

①

博士学位論文

細胞接着性タンパク質ビトロネクチンの
構造と機能に関する研究

人間文化研究科 人間環境学専攻

平成2年度生

宮崎 歴

目次

目次	i
略語	v
和文概要	vi
英文概要	viii

第 I 章 序

1. はじめに	1
2. これまでのビトロネクチン研究	2
2-1. ビトロネクチンの発見	2
2-2. ビトロネクチンの構造	3
2-3. ビトロネクチン精製法	4
2-4. ビトロネクチン血液型	4
2-5. ビトロネクチンの機能(1) -細胞接着・伸展活性-	5
2-6. ビトロネクチンの機能(2) -血液凝固・線溶系-	6
2-7. ビトロネクチンの機能(3) -免疫捕体系-	7
3. 本研究の目的	7
4. 本研究の構成	9
5. 第 I 章の図	10

第 II 章 ビトロネクチンの系統学的分布

1. はじめに	13
2. 実験材料と実験方法	14
2-1. 高等動物のビトロネクチンとその抗血清	14
2-2. 様々な生物とその血液	14
2-3. SDS電気泳動	15
2-4. イムノブロットィング	15
3. 結果	16
3-1. 14種高等動物血漿ビトロネクチンのSDS電気泳動による比較	16
3-2. ビトロネクチンの系統学的分布	17
4. 考察	18
5. 第 II 章の図表	21

第 III 章 動物ビトロネクチンの統一分子像 - 分子量の問題から -

1. はじめに	27
2. 実験材料と実験方法	28

2-1. アミノ末端アミノ酸配列分析	28
2-2. 糖鎖の切断	28
2-3. ファーガソンプロット	29
3. 結果	29
3-1. ビトロネクチンのアミノ末端アミノ酸配列の同定	29
3-2. ビトロネクチンの糖鎖の切断	30
3-3. ビトロネクチンのファーガソンプロットによる解析	30
4. 考察	32
5. 第III章の図表	35

第IV章 真性粘菌のビトロネクチン様タンパク質

1. はじめに	43
2. 実験材料と実験方法	44
2-1. 真性粘菌の培養	44
2-2. SDS電気泳動	44
2-3. イムノプロットティング	44
2-4. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の抽出	44
2-5. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の精製	45
2-6. アミノ末端アミノ酸配列分析	46
2-7. タンパク質の定量	46
2-8. 細胞伸展活性の測定法	47
3. 結果	48
3-1. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の粘菌からの抽出	48
3-2. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の精製	48
3-3. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列分析	49
3-4. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の細胞伸展活性	49
3-5. RGDペプチドによる細胞伸展活性の阻害	50
4. 考察	51
5. 第IV章の図表	54

第V章 ビトロネクチンの細胞接着活性の熱およびオートクレーブ耐性

1. はじめに	62
2. 実験材料と実験方法	63
2-1. 細胞接着性タンパク質	63
2-2. タンパク質の熱およびオートクレーブ処理	63
2-3. SDS電気泳動	64
2-4. 細胞伸展活性測定	64
3. 結果	65

3-1. 熱およびオートクレーブ処理したタンパク質の細胞伸展活性	6 5
3-2. 熱およびオートクレーブ処理によるビトロネクチンの細胞伸展活性への影響	6 5
3-3. ビトロネクチンの細胞伸展活性の熱およびオートクレーブ耐性と尿素処理との関係	6 6
3-4. 熱およびオートクレーブ処理したビトロネクチンの細胞伸展活性のRGD配列依存性	6 6
3-5. 熱およびオートクレーブ処理したビトロネクチンのSDS電気泳動	6 7
3-6. 熱およびオートクレーブ処理によるビトロネクチン分子サイズ変化の抑制	6 8
4. 考察	6 9
5. 第V章の図	7 3

第VI章 まとめ

1. 系統学的ビトロネクチンの分布	8 0
2. 構造と機能からみたビトロネクチンの分子進化	8 1
3. ビトロネクチン研究の新しい展開の可能性	8 2
4. ビトロネクチンの応用的利用	8 3

謝辞	8 4
----	-----

参考文献	8 5
------	-----

副論文 I

Vitronectin diversity in evolution but uniformity in ligand binding and size of the core peptide. (Biochim. Biophys. Acta, 1120, 1-10, 1992.)	9 4
--	-----

副論文 II

Physarum vitronectin-like-protein: An Arg-Gly-Asp-dependent cell-spreading protein with distinct NH ₂ -terminal sequence. (Exp. Cell Res. 199, 106-110, 1992.)	1 0 4
--	-------

副論文 III

Heat and autoclave resistance of cell-spreading activity of vitronectin. (Biochim. Biophys. Acta, 1159, 215-222, 1992.)	1 0 9
--	-------

参考論文 I

Three types of vitronectin in human blood.
(Cell Struct. Funct. 13, 123-128, 1988.) 1 1 7

参考論文 II

ビトロネクチンの構造と機能
(血液と脈管 20, 273-284, 1989.) 1 2 3

参考論文 III

Polymorphism of the human vitronectin gene causes vitronectin
blood type.
(Biochem. Biophys. Res. Commun. 167, 1355-1360, 1990.) 1 3 5

参考論文 IV

ビトロネクチン
(検査と技術 19, 343-344, 1992.) 1 4 1

参考論文 V

Yolk Vitronectin: Purification and differences from its blood
homologue in molecular size, heparin binding, collagen
binding, and bound carbohydrate.
(J. Biol. Chem. 267, 24863-24870, 1992.) 1 4 3

口頭発表 1 5 1

略語一覽

kDa	kiro dalton キロダルトン
PA	plasminogen activator プラスミノーゲン活性化因子
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1 プラスミノーゲン活性化因子阻害因子-1
RGD	Arg-Gly-Asp アルギニン-グリシン-アスパラギン酸
ATIII	antithrombin III 抗トロンビンIII
SDS	sodium dodecyl sulfate ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride フッ化フェニルメチルスルホニル
BPB	bromophenol blue ブロモフェノールブルー
PBS	phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水
PVDF	polyvinylidene difluoride ポリビニリデンジフルオリド
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium ダルベッコ改変イーグル培地
GRGDSP	Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro グリシン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン-プロリン
GRGESP	Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro グリシン-アルギニン-グリシン-グルタミン酸-セリン-プロリン

和文概要

ビトロネクチンは血漿、血小板、細胞外マトリックスなどに存在する糖タンパク質で、動物細胞を基質に接着・伸展させる活性の他、血液凝固・線溶系や免疫補体系での調節機能を合わせ持っている。今まで、ヒトのビトロネクチンについてはその構造と機能の研究が盛んに行われてきたが、その他の生物のビトロネクチンについてほとんど研究されていなかった。そこで、様々な生物のビトロネクチンの構造と機能を研究し、生物界全体に普遍的なビトロネクチンの統一的な構造と機能を明らかにすることにした。

まず、様々な生物にビトロネクチンが存在しているかどうかを調べた。その1つの方法として、私の研究室で開発されたビトロネクチンの簡便精製法に従い、14種の哺乳類、鳥類などの高等動物血漿よりビトロネクチンを精製した。精製されたビトロネクチンは、分子量が58-78 kDaで、バンドの数も1-3本と多様性がみられた。また、もう1つの方法として、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリのビトロネクチンに対する抗体を調製し、その他の生物におけるビトロネクチン様タンパク質の存在を抗体反応性で検討した。すると、両生類、ハ虫類、魚類などの脊椎動物、ショウジョウバエや線虫などの無脊椎動物、真性粘菌といった粘菌類にまでビトロネクチン様タンパク質が見いだされた。ビトロネクチン様タンパク質の分子量は、51-96 kDaで、バンドの数も1-3本と精製動物ビトロネクチンと同様に多様であった。

ビトロネクチンの統一分子像を考えるためには、精製動物ビトロネクチンおよびビトロネクチン様タンパク質の分子量やバンドの数が、種により多様であることが1つの問題である。また、ヒトビトロネクチンの分子量の問題点としては、SDS電気泳動で75 kDaである分子量が、一次構造より推定される分子量52 kDaよりもかなり大きいことがあった。これらの分子量の問題を解決することが、ビトロネクチンの統一分子像を見つけるカギになると思われた。分子量の問題は、①糖がポリペプチド鎖に結合しており、その含量が種により多様であること②ビトロネクチンの見かけの分子量がSDS電気泳動のゲル濃度によって変化するため、通常分子量推定がビトロネクチンには当てはめることができないことの2つに起因する可能性が高かった。そこで、精製したビトロネクチンの糖鎖を切断し、ゲル濃度によらない分子量算定法のファーガソンプロットを行ってビトロネクチンの分子量を求めた。その結果、ビトロネクチンのポリペプチド鎖部分の分子量は40-57 kDaで、cDNAより推定される分子量とよく似た値となった。また、カルボキシ末端から5-13 kDaの位置にヒト

ビトロネクチンと同様のポリペプチド切断点があるとする、動物ビトロネクチンはもともと50-57 kDaで合成されることになる。そして分子によって切断を受けるものと受けないものがあるため、分子量やバンドの数に多様性が生ずるのではない。つまり、ビトロネクチンの動物種多様性は糖鎖部分とペプチド鎖切断の有無によるもので、基本的なポリペプチド鎖部分の構造は統一性をもつと推測された。

では、ビトロネクチン様分子として検出されたものも動物ビトロネクチンと同様の分子像を持つのだろうか。そこで、ビトロネクチン様タンパク質を検出できた最も原始的生物、粘菌のビトロネクチン様タンパク質について調べることにした。70 kDaの粘菌ビトロネクチン様タンパク質を粘菌のホモジネートの不溶性画分から、0.8 % TritonX-100で抽出し、抗体セファロースカラムクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィー、SDS電気泳動ゲルからの電氣的抽出を経て精製した。精製された粘菌ビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端アミノ酸配列は、高等動物のものとは相同性がみられなかった。しかし、この分子にはヘパリン結合性やRGD配列依存性の細胞伸展活性があった。これらの結果より、粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、動物ビトロネクチンと全く同じ分子像を持っているわけではないが、ビトロネクチン分子に非常に似た分子であると考えられた。

このようにビトロネクチンの大量精製法が確立し、分子像が明らかになってくると、他方ではビトロネクチンを細胞機能制御材料や医薬用血漿製剤に利用しようとするようになる。そのようなビトロネクチンの利用時に想定される処理条件として、煮沸やオートクレーブによる滅菌がある。そこで、熱やオートクレーブ処理によりビトロネクチンの細胞伸展活性がどの様に変化するかを調べた。その結果、ビトロネクチンは、100℃、10分の熱処理や121℃、1.2 kg / cm²、20分のオートクレーブ処理によってもその細胞伸展活性を失うことはなく、その活性は未処理のものと同じ比活性を示し、RGD配列依存性であった。またオートクレーブ処理によって、ビトロネクチンの分解と高分子量化が生じたが、この変化は還元剤の添加により部分的に抑制できた。以上のことから、ビトロネクチンを煮沸、オートクレーブで滅菌し、医薬や細胞培養へと応用していくことが可能となった。

英文概要

STRUCTURE AND FUNCTION OF VITRONECTIN

KOYOMI MIYAZAKI

Vitronectin is a multifunctional glycoprotein in animal blood plasma. It promotes adhesion and migration of cells in an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence dependent manner. Furthermore it modulates immune complement, blood coagulation and fibrinolytic systems. Vitronectin is also known to be a heparin-binding protein, and is instantly purified from human plasma by heparin affinity chromatography in the presence of urea. Although there have been many reports on vitronectin from human, there has been few reports from other animals and no report from primitive organisms.

To know a general structure and function of vitronectin, I tried to identify and characterize vitronectins in a variety of living organisms.

Animal plasma vitronectins can be purified from rabbit, mouse, rat, hamster, guinea pig, dog, horse, porcine, bovine, goat, sheep, chicken, and goose using heparin affinity column. The apparent molecular weights of these vitronectins range from 59 to 78 kDa in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In addition, the number of bands also varied from 1-3. Proteins reacting with anti-vitronectin antibody were also detected on the immunoblot of 13 more species including *Drosophila* and *Physarum*. Almost all of these vitronectin-like proteins showed marked species-specific variations in their apparent molecular weights from 51 to 96 kDa in SDS-PAGE.

I attempt to know the uniformity of animal vitronectin polypeptide. Purified animal vitronectins have similar amino terminal sequences. Furthermore, vitronectins were deglycosylated and examined by Ferguson plot analysis. The size of the polypeptide portion of vitronectins was estimated to range from 40 to 57 kDa which was 19-26 kDa smaller than original values. Supposing a possible cleavage site at 5-13 kDa far from the carboxyl terminus, all vitronectin

polypeptide were speculated to be synthesized de novo in the size range of 50–57 kDa. Cell–spreading activity, heparin– and collagen–binding activities, which are buried through polypeptide region, are conserved among animal vitronectin. Therefore, animal vitronectins have uniformity in polypeptide and variety in sugar moiety.

Physarum is the most primitive organism producing vitronectin–like protein. To know the similarity of vitronectin–like protein in primitive organisms to animal vitronectins, the protein was purified to homogeneity from *Physarum* microplasmidia by four steps: extraction from the insoluble cell debris, immunoaffinity chromatography, heparin affinity chromatography, and electroelution of preparative SDS–PAGE. The amino terminal sequence of *Physarum* vitronectin had no similarity to NH₂–terminal sequences of animal vitronectins. *Physarum* vitronectin was efficient in mediating cell–spreading of BHK cells, which was specifically inhibited by RGD–containing synthetic peptides.

For application of animal vitronectins, I have investigated the heat and autoclave resistant properties of the cell–spreading activity of vitronectin. Vitronectin heated at 100 °C for 10 min or autoclaved at 121 °C at 1.2 kg/cm² for 20 min retained the same cell–spreading activity as native vitronectin. In contrast, fibronectin and type I collagen treated in the same way lost its activity almost completely. GRGDSP remarkably inhibited the cell–spreading activity of native, heated, and autoclaved vitronectins. GRGESP did not inhibit the activity of native vitronectin, but unexpectedly partially inhibited the cell–spreading activity of the activity of both heated and autoclaved vitronectins. In SDS–PAGE, vitronectin heated at 100 °C migrated mainly as a monomer, but autoclaved vitronectin migrated at both the top and front of the gel instead of at the position of the monomer. The change in molecular size during the heat and autoclave treatments was partially prevented by adding 10 mM dithiothreitol to the protein solution.