＜口頭発表要旨＞

1.　日本細胞生物学会　第40回大会　（大阪　1987年11月）

ヒト血漿ビトロネクチン７５Ｋと６５Ｋの微量定量法とビトロネクチン血液型

○窪田暦、片山澄美子*、松田道生#、林正男　（お茶の水女子大・理・生物、#自治医大・医・止血血栓、*現・東大・遺伝子）

ビトロネクチンは、血漿や血清に存在する細胞接着性糖タンパク質で、ヒト血漿・血清中に0.1～0.4mg/mlの濃度で存在している。ビトロネクチンは、フィブロネクチンと同様の細胞接着及び伸展活性を示す他、補体複合体C5b－9に結合して補体の溶血作用を阻害したり、トロンビン・抗トロンビンⅢ複合体に結合して血液凝固反応を調節する。

ビトロネクチンの分子量は75Kであるが、還元剤処理したヒト血液では分子量65Kと75Kのポリペプチドの混合物として検出される。私達は、ヒト血漿・血清0.1μlをＳＤＳ電気泳動後、ビトロネクチン抗体を用いてイムノブロットを行い、ニトロセルロースシート上に発色したビトロネクチンのバンドをデンシトメーターで測定した。この方法では、ヒト血液中におけるビトロネクチン75Kと65Kが別々に、しかも5～35ngという微量で定量できる。この微量定量法を用いて、205検体のヒト血液中におけるビトロネクチンの定量を行った。その結果、血液中でのビトロネクチンの存在様式は、65Kと75Kの存在比によって３つの型に分類できた。その３つの型とは、75Kの多いⅠ型、75Kと65Kが同量のⅡ型、65Kの多いⅢ型で、それぞれ58%、35%、5%のヒトが該当した。このビトロネクチン血液型は、性別、年齢、ＡＢＯ式血液型とは関係なかった。ビトロネクチンの３つの型が生じる原因やその生理学的意味は、現在のところ、不明である。

日本細胞生物学会大会講演要旨集 p.100　1987.

A SENSITIVE ASSAY FOR VITRONECTIN IN HUMAN PLASMA AND VITRONECTIN BLOOD TYPE. Koyomi Kubota, Sumiko Katayama*, Michio Matsuda**, and Masao Hayashi. Department of Biology, Ochanomizu University, Tokyo 112; and **Hemostasis and Thrombosis Research Division, Institute of Hematology, Jichi Medical School, Tochigi 329-04; *Present address; Molecular Genetics Research Laboratory, Tokyo University, Tokyo 113.

Vitronectin is a cell adhesive glycoprotein present at a concentration ranging 0.1-0.4 mg/ml in human serum and plasma that promotes attachment and spreading of animal cells to culture dishes and concerns to blood coagulation and complement system. Vitronectin is usually detected as a mixture of two polypeptides showing molecular weight of a 75 kilodalton(kDa) and a 65 kDa, a fragment of the 75 kDa, in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis after chemical reduction.

We established a very sensitive assay for vitronectin in human serum and plasma, that could measure 75 kDa and 65 kDa polypeptides respectively in the range of 5-35 ng. The assay was constituted of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole serum or plasma, immunoblotting with anti-vitronectin antibody, and densitometry of vitronectin bands on nitrocellulose sheets. From analysis with 205 lots of human serum or plasma, we classified them into three types concerning the ratios of 65 kDa to 75 kDa polypeptides of vitronectin. Type I(58% persons) was 75 kDa rich, type II (35% persons) contained approximately equal amount of 75 kDa and 65 kDa, and type III(5% persons) was 65 kDa rich. The type of vitronectin did not correlate with sex, age, and ABO blood type, and it was independent of the concentration of vitronectin in blood.

Cell Struct. Funct. 12, 694, 1987.

2.　日本細胞生物学会　第41回大会　（名古屋　1988年11月）

ビトロネクチンのＳＤＳ電気泳動上の奇妙な振舞い

○窪田 暦、林 正男　（お茶の水女子大・理・生物）

動物の血漿及び血清中に存在する細胞接着性糖タンパク質の一つであるビトロネクチンは、別名Ｓ－プロテイン、血清中伸展因子と呼ばれる多機能タンパク質である。ヒト血漿中に約0.2mg/mlの濃度で存在している。

ビトロネクチンは、ＳＤＳ電気泳動において分子量75,000とその分解物である65,000の２つのバンドに分離する。しかし、この２つのバンドの分子量は80,000と72,000に算出されることもしばしばある。一方、アミノ酸配列から推定されるポリペプチド部分の分子量は、52,000と45,000であり、結合糖を考慮しても、報告されている分子量の値は大きく食い違う。今回、私達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依存して変化するということを見い出した。そこで、ポリアクリルアミド濃度に依存しない分子量の算出方法であるFergusonプロットでビトロネクチンの分子量を解析した。その結果、ビトロネクチンの分子量は62,000と52,000になった。小川ら[第11回糖質シンポジウム講演要旨 pp.69-70 (1988)]の報告している結合糖の量（分子量6,000）を差し引くと、２本のバンドのポリペプチド部分の分子量は56,000と46,000になる。従って、一次構造から算出されるビトロネクチンの分子量が正しい値と思われ、ＳＤＳ電気泳動では通常、27～41%程大きい分子量の位置に泳動される。

第41回日本細胞生物学会講演要旨集　p.84　1988.

ANOMALOUS BEHAVIOR OF VITRONECTIN IN SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS. Koyomi Kubota and Masao Hayashi. Department of Biology, Ochanomizu University, Tokyo 112.

Vitronectin, one of cell-adhesive glycoproteins in animal plasma and serum, is a multifunctional protein. Vitronectin is present at concentrations ranging 0.1-0.4 mg/ml in human plasma. It functions in cell-attachment, blood coagulation, and cell-lytic activity of C5b-9.

There was discrepancy concerning the reported Mr of vitronectin. Human vitronectin separates into two bands in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis after chemical reduction. Almost all reports estimated the Mr of the two bands at 75,000 and 65,000 daltons (75 kDa and 65 kDa) from the relative mobilities in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The smaller form is an endogenous fragment of the larger molecule. We, however, calculated them as 80 kDa and 72 kDa [Kubota, K., et al.: Cell Struct. Funct. 13, 123-128 (1988)]. On the other hand, the Mr of the two molecules containing about 5% carbohydrate was calculated as 55 kDa and 48 kDa from the amino acid sequence and possible cleavage position [Gebb, C., et al.: J. Biol. Chem. 261, 16698-16703 (1986)].

We found that apparent Mr of vitronectin varied with the concentration of polyacrylamide in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Using Ferguson plot analysis [Frank, R. N., et al.: Arch. Biochem. Biophys. 171, 1-13 (1975)], the Mr of vitronectin was estimated 62 kDa and 52 kDa. The Mr of their polypeptide cores became 56 kDa and 46 kDa after subtracting the carbohydrate content (6 kDa) of vitronectin [Ogawa, H., et al.: Abs. XIth Japanese Carbohydrate Symposium. pp.69-70 (1988)]. These values almost corresponded to 52 kDa and 45 kDa which were calculated from amino acid sequence. These results suggest that vitronectin migrates at positions giving 27-41% larger apparent Mr in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Cell Struct. Funct. 13, 621, 1988.

3.　日本生化学会　第62回大会　（京都　1989年11月）

シヨウジョウバエ、テトラヒメナ、粘菌にビトロネクチンは存在するか？
○窪田 歴、林 正男（お茶大・理・生物）

【目的】ヒトの血漿や結合組織に存在する細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチンを、独自に開発した簡便精製法により、ウマ、ブタ、ウサギ、ニワトリからも初めて精製した。その結果、哺乳類や鳥類の血漿中に、動物種特異的なビトロネクチンが存在することが結論された（昨年の本学会）。今回、ビトロネクチンに対する抗体を作製し、より下等な生物におけるビトロネクチンの存在を抗体反応性で検討した。
【方法】ショウジョウバエ（お茶大・石和貞男）、テトラヒメナ（お茶大・能村堆子）、粘菌（お茶大・太田次郎）、線虫（岡山大・香川弘昭）、ヒドラ（遺伝研・藤沢敏孝）、カイメン（お茶大・渡辺洋子）、プラナリア（お茶大・大戸吉和）の全タンパク質をＳＤＳ電気泳動し、ビトロネクチンに対する抗体でイムノブロットした（カッコ内は入手先、敬称略）。さらに反応した分子の性状を解析した。【結果】ショウジョウバエ、テトラヒメナ、粘菌にはビトロネクチン抗体と反応する分子が存在する。この報告は、哺乳類と鳥類以外でビトロネクチン様タンパク質が見いだされた最初の報告である。

生化学　61．1044．1989.

4.　日本生化学会　第63回大会　（大阪　1990年9月）

ビトロネクチン血液型と遺伝子多型の相関
○窪田 歴、林 正男、＊大石 伸枝、＊榊 佳之
（お茶大・理・生物、＊九州大・遺伝情報実験施設）

【目的】ヒト血漿中に存在する細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチンは，分子量75,000(75kDa)と，そのカルボキシル末端側10kDaの切断された65kDaの２つの分子種の混合物として検出される。全てのヒトは，この75kDaと65kDaの存在量比に従い，75kDaの多いＩ型，75kDaと65kDaがほぼ等量のII型，65kDaの多いIII型，の３つのビトロネクチン血液型に分類できる。このビトロネクチン血液型が生じる理由として，ビトロネクチン遺伝子の多型が関係するかどうかを検討した。
【方法】10kDa切断部位を含むビトロネクチン遺伝子の530bp(3693～4222)を，各ビトロネクチン血液型をもつヒトのゲノムＤＮＡをもとに，ＰＣＲ法により部分増幅した。そのポリヌクレオチド鎖の制限酵素の切断様式の違いにより遺伝子の多型を調べた。
【結果】ビトロネクチン遺伝子には，制限酵素PmaC Iにより切断されるもの(VIN Thr-381)とされないもの(VIN Met-381)の２つの対立遺伝子が存在していた。またＩ型のヒトはVIN Thr-381のみ，II型のヒトはVIN Thr-381とVIN Met-381の両方，III型のヒトはVIN Met-381のみを持つことがわかった。以上のことより，この対立遺伝子の組合せによって，ビトロネクチン血液型が決まると考えられる。

生化学　62．657．1990.

5. 日本生化学会　第63回大会　（大阪　1990年9月）

ビトロネクチン分子の動物種多様性と統一性

○中島尚美、窪田 歴、八藤後武美[1]、小川温子[2]、松本勲武[2]、瀬野信子[2]、林 正男（お茶大・理・生物、[1]伊藤ハム・中研、[2]お茶大・理・化学）

【目的】細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチンは、私たちの開発した方法で、ヒト以外にもニワトリやブタ、ウシなど６種の動物血漿からも精製できている。しかし、これらのビトロネクチンのＳＤＳ電気泳動像は、ビトロネクチンが動物種により様々な分子量をもつことを示している。そこで、この動物種多様性を解析した。
【方法】ビトロネクチンはＳＤＳ電気泳動のポリアクリルアミドゲル濃度に依存して見かけの分子量が変化する糖タンパク質であると考え、ポリアクリルアミドゲル濃度に依存しない分子量の算出方法であるFergusonプロットでビトロネクチンの分子量を解析した。さらに、ビトロネクチン分子に含まれる糖鎖の解析も行った。
【結果】ビトロネクチン分子の動物種多様性は主に糖鎖部分によるものであり、ポリペプチド鎖部分には統一性の見られることが明かになった。

生化学 62, 657, 1990.

6. 日本細胞生物学会　第43回大会（東京　1990年10月）

真性粘菌のビトロネクチンの精製と性状

○窪田 暦、林 正男（お茶大・理・生物）

細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチンは、動物細胞の接着・伸展活性を示すばかりでなく、血液凝固系の調節、免疫補体系の調節などの機能を果たしていることが知られている。ビトロネクチンは、ヒト血漿由来のものが中心に研究されているが、高等動物一般に存在しており、分子量は56,000～78,000である。

私達の開発した簡便精製法により、ヒトやウシ以外にウマ、ウサギ、ブタ、ニワトリから世界で初めてビトロネクチンを精製したことを一昨年の本大会で報告した。

今回、各種の精製ビトロネクチンに対するポリクローナル抗体を作成し、より下等な生物におけるビトロネクチンの存在を抗体反応性で検討した。その結果、血液凝固系や免疫補体系の存在していない真性粘菌 <u>Physarum</u> <u>polycephalum</u>の変形体にも抗ウシビトロネクチン抗体と反応する分子量70,000のタンパク質が存在することを見いだした。さらに、その粘菌ビトロネクチンの精製を行った。粘菌変形体のホモジネートを10,000rpmで遠心すると、ビトロネクチンは沈澱に不溶性タンパク質として分画され、Triton X-100により可溶化された。このTriton抽出液にビトロネクチン抗体セファロースを加えて、結合タンパク質を8M尿素により溶出すると、粘菌ビトロネクチンがおおむね精製できた。

第43回日本細胞生物学会講演要旨集　p.107

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VITRONECTIN FROM PLASMODIUM OF <u>PHYSARUM</u> <u>POLYCEPHALUM</u>. <u>Koyomi Kubota</u> and <u>Masao Hayashi</u>. Department of Biology, Ochanomizu University, Tokyo 112.

Vitronectin is one of cell adhesive glycoproteins in animal plasma and serum. It appears to function in complement and coagulation systems as well as cell attachment system. Vitronectin has been isolated from human, bovine, horse, porcine, rabbit, and chicken plasma by heparin affinity chromatography in the presence of urea [Kitagaki-Ogawa, H. et al.: Biochim. Biophys. Acta 1033, 49-56, (1990)]. The molecular weights of these vitronectins are ranging from 56,000 to 78,000. However, there has been no report on vitronectin in other organisms.

To study structure and function of vitronectin in primitive eukaryotes, we carried out immunoblotting of slime mold, <u>Pysarum</u> <u>polycephalum</u> with rabbit polyclonal antibody against bovine vitronectin. A protein that cross-reacted with anti-bovine vitronectin antibody was found in <u>Physarum</u> <u>polycephalum</u>. We shall refer to this molecule as <u>Physarum</u> vitronectin. <u>Physarum</u> vitronectin was detected as one band with molecular weight 70,000 by immunoblotting under reducing conditions. To purify this molecule, plasmodia of <u>Physarum</u> <u>polycephalum</u> were homogenized with 0.13 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. <u>Physarum</u> vitronectin was enriched in the precipitate and extracted with 1 % Triton X-100 from the precipitate. The extract was subjected to immunoaffinity chromatography using anti-bovine vitronectin antibody-sepharose. Thus almost pure <u>Physarum</u> vitronectin was obtained.

Cell Struct. Funct. <u>15</u>, 469, 1990.

7. International Symposium on Structure and Function of Extracellular Matrix. (東京 1991年8月)

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *PHYSARUM* VITRONECTIN

Koyomi MIYAZAKI, Takako HAMANO, Naomi NAKASHIMA, Michiko ISHIKAWA, *Haruko OGAWA, *Isamu MATSUMOTO, *Nobuko SENO, and Masao HAYASHI.
(Departments of Biology and *Chemistry, Ochanomizu University, Tokyo, JAPAN)

Vitronectin is a multifunctional glycoprotein in animal blood plasma. It promotes adhesion and migration of cells through the interaction between adhesion receptor integrins and Arg-Gly-Asp (RGD) sequence within vitronectin molecule. Furthermore it modulates immune complement and blood coagulation. It has heparin binding site, which is cryptic in the native form but exposed after treatment of 8 M urea. Based on this property, vitronectin has been instantly purified from human plasma by heparin affinity chromatography in the presence of urea (1, 2). The procedure has been applied to various animal plasma and vitronectins can be purified from rabbit, mouse, rat, hamster, guinea pig, dog, horse, porcine, bovine, goat, sheep, chicken, and goose. All of these vitronectins have similar NH_2-terminal sequences and promote cell-spreading in the same way. The molecular weights of these vitronectins range from 59 to 78 kD.

To search for more general structure and function of vitronectin, we tried to identify vitronectin in a variety of living organisms immunologically. A protein that cross-reacted with anti-vitronectin antibody was found in even slime mold *Physarum polycephalum*. The protein was detected as one band with molecular weight 70 kD by immunoblotting under reducing conditions. We shall refer to this molecule as *Physarum* vitronectin. *Physarum* is a primitive eukaryote. What is the vitronectin-like molecule in slime mold ?

Physarum vitronectin was purified to homogeneity from *Physarum* microplasmodia by four steps: extraction from the insoluble cell debris, immunoaffinity chromatography, heparin affinity chromatography, and electroelution of preparative SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Purified molecule migrated as one band of 70 kD on SDS-PAGE under reducing conditions.

Physarum vitronectin was subjected to NH_2-terminal microsequencing analysis on polyvinylidene difluoride membranes. The sequence of NH_2-terminal 20 amino acids was A-S-Y-P-V (or I)-P-Q-K-L-G-M-P (or D)-A-L-R (or D, G, Y)-P-T (or S)-M-S-Q, which had no similarity to known NH_2-terminal sequences for vitronectins. According to a computer homology search using a NBRF-PIR protein sequence database, the same NH_2-terminal sequence was not found in any proteins, but partially shared sequences were found in cathepsin H and dihydrolipoamide acetyltransferase precursor.

Physarum vitronectin was efficient in mediating cell spreading of BHK cells, even though the maximum level of spreading activity was not beyond 55%. The morphology of cells spread on *Physarum* vitronectin presented less expanded cytoplasm than that on human vitronectin. The cell spreading was specifically inhibited by RGD-containing synthetic peptides.

In conclusion, *Physarum* vitronectin is similar but not identical with animal plasma vitronectin, and it will provide new aspects of vitronectin study.

(1) Yatohgo, T. et al. *Cell Struct. Funct.* 13, 281-292, (1988)
(2) Kitagaki-Ogawa, H. et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1033**, 49-56, (1990)

International Symposium on Structure and Function of Extracellular Matrix. Abstract p.51 1991.

8.　日本生化学会　第64回大会　東京　1991年10月

真性粘菌のビトロネクチン様タンパク質の精製と特徴づけ
○宮崎 歴(こよみ)、浜野 宝子(たかこ)、林 正男（お茶大・理・生物）

【目的】高等動物血漿中に存在するビトロネクチンは、分子量58～78kDaの細胞接着性糖タンパク質である。私達は、真性粘菌中にビトロネクチン抗体と免疫交差性を持つ70kDaのビトロネクチン様タンパク質が存在していることを一昨年の本大会で報告した。今回、この分子を精製し、性状の検討を行なった。
【方法】真性粘菌<u>Physarum polycephalum</u>変形体ホモジネートの不溶性画分を0.8%Triton X-100で抽出した。その抽出物を、抗体セファロースカラムクロマトグラフィー、次いでヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィー、さらに、SDS電気泳動後、ゲルから電気的に回収し、粘菌のビトロネクチン様タンパク質を単一に精製した。これらの精製標品を用いて粘菌のビトロネクチン様タンパク質のN末端アミノ酸配列分析、細胞伸展活性を調べた。
【結果】粘菌のビトロネクチン様タンパク質のN末端アミノ酸配列は、高等動物ビトロネクチンのものとは、ホモロジーがみられなかった。しかし、この分子は、ヘパリン結合活性やRGD配列依存性の細胞伸展活性があり、特殊ではあるが、粘菌ビトロネクチンと考えられる。

生化学　<u>63</u>, 713, 1991.

9.　日本生化学会　第64回大会　東京　1991年10月

ビトロネクチン分子の糖とポリペプチド鎖の動物種多様性と統一像
○中島尚美、宮崎 歴、石川総子、小川温子*、内堀はるひ*
松本勲武*、瀬野信子*、林 正男
（お茶大・理・生物、*化学）

【目的】ビトロネクチンは、ヒト由来では75kDaと65kDaの２本鎖として知られている。しかし、１４種の動物血漿から私たちの開発した方法により精製したビトロネクチンは、SDS電気泳動像において動物種により様々な分子量とバンド数をもっていた。そこで、ビトロネクチン分子から糖鎖をはずしてその前後の分子量変化を解析し、ビトロネクチンの統一像を探った。
【方法】ノイラミニダーゼ、エンド-α-<u>N</u>-アセチルガラクトサミニダーゼ、<u>N</u>-グリコシダーゼFを用いて、ビトロネクチンの糖鎖をはずした。糖鎖が完全にはずれていることの確認は、酵素標識レクチンであるHRP-ConA及びHRP-PNAを用いて行なった。糖鎖のないビトロネクチン分子を得、SDS電気泳動及びファーガソンプロットによりその分子量を求めた。
【結果】ビトロネクチン分子は、糖鎖をはずすことにより分子量が3～14kDa小さくなった。更に、糖鎖をはずしたビトロネクチン分子の分子量をファーガソンプロットにより求めたところ40～57kDaの１～３本鎖であった。従って、ビトロネクチン分子の糖鎖部分には多様性がみられる。しかし、ポリペプチド鎖には多少の多様性はあるものの、N末端から切断部位までは40～46kDa、切断部位からC末端までは8～13kDaという１つの統一像が考えられる。

生化学　<u>63</u>, 713, 1991.

10. 日本細胞生物学会　第44回大会　（福岡　1991年11月）

卵黄ビトロネクチンの精製と特性

○浜野宝子，長野裕子，中島尚美，石川総子，宮崎　暦，林　正男
（お茶の水女子大・理・生物）

ビトロネクチンは，高等動物の血液，組織中に存在する多機能タンパク質であり，細胞接着や免疫補体系，血液凝固系に関与することが知られている。多くの細胞接着分子は，発生における細胞移動や組織形成に重要な役割を果している。私達は一昨年の第42回細胞生物学会で，ニワトリ卵黄中に，卵黄型ビトロネクチンと呼ぶべきタンパク質が存在することを報告した。

今回，このニワトリ卵黄ビトロネクチンを精製し，その性状について検討した。ヒドロキシアパタイトカラム，DEAEセルロースカラム，抗ニワトリ血漿ビトロネクチン抗体カラムを用いて，ニワトリ卵黄から卵黄ビトロネクチンを，2900倍精製した。血漿ビトロネクチンの分子量が70KDと65KDであるのに対し，卵黄ビトロネクチンは54KDと45KDが主であった。N末アミノ酸分析の結果，54KDは血漿ビトロネクチンのN末配列と同一であり，45KDはN末から50番目以後のアミノ酸配列と類似していた。細胞伸展活性は血漿ビトロネクチンと同等な活性を示した。また，RGDペプチドによる阻害活性もみられた。しかし，ヘパリン結合活性やコラーゲン結合活性はみられず，この点は血漿ビトロネクチンとは異なった。レクチン反応性では，WGA，UEA-1，PHA-Lとの結合性が，血漿ビトロネクチンと若干異なり，従って，糖鎖構造も若干異なっていると思われる。

第44回日本細胞生物学会講演要旨集　p.167

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF YOLK VITRONECTIN FROM CHICK EGGS.

Takako Hamano, Yuko Nagano, Naomi Nakashima, Michiko Ishikawa, Koyomi Miyazaki, and Masao Hayashi, Department of Biology, Ochanomizu University, Tokyo 112.

Vitronectin is a multifunctional glycoprotein in animal blood plasma, which exhibits cell-adhesion activity, regulation of blood coagulation, and inhibition of complement cytolysis. Many cell attachment factors play important roles in cell migration and tissue morphogenesis during embryonic development. We have previously reported the presence of a vitronectin-like protein in chick egg yolk.

In this paper, we purified the chick yolk vitronectin and characterized it. Yolk vitronectin was purified 2900-fold from chick eggs with hydroxyapatite, DEAE-cellulose, and anti-chick blood vitronectin antibody columns. Molecular weight of yolk vitronectin was 54KD and 45KD in SDS-PAGE under reducing conditions, whereas that of blood homologue was 75KD and 65KD. Concerning NH_2-terminal amino acid sequences, 54KD protein was the same as that of blood vitronectin, and 45KD one was similar to the sequence starting at the 50th amino acid from the NH_2-terminus of blood vitronectin. Cell-spreading activity of yolk vitronectin was indistinguishable from that of blood vitronectin. Both vitronectins were quite sensitive to RGD peptides. In contrast to above similarity, yolk vitronectin did not bind to heparin and collagen, that largely differed from the nature of blood vitronectin. Reactivity of yolk vitronectin with lectins of WGA, UEA-1, and PHA-L was also slightly different from that of blood vitronectin, suggesting slight differences in their bound carbohydrates.

Cell Struct. Funct. 16, 608. 1991

11. 9th Symposium of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists.
(香港　1991年12月)

PHYSARUM VITRONECTIN: A UNIQUE CELL-SPREADING PROTEIN.
K. Miyazaki, T. Hamano, and M. Hayashi, Department of Biology, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112, JAPAN.

Vitronectin is a multifunctional glycoprotein of approximately 70 K in animal blood plasma. It promotes cell adhesion and modulates both immune complement and haemostatic enzymes. Vitronectin is also known to be a heparin binding protein. Although there have been many reports on vitronectin from mammalia, there has been no report from primitive organisms.

We searched for vitronectin in primitive organisms. A protein cross-reacted with vitronectin antibody was found in slime mold *Physarum polycephalum*. Molecular weight of this protein is 70 K under reducing conditions. We shall refer to this molecule as *Physarum* vitronectin.

Physarum vitronectin was isolated from *Physarum* by extraction from cell debris, immunoaffinity chromatography, heparin affinity chromatography, and electroelution from preparative SDS-gels. *Physarum* vitronectin migrated as one band of 70 K and strongly reacted with vitronectin antibody. The amino-terminal sequence of *Physarum* vitronectin was unique and had no similarity to known sequences of vitronectins. However, *Physarum* vitronectin could spread BHK cells efficiently. The morphology of the cells spread on *Physarum* vitronectin presented less expanded cytoplasm than that on human vitronectin. The cell-spreading was inhibited by a synthetic peptide GRGDSP, but not by GRGESP, suggesting that there is cell-spreading active RGD sequence in *Physarum* vitronectin.

In conclusion, *Physarum* vitronectin is similar but not identical with known animal plasma vitronectins, and it seems to be a unique member of vitronectin family.

9th Symposium of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists.
Programme & Abstracts p. 70

12. 9th Symposium of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists.
(香港　1991年12月)

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHICK YOLK VITRONECTIN. T.Hamano, Y.Nagano, N.Nakashima, M.Ishikawa, K.Miyazaki, and M.Hayashi. Department of Biology, Ochanomizu University, Tokyo 112, Japan.

Vitronectin (also called S-protein, serum spreading factor, or epibolin) is a multifunctional glycoprotein in animal blood plasma, exhibits cell-adhesion activity, regulates blood coagulation, and inhibits complement cytolysis.

Many cell attachment factors such as cadherin, laminin, and tenascin, generally play important roles in cell migration and tissue morphogenesis in an early stage of development. We have, therefore, tried to study on the role of vitronectin in early development. During the preliminary experiment, we found "yolk vitronectin" in chicken egg yolk through immunological assays. Yolk vitronectin was purified 2,900-fold by a combination of hydroxyapatite, DEAE-cellulose, and anti-vitronectin-Sepharose columns. Whereas molecular weight of blood vitronectin was 75KD and 65KD, that of yolk vitronectin was 54KD and 45KD in SDS-PAGE under reducing conditions. Concerning NH_2-terminal amino acid sequences, 54KD protein was the same as that of blood vitronectin, and 45KD one had some homology with the sequence of human blood vitronectin beginning at the 50th amino acid from the NH_2-terminus. Cell-spreading activity of yolk vitronectin was sensitive to RGD peptides but not RGE. In contrast to the above similarity, yolk vitronectin did not bind heparin and collagen, that was largely different from the nature of blood vitronectin. Reactivity of yolk vitronectin with lectins of UEA-1, WGA and PHA-L slightly differed from that of blood vitronectin, suggesting slight differences between their bound carbohydrates.

9th Symposium of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists.
Programme & Abstracts p. 69

13. 第21回医用高分子シンポジウム　1992年8月

田中晶子、菊池明彦、片岡一則、鶴田禎二、宮崎歴、林正男
「ジアミン側鎖を有するポリスチレン誘導体の血管内皮細胞培養床としての評価」

我々はこれまでに、側鎖にアミノ基を有する種々ポリスチレン誘導体表面上での血管内皮細胞の接着・増殖挙動について検討してきた。その過程で、アミノ基の化学構造および塩基性が異なると内皮細胞の接着・増殖挙動に差が見られることが明らかとなってきた。さらに、材料表面上での細胞の接着挙動は介在する細胞接着性タンパク質の影響を受けることを示唆する結果が得られた。そこで本研究では、側鎖にジアミン構造を有するポリスチレン誘導体表面上での血管内皮細胞の接着・増殖挙動を解析しアミノ基の構造効果について評価するとともに、細胞接着性タンパク質の影響についても詳細に検討したので報告する。

第21回医用高分子シンポジウム要旨集

14. 日本生化学会　第65回大会　(福岡　1992年10月)

ビトロネクチン細胞伸展活性の熱及びオートクレーブ耐性
○宮崎 歴, 浜野 宝子, 林 正男 (お茶の水女子大・理・生物)

【目的】ビトロネクチンは、RGD配列を介した細胞接着活性をもつ血漿タンパク質である。大量精製法の確立の結果、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考えるようになった。今回、その基礎研究の一部として、熱やオートクレーブによるビトロネクチンの細胞伸展活性の変化を研究した。
【方法】ビトロネクチン、フィブロネクチン、コラーゲンを40－100℃、10分の熱処理後、または、121℃、1.2kg/cm^2、20分のオートクレーブ処理後、細胞伸展活性を調べた。細胞伸展活性のRGD配列依存性は、RGDペプチド存在下の細胞伸展活性により確かめた。また、処理したタンパク質の分子変化は、SDS電気泳動で観察した。
【結果】熱処理(100℃、10分)またはオートクレーブ処理しても、ビトロネクチンは細胞伸展活性を失わず、未処理のビトロネクチンと同様の活性を示した。しかし、フィブロネクチンやコラーゲンは活性を失った。また、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は、GRGDSPで86%、GRGESPで50%の阻害を受けた。熱及びオートクレーブ処理でビトロネクチンは、分解と高分子量化を受けるが、この変化は還元剤により部分的に抑制された。

生化学 64, 748, 1992.