

第II章 ビトロネクチンの 系統学的分布

1. はじめに

生物には普遍的な現象がいくつかある。細胞接着も、動物、植物、微生物など生物に広く見いだされる普遍的な現象のひとつである。細胞は細胞接着因子を足場に自らの環境を安定に整え、生命活動を営む。今まで、細胞接着に関わる分子や細胞接着の重要性は、哺乳類を中心にした研究から明らかになってきたが、その他の生物では分子レベルでまだ十分に捉えられていない。つまり、細胞接着を担う分子の系統学的分布の研究はほとんどなかった。

ビトロネクチンは、ヒト血漿中の細胞伸展因子 (serum spreading factor) として同定され、その後ヒト胎盤 [14]、ヒト血小板 [18]、ウシ血清中 [43] に見つけれただけである。つまり、ビトロネクチンも系統学的分布については不明で、ヒトもしくはウシビトロネクチンの構造と機能の研究の域を出ることはなかった。

ビトロネクチンという分子が系統的に保持されているタンパク質なのかどうかは全く不明である。ビトロネクチンという分子がヒトやウシ以外の生物で進化的にどのように保持されているか。またもし保持されているとすれば、それはヒトビトロネクチンと同様の機能を果たすのか。これらのことを調べ、研究を展開していくことが、生物普遍的性質を探る上でも、応用的に利用していく上でも重要である。

そこで、まずビトロネクチン分子の系統学的な分布を明らかにすることにした。作戦として、①八藤後らによって確立された動物種を越えて適応できるビトロネクチン精製法で、動物血漿よりビトロネクチンを精製する。②精製した動物ビトロネクチンに対する抗血清を調製し、それを用いてイムノブロットを行い、各種生物中のビトロネクチン様タンパク質を検索する。という2つの方法をとった。

2. 実験材料と実験方法

2-1. 高等動物のビトロネクチンとその抗血清

高等動物ビトロネクチンは、ヒト、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ガチョウの血漿または血清より精製した。精製法は八藤後らの方法[34]に従った。

血漿は、CaCl₂を終濃度で20 mMになるように添加し、室温で1時間、更に4℃で一晩おいて凝固させた。10000 rpm、10分遠心した上清にEDTAとPMSFをそれぞれ終濃度で5 mM、1 mM加えて精製のための血清とした。

0.13 M NaCl入りPB-EDTA(10 mM リン酸緩衝液(pH 7.7)、5 mM EDTA)で平衡化したヘパリンセファロースカラムに血清をのせ、カラムの通過画分を集めた。この通過画分に尿素を終濃度で8 Mになるように加え、室温で2時間放置した。一方、ヘパリンセファロースは結合画分を溶出した後に、0.13 M NaCl、8 M 尿素入りPB-EDTAで平衡化しておいた。尿素処理した試料を再度ヘパリンセファロースカラムに添加し、0.13 M NaCl、8 M 尿素入りPB-EDTA、続いて0.13 M NaCl、8 M 尿素、10 mM 2-メルカプトエタノール入りPB-EDTAでカラムを洗浄した。カラムの結合画分を0.5 M NaCl、8 M 尿素入りPB-EDTAで溶出し、これを精製ビトロネクチン画分とした。

また、上記の方法に従って精製したヒト、ブタ、ウシ、ニワトリのビトロネクチンを抗原としてウサギのポリクローナル抗体を得た。

2-2. 様々な生物とその血液

採血したイモリの血液に抗血液凝固剤のクエン酸ナトリウムを加え、遠心して得たその上清をイモリ血漿とした。ウズラ、ジュウシマツ、イシガメ、アフリカツメガエル、キンギョ、タイ、ドジョウ、ヤツメウナギ、メクラウナギ、ワタリガニ、クルマエビ、タコ、アワビ、ハマグリ、マボヤの血液は、解剖して心臓から注射採血した。採取した血液は、2時間室温で放置し、更に4℃で一晩放置した。そして9000×gで5分遠心して、上清を各種動物血清とした。

更に下等な生物は生物全体をマイクロチューブにとり、氷上でホモジナイズした。ホモジネートに等量のSDSホモジナイズバッファー(4 % SDS、5 % 2-メ

ルカプトエタノール、20 %グリセロール、0.006 % BPB、1000 units / ml ア
プロチニン、20 μ g / ml ロイベプチン、20 mM EDTA、1.8 mM PMSF、20 mM リ
ン酸緩衝液(pH 6.8))を加え、5分、沸騰水中でインキュベートした。なお、用
いた生物は以下のもので、()内に示した方より譲り受けた(敬称略)。バフン
ウニ Hemicentrotus pulcherrimus の卵、精子、胞胚期及び原腸胚期の胚(お茶
大、馬場昭次)、ショウジョウバエ Drosophila melanogaster の成虫と3令幼
虫(お茶大、石和貞男)、線虫 Caenorhabditis elegans (岡山大、香川弘昭)、ブ
ラナリア(お茶大附高、大戸吉和)、ヒドラ Hydra magnipapillata (遺伝研、藤
沢敏孝)、カイメン Ephydatia fluviatilis (お茶大、渡辺洋子)、テトラヒメ
ナ(お茶大、能村堆子)、真性粘菌 Physarum polycephalum の微小変形体(お茶
大、室伏きみ子)、細胞性粘菌 Dictyostelium discoideum の子実体形成期と集
合期の細胞(山口大、祐村恵彦)。

2-3. SDS電気泳動

SDS電気泳動は、基本的にLaemmliの方法[61]に従い、SDSを含むポリアクリル
アミドゲルを用いたスラブ電気泳動を行った。濃縮ゲルは4 %アクリルアミド、
分離ゲルは7.5 %または10 %アクリルアミドのものを用いた。

精製ビトロネクチン、血漿、血清は、泳動前にSDSサンプルバッファー(2 %
SDS、5 % 2-メルカプトエタノール、10 %グリセロール、0.4 mM PMSF、
0.003 % BPB、10 mM リン酸緩衝液(pH 6.8))で100°C、5分処理して電気泳動用
の試料とした。SDSホモジナイズバッファーで処理した生物は、そのまま電気泳
動の試料とした。泳動条件は、12.5 mAで約2時間、その後40 mAで約2時間であ
った。

泳動終了後、ゲルは0.25 %クーマシーブリリアントブルー R-250、50 %ト
リクロロ酢酸で染色し、5 %メタノール、7.5 %酢酸で脱染した。

2-4. イムノブロッティング

イムノブロッティングは、基本的にTowbinらの方法[62]に従った。SDS電気泳
動で分離したタンパク質をセミドライ式転写装置、ホライズプロット(アトー

社)を用いて、ニトロセルロースシートに転写した。転写は、5 mM 四ほう酸水素ナトリウム溶液中で150 mA、60分間通電して行った。

タンパク質が転写されたニトロセルロースシートは、0.2 %スキムミルクを含むPBS(ブロッキング溶液)中で、室温、30分間振とうさせ、ブロッキングを行った。一次抗体として、ヒト、ブタ、ウシ及びニワトリビトロネクチンに対するウサギポリクローナル抗血清を混合して用いた。それぞれの抗血清が1 / 1000になるようにブロッキング溶液に希釈した溶液中で、シートを60分間振とうさせた。抗体液を捨て、PBS中、3回、各10分間の振とうを繰り返して洗浄をした。次に二次抗体として、抗ウサギIgGヤギIgGをブロッキング液で1 / 1500に希釈し、60分間反応させた。上記と同様の操作でシートを洗浄後、三次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ヤギIgGウサギIgGを1 / 1500に希釈し、60分間反応させた。シートを洗浄した上で、34 μ g / ml オルトジアニジン、0.01 %過酸化水素を含むPBS中でシートを振とうさせ、酵素反応による発色を行った。

抗体反応性のコントロールには、一次抗体に免疫前血清または吸収抗血清を用いた。吸収抗血清とは、抗血清に過剰量の精製ビトロネクチンを加えて反応させ、抗血清中の抗ビトロネクチン抗体だけを特異的に除いたものである。

3. 結果

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

ビトロネクチンは初めヒト血清中で見つかったものであり、現在のビトロネクチンに関する研究の大部分がヒトビトロネクチンに関するものである。しかし、8 M 尿素存在下のヘパリンアフィニティーカラムを用いたビトロネクチンの新しい精製法[34]によって、ヒト以外に、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ガチョウの14種類の動物血漿からもビトロネクチンが精製された。精製したビトロネクチンのSDS電気泳動像を図II-1に示した。ビトロネクチンの分子量は動物種により多様で、最も小さいブタの59 kDaと最も大きいウシの78 kDaを比べると、その差は19 kDaもあった(表II-1)。また、バンドの数も1-3本と多様で

あった。ヒト、イヌ、ウマ、ウシは2本のバンドであり、ヤギとヒツジは3本のバンドで、その他の動物のビトロネクチンは1本のバンドであった。さらに精製ビトロネクチンをより感度の高い検出法であるイムノブロットで調べてみた。抗血清には抗ヒトビトロネクチン抗血清、抗ブタビトロネクチン抗血清、抗ウシビトロネクチン抗血清、抗ニワトリビトロネクチン抗血清の4種混合抗血清を用いた。すると、SDS電気泳動で検出されたバンドはすべて検出され、さらにマウスとニワトリでは、わずかな量の2本目のバンドも検出された。それぞれの2本目のバンドの分子量はマウスで80 kDa、ニワトリで65 kDaであった。このことは、マウスとニワトリの精製ビトロネクチンも2本バンドであることを意味する。

14種の動物の精製前の血漿または血清を上記と同様にイムノブロットしたところ、SDS電気泳動で検出されたバンド(図Ⅱ-1)はすべて検出された。ただし、マウスとニワトリでは、図Ⅱ-1のバンド以外に、マウスでは80 kDa、ニワトリでは65 kDaのバンドも検出され、これは精製ビトロネクチンをイムノブロットした結果と一致していた。従って、精製されたビトロネクチンは、精製段階での分解がほとんどなく、血中の分子を反映しているものと考えられる。

3-2. ビトロネクチンの系統学的分布

前項で述べたように抗ビトロネクチン抗体を用いたイムノブロットで、14種の高等動物血漿や血清中のビトロネクチンを検出することができた。そこで、大量の血液を採取することができない生物や血液を持たない下等な生物中にビトロネクチンが存在しているかどうか、イムノブロットによって調べることにした。その結果を表Ⅱ-2にまとめた。38 kDaから170 kDaにわたる分子量をもつタンパク質が様々な生物の中に検出された。特に強い染色がみられたのは、ウズラやジュウシマツの血清、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の成虫(図Ⅱ-2)、線虫 *Caenorhabditis elegans*、真性粘菌 *Physarum polycephalum* (図Ⅱ-3)であった。また染色は弱かったが、イシガメ、イモリ、アフリカツメガエル、キンギョ、タイ、ドジョウ、メクラウナギ、クルマエビ、ワタリガニの血清中にもビトロネクチン様タンパク質が検出された。これらのビトロネクチン様タンパク質は、免疫前血清(図Ⅱ-2、3の各レーン3)や吸収抗血清(図Ⅱ-2、3の各レーン4)では染色されなかった。これは、ビトロ

ネクチン抗体が特異的に各種生物のビトロネクチン様タンパク質と反応している結果である。しかし、タコ、ハマグリ、アワビ、ヤツメウナギ、ホヤの血清やウニ、プラナリア、ヒドラ、カイメン、細胞性粘菌のホモジネートには、ビトロネクチン様タンパク質を検出できなかった。

以上の結果から、系統学的なビトロネクチン様タンパク質の分布を図Ⅱ-4の系統樹に示した。抗ビトロネクチン抗体と反応するタンパク質は、両生類や魚類などの脊椎動物、節足動物、線形動物、粘菌類に分布し、系統学的関連をもって検出されることはなかった。分子量は、線虫を除いて51から96 kDaで、バンドの数も1-2本と高等動物のビトロネクチンの分子量範囲やバンドの数(図Ⅱ-1、表Ⅱ-1)によく対応していた。

またショウジョウバエでは、ビトロネクチン様タンパク質が幼虫には存在しないが成虫には存在しており、発生段階における差異が見られた。

4. 考察

1980年代のビトロネクチンの研究は、ほとんどがヒトビトロネクチンに焦点をあてたものであった。しかし、ビトロネクチンの生物における普遍的な性状を明らかにしていくためには、様々な生物からのビトロネクチンの特徴づけが必要である。マウス、ラットなどの実験小動物や粘菌、ショウジョウバエなどの実験によく使われる下等生物のビトロネクチンは、ビトロネクチンを実験的に取り扱うときの良い材料となる。八藤後ら[34]の精製法の確立によって、ヒト以外の動物血漿よりもビトロネクチンを精製することが可能となり、14種の精製動物ビトロネクチンが精製された。これらの高等動物は、動物実験によく用いられており、今後動物実験への研究の展開が予想される。

他のグループによる動物ビトロネクチンの報告には、1988年のKorc-Grodzickiら[67]によるものがある。彼らは、ヒト血漿中のビトロネクチンがプロテインカイネースAによって選択的にリン酸化されることを見つけた。そこで、その他の動物の血漿タンパク質についても同様に調べ、ウサギで135 kDa、モルモットで75 kDa、ラットで140、116、75 kDa、マウスで90 kDaのタンパク質が選択的にリン酸化され、これらがビトロネクチンではないかと報告している[68]。しかしながら、これらのタンパク質の分子量は、モルモットとラ

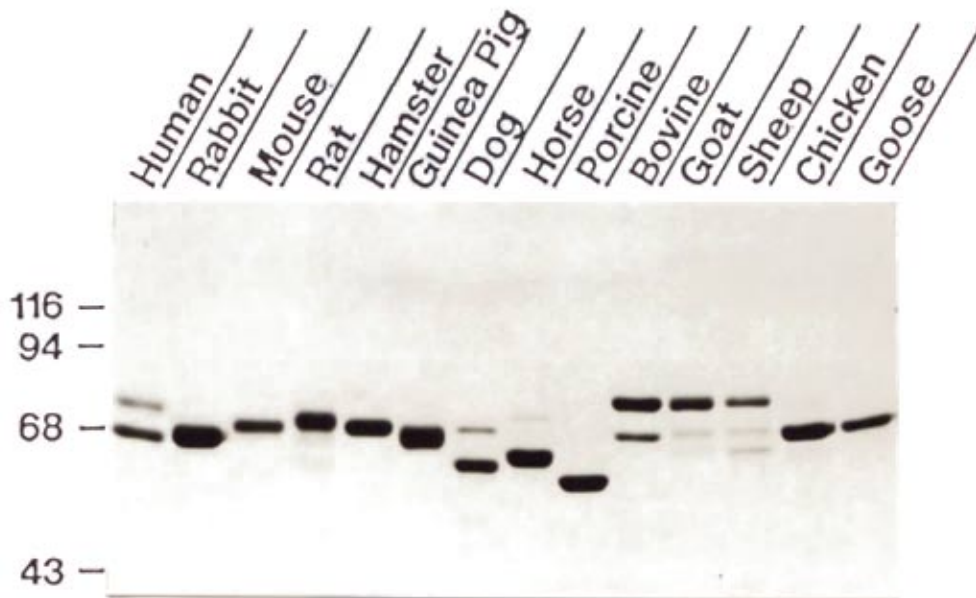
ットの75 kDa以外では、今回のビトロネクチンよりはるかに大きい。プロテインカイネースAによるリン酸化の実験は行わなかったが、彼らの報告したタンパク質のうち、いくつかは、ビトロネクチンとは異なるタンパク質と推定される。

また、抗ビトロネクチン抗体と交差反応するタンパク質が、鳥類、爬虫類、アフリカツメガエルやイモリなどの両生類、魚類といった脊椎動物、線虫、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* などの無脊椎動物、粘菌 *Physarum polycephalum* 中にも検出された。アフリカツメガエルやイモリは初期発生の研究に有用で、外来遺伝子の導入などの研究が進んでいる。ショウジョウバエでは、古くからの遺伝学的知見の蓄積はもちろんのこと、発生学、行動学の研究が盛んである。線虫 *Caenorhabditis elegans* は、受精卵から成虫に至るまでの細胞の系譜が完成している唯一の生物で、発生学研究上、有用な生物である。粘菌は、細胞運動、核分裂、細胞融合などの研究に古くから用いられている。このように、今回ビトロネクチン様タンパク質の見つかった生物は、他分野の研究が大きく進んでいるものが多い。今まで不十分であったビトロネクチン研究の発生、増殖、運動への展開に道を開く可能性が高い。また、系統学的に全ての生物にビトロネクチンを検出することはできなかったが、生物界に広く分布が確認できた接着分子は、このビトロネクチンが最初である。ビトロネクチンを通して細胞接着の普遍的性質を調べられる可能性があり、非常に重要な発見であった。ただし、このビトロネクチン様タンパク質は抗ビトロネクチン抗体と反応しただけで、まだビトロネクチン分子であるとは言い切れない。これらのタンパク質の精製や特徴づけを行って、ビトロネクチンとの構造や機能の類似性の検討が次の課題になる。

最近になって、いくつかのグループが植物中のビトロネクチン様タンパク質を報告した。Sandersらはヒトビトロネクチン抗体と反応する55 kDaのビトロネクチン様タンパク質とヒトビトロネクチンのcDNAとハイブリダイズする遺伝子を顕花植物の中に見つけている[63]。また、Wagnerらは、褐ソウ類中にビトロネクチン抗体と反応するビトロネクチン様タンパク質を検出しており、それが胚の接着に重要な働きをしているらしいと報告している[64]。さらに、Zhuらはタバコの細胞のなかにビトロネクチン様タンパク質を見つけ、特徴づけを行っている[65]。今回、植物ビトロネクチンの検討は行わなかったが、これらの報告と考えあわせると、やはりビトロネクチンは、動物、植物、菌類に広く分布している分子のようである。

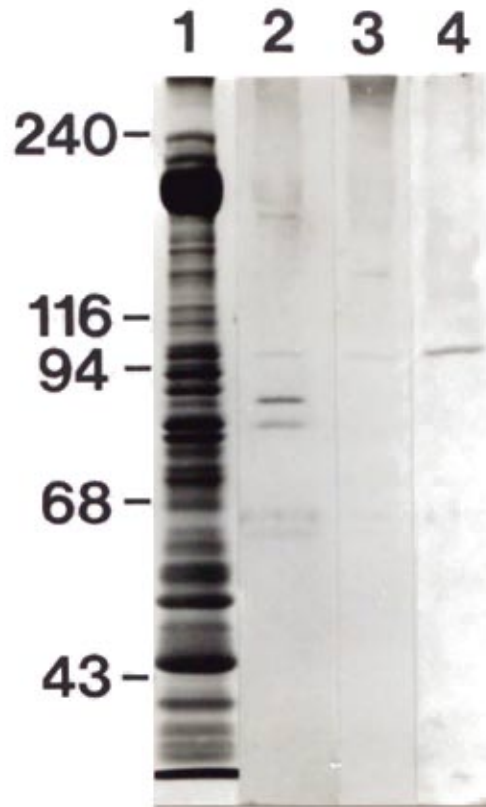
発生学の見地からの興味深い事実として、ショウジョウバエのビトロネクチン様タンパク質が成虫に存在しており、3令幼虫には存在していないことがあった。ショウジョウバエの細胞外マトリックス分子は、今回のビトロネクチン以外に、Gratecosら[66]による、フィブロネクチン様タンパク質がある。しかし、このフィブロネクチン様タンパク質は成虫と3令幼虫のどちらにも検出されている。つまり、同じ細胞外マトリックス分子でも、今回のビトロネクチン様タンパク質とGratecosらのフィブロネクチン様タンパク質とは異なった発現をしている。ビトロネクチン様タンパク質は、発生の遅い段階に生じ、初期発生とはあまり関係していないのかも知れない。ショウジョウバエにおいて少なくとも、ビトロネクチン様タンパク質はフィブロネクチン様タンパク質とは異なる場面で異なる役目を担っているのだろう。

ところで、SDS電気泳動およびイムノブロットでの各種ビトロネクチン、ビトロネクチン様タンパク質を比較してみると、バンドの数やその割合が生物によって様々であった。今までにヒトビトロネクチンでも、2つのバンドの割合は個人によって様々であることが知られていた[37, 38]。ヒトビトロネクチンの場合、2つのともに優性にはたらく遺伝子が存在しており、1つはプロテアーゼ感受性の分子(65 kDa)を、もう1つはプロテアーゼに耐性の分子(75 kDa)を合成する。そして、その2つの遺伝子の組み合わせによって、ビトロネクチンの2つのバンドの量比が決定されていると考えられている[39, 40]。5-13 kDaの差のある2本のバンドのマウス、イヌ、ウマ、ウシ、ニワトリ、ジュウシマツ、ショウジョウバエ、イシガメ、ワタリガニ、クルマエビのビトロネクチンでは、ヒトと同様の現象が起こっているのではないか。つまり、個体間でその量比が異なっていたり、バンド量比を決定する遺伝子が働いていたりするのではないか。また、1本しかバンドが検出されなかった種においても、本来は2本バンドのもので、マイナーなバンドが検出できなかったもしくは、完全に切れているまたは全く切れていないタイプである可能性もある。さらに、3本のバンドが検出された種では、2本鎖の分解が進んだものではないだろうか。ヒトビトロネクチンの2本のバンドの間には、ヘパリンの結合性[41]、セロトニンの結合性[42]、リン酸化[31, 32]などの違いが見られる。これは、他の動物ビトロネクチンにも同様に見られることが予想される。今後、動物種間の機能を比較して、バンドの数により特有な機能の差が見つかってくれば、2種の分子種の存在する意味やヒトのビトロネクチン血液型のもつ意味などの解明に役立つであろう。



図Ⅱ-1. 14種精製動物ビトロネクチンのSDS電気泳動

14種の動物血漿より八藤後ら[34]の方法に従い、ビトロネクチンを精製した。精製したビトロネクチンは、2% SDS、5% 2-メルカプトエタノールで、100°C、5分処理した。4% アクリルアミドの濃縮ゲルと7.5% アクリルアミドの分離ゲルを用いてSDS電気泳動し、クーマシーブリリアントブルーで染色した。左に示した数字は、分子量マーカータンパク質の分子量とその泳動位置である。



図Ⅱ-2. *Drosophila melanogaster*のピトロネクチン抗体によるイムノブロット

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 成虫のホモジネートを各レーン1.5匹分ずつ、7.5%アクリルアミドの分離ゲルでSDS電気泳動により分離した。ゲル中のタンパク質は、クーマシーブリリアントブルーで染色した(レーン1)。イムノブロットは、一次抗体として、抗ウシピトロネクチンウサギ抗血清を(レーン2)、コントロールとして免疫前血清(レーン3)と吸収抗血清(レーン4)を用いた。左の数字は、分子量マーカータンパク質の分子量と泳動位置である。

第II章 ビトロネクチンの 系統学的分布

1. はじめに

生物には普遍的な現象がいくつかある。細胞接着も、動物、植物、微生物など生物に広く見いだされる普遍的な現象のひとつである。細胞は細胞接着因子を足場に自らの環境を安定に整え、生命活動を営む。今まで、細胞接着に関わる分子や細胞接着の重要性は、哺乳類を中心にした研究から明らかになってきたが、その他の生物では分子レベルでまだ十分に捉えられていない。つまり、細胞接着を担う分子の系統学的分布の研究はほとんどなかった。

ビトロネクチンは、ヒト血漿中の細胞伸展因子 (serum spreading factor) として同定され、その後ヒト胎盤 [14]、ヒト血小板 [18]、ウシ血清中 [43] に見つけれただけである。つまり、ビトロネクチンも系統学的分布については不明で、ヒトもしくはウシビトロネクチンの構造と機能の研究の域を出ることはなかった。

ビトロネクチンという分子が系統的に保持されているタンパク質なのかどうかは全く不明である。ビトロネクチンという分子がヒトやウシ以外の生物で進化的にどのように保持されているか。またもし保持されているとすれば、それはヒトビトロネクチンと同様の機能を果たすのか。これらのことを調べ、研究を展開していくことが、生物普遍的性質を探る上でも、応用的に利用していく上でも重要である。

そこで、まずビトロネクチン分子の系統学的な分布を明らかにすることにした。作戦として、①八藤後らによって確立された動物種を越えて適応できるビトロネクチン精製法で、動物血漿よりビトロネクチンを精製する。②精製した動物ビトロネクチンに対する抗血清を調製し、それを用いてイムノブロットを行い、各種生物中のビトロネクチン様タンパク質を検索する。という2つの方法をとった。

2. 実験材料と実験方法

2-1. 高等動物のビトロネクチンとその抗血清

高等動物ビトロネクチンは、ヒト、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ガチョウの血漿または血清より精製した。精製法は八藤後らの方法[34]に従った。

血漿は、CaCl₂を終濃度で20 mMになるように添加し、室温で1時間、更に4℃で一晩おいて凝固させた。10000 rpm、10分遠心した上清にEDTAとPMSFをそれぞれ終濃度で5 mM、1 mM加えて精製のための血清とした。

0.13 M NaCl入りPB-EDTA(10 mM リン酸緩衝液(pH 7.7)、5 mM EDTA)で平衡化したヘパリンセファロースカラムに血清をのせ、カラムの通過画分を集めた。この通過画分に尿素を終濃度で8 Mになるように加え、室温で2時間放置した。一方、ヘパリンセファロースは結合画分を溶出した後に、0.13 M NaCl、8 M 尿素入りPB-EDTAで平衡化しておいた。尿素処理した試料を再度ヘパリンセファロースカラムに添加し、0.13 M NaCl、8 M 尿素入りPB-EDTA、続いて0.13 M NaCl、8 M 尿素、10 mM 2-メルカプトエタノール入りPB-EDTAでカラムを洗浄した。カラムの結合画分を0.5 M NaCl、8 M 尿素入りPB-EDTAで溶出し、これを精製ビトロネクチン画分とした。

また、上記の方法に従って精製したヒト、ブタ、ウシ、ニワトリのビトロネクチンを抗原としてウサギのポリクローナル抗体を得た。

2-2. 様々な生物とその血液

採血したイモリの血液に抗血液凝固剤のクエン酸ナトリウムを加え、遠心して得たその上清をイモリ血漿とした。ウズラ、ジュウシマツ、イシガメ、アフリカツメガエル、キンギョ、タイ、ドジョウ、ヤツメウナギ、メクラウナギ、ワタリガニ、クルマエビ、タコ、アワビ、ハマグリ、マボヤの血液は、解剖して心臓から注射採血した。採取した血液は、2時間室温で放置し、更に4℃で一晩放置した。そして9000×gで5分遠心して、上清を各種動物血清とした。

更に下等な生物は生物全体をマイクロチューブにとり、氷上でホモジナイズした。ホモジネートに等量のSDSホモジナイズバッファー(4 % SDS、5 % 2-メ

ルカプトエタノール、20 %グリセロール、0.006 % BPB、1000 units / ml ア
プロチニン、20 μ g / ml ロイベプチン、20 mM EDTA、1.8 mM PMSF、20 mM リ
ン酸緩衝液(pH 6.8))を加え、5分、沸騰水中でインキュベートした。なお、用
いた生物は以下のもので、()内に示した方より譲り受けた(敬称略)。バフン
ウニ Hemicentrotus pulcherrimus の卵、精子、胞胚期及び原腸胚期の胚(お茶
大、馬場昭次)、ショウジョウバエ Drosophila melanogaster の成虫と3令幼
虫(お茶大、石和貞男)、線虫 Caenorhabditis elegans (岡山大、香川弘昭)、ブ
ラナリア(お茶大附高、大戸吉和)、ヒドラ Hydra magnipapillata (遺伝研、藤
沢敏孝)、カイメン Ephydatia fluviatilis (お茶大、渡辺洋子)、テトラヒメ
ナ(お茶大、能村堆子)、真性粘菌 Physarum polycephalum の微小変形体(お茶
大、室伏きみ子)、細胞性粘菌 Dictyostelium discoideum の子実体形成期と集
合期の細胞(山口大、祐村恵彦)。

2-3. SDS電気泳動

SDS電気泳動は、基本的にLaemmliの方法[61]に従い、SDSを含むポリアクリル
アミドゲルを用いたスラブ電気泳動を行った。濃縮ゲルは4 %アクリルアミド、
分離ゲルは7.5 %または10 %アクリルアミドのものを用いた。

精製ビトロネクチン、血漿、血清は、泳動前にSDSサンプルバッファー(2 %
SDS、5 % 2-メルカプトエタノール、10 %グリセロール、0.4 mM PMSF、
0.003 % BPB、10 mM リン酸緩衝液(pH 6.8))で100°C、5分処理して電気泳動用
の試料とした。SDSホモジナイズバッファーで処理した生物は、そのまま電気泳
動の試料とした。泳動条件は、12.5 mAで約2時間、その後40 mAで約2時間であ
った。

泳動終了後、ゲルは0.25 %クーマシーブリリアントブルー R-250、50 %ト
リクロロ酢酸で染色し、5 %メタノール、7.5 %酢酸で脱染した。

2-4. イムノブロッティング

イムノブロッティングは、基本的にTowbinらの方法[62]に従った。SDS電気泳
動で分離したタンパク質をセミドライ式転写装置、ホライズプロット(アトー

社)を用いて、ニトロセルロースシートに転写した。転写は、5 mM 四ほう酸水素ナトリウム溶液中で150 mA、60分間通電して行った。

タンパク質が転写されたニトロセルロースシートは、0.2 %スキムミルクを含むPBS(ブロッキング溶液)中で、室温、30分間振とうさせ、ブロッキングを行った。一次抗体として、ヒト、ブタ、ウシ及びニワトリビトロネクチンに対するウサギポリクローナル抗血清を混合して用いた。それぞれの抗血清が1 / 1000になるようにブロッキング溶液に希釈した溶液中で、シートを60分間振とうさせた。抗体液を捨て、PBS中、3回、各10分間の振とうを繰り返して洗浄をした。次に二次抗体として、抗ウサギIgGヤギIgGをブロッキング液で1 / 1500に希釈し、60分間反応させた。上記と同様の操作でシートを洗浄後、三次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ヤギIgGウサギIgGを1 / 1500に希釈し、60分間反応させた。シートを洗浄した上で、34 μ g / ml オルトジアニジン、0.01 %過酸化水素を含むPBS中でシートを振とうさせ、酵素反応による発色を行った。

抗体反応性のコントロールには、一次抗体に免疫前血清または吸収抗血清を用いた。吸収抗血清とは、抗血清に過剰量の精製ビトロネクチンを加えて反応させ、抗血清中の抗ビトロネクチン抗体だけを特異的に除いたものである。

3. 結果

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

ビトロネクチンは初めヒト血清中で見つかったものであり、現在のビトロネクチンに関する研究の大部分がヒトビトロネクチンに関するものである。しかし、8 M 尿素存在下のヘパリンアフィニティーカラムを用いたビトロネクチンの新しい精製法[34]によって、ヒト以外に、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ガチョウの14種類の動物血漿からもビトロネクチンが精製された。精製したビトロネクチンのSDS電気泳動像を図II-1に示した。ビトロネクチンの分子量は動物種により多様で、最も小さいブタの59 kDaと最も大きいウシの78 kDaを比べると、その差は19 kDaもあった(表II-1)。また、バンドの数も1-3本と多様で

あった。ヒト、イヌ、ウマ、ウシは2本のバンドであり、ヤギとヒツジは3本のバンドで、その他の動物のビトロネクチンは1本のバンドであった。さらに精製ビトロネクチンをより感度の高い検出法であるイムノブロットで調べてみた。抗血清には抗ヒトビトロネクチン抗血清、抗ブタビトロネクチン抗血清、抗ウシビトロネクチン抗血清、抗ニワトリビトロネクチン抗血清の4種混合抗血清を用いた。すると、SDS電気泳動で検出されたバンドはすべて検出され、さらにマウスとニワトリでは、わずかな量の2本目のバンドも検出された。それぞれの2本目のバンドの分子量はマウスで80 kDa、ニワトリで65 kDaであった。このことは、マウスとニワトリの精製ビトロネクチンも2本バンドであることを意味する。

14種の動物の精製前の血漿または血清を上記と同様にイムノブロットしたところ、SDS電気泳動で検出されたバンド(図Ⅱ-1)はすべて検出された。ただし、マウスとニワトリでは、図Ⅱ-1のバンド以外に、マウスでは80 kDa、ニワトリでは65 kDaのバンドも検出され、これは精製ビトロネクチンをイムノブロットした結果と一致していた。従って、精製されたビトロネクチンは、精製段階での分解がほとんどなく、血中の分子を反映しているものと考えられる。

3-2. ビトロネクチンの系統学的分布

前項で述べたように抗ビトロネクチン抗体を用いたイムノブロットで、14種の高等動物血漿や血清中のビトロネクチンを検出することができた。そこで、大量の血液を採取することができない生物や血液を持たない下等な生物中にビトロネクチンが存在しているかどうか、イムノブロットによって調べることにした。その結果を表Ⅱ-2にまとめた。38 kDaから170 kDaにわたる分子量をもつタンパク質が様々な生物の中に検出された。特に強い染色がみられたのは、ウズラやジュウシマツの血清、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の成虫(図Ⅱ-2)、線虫 *Caenorhabditis elegans*、真性粘菌 *Physarum polycephalum* (図Ⅱ-3)であった。また染色は弱かったが、イシガメ、イモリ、アフリカツメガエル、キンギョ、タイ、ドジョウ、メクラウナギ、クルマエビ、ワタリガニの血清中にもビトロネクチン様タンパク質が検出された。これらのビトロネクチン様タンパク質は、免疫前血清(図Ⅱ-2、3の各レーン3)や吸収抗血清(図Ⅱ-2、3の各レーン4)では染色されなかった。これは、ビトロ

ネクチン抗体が特異的に各種生物のビトロネクチン様タンパク質と反応している結果である。しかし、タコ、ハマグリ、アワビ、ヤツメウナギ、ホヤの血清やウニ、プラナリア、ヒドラ、カイメン、細胞性粘菌のホモジネートには、ビトロネクチン様タンパク質を検出できなかった。

以上の結果から、系統学的なビトロネクチン様タンパク質の分布を図Ⅱ-4の系統樹に示した。抗ビトロネクチン抗体と反応するタンパク質は、両生類や魚類などの脊椎動物、節足動物、線形動物、粘菌類に分布し、系統学的関連をもって検出されることはなかった。分子量は、線虫を除いて51から96 kDaで、バンドの数も1-2本と高等動物のビトロネクチンの分子量範囲やバンドの数(図Ⅱ-1、表Ⅱ-1)によく対応していた。

またショウジョウバエでは、ビトロネクチン様タンパク質が幼虫には存在しないが成虫には存在しており、発生段階における差異が見られた。

4. 考察

1980年代のビトロネクチンの研究は、ほとんどがヒトビトロネクチンに焦点をあてたものであった。しかし、ビトロネクチンの生物における普遍的な性状を明らかにしていくためには、様々な生物からのビトロネクチンの特徴づけが必要である。マウス、ラットなどの実験小動物や粘菌、ショウジョウバエなどの実験によく使われる下等生物のビトロネクチンは、ビトロネクチンを実験的に取り扱うときの良い材料となる。八藤後ら[34]の精製法の確立によって、ヒト以外の動物血漿よりもビトロネクチンを精製することが可能となり、14種の精製動物ビトロネクチンが精製された。これらの高等動物は、動物実験によく用いられており、今後動物実験への研究の展開が予想される。

他のグループによる動物ビトロネクチンの報告には、1988年のKorc-Grodzickiら[67]によるものがある。彼らは、ヒト血漿中のビトロネクチンがプロテインカイネースAによって選択的にリン酸化されることを見つけた。そこで、その他の動物の血漿タンパク質についても同様に調べ、ウサギで135 kDa、モルモットで75 kDa、ラットで140、116、75 kDa、マウスで90 kDaのタンパク質が選択的にリン酸化され、これらがビトロネクチンではないかと報告している[68]。しかしながら、これらのタンパク質の分子量は、モルモットとラ

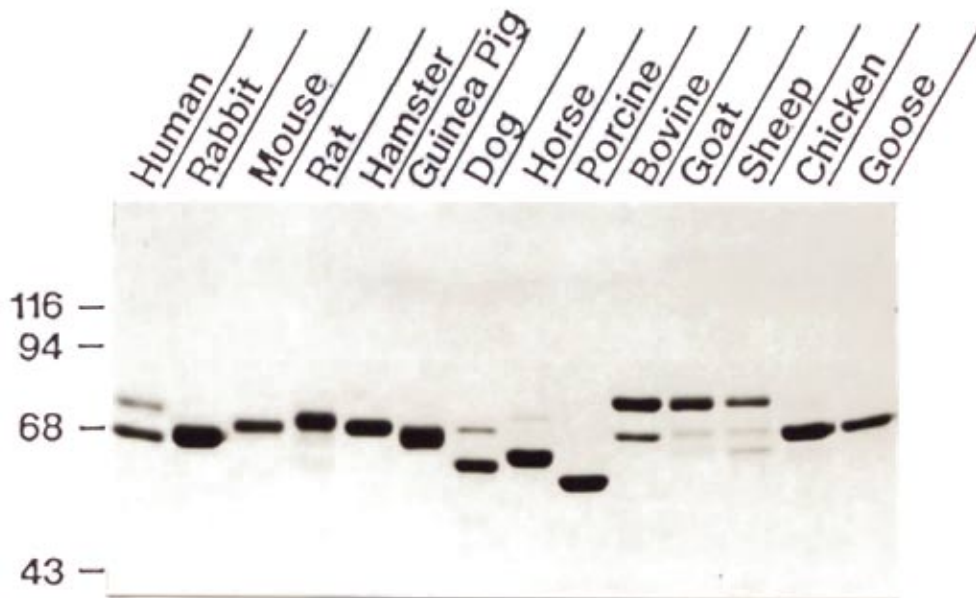
ットの75 kDa以外では、今回のビトロネクチンよりはるかに大きい。プロテインカイネースAによるリン酸化の実験は行わなかったが、彼らの報告したタンパク質のうち、いくつかは、ビトロネクチンとは異なるタンパク質と推定される。

また、抗ビトロネクチン抗体と交差反応するタンパク質が、鳥類、爬虫類、アフリカツメガエルやイモリなどの両生類、魚類といった脊椎動物、線虫、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* などの無脊椎動物、粘菌 *Physarum polycephalum* 中にも検出された。アフリカツメガエルやイモリは初期発生の研究に有用で、外来遺伝子の導入などの研究が進んでいる。ショウジョウバエでは、古くからの遺伝学的知見の蓄積はもちろんのこと、発生学、行動学の研究が盛んである。線虫 *Caenorhabditis elegans* は、受精卵から成虫に至るまでの細胞の系譜が完成している唯一の生物で、発生学研究上、有用な生物である。粘菌は、細胞運動、核分裂、細胞融合などの研究に古くから用いられている。このように、今回ビトロネクチン様タンパク質の見つかった生物は、他分野の研究が大きく進んでいるものが多い。今まで不十分であったビトロネクチン研究の発生、増殖、運動への展開に道を開く可能性が高い。また、系統学的に全ての生物にビトロネクチンを検出することはできなかったが、生物界に広く分布が確認できた接着分子は、このビトロネクチンが最初である。ビトロネクチンを通して細胞接着の普遍的性質を調べられる可能性があり、非常に重要な発見であった。ただし、このビトロネクチン様タンパク質は抗ビトロネクチン抗体と反応しただけで、まだビトロネクチン分子であるとは言い切れない。これらのタンパク質の精製や特徴づけを行って、ビトロネクチンとの構造や機能の類似性の検討が次の課題になる。

最近になって、いくつかのグループが植物中のビトロネクチン様タンパク質を報告した。Sandersらはヒトビトロネクチン抗体と反応する55 kDaのビトロネクチン様タンパク質とヒトビトロネクチンのcDNAとハイブリダイズする遺伝子を顕花植物の中に見つけている[63]。また、Wagnerらは、褐ソウ類中にビトロネクチン抗体と反応するビトロネクチン様タンパク質を検出しており、それが胚の接着に重要な働きをしているらしいと報告している[64]。さらに、Zhuらはタバコの細胞のなかにビトロネクチン様タンパク質を見つけ、特徴づけを行っている[65]。今回、植物ビトロネクチンの検討は行わなかったが、これらの報告と考えあわせると、やはりビトロネクチンは、動物、植物、菌類に広く分布している分子のようである。

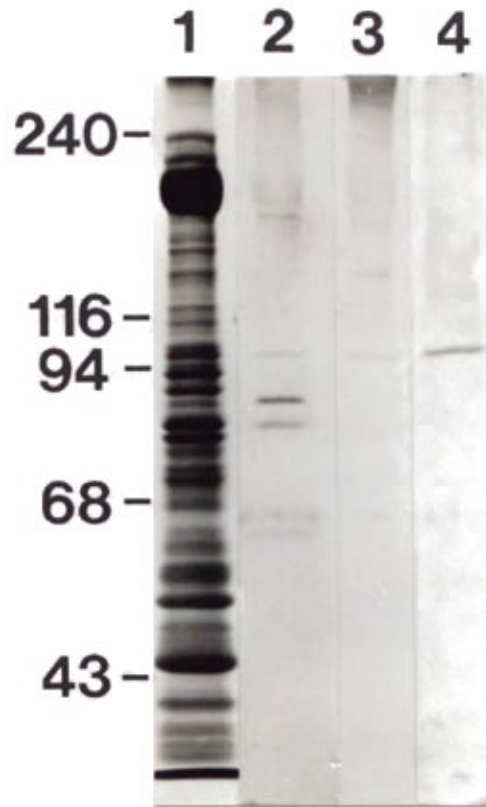
発生学の見地からの興味深い事実として、ショウジョウバエのビトロネクチン様タンパク質が成虫に存在しており、3令幼虫には存在していないことがあった。ショウジョウバエの細胞外マトリックス分子は、今回のビトロネクチン以外に、Gratecosら[66]による、フィブロネクチン様タンパク質がある。しかし、このフィブロネクチン様タンパク質は成虫と3令幼虫のどちらにも検出されている。つまり、同じ細胞外マトリックス分子でも、今回のビトロネクチン様タンパク質とGratecosらのフィブロネクチン様タンパク質とは異なった発現をしている。ビトロネクチン様タンパク質は、発生の遅い段階に生じ、初期発生とはあまり関係していないのかも知れない。ショウジョウバエにおいて少なくとも、ビトロネクチン様タンパク質はフィブロネクチン様タンパク質とは異なる場面で異なる役目を担っているのだろう。

ところで、SDS電気泳動およびイムノブロットでの各種ビトロネクチン、ビトロネクチン様タンパク質を比較してみると、バンドの数やその割合が生物によって様々であった。今までにヒトビトロネクチンでも、2つのバンドの割合は個人によって様々であることが知られていた[37, 38]。ヒトビトロネクチンの場合、2つのともに優性にはたらく遺伝子が存在しており、1つはプロテアーゼ感受性の分子(65 kDa)を、もう1つはプロテアーゼに耐性の分子(75 kDa)を合成する。そして、その2つの遺伝子の組み合わせによって、ビトロネクチンの2つのバンドの量比が決定されていると考えられている[39, 40]。5-13 kDaの差のある2本のバンドのマウス、イヌ、ウマ、ウシ、ニワトリ、ジュウシマツ、ショウジョウバエ、イシガメ、ワタリガニ、クルマエビのビトロネクチンでは、ヒトと同様の現象が起こっているのではないか。つまり、個体間でその量比が異なっていたり、バンド量比を決定する遺伝子が働いていたりするのではないか。また、1本しかバンドが検出されなかった種においても、本来は2本バンドのもので、マイナーなバンドが検出できなかったもしくは、完全に切れているまたは全く切れていないタイプである可能性もある。さらに、3本のバンドが検出された種では、2本鎖の分解が進んだものではないだろうか。ヒトビトロネクチンの2本のバンドの間には、ヘパリンの結合性[41]、セロトニンの結合性[42]、リン酸化[31, 32]などの違いが見られる。これは、他の動物ビトロネクチンにも同様に見られることが予想される。今後、動物種間の機能を比較して、バンドの数により特有な機能の差が見つかってくれば、2種の分子種の存在する意味やヒトのビトロネクチン血液型のもつ意味などの解明に役立つであろう。



図Ⅱ-1. 14種精製動物ビトロネクチンのSDS電気泳動

14種の動物血漿より八藤後ら[34]の方法に従い、ビトロネクチンを精製した。精製したビトロネクチンは、2% SDS、5% 2-メルカプトエタノールで、100°C、5分処理した。4% アクリルアミドの濃縮ゲルと7.5% アクリルアミドの分離ゲルを用いてSDS電気泳動し、クーマシーブリリアントブルーで染色した。左に示した数字は、分子量マーカータンパク質の分子量とその泳動位置である。



図Ⅱ-2. *Drosophila melanogaster*のピトロネクチン抗体によるイムノブロット

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 成虫のホモジネートを各レーン1.5匹分ずつ、7.5%アクリルアミドの分離ゲルでSDS電気泳動により分離した。ゲル中のタンパク質は、クーマシーブリリアントブルーで染色した(レーン1)。イムノブロットは、一次抗体として、抗ウシピトロネクチンウサギ抗血清を(レーン2)、コントロールとして免疫前血清(レーン3)と吸収抗血清(レーン4)を用いた。左の数字は、分子量マーカータンパク質の分子量と泳動位置である。

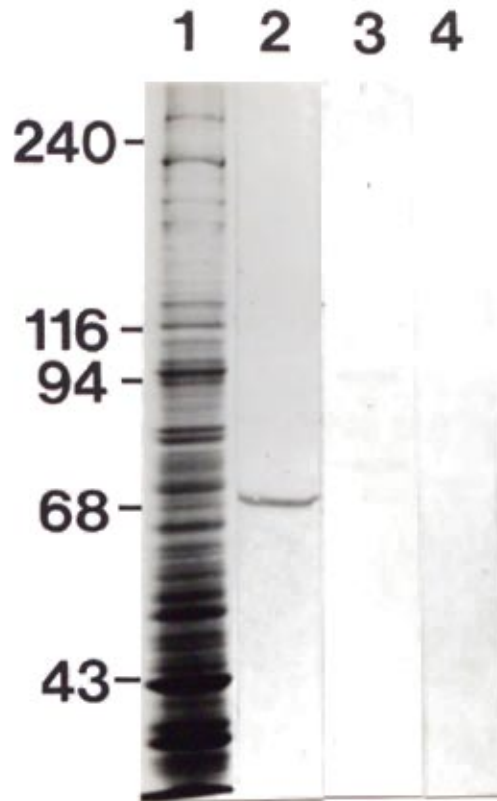


図 II - 3. *Physarum polycephalum* のビトロネクチン抗体によるイムノブロット

真性粘菌 *Physarum polycephalum* のホモジネートを7.5 %アクリルアミドの分離ゲルでSDS電気泳動した。ゲル中のタンパク質は、クーマシーブリリアントブルーで染色した(レーン1)。イムノブロットは、一次抗体として、抗ウシビトロネクチンウサギ抗血清を(レーン2)、コントロールとして免疫前血清(レーン3)と吸収抗血清(レーン4)を用いた。左の数字は、分子量マーカーの分子量と泳動位置を示してある。

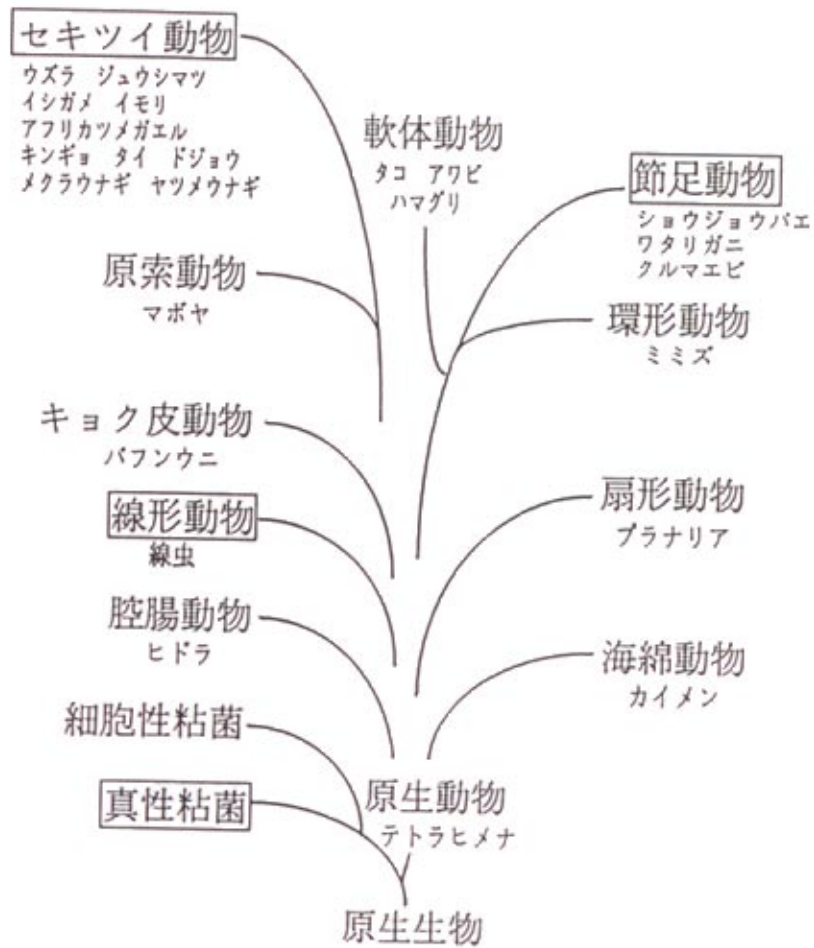


図 II - 4. ビトロネクチン様タンパク質の系統学的分布

図中に示した生物の血液またはホモジネートを SDS 電気泳動後、4 種混合抗血清でイムノブロットしてビトロネクチン様タンパク質の分布を調べた。ビトロネクチン抗体に特異的に反応したバンドを持つ群を枠で囲んだ。

動物名	見かけの分子量(kDa)
ヒト	76/68
ウサギ	68
マウス	(80)/71
ラット	73
ハムスター	71
モルモット	69
イヌ	71/63
ウマ	75/64
ブタ	59
ウシ	78/69
ヤギ	78-65
ヒツジ	78-65
ニワトリ	70/(65)
ガチョウ	71

表 II - 1. 14種の精製動物ビトロネクチンの分子量

図 II - 1 の SDS電気泳動(7.5 %アクリルアミドの分離ゲル)から14種の精製動物ビトロネクチンの見かけの分子量を求めた。分子量マーカーとして、 β -ガラクトシダーゼ(116 kDa)、ホスホリラーゼb(94 kDa)、ウシ血清アルブミン(68 kDa)、オボアルブミン(43 kDa)を用い、各タンパク質の相対移動度を分子量の対数に対してプロットしたものを標準曲線として用いた。

生物名 (血液)	抗体反応性	分子量 (kDa)	生物名 (ホモジネート)	抗体反応性	分子量 (kDa)
ウズラ	++	69	バフンウニ		
ジュウシマツ	++	69-74	卵	-	
イシガメ	+	51/79	精子	-	
イモリ	+	96	胞胚期胚	-	
アフリカツメガエル	+	58-63	原腸胚期胚	-	
キンギョ	+	86	ショウジョウバエ		
タイ	+	66/68 86-96	成虫	++	80 85
			3令幼虫	-	
ドジョウ	+	51-55 84	ミミズ	-	
			線虫	++	38 170
メクラウナギ	+	64	プラナリア	-	
ヤツメウナギ	-		ヒドラ	-	
ワタリガニ	+	66	カイメン	-	
クルマエビ	+	70	テトラヒメナ	-	
タコ	-		真性粘菌	++	70
アワビ	-		細胞性粘菌		
ハマグリ	-		子実体形成期	-	
マボヤ	-		集合期	-	

表Ⅱ-2. 動物血清および生物ホモジネート中のビトロネクチン様分子の抗体反応性と分子量

表中の動物血清および生物ホモジネート中のタンパク質を、7.5%アクリルアミド分離ゲルを用いてSDS電気泳動で分離し、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリのビトロネクチンに対するウサギ抗血清でイムノブロットを行った。抗体反応性は、イムノブロットでの特異的なバンドの発色の強さを示し、++は強く発色したもの、+は弱いが発色できたもの、-は発色しなかったものを示す。