

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

ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって、ヒト以外の動物血漿からもビトロネクチンが精製され、より下等な生物にもビトロネクチン様タンパク質を検出できた。ところが、これらの生物ビトロネクチンをSDS電気泳動で比較してみると、見かけの分子量やバンドの数が様々であった。同じ精製法で精製されたビトロネクチンがなぜ、分子量やバンドの数の多様さを持つのだろうか。性状の違いを生み出すような構造の違いを持っているのだろうか。

また、ヒトビトロネクチンのcDNAはクローニングされ、タンパク質の一次構造も決定されている[16、17]。その一次構造から、ビトロネクチンのポリペプチド鎖部分の分子量は52 kDaと言われている。一方、還元剤存在下でのSDS電気泳動から見積られたビトロネクチンの見かけの分子量は、75 kDaである。ヒトビトロネクチンが、糖鎖を5 % (4 kDa) または11 % (8-9 kDa) ふくんでいることを考慮しても、一次構造からの分子量と見かけの分子量との間に14-19 kDaのくいちがいがある。ビトロネクチンは翻訳後、分子修飾を受けているのだろうか。ビトロネクチンの分子量は、一体いくつなのか。

分子量のくいちがいという点では、今までのヒトビトロネクチンの分子量は75 kDaから80 kDaの範囲で報告され、一致していないことも疑問視される。ある時、私はヒトビトロネクチンをSDS電気泳動すると、ビトロネクチンの見かけの分子量がゲル濃度に依存して変化することに気づいた。ゲル濃度により見かけの分子量が変化する分子は、SDS電気泳動での通常分子量算出では分子量を決定することができない。ここにビトロネクチンの分子量の問題を解くカギがあるように思えた。このような分子は、ゲル濃度によらないファーガソンプロットという方法で、分子量を算出することが必要となる。

そこで精製動物血漿ビトロネクチンを使って、部分的な一次構造を同定し、糖鎖のないビトロネクチンのファーガソンプロットによる分子量を調べることにした。そして、ビトロネクチン分子が動物種間でどの様に統一的にみることができるかを調べた。

2. 実験材料と実験方法

2-1. アミノ末端アミノ酸配列分析

精製したビトロネクチンは、気相シーケンサー(アプライドバイオシステム社、477A型)にかけてアミノ末端から25残基のアミノ酸配列を同定した。分析前に、システイン残基の修飾は行わなかったため、システイン残基の同定はできなかった。

2-2. 糖鎖の切断

ビトロネクチンからの糖鎖の切断方法として、N-グリコシド結合糖鎖の切断はIiら[69]の方法を、O-グリコシド結合糖鎖の切断はFanら[70]の方法を、シアル酸の切断はThotakura and Bahl[71]の方法を参考にし、この3種類の方法を組み合わせて行なった。

まず、120 μ l(9.0 μ g)のビトロネクチンを緩衝液A(50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.6)、2 mM CaCl₂、0.2 mM EDTA)に対して透析し、0.4 % 2-メルカプトエタノールと2 % SDSを含む緩衝液Aを40 μ l加え100°C、3分間処理し、さらに0.1 % 2-メルカプトエタノールと0.8 % n-オクチル- β -D-チオグリコシドを含む緩衝液Aを640 μ l加えた。次に、8.1 μ l(8.1 mU)のノイラミニダーゼ(*Vibrio cholerae*、カルピオケム社)と、5.1 μ l(18 mU)のエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(*Alcarigenes* sp.、生化学工業)と、6.8 μ l(1.4 U)のN-グリコシダーゼF(*Flavobacterium meningosepticum*、ベーリンガーマンハイム社)を加え、37°Cで16時間インキュベートした。ここで用いたノイラミニダーゼはシアル酸を、エンド-N-アセチルガラクトサミニダーゼはO-グリコシド結合糖鎖を、N-グリコシダーゼFはN-グリコシド結合糖鎖を切断する酵素である。このようにして得た糖鎖のないビトロネクチンは、次の電気泳動の試料として濃縮するため、氷上で91 μ lの冷やした100 %トリクロロ酢酸を加えて(終濃度10 %トリクロロ酢酸)、4°Cで一晩放置した。9,000 \times gで4°C、5分間遠心(ベックマン社、マイクロフュージ B)し、上清をデカンテーションで除き、沈澱に触れないようにしながらマイクロチューブの内壁の液をキムワイプでふいた。沈澱に30 μ lの2 \times サンプルバッファーを加え(溶液は酸性のために黄色くなる)、

0.1 N NaOHを溶液の色が青色にようやく変化するまで加えた(この時pHはほぼ中性となる)。さらに、イオン交換水を加えて全体を60 μ lとし、100°C、5分間処理した。

2-3. ファーガソンプロット

第II章、2-3と同様にSDS電気泳動を行った。濃縮ゲルは4%、分離ゲルは6、7.5、10、12、13.5、または15%アクリルアミドのゲルを調製した。泳動後のゲルはクーマシーブリリアントブルーで染色し、濃縮ゲルと分離ゲルの境目から、マーカー色素であるプロモフェノールブルーまたは各タンパク質のバンドまでの距離を測定した。各タンパク質のバンドまでの距離をプロモフェノールブルーまでの距離で割って、各タンパク質の相対移動度(R_f)を求めた。この相対移動度(R_f)とアクリルアミドゲル濃度(T)との関係をプロットし(図III-3)、これにより得られる直線の傾き、つまり遅延係数(K_R)を次のようなファーガソンの式[72-74]を用いて求めた。

$$\log R_f = \log R_{f0} - K_R T$$

ここでの R_{f0} は、 $T=0$ の時に R_f が内挿した点である。次に、このようにして求めた遅延係数(K_R)と11種類の標準タンパク質の分子量の関係をプロットした(図III-4)。用いた標準タンパク質は、 β -ガラクトシダーゼ(116 kDa)、ホスホリラーゼb(94 kDa)、ラクトフェリン(80 kDa)、ウシ血清アルブミン(68 kDa)、ウサギIgG H鎖(50 kDa)、オボアルブミン(43 kDa)、アルドラーゼ(40 kDa)、サーモライシン(34.4 kDa)、カーボニックアンヒドラーゼ(30 kDa)、 α -キモトリプシノーゲンA(25.7 kDa)、ダイズトリプシンインヒビター(20.1 kDa)である。このプロットにより得られる標準カーブを用いて、ビトロネクチンの遅延係数から分子量を求めた。

3. 結果

3-1. ビトロネクチンのアミノ末端アミノ酸配列の同定

動物種間の一次構造の比較をするため、精製したビトロネクチンのアミノ末

端アミノ酸配列を調べた。その結果を図Ⅲ-1に示した。ヒトの配列はすでに報告されている全一次構造[16、17]より抜粋したアミノ酸配列を用い、ヒト以外の配列は精製したビトロネクチンを気相シーケンサーにかけて同定した。すると、14種の動物のビトロネクチンは分子量やバンドの数が多様であったにも関わらず、アミノ末端アミノ酸配列は非常に相同性が高く、ヒトとウサギでは88%もの相同性がみられた。

3-2. ビトロネクチンの糖鎖の切断

ビトロネクチンは糖タンパク質であるが、この結合糖鎖は動物種により、N-グリコシド結合糖鎖しか含まないもの、N-グリコシド結合糖鎖とO-グリコシド結合糖鎖の両方を含むがN-グリコシド結合糖鎖をより多く含むもの、N-グリコシド結合糖鎖とO-グリコシド結合糖鎖の両方を含むがO-グリコシド結合糖鎖をより多く含むものなど、多様なことが知られている[35]。そこで、図Ⅱ-1に示した分子量やバンド数の動物種多様性の原因が糖鎖部分にあるのではないかと考え、ビトロネクチンの糖鎖の切断を試みた。

N-グリコシド結合糖鎖はN-グリコシダーゼFを用いて、O-グリコシド結合糖鎖はエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼを用いて切断した。エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、シアル酸のついている糖鎖は切断できないため、あらかじめノイラミニダーゼでシアル酸をはずした。

図Ⅲ-2に14種動物ビトロネクチンから糖鎖をはずした結果を示した。上側に見えるバンドはエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼである。糖鎖をはずすことによりビトロネクチンの分子量は3-14 kDa小さくなった(表Ⅲ-1(c))。そして、この減少量は糖組成[35]から求めた糖含量とよく一致している。糖鎖をはずすことにより、ヒトビトロネクチンの分子量は9 kDa小さくなり、67 kDaと59 kDaとなった。しかし、この値はcDNA塩基配列から求めた値の52 kDaとはまだかけ離れていた。

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

ビトロネクチンをSDS電気泳動で分離すると、見かけの分子量がアクリルアミド濃度によって変化する奇妙な振舞いをすることに気づいた。例えば、ヒトビ

ビトロネクチンをSDS電気泳動で分離すると、見かけの分子量がアクリルアミド濃度によって変化する奇妙な振舞いをすることに気づいた。例えば、ヒトビトロネクチンの分子量はアクリルアミド濃度を6、7.5、10、12、13.5、15 %と変化させるに従って、78 kDaと72 kDa、77 kDaと68 kDa、75 kDaと65 kDa、73 kDaと61 kDa、74 kDaと61 kDa、73 kDaと58 kDaと変化し、ウシ血清アルブミン(BSA)との相対的な泳動位置が逆転した(図Ⅲ-3)。SDS電気泳動でゲル濃度により見かけの分子量が変化する分子には、他にヒストン[72]、コラーゲン[75]、カゼイン[76]が知られている。これらの分子は、通常の方法では正しい分子量を求めることができず、ファーガソンプロットというゲル濃度に依存しない分子量算定法が適用される。そこで、ヒトビトロネクチンのファーガソンプロットを行なった(図Ⅲ-4)。すると、アクリルアミドゲル濃度0 %の時の相対移動度の内挿点が、標準タンパク質ではすべて一点に集中したが、ビトロネクチンのみずれていた。このずれが実際の分子量と見かけの分子量が異なる原因である。

次に、ファーガソンプロットから得られる直線の傾きの遅延係数を求めた。遅延係数はアクリルアミドゲル濃度に関係なく分子量に従うことがわかっている。そこで、標準タンパク質について遅延係数と分子量の関係をプロットし、標準カーブを描いた(図Ⅲ-5)。この標準カーブにより、ヒトビトロネクチンの遅延係数から分子量を求めたところ59 kDaと50 kDaとなった(表Ⅲ-1(d))。

同様にして、14種動物ビトロネクチンすべての無処理なものの分子量と糖をはずしたものの分子量を求めた。無処理のビトロネクチンの分子量はファーガソンプロットにより44-65 kDaとなり(表Ⅲ-1(d))、7.5 %アクリルアミドのSDS電気泳動により求めた分子量(表Ⅲ-1(a))と比べると12-18 kDa小さくなった。また、糖をはずしたビトロネクチンの分子量は40-57 kDaとなり(表Ⅲ-1(e))、7.5 %アクリルアミドのSDS電気泳動により求めた分子量(表Ⅲ-1(b))と比べると11-17 kDa小さくなった。糖をはずす前後での分子量の違いは糖の分子量を示しており、この分子量はファーガソンプロットを行なっても行なわなくてもほぼ同じ値であった(表Ⅲ-1(c)、(f))ことから、糖の分子量はアクリルアミド濃度とは無関係であることが示唆された。よって、ビトロネクチンの分子量がSDS電気泳動で正しく求めることができない原因はポリペプチド部分にあることがわかった。

4. 考察

ビトロネクチンの分子量は動物によって多様であったが、アミノ末端のアミノ酸配列には高い相同性がみられた。本研究と平行して、ウサギとマウスのビトロネクチンのcDNA配列が相次いで報告された[77、78]。それらと図Ⅲ-1のウサギとマウスの配列を比較してみると、同定できなかった残基がシステインであることを除いては完全に一致しており、アミノ酸配列分析の結果を更に支持した。全体のアミノ酸配列をヒト、マウス、ウサギのビトロネクチンで相互に比較してみた(図Ⅲ-6)。するとヒトとウサギで76%、ヒトとマウスで75%、ウサギとマウスで74%、3種全てでは、67%の相同性があり、全一次構造を比較しても非常に相同性が高いことがわかる。相同性の傾向を見ると、アミノ末端部位とヘパリン結合部位の配列は特に相同性が高く、その部位の担う機能の重要さをうかがわせる。逆に、57-130番の配列は14%の相同性しかなく、動物種間で多様な部位と予想される。ヒトビトロネクチンでは57-130番の部位の生理活性はまだ明らかになっていないことからすると、ビトロネクチンの機能を担わない部位、もしくは動物種特異的機能の部位であろう。そのために進化的に保持されていないのではないか。

Nakashimaら[36]の結果によると、一次構造から予想されたように動物ビトロネクチンは、ヒトビトロネクチンと同様の細胞伸展活性、ヘパリン結合活性、コラーゲン結合活性を持ち合わせていた。このことも、14種のビトロネクチンが全て、今まで知られていたヒトやウシのビトロネクチンと同種のビトロネクチンであることを支持する。これらの活性は、上で述べたような動物種間で一次構造的に相同性の高い部分によって担われており、高等動物血漿ビトロネクチンに必須の活性であろう。

このようにビトロネクチンは一次構造で相同性が高いことが明らかになってくると、分子量が多様なことが次の問題となった。ヒトビトロネクチン[16、17]とウサギビトロネクチン[77]とマウスビトロネクチン[78]の全一次構造から推定される分子量は、ヒトとウサギで52 kDa、マウスで53 kDaである。しかし、10%アクリルアミドでのSDS電気泳動によると、ヒトは76 kDaと68 kDa、ウサギは68 kDa、マウスは71 kDaで、ヒトで11%(6 kDaに相当)、ウサギで20%(11 kDaに相当)含まれる糖[35]を考慮してもその間には5-18 kDaの差が残る。ヒトビトロネクチンには糖鎖の他に、1モルあたり2.5モル(分子量237.5 Daに相

当)以下のリン酸基[31]や2モル(分子量192 Daに相当)以下の硫酸基[79]が結合しているが、リン酸基や硫酸基はビトロネクチンの分子量の食い違いにはほとんど関係しないと思われる。つまり、ビトロネクチンの分子量の問題は、タンパク質の翻訳後のプロセッシングだけでは解決されない問題であった。

そのこととは別に、私はビトロネクチンの見かけの分子量が、SDS電気泳動のポリアクリルアミドゲル濃度によって変化するという現象に気づいた。そこで、ゲル濃度によらないファーガソンプロットという解析法で、ビトロネクチンの正しい分子量を求めることにした。ヒトビトロネクチンから糖鎖をはずし、ファーガソンプロットによる解析を行なったところ、通称75 kDaのビトロネクチンは52 kDaと推定され、cDNA塩基配列からの推定値と一致した。糖鎖をはずした前後の分子量の減少は、SDS電気泳動からの値とファーガソンプロットからの値とではほぼ同じであり、糖組成[35]より求めた糖含量ともほぼ一致していた。よって、ビトロネクチンの分子量が、通常の電気泳動では正しく推定できない原因は、ポリペプチド部分にあると推察された。

ヒストン、カゼイン、コラーゲンなどは、ビトロネクチンと同様、SDS電気泳動のゲル濃度によって見かけの分子量が変化すると報告されている[72、75、76]。その原因として、タンパク質のプロリン含量が高い、塩基性度や疎水性度が強いなどが考えられている。ビトロネクチンの場合、プロリンの含量は極端に多くはないが、ヘパリン結合部位が塩基性アミノ酸に富んでいるため、その部位の影響により正常に電気泳動されないのではないだろうか。

ビトロネクチンの動物種多様性としては、SDS電気泳動における分子量だけでなく、バンドの数にもあったことをII章でふれた。ウサギビトロネクチンは1本バンドであるが、ファーガソンプロットを用いて分子量を求めた結果、ポリペプチド部分の分子量は43 kDaとなった。この値は、cDNAから推定される分子量52 kDaより9 kDa小さい。しかし、アミノ末端から切断部位と想定される部位(382番)までの分子量は43 kDaと算定される。従って、ウサギビトロネクチンは382番付近で、全てのビトロネクチン分子が完全に切れていると考えられる。同様にマウスビトロネクチンのポリペプチド部分の分子量は46 kDaであり、この値もアミノ末端から切断部位(380番)までの分子量に相当するため、マウスビトロネクチンも切れるタイプと考えられる。このように考えると、一本鎖として検出されたマウス、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、ブタ、ガチョウは精製ビトロネクチンよりも大きい分子量の分子として合成されて切断され

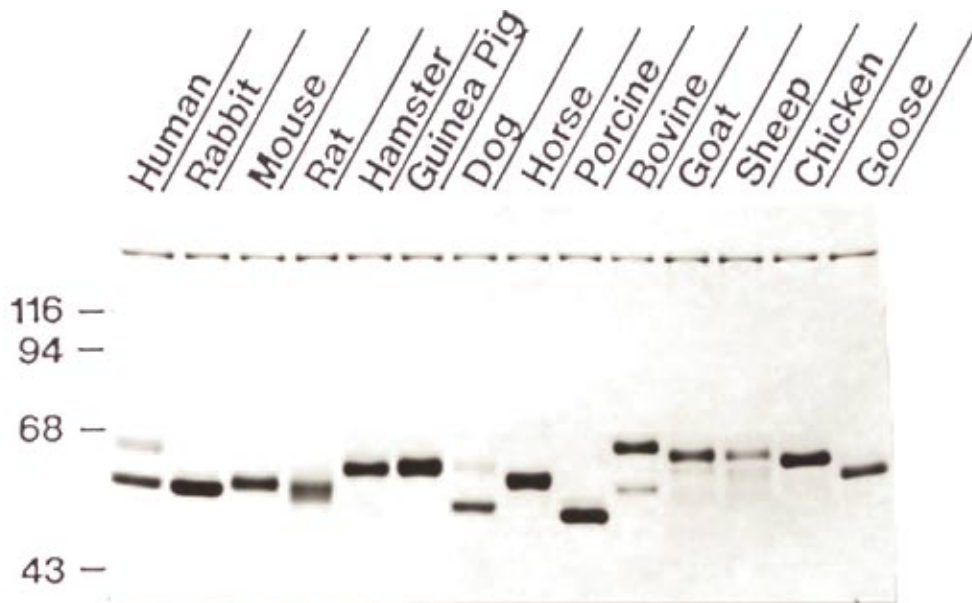
るタイプ、ニワトリは全く切断されないタイプに分類できる。やはり、バンドの数に多様さが生ずるのは、第II章で論じたように、遺伝子の支配により酵素によって切れやすいビトロネクチンまたは切れにくいビトロネクチンが合成されているためではないだろうか。

以上の結果から推定した動物ビトロネクチンの統一分子モデルを図III-7に示した。ビトロネクチンのペプチド部分の分子量は50-57 kDaで、アミノ末端から切断部位までは40-49 kDa、切断部位からカルボキシ末端までは8-13 kDaであった。一方、糖鎖は3-14 kDaと動物種により多様であった。つまり、ビトロネクチンは動物種により多様であるが、多様なのは主に糖鎖部分とポリペプチド鎖の切断の有無によるもので、基本的なポリペプチド部分の構造は統一性がある。動物種間のポリペプチド部分の統一性を支持する事実として、分子量の結果以外にビトロネクチンの機能の共通性がある。すべての精製ビトロネクチンが、細胞伸展活性、コラーゲン結合活性、ヘパリン結合活性を持っていた。これらの機能のうち、細胞接着活性はアミノ基末端よりのRGD配列により[16、17]、ヘパリン結合活性はカルボキシ末端よりの14 kDa[80]により、コラーゲン結合活性はRGD配列とヘパリン結合部位の中間の領域によって生ずる。つまり、動物ビトロネクチンは、生理機能を担うアミノ酸配列をポリペプチド部分に共通して保持しているのである。

動物名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
ヒト	D	Q	E	S	C	K	G	R	C	T	E	G	F	N	V	D	K	K	C	Q	C	D	E	L	C
ウサギ	?	Q	E	S	?	K	G	R	?	T	E	G	F	?	S	D	?	K	?	Q	?	Q	E	L	P
マウス	D	?	?	?	F	K	G	R	?	T	Q	G	F	M	A	?	K	K	?	Q	?	D	?	L	?
ラット	Q	M	?	S	?	K	G	?	?	T	Q	G	F	M	A	?	K	K	?	Q	?	D	?	L	?
ハムスター	D	Q	E	S	?	K	G	R	?	D	Q	G	F	V	A	N	R	K	?	Q	?	D	E	L	?
モルモット	?	?	E	S	?	K	G	R	?	T	E	G	F	N	A	D	R	K	?	Q	?	?	E	L	?
イヌ	A	Q	E	S	?	K	G	R	V	T	E	G	F	N	A	D	R	K	Q	Q	Q	D	E	L	?
ウマ	?	Q	E	S	?	K	D	?	?	T	E	G	F	N	A	N	R	K	?	Q	?	D	?	L	?
ブタ	D	Q	E	S	?	K	G	R	?	T	D	G	F	I	A	E	R	K	?	Q	?	G	E	L	L
ウシ	?	Q	E	S	?	K	G	R	?	T	E	G	F	?	A	T	R	K	?	Q	?	?	?	?	?
ヤギ	?	Q	E	S	?	K	G	R	?	T	E	G	F	?	A	T	R	K	?	?	?	?	?	?	?
ヒツジ	?	?	E	S	?	K	G	R	?	T	E	G	F	N	A	T	R	K	?	?	?	?	?	?	?
ニワトリ	A	E	D	S	K	E	G	R	?	D	E	G	F	N	A	M	K	K	L	Q	?	D	T	L	?
ガチョウ	A	E	E	S	?	E	G	R	?	D	E	G	F	N	A	M	Q	K	?	Q	D	D	T	L	?

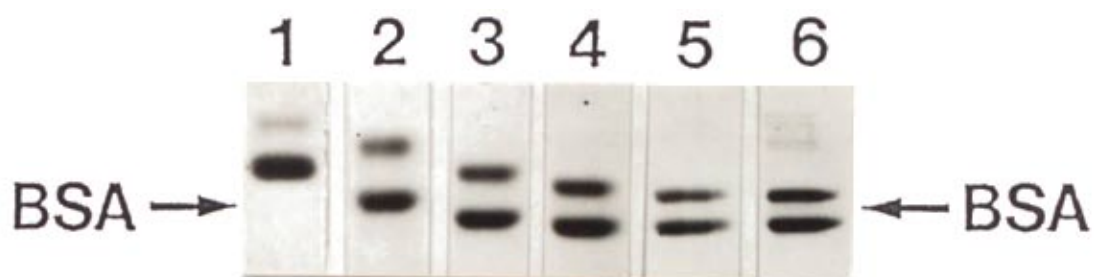
図III-1. 14種精製動物ビトロネクチンのアミノ末端アミノ酸配列

精製した14種の動物ビトロネクチンのアミノ末端領域のアミノ酸配列をヒトビトロネクチンと比較した。ヒトのビトロネクチンのアミノ酸配列はJenneら[17]及びSuzukiら[16]の配列から引用した。ヒト以外のビトロネクチンのアミノ酸配列は、気相シーケンサーにより分析した。アミノ酸残基は一文字表記法で示してある。気相シーケンサーで分析したものでは、システインは同定できなかった。また、小文字で表わしているアミノ酸は別のアミノ酸である可能性があり、?はアミノ酸残基が同定できなかった部分である。2種以上との動物種間で相同性のあるアミノ酸を枠で囲んだ。



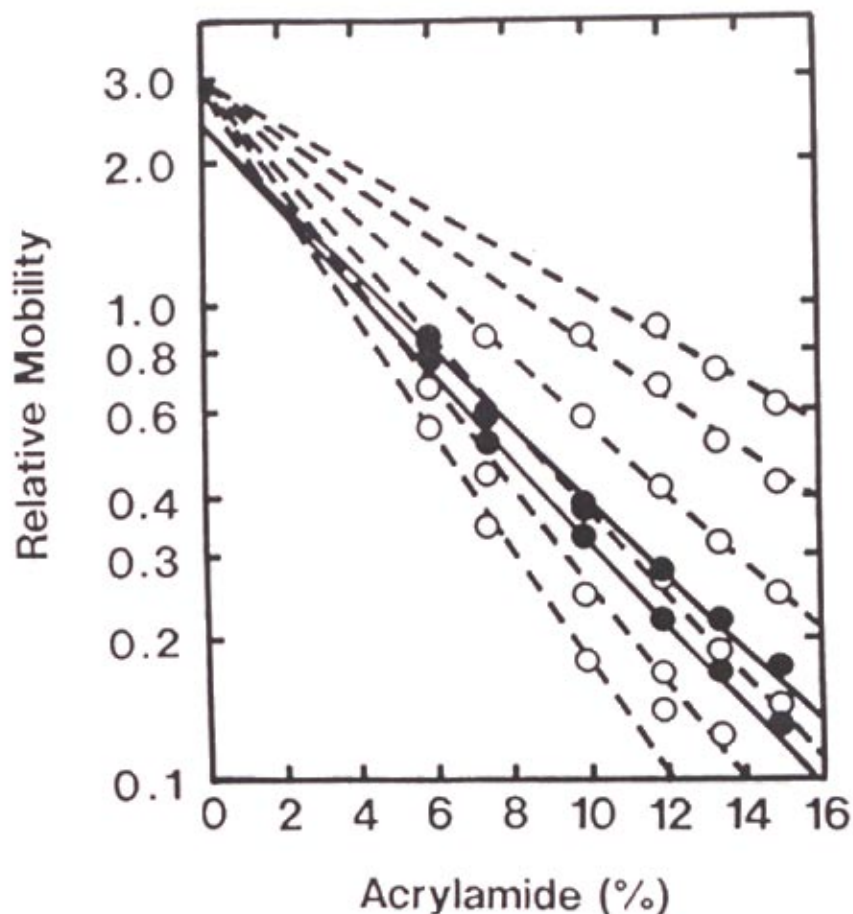
図Ⅲ-2. 糖鎖をはずした14種動物ビトロネクチンのSDS電気泳動

14種の精製動物ビトロネクチン(3 μ g)を0.5%SDS、0.1%2-メルカプトエタノールの存在下で、100 $^{\circ}$ C、3分処理した後、ノイラミニダーゼとエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼとN-グリコシダーゼFで糖鎖を切断した。試料は2%SDSと5%2-メルカプトエタノールの存在下で、100 $^{\circ}$ C、5分間処理し、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電気泳動を行った。ゲルは泳動後、クーマシーブリリアントブルーで染色した。上側のバンドは、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼである。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。



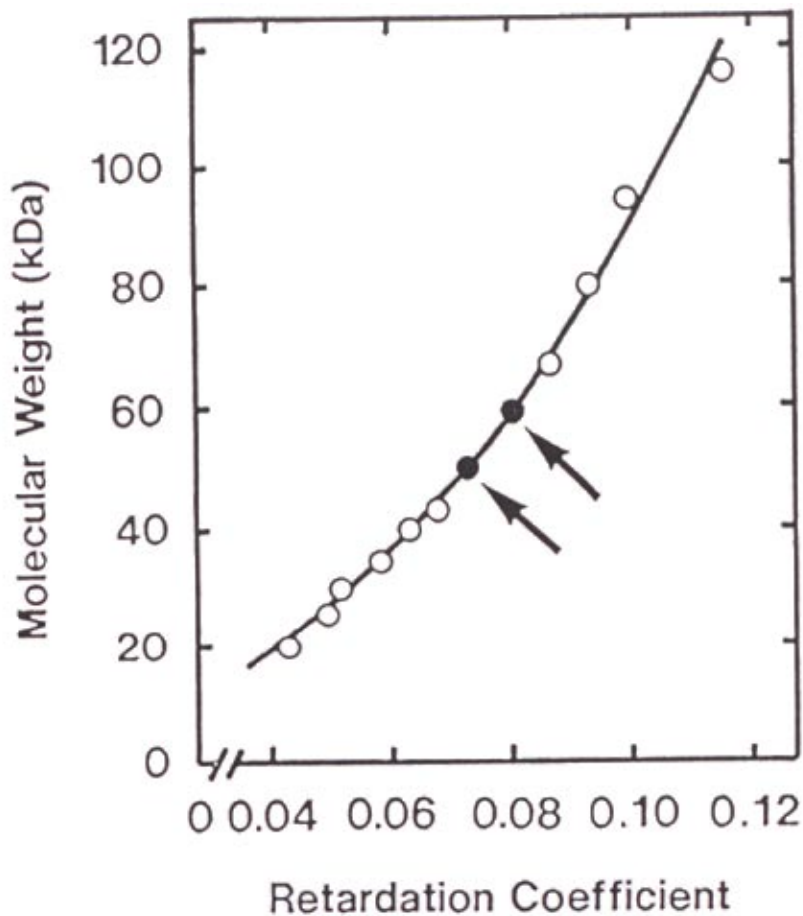
図Ⅲ-3. ヒトビトロネクチンの見かけの分子量のゲル濃度による変化

ヒトビトロネクチンは、2 % SDS、5 % 2-メルカプトエタノール存在下で、100℃、5分間処理した。濃縮ゲルは全て4 %アクリルアミド、分離ゲルは6 % (レーン1)、7.5 % (レーン2)、10 % (レーン3)、12 % (レーン4)、13.5 % (レーン5)、15 % (レーン6)アクリルアミドを用いてSDS電気泳動した。ゲルは、クーマシーブリリアントブルーで染色した。矢印は、分子量マーカーとしてヒトビトロネクチンと同一ゲルで泳動したウシ血清アルブミン(BSA)の泳動位置である。



図Ⅲ-4. ヒトビトロネクチンと標準タンパク質のファーガソンプロット

試料は、2 % SDS、5 % 2-メルカプトエタノール存在下で、100℃、5分間処理した。濃縮ゲルは全て4 %アクリルアミド、分離ゲルは6 %、7.5 %、10 %、12 %、13.5 %、15 %アクリルアミドを用いてSDS電気泳動した。ゲル中のタンパク質は、クマシーブリリアントブルーで染色した。濃縮ゲルと分離ゲルの境界から、各タンパク質のバンドまでの距離を測定して、フロントであるBPBまでの距離に対する割合を求め相対移動度とした。そして、各アクリルアミド濃度に対してそれぞれの相対移動度をプロットした。直線(●)は、ヒトビトロネクチンで上側が65 kDa、下側が75 kDaのビトロネクチンである。破線(○)は、分子量マーカーとして用いた11種類の標準タンパク質の内の6種類で、上から順にダイズトリブシンインヒビター、カーボニックアンヒドラーゼ、オボアルブミン、ウシ血清アルブミン、ホスホリラーゼb、 β -ガラクトシダーゼである。

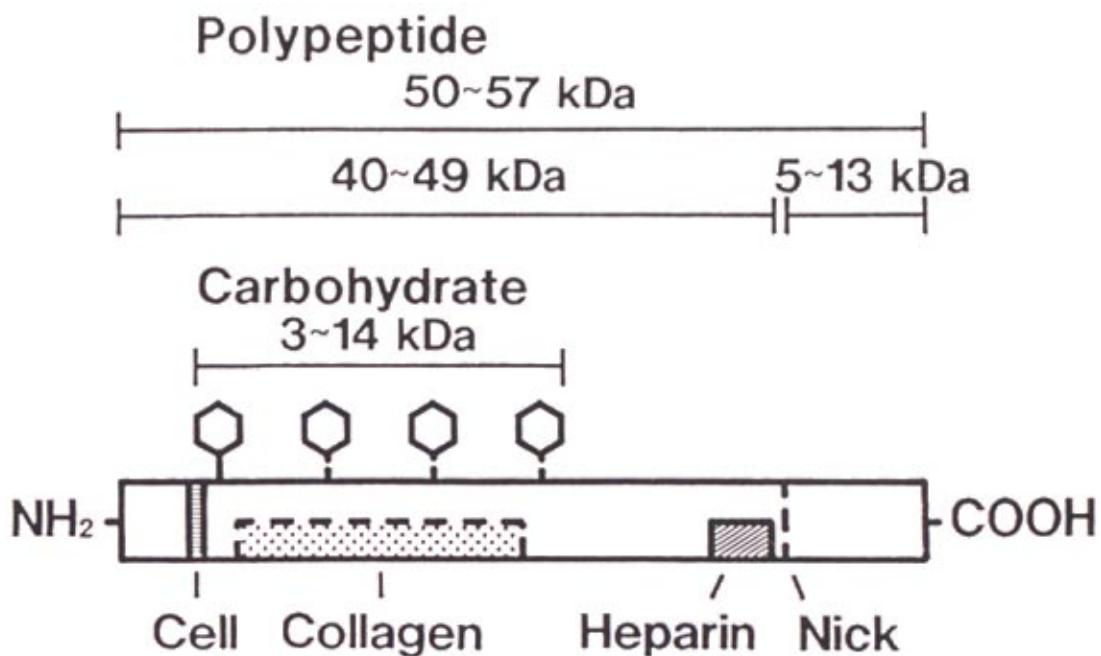


図III-5. ヒトビトロネクチンの遅延係数からの分子量算出

遅延係数は、図III-3のファーガソンプロットにより得られる直線の傾きであり、ファーガソンの式[72-74]

$$\log R_f = \log R_{f0} - K_R T$$

により求めた。 R_f は相対移動度、 R_{f0} はゲル濃度0%の外挿点、 K_R は遅延係数、 T はゲル濃度である。11種の標準タンパク質(○)について、遅延係数を分子量に対してプロットし、標準カーブを書いた。用いた標準タンパク質は上から順に、 β -ガラクトシダーゼ、ホスホリラーゼb、ラクトフェリン、ウシ血清アルブミン、ウサギIgG H鎖(下側の●と重なっている)、オボアルブミン、アルドラーゼ、サーモライシン、カーボニックアンヒドラーゼ、 α -キモトリプシノーゲンA、ダイズトリプシンインヒビターである。矢印(●)は、ヒトビトロネクチンで上側が通称75 kDa、下側が通称65 kDaのバンドであり、ファーガソンプロットにより得られた遅延係数を標準カーブ上にプロットし、分子量を求めた。



図Ⅲ-7. 血漿ビトロネクチン分子の統一モデル

14種精製動物ビトロネクチンに関する分子量の結果から血漿ビトロネクチン分子の統一モデルを推測した。ポリペプチド鎖全体の分子量は、50-57 kDaで、アミノ末端から切断部位までは40-49 kDa、切断部位からカルボキシ末端までは、8-13 kDaとなり、多少の違いはあるものの統一的特徴がある。また、Nakashimaら[36]の結果より、ドメイン構造としては、全てのビトロネクチンが細胞接着部位、コラーゲン結合部位、ヘパリン結合部位を持っていた。一方、糖鎖は3-14 kDaと種により差がみられる。これは、分子量だけでなく糖鎖の本数や組成においても多様である。

動物名	分子量 (kDa)						
	(a) 糖鎖(+)	(b) 糖鎖(-)	(c) 糖含量 (a)-(b)	(d) 糖鎖(+) F P	(e) 糖鎖(-) F P	(f) 糖含量 (d)-(e)	(g) 糖含量
ヒト	76/68	67/59	9	59/50	52/43	7	6
ウサギ	68	58	10	53	43	10	11
マウス	(80)/71	60	11	56	46	10	
ラット	73	59	14	60	46	14	
ハムスター	71	63	8	57	49	8	
モルモット	69	64	5	53	48	5	
イヌ	71/63	64/56	7	58/50	50/42	8	
ウマ	75/64	71/61	3-4	62/50	57/44	5-6	6
ブタ	59	54	5	44	40	4	5
ウシ	78/69	68/59	10	64/55	52/43	12	11
ヤギ	78-65	66-55	10-12	65-53	52-44	9-13	
ヒツジ	78-65	66-55	10-12	65-53	52-44	9-13	
ニワトリ	70/(65)	64	6	56	50	6	7
ガチョウ	71	59	12	57	47	10	

表Ⅲ-1. ファーガソンプロットによって算出した動物ビトロネクチンの分子量

(a)、(b)の値は、それぞれ糖鎖をはずす前後のビトロネクチンの見かけの分子量を、7.5%アクリルアミドの分離ゲルでのSDS電気泳動から求めたものである。(a)の()内の値は、イムノプロットした時にのみ検出できたバンドの分子量である。そして、(a)の値から(b)の値を差し引いて求めたのが(c)の値で、糖鎖の分子量になる。また、糖鎖をはずす前後のビトロネクチンをファーガソンプロット(FP)して求めた分子量が(d)と(e)で、(d)の値から(e)の値を差し引いて求めたのが(f)のファーガソンプロットによる糖鎖の分子量である。(g)の値は、既に報告されている[35]ビトロネクチンの糖組成から、ファーガソンプロットにより、求めた糖含量である。