

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

第II章と第III章で、動物血漿ビトロネクチンの構造と機能の検討を行ってきた。その結果、動物ビトロネクチンの統一的な分子像を想定することができた。しかし、これは、高等動物の哺乳類および鳥類という進化がかなり進んだ生物でのビトロネクチンの分子像である。これらの分子群に対し、まだビトロネクチン分子と呼んでよいかどうかはわからないけれども、ビトロネクチン抗体と反応するタンパク質を下等な生物中に見つけている。それらの分子についても分子像を明らかにしていかなければ、ビトロネクチンとして同定もできず、生物全体でのビトロネクチンの分子像や働きを知ることもできない。そこでこの章では、高等動物ビトロネクチンとは進化的に離れた生物のビトロネクチン様タンパク質に着目して研究を進めることにした。

第II章の結果より、ビトロネクチン様タンパク質を検出できた最も下等な生物は、真性粘菌 *Physarum* であった。これを進化的に離れたビトロネクチン様タンパク質を産生する生物として選んだ。粘菌は、植物と動物の中間に位置する下等な生物である。その生活環を図IV-1に示した[81]。粘菌は変形菌類とも呼ばれ、通常は湿った影地に変形体として生息する。一定の形を持たない細胞質の塊の変形体は、細胞壁も持たず、多核で、動物的にアメーバ運動をして動き回って捕食活動をする。また、乾燥や飢餓などの状態におかれると、胞子体を形成して植物様の生活をする。高等動物のような血液も持たなければ、多細胞組織の構造維持のための細胞外マトリックスを必要ともしなさそうな生物でもある。このような高等動物とはかけ離れた生物でのビトロネクチン様タンパク質は、どんな分子なのか、どんな機能を持っているのか。粘菌のビトロネクチン様タンパク質を精製し、そのタンパク質の部分的な一次構造や活性について調べてみることにした。

2. 実験材料と実験方法

2-1. 真性粘菌の培養

真性粘菌 Physarum polycephalum の微小変形体は、お茶の水女子大学 室伏きみ子先生よりゆずりうけた株を培養した。培養法はDanielらの方法[82]に従い、24°Cで暗所振とう培養をおこなった。培地は、1.5 %バクトトリプトン(ディフコ社)、0.22 %イーストイクトラクト(ディフコ社)、1.5 %グルコース(ナカライテスク社)の溶液に無機イオンを添加してオートクレーブした。継代直前にオートクレーブしたヘミン(東京化成工業)を更に培地に加えて使用した。

2-2. SDS電気泳動

SDS電気泳動は、II章、2-3と同様の方法で行った。濃縮ゲルは4 %アクリルアミド、分離ゲルは7.5 %アクリルアミドのゲルを用いた。ゲルはII章、2-3と同様の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、または銀染色キット(第一化学)を用いて染色した。

2-3. イムノブロッティング

イムノブロッティング法はII章、2-4と同様の方法で行った。一次抗体として、抗ウシビトロネクチンウサギ抗血清を1 / 1000、二次抗体として抗ウサギIgGヤギIgGを1 / 1500、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で1時間づつ反応させ、酵素反応を行った。

2-4. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の抽出

粘菌ビトロネクチン様タンパク質を図IV-2の手順に従い抽出した。

培養して増殖がプラターに達した粘菌を抽出のための試料とした。懸濁培養液100 mlに冷やしたホモジナイズバッファー(20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、0.13 M NaCl、10 mM 2-メルカプトエタノール)を80 ml加えて、2,000 rpm、4°C、2分遠心して沈澱を集めた。沈澱になった細胞塊にホモジナイズバッ

ファーを120 ml加えて再度懸濁し、同様に遠心をして細胞を洗った。100 mlの懸濁液からおよそ20 mlの細胞が集められた。細胞に3倍量のホモジナイズバッファーを加えて懸濁し、更に1 / 100量の0.2 M PMSFを攪拌しながら加えた。これをホモジナイズするための細胞懸濁液とした。ポッター式のホモジナイザーをモーターに取り付け、氷上で10ストローク、細胞懸濁液をホモジナイズした。

ホモジネートに1.5倍量のホモジナイズバッファーを加え、10,000 rpm、4℃、10分遠心し、この上清を可溶画分とした。沈澱を洗うために、再度ホモジナイズバッファーで懸濁してから、同様に遠心して沈澱を回収した。沈澱を2倍量のホモジナイズバッファーで懸濁し、さらに沈澱の3倍量の抽出バッファー(20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、0.13 M NaCl、10 mM 2-メルカプトエタノール、1.6% TritonX-100)を加えて、4℃で1時間放置した。1時間後、10,000 rpm、4℃、10分遠心した上清を抽出液とした。抽出液は、カラムクロマトグラフィーによる精製の試料として-20℃に保存し、使用する直前に融解して用いた。

2-5. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の精製

抗ウシビトロネクチンウサギIgGは常法[83]に従い、硫酸分画とDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによって抗血清より精製した。そのIgGをCNBr活性化セファロース(ファルマシア社)と結合させて抗体セファロースを調製した。

TritonX-100による粘菌の抽出液から還元剤2-メルカプトエタノールを除くため、抽出液を4℃で20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、0.13 M NaCl、0.8 % TritonX-100に対して透析した。

透析物を透析外液で平衡化した抗ウシビトロネクチン抗体セファロースと4℃で1晩インキュベートした後に、室温でカラムにつめ、素通りを非結合画分として集めた。カラムは最初に、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、0.13 M NaCl、0.8 % TritonX-100で、続いて20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、0.13 M NaClで洗浄した。最後に、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5 mM EDTA、0.13 M NaCl、8 M 尿素でタンパク質を溶出した。非結合画分は、再度抗体セファロースとインキュベートし、10回、抗体セファロースを用いた精製を繰り返した。

次に、抗体セファロース結合画分を0.01 M NaCl、5 mM EDTA、8 M 尿素、20

mM Tris-HCl (pH 8.0) に対して透析を行った。その透析物をヘパリンセファロースカラムに添加し、塩濃度を0.1 Mに上昇させ、結合画分を溶出した。

ヘパリンセファロース結合画分を4°Cで10 mM 重炭酸アンモニウムに対して透析し、透析物を凍結乾燥した。凍結乾燥標品にSDSサンプルバッファーを加え、100°C、5分間処理をして電気泳動のサンプルとした。

SDS電気泳動で試料を分離し、0.05 %クーマシーブリリアントブルーR-250で染色した。ビトロネクチン様タンパク質の部分のゲルを切り出し、電氣的抽出装置(アトー社、マックスイールド)でタンパク質を抽出した。

2-6. アミノ末端アミノ酸配列分析

アミノ末端アミノ酸配列は、PVDF膜にタンパク質を転写して分析する方法で同定した[84]。ヘパリンセファロース結合画分を前述の方法で凍結乾燥した後、電気泳動し、セミドライプロット装置でPVDF膜(バイオラッド社)に電氣的に転写した。転写は、10mM CAPS(pH 11.0)中で、200 mA、8時間通電して行った。シートは、0.1 %クーマシーブリリアントブルー、42 %メタノール、17 %酢酸で染色し、42 %メタノール、17 %酢酸で脱染し、乾燥後、ビトロネクチン様タンパク質のバンドの部分をはさみで切り出した。

なお、アミノ末端アミノ酸配列分析のための電気泳動ゲルは、タンパク質のアミノ末端をブロックする可能性のあるフリーラジカルを除去するため、以下のように調製した[85]。重合は一晩以上行い、泳動前に0.1 mMチオグリコール酸ナトリウムを加えた電気泳動バッファーで前電気泳動を行ってから試料を添加するゲルとした。

PVDF膜に転写したタンパク質は、自動アミノ末端アミノ酸シーケンサー(アプライドバイオシステム社、477A型)にかけて分析した。

2-7. タンパク質の定量

ビトロネクチン様タンパク質の抽出過程での試料と最終精製標品のタンパク質濃度は、ローリー法に従って定量した[86]。標準タンパク質として、ウシ血清アルブミン(カルビオケム社)を用いた。0.8 % TritonX-100の存在しているタンパク質溶液では、発色後、沈澱が生ずるので、0.8 % TritonX-100で希釈

した標準タンパク質で検量線を求めた。なお、0.8 % TritonX-100を含むタンパク質溶液では、発色後に沈澱を遠心して除いてから、その上清の吸光度を測定した。

抗体セファロース、ヘパリンセファロースを用いた精製過程でのタンパク質濃度の定量は、280 nmの吸光度で調べた。

2-8. 細胞伸展活性の測定法

細胞は、ベビーハムスター腎臓由来の細胞株であるBHK細胞を用いた。培地は、DMEM(フロー社)に10 %ウシ胎児血清(ディフコ社)、100 U / mlペニシリン(明治製薬)、0.1 mg / mlストレプトマイシン(明治製薬)を添加したものを、37°C、5 % CO₂濃度で培養した。細胞がセミコンフルエントになった状態の時に、細胞を0.25 %トリプシンで処理して培養皿よりはがし、1000 rpm、1分の遠心で細胞を沈澱として集めた。沈澱を0.35 %ダイズトリプシンインヒビターを含むGrinnellの細胞接着用溶液(150 mM NaCl、1 mM CaCl₂、3 mM KCl、0.5 mM MgCl₂、6 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄、(pH 7.3))[69]に懸濁し、再度遠心した。細胞塊を 1×10^5 / mlの濃度になるようにGrinnellの細胞接着用溶液に懸濁して、細胞のサスペンションとした。

タンパク質溶液を、ポリスチレンの96ウェル組織培養用プレート(ヌンク社)の各穴に添加し、37°C、60分間インキュベートしてタンパク質をプレートにコートした。結合しなかったタンパク質は吸引して取り除き、細胞のサスペンション(1×10^4 個細胞 / 1穴)を加えた。37°C、90分間インキュベートした後、2 %グルタルアルデヒド、5 %ホルムアルデヒド、5 %ショ糖を含むPBSを各穴に加え、室温で20分インキュベートして細胞を固定した。

細胞伸展活性は顕微鏡下での観察により、接着している細胞数当りの伸展している細胞数の割合で示した。

RGD配列を含む合成ペプチドがビトロネクチンの細胞伸展活性に及ぼす効果は、細胞のサスペンションに合成ペプチドを100 μg / mlの濃度で加えて調べた。この時、プレートにコートするビトロネクチンの濃度は1 μg / mlにした。

3. 結果

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

動物血漿ビトロネクチンは可溶性の分泌タンパク質であるが、粘菌はビトロネクチン様タンパク質を培養上清には分泌していなかった。そこで、粘菌ビトロネクチン様タンパク質を粘菌の細胞体から調製するために、図IV-2に従って簡単な細胞分画法を行った。その結果、粘菌ホモジネート中に存在していたビトロネクチン様タンパク質は(図IV-3 B、レーン1)不溶性画分に分画され(図IV-3 B、レーン2)、可溶性画分にはほとんど分画されなかった。更に、不溶性画分のビトロネクチン様タンパク質は、TritonX-100処理によってほとんど可溶化された(図IV-3 B、レーン3)。このことは、粘菌ビトロネクチン様タンパク質が不溶性か、または不溶性物質に結合しているか、あるいは何かに取り囲まれた状態で存在していることを示唆している。抽出の過程でのタンパク質の分布を表IV-1に示した。この抽出で、粘菌ビトロネクチン様タンパク質はほぼ8倍に精製された。

3-2. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の精製

粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、尿素処理しなくてもヘパリンに結合してしまうので、動物血漿ビトロネクチンのような尿素存在下のヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製することができなかった。

そこで、TritonX-100抽出画分から、以下の3つのステップを経て精製を行った。まず、抗体セファロースカラムクロマトグラフィー(図IV-3、レーン4)とヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィー(図IV-3、レーン5)を行って結合画分を集め、最後にSDS電気泳動ゲルからの電気的抽出により単一標品に精製した(図IV-3、レーン6)。精製されたタンパク質は、還元剤存在下のSDS電気泳動で70 kDaの位置に1本のバンドとして銀染色され(図IV-3 A、レーン6)、抗ウシビトロネクチン抗体を用いたイムノブロットでも同様のバンドが染色された(図IV-3 B、レーン6)。

精製された粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、ウシビトロネクチンで吸収した吸収抗血清とも、粘菌ビトロネクチン様タンパク質で吸収した吸収抗血清

とも反応しなかった。しかし、粘菌ビトロネクチン様タンパク質で吸収した吸収抗血清は、依然としてウシビトロネクチンとの反応性は残っていたことから、ウシビトロネクチンと粘菌ビトロネクチン様タンパク質の間で共有するエピトープが少ないことが確認できた。

全精製過程でのタンパク質とビトロネクチン様タンパク質の回収を表IV-1に示した。最終的に300 mlの粘菌培養液から、40 μ gの粘菌ビトロネクチン様タンパク質が精製された。

粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、8 M 尿素存在下でヘパリンセファロースに結合した(図IV-3、レーン5)ので、動物ビトロネクチンと同様、8 M 尿素存在下でヘパリンに結合性をもつことがわかる。しかし、先にも述べたとおり、尿素有存在しない条件下でもヘパリンセファロースと相互作用したので、粘菌ビトロネクチン様タンパク質のヘパリン結合性は、動物ビトロネクチンのように尿素処理によって活性化されるものではなく、常に相互作用できるものだと予想される。

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

第III章で述べたように動物ビトロネクチンは、アミノ末端アミノ酸配列の相同性が非常に高かった。そこで、粘菌ビトロネクチン様タンパク質にも同様の相同性を見られるかどうかを確かめた。ヘパリンセファロース結合画分を電気泳動し、PVDF膜に転写してアミノ末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、図IV-4に示したような配列が得られた。粘菌ビトロネクチン様タンパク質の配列は、ヒトをはじめとした動物ビトロネクチンのアミノ末端アミノ酸配列とは、全くホモロジーがみられず、ヒト、マウス、ウサギの一次構造(図III-7)と比較しても、その内部配列ともホモロジーは見られなかった。また、この配列と同様のアミノ末端アミノ酸配列を持ったタンパク質は、国立遺伝学研究所のNVRF-PIRのタンパク質アミノ酸配列データベース中にも存在していなかった。ただし、この配列は、カテプシンIIやビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の構成成分の一つジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼの前駆体の内部配列と部分的にホモロジーを持っていた。

3-4. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の細胞伸展活性

粘菌ビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列が動物ビトロネクチンと異なり、両者の構造的差異が予想された。そこで、生理活性はどうかを次に調べることにした。ビトロネクチンの特徴的な生理活性である細胞伸展活性を持つかどうかを確かめることにした。すると、図IV-5に示したように、粘菌ビトロネクチン様タンパク質はヒトビトロネクチンと同様、BHK細胞を効果的に伸展させることができた。しかし、粘菌ビトロネクチン様タンパク質上では丸いままの細胞も数多くみられ、細胞の形態もヒトビトロネクチン上のものよりも若干弱い伸展形態を示した。

細胞伸展活性の濃度依存性を粘菌ビトロネクチン様タンパク質とヒトビトロネクチンで比較すると、図IV-6に示すようにどちらのタンパク質も濃度依存的に増大し、低濃度領域ではほとんど同じ活性を示した。しかしヒトビトロネクチンとは異なり、粘菌ビトロネクチン様タンパク質は活性の飽和がはやく、いくら高濃度コートしても、最大細胞伸展活性が55%を越えることはなかった。最大伸展率が低い原因として、精製の際にSDS処理したことが原因の可能性もあったが、SDS処理する前のヘパリンセファロース結合画分で活性を測定しても、最大細胞伸展活性は55%であったため、精製段階のSDS処理で生じた性質ではなく、粘菌ビトロネクチン様タンパク質の固有の性質と思われた。

3-5. RGDペプチドによる細胞伸展活性の阻害

ビトロネクチンの細胞伸展活性はRGD配列依存性であるため、細胞接着の際にRGD配列を含む合成ペプチドが共存すると、その細胞接着活性が阻害される[5]。粘菌ビトロネクチン様タンパク質上での細胞伸展活性もまたRGD配列を介したものであるかどうかを知るため、RGDペプチドの細胞伸展活性に及ぼす効果を調べた。その結果、粘菌ビトロネクチン様タンパク質上でのBHK細胞の伸展は、ヒトビトロネクチンの場合と同様、濃度依存的にGRGDSPペプチドによって阻害された(図IV-7)。しかし、コントロールペプチドのGRGESPペプチドでは有意な阻害はみられなかった。このことは、粘菌ビトロネクチン様タンパク質上での細胞伸展活性も、動物ビトロネクチンの場合と同様RGD配列依存性であることを意味している。

4. 考 察

粘菌中に存在していたビトロネクチン様タンパク質が界面活性剤による抽出、抗体セファロースカラムクロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティー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というステップをへて、初めて精製された。精製標品はSDS電気泳動上70 kDaの1本のバンドで、抗ウシビトロネクチン抗体と強く反応し、ウシビトロネクチンで吸収した吸収抗血清とは全く反応しなかった。一方、ウシビトロネクチンは粘菌ビトロネクチン様タンパク質で吸収した吸収抗血清で依然として染色された。このことは、粘菌ビトロネクチン様タンパク質とウシビトロネクチンとの間で共有するエピソードが部分的であることを示唆している。

粘菌ビトロネクチン様タンパク質と動物ビトロネクチンとの間にみられるその他の類似性として、分子量の大きさ、ヘパリンへの親和性、RGD配列依存性の細胞接着活性がある。しかし、動物ビトロネクチンとは異なるいくつかの性質も持っていた。例えば、粘菌ビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端配列は、動物ビトロネクチンのものとは全く異なっていた。また粘菌ビトロネクチン様タンパク質は不溶性タンパク質としてホモジネート沈殿に分画され、そのヘパリン結合性も潜在型の性質を示してはいなかった。更に細胞伸展活性のプラトーの値が動物ビトロネクチンのものより低かった。従って、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はよく似ているが、同一とは言い切れない。

最近になって、私の研究室でニワトリ卵黄中にもビトロネクチンがあることを見つけた[88]。このビトロネクチンは、ヘパリンへの結合性を持たないため、八藤後らの方法では精製されない。またコラーゲン結合活性もない。しかし、血漿中のビトロネクチンと一次構造的に相同性があり、細胞接着・伸展活性を持っていた。このように、第Ⅲ章で述べた動物ビトロネクチンの統一像とは少し異なるビトロネクチン分子も発見されてきた。ビトロネクチンには第Ⅲ章で述べた統一像とは若干異なる例外の分子もあるようだ。このような概念から考えると、粘菌ビトロネクチン様タンパク質も動物ビトロネクチンの統一像とは食い違う点もあるが、ビトロネクチンの一種と考えられる。

今後、粘菌ビトロネクチン様タンパク質をビトロネクチンとして定義するためには、更に確実な証拠、例えば、動物ビトロネクチンと相同な内部配列を見

つけることや、粘菌ビトロネクチン様タンパク質の遺伝子を単離する事などが必要となる。

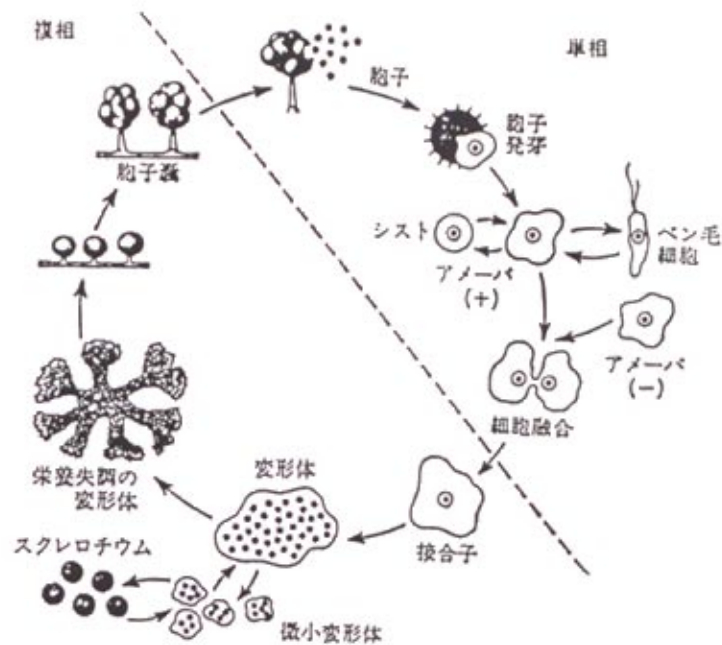
では、粘菌ビトロネクチン様タンパク質はどのような構造をしているのであろうか。粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、アミノ末端アミノ酸配列が、動物ビトロネクチンのものとは全く異なっていた。動物ビトロネクチンで多様性のみられた57-130番に相当する部分が、粘菌のビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端になっているのだろうか。もしそうだとすると、粘菌ビトロネクチン様タンパク質では、動物ビトロネクチンのアミノ末端から57個以上のアミノ酸に相当する部分が欠失する事になる。しかし、ビトロネクチンのアミノ末端から57残基中にはRGD配列が含まれており、ここが細胞接着活性を担っている[16、17]。粘菌ビトロネクチン様タンパク質にも、RGD配列依存性の細胞接着・伸展活性があるので、動物ビトロネクチンのアミノ末端領域が欠失した分子構造をとるとは考えにくい。また、粘菌ビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端配列は、カテプシンHやジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼ前駆体の内部配列と相同性があった。これらのタンパク質は、今までビトロネクチンとは全く関連性がみられなかったタンパク質である。しかし、タンパク質の進化という点では、遺伝子のシャッフリングがおきて、遺伝子の一部どうしがはぎ合わさることもある。もしかすると、アミノ末端側にカテプシンHやジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼのタンパク質の一部を、分子の内部にビトロネクチン分子の一部を持つようなキメラ分子が、粘菌ビトロネクチン様タンパク質の正体であるのかも知れない。この考えはまだ推測の域を出ないが、粘菌は進化的に随分離れた生物であるので、十分に検討の余地がある。

そのような進化の過程においても、ビトロネクチン様タンパク質にはRGD配列が保持されていた。今までにも、RGD配列の認識機構は、セキツイ動物だけでなく、*Drosophila melanogaster*の胚形成[89]、*Dictyostelium discoideum*の細胞集合[90]、植物細胞の細胞壁への接着[91]、ヒト免疫不全症ウイルス中のタンパク質tatの細胞接着活性[92]などでも報告されている。この粘菌ビトロネクチン様タンパク質にもRGD配列依存性の細胞接着活性があったことが、更にRGD配列認識機構の普遍性を支持した結果となった。

さて、現在までの所、粘菌中でビトロネクチン様タンパク質がどのような分子と相互作用し、どの様に働くのかは明かではない。粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、BHK細胞によってRGD配列依存的に認識された。この時、BHK細胞のイ

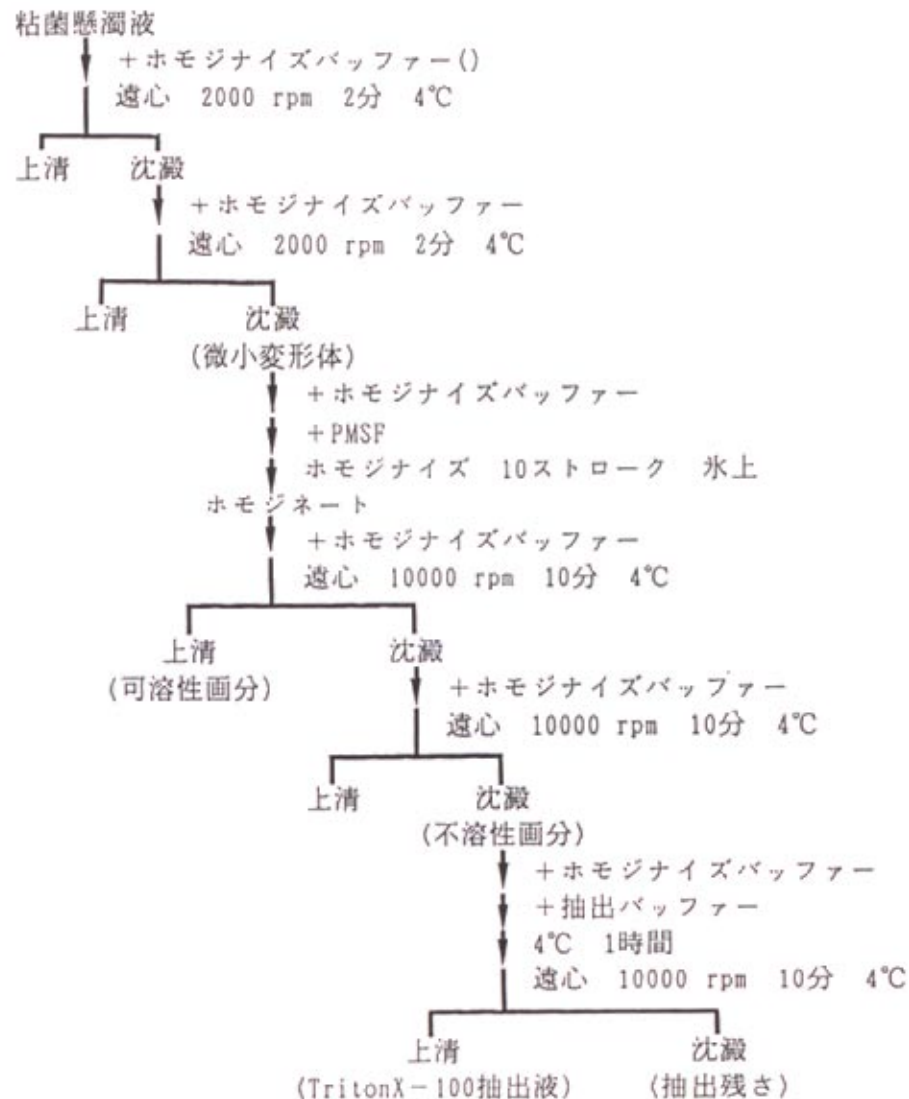
インテグリン、ビトロネクチンレセプターが粘菌ビトロネクチン様タンパク質を認識しているものと思われる。では、粘菌中では何がビトロネクチン様タンパク質のRGD配列を認識しているのでしょうか。Hynesらは、1988年、酵母にインテグリン抗体と反応する分子があることを報告している[93]。また、Schindlerらは、ダイズの培養細胞にビトロネクチンレセプター様タンパク質があることを報告している[91]。粘菌中にもこのようなインテグリン様タンパク質が存在していて、粘菌ビトロネクチン様タンパク質と相互作用している可能性は大きい。今後は、そのようなレセプター分子群の解明も必要だろう。

また、粘菌ビトロネクチン様タンパク質は培地には分泌されず、不溶性画分に分画され、界面活性剤によって可溶化された。おそらく膜に結合しているか、もしくは細胞小器官中に存在して機能発現しているものと思われる。粘菌は脊椎動物のような血液凝固・線溶系や免疫補体系を持っていない。ビトロネクチン様タンパク質は、脊椎動物のビトロネクチンとは異なる場面で働くのではないだろうか。例えば、2つの変形体が接触して融合するときに、細胞相互を認識する分子として働くのかも知れない。また、粘菌が地表を這って捕食活動をするときに、ビトロネクチン様タンパク質が認識部位として働いているのかも知れない。バクテリアに感染したときに、そのバクテリアにビトロネクチン様タンパク質が接着して、非免疫細胞的な防御反応を示している可能性もあるだろう。ビトロネクチン様タンパク質が接着分子としてではなく、細胞が生きていく上で必要な未知の働きを担っている可能性も十分にある。図IV-1に示したような粘菌の生活様式の中で、ビトロネクチン様タンパク質が、微小変形体と変形体の中での存在していることは確認した。今後さらに、その他の生活様式段階でビトロネクチン様タンパク質の存在を比較検討できれば、粘菌中でのビトロネクチン様タンパク質の担う働きを示唆することもあるだろう。



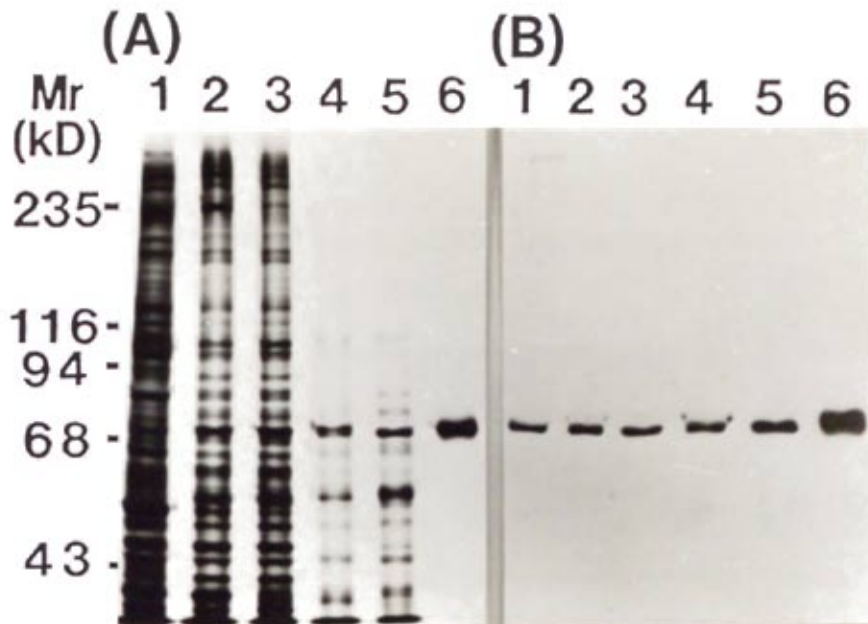
図IV-1. 粘菌 Physarum の生活環

Physarum は、胞子の発芽によりアメーバまたはペン毛細胞に変化する。増殖を繰り返し、やがて細胞は接合して接合子を形成する。接合子は、変形体へと発生してアメーバ運動をして補食しながら這いまわる。変形体は細胞壁を持たない多核の細胞質の塊である。変形体を懸濁培養すると細胞が細かく分散した微小変形体を形成する。飢餓と光照射の条件下に変形体をおくと粘菌は栄養失調になり、子実体を形成して胞子を作る。



図IV-2. 粘菌 *Physarum* からのビトロネクチン様タンパク質の抽出方法

粘菌 *Physarum* の微小変形体を粘菌懸濁液の遠心によって集めた。沈澱として得られた細胞塊をホモジナイズバッファーで洗ったのち、ホモジナイズバッファーで懸濁してPMSFを加えて、ホモジナイザーでホモジネートにした。粘菌ビトロネクチン様タンパク質は、ホモジネートの不溶性画分に分画された。不溶性画分をホモジナイズバッファーで洗った後、抽出バッファーにより粘菌ビトロネクチン様タンパク質を抽出した。



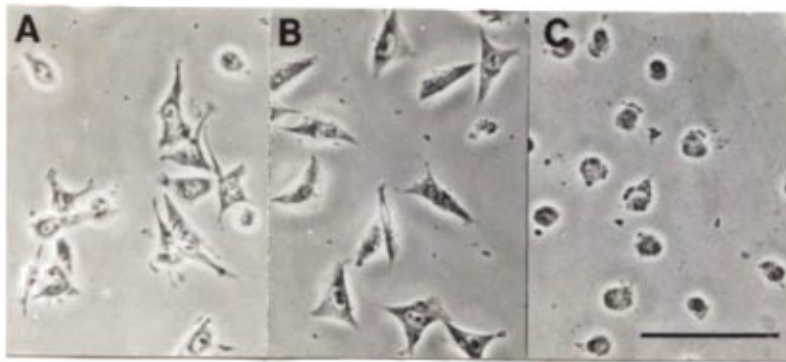
図IV-3. ビトロネクチン様タンパク質の精製過程のSDS電気泳動

粘菌 *Physarum* の微小変形体のホモジネート(レーン1)を10000 rpm、10分遠心した。沈殿(レーン2)を0.8 % TritonX-100で懸濁し、4°C、60分放置し、ビトロネクチン様タンパク質を抽出した。TritonX-100による抽出物(レーン3)を抗ビトロネクチン抗体セファロースカラムにかけ、結合したタンパク質を8 M 尿素で溶出した(レーン4)。さらに、ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーを行い、結合画分(レーン5)を集めた。ヘパリン結合画分をSDS電気泳動で分離し、粘菌ビトロネクチン様タンパク質のバンドをゲルより切りだして、電氣的に溶出した(レーン6)。各精製段階での試料は、2 % SDS、5 % 2-メルカプトエタノールを含むSDSサンプルバッファーで100°C、5分間処理し、7.5 %分離ゲルでSDS電気泳動した。ゲル中のタンパク質は、銀染色キットで染色(A)、またはニトロセルロースシートに転写した後、抗ウシビトロネクチン抗血清でイムノプロットした(B)。左に示した数字は、分子量マーカータンパク質の分子量である。

	1	5	10	15	20
(1)	A-S-Y-P-V-P-Q-K-L-G-M-P-A-L-R-P-T-M-S-Q-	I	D	D	S G Y
(2)	D-Q-E-S-C-K-G-R-C-T-E-G-F-N-A-D-R-K-C-Q-	A	D Q	T K	

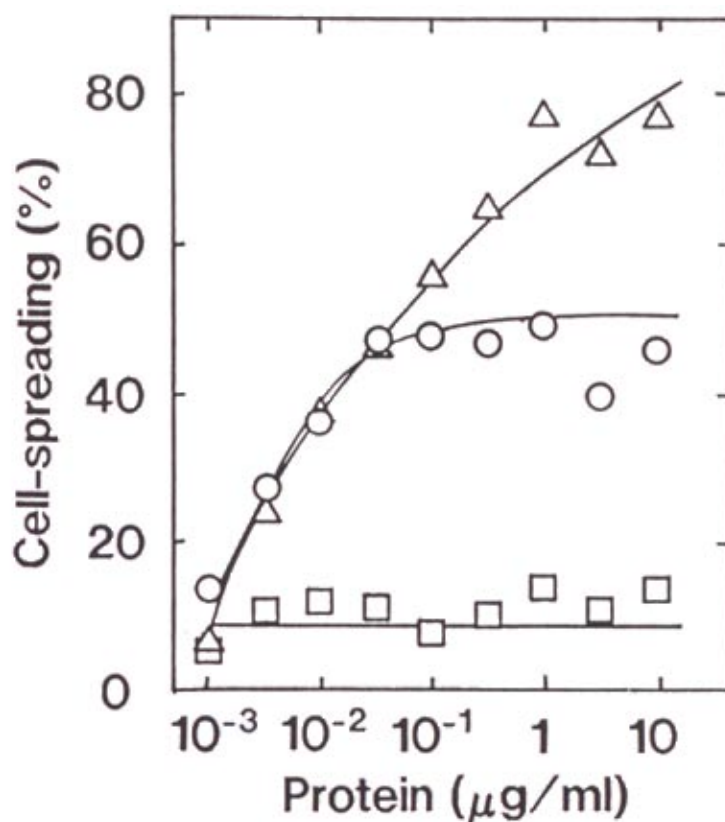
図IV-4. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質のアミノ末端配列

精製途中のヘパリン結合画分をSDS電気泳動で分離した後、PVDF膜に電氣的に転写した。PVDF膜上の粘菌ビトロネクチン様タンパク質のバンドを切り出し、気相シーケンサーでアミノ末端アミノ酸配列を決定した(1)。粘菌ビトロネクチン様タンパク質の5、12、15、17サイクル目のエドマン分解では、2または4つのアミノ酸が同定された。比較のために、動物ビトロネクチンのアミノ末端アミノ酸配列を示した(2)。この配列は、図III-1をもとに3から14種の動物において共通してみられたアミノ酸である。ただし、システインはヒトビトロネクチンのアミノ酸配列を参考にした。



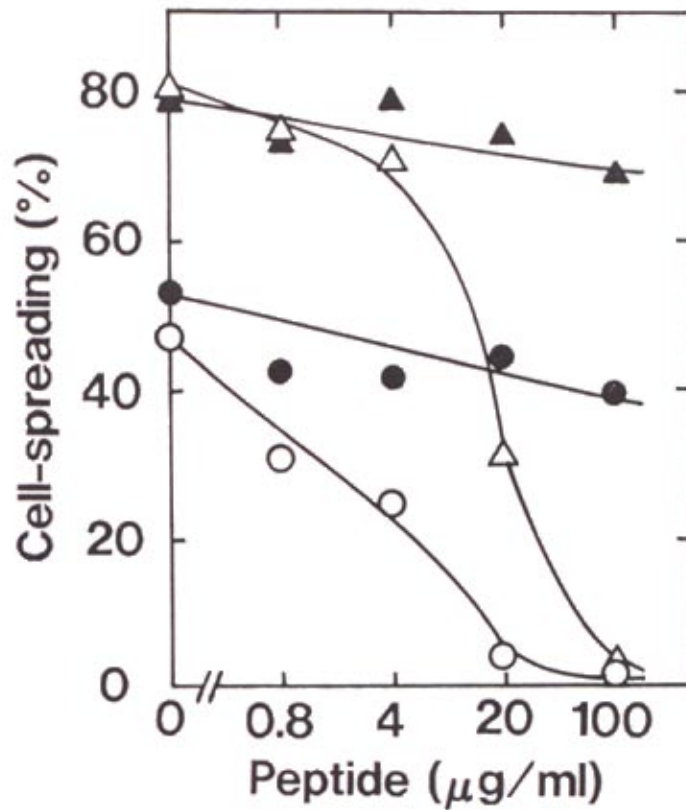
図IV-5. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質上でのBHK細胞の伸展形態

粘菌ビトロネクチン様タンパク質(A)、ヒトビトロネクチン(B)、ウシ血清アルブミン(C)を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でマイクロタイタープレートにコートし、Grinnellの細胞接着用溶液に懸濁したBHK細胞をプレートに加え、 37°C 、90分インキュベートした。細胞の形態は、位相差顕微鏡下で観察した。図中のバーの長さは、 $100\mu\text{m}$ に相当する。



図IV-6. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の細胞伸展活性の濃度依存性

粘菌ビトロネクチン様タンパク質(○)、ヒトビトロネクチン(△)、ウシ血清アルブミン(□)を各濃度で96穴のマイクロタイタープレートに加え、37℃、60分間インキュベートしてコートした。Grinnellの細胞接着用培地に懸濁したBHK細胞をプレートに加え、37℃、90分インキュベートし、細胞を固定後、位相差顕微鏡下で細胞数を数えた。細胞伸展活性は、接着している細胞数当りの伸展している細胞数の割合で示した。



図IV-7. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の細胞伸展活性へのRGDペプチドの効果

ポリスチレンのマイクロタイタープレートに1μg/mlの粘菌ビトロネクチン様タンパク質(○、●)またはヒトビトロネクチン(△、▲)で37℃、60分コートした。細胞の懸濁液に、各濃度のGRGDSP(○、△)またはGRGESP(●、▲)ペプチドを加え、タンパク質をコートした各穴に添加した。37℃、90分細胞を伸展させ、固定後、位相差顕微鏡下で細胞の数を数えた。

	タンパク質濃度 (mg/ml)	体積 (ml)	タンパク質量 (mg)	回収率 (%)
ホモジネート	11	200	2200	100
ホモジネート沈澱	4.67	168	785	36
TritonX-100抽出物	1.39	138	192	9
抗体カラム	0.10	55	5.5	0.25
ヘパリンカラム	0.20	4.2	0.85	0.04
電氣的抽出	0.29	0.14	0.04	0.002

表IV-1. 粘菌ビトロネクチン様タンパク質の精製段階におけるタンパク質量と回収率

粘菌ビトロネクチン様タンパク質を精製した各段階におけるタンパク質の回収率を表にした。ホモジネート、ホモジネート沈澱、TritonX-100抽出物、電氣的抽出でのタンパク質濃度はローリー法で、抗体カラム、ヘパリンカラムでのタンパク質濃度は280 nmの波長の吸光度によって求めた。回収率は、ホモジネートの全タンパク質量を100%とした時の各段階でのタンパク質量の割合で示した。