

学 位 申 請 論 文

ヒト耳下腺唾液中のリン酸カルシウム
沈殿促進物質
玉 木 直 文

Calcium Phosphate Precipitation
Accelerator in Human Parotid Saliva
Naofumi TAMAKI

岡山大学歯学部予防歯科学講座
(指導：渡 邊 達 夫 教授)

ヒト耳下腺唾液中のリン酸カルシウム

を可溶化した沈殿促進物質

玉木 直文

Calcium Phosphate Precipitation

Accelerator in Human Parotid Saliva

Naofumi TAMAKI

S.C.

(平成 13 年 1 月 5 日受付)

緒 言

唾液には、エナメル質の結晶成長や再石灰化の作用があり、カルシウムの供給源として齲蝕の発生予防に関与していると考えられている。カルシウムは唾液腺から分泌され¹⁾、エナメル質や歯垢の石灰化部位まで可溶化し

た状態で運ばれている。唾液中でカルシウムを可溶化した状態に保つ物質として、高プロリン含有タンパク (PRPs), スタセリン, ヒスタチン等が見つかっており, カルシウム結合タンパクによるリン酸カルシウム沈殿抑制作用については, これまでにいくつかの研究がなされている²⁻⁸⁾。

多田は⁹⁾, 唾液タンパクのリン酸カルシウム沈殿抑制能を相対的に比較するため, リン酸カルシウム沈殿抑制活性を定量する方法を確立した。このとき, 唾液に含まれている数種のリン酸カルシウム沈殿抑制タンパクを精製する過程において, リン酸カルシウム沈殿を促進させる物質が存在することが判明した。

そこで本研究では, リン酸カルシウム沈殿促進物質を精製し, その性状を検討することを目的とした。

材料ならびに方法

I. リン酸カルシウム沈殿量の定量⁹⁾

1. 溶液の調製

リン酸塩溶液は KH_2PO_4 , KCl ならびに NaN_3 (ナカライテスク, 京都) を各々の最終濃度が 11mM, 56mM および 3mM になるようにし, KOH で pH6.80 に調整した。緩衝液は 125mM イミダゾール緩衝液 (pH 7.0) を使用した。カルシウム溶液は CaCl_2 (ナカライテスク, 京都) を 24mM となるようイミダゾール緩衝液で溶解したものをを用いた。ハイドロキシアパタイト懸濁液は, ハイドロキシアパタイト (日本ケミカル株式会社, 東京) をイミダゾール緩衝液に 1mg/ml となるように懸濁し, 調製した。

前述のリン酸塩溶液, カルシウム溶液, およびイミダゾール緩衝液のそれぞれに溶存する気体を使用直前に N_2 で置換した。各溶液 100ml あたり, 約 1 L の N_2 ガス (大同ほくさん, 岡山) を, シリコンチューブを通し

て 1 分間通気した。

2. リン酸カルシウム沈殿量の測定

リン酸カルシウム沈殿反応は，カルシウム溶液 0.5ml と試料 0.25ml を混合したものを，リン酸塩溶液 2.5ml とハイドロキシアパタイト懸濁液 0.25ml の混合液に加えて開始した。この反応液を 25℃で 30 分間インキュベートした。生じた沈澱物を $\phi=0.45\mu\text{m}$ ニトロセルロースメンブレンフィルター (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) で濾過し，ただちに濾液 0.1ml をイミダゾール緩衝液で 50 倍に希釈した後，カルシウム濃度を原子吸光分光光度計 (Z-8000 型，日立製作所) を用いて測定した。濾液中のカルシウム濃度と，反応系におけるカルシウムの初期濃度との差を，沈殿量と規定した。

促進活性の 1 ユニットは，25℃で 1 分間に 1ppm のカルシウムの濃度を減少させる量とした。なお，比活性はタンパク 1mg 当りのユニット数で表わした。

II. ヒト耳下腺唾液のリン酸カルシウム沈殿促進物質の精製

1. 耳下腺唾液採取

健康成人（男性 8 名，女性 7 名，24 歳～31 歳）にパラフィンフィルムをかませ，Keene の方法¹⁰⁾に従い，耳下腺開口部より氷冷下で吸引採取した。採取した唾液（約 2 L）は，4℃で 12,000×g，20 分間遠心後，上清を分画分子量 10,000Da のフィルター（Ultra filter® QO100，ADV ANTEC MFS, Inc., Tokyo, Japan）で限外濾過した。限外濾液は，凍結乾燥後 -20℃で保存し，使用直前に緩衝液に溶解した。

2. カラムクロマトグラフィー

Hay の方法¹¹⁾に準じて，陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより，リン酸カルシウム沈殿促進物質を精製した。

50mM トリスー塩酸緩衝液（0.025M NaCl および 0.1% chloreitone 含有，pH8.0）で平

平衡化した DEAE Sephadex® A-25 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) をカラム (直径 5.0cm, 長さ 28cm, 550ml) に充填した。凍結乾燥したヒト耳下腺唾液試料を, トリス-塩酸緩衝液で溶解し, カラムに添加した。1,000ml のトリス-塩酸緩衝液で溶出した後, 0.025M から 0.5M への NaCl 濃度勾配 (各 1,000ml) で展開した。溶出は 226nm と 280nm でモニターしながら, 流速 80ml/hr で 20ml 毎に分取した。

DEAE Sephadex® A-25 の溶出パターンのうち, リン酸カルシウム沈殿促進活性を示す画分を凍結乾燥により濃縮し, 蒸留水で回収した。トリス-塩酸緩衝液で平衡化した Biogel® P-2 medium (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) カラム (直径 2.6cm, 長さ 100cm, 530ml) に, 約 10 倍に濃縮した上記試料を添加した。流速は 20ml/hr で, 10ml 毎に分取した。ゲル濾過クロマトグラフィーは, 2 回繰り返した。

III. タンパクの定量

Hartree らの方法¹²⁾に従った。標準タンパクには牛血清アルブミン (Sigma Chem. Co.) を用いた。

また、最終的に精製された促進物質のアミノ酸濃度の定量は、室温で 30 分間、1N 塩酸での加水分解後、Böhlen らの方法¹³⁾に従った。標準アミノ酸にはヒスチジン (Sigma Chem. Co.) を用いた。

IV. 無機リン酸の定量

無機リン酸濃度は、Concuestell らの方法¹⁴⁾に従い、リン-モリブデン反応を用いた比色定量を行った。

V. アミノ酸分析

精製物はエドマン分解によってアミノ酸組成を推定した。アミノ酸の決定には、自動アミノ酸配列決定装置 (Applied Biosystems Model 476A, PE Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。

VI. 分子量の測定

Andrews¹⁵⁾の方法に従って行った。マーカ-としては、ペプスタチン A (685.9Da), ロイペプチン (475.6Da), ヒスチジン (155.2Da), グリシン (75.1Da, Sigma Chem. Co.) を使用した。2.6×100cm のカラムにトリス-塩酸緩衝液で平衡化した Biogel® P-2 を充填した後, 10 μ g の促進物質ならびにマーカ-各 0.5mg を添加した。

VII. 精製物の純度の測定

1. 薄層クロマトグラフィー

シリカゲル 60 でコートされた薄層プレート (関東化学株式会社, 東京) を支持体として, 溶媒にはメタノール:クロロホルム:17%アンモニア (2:2:1) を用いて, 薄層クロマトグラフィーを行った¹⁶⁾。室温で 120 分展開後, Mendez¹⁷⁾らの方法に従い, Fluorescamine®を用いて発色させた。

2. 逆相高速液体クロマトグラフィー

逆相カラム (Sephasil® C₁₈, Amersham Pharmacia Biotech) を用いた, 高速液体ク

ロマトグラフィーを、10mM 酢酸アンモニウムから 10mM 酢酸アンモニウムに 60% アセトニトリルを添加した溶液への直線濃度勾配で溶出させた。溶出は 220nm の波長でモニターしながら、60ml/hr の流速で行った。

結 果

I. リン酸カルシウム沈殿促進物質の精製

図 1 は、DEAE Sephadex[®] A-25 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いた時の、促進活性およびタンパクの溶出パターンである。塩濃度勾配法を用いると、0.22M NaCl 相当のところに促進活性をしめす物質が溶出してきた。

促進物質の精製結果を表に示した。精製物質は限外濾液画分よりも 50 倍高い比活性を示した。なお促進活性の回収率は 58.2% で、4.5mg のタンパク相当の標品を得た。

図 2 は、Biogel[®] P-2 ゲル濾過を行った時の促進活性，アミノ酸およびリン酸の溶出パターンを表している。三つのピークが一致しており，活性物質はほぼ均質であることを示している。分画番号 30，31 を用いて，促進物質の諸性質を検討した。

II. 性状

1. 精製試料の均一性

1) 薄層クロマトグラフィー

精製試料 $2\mu\text{g}$ を薄層クロマトグラフィー展開した後，Fluorescamine[®]により発色を行った。その結果，精製試料のレーンには，二つのスポットが見られた（図 3）。このうち一つはヒスチジンと移動距離が同じであり，展開途中に分離したヒスチジンであると考えられる。もう一つのスポットを回収し，蒸留水に溶解して，リン酸カルシウム沈殿促進活性の測定を行った。その結果，添加した約 38% の促進活性が認められた。このことより，このスポットが目的としている促進物質である

ことが示された。

2) 高速液体クロマトグラフィー

精製試料を添加した結果，三つのピークが認められた（図 4）。保持時間から，2.7 分のは緩衝液成分であるトリスであり，3.8 分のはヒスチジンであった。さらに，保持時間が 4.8 分に一番大きなピークが認められた。このピークを回収し，リン酸カルシウム沈殿促進活性を測定した。その結果，このピークと一致して促進活性が認められた。このことより，このピークが目的としている促進物質であることが示された。また，促進活性の回収率は約 37%であった。

2. 分子量の測定

図 5 に示すように，Biogel® P-2 によるゲル濾過法では，促進物質はロイペプチン（475.6Da）とヒスチジン（155.2Da）の間に溶出され，分子量は約 227Da と算定された。

3. 同定

1) アミノ酸組成

アミノ酸シーケンサーを用いて分析した結果，促進物質はヒスチジンを含有することが示された。

さらにジアゾ反応を用いた Pauly テスト¹⁸⁾を行ったところ，混合液は赤褐色を呈した。このことから，促進物質はヒスチジンを含有していることが示された。

2) 無機リン酸の定量

リンーモリブデン反応を用いた比色定量の結果，ヒスチジンを標準としたアミノ酸濃度と同モル濃度の無機リン酸を含有することが示された（図 2）。

3) 促進物質の同定

上記の結果より，リン酸カルシウムの沈殿を促進する物質は，分子量が約 227Da であり，ヒスチジンとリン酸を 1 対 1 で含有することが示された。このことより，フォスホヒスチジン様物質であることが推測された。

4. 活性の経時的変化

図 6 は，精製した試料を添加した時のリン

酸カルシウム沈殿量の経時的な変化を示す。コントロールには，試料の代わりにイミダゾール緩衝液を加えた。試料を添加した場合は，反応 10 分後からコントロールよりも沈殿量が多かった。

図 7 は，図 6 におけるリン酸カルシウム沈殿量のコントロールとの差を，促進物質のカルシウム沈殿促進量として表したものである。リン酸カルシウム沈殿促進量は，反応開始後 20 分までほぼ直線的に増加し，30 分で最大となった。従って，以下の実験では反応時間を 30 分とした。

5. 濃度依存性

図 8 は，リン酸カルシウム沈殿促進能についての，量－反応関係を表したものである。その結果，添加試料が $3\mu\text{g}$ までは，ほぼ直線に増加し，その後は添加量に応じてゆるやかに増加した。

6. 熱安定性

100℃で 30 分間促進物をインキュベートし

た後，リン酸カルシウム沈殿促進活性を測定した。その結果，熱処理後も活性は変化がなく熱に対して安定であることが示された。

7. pH による安定性

37℃に保った pH 1.0-11.0 の緩衝液中に促進物質 ($3\mu\text{g}$) を添加し，30 分間インキュベートした後，イミダゾール緩衝液を用いて pH を調整し，リン酸カルシウム沈殿促進活性の測定を行った。その結果を，処理しない時の促進活性を 100 として表した (図 9)。pH 7.0 から 11.0 までの間で安定であることが示された。

考 察

唾液タンパクによる，リン酸カルシウム沈殿の抑制作用については，これまで Morishita ら¹⁹⁾に代表されるように定性的な研究にとどまっていた。多田は，唾液中の各タンパクの抑制活性を相対的に比較するため

に，リン酸カルシウム沈殿抑制活性を定量する方法を確立した⁹⁾。この定量法を用いて，ヒト耳下腺唾液から各タンパクを精製する過程で，リン酸カルシウム沈殿促進活性が存在することが示された。

予備実験において，限外濾過を行わずに唾液試料を陰イオン交換クロマトグラフィーに添加し，溶出を行ったところ，Small PRPsとスタセリンとの間に促進物質が溶出した。この物質は分子量が 10,000Da 以下であることが分かったので，陰イオン交換クロマトグラフィーを行う前に，限外濾過を行うこととした。

また，人や日時などのヒト耳下腺唾液の採取条件を変えても，促進物質は毎回分離された。そのため，今回精製された促進物質は，耳下腺唾液固有のものと考えられる。

本実験において，ヒト耳下腺唾液からリン酸カルシウム結晶成長促進物質を精製した結果，約 50 倍に精製され，回収率は 58.2%で

あった。陰イオン交換クロマトグラフィーで、総活性量の半分以上が失われている。これは、促進活性画分の前後にスタセリン等の抑制物が多く含まれており、精製度をあげるために比活性の高い画分のみを回収したことによると考えられる。ゲル濾過クロマトグラフィーでは、回収率が増加している。これは、このステップにおいて Small PRPs やスタセリン等の抑制物が除去されたためであると考えられる。

沈殿促進物質の諸性質について検討したところ、熱に対する耐性は強く、100℃で30分間インキュベートしても活性は失われなかった。また、pH7.0~11.0において活性が安定であった。

促進物質の同定を行ったところ、アミノ酸シーケンサー、薄層クロマトグラフィー、Pauly テストによりヒスチジンを含有することが認められた。また、ヒスチジンとほぼ同モル濃度の無機リン酸が検出された。さらに、

ゲル濾過法により，分子量は約 227Da と推定された。以上の結果より，ヒト耳下腺唾液より得られたリン酸カルシウム沈殿促進物質はフォスホヒスチジン様物質であることが推測された。しかし，リン 31 の核磁気共鳴分光法での分析を行った結果，既知のフォスホヒスチジンの値^{20,21)}とは差が認められた。そのため，今回精製された促進物質をフォスホヒスチジンと同定することはできなかった。今後，水素 1，炭素 13 や窒素 14 の核磁気共鳴分光法を行い，同定を行う必要があると思われる。

ヒト耳下腺唾液中で，特に特徴的なタンパクとしてヒスタチンが存在する。このタンパクのファミリーには 12 種類のタンパクがあり^{22,23)}，高ヒスチジン含有タンパクである。ヒスタチンは既知のどのグループのタンパクやペプチドにも類似しない，唾液に特異的なタンパクである。ヒスタチンと今回精製されたフォスホヒスチジン様物質と何らかの関係

があると思われる。しかし、ヒスタチン（分子量 = 4,520Da）はハイドロキシアパタイトのようなリン酸カルシウムに対して高い親和性を示し²⁴⁾、リン酸カルシウムの沈殿を抑制することが知られている²⁵⁾。つまり、今回の促進物質とは明らかに作用の違いがある。

ヒト耳下腺唾液中に、リン酸二水素カリウム、イミダゾール緩衝液、塩化カリウムおよび塩化カルシウムを混合し、室温に2日間放置してもリン酸カルシウムの沈殿は生じない。つまり、唾液そのものは、リン酸カルシウムの沈殿を抑制している。しかし、限外濾過によってリン酸カルシウム沈殿抑制タンパクを除去すると、残った溶液はリン酸カルシウムの沈殿を促進するようになった。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行い、スタセリン等の抑制物が除去されると総活性量は増加した（表1）。これらのことは、今回精製された促進物質と既知の抑制物との関連は生体における反応を知るうえで興味深いも

のであり、今後更なる研究が必要であると思われる。

今回精製した促進物質は、対照となる緩衝液を入れた場合よりも、反応開始 10 分後からリン酸カルシウムの沈殿を促進している（図 6, 7）。唾液において、特にエナメル質表面で局所的にこの促進物質の濃度が上がることにより、エナメル質の結晶成長や再石灰化において何らかの影響を与える可能性も否定できない。

結 論

ヒト耳下腺唾液からリン酸カルシウムの沈殿を促進させる物質を分離、精製し、その性質を調べた結果、以下の知見を得た。

1. 促進物質は限外濾過液より約 50 倍に精製され、リン酸カルシウム沈殿促進活性の回収率は 58.2%であった。

2. ゲル濾過法で、分子量は約 227Da と算定された。

3. ヒト耳下腺唾液から分離された、リン酸カルシウムの沈殿促進させる物質は、ヒスチジンとリン酸分子を 1 対 1 で含有していることが推測された。

4. 促進物の熱安定性は、100℃で 30 分間でも活性に変化がなかった。また、pH 安定性については、pH7.0~11.0 で安定であった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜わった岡山大学歯学部予防歯科学講座渡邊達夫教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の推進に当って、終始御指導と御助言を頂いた予防歯科学講座森田学講師（現北海道大学大学院教授）に謹んで感謝の意を表します。

最後に、種々の面にわたり御協力頂きました
予防歯科学講座の皆様方に厚く御礼申し上げ
ます。

- 1) Hay, D. J., Blockem, J. L.: Salivary phosphate distribution and excretion studies. *Adv. J. Biochem.*, 11, 433-447, 1971.
- 2) Gross, P.: Saturation of human saliva with calcium phosphate. *Arch. Oral Biol.*, 19, 1383-1392, 1974.
- 3) Hay, D. J., Morano, E. C.: Equilibrium dialysis and ultrafiltration studies of calcium and phosphate binding by human salivary proteins. Implications for salivary supersaturation with respect to calcium phosphate salts. *Calcif. Tissue Int.*, 25, 531-538, 1982.
- 4) Poff, A. M., Pester, E. J. F., Larsen, W. J. and Carrera, J. W.: Human sialoproteins: In vivo calcium formation in relation to saturation of saliva with respect to calcium phosphate. *Arch. Oral Biol.*, 42, 93-99, 1987.
- 5) Hay, D. J., Carrera, E. B., Schindler, J. B., Morano, E. C. and Schindler, J. B.: In vivo calcium

文 献

- 1) Wallach, D. and Schramm, M. : Calcium and the exportable protein in rat parotid gland. Parallel subcellular distribution and concomitant secretion. *Eur. J. Biochem.*, **21**, 433-437, 1971.
- 2) Grøn, P. : Saturation of human saliva with calcium phosphate. *Arch. Oral Biol.*, **18**, 1385-1392, 1973.
- 3) Hay, D. I., Moreno, E. C. : Equilibrium dialysis and ultrafiltration studies of calcium and phosphate binding by human salivary proteins. Implications for salivary supersaturation with respect to calcium phosphate salts. *Calcif. Tissue Int.*, **34**, 531-538, 1982.
- 4) Poff, A. M., Pearce, E. I. F., Larsen, M. J. and Cutress, T. W. : Human supragingival *in vivo* calculus formation in relation to saturation of saliva with respect to calcium phosphates. *Arch. Oral Biol.*, **42**, 93-99, 1997.
- 5) Hay, D. I., Carlson, E. R., Schluckebier, S. K. , Moreno, E. C. and Schlesinger, D. H. : Inhibition of

- calcium phosphate precipitation by human salivary acidic proline-rich proteins: structure-activity relationships. *Calcif. Tissue Int.*, **40**, 126-132, 1987.
- 6) Schwartz, S. S., Hay, D. I. and Schluckebier, S. K. : Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary statherin: structure-activity relationships. *Calcif. Tissue Int.*, **50**, 511-517, 1992.
- 7) Schlesinger, D. H. and Hay, D. I. : Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1689-1695, 1977.
- 8) Oppenheim, F. G., Yang, Yueh-Chao, Diamond, R. D., Hyslop, D. and Troxler, R. F. : The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid saliva. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1177-1182, 1986.

- 9) 多田 徹 : ヒト耳下腺唾液タンパクのリン酸カルシウム結晶成長抑制タンパクに関する研究 .
岡大歯誌, **18**, 307-316, 1999.
- 10) Keene, H. J. : Parotid fluid collection system with vacuum-trap modification. *J. Dent. Res.*, **42**, 1041, 1963.
- 11) Hay, D. I. : Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Arch. Oral Biol.*, **20**, 533-538, 1975.
- 12) Hartree, E. F. : Determination of protein; a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427, 1972.
- 13) Böhlen, P., Stein, S., Dalrman, W. and Udenfriend, S. : Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 213-220, 1973.
- 14) Concustell, E., Cortes, M., Ferragut, A. and Gener,

- J. : Inorganic phosphate measurement. *Clin. Chim. Acta.*, **81**, 267-272, 1977.
- 15) Andrews, P. : The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.*, **96**, 595-606, 1965.
- 16) Niederwieser, A. : Thin-layer chromatography of amino acid and derivative. *Methods Enzymol.*, **25**, 60-99, 1972.
- 17) Mendez, E. and Lai, C. Y. : Reaction of peptides with fluorescamine on paper after chromatography or electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **65**, 281-292, 1975.
- 18) Wålinder, O. : Identification of phosphate-incorporating protein from bovine liver as nucleoside diphosphate kinase and isolation of 1-³²P-phosphohistidine, 3-³²P-phosphohistidine and N- ϵ -³²P-phospholysine from erythrocytic nucleoside diphosphate kinase, incubated with adenosine triphosphate-³²P. *J. Biol. Chem.*, **243**, 3947-3952, 1968.

- 19) Morishita, M. Tokumoto, K. Watanabe, T. and Iwamoto, Y. : Effect of a protease derived from the oral bacterium *Bacteroides Loescheii* on the inhibition of calcium-phosphate precipitation by human parotid saliva. *Arch. Oral. Biol.*, **31**, 555-557, 1986.
- 20) Gassner, M., Stehlik, D., Schrecker, O., Hengstenberg, W., Maurer, W. and Rüterjans, H. : The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.*, **75**, 287-296, 1977.
- 21) Beasant, P. G., Byrne, L., Thomas, G. and Attwood, P. V. : A chromatographic method for the preparative separation of phosphohistidines. *Annal. Biochem.*, **258**, 372-375, 1998.
- 22) Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offer, G. D. and Troxler, R. F. : Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7472-7477, 1988.

- 23) Troxler, R. F., Offner, G. D., Xu, T., Vanderspek, J. C. and Oppenheim, F. G. : Structural relationship between human salivary histatins. *J. Dent. Res.*, **69**, 2-6, 1990.
- 24) Jensen, J. L., Lamkin, M. S. and Oppenheim, F.G. : Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite : a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J. Dent. Res.*, **71**, 1569-1576, 1992.
- 25) Driscoll, J., Zuo, Y., Xu, T., Choi, J. R., Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G. : Functional comparison of native and recombinant human salivary histatin 1. *J. Dent. Res.*, **74**, 1837-1844, 1995.

表題脚注

岡山大学歯学部予防歯科学講座

(指導：渡邊達夫教授)

本文の要旨は,第 49 回日本口腔衛生学会総会(2000 年 10 月,札幌),第 24 回大韓口腔保健学会(2000 年 12 月,益山)において発表した。

1. L. malis	4654.3	—	—	—	—
2. Altracoll	283.6	388.3	42.9	1.8	389
3. BOND [®] Sphero [®] A-2	23.8	335.6	35.0	4.2	36.1
4. First Stage [®] P-2	8.3	405.2	42.3	21.3	45.6
5. Second Stage [®] P-2	4.8	319.2	33.9	20.8	38.2

表 1 ヒト耳下腺唾液からのリン酸カルシウム沈殿促進物質の精製

Step	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)	Purification (fold)	Yield (%)
1. Crude saliva	4664.6	—	—	—	—
2. Ultrafilter	383.6	888.8	2.32	1.0	100
3. DEAE Sephadex® A-25	23.8	356.6	15.01	6.5	40.1
4. First Biogel® P-2	8.2	405.2	49.31	21.3	45.6
5. Second Biogel® P-2	4.5	517.2	115.93	50.0	58.2

図 1 DEAE Sephadex A 34 クロマトグラフィー

50mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 6.5) (NaCl) で平衡化した、カラム (直径 4.0cm, 長さ 20cm) を用い、NaCl の濃度勾配で洗脱した。フラクション 128-132 を画分 A (Lysate 成分)、フラクション 135-139 を画分 B (Secretory 成分)、フラクション 142-144 を画分 C (促進物質画分)、フラクション 146-149 を画分 D (スタグザン)、フラクション 152-155 を画分 E (スタグザン) として画取した。

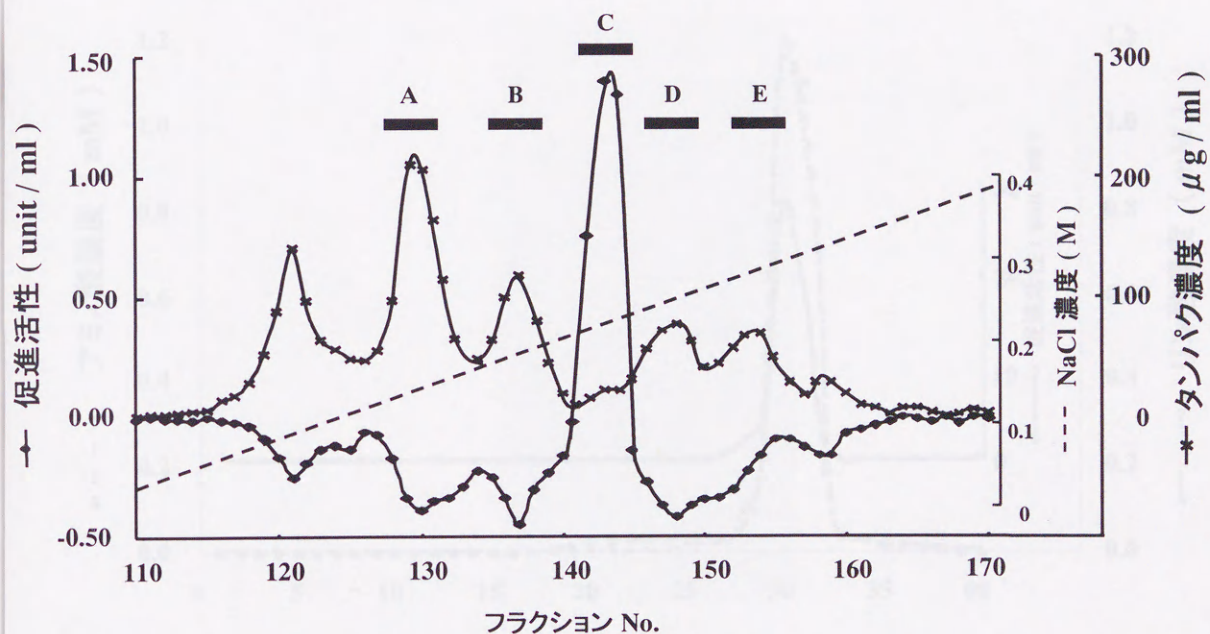


図 1 DEAE Sephadex A-25 クロマトグラフィー

50mM トリスー塩酸緩衝液 (0.025M NaCl) で平衡化した, カラム (直径5.0cm, 長さ28cm) を用い, NaCl の濃度勾配で展開した。: フラクション 128-132 を画分 A (Large PRPs), フラクション 135-139 を画分 B (Small PRPs), フラクション 142-144 を画分 C (促進物質画分), フラクション 146-149 を画分 D (スタセリン), フラクション 152-155 を画分 E (ヒスタチン) として回収した。

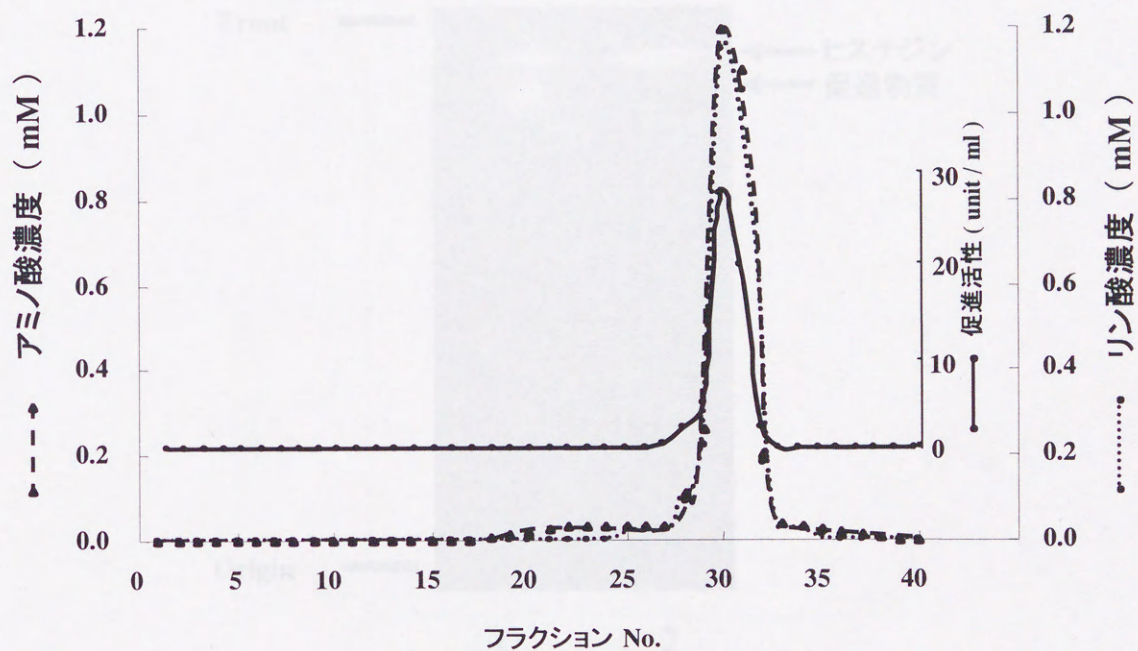


図 2 Biogel P-2 ゲル濾過クロマトグラフィー (2回目)

フラクション 30-31を促進物質として回収した。アミノ酸濃度と同モル濃度のリン酸を含有していた。

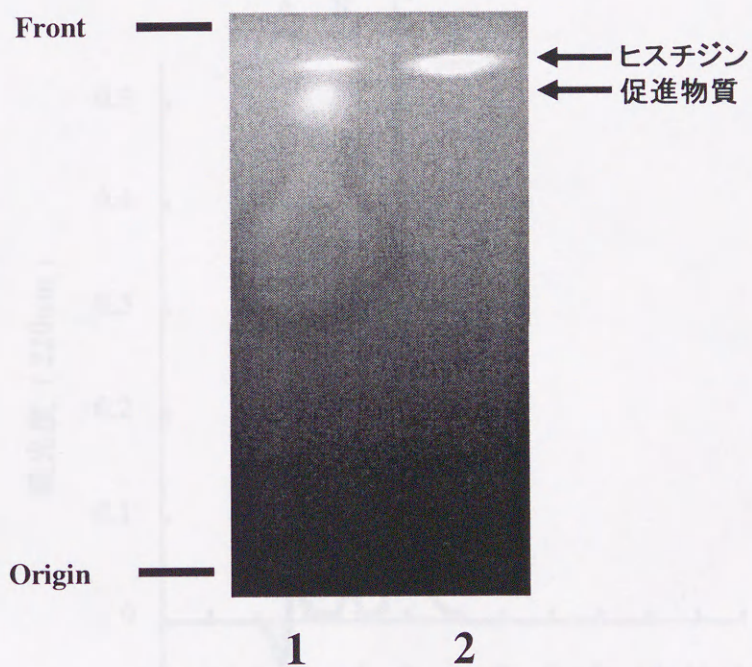


図 3 精製物質の薄層クロマトグラフィー

レーン 1, 精製物質 (2 μg, ヒスチジン相当)

レーン 2, ヒスチジン (2 μg)

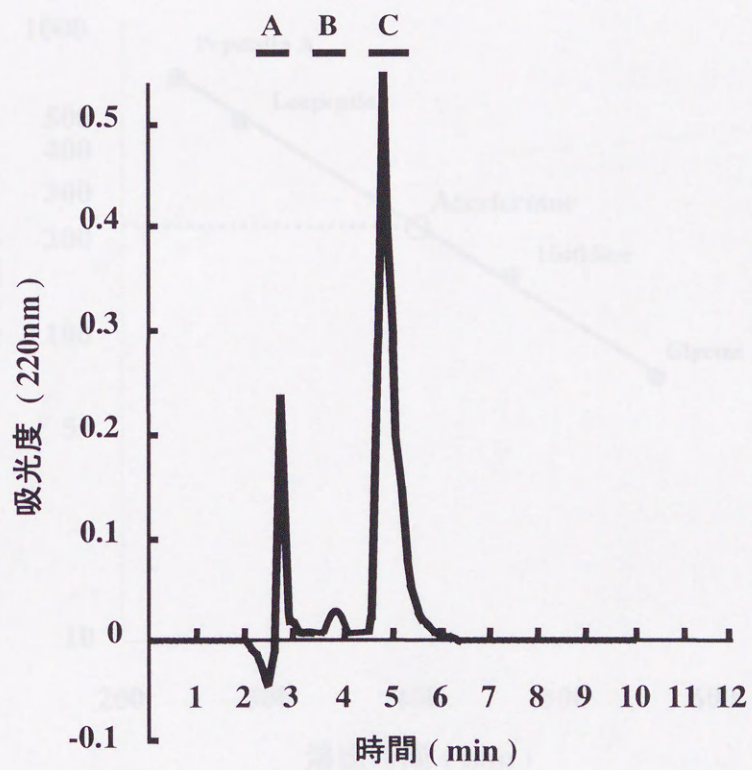


図 4 RP-HPLCによる溶出パターン

画分 Aをトリス, 画分 Bをヒスチジン, 画分 C
を促進物質として同定した。

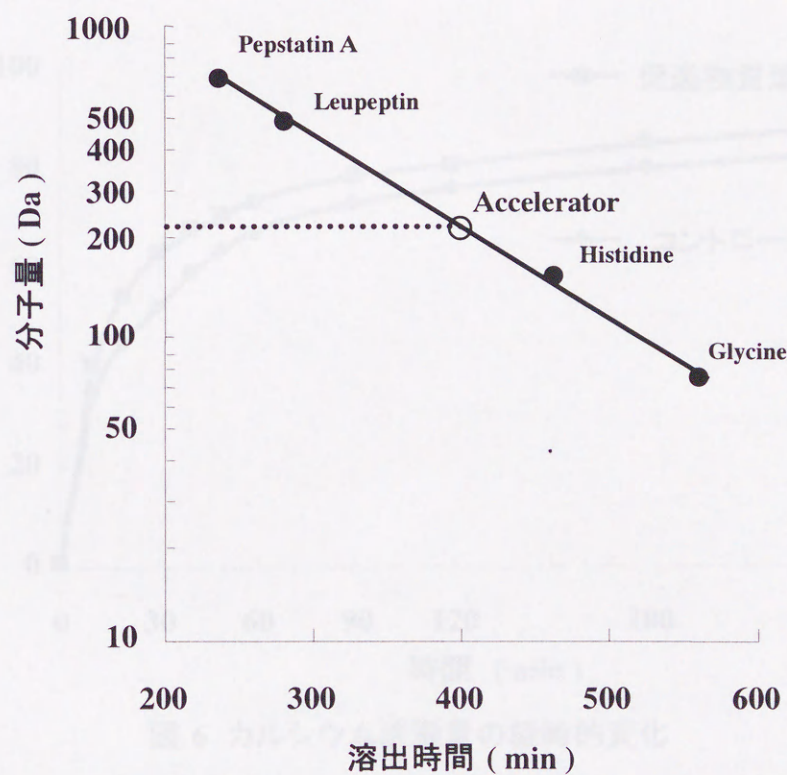


図 5 Biogel P-2 ゲル濾過による
促進物質の分子量測定

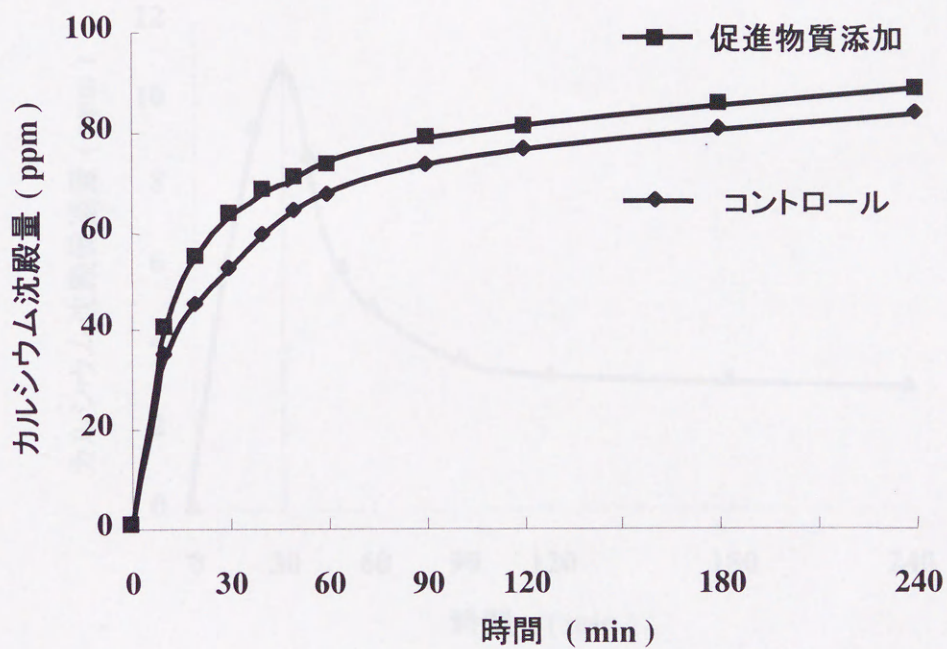


図 6 カルシウム沈殿量の経時的変化

促進物質 ($3\mu\text{g}$) を添加したときの、 25°C における沈殿量の経時的変化を測定した。

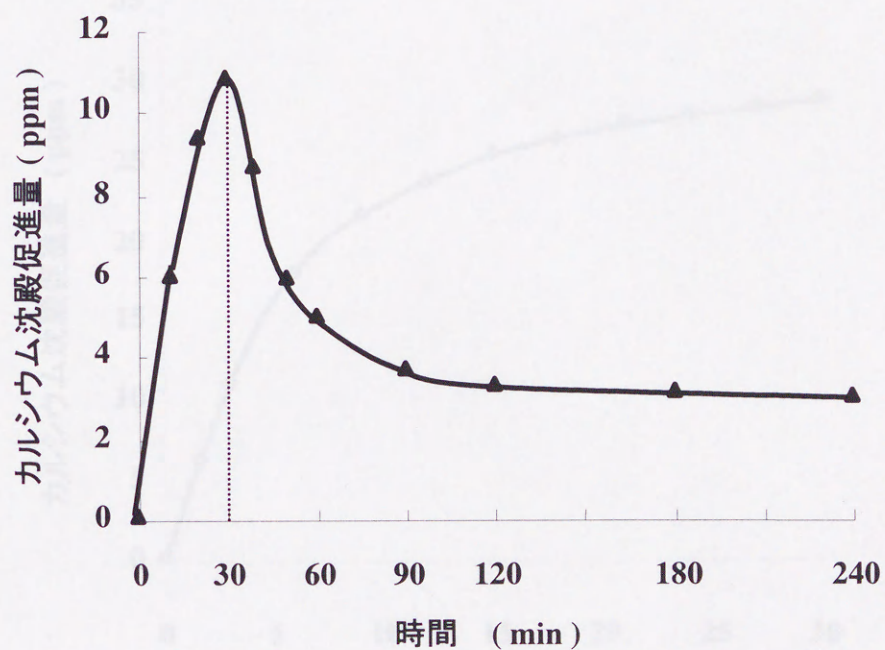


図 7 精製試料によるカルシウム沈殿促進量

促進物質を添加したものとコントロールとの沈殿量の差を、カルシウム沈殿促進量とした(図 6 から作図)。

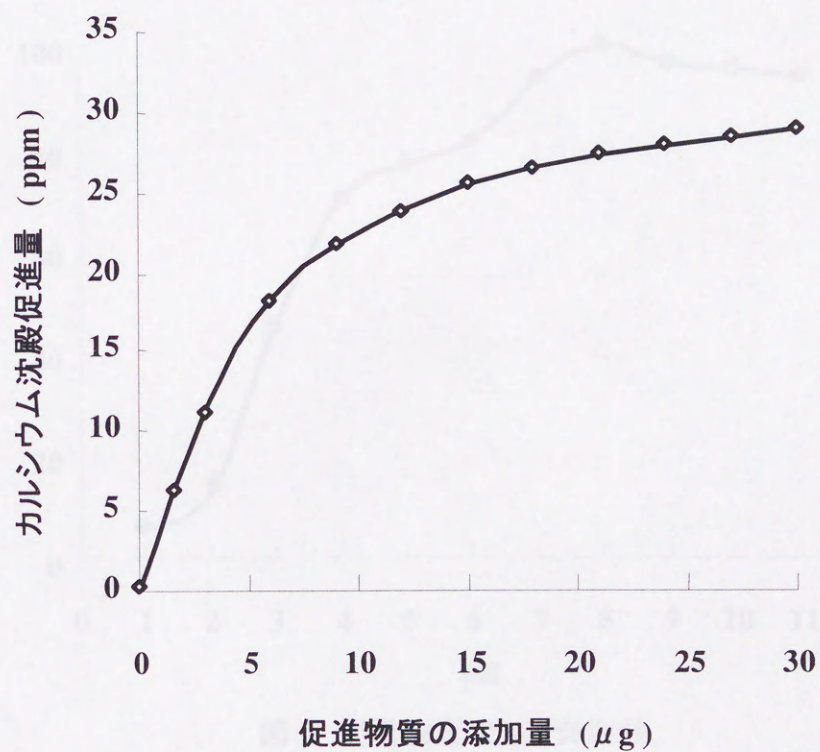


図 8 促進物質添加量とリン酸カルシウム沈殿促進量
(25°C, 30分)

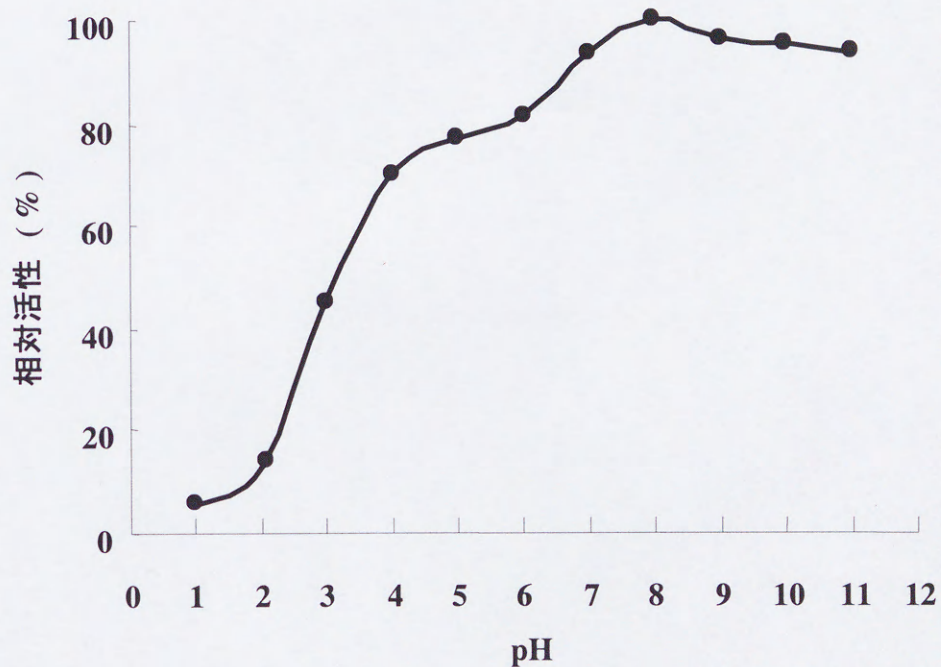
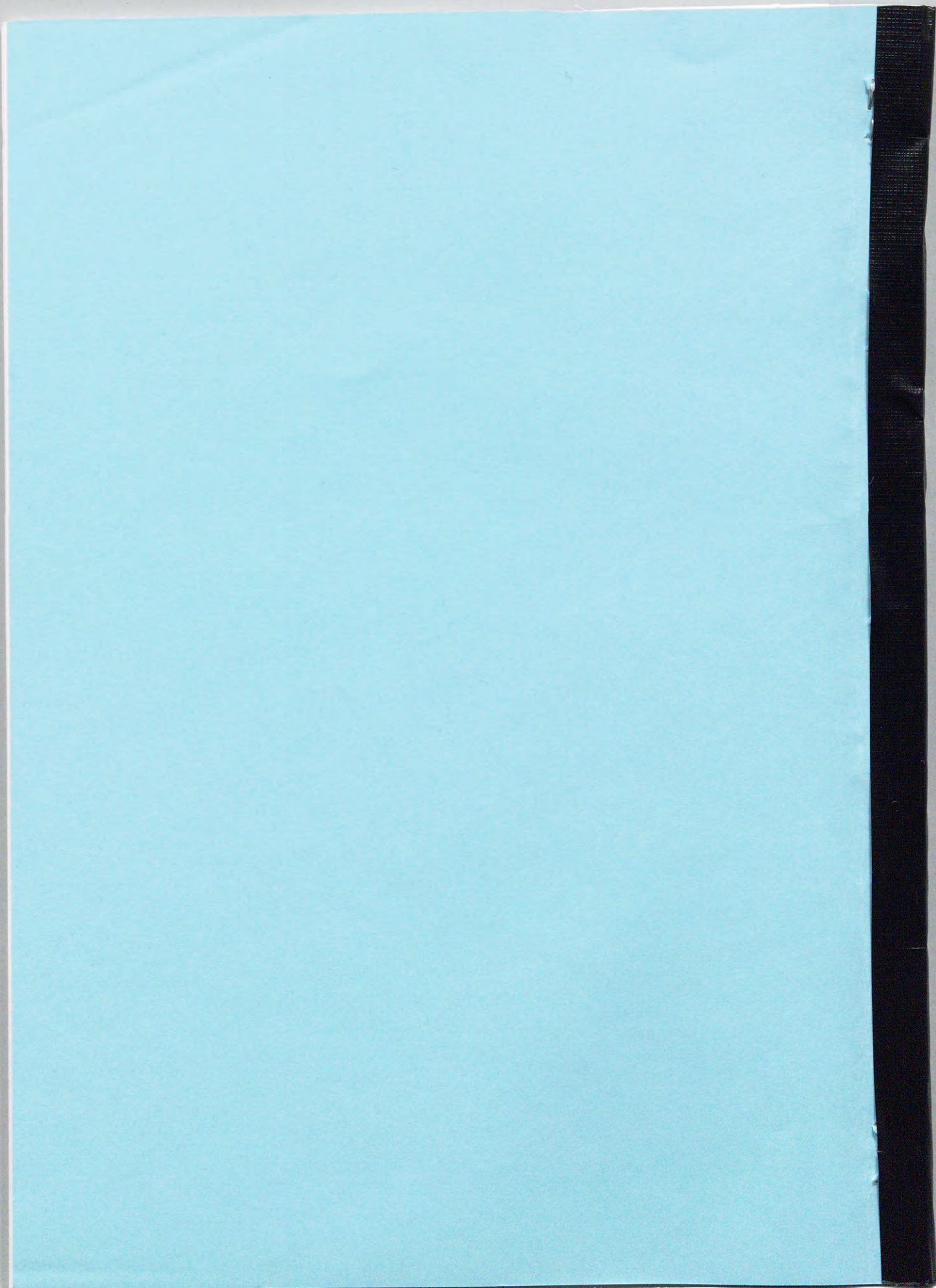
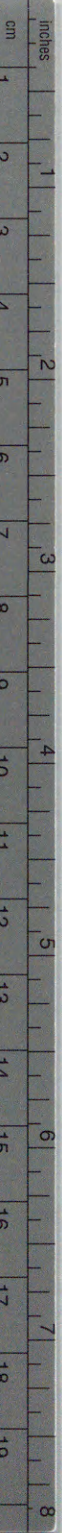


図 9 促進物質の pH 安定性

促進物質 ($3\mu\text{g}$) を pH 1-11 の各種の緩衝液中で 37°C , 30 分間インキュベートした後, イミダゾール緩衝液を用いて pH を調整し, 活性を測定した。: pH 1-2, 100mM グリシン-塩酸緩衝液; pH 3-5, 100mM 酢酸-酢酸ナトリウム; pH 6-8, 100mM イミダゾール-塩酸緩衝液; pH 9-11, 100mM グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

