の測定は 230 nm で行い、ウロン酸の検出は前と同様に行った。さらに、Sepharose CL-6B による再クロマトグラフィーを行い、このウロン酸のピークを PG の最終精製物として以後の分析に用いた。分子量の標準として、ブルーデキストラン (2,000K 以上), γ -グロブリン (160K), ウシ血清アルブミン (67K), キモトリプシノーゲン (25K) を用いた。なお、精製の各段階で精製度の確認のための電気泳動を行った。

3. 酵素消化

1) コンドロイチナーゼ ABC および AC 消化

PG のグリコサミノグリカン鎖 (GAG 鎖) を除去する目的で行ったコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業社製, Ch-S ase ABC) および AC (Ch-S ase AC) 消化^{39,40)}は、PG 4 mg に対し、基質緩衝液 1.0 ml, Ch-S ase ABC 0.2 単位、または Ch-S ase AC 0.4 単位の割合で混合し、37℃、2 時間インキュベートの条件で行った。基質緩衝液は、前者では 0.05 M 酢酸ナトリウムおよび 0.05 M NaCl を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を、後者では 0.05 M NaCl を含む 0.04 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた。また、消化に際し、溶液中にプロテアーゼインヒビターとして 5 mM PMSF, 10 mM EDTA を添加した。

2) プロナーゼ消化^{40,41)}

PG 2 mg (タンパク質量として約 1 mg) に対し、0.5 N NaOH を添加し、4℃、20 時間、アルカリ分解を行い、その後 1 N 塩酸で中和した。プロナーゼ消化用緩衝液 (50 mM トリス塩酸, 2.5

mM MgCl₂ pH 7.8) を 1 ml 添加し, 100℃, 30 分, 熱変性を行って放冷したのち, ここにタンパク質重量の1/50のプロナーゼ E (科研化学社製) を添加, 37℃で24時間インキュベートした。ついで同量のプロナーゼを添加し, さらに24時間インキュベートを行った。反応に際し少量のトルエンを防腐剤として添加した。糖鎖の分析に使用する試料では30% TCA を 1/3 量加え反応の停止を行い, 4℃で1時間以上放置したのち, 10,000g, 15分遠心して上清を得た。上清は透析後, 凍結乾燥をした。

4. 化学的定量分析

1) コアタンパク質の定量およびアミノ酸分析

PG コアタンパク質の定量は消化前の PG をそのまま用い, Lowry 法^{42,43)}により分析した。

アミノ酸分析は, 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む 6 N 塩酸中で減圧, 封管下 110℃, 24 時間加水分解し, 日立アミノ酸分析計 835 により行った。

2) 糖鎖の分析

ウロン酸は, PG をそのまま用いて蒸留水で適宜希釈し, 上記のカルパズール硫酸法で定量を行った。

シアル酸は 過ヨウ素酸-レゾルシノール法⁴⁴⁾で同様に定量を行った。

ヘキソサミンは試料を 4 N 塩酸中で減圧, 封管下 100℃, 14 時間加水分解した³⁸⁾ものを日立のアミノ酸分析計 835 を用いて分析した。この際, 一定量のグルコサミン, ガラクトサミンの標準品について 4 N 塩酸で同じ条件で処理したものと未処理のものとを分析し, それらの分析値から回収率 (または破壊率) を求め, これを用いて補正を行った。

二糖分析^{45,46)}ではプロナーゼ消化した GAG 鎖を 3. -1) と同様の Ch-S ase ABC 消化を行い, その凍結乾燥物をそのまま分析に用いた。分析には電気泳動装置およびセルロースアセテート膜 Sepraphore III (Gelman Instrument Co. 製) を用い, 0.3 M 酢酸カルシウム pH 6.85, 1.0 mA/cm で 1 時間の泳動条件で行った。なお, 標準品

としてコンドロイチン硫酸 (Ch-S) A, B, C, ヒアルロン酸 (HA) およびケラタン硫酸 (KS) (生化学工業社製) を用いた。

5. SDS 電気泳動

1) 1 次元 SDS 電気泳動

SDS 電気泳動は Laemmli の方法⁴⁷⁾に準じ, トリス塩酸 (ゲル 緩衝液), トリス/グリシン (泳動用緩衝液) の不連続緩衝液系を用いて行った。乾燥した試料を適用する際には 6 M 尿素を含む試料液に溶解し, Ch-S ase ABC 消化後のコアタンパク質を試料とする際には Ch-S ase ABC 消化物に 5 倍濃度の試料液を加えて泳動を行った。分離用ゲルは 4~20% または 7.5~20% で, 濃縮ゲルはおおの2.5, 4% の均一濃度で使用した。また, 分子量マーカーとして electrophoresis calibration kit (Pharmacia) の低分子用を用いた。すなわち, フォスフォリラーゼ b (94K), ウシ血清アルブミン (67K), 卵アルブミン (43K), 炭酸脱水酵素 (30K), 大豆トリプシンインヒビター (20.1K), α -ラクトアルブミン (14.4K) を含むものである。泳動後, クーマシーブリリアントブルー (CBB) で染色し, 脱色後さらにアルシアンブルーによる重染色を行った。

また, 抗体産生細胞のスクリーニング用ブロッキング膜作製のために行った電気泳動では消化物に 5 倍濃度の SDS 緩衝液を添加して試料をスラブの全幅に適用して電気泳動を行った。

2) コアタンパク質の 2 次元電気泳動⁴⁸⁾

PG を 4 mg/ml に基質緩衝液に溶かし Ch-S ase ABC 消化を行ったものを試料として 1 次元目に等電点電気泳動を, 2 次元目に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い, さらに Immuno-blotting による検索を行った。等電点電気泳動は, 内径 2.5 mm × 13 cm のカラムを用いて 5% アクリルアミド, 8.5 M 尿素, 両性担体として Pharmalyte (Pharmacia Co.) を pH 3~10 : pH 4~6 : pH 6~8 = 3 : 1 : 1 の割合で全量に対して 2% 含むゲル (ゲル長 10cm) を作製し, 前述の試料に 8.5 M 尿素, 2% の Pharmalyte (pH 3~10) を添加した試料液を, 象牙質 PG では 40

μl (PG として $215 \mu\text{g}$) 骨の PG では $30 \mu\text{l}$ (PG として $100 \mu\text{g}$) 重層した。ここに、5 M 尿素、2 % Pharmalyte (pH 3 ~ 10) の保護液を $50 \mu\text{l}$ 重層し、上部電極液に 0.02 N 水酸化ナトリウムを、下部電極液に 0.01 N リン酸を用い、ディスク等電点電気泳動装置 (マリソル産業製) で泳動した。また、等電点測定用に内径 5 mm のカラムに試料用ゲルと同様に長さ 10 cm のゲルを作製し、試料液を $40 \mu\text{l}$ 、保護液を $50 \mu\text{l}$ 重層して同様に泳動した。通電は最初の 1 時間半は 150 V で、その後 300 V にして 10 時間、さらに 500 V で 1 時間半を行った。泳動終了後、ゲルを SDS 試料液 (6 M 尿素、10 % グリセロール、1 % SDS、5 % 2-メルカプトエタノール、0.1 % ブロモフェノールブルーを含む 0.01 M トリス塩酸 pH 8.0) で 40°C 、15 分間 2 回平衡化し、あらかじめ作製しておいた SDS ポリアクリルアミドゲル (7.5 ~ 20 % 濃度 勾配ゲル、4 % 濃縮ゲル) の上に 1 % アガロースを溶解した同試料液を重層し、ここに平衡化したゲルを浸漬して上記と同様に SDS 電気泳動を行った。泳動後、CBB 染色を行い、さらに Wray らの方法⁴⁹⁾に準じ、脱色後のゲルに銀染色を施した。また、前述の等電点測定用ゲルは各 5 mm に切断し 1 ml の蒸留水で 4°C 一夜放置し、微小電極を用いて pH を測定した。

6. コアタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製^{50, 51)}

抗原として象牙質 PG の Ch-S ase ABC 消化物を溶液のまま完全アジュバントと懸濁し、1 匹当たり $200 \mu\text{g}$ を BALB/c マウス腹腔に免疫した。1 回目の追加免疫は 2 週目に不完全アジュバントを混ぜて行い、2 回目は消化物をそのまま免疫し、最終免疫とした。最終免疫の 4 日後にあらかじめ培養しておいたマウス骨髄腫細胞 NS-1 株 (細胞数 $2 \sim 10 \times 10^7$) と免疫したマウスより得た脾細胞 (細胞数 $1 \sim 5 \times 10^8$) をポリエチレングリコール法により細胞融合し、96 穴プレート 5 枚に播種し、HAT 培地、5 % CO_2 、95 % 空気の気相下でインキュベートした。ELISA 法および Immunoblotting (後述) でスクリーニングを行い、

陽性を示した細胞を限界希釈法により 2 回クローニングした。最終的に得られたクローンは 75 ml フラスコで大量培養し、1 匹当たり $1 \times 10^7 / 0.5 \text{ ml}$ の細胞をあらかじめ 3 ~ 4 週前にプリスタン 0.5 ml を注射しておいたマウスに注射した。腹水の貯留後、毎日これを採取し、回収した腹水を PBS で 4 倍に希釈し、50 % 飽和硫酸により Ig 画分を回収した。さらに Affi-Gel Protein A (Bio-Rad 社製) で IgG 画分を精製し^{51, 52)}、再度硫酸分画を行って -80°C で保存した。また、得られた抗体についてマウスモノクローナル抗体タイピングキット (Miles Lab.) を用いてイムノグロブリンのタイプを決定した。

7. 免疫化学的方法

1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法⁵¹⁾

抗体産生細胞のスクリーニングにはポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート (Dynatech Lab.) に免疫に用いたのと同じ PG の Ch-S ase ABC 消化物を Voller の緩衝液 (15 mM Na_2CO_3 、35 mM NaHCO_3 、pH 9.2、0.02 % NaN_3) で PG として $16 \mu\text{g/ml}$ となるように希釈し、各ウェルに加え 4°C 、一夜放置したのち、0.5 % Tween 加 PBS で 3 回洗浄した。ここに融合細胞の培養上清を加え、室温で 1 時間反応させたのち、洗浄を行って 2 次抗体を加えた。2 次抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig (A + M + G) ヤギ血清 (Cappel Lab. Inc.) を PBS-Tween で 1,000 倍に希釈し用いた。室温で 1 時間反応後、同様の洗浄を行った。反応基質は o-フェニレンジアミン 10 mg を 1 ml のメタノールに溶かして蒸留水で 100 ml とし、30 % 過酸化水素水を $10 \mu\text{l}$ 添加し、室温で 1 時間反応させた。ついで 8 M 硫酸を各 $25 \mu\text{l}$ 加え、反応を停止させたうえで Titertek Multiskan MC (Flow Lab.) を用い、492 nm で吸光度を測定した。

精製した抗体の抗体価の測定は、抗原および抗体を順次希釈して求めた。すなわち、抗原として PG の Ch-S ase ABC 消化物を PG として初濃度 $128 \mu\text{g/ml}$ とし、さらにこれを最終的に 0.125

$\mu\text{g/ml}$ の濃度まで Voller の緩衝液を用いて倍々希釈を行った。各ウェルには $100\ \mu\text{l}$ の抗原または緩衝液（ブランク）を加えた。また、精製した抗体は初濃度を40倍として最終的に 655, 360 倍になるまで順次、4 倍希釈を行った。

また、抗原決定基の検索のために一定量の PG およびプロナーゼ消化物を抗原として消化前後の反応性の違いを比較した。

組織特異性および種特異性の評価のために用いた試料は SDS 緩衝液で $4\ \text{mg/ml}$ に溶解し、これを原液として Voller の緩衝液を用いて初濃度 $60\ \mu\text{g/ml}$ に希釈し、抗体は100倍からおおの、倍々希釈を行って、同様の実験を行った。

2) Immunoblotting 法

SDS 電気泳動の終了したゲルをニトロセルロース膜およびトランスブロット装置 (Bio Rad 社製) を使用して $25\ \text{mM}$ トリス塩酸, $192\ \text{mM}$ グリシン/ 20% メタノール ($\text{pH}\ 8.3$) の泳動用緩衝液で $30\ \text{V}$, 40 分ブロッティングを行った⁵¹⁾。泳動後、ニトロセルロース膜の両端を $1\ \text{cm}$ 幅に切断しアミドブラック染色をしてトランスブロットされたタンパク質のバンドの確認をした。残りの膜は 2% 血清アルブミン (BSA) を含む PBS $20\ \text{ml}$ を加え、室温で1時間振盪させながらブロッキングを行った。その後、PBS で3分間3回洗浄を行って濾紙に挟んで乾燥したのち、使用時に幅 $7\ \text{mm}$ の短冊状に切断して用いた。すなわち、ELISA 法で陽性と検知した抗体産生細胞を24穴プレートに移し、培養後その上清を上記の短冊状のブロッティング膜と室温で1時間反応させ、PBS で同様の洗浄を行った。その後、2次抗体として抗マウス Ig (A+M+G) ヤギ血清を $1,000$ 倍希釈となるように PBS に添加し、室温で1時間振盪させながら反応させた。ついで、反応基質として $30\ \text{mg}$ の 4-chloro-1-naphthol (Sigma Co.) を $10\ \text{ml}$ のメタノールに溶解し、PBS を加えて全量を $50\ \text{ml}$ としたのち、 $30\ \mu\text{l}$ の H_2O_2 を添加した。室温で20分間反応後、水洗し乾燥した。

PG 画分および各種軟組織の DEAE-PG 粗画分

の SDS 電気泳動後の Immunoblotting には、陽イオン化ナイロン膜である Zeta-Probe blotting membrane (Bio-Rad) を使用した。すなわち、泳動の終了したゲルをブロッティング用緩衝液 ($25\ \text{mM}$ トリス塩酸, $192\ \text{mM}$ グリシン $\text{pH}\ 8.3$) $200\ \text{ml}$ に対し、室温で30分間振盪してゲルを平衡化し、さらに Zeta-Probe blotting membrane も同緩衝液 $50\ \text{ml}$ で平衡化した。泳動は、同様にゲルを陰極側において前述の緩衝液で $15\ \text{V}$, 15 時間行った。泳動終了後、 2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS-Tween 溶液 $15\ \text{ml}$ を加えて真空バックをし、 50°C で10時間ブロッキングを行い、ここにモノクローナル抗体を $3,000$ 倍に加えて室温で1時間反応させた。その後、PBS-Tween で3分間3回洗浄し、2次抗体を加えた。以後の反応は上記と同様である。

III. 結 果

1. 骨および象牙質 PG の抽出および精製

PG の抽出方法および精製過程における収量を図1に示す。G extract では骨および象牙質湿重量の 0.24% 、E extract では 0.95% であった。その後の DEAE-Sephacel クロマトグラフィーによって回収された PG 画分は、E extract の約 8% であった。続く Sepharose CL-6B クロマトグラフィーでは、E extract の約 4% になり、最終的に E extract の約 2.5% の PG が得られた。仔ウシ骨と未萌出歯象牙質粉末ではほぼ同様の結果

図1 骨および象牙質プロテオグリカン (PG) の抽出および精製方法。( ) 内の数値は抽出および精製物の原料粉末の湿重量に対する重量%を示す

が得られた。比較のために用いたウシ胎児骨では仔ウシ骨に比べ、G extract 中に抽出される有機質の量が若干多かった。

2. 各種クロマトグラフィーの結果

1) イオン交換クロマトグラフィー

仔ウシ骨、未萌出歯象牙質の G extract の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ両者ともに NaCl 濃度 0.4~0.5M 濃度の位置にごくわずかなウロン酸のピークを認めたが、PG 画分のほとんどが E extract 中に検出されたため、以後の検索は E extract の PG について行った。また、DEAE-Sephacel の各ピークの SDS 電気泳動の結果から、G extract の主成分はコラーゲンおよび血清アルブミンなどから成ると考えられた。

図 2 に (a) 仔ウシ骨、(b) 未萌出歯象牙質の E extract の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示す。NaCl 濃度 0.4~0.5M の位置にウロン酸のピークを認めた。これは骨および象牙質 E extract においてはほぼ同様であった。また、各ピークの SDS 電気泳動の結果および溶出位置から、仔ウシ骨ではピーク 1 は主としてコラーゲン、ピーク 2 は血清アルブミン、ピーク 4 はオステオネクチン、ピーク 5 は

α_2 HS 糖タンパク質、ピーク 7 は PG を主成分とするものと推定された。オステオカルシンはピーク 4 およびピーク 5 にかけて溶出するものと考えられた。また、象牙質ではピーク 1, 2, 3 は骨と同様で、ピーク 4 は分子量 50K 付近のタンパク質、ピーク 5 は α_2 HS 糖タンパク質、ピーク 6 ではリンタンパク質、ピーク 7 は PG が、それぞれ主成分と推定され、オステオカルシンは骨と同様であった。ピーク 6 のリンタンパク質については、さらにリンの定量を行って、フォスフォリンであることを確認した。

さらに、比較のために行ったウシ胎児骨、仔ウシ萌出歯象牙質の E extract のクロマトグラフィーの結果を図 3 に示す。ウシ胎児骨では分子量 67K 付近の血清アルブミンを主成分としたピーク 2、オステオネクチンを多く含むピーク 4 が相対的に多く、また、ピーク 5, 6 に変化が認められた。ピーク 6 はシアルタンパク質を含むと推定された。PG 画分 7 も仔ウシ骨に比べ若干多かった。萌出歯は未萌出歯に比べピーク 4, 5 の α_2 HS 糖タンパク質およびオステオネクチンを含むピークが多く、また、リンタンパク質の溶出パターンに差違が認められた。

2) ゲル濾過クロマトグラフィー

図 2 (a) 仔ウシ骨、(b) 未萌出歯象牙質の E extract の DEAE-Sephacel のクロマトグラム。—— は 280 nm の吸収、----- はウロン酸、----- は NaCl の濃度勾配を示す

図 3 (a) ウシ胎児骨、(b) 仔ウシ萌出歯象牙質の E extract の DEAE-Sephacel クロマトグラム。—— は 280 nm の吸収、----- はウロン酸、----- は NaCl の濃度勾配を示す

図4 (a) 仔ウン骨, (b) 未萌出歯象牙質 PG 画分の Sepharose CL-6B 再クロマトグラム。—— は 230 nm の吸収, ---- は ウロン酸

図4に骨および象牙質の DEAE-Sephacel のピーク7 (PG 画分) を2回の Sepharose CL-6B クロマトグラフィーで精製し得られた PG の溶出パターンを示す。骨, 象牙質のいずれの場合も $K_{av}=0.31\pm0.02$ で溶出するピークを認めた。これを分子量マーカーの溶出位置から算出すると分子量約70~120K であることが推定された。

なお, 1回目のクロマトグラフィーでは骨ではウロン酸のピークと230 nm の吸収ピークがほぼ一致して $K_{av}=0.31\pm0.02$ で溶出したのに対し, 象牙質では230 nm の吸収ピークがやや低分子より, ウロン酸のピークはそれよりも若干低分子側に認められた。これを高分子側と低分子側に分けて PG および Ch-S ase ABC 消化物として SDS 電気泳動を行ったところ, 低分子側には遊離の糖鎖および分解物と考えられる低分子のタンパク質が検出された。したがって, 1回目の Sepharose CL-6B クロマトグラフィーにおける象牙質の PG 画分の回収は溶出ピークの高分子側を中心に行い, 再クロマトグラフィーによって上記の位置に溶出するピークが得られた。ウロン酸の溶出パターンは低分子側に若干の肩を有していた。

図5 (a) 仔ウン骨, (b) 未萌出歯象牙質 PG の糖鎖の Sepharose CL-6B クロマトグラム。—— フロナーゼ消化前の PG の230 nm 吸収, ---- 消化後のウロン酸を示す

精製した骨および象牙質 PG をプロナーゼ消化し, 糖鎖 (GAG) を Sepharose CL-6B クロマトグラフィーに適用した際の溶出パターンを図5に示す。GAG 鎖のピークは骨では $K_{av} 0.45$ 付近に単一のピークとして溶出されるのに対し, 象牙質では $K_{av} 0.52$ を中心とし, 若干低分子側に肩を有するピークとして溶出された。

3. 精製した骨および象牙質 PG の分析

1) 1次元 SDS 電気泳動

骨および象牙質の精製した PG および Ch-S ase ABC 消化後のコアタンパク質の7.5~20%濃度勾配ゲルによる SDS 電気泳動像を図6に示す。電気泳動的にみて骨の PG では60~120K にアルシアンブルー染色性の広範囲の分布を認めたが, 比較のために泳動した胎児骨の PG では図には示さなかったが, さらに高分子側に前の画分とは重ならないもう1つの画分を認めた。これに対し象牙質の PG は同程度, もしくは若干低分子側にアルシアンブルー染色性の単一の画分を認めた。分布範囲は骨のものに比べ, 低分子側にも検出され, 40K くらいにまで及んだ。これは萌出歯の PG ではさらに低分子側にまで及び, 泳動の前線にまで及んでいた。

図6 骨および象牙質のPGおよびコンドロイチナーゼ消化物のSDS電気泳動像。PG, Coreはおのの, プロテオグリカン, コアタンパク質を示す

コアタンパク質はCh-S ase ABC消化後に沈澱を行って回収しようと試みたが、骨のものでは沈澱が得られたのに対し、象牙質ではほとんどのものが上清画分に存在した。そこでコアタンパク質のタンパク質量を精確に知る目的で消化物をそのまま電気泳動、Immunoblotting, ELISAなどに用いることとした。

電気泳動の結果、コアタンパク質は骨では40, 45Kに顕著なバンドを、さらに量的には少ないが35Kにもバンドを認めた。他に20K付近にもバンドが認められた。象牙質では全体にバンドが不鮮明で、また、タンパク質として骨のそれと等量を泳動しても骨ほど明瞭なバンドは得られなかった。Ch-S ase ABC消化後に得られたバンドは約90, 70, 40, 28, 20K付近に認められ、骨のコアタンパク質とは異なり、多様な像を示した。また、骨、象牙質ともに分子量95, 80, 65Kにコンドロイチナーゼに由来する細い明瞭なバンドを認めた。

2) PGの成分分析

表1に骨および象牙質のPGの最終精製物のタ

表1 骨および象牙質PGの組成。数値はPG当たりの重量%を示す

	Bone PG	Dentin PG
Hexuronic acid	27.2	28.0
Galactosamine	15.9	18.8
Glucosamine	1.2	2.3
Sialic acid	2.1	2.6
Protein	49.3	47.5

(% by weight)

図7 セルロースアセテート膜電気泳動法による骨および象牙質PGの二糖分析。KS, CS-A, CS-BおよびCS-Cはおのの, 標準品として用いたケラタン硫酸, コンドロイチン硫酸A, BおよびCを, また, B, Dは骨, 象牙質を示す

ンパク質および糖分析の結果を示す。骨および象牙質のPGはいずれも約半分のタンパク質を含み、残りはGAG鎖の成分であるヘキスロン酸とヘキソサミンがほぼ等モルずつ占めていた。骨および象牙質での差はほとんど認められなかった。ヘキソサミンは、骨および象牙質ともにガラクトサミンが多く、ガラクトサミン/グルコサミン比は約10~14であった。また、両者ともに2.5%程度のシアル酸を含んでいた。

3) PGのGAG鎖の二糖分析

精製したPGをプロナーゼ消化し、GAG鎖をさらにCh-S ase ABCで消化し二糖分析を行った結果を図7に示す。骨ではコンドロイチン硫酸A(Ch-S Aまたはコンドロイチン4硫酸Ch-4-S)

を主成分とし、わずかにコンドロイチン硫酸 B (Ch-S B またはデルマタン硫酸 DS) を認めたのに対し、象牙質では Ch-SA のみからなり、他の成分に由来する二糖を認めなかった。また、骨、象牙質ともに原点にはアルシアンブルー染色性のバンドを認めなかった。

4) PG のアミノ酸組成

表 2 に骨および象牙質 PG のアミノ酸組成を示す。骨ではアスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンが多く、セリン、プロリンがほぼ等量であるのに対し、象牙質ではアスパラギン酸が多く、ついで、グルタミン酸、グリシン、セリンがほぼ等量存在し、ロイシンは少なかった。

4. 骨および象牙質 PG コアタンパク質とモノクローナル抗体との反応性

1) ELISA 法による抗体との反応性

モノクローナル抗体の作製のために、象牙質 PG の Ch-S ase ABC 消化物を 2 匹の BALB/c マウスに免疫し 2 回の細胞融合を行ったが最終的

表 2 骨および象牙質の PG のアミノ酸組成。数値は 1,000 残基当たりの残基数を示す。(1) および (3) は本実験の結果、(2) および (4) は Fisher³¹⁾, Jontell⁶⁰⁾の結果を示す

	Bone		Dentin	
	(1)	(2)	(3)	(4)
ASP	111	123	196	193
THR	49	44	39	39
SER	80	71	121	140
GLU	126	96	170	156
PRO	74	75	50	37
GLY	92	92	156	154
ALA	54	51	43	47
VAL	67	61	46	42
MET	10	8	11	2
ILE	44	53	34	29
LEU	104	131	31	37
TYR	27	30	7	10
PHE	32	33	11	10
LYS	55	57	39	54
HIS	27	28	21	20
ARG	46	49	25	24

図 8 象牙質コアタンパク質に対するモノクローナル抗体 (DPG-2 抗体) の骨および象牙質 PG コアタンパク質に対する反応性 (ELISA 法による) 抗体は 3,000 倍希釈で使用した

に ELISA 法および Immunoblotting 法で両者ともに陽性であったものは 2 クローン得られた。それらのイムノグロブリンのタイプおよびサブタイプはともに IgG₁ であった。また、これらのクローンをマウス腹腔に注射し、その腹水を精製して得た抗体のうちの 1 つ (DPG-2 抗体と名付けたもの) を 3,000 倍に希釈して使用したときの抗原抗体反応曲線を図 8 に示す。精製した抗体は骨および象牙質 PG の Ch-S ase ABC 消化物に反応し、抗原抗体反応の 1/2 最大値は抗体を約 2 万倍に希釈した時に得られた。また、抗原と抗体との反応は抗原の濃度が 64 μg/ml 以上である場合は有意差を生じないが、それ以下の濃度では骨の PG コアタンパク質の方が象牙質の PG コアタンパク質に比べて約 3～4 倍の反応性を示した。この違いは抗原が低濃度であるほど顕著であった。

さらに、PG のプロナーゼ消化を行って消化しないままの PG と消化後のものを比較したところ消化しないものでは強い反応性を示したのに対し、消化したものでは全く反応しなかった。

2) 1 次元 SDS 電気泳動および Immunoblotting

DPG-2 抗体と骨および象牙質の PG, PG コアタンパク質との Immunoblotting の結果を図 9 に示す。骨および象牙質の PG の分布に一致して抗体と反応する広範囲な陽性の像を示した。コア

図9 骨および象牙質 PG およびコンドロイチナーゼ消化物の SDS 電気泳動後の Immunoblotting. PG, Core はおのおの, プロテオグリカン, コアタンパク質を示す

タンパク質は骨については40Kのバンドが強く反応し、35Kのものがこれに次いでいた。また20Kのバンドも弱い陽性反応を示した。量的には40Kのものに次いでいた45Kのものでは反応を認めなかった。一方、象牙質では45K以上の高分子では反応は認められず、40Kおよびそれ以下の数本のバンドはいずれも陽性であった。さらに象牙質のものでは量的には骨のものの約2倍適用しているにもかかわらず、反応性は骨のものより弱かった。また、骨および象牙質のコアタンパク質についてはいずれの場合も糖鎖の不完全消化物と思われる、50~70K付近のやや幅広い不明瞭な陽性像を認めた。

3) コアタンパク質の2次元電気泳動および Immunoblotting

Ch-S ase ABC 消化物を等電点/SDS 電気泳動の2次元電気泳動にかけ、DPG-2抗体により Immunoblotting したものを図10に示す。骨のコアタンパク質では分子量45, 40, 35K, pI 8.0~

7.0に3本の数珠状に連なるスポットを認め、40, 35Kの2本だけが抗原抗体反応陽性であった。象牙質では分子量範囲が90~14.5K, pI 7.4~6.4に及ぶ複数のスポットを認めたが抗体と反応したのは40Kおよびそれ以下の塩基性側のスポットであった。

4) 各種軟組織の SDS 電気泳動と Immunoblotting

未萌出歯髄、関節軟骨、腱の G extract の DEAE-Sephacel クロマトグラフィーでは骨および象牙質と同様に NaCl 濃度0.4~0.5Mの位置にウロン酸のピークが認められた。得られた各種軟組織の DEAE-PG 粗画分およびその Ch-S ase ABC 消化物を4~20% SDS 電気泳動にかけ、さらに DPG-2 抗体による Immunoblotting を行った結果を図11に示す。その結果、SDS 電気泳動に関しては軟骨では軟骨型の巨大な PG がゲル内に入らずゲル上部に留まり、低分子型のは胎児骨の PG に類似した200K付近および60~120Kの2つの群からなることが示された。腱でも PG は少量の巨大型のものと2群の低分子型のものが認められたが、2群のうち量的には低分子側のものが多かった。歯髄でも2群の分布が認められ量的には高分子側のものが多かった。Ch-S ase ABC 消化物に関しては軟骨ではコアタンパク質は40~45Kにほぼ重なる2本のバンドとして観察された。腱でも軟骨のものに類似したバンドが認められた。歯髄では90, 40Kにバンドが認められた。さらに、Immunoblotting の結果、軟骨では2群の PG がともに反応したが腱では高分子側、歯髄では低分子側のものだけが反応した。また、コアタンパク質に関しては軟骨、腱では40Kのバンドのみが反応し、45Kのものは反応しなかった。歯髄では40Kのものに反応が認められた。また、コアタンパク質の Immunoblotting では Ch-S ase ABC 未消化物と思われる陽性像が50~70K付近に幅広く認められた。

5. ELISA 法による種特異性の検索

ウシ、ヒト、ラットおよびマウスの骨の G extract, E extract を用いて ELISA 法によっ

図10 (a, c) 骨および (b, d) 象牙質 PG のコンドロイチナーゼ消化物の2次元電気泳動像 (a, b) および DPG-2 抗体に対する Immunoblotting (c, d)。電気泳動は1次元目に等電点, 2次元目に SDS 電気泳動を行った

てウシ象牙質 PG コアタンパク質に対する抗体 (DPG-2 抗体) との反応性をみた結果, ウシ, ヒトの G extract では反応は不明確であったが, E extract では明らかに反応が認められた。しかしながら, ラットおよびマウスでは G, E extract のいずれにおいても反応は不明確であった。

IV. 考 察

1. 試料の調製および抽出について

Termine ら²⁴⁾の連続抽出法で骨や象牙質から抽出される成分は主として非コラーゲン性有機質および可溶性コラーゲンからなると考えられる

が, そのうち G extract では細胞成分, 基質に吸着した成分の他に非石灰化組織, すなわち, 骨様基質 (osteoid) 象牙前質 (predentin) からの基質成分が, E extract では主としてヒドロキシアパタイトと親和性の有る成分が抽出され则认为される。本実験での骨および象牙質の G extract, E extract の総量は原料の湿重量の約 1.2% であった。この値は非コラーゲン性有機質の割合が原料の乾燥重量の約 2~2.5% であること^{25,53~56)}を考えると, 若干低い値を示している。これは, (1) 原料に由来する水分量の影響, (2) 脱灰の不充分, (3) 超音波による洗浄で G extract で抽出さ

図11 DPG-2 抗体を用いた組織特異性の検索。ウシ各種軟組織の DEAE-PG 粗画分およびコンドロイチナーゼ ABC 消化物の (a) SDS 電気泳動と (b) その Immunoblotting。PG はプロテオグリカン, C. はコアタンパク質を示す。Cartl., Tendon および D. Pulp はおのおの, ウシ胎児膝関節軟骨, 腱および仔ウシ未萌出歯歯髄を示す

れる成分が減少したこと, などが考えられる。また, G extract と E extract の成分量の割合は約 1 : 4 であったが, これは Termine ら⁵⁷⁾のウシ胎児骨で行った結果 (G extract/E extract = 1 : 2) に比べ G extract の割合が小さい。これは本実験で用いた仔ウシ骨, 未萌出歯象牙質が Termine らの材料に比べ石灰化が進んでいることが原因と考えられる。このことは筆者もウシ胎児骨を用いた実験で G extract 量が多いことを確

認している。

2. 各種クロマトグラフィーによる精製について

骨および象牙質の E extract を DEAE-Sephacel にかけた時の溶出パターンは他の研究者の報告^{25, 28, 35, 58~64)}にほぼ一致している。PG の溶出に関しても DEAE-カラムの種類, 緩衝液の pH などの条件による差はあるものの相応の結果が得られた。ウロン酸のピークは 280 nm の吸収ピークより若干イオン強度の高い酸性側で溶出しているが, この理由として, (1)他の酸性タンパク質の混入, (2) PG の糖鎖の遊離または, (3)コアタンパク質の分解による相対的なタンパク質量の減少, などが考えられる。また, E extract から実際に得られた PG 画分の重量は E extract の約 8.5 % であったが, これはウロン酸の測定値から算出される値よりやや高い値であった。これは他のタンパク質による影響と考えられた。また, Jones ら⁶⁵⁾はヒト歯根象牙質基質をコラーゲナーゼ消化してヘキササミン量を測定し, グリコサミノグリカンが基質の約 4 % 存在すると報告している。

続く Sepharose CL-6B のゲル濾過クロマトグラフィーでは骨の PG ではウロン酸のピークと 230 nm の吸収が一致していたのに対し, 象牙質では低分子側にピークがずれ, ピークの低分子側のものは遊離の糖鎖およびタンパク質の分解物を含んでいた。このことは上記の DEAE-Sephacel でのウロン酸と 280 nm の吸収ピークのずれを説明すると思われる。試料の調製, 抽出の各段階でプロテアーゼインヒビターを添加し, 4℃で操作を行っていること, また, 骨ではこのような分解が認められないことから象牙質 PG は生体内でのプロテアーゼ活性が高く, 一部分解が生じているものと推定される。また, 添加したプロテアーゼインヒビターでは抑制されない酵素群による分解の可能性も考えられる。以上のことに留意して象牙質の PG 画分の回収はピークの高分子側を中心に行ったが, これの再クロマトグラフィーでは骨, 象牙質ともに $K_{av} 0.31 \pm 0.02$, 分子量 70 ~ 120 K に溶出するピークが得られた。一方,

骨の PG の分子量に関して Fisher ら³¹⁾は分子量 80~120K, Franzén ら⁶³⁾は74,600, Sato ら⁶⁶⁾は70~120Kと報告している。また, 象牙質では Rahemtulla ら³⁵⁾が70~120Kと報告しており, 本実験の結果はほぼこれに一致している。なお, Sepharose CL-6B 再クロマトグラフィーの溶出パターンで230 nm の吸収曲線はほぼ単一のピークを示すのに対し, ウロン酸のピークは骨, 象牙質ともにやや低分子よりに肩のある溶出パターンを示していたが, この理由は不明である。

糖鎖の Sepharose CL-6B クロマトグラフィーで骨のものは Kav 0.45, 分子量約45Kと推定される位置に溶出していたが, Fisher ら³¹⁾は約40K, Prince ら⁶⁷⁾, Sato ら⁶⁶⁾は同じ Sepharose CL-6B を用いて Kav 0.50 に溶出すると報告している。また, 象牙質のものでは若干小さめの Kav 0.52, 分子量40K にピークが得られたが, これは低分子側に明らかな肩を有していた。この肩は分子量20~25K に位置し, ほぼ軟骨型 PG モノマーの糖鎖に匹敵するものと考えられる⁴⁾。したがって, 象牙質では糖鎖の大きさの異なる PG が存在する可能性も考えられる。

3. 骨および象牙質 PG の組成について

精製した骨および象牙質 PG の組成は重量%で約半分のタンパク質, 27%のウロン酸, 18~20%のヘキソサミンおよび2.5%のシアル酸を含んでいた。また, ガラクトサミン/グルコサミン比は約10~14:1であった。ヘキソサミンを N-アセチル硫酸化ヘキソサミンとして計算すると GAG 鎖として56~60%含まれることになる。比較のために骨および象牙質 PG を低分子型 PG として分析した他の研究者達の報告をあげてみると, 骨では Fisher ら³¹⁾のタンパク質19.8%, ヘキソサミン18% (うちガラクトサミン17.3%), シアル酸1.2%, Franzén ら⁶³⁾はタンパク質39.9%, ウロン酸10%, ヘキソサミン13.9% (グルコサミン/ガラクトサミン=0.15), シアル酸0.8%, また, Sato ら⁶⁶⁾はタンパク質40.3%, ウロン酸21.2%, ヘキソサミン25.3% (うち, ガラクトサミン23.1%), シアル酸5.1%と報告している。また, 象牙

質については唯一, Rahemtulla³⁵⁾らの報告があるのみでタンパク質 19.0%, ウロン酸 18.2%, ヘキソサミン 25.5% (うち, ガラクトサミン 20.5%) であった。これらを本実験の結果と比較してみると, 骨では Franzén ら, Sato らの結果にかなり近いものであるが, タンパク質量については Fisher らの報告と異なる。この違いは材料とした骨が Fisher らの場合は胎児骨で, Franzén, Sato らはおのおの生後2年, および成牛を用いているためと思われる。Fisher ら³²⁾によれば, 同じ大きさのコアタンパク質に糖鎖が2本ついた型の PG の占める割合が骨の成長により減少するといわれるので, そのためであろうと推定される。象牙質については Rahemtulla らは PG の大きさが70~120K, 糖鎖は軟骨型のものより大きいものであると報告しているが, タンパク質部分については特に記載がない。

さらに, 糖鎖の組成に関しても象牙質では上記のもの以外に Linde ら²⁸⁾はガラクトサミン/グルコサミン比が10:1, Jontell ら⁶⁰⁾は19:1と報告している。また, 二糖分析の結果, 象牙質ではコンドロイチン硫酸Aのみ, 骨ではそれ以外にわずかのコンドロイチン硫酸Bを認めたが, これに関しても数多くの報告があり, いずれも糖鎖の構成の大部分がコンドロイチン硫酸Aである点では一致しているものの微量成分に関しては報告によりさまざまである。そのうち, その他の糖鎖の中でコンドロイチン硫酸Cは量的に最も多いと考えられるが, 象牙質では象牙前質にのみ存在するといわれており^{25,26,35,68~72)}, また, 骨でも5~10%程度の存在が報告されている^{61,62,71~74)}。さらに, デルマトン硫酸^{32,67,69,75)}, ヘパラン硫酸^{70,73~75)}, ケラタン硫酸^{69,71)}, ヒアルロン酸^{69,70)}, などに由来する二糖も報告されている。本実験の範囲では PG を Ch-S ase ABC で消化後, 電気泳動, アルシアンブルー染色を施した結果, 原点に残る未消化物を認めなかった。

4. 骨および象牙質 PG のアミノ酸組成について

アミノ酸分析の結果は骨と象牙質でかなりの違いが認められた。骨ではロイシンが多いのが特

徴的で、グルタミン酸、アスパラギン酸のような酸性アミノ酸がこれに次いでいた。セリンは1,000残基当たり70~80残基存在していた。これはHerring¹⁾の先駆的な報告が象牙質のものに類似であったのを除けば、本実験の結果は最近報告のあったものにほぼ一致したものであった^{31,32,61,62,66,77,78)}。一方、象牙質PGのアミノ酸組成はアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンなどの酸性アミノ酸がいずれも150残基以上存在し、セリンがこれに次いでいた。ロイシンは40残基以下で骨のものと明らかな違いが認められた。この分析結果は多少の差異はあるものの他の報告^{25,26,28,35,60,79,80)}に類似している。このうち、比較的初期の報告^{25,79)}ではセリンが150残基を越えているが、これはフォスフォフォリンの混入による影響が考えられる。また、Smith²⁶⁾, Smalley⁸⁰⁾の報告ではアスパラギン酸が115残基とやや低めであるが、最近報告されたJontell⁶⁰⁾, Rahemtulla³⁵⁾などは本実験の結果によく一致している。さらに、骨および象牙質PGのアミノ酸組成を他の軟組織のPGと比較してみると、骨のPGは軟骨⁷⁸⁾, 腱^{61,81)}, 角膜⁸²⁾, 強膜⁷⁷⁾, 皮膚^{83~85)}, 細胞膜周囲⁸⁶⁾, 歯根膜^{83,87)}に存在する低分子型PGのアミノ酸組成にかなり類似しており、中でも皮膚、腱、強膜、歯根膜のものと酷似している。また、基底膜のPG^{88,89)}ではアスパラギン酸、ロイシンが若干少なく、グルタミン酸が多めであることを除けば、これも類似性が認められる。一方、象牙質PGによく類似しているものとしてごく最近報告されたもの⁸⁷⁾に歯髄PGがあげられる。象牙質PGはグルタミン酸、グリシン、セリンが多い点では軟骨型のもの^{3,4,77,78)}に近いが、アスパラギン酸が多く、プロリン、ロイシンが少ない点でこれらとは異なる。したがって、骨のPGが主として結合組織にみられる低分子型のPGとかなりの類似性を示すのに対し、象牙質PGでは唯一、歯髄PGとの類似が認められただけであった。また、アスパラギン酸、セリン残基が多いことの理由として象牙質に特有のフォスフォフォリンの混入が考えられたため、精製し

たPGをさらにセシウムクロリド(CsCl)の密度勾配遠心、セチルピリジニウムクロリド(CPC)沈澱などを試みたが、この処理後のアミノ酸分析結果もほぼ同様であり、また、リンの定量結果ではわずかなリンの存在が認められた。したがって、フォスフォフォリンがなお除去できていないか、または軟骨、皮膚のPGで報告^{90,91)}されているようなPG自身のリン酸化の可能性も考えられる。

5. 骨および象牙質のPGおよびコアタンパク質のSDS電気泳動/Immunoblottingについて

精製したPGのSDS電気泳動像はSato⁶⁶⁾の報告に一致している。しかしながら、Fisher³¹⁾のいうような2本鎖型のPGはごくわずかに認めたものの彼らの報告ほど明瞭なバンドを示していなかった。それは本実験で用いた仔ウシ骨が胎児骨に比べ加齢によりPG組成の変化をきたし、2本鎖型が減少したためと思われる。象牙質のものについては今回の筆者の報告が初めてであるが、ほぼ骨のものと同様の結果が得られた。次に、PGのImmunoblottingに関しては従来、ニトロセルロース膜ではCh-Sase消化をせずにそのままの状態ではPGを検出することはできなかったが、今回筆者はZeta-Probe membraneを用いたことにより、PGと抗体との反応を検出することができた。骨ではPGの分布に一致して反応が認められ、Fisherのいう1本鎖、2本鎖のコアタンパク質は分子量が同じで起源の異なるものという報告に対し、本実験の結果からは少なくとも共通の抗原決定基を有するものであることが結論づけられる。また、象牙質ではやや反応が弱いもののほぼ同様の結果が得られた。

コアタンパク質に関してはSDS電気泳動の結果、骨ではFisher^{31,32)}, Franzén^{62,63)}と同様の結果が得られた。象牙質では分子量90, 70, 40Kおよびそれ以下の低分子側にCBB染色性のあまり良くない複数のバンドが認められた。骨・象牙質ともに分子量95, 80, 65Kにコンドロイチナーゼに由来するバンドが認められたが、それは象牙質のコアタンパク質の不明瞭なバンドに重な

って明瞭な細いバンドとして判別可能であった。また、コンドロイチナーゼ ABC および AC 消化による泳動像の変化は認められなかったため、90, 70K のバンドは象牙質 PG のコアタンパク質固有のものと考えられる。なお、象牙質のコアタンパク質の染色性があまり良くないことの原因の 1 つに象牙質 PG が酸性アミノ酸を多く含むということが考えられるが、コアタンパク質が TCA 沈澱ではほとんど回収されず、上清に存在したことの原因については不明である。

これらの Immunoblotting の結果、骨および象牙質の 40K および 35K のコアタンパク質が反応陽性であった。また、象牙質ではそれ以下の低分子側のものも反応した。したがって、骨および象牙質のコアタンパク質には共通の抗原性を有するものが存在すると考えられる。また、象牙質の低分子側で反応を示したものは 40K コアタンパク質の分解物または同じ抗原決定基を有するペプチドと考えられる。一方、象牙質コアタンパク質のうち 90, 70K のものは反応を示さず、抗原性の異なるものと考えられる。Immunoblotting, ELISA 法によると象牙質 PG コアタンパク質に対するモノクローナル抗体 (DPG-2 抗体) を用いたにもかかわらず、象牙質コアタンパク質は骨のものの 3 分の 1 以下の反応しか認められなかった。これは象牙質 PG コンドロイチナーゼ消化物中に 40K のコアタンパク質の占める割合が小さいためと思われる。

1 次元で得られた結果をさらに 2 次元電気泳動で得られた結果と比較し、詳細に検討すると象牙質 PG コアタンパク質は 70K 付近のもの、40K 付近のものがさらに酸性側と塩基性側に分かれ、DPG-2 抗体と反応したのは塩基性側の 40K およびそれ以下の低分子側のものであった。DPG-2 抗体と反応したものは骨の 40K のものと抗原性が共通と考えられるが、40K 付近のものでも酸性側のもの、および 90, 70K のものは抗原性を異にすると考えられる。また、骨の 45, 40, 35K のバンドが数珠状に連なったスポットとして認められたのは、シアル酸などの修飾の違いによるものと考え

えられる。また、Fisher ら^{31, 32)}は骨のコアタンパク質のうち本実験の 45, 40K に該当するものをコアタンパク質へのオリゴ糖の付き方の違いによるものと考察している。事実、オリゴ糖の付き方によってコアタンパク質の電気泳動的な挙動が異なることが知られている⁹²⁾。しかしながら、本実験の結果からは 45, 40K コアタンパク質の抗原性の違いが明らかとなり、コアタンパク質の合成レベルでの違いの可能性も考えられる。

6. 各種軟組織の PG コアタンパク質との比較

各種軟組織の低分子型 PG のコアタンパク質は分子量的には骨のものとほぼ同じくらいの大きさのものであった。これは Heinegård ら^{77, 78)}, Vogel ら⁸¹⁾の結果にはほぼ一致する。しかしながら、歯髄 PG に関しては Pearson ら⁸⁷⁾は分子量 55K と報告しており、本実験の結果とは異なる。また、抗原性について骨および象牙質のコアタンパク質と比較してみると PG のうち軟骨型の巨大なものとは抗原性を異にすると考えられる。これは Heinegård ら^{63, 77)}の報告に一致する。また、DPG-2 抗体の認識する抗原決定基は骨、象牙質のみならず、他の軟組織の低分子型 PG のコアタンパク質にも存在することが明らかとなった。このことは Heinegård ら⁷⁷⁾のホリクローナル抗体を用いた検索で低分子型 PG のうち、軟骨、骨、腱、強膜は交叉反応性のある分子であるという報告に一致している。さらに本実験で得られた興味ある知見として骨のコアタンパク質には DPG-2 抗体と反応しないものも存在したことがあげられる。これと同様のことは軟骨、腱のコアタンパク質でも観察された。

7. 種特異性の検索について

種特異性に関しては、今回作製したウシ象牙質 PG コアタンパク質に対するモノクローナル抗体との反応性で調べたところ、ラット、マウスの骨の抽出物については明瞭な結果が得られなかったが、ヒトの骨の抽出物では交叉反応性を有することが明らかとなった。したがって、今後骨および象牙質を形成する細胞の分化などの研究を行う際、この抗体をヒトにまで広げて応用することが

可能であると考えられる。

V. 結 論

1. 骨および象牙質の EDTA/塩酸 グアニジン抽出物中から分子量 70~120K の低分子型 PG を精製した。

2. 精製した PG はほぼ等量のタンパク質と糖鎖より成り、アミノ酸組成は骨のものでは他の結合組織の低分子型 PG に類似していたが、象牙質では歯髄の PG との類似性を認めた。

3. ウシ象牙質のコアタンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を作製した。

4. 骨および象牙質 PG のコアタンパク質には共通の抗原性を有する分子量 40K のものが認められた。象牙質では 40K のものは骨の約 1/4 量を占め、それ以外に 90, 70K のコアタンパク質も認められた。

5. 骨の PG はこれまでに報告されていた 1 本鎖型, 2 本鎖型のものはいずれも共通の抗原性を有するものであった。

6. 関節軟骨, 腱, 歯髄の低分子型 PG には骨および象牙質 PG のコアタンパク質と共通の抗原性を有するものが存在した。

7. ウシ象牙質 PG のコアタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた検索でヒト骨脱灰抽出物との間に交叉反応性を認めた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました佐々木哲教授に深甚なる謝意を表します。また、終始ご教示、ご校閲を賜った下川仁弥太助教授に心より感謝致しますとともに、ご助言、ご協力を頂いた生化学教室の皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Herring, G. M. : The Chemical Structure of Tendon, Cartilage, Dentin and Bone Matrix. Clin. Orthop. 60 : 261-299, 1968.
- 2) Lindahl, U. and Hook, M. : Glycosaminoglycans and Their Binding to Biological Macromolecules. Ann. Rev. Biochem. 47 : 385-417, 1978.

- 3) Hascall, V. C. and Hascall, G. K. : Proteoglycans. In : Hay, E. D., ed. : Cell Biology of Extracellular Matrix, New York, 1981, Plenum Press, 39-63.
- 4) Heinegård, D. and Paulsson, M. : Structure and Metabolism of Proteoglycans. In : Piez, K. A. and Reddi, A. H., ed. : Extracellular Matrix Biochemistry, New York, 1984, Elsevier, 277-328.
- 5) Shinomura, T., Kimata, K., Oike, Y., Noro, A., Hirose, N., Tanabe, K. and Suzuki, S. : The Occurrence of Three Different Proteoglycan Species in Chick Embryo Cartilage. J. Biol. Chem. 258 : 9314-9322, 1983.
- 6) Vaughan, L., Winterhalter, K. H. and Bruckner, P. : Proteoglycan Lt from Chicken Embryo Sternum Identified as Type IX Collagen. J. Biol. Chem. 260 : 4758-4763, 1985.
- 7) Takanashi, N., Ishihara, H., Tejima, S., Oike, Y., Kimata, K., Shinomura, T. and Suzuki, S. : The Core Molecule from Type H Proteoglycan. Biochem. J. 229 : 561-571, 1985.
- 8) 岡田節人 : 発生における分化. 東京, 1985, 岩波書店, 131-149.
- 9) 北村邦夫, 加藤淑裕 : 発生系における細胞間相互作用. 代謝 21 : 315-324, 1984.
- 10) 鈴木 旺, 木全弘治 : 軟骨細胞が営む細胞間マトリックス形成反応. 蛋白質 核酸 酵素 30 : 513-522, 1985.
- 11) 鈴木 旺 : 細胞分化とプロテオグリカン分子種の変換. 結合組織 17 : 13-19, 1985.
- 12) Meier, S. and Hay, E. D. : Control of Corneal Differentiation *in vitro* by Extracellular Matrix. In : Slavkin, H. C. and Greulich, R. C., ed. : Extracellular Matrix Influences on Gene Expression, New York, 1975, Academic Press, 185-196.
- 13) Slavkin, H. C., Matosian, P., Bringas, P., Mino, W., Croissant, R. D. and Guenther, H. : Epithelial-Specific Extracellular Matrix Influences on Mesenchyme Collagen Biosynthesis *in vitro*. In : Slavkin, H. C. and Greulich, R. C., ed. : Extracellular Matrix Influences on Gene Expression, New York, 1975, Academic Press, 237-251.
- 14) Lash, J. and Kosher, R. A. : Perinotochordal Proteoglycans and Somite Chondrogenesis. In : Slavkin, H. C. and Greulich, R. C., ed. : Extracellular Matrix Influences on Gene Expression, New York, 1975, Academic Press, 671-676.
- 15) Hurmerinta, K. : Autoradiographic Visualization of Glycoproteins and Glycosaminoglycans

- in the Epithelio-mesenchymal Interface of Developing Mouse Tooth Germ. *J. Dent. Res.* 90 : 278-285, 1982.
- 16) Hay, E. D. : Cell-Marix Interaction in Embryonic Avian Cornea and Lens. In : Hawkes, S. and Wang, J. L., ed. : *Extracellular Matrix*, New York, 1982, Academic Press, 55-69.
  - 17) Hay, E. D. : Collagen and Embronic Development. In : Hay, E. D., ed. : *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, 1981, Plenum Press, 379-409.
  - 18) 大平敦彦 : 細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能. 代謝 21 : 305-313, 1984.
  - 19) Rapraeger, A. C. and Bernfield, M. : An Integral Membrane Proteoglycan is Capable of Binding Components of the Cytoskeleton and the Extracellular Matrix. In : Hawkes, S. and Wang, J. L., ed. : *Extracellular Matrix*, New York, 1982, Academic Press, 265-269.
  - 20) Gallagher, J. T., Lyon, M. and Steward, W. P. : Structure and Function of Heparan Sulphate Proteoglycans. *Biochem. J.* 236 : 313-325, 1986.
  - 21) Fransson, L., Carlstedt, I., Cöster, L. and Malmström, A. : Binding of Transferrin to the Core Protein of Fibroblast Proteoglycan Sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 5657-5661, 1984.
  - 22) Höök, M., Kjellén, L., Johansson, S. and Robinson, J. : Cell-Surface Glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 847-869, 1984.
  - 23) Leaver, A. G., Triffitt, J. T. and Holdbrook, I. B. : Newer Knowledge of Non-collagenous Protein in Dentin and Cortical Bone Matrix. *Clin. Orthop.* 110 : 269-292, 1975.
  - 24) Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M. and Nylén, M. U. : Properties of Dissociatively Extracted Fetal Tooth Matrix Proteins. I. Principal Molecular Species in Developing Bovine Enamel. *J. Biol. Chem.* 255 : 9760-9768, 1980.
  - 25) Jones, I. L. and Leaver, A. G. : Studies on the Minor Components of the Organic Matrix of Human Dentine. *Arch. oral Biol.* 19 : 371-380, 1974.
  - 26) Smith, A. J. and Leaver, A. G. : Non-collagenous Components of the Organic Matrix of Rabbit Incisor Dentine. *Arch. oral Biol.* 24 : 449-454, 1979.
  - 27) Urist, M. R., Speer, D. P., Ibsen, K. J. and Strates, B. S. : Calcium Binding by Chondroitin Sulfate. *Calcif. Tissue Res.* 2 : 253-261, 1968.
  - 28) Linde, A., Bhowan, M. and Butler, W. T. : Noncollagenous Proteins of Dentin. *J. Biol. Chem.* 255 : 5931-5942, 1980.
  - 29) Termine, J. D., Belcourt, 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.
  - 30) Termine, J. D., Belcourt, A. B., Miyamoto, M. S. and Conn, K. M. : Properties of Dissociatively Extracted Fetal Tooth Matrix Proteins. II. Separation and Purification of Fetal Bovine Dentin Phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 255 : 9769-9772, 1980.
  - 31) Fisher, L. W., Termine, J. D., Dejter, Jr. S. W., Whitson, S. W., Yanagishita, M., Kimura, J. H., Hascall, V. C., Kleinman, H. K., Hassell, J. R. and Nilsson, B. : Proteoglycans of Developing Bone. *J. Biol. Chem.* 258 : 6588-6594, 1983.
  - 32) Fisher, L. W. : The Nature of the Proteoglycans of Bone. In : Butler, W. T., ed. : *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, Alabama, 1985, Ebsco Media, 188-196.
  - 33) Termine, J. D., Robey, P. G., Fisher, L. W., Shimokawa, H., Drum, M. A., Conn, K. M., Hawkins, G. R., Cruz, J. B. and Thompson, K. G. : Osteonectin, Bone Proteoglycan, and Phosphoryn Defects in a Form of Bovine Osteogenesis Imperfecta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 2213-2217, 1984.
  - 34) Fisher, L. W., Denholm, L. J., Conn, K. M. and Termine, J. D. : Mineralized Tissue Protein Profiles in the Australian Form of Bovine Osteogenesis Imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* 38 : 16-20, 1986.
  - 35) Rahemtulla, F., Prince, C. W. and Butler, W. T. : Isolation and Partial Characterization of Proteoglycans from Rat Incisors. *Biochem. J.* 218 : 877-885, 1984.
  - 36) Bitter, T. and Muir, H. M. : A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Anal. Biochem.* 4 : 330-334, 1962.
  - 37) 福井作蔵 : 還元糖の定量法 (生物化学実験法 1). 東京, 1969, 学会出版センター, 57-59.
  - 38) 瀬野信子, 川合由美子, 阿武喜美子 : 3. 定量実験法 (ムコ多糖実験法 I). 東京, 1972, 南江堂, 85-125.
  - 39) 鈴木 旺 : Chondroitin ABC lyase, Chondroitin AC lyase (酵素ハンドブック). 東京, 1982, 朝倉書店, 707-708.
  - 40) 岩田 久 : 骨・軟骨のムコ多糖代謝とその異常 (ムコ多糖実験法 II). 東京, 1972, 南江堂, 231-268.
  - 41) 畑 隆一郎 : 酸性ムコ多糖の微量分析法. 蛋白

- 質 核酸 酵素 18 : 843-857, 1973.
- 42) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
  - 43) 菅原 潔, 副島正美 : 蛋白質の定量法 (生物化学実験法 7). 東京, 1977, 学会出版センター, 95-128.
  - 44) Jourdan, G. W., Dean, L. and Roseman, S. : The Sialic Acids. XI A Periodate-resorcinol Method for the Quantitative Estimation of Free Sialic Acids and Their Glycosides. *J. Biol. Chem.* 246 : 430-435, 1971.
  - 45) Seno, N., Anno, K., Kondo, K., Nagase, S. and Saito, S. : Method for Electrophoretic Separation and Rapid Quantitation of Isomeric Chondroitin Sulfates on Cellulose Acetate Strips. *Anal. Biochem.* 37 : 197-201, 1970.
  - 46) 瀬野信子, 阿武喜美子 : ムコ多糖 (糖質の化学上, 生化学実験講座). 東京, 1976, 東京化学同人, 131-154.
  - 47) Laemmli, U. K. : Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
  - 48) 宮崎 香, 萩原秀昭, 横田 信, 角野富三郎, 堀尾武一 : 2 次元電気泳動法 (等電点電気泳動と等速電気泳動, 蛋白質 核酸 酵素別冊20). 東京, 1978, 共立出版, 183-196.
  - 49) Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. and Hancock, R. : Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 118 : 197-203, 1981.
  - 50) 岩崎辰夫, 安東民衛, 市川かおる, 保井孝太郎 : 単クローン抗体. 東京, 1983, 講談社サイエンティフィク.
  - 51) Köhler, G. and EMBO : Hybridoma Techniques. EMBO, SKMB Course. New York, 1980, Cold Spring Harbor Lab.
  - 52) 松橋 直, 成内秀雄, 臼井美津子 : 抗体の精製法 (免疫学実験入門生物化学実験法15). 東京, 1981, 学会出版センター, 61-68.
  - 53) Eastoe, J. E. : The organic matrix of bone. In : Bourne, G. H., ed. : *The Biochemistry and Physiology of Bone*, New York, 1956, Academic Press, 81-105.
  - 54) Oldroyd, D. and Herring, G. M. : A Method for the Study of Bone Mucosubstances by Using Collagenase. *Biochem. J.* 104 : 20P, 1967.
  - 55) Eastoe, J. E. : Chemical Organization of the Organic Matrix of Dentine. In : Miles, A. E. W., ed. : *Structural and Chemical Organization of Teeth*, Vol. 2, New York, 1967, Academic Press, 279-315.
  - 56) Veis, A. : Bones and Teeth. In : Piez, K. A. and Reddi, A. H., ed. : *Extracellular Matrix Biochemistry*, New York, 1984, Elsevier, 329-374.
  - 57) Termine, J. D. : Chemical Characterization of Fetal Bone Matrix Constituents. In : Veis, A., ed. : *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*, Amsterdam, 1981, Elsevier, 349-353.
  - 58) Linde, A. : Noncollagenous Proteins and Proteoglycans in Dentinogenesis. In : Linde, A., ed. : *Dentin and Dentinogenesis*, Florida, 1984, CRC Press, 55-92.
  - 59) Butler, W. T., Bhoen, M., Dimuzio, M. T. and Linde, A. : Non-collagenous Proteins of Dentin. Isolation and Partial Characterization of Rat Dentin Proteins and Proteoglycans Using a Three-step Preparative Method. *Coll. Relat. Res.* 1 : 187-199, 1981.
  - 60) Jontell, M. and Linde, A. : Non-collagenous Proteins of Predentine from Dentinogenically Active Bovine Teeth. *Biochem. J.* 214 : 769-776, 1983.
  - 61) Herring, G. M. : A Comparison of Bone Matrix and Tendon with Particular Reference to Glycoprotein Content. *Biochem. J.* 159 : 749-755, 1976.
  - 62) Franzén, A. and Heinegård, D. : Extraction and Purification of Proteoglycans from Mature Bovine Bone. *Biochem. J.* 224 : 47-58, 1984.
  - 63) Franzén, A. and Heinegård, D. : Characterization of Proteoglycans from the Calcified Matrix of Bovine Bone. *Biochem. J.* 224 : 59-66, 1984.
  - 64) Franzén, A. and Heinegård, D. : Proteoglycans and Proteins of Rat Bone. In : Butler, W. T., ed. : *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, Alabama, 1985, Ebsco Media, 132-141.
  - 65) Jones, I. L. and Leaver, A. G. : Preliminary Studies on the Non-collagenous Organic Components of Human Dentin. *J. Dent. Res.* 51 : 1233-1234, 1972.
  - 66) Sato, S., Rahemtulla, F., Prince, C. W., Tomana, M. and Butler, W. T. : Proteoglycans of Adult Bovine Compact Bone. *Connect. Tissue Res.* 14 : 65-75, 1985.
  - 67) Prince, C. W., Rahemtulla, F. and Butler, W. T. : Metabolism of Rat Bone Proteoglycans *in vivo*. *Biochem. J.* 216 : 589-596, 1983.
  - 68) Engfeldt, B. and Hjerpe, A. : Glycosaminoglycans of Dentine and Predentine. *Calcif. Tissue Res.* 10 : 152-159, 1972.
  - 69) Linde, A. : Glycosaminoglycans of the Odontoblast-Predentine Layer in Dentinogenically

- Active Porcine Teeth. *Calcif. Tissue Res.* 12 : 281-294, 1973.
- 70) Jones, I. L. and Leaver, A. G. : Glycosaminoglycans of Human Dentine. *Calcif. Tissue Res.* 16 : 37-44, 1974.
  - 71) Butler, W. T. : Matrix Macromolecules of Bone and Dentin. *Coll. Relat. Res.* 4 : 297-307, 1984.
  - 72) Prince, C. W., Rahemtulla, F. and Butler, W. T. : Isolation of [^{35}S] Sulphate into Glycosaminoglycans by Mineralized Tissues *in vivo*. *Biochem. J.* 224 : 941-945, 1984.
  - 73) Tian, M., Yanagishita, M., Hascall, V. C. and Reddi, A. H. : Biosynthesis and Fate of Proteoglycans in Cartilage and Bone during Development and Mineralization. *Arch. Biochem. Biophys.* 247 : 221-232, 1986.
  - 74) Carrino, D. A., Weitzhandler, M. and Caplan, A. I. : Proteoglycans Synthesized during the Cartilage to Bone Transition. In : Butler, W. T., ed. : *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, Alabama, 1985, Ebsco Media, 197-208.
  - 75) Hunter, G. K., Heersche, J. N. M. and Aubin, J. E. : Isolation of Three Species of Proteoglycan Synthesized by Cloned Bone Cells. *Biochemistry* 22 : 831-837, 1983.
  - 76) White, C. J. B. : Molecular Organization of Heparan Sulphate Proteoglycan from Human Dentine. *Arch. oral Biol.* 23 : 1141-1144, 1978.
  - 77) Heinegård, D., Björne-Persson, A., Cöster, L., Franzén, A., Gardell, S., Malmström, A., Paulsson, M., Sandfalk, R. and Vogel, K. : The Core Proteins of Large and Small Interstitial Proteoglycans from Various Connective Tissues form Distinct Subgroups. *Biochem. J.* 230 : 181-194, 1985.
  - 78) Heinegård, D., Paulsson, M., Inerot, S. and Carlström, C. : A Novel Low-molecular-weight Chondroitin Sulphate Proteoglycan Isolated from Cartilage. *Biochem. J.* 197 : 355-366, 1981.
  - 79) Hjerpe, A. and Engfeldt, B. : Proteoglycans of Dentine and Predentine. *Calcif. Tissue Res.* 22 : 173-182, 1976.
  - 80) Smalley, J. W. and Embery, G. : The Influence of Fluoride Administration on the Structure of Proteoglycans in the Developing Rat Incisor. *Biochem. J.* 190 : 263-272, 1980.
  - 81) Vogel, K. G. and Heinegård, D. : Characterization of Proteoglycans from Adult Bovine Tendon. *J. Biol. Chem.* 260 : 9298-9306, 1985.
  - 82) Axelsson, I. and Heinegård, D. : Characterization of the Keratan Sulphate Proteoglycans from Bovine Corneal Stroma. *Biochem. J.* 169 : 517-530, 1978.
  - 83) Pearson, C. H. and Gibson, G. J. : Proteoglycans of Bovine Periodontal Ligament and Skin. *Biochem. J.* 201 : 27-37, 1982.
  - 84) Fujii, N. and Nagai, Y. : Isolation and Characterization of a Proteodermatan Sulfate from Calf Skin. *J. Biochem.* 90 : 1249-1258, 1981.
  - 85) Damle, S. P., Cöster, L. and Gregory, J. D. : Proteodermatan Sulfate Isolated from Pig Skin. *J. Biol. Chem.* 257 : 5523-5527, 1982.
  - 86) Brennan, M. J., Oldberg, A., Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. : Chondroitin/Dermatan Sulfate Proteoglycan in Human Fetal Membrane. *J. Biol. Chem.* 259 : 13742-13750, 1984.
  - 87) Pearson, C. H. and Pringle, G. A. : Chemical and Immunochemical Characteristics of Proteoglycans in Bovine Gingiva and Dental Pulp. *Arch. oral Biol.* 31 : 541-548, 1986.
  - 88) Hassell, J. R., Robey, P. G., Barrach, H., Wilczek, J., Rennard, S. I. and Martin, G. R. : Isolation of a Heparan Sulfate-containing Proteoglycan from Basement Membrane. *Proc. Natl Acad. Sci.* 77 : 4494-4498, 1980.
  - 89) Hassell, J. R., Leyshon, W. C., Ledbetter, S. R., Tyree, B., Suzuki, S., Kato, M., Kimata, K. and Kleinman, H. K. : Isolation of Two Forms of Basement Membrane Proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 260 : 8098-8105, 1985.
  - 90) Schwartz, E. R. and Miller, K. : Phosphorylation of Proteoglycans in Human Articular Cartilage. *Connect. Tissue Res.* 5 : 225-235, 1978.
  - 91) Glossl, J., Hoppe, W. and Kresse, H. : Post-translational Phosphorylation of Proteodermatan Sulfate. *J. Biol. Chem.* 261 : 1920-1923, 1986.
  - 92) Glossl, J., Beck, M. and Kresse, H. : Biosynthesis of Proteodermatan Sulfate in Cultured Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259 : 14144-14150, 1984.