

第V章

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

1. はじめに

ヒトがけがをすると、傷口に血小板が接着・凝集し、やがて新しい細胞が移動・接着・増殖して傷口はふさがれる。一方、原発巣から遊離したがん細胞は、別の組織に接着して転移巣を形成し、死に至る病の原因となっている。このように細胞接着現象は、ヒトの体の中で良くも悪くも働いている。細胞接着をうまく制御できれば、臨床的に有用なことは明らかである。ビトロネクチンが大量かつ簡便に精製されてくると、ビトロネクチンを用いて細胞接着を制御するような臨床的応用が考えられるようになった。ビトロネクチンと同様の細胞伸展活性を持つフィブロネクチンは、既に目の角膜損傷治療のために利用されている[94]。フィブロネクチンよりも強い細胞伸展活性を持つビトロネクチンは、より有用なタンパク質として利用されるのではないかと期待される。

ビトロネクチンのような血漿タンパク質を臨床的に利用する際に注意しなければならないことは、肝炎ウイルスやエイズウイルスなどウイルスのコンタミネーションである。それが避けられなければ、血漿タンパク質を安全に利用することはできない。肝炎ウイルスやエイズウイルスは、60℃、10時間、または56℃、20分間で不活性化すると報告されている[95、96]。しかし便利さと確実さの点から世界保健衛生機関(WHO)は、これらのウイルスの消毒や滅菌の条件として、20分間の煮沸または121℃、1.1 kg / cm²、20分間のオートクレーブをすすめている[97]。

また、ビトロネクチンの応用的利用には、細胞培養の分野が考えられる。動物細胞を血清の無い状態で培養するには、多くの場合、細胞接着因子としてフィブロネクチンを添加する。血清中に含まれる主たる細胞接着因子はビトロネクチンであるにもかかわらず[43、44]、このようにフィブロネクチンを使用するのはビトロネクチンよりフィブロネクチンが安価で容易に精製されてきたからである。ビトロネクチンも容易にかつ安価に精製されてくると、より血清の条件に近いビトロネクチンの添加が好ましい。また、いままでフィブロネクチンでは無血清培

養できなかつた細胞も培養できる可能性がある。培地にタンパク質を添加するには、フィルターやオートクレーブによる滅菌がおこなわれる。しかし、タンパク質は、フィルターへ吸着したりオートクレーブによって失活したりしやすい。

以上のことから、熱やオートクレーブの滅菌に耐えうる細胞接着因子があれば有用であると考えられた。そこで、ビトロネクチンの細胞伸展活性が、熱やオートクレーブに対してどの様に影響されるかを調べた。

2. 実験材料と実験方法

2-1. 細胞接着性タンパク質

ビトロネクチンは、ヒトおよびブタの凍結保存血漿より、II章、2-1で述べた8 M尿素存在下での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精製した。この方法で精製されたビトロネクチンは、ヘパリン結合性のあるビトロネクチンである。またヘパリン結合性のないビトロネクチンとして、Barnesらの方法[15]に従って8 M尿素処理せずに精製したビトロネクチンも用いた。

フィブロネクチンは、ゼラチンアフィニティーカラムクロマトグラフィー[98]によってヒト凍結保存血漿より精製した。

ラミニンは、マウスEHS(Engelbreth-Holm-Swarm)肉腫より、Timplらの方法[99]に従って精製した。

I型コラーゲンは、ブタ皮膚由来のものを新田ゼラチンより購入した。

8 M尿素処理したフィブロネクチンは以下のように調製した。精製ヒトフィブロネクチンを0.25 mg / mlの濃度になるように8 M尿素、0.13 M NaCl、10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈し、室温で2時間処理した。そして、0.13 M NaCl、10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)に対して室温で透析し、その透析物を8 M尿素処理したフィブロネクチンとした。

2-2. タンパク質の熱およびオートクレーブ処理

タンパク質を0.13 M NaCl、10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)で0.25 mg / mlの濃

度に希釈した。希釈したタンパク質溶液を100 μ l、耐圧性ガラス容器またはポリプロピレンのマイクロチューブに取り、一定温度の温浴中で10または60分間熱処理、もしくは121°C、1.2 kg / cm²、20分間のオートクレーブ処理をした。

熱およびオートクレーブ処理した時のタンパク質の回収率は、280 nmの吸光度で確かめた。オートクレーブ処理したビトロネクチンは、更にローリー法[86]によっても回収率を求めた。ローリー法の標準タンパク質としては、ウシ血清アルブミン(カルビオケム社)を用いた。

また、熱およびオートクレーブ処理に対する還元剤の効果を見るため、ジチオスレイトール(ベセスダリサーチ社)を終濃度で10 mMまたは2-メルカプトエタノール(ナカライテスク社)を終濃度で2 %になるようにタンパク質溶液に加えて処理することも試みた。

2 - 3. 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。

オートクレーブしたビトロネクチンをSDSサンプルバッファーで処理した時のタンパク質の回収率は、以下の方法で確かめた。オートクレーブしたビトロネクチン溶液にSDS電気泳動の試料と同様にSDSサンプルバッファーを加え、100°C、5分間処理し、0.13 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)に対して4°Cで一晩、透析をした。その透析物のタンパク質濃度をローリー法[86]によって測定した。

2 - 4. 細胞伸展活性の測定法

細胞伸展活性は、第IV章、2 - 8と同様の方法で行った。ただし、ポリスチレンの96ウェルの組織培養用プレートの代わりに、ポリ塩化ビニルのプレート(住友ベークライト社、エリサプレートE)を用いた。また、RGDペプチドの細胞伸展活性への影響を確かめる実験では、プレートにコートするビトロネクチン濃度を10 μ g / mlで行った。

3. 結果

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

まず、ヒトビトロネクチン、ブタビトロネクチン、ヒトフィブロネクチン、ブタⅠ型コラーゲン、マウスラミニン上のBHK細胞の細胞伸展活性を調べた。図V-1に示したように、BHK細胞はヒトビトロネクチン、ヒトフィブロネクチン、ブタⅠ型コラーゲン上で濃度依存的に伸展した。しかし、マウスラミニン上では全く伸展しなかった。またブタビトロネクチンも、ヒトビトロネクチンと同様の細胞伸展活性をもち、ほとんど同じ濃度依存曲線を描いた。

これらの接着性タンパク質について、その細胞伸展活性が熱およびオートクレーブに感受性があるかどうかを調べた。ヒトビトロネクチン、ブタビトロネクチン、ヒトフィブロネクチン、ブタⅠ型コラーゲンを40-100°Cの様々な温度で10分間熱処理、もしくは121°C、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理をした。すると、ヒトビトロネクチンは熱やオートクレーブ処理の後でも、処理していないビトロネクチンとほぼ同じ細胞伸展活性を保持していた(図V-2)。この熱およびオートクレーブ耐性は、ブタビトロネクチンにも同様にみられる性質であった。また熱処理の時間を60分に延長しても細胞伸展活性は保持されることに変化はなかった。

それとは対照的に、同じ様な細胞伸展活性を持つフィブロネクチンやⅠ型コラーゲンは、処理温度の上昇とともにその活性が減少していき、オートクレーブ後ではほとんど活性を失ってしまった。

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

熱およびオートクレーブ処理で、ビトロネクチンの細胞伸展活性の強さや作用機序が影響を受けていないかどうかは大きな問題である。そこでまず、細胞伸展活性の濃度依存性を調べた。すると、図V-3に示したように、熱処理したビトロネクチン、オートクレーブしたビトロネクチンのどちらの細胞伸展活性も未処理のビトロネクチンとほとんど変化せず、濃度依存性カーブもほとんど一致した。いずれの場合にも0.01 μg / mlの濃度で最大活性の半分の活性を、

0.1 μ g / mlの濃度で最大活性を示した。

細胞の伸展形態を比較してみると、100°Cで熱処理(図V-4 B)やオートクレーブ処理したビトロネクチン(図V-4 C)上では、BHK細胞の伸展形態が未処理のビトロネクチン(図V-4 A)上のもので非常に似ており、顕微鏡下で区別はつかなかった。それとは対照的に、100°Cで熱処理(図V-4 E)もしくはオートクレーブ処理したフィブロネクチン(図V-4 F)上では、BHK細胞はほとんど伸展しなかった。これらの結果からは、BHK細胞は処理の有無に関わらず、ビトロネクチンを同じように認識しているように見えた。

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

今までの実験で用いたビトロネクチンは、精製途上で尿素処理されたものである。一方、フィブロネクチンやコラーゲンは、8 M 尿素処理されずに精製されたものである。8 M 尿素は、熱やオートクレーブ程ではないが、タンパク質を変性する作用がある。ビトロネクチンの細胞伸展活性が、精製途上で8 M 尿素処理されたことによって獲得された可能性があった。そこで、8 M 尿素処理していないBarnes型のビトロネクチンを精製し、その耐性を調べた。また逆に、フィブロネクチンを8 M 尿素処理した試料の熱やオートクレーブに対する耐性も確かめた。

その結果、Barnes型のビトロネクチンも、尿素処理したビトロネクチンと同様の熱やオートクレーブに耐性のある細胞伸展活性を示した。フィブロネクチンは、8 M 尿素処理では細胞伸展活性が影響されることはなかったが、更に熱やオートクレーブで処理するとその活性が失われてしまった。よって、熱およびオートクレーブに耐性を示すビトロネクチンの細胞伸展活性は、ビトロネクチン本来の性質であり、8 M 尿素処理によって生み出されるものではないと結論された。

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

ビトロネクチンやフィブロネクチンの細胞伸展活性は、分子中のRGD配列を介

して生ずることがわかっている。しかし、ビトロネクチンとフィブロネクチンの細胞伸展活性は熱やオートクレーブに対して感受性が異なっていた。それは、ビトロネクチンがRGD配列以外の伸展機構をもち、そこが熱耐性の活性を担うことを予想させた。そこで、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がRGD配列依存性かどうかを確かめた。

RGD配列依存性の細胞伸展活性は、RGDを含む合成ペプチドによって競合阻害される[5]。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を測定する際に、100 μ g / mlのGRGDSPまたはGRGESPペプチドを同時に添加した。その結果を図V-5に示した。GRGDSPは、未処理、熱処理、オートクレーブ処理したすべてのビトロネクチンの細胞伸展活性を完全に阻害した。これはすなわち、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結合部位が、未処理のものと同様のRGD配列であることを意味している。またビトロネクチンのRGD配列は熱やオートクレーブに対して耐性であるが、フィブロネクチンのRGD配列は弱いことも意味する。ところがビトロネクチンのRGD配列が全くダメージを受けていないかというところでもない。GRGESPに対する反応が、未処理、熱処理、オートクレーブ処理したビトロネクチンの間で異なっていたのである(図V-5)。GRGESPは未処理のビトロネクチンの細胞伸展活性を阻害することはないが、処理したビトロネクチンの活性を約50%阻害した。

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

次に熱やオートクレーブの処理によってビトロネクチン分子サイズの変化が生じていないかどうかを調べるため、還元剤存在下のSDS電気泳動をした。

ヒトビトロネクチンの見かけの分子量は、75 kDaと65 kDa、ブタビトロネクチンの見かけの分子量は59 kDaである。100°Cで熱処理したヒトビトロネクチン(図V-6、レーン2)やブタビトロネクチン(図V-6、レーン5)は、若干の減少はあるものの、主に未処理のビトロネクチン(図V-6、レーン1、4)と同じ位置に泳動された。一部、120 kDa以上の高分子量化したのも観察された。この高分子量化は、100°C処理の時間を10分から60分に延長することにより、更に顕著になり(図V-7、レーン2)、熱処理の際に生ずると推察された。100°C、10分熱処理した時のタンパク質の回収率を280 nmの吸光度で測定したところ、98%という値が得られ、ほとんどのビトロネクチンが回収されていたことから、

単量体のビトロネクチンの若干の減少は、ビトロネクチンが多量体となり高分子量化したためと推測される。

一方、オートクレーブしたビトロネクチンのSDS電気泳動像(図V-6、レーン3、6)は、未処理のビトロネクチンとは大きく異なっていた。75、65 kDaや56 kDa付近には、タンパク質のバンドがほとんど見られなかった。そしてその代わりに、4%ポリアクリルアミドの濃縮ゲルへと移動しないような高分子と10%ポリアクリルアミドの分離ゲルの先端まで泳動されてしまうような20 kDa以下の低分子しか検出されなかった。高分子のものの大きさを推定するため、9000×g、5分の遠心をしてみたが、沈殿することはなく、0.45 μmの孔径をもつポリテトラフルオロエチレンのフィルターも通過してしまった。

オートクレーブしたビトロネクチンで単量体の分子がなぜ消失してしまったのだろうか。オートクレーブの途中やSDSサンプルバッファーでオートクレーブしたタンパク質を処理した時に、タンパク質が回収されなかった可能性がある。そこで、それぞれの処理ステップでのタンパク質の回収率を求めてみた。オートクレーブ処理の前後で、タンパク質溶液の体積にほとんど変化がみられないにもかかわらず、280 nmの吸光度は0.308から0.414に上昇した。しかし、タンパク質を含まない溶媒のみでも0.006から0.126へと吸光度が上昇し、ビトロネクチン部分の回収率は95.4%と計算された。また、同じステップの回収率をローリー法によって求めた。その回収率は95.2%という値で、280 nmの吸光度からの結果とも合わせて、オートクレーブ時のビトロネクチンの減少は考えられなかった。さらに、SDSサンプルバッファーで処理した時のビトロネクチンの回収率をローリー法で求めた。回収率は91.5%で、ビトロネクチンの有意な減少はなかった。従って、SDSサンプルバッファーの処理によってもビトロネクチンは十分に回収されており、単量体の分子が検出されなかったことが回収率の低さによるものではないと結論された。

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

前項で述べたように、ビトロネクチンは、熱およびオートクレーブ処理すると分解したり、高分子量化したりした。通常、熱を加えると物質は酸化反応するので、ビトロネクチンの分子サイズを変化させるたのはその酸化反応による

ものかも知れない。そこで、処理の時に還元剤のジチオスレイトールを終濃度で10mM添加して酸化反応を抑えてみた。その結果、図V-7に示したように、ジチオスレイトールは、100℃の熱処理およびオートクレーブ処理により引き起こされるビトロネクチンの分子サイズの変化を抑制した(図V-7、レーン3、5)。しかし、完全に抑制するというわけではなかった。ジチオスレイトールによる抑制効果は、別の還元剤2%の2-メルカプトエタノールによっても代用できたことから、ビトロネクチンの分子サイズの変化は処理時の酸化が少なくとも一つの原因と考えられた。なお、ジチオスレイトールを加えて熱およびオートクレーブ処理したビトロネクチンでも細胞伸展活性をもっていた。

4. 考察

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ではその細胞伸展活性を失うことはなかった。この耐性は、ヒトとブタのビトロネクチンに共通してみられた性質である。ヒトとブタのビトロネクチンでは糖の含量や組成が大きく異なっている[35]。よって、この耐性は、糖鎖に起因するものではない。また、ヒトビトロネクチンは、75 kDaと65 kDaの2つの分子種からなるが、ブタビトロネクチンは、完全に切断されたタイプの59 kDaの分子種のみである。バンドの数によってもこの耐性は影響されない。おそらく、動物種間で共通する領域によって担われており、動物ビトロネクチンに共通の性質であろう。

さらに、Barnes型のビトロネクチンもまた熱やオートクレーブに対して耐性であった。Barnes型のビトロネクチンは、尿素処理せずに精製されたもので、ヘパリンへの結合性を欠いている。従って、ビトロネクチンがヘパリンに結合できるような構造をとっていることや尿素処理されていることは、この耐性には関係無い。

Goodmanら[100]は、ラミニンの細胞接着活性の20-30%が耐熱性であると報告している。ラミニンやその断片化されたペプチドのP1やE1-Xは細胞接着・伸展活性をもっている。その活性は、60-65℃の熱処理によって20-40%まで減少するが、更に温度を100℃まで上昇させて処理しても、その20-40%の活性は保持されたままである。また、RGD配列依存性の細胞接着活性をもつP1やE1-Xの

活性は、温度によって全く影響を受けない。このラミニンの耐熱性は、ビトロネクチンの耐性とよく似ているが、ビトロネクチンの場合、断片化しない分子が、熱やオートクレーブによって全くその活性を減じないことが特徴的である。

では、なぜビトロネクチンの細胞伸展活性だけが熱に強いのであろうか。いくつかの可能性を考えてみた。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は、RGD配列に由来する活性であった。さらに、ビトロネクチンには、フィブロネクチンやラミニンのようなRGD配列以外の第2の細胞接着部位[50-52, 100]は同定されていない。従って、ビトロネクチンに熱耐性のある第2の細胞接着部位があるのではなく、RGD配列のみが耐性にきいているのであろう。

次に、ラミニンの知見と本章の結果から、RGD配列があれば熱やオートクレーブに耐性が生ずるのではないかと考えられた。しかし、RGD配列をもつフィブロネクチンではその耐性がみられなかった。確かにビトロネクチンとフィブロネクチンは、ともにRGD配列依存性の細胞伸展活性を示すが、それぞれに特異的な細胞膜レセプターを介したものである[24]。Pierschbacherら[49]は、RGD配列の特異的認識の仕組みとして、RGD配列の前後のアミノ酸配列がRGD部分のとりコンフォメーションをかえるためだと報告している。このことから考えると、ビトロネクチン中のRGD配列のコンフォメーションが、フィブロネクチンのものよりも、より熱やオートクレーブに対して安定であるのかも知れない。

しかし、通常は細胞伸展活性を阻害しないGRGESPペプチドも、熱およびオートクレーブ処理したビトロネクチンの活性を約50%阻害した。これは、GRGESPペプチドが、熱処理されたビトロネクチンのRGD配列と競合して細胞と相互作用することを意味する。ビトロネクチンのRGD付近のコンフォメーションも熱やオートクレーブ処理によって、部分的には変化しているようである。一般的にRGE配列は、細胞に認識されない配列と考えられているが、近年になって、弱くではあるが細胞に認識されること[93]、RGE配列を含むペプチドもメラノーマの細胞接着に阻害を示す場合があること[101]が報告されている。熱処理したビトロネクチンの場合も、その1つのケースである。

またRGD部位の分子中の位置が、耐性を異ならせている可能性もある。フィブロネクチンの分子量は、ビトロネクチンの分子量の約3倍である。そして、フィブロネクチンのRGD配列は分子の中央部に、ビトロネクチンのRGD配列は分子のアミノ末端よりに位置する。熱やオートクレーブ処理によって、ビトロネクチ

ンのRGD配列が立体構造的に隠されにくく、フィブロネクチンのRGD配列が隠されやすいのかもしれない。

さて、熱処理によって分子構造にはどのような変化が生じているのであろうか。ビトロネクチンを熱やオートクレーブ処理すると、分解と高分子量化が起こった。タンパク質を100℃で処理するとペプチド結合、特にアスパラギン酸-プロリンの開裂が生じたり[102、103]、オートクレーブすると分解と沈澱形成をすることが報告されている[104]。ヒトビトロネクチンには、2つのアスパラギン酸-プロリンのペプチド結合(Asp-217-Pro-218、Asp-439-Pro-440)がある[18]。熱によってこの2つの結合が優先的に分解され、高分子量化に働いているであろう。また、ジチオスレイトールや2-メルカプトエタノールなどの還元剤の添加が、ビトロネクチンの高分子量化と分解をいくらか抑制した。酸化反応もビトロネクチンの分解と高分子量化に関わると思われる。

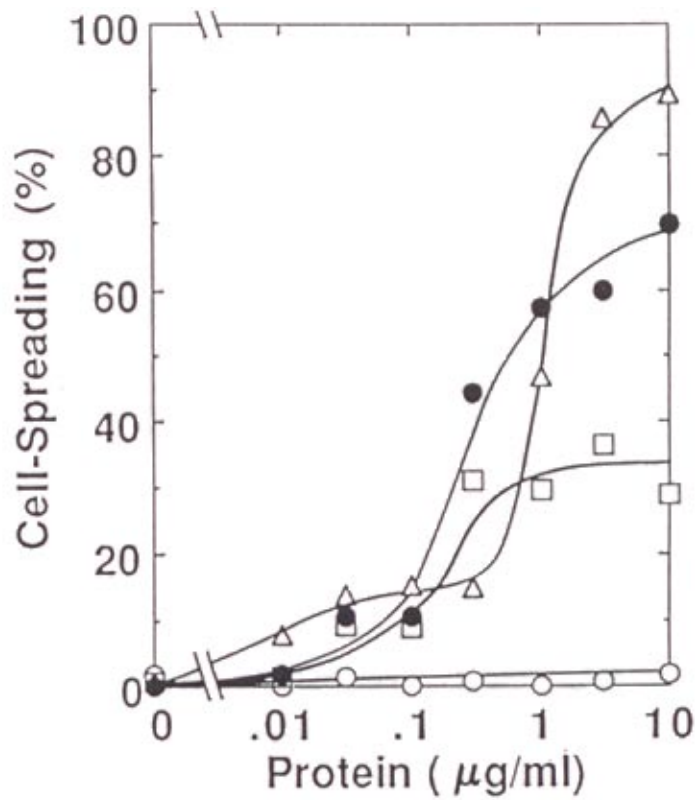
また、ビトロネクチンを熱およびオートクレーブ処理すると細胞伸展活性以外の生理機能は変化しているだろう。まだ十分に調べていないが、ビトロネクチンのヘパリン結合性は、100℃の熱処理によって活性化されることがわかっている。さらにビトロネクチンは、ヘパリンと尿素の存在下で熱処理するとコラーゲンに結合するようになる。従って、熱およびオートクレーブ処理したビトロネクチンは分子構造が変化しているけれども、細胞接着活性以外の生理機能も保持していると推測される。

最後にビトロネクチンの応用的利用の可能性について述べる。ビトロネクチンの細胞伸展活性が熱やオートクレーブに対して耐性であることは、ビトロネクチンを生体材料として加工することが容易であることを示唆する。高分子材料合成の分野においての多くの条件は、高温、強力な触媒、強酸、強アルカリなどのタンパク質にとって過激なものが多い。ビトロネクチンの細胞伸展活性は、熱やオートクレーブだけでなく、pH 2.5[88]、pH 9.5[15]、0.1% SDS[105]、8 M 尿素[34]などの条件にも耐性がある。よって、熱、オートクレーブ、高pH、低pH、SDS、尿素などの処理をしても細胞接着活性をもったビトロネクチンを得ることができる。

また熱やオートクレーブ処理は、一般的にガラスや金属などの消毒や滅菌に利用される。しかし通常、血漿タンパク質を含む多くのタンパク質は熱やオートクレーブ処理をすると、変性してその活性を失ってしまう。そのため、オートクレーブによるタンパク質の滅菌ができない。その点で、ビトロネクチンは

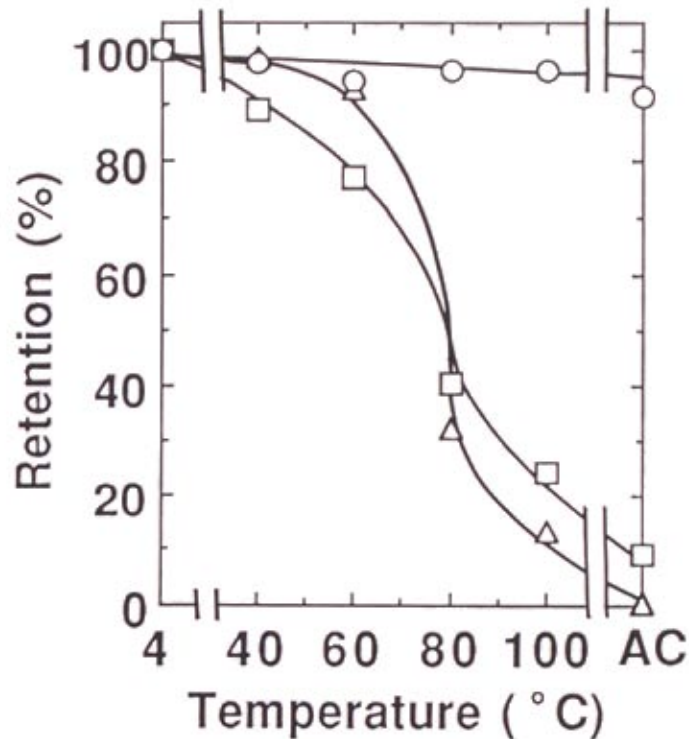
例外であった。オートクレーブによって滅菌したビトロネクチンは、細胞伸展活性を十分にもっている。滅菌ビトロネクチンは、無血清培地への細胞接着因子として有用となるだろう。

さらに臨床的な利用も考えられる。血清タンパク質を臨床的に利用する際の大きな障害は、血清タンパク質中に残存している肝炎やAIDSなどのウィルスの問題である。フィブロネクチンを目薬として臨床的に使用したケースでは、患者の血漿からフィブロネクチンを精製し、その患者の目薬とすることで、その問題を避けていた[94]。しかし、ビトロネクチンは保存血漿から精製し、熱やオートクレーブ処理で滅菌ができる。これでビトロネクチンを安全かつ便利に利用することができる。実際、オートクレーブ処理したビトロネクチンの目薬の臨床応用が行われ、良好な結果が得られている[106、107]。



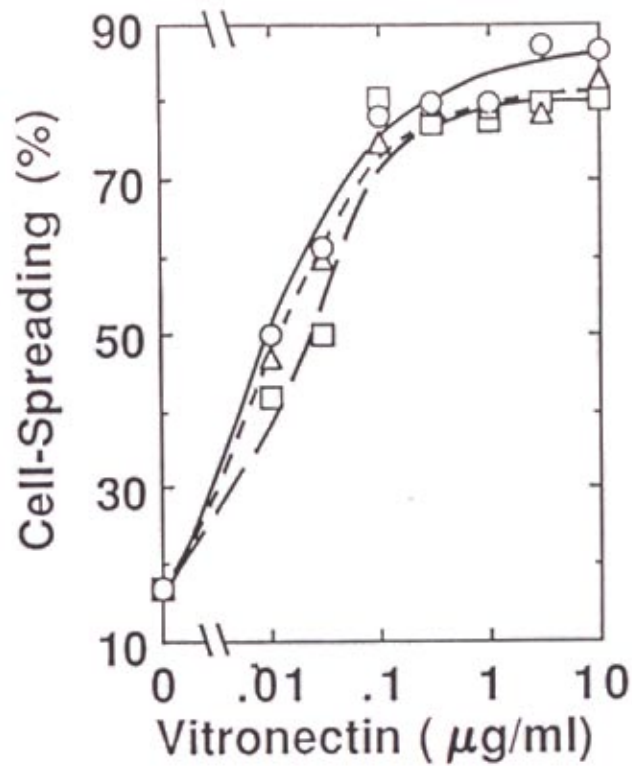
図V-1. 各種細胞接着性タンパク質上でのBHK細胞の細胞伸展活性

96穴のポリ塩化ビニルのマイクロタイタープレートを各濃度のヒトヒトロネクチン(●)、ヒトフィブロネクチン(▲)、ブタI型コラーゲン(□)、マウスラミニン(○)でコートした。BHK細胞をGrinnellの細胞接着用溶液中に懸濁し、タンパク質をコートした穴に加え、37°Cで90分インキュベートした。細胞は、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。



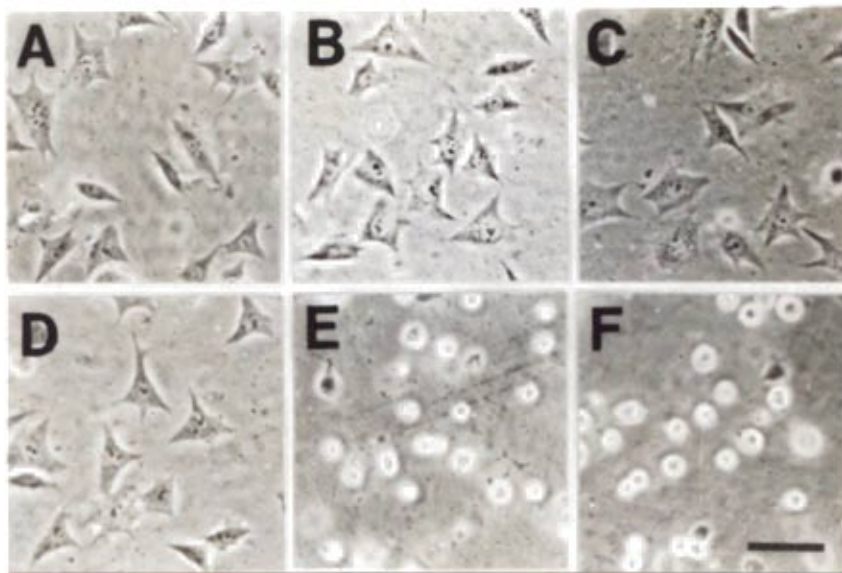
図V-2. 接着性タンパク質の細胞伸展活性の温度感受性

ヒトビトロネクチン(○)、ヒトフィブロネクチン(△)、ブタI型コラーゲン(□)を0.13 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)中で0.25 mg / mlの濃度になるよう希釈し、各温度で10分間熱処理、または121°C、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理(ACと表記)した。処理したタンパク質をGrinnellの細胞接着用溶液で10 μg / mlに希釈し、ポリ塩化ビニルのマイクロタイタープレートの各穴に加え、37°C、60分間インキュベートしてコートした。細胞伸展活性は、BHK細胞の懸濁液を37°C、90分間インキュベートして測定した。活性の残存率は、未処理のタンパク質の活性に対する処理後の活性の割合として表わした。



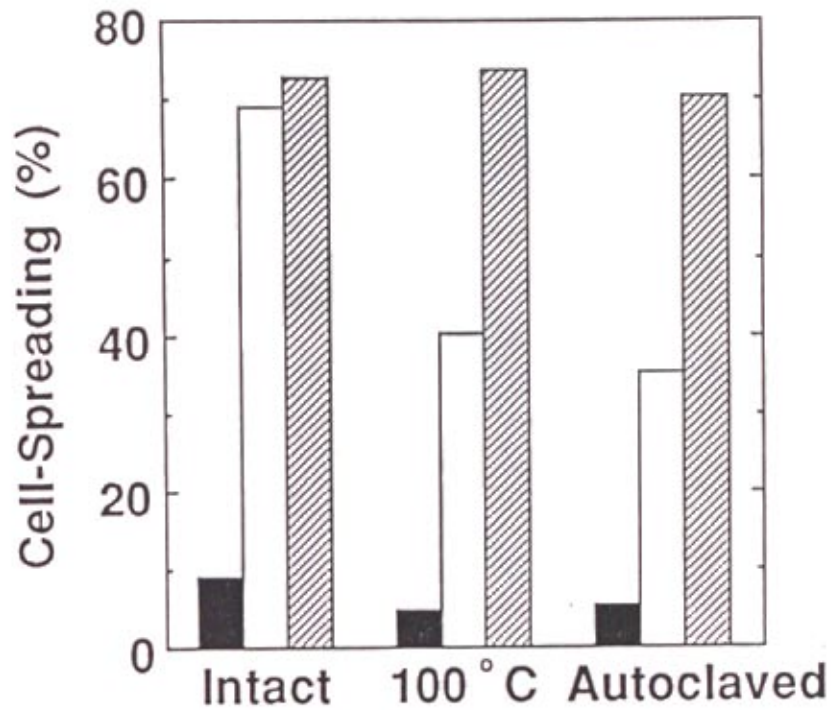
図V-3. 熱及びオートクレーブ処理したビトロネクチンの細胞伸展活性の濃度依存性

ヒトビトロネクチン(○、実線)を100°C、10分間熱処理(△、点線)または121°C、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理(□、破線)し、マイクロタイタープレートに各濃度でコートした。細胞伸展活性は、BHK細胞の懸濁液を37°C、90分間インキュベートして行った。



図V-4. 熱及びオートクレーブ処理したビトロネクチン上での細胞の形態

ヒトビトロネクチン(A-C)とヒトフィブロネクチン(D-F)を100℃、10分間熱処理(BとD)、または121℃、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理(CとF)し、マイクロタイプレート各穴に10 μg / mlの濃度でコートした。コントロールとして、未処理のビトロネクチン(A)とフィブロネクチン(D)もコートした。BHK細胞をタンパク質をコートした穴の中で、37℃、90分間インキュベートした。細胞の形態は、位相差顕微鏡で観察した。図中のバーの長さは、50 μmに相当する。



図V-5. 熱及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へのRGDペプチドの効果

未処理(Intact)、100°C、10分間の熱処理、121°C、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理したビトロネクチンをマイクロタイタープレートに10μg / mlの濃度でコートした。ビトロネクチンをコートした穴に、BHK細胞の懸濁液を加える際に100μg / ml GRGDSP(黒)、またはGRGESP(白)を共存させた。コントロールとして、合成ペプチドを共存させない場合の値(斜線)も示した。

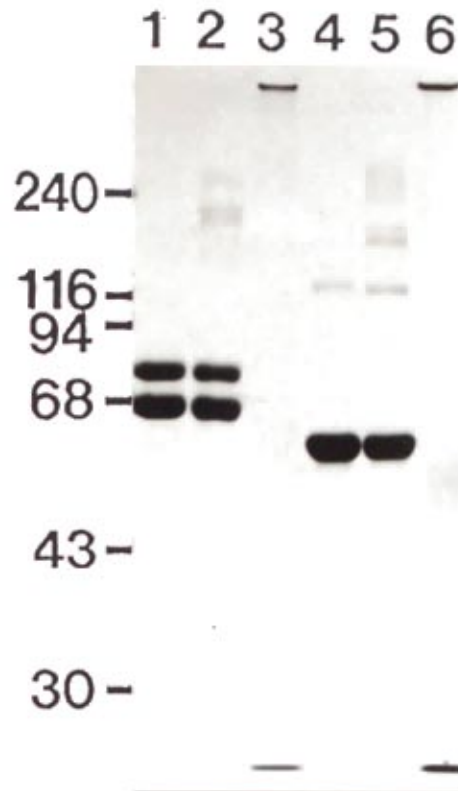
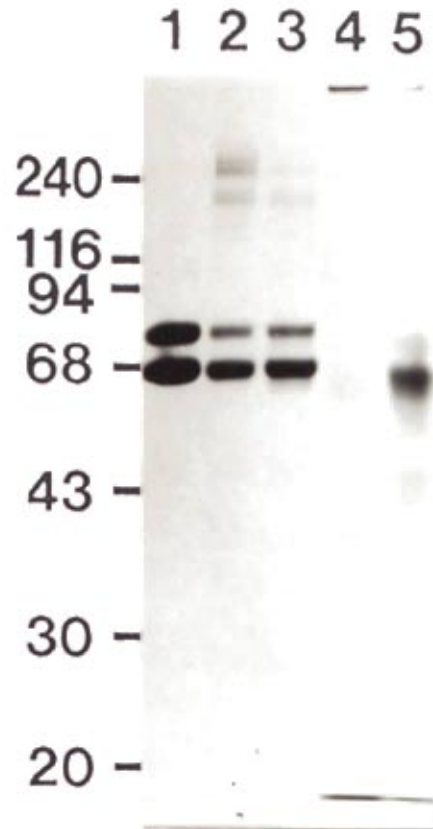


図 V - 6 . 熱及びオートクレーブ処理したビトロネクチンの SDS 電気泳動

ヒトビトロネクチン(レーン1-3)とブタビトロネクチン(レーン4-6)を100°C、10分間の熱処理(レーン2、5)、または121°C、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理(レーン3、6)した後、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中で、100°C、5分間処理し、試料とした。各レーン当り7.5 μgのビトロネクチンを泳動した。ゲルは、4 %アクリルアミドの濃縮ゲルと10 %アクリルアミドの分離ゲルを用いた。コントロールとして、未処理のビトロネクチン(レーン1、4)も泳動した。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。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を示している。



図V-7. ビトロネクチンの熱及びオートクレーブ処理への還元剤の影響

ヒトビトロネクチン(レーン1)を100℃、60分間熱処理(レーン2、3)、または121℃、1.2 kg / cm²、20分間オートクレーブ処理(レーン4、5)する際に、10 mM ジチオスレイトールを加えた場合(レーン3、5)と加えない場合(レーン2、4)を比較した。処理したビトロネクチンは、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℃、5分間処理した後、10 %アクリルアミドの分離ゲルでSDS電気泳動した。タンパク質の染色は、クーマシーブリリアントブルーで行った。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を示している。