

フィブロネクチン・レセプターと細胞表面

フィブロネクチンは動物の血液中や培養細胞表面などに存在する糖蛋白質で、細胞の接着・伸展・移動・分化・増殖・食作用などの生理作用を示し、癌の転移、組織修復、組織構築、生体防御などに関与している。このフィブロネクチンの細胞表面での研究は細胞接着ペプチド RGD (Arg-Gly-Asp) の発見と細胞膜上のレセプターの発見により現在大きな転機を迎えつつある。他の接着性蛋白質であるラミニン、ビトロネクチン、コラーゲンなどが、フィブロネクチンとそれなりに「遠くて近い」「深い仲」だということもささやかれている。

はじめに その糖蛋白質の存在がそれまで報告されていたにもかかわらず、生理機能が不明であったフィブロネクチン (fibronectin) は、1973年に動物細胞が溶化したときに細胞表面から溶出する主要な糖蛋白質として発見され、一部の人々に強い衝撃を与えた。しかし、1973年に発表された論文は7報にすぎなかった。その後、Yamadaらによる培養細胞由来フィブロネクチンの精製法の確立、EngvallとRuoslahtiによる血液由来フィブロネクチンの簡便多量精製法の確立によって、生化学的解析の基盤ができあがった。一方、細胞の癌化以外にも、細胞の器質*・細胞外マトリックスへの接着、細胞の形態調節、発生初期での神経冠細胞などの移動、細胞の増殖・分化・食作用・走化性、赤血球凝集、神経細胞の軸索伸展などの生理作用に関係することが報告され、生化学、実験腫瘍学、分子生物学はもとより、細胞生物学、発生生物学、神経生物学など多くの分野の研究者に強いインパクトを与え続けている。さらに、臨床医学的には、近畿大の西田らが眼の角膜損傷の治療用点眼剤としてフィブロネクチンの導入に成功し、同じ発想による皮

膚科領域での研究を触発している。また、大きな外傷、感染症、肺疾患、血液疾患などにも関与している可能性がそれ以前から指摘されていて、その診断法や治療法およびそれらの開発、ひいては産業化も検討されている。

フィブロネクチンに続く新しい接着性蛋白質も続々と発見されている。2匹目のドジョウは、1977年に発見され、1979年にその名が命名された基底膜成分の細胞接着性蛋白質ラミニン (laminin) である。ラミニンはフィブロネクチンと同じような細胞生理作用をもつが、とくに基底膜機能、癌細胞の転移、神経突起成長などとの関連が強い。また、フィブロネクチンとは異なる血液中の接着性蛋白質として血清中細胞伸展因子 (serum spreading factor) を、Barnes一人が1980年ごろから研究を開始していた。1983年に同じものがRuoslahtiらによってビトロネクチン (vitronectin) と再命名され、現在、3匹目のドジョウの最有力候補となっている。これら3つの細胞接着性蛋白質の全体像を表1に示す。なお、1984年の世界中の全出版論文数を比較すると、フィブロネクチン 494報、ラミニン 177報、ビト

Takayuki Hasegawa, 帝京大学医学部薬理学教室 (〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1) [Department of Pharmacology, Teikyo University School of Medicine, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan]

Masao Hayashi, お茶の水女子大学理学部生物学科 (〒112 東京都文京区大塚 2-1-1) [Department of Biology, Ochanomizu University, Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan]

Biochemical Aspects of Cell Adhesive Glycoproteins and their Receptors

[Key word] 【レセプター】【フィブロネクチン】【接着性蛋白質】【細胞表面】

ロネクチン 8 報である。

本稿では、筆者らが別々に進めてきた上記接着性蛋白質の生化学的研究とフィブロネクチンレセプターの研究を基盤に、これら接着性蛋白質とそのレセプター研究の進歩と現況を解説しようというものである。

I. 接着性蛋白質の生化学的性状

1. フィブロネクチン

フィブロネクチンは、線維状蛋白質に結合する蛋白質という意味にちなんで命名された。分子量約 25 万のポリペプチドが C 末端付近で S-S 結合している。2 量体を形成している可溶性の血漿フィブロネクチンと、多量体を形成し不溶性傾向の強い細胞表面にある細胞性フィブロネクチンがよく知られている。両者ともに、化学的組成、構造、抗原性、生理活性はよく似ている。血漿フィブロネクチンを用いた研究のほうが進んでいて、ヒト血漿中に 0.3 mg/ml と、比較的高濃度に存在し、セラチンに特異的に結合する性質を利用して 100 mg 程度は容易に精製できる。5~9% 含まれる糖鎖はポリペプチド中の Asn に結合している。糖鎖構造は既知である。糖鎖の役割はフィブロネクチンの細胞生理活性とは無縁

で、フィブロネクチン分子の構造安定性を保つにすぎない。全アミノ酸配列は最近、Kornblihtt ら¹⁾によって、ヒト・フィブロネクチン遺伝子の塩基配列から推定され、最大 2,324 個のアミノ酸からなることがわかっている。分子内部にアミノ酸配列の繰返し構造が見られる。リン酸化や硫酸化を受ける。ヘパリン (ヘパラン硫酸)、フィブリン、セラチン (コラーゲン)、補体成分 C1q など約 20 種の生体高分子と結合し、その結合自体がフィブロネクチンの細胞作用発現、生体内での機能発現の機構そのもののステップであると受けとられている (図 1)。これら生体高分子に結合する部位がフィブロネクチン分子の部分部分にドメインとして分布していて、筆者らによってその分布状態が解明された²⁾。本稿で中心的問題となる細胞結合ドメインは、分子の中央右寄りである。フィブロネクチンの遺伝子はひとつで、48 個のエキソンからなる。ED 部位で 2 種、III CS 部位で 5 種の選択的スプライシングが生じるために、理論上 10 種類の mRNA の生成が可能である³⁾。この 10 種類の mRNA が同一種内での血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチンおよびそのサブユニットに見られるポリペプチドの多様性⁴⁾を生む主要な原因であると解釈されている。

表 1. 細胞接着性蛋白質の比較

| 事 項 | フィブロネクチン | ラミニン | ビトロネクチン |
|---------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 単量体分子量と 4 次構造 | 25 万の 2 量体と多量体 | 22 万を 2~3 個と 44 万を 1 個の複合体 | 7.5 万とその分解物 6.5 万のそれぞれ単量体 |
| おもに接着する細胞存在部位 | 線維芽細胞 血漿、培養細胞表面、肺、胎盤など | 上皮細胞 ほとんどの組織の基底膜 | 線維芽細胞 血漿、血管、腎、肺、胎盤など |
| ヒト血漿中濃度 | 約 0.3 mg/ml | 正常人では検出されない | 約 0.2 mg/ml |
| 全アミノ酸配列 | 既 知 | 未 知 | 既 知 |

どれも遺伝子はクローニングされている。また、精製品および抗体も市販されている。

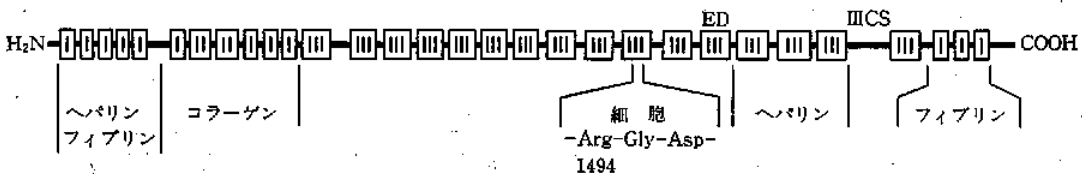


図 1. フィブロネクチンのドメイン構造

分子量 25 万のフィブロネクチンは分子内アミノ酸配列に繰返し構造がある。繰返し構造には 3 つの型があり、図中に I, II, III の記号で示した。ED および III CS は選択的スプライシングが起こる部位であり、10 種類の mRNA (したがって、フィブロネクチンの 1 次構造) は、この部分に差異が生じる。図の下部はフィブロネクチンの機能的ドメイン構造で、記入した生体高分子と結合する領域を示す。N 末端から 1494~1496 番目のアミノ酸が細胞結合ペプチド RGD である。

• 器質は substrate の和訳だが、酵素の作用する基質と区別するために用いている。培養器とか組織・器官の材質という意味をこめたつもりである。

2. ラミニン

ラミニンは、基底膜 (basal lamina) にちなんで 1979 年に命名された基底膜の主要な糖蛋白質である⁴⁾。Ⅳ型コラーゲン、エンタクチン (entactin)、ナイドジェン (nidogen) とともにいろいろな組織の基底膜に共通に存在しているが、血液中には検出されない。分子量は約 100 万と非常に大きく、44 万の A 鎖 1 つと 22 万の B 鎖 3 つ (2 つという説もあり未解決) が S-S 結合して、図 2 に示すような十字形をしている。マウス EHS 肉腫由来のラミニンが多くの実験で使われている。マウス EHS 肉腫 (移植可能であり、頑張れば 100 g 程度は取れる) を出発材料にすると、通常の生化学的精製法の難易度「中」で 100 mg 程度のラミニンを精製できる。ヒト胎盤などの正常組織からの精製法も報告されているが、容易ではない。ラミニンは、精製したⅣ型コラーゲンやヘパラン硫酸などと *in vitro* で結合する。その結合の巧さによって、*in vivo* では基底膜という特定の構造および機能をもつ膜が形づくられると考えられる。いわゆる細胞接着の活性をもつ部分は、図 2 に示すように十字形の中央または B 鎖の末端のどちらかか、または両方とも考えられているが、まだ未解決である。さらに、事態を複雑にしている (渦中の研究者にとっては面白く

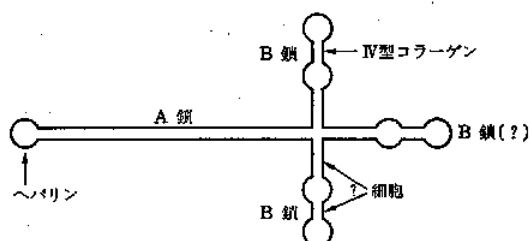


図 2. ラミニンのドメイン構造

分子量 44 万の A 鎖の左端にヘパリン結合部位がある。分子量 22 万の B 鎖は 3 つ (または 2 つ) あり、Ⅳ型コラーゲンと上皮細胞を結合する領域をもつ。この十字形モデルはラミニン分子 1 つを電子顕微鏡で観察した結果に基づいている。

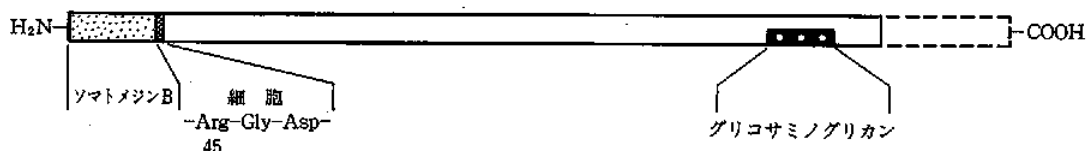


図 3. ビトロネクチンのドメイン構造

分子量 7.5 万のビトロネクチンは、その N 末端にソマトメジン B そのものをもっている。N 末端から 45~47 番目のアミノ酸が細胞結合ペプチド RGD である。C 末端近くの 34 個のアミノ酸領域がグリコサミノグリカン結合部位で、C 末端を含む分子量 1 万の点線で示した部分は *in vivo* で約半量ほど切断され、6.5 万のビトロネクチンとなっている。

感じている) のは、神経細胞では、ラミニンの活性部位が上皮細胞に結合する部位と異なっていて、A 鎖の末端にあるヘパリン結合ドメインが効くという事実である⁵⁾。ちなみに、フィブロネクチンも神経細胞に作用するが、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインにはそのような活性はない。このように、細胞結合活性がどの部位にあるかということも含めて、ラミニンの機能的ドメイン構造の解析は、フィブロネクチンやビトロネクチンに比べて少々遅れている。

3. ビトロネクチン

ビトロネクチンは *in vitro* のガラスやプラスチック器質に結合し、細胞接着を促進することにちなんで命名された血清中の糖蛋白質である。かつて α_1 プロテインと呼ばれたり、今もその名称が使われている "serum spreading factor" と同じものである。分子量 7.5 万と、その分解物である 6.5 万の糖蛋白質の混合物として精製されてくる。血漿中に 0.1~0.4 mg/ml の濃度で溶けていて、腎、胎盤、血管などの組織にも存在している。細胞生理機能はフィブロネクチンとよく似ている。Ruoslahti の研究室では、モノクローン抗体カラムとヘパリン親和性カラムを使う方法で、一度に数 10 mg 程度を精製しているが、モノクローン抗体はまだ一部のエリート研究集団の武器という現実なので、他の研究室でこの精製法に追従しているところはない。なお、モノクローン抗体および精製標品が 1985 年に Calbiochem 社から市販された。一方、Barnes の開発した 4 つのカラムを使う方法⁶⁾は、慣用の生化学設備で遂行できる。しかし筆者らが追試している現実では、1 カ月かかって 1000 ml の血漿から 1 mg くらいしか取れず、革新的な改良法が待たれている。全アミノ酸配列は最近、Ruoslahti 研究室の鈴木ら⁷⁾により、ヒト・ビトロネクチン遺伝子の塩基配列から推定された。それによると、ビトロネクチンは 458 個のアミノ酸からなり、計算値の分子量は糖鎖を考慮外としてはいるが、52132 と期待値より

もかなり小さい。分子内にアミノ酸配列の繰返し構造はなく、リン酸化などの化学修飾の問題にはまだ着手されていない。このビトロネクチンも、条件によりヘパリンに結合する⁸⁾。ゼラチンやコラーゲンには結合しない。変わったことに、トロンビン・抗トロンビンⅢ複合体に結合する。このことから、ビトロネクチンは血液凝固系に何らかの作用をもつと考えられる。機能的ドメイン構造は鈴木ら⁹⁾により報告されていて、図3に示すようにN末端の44個のアミノ酸はソマトメジンBそのものであり、その隣接した部分が細胞結合部位で、C末端近くの34個からなる部分にヘパリン結合部位があるということである。

II. 接着性蛋白質の細胞結合性

1. 細胞表面への結合性

フィブロネクチンは細胞の外側から作用して、細胞の示す多くの生命活動を調節している。フィブロネクチンが酵素活性を示すという報告はないし、細胞内に入って作用するという知見もない。したがって、細胞表面に何らかのフィブロネクチン作用相手(つまり、レセプター)があると考えるのが妥当である。しかし、数年前までは、これが妥当に思われていなかった。というのは、細胞表面上のいわゆる特異的レセプターのイメージはペプチドホルモンやカテコールアミンなどの比較的分子量に対するものであって、フィブロネクチンみたいな大きな糖蛋白質に対するイメージは、もっと非特異的に細胞表面にベタッと接着して機能しているというものであった。これは、1つにはフィブロネクチンの細胞作用が上記低分子に比べ、概して時間的に遅いことや、効果が生化学的に明確にとらえにくかったことによる。もう1つの理由は、フィブロネクチンは器質に結合しているときは細胞と結合するが、溶液状では細胞に結合できないと Pearlstein¹⁰⁾ が主張したことによる。彼の主張は、実際、フィブロネクチン研究者の実験とよく合うために、細胞表面上のフィブロネクチンレセプターを研究する手段が狭く限定されるに違いないと考えられていた。そこで、何もうまい工夫をしない、当たって砕ける型の実験は行なわれなかったし、それ以前の意気込みの段階で筆者らも何度か挫折してしまっていたのであった。

事態は、別の舞台のできごとによって打開された。それは、1983年になって突然、ラミニンのレセプターが3カ所から独立に発見されたことである。この発見は、意外にも、「普通」の発想と手法で得られた。そこで、ラミ

ニン研究者よりも常にずっと先行していたフィブロネクチン研究者は衝撃を受け、フィブロネクチンレセプターの探索を再検討しはじめたのであった。

もっとも、それ以前にまったく研究がなかったわけではなかった。Grinnell ら¹¹⁾は、懸濁したBHK細胞に対するフィブロネクチンの結合が4°Cでは多く、37°Cでは少なかったと報告している。しかし、この実験では、特異的結合は約30%しかなく、また、温度依存性についてもあまり信用できるものではなかった。このとき、彼らが¹²⁵Iでフィブロネクチンのポリペプチドを標識せずに、³H]NaBH₄を用いて糖鎖部分を標識したことは注意しておく必要がある。つまり、フィブロネクチンの細胞結合活性は¹²⁵I標識処理によって不活化されると言われている。一方、Mosherの研究室¹²⁾では、単層培養中の線維芽細胞に¹²⁵I標識したフィブロネクチンの結合性を調べ、解離定数は 3.6×10^{-8} M、結合部位の数は細胞あたり12.8万個あると報告した。この実験には別の問題がある。加えたフィブロネクチンの多くは細胞表面膜そのものに結合するというよりも、すでに細胞表面に存在していたフィブロネクチンを含む細胞外マトリックスに結合した可能性が高いのである。

Akiyama と Yamada¹³⁾の結果は信頼できそうである。彼らはBHK細胞に対する³H標識フィブロネクチンの結合性を抱括的に調べ、温度による差はないこと、最大結合の半値に達するには12~15分と遅いこと、細胞あたり約50万個の1種類のレセプターがあること、解離定数は 8×10^{-7} Mと中程度の結合力をもつことなどを1985年に報告した。この肯定的結果は¹²⁵I標識ではなく、³H標識フィブロネクチンを用いたことと、数mg/mlというきわめて高濃度のフィブロネクチンを使用したことがポイントとなっている。この濃度は、通常1 μ g/mlで細胞生理作用を示すフィブロネクチン濃度の、そのなんと約千倍の濃度であって、非常識というか、非凡というか、そういうアプローチであった。

他方、ラミニンのほうはいくつかのグループが細胞結合性に関する報告をしている。解離定数は約 2×10^{-9} Mと、フィブロネクチンに比べ約400倍も結合力が強い。ところが、細胞あたりの結合部位の数は1万から11万とまちまちに報告されている。これはたぶん、用いた細胞種(マウス線維肉腫、マウス黒色腫、ヒト乳癌)の差異によるものであろう。ラミニンの標識には¹²⁵Iが用いられたが、フィブロネクチンの場合と異なり、¹²⁵I標識処理はラミニンの細胞結合活性を不活化しないと思われる。

また、コラーゲンに関しては Goldberg¹⁴⁾ が、単層培養中のマウス 3T3 細胞に対する ¹²⁵I 標識 I 型コラーゲンの結合性を報告している。細胞は1種類の結合部位をもち、その数は約 50 万個、解離定数は $1.2 \times 10^{-11} M$ と、きわめて強い。

なお、ビトロネクチンに関しては、研究されはじめて日も浅いこともあって、この種の知見はまだ報告されていない。

2. RGD の発見と普遍性

Ruoslahti のポストドクであった若き Pierschbacher は、直線的な鋭い研究を行ない、3~4 年の研究でフィブロネクチンの細胞結合活性部位をつきとめた¹⁵⁾。1984 年のことであった。それは、なんとテトラペプチド RGDS (つまり Arg-Gly-Asp-Ser) であった。その後、最後のセリンの重要性がうすれ、リジンやプロリンでは駄目だが、バリン、スレオニン、アラニンなどでもよいことがわかってきて、トリペプチド RGD が本質的なペプチドと提唱されるようになった。この RGD はフィブロネクチン分子の中央から少し C 末端寄りに位置している(図1)。この RGD を含む合成ペプチドを器質に結合させておけば、細胞はこのペプチドに結合し器質上に伸展する。Ruoslahti らは、ただちに、この RGD が他の既知の蛋白質の1次構造中にあるかないかをコンピュータで検索した。すると、原核生物を含め、いろいろな生物種で 15 種の蛋白質が浮び上ってきた。そのうち比較的良好にわかっている 8 種を表2に示す。ビトロネクチンは、実は、その後 RGD を含むことがわかったのであるが、まとめて表2に入れておく。なお、ビトロネクチンの RGD は N 末端近くにある(図3)。

ところで、RGD を含む蛋白質は、それぞれの生命活動の場で本当に RGD が動物細胞の接着に機能しているのだろうか？ 動物細胞と関係ありそうもないフェージや粘菌の蛋白質がなぜ、この RGD をもっているのだろうか？ その問いにある程度答える1つの容易な実験は、結局、RGD を含む合成ペプチドの実験であった。つまり、RGD を含む合成ペプチドを実験系に入れたとき、フィブロネクチンの細胞結合活性が特異的に阻害されるかどうかをみることである。阻害される理由は、細胞表面上のフィブロネクチンレセプターが、RGD を含む合成ペプチドで飽和され、フィブロネクチンを結合できなくなるためと考えられた。この種の阻害実験によると、ビトロネクチンの線維芽細胞接着能、ディスコイディン I による細胞性粘菌接着能、フィブリノーゲンによ

表 2. RGD をもつ蛋白質の一部とその活性

| 蛋白質 | 活性対象 | 線維芽細胞接着活性 | RGD ペプチドでの活性阻害 |
|-------------------|-----------|-----------|----------------|
| フィブロネクチン | 動物細胞 | あり | あり |
| ビトロネクチン | 動物細胞 | あり | あり |
| フィブリノーゲン フィブリン | 動物細胞 | なし | あり |
| ディスコイディン I | 細胞性粘菌相互 | ? | あり |
| コラーゲン | 動物細胞 | あり | ? |
| λレセプター | λファージと大腸菌 | あり | ? |
| トロロンビン | 動物細胞 | ? | ? |
| 口蹄疫ウイルス蛋白質 I | 動物細胞 | ? | ? |

RGD をもつ蛋白質は現在 15 種知られている。ここでは、そのうち比較的わかっている約半分を示した。

る血小板凝集能などが、この RGD を含む合成ペプチドで阻害されることがわかってきた。つまり、実際に機能していると充分に思えるのである。表2のその他の蛋白質に関するこの種の検討は現在進行中と思われる。わかった限りにおいては、やはり、RGD を含む表2の蛋白質群は生物界のいろいろな接着に機能しているらしい。そのうえ、さらに、*in vivo* の系にも阻害活性が見られるようになってきた。この例としては、発生初期のイモリ胚にこの RGD を含む合成ペプチドを注射すると、発生は正常に進まず、異常な形態を呈するようになる。その異常な様子はフィブロネクチン抗体を注射したときとよく似ていて、細胞が細胞外マトリックスに接着できず、結果として本来あるべき部位に細胞群が移動していけないために生じた形態形成異常であろうと解釈されている。

なお、ラミニンは1次構造の解析からは、RGD をもつかどうか現在不明である。上記のような阻害実験では、RGD を含む合成ペプチドでの阻害があまり効果的でないで、たぶん RGD を含んでいないと思われる。ということは、ラミニンの細胞接着部位にはまったく別のアミノ酸配列が期待できるということになる。これらの違いは、フィブロネクチンやビトロネクチンと異なり、ラミニンは主として上皮細胞を接着するということと関係があるに違いない。

III. 接着性蛋白質レセプター

1. フィブロネクチンレセプター

動物細胞にあるフィブロネクチンレセプターの現在の最有力候補は、分子量 14 万の糖蛋白質(以下、14 万を

140 K と記す) である。ここでは、この糖蛋白質について、筆者の経験を中心に、論文に書かれない裏話も含めながら話を進めていく。

140 K 蛋白質の発見に至った道には大きく分けて2つの流れがあり、その1つは筆者が大きく関与してきた抗体を用いて攻める方法であった。他の1つは RGD を含むペプチドを使う Ruoslahti 研究室での同定法であり、この節の後半で触れる。

A. 抗体による同定・精製

初めにこの 140 K に注目したのは、Buck 研究室¹⁹⁾であった。彼らは、細胞膜全体に対するポリクローン抗体を作り、この抗体がフィブロネクチンによる細胞伸展を阻害することを見つけた。さらに、細胞膜蛋白質を通常の生化学的手段で分画し、抗体の作用を中和する分画を追跡し、ついに 140 K にたどりついたのであった。しかし、この研究はこれ以上発展しなかった。膜蛋白質を通常の生化学的手段で精製するのは、きわめて困難であり、収率もひどく低いからである。このときは、放射活性で蛋白質を同定するのが精一杯であった。

次に登場したのが、モノクローン抗体を用いたアプローチである。すなわち、細胞表面に対するいろいろなモノクローン抗体を作って、フィブロネクチンによる細胞伸展を阻害する活性でスクリーニングしていけば、その中にはフィブロネクチンレセプターに対する抗体が見つかるだろう。そして、この抗体を使えば、抗原分子である仮想のフィブロネクチンレセプターを同定・精製・特徴付けできるであろうと考えた。JG 22 E はそのような

期待を背負ったモノクローン抗体として登場してきた。JG 22 E はニワトリ胚線維芽細胞のフィブロネクチンによる細胞伸展を約 80% の割合で阻害し、しかも、細胞に不可逆的な損傷を与えることはない。抗体を洗って除くと、細胞は再び伸展する。ただ、この抗体はニワトリ筋原細胞を抗原にして作られたので、ニワトリ線維芽細胞には反応するが、ハムスター腎由来の BHK 細胞やマウス 3 T 3 細胞とは反応しない。

JG 22 E で細胞を染めると¹⁷⁾、JG 22 E の抗原の分布状況が観察できる。よく伸展した線維芽細胞では図 4 (b) に示すように、細い矢印の近く(矢印そのものではない)に JG 22 E の抗原が線維状に分布している。しかも、この分布は図 4 (c) に示すように、細い矢印の近く(矢印そのものではない)にあるフィブロネクチンの分布とよく一致している。また、この分布と一致する細胞内のものとして α アクチニンがある。さらに、215 K のリン酸化蛋白質ターリン (talin) も同一分布を示すらしい。Buck はターリンの発見者 Burridge と組んで、140 K がターリンと相互作用することを見つけたという話である。なお当初、ビンキュリン (vinculin) はフィブロネクチンと同じ部位に存在していると言われたこともあったが、現在では否定されている。JG 22 E の抗原はフィブロネクチンと同様に、細胞接着域 (focal adhesion site) (図 4 (a)~(c) の右中下の細い矢じり印と上部細い矢印そのもの) には存在しない。図 5 は、これらをまとめた模式図である。

JG 22 E の抗原は JG 22 E を用いた抗体アフィニティ

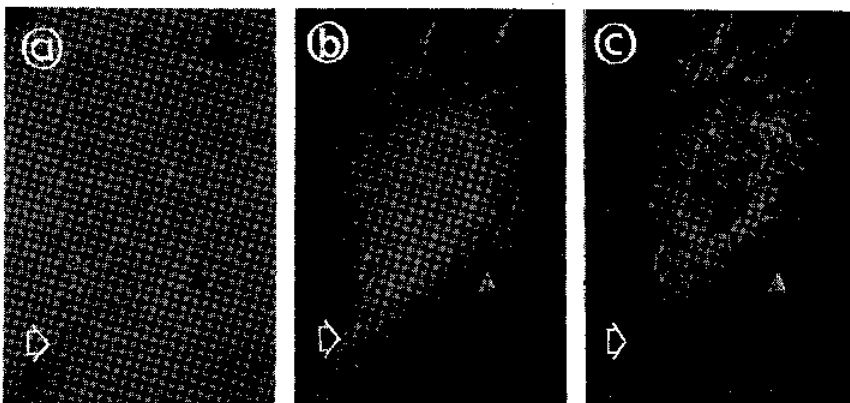


図 4. JG 22 E の抗原の分布¹⁷⁾

(a) はニワトリ胚線維芽細胞をガラスプレートに播いて 6 時間後の干渉反射顕微鏡像である。(b) は同じ細胞をモノクローン抗体 JG 22 E で染めたもので、フィブロネクチンレセプター 140K の分布を示す。(c) は同じ細胞をフィブロネクチン抗体で染めたもので、フィブロネクチンの分布を示す。図上部の細い矢印は細胞接着域 (focal adhesion site) を示し、(a) では黒くなっている。140K (b) とフィブロネクチン (c) は細胞接着域そのものには存在しないが、そのすぐ周辺には存在する。右中下の細い矢じり印は別の細胞接着域を示し、140K もフィブロネクチンも存在しない。左下の太い矢印は近接域 (contact site) を示し、140K とフィブロネクチンが共存している。

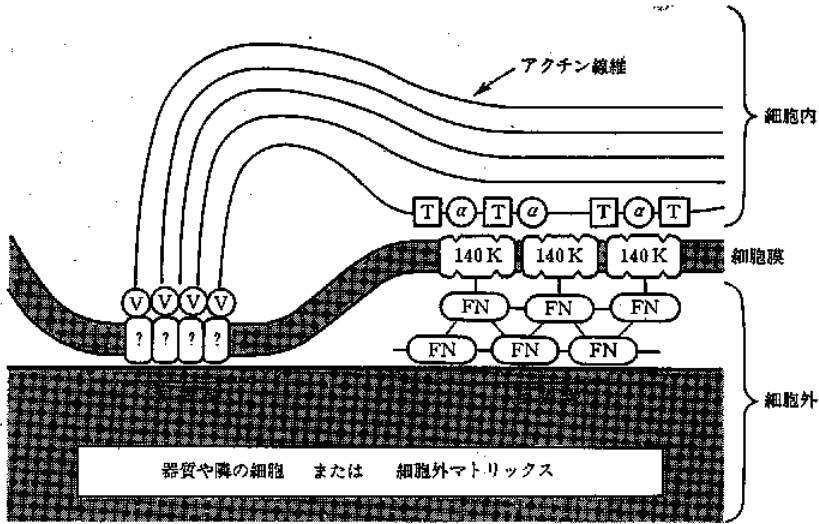


図 5. フィブロネクチンレセプターと細胞表面の模式図

細胞が器質または細胞外マトリックスに最も近接している細胞接着域 (focal adhesion site) には、ビンキュリン(V)があるが、フィブロネクチンはない。この領域での器質 (または細胞外マトリックス) への接着因子は不明である。フィブロネクチン (FN) は近接域 (contact site) の細胞外に線維状に会合して存在し、140K フィブロネクチンレセプターは細胞膜上に同じように会合して存在していると思われる。細胞内のその領域には α -アクチニン(α)とターリン(T)が存在していて、アクチン繊維と何らかの相互作用をしていると想定される。

カラムによって、ニワトリ 13 日目胚の細胞膜分画から容易に精製できる¹⁸⁾。取量は 36 個の卵から約 400 μ g

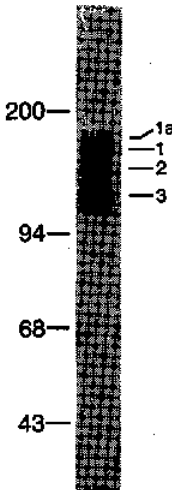


図 6. 140K フィブロネクチンレセプターの SDS 電気泳動¹⁸⁾

ニワトリ13日目胚の細胞膜分画をオクタチルグルコシドで可溶化し、モノクローン抗体 JG 22E を固定したセファロース 4B と 4°C で一晩保温する。結合した JG 22E の抗原を pH 11.3 のアルカリ条件で溶出し、還元剤なしの条件で SDS 電気泳動を行なうと、分子量 140K の付近に 4 本のバンドがみられる。左側は分子量マーカー ($\times 10^{-3}$) の移動位置である。右側は各バンドの名称であり、いわゆる 140K はバンド 1 (155K)、バンド 2 (135K)、バンド 3 (120K) の 3 本のバンドからなる。なお、バンド 1a は夾雑物と考えている。

得られる。ところが、得られた抗原の組成は均一ではなく、非還元下の SDS 電気泳動では 3~4 本のバンドに分かれる (図 6)。分子量は、それぞれ 170 K (バンド 1a)、155 K (バンド 1)、135 K (バンド 2)、120 K (バンド 3) である。バンド 1a は単なる夾雑物である可能性が強い。便宜上、バンド 1~3 をまとめて 140 K と呼んでいるが、いずれもシアル酸を含む酸性糖蛋白質である。還元下で SDS 電気泳動を行なうと、バンド間の分離は悪くなる。

バンド 1~3 は、単一のモノクローン抗体によって釣り上げられてきた。それならば、バンド 1~3 は全部同一の抗原決定基をもつアイソフォームまたは起源が同じものの分解物なのだろうか? JG 22E は変性した 140K は反応しないので、ウェスタンブロット(免疫ブロット)法による抗原分子の同定はできない。そこで、バンド 1~3 をそれぞれ切り出し、¹²⁵I で標識したのち、トリプシン処理し、2 次元ペプチドマップによる比較を行なった。図 7 に示すように、互いにどのマップとも一致せず、バンド 1~3 はそれぞれまったく異なる蛋白質ということになった¹⁸⁾。異なる蛋白質が共通の抗原決定基をもっているとは考えにくい。ショ糖密度勾配遠心を行なうと、バンド 1~3 は複合体を形成していることがわかり、バンド 1~3 の全部ではなく、どれか 1 つが JG 22E の抗原ということであった。たぶん、それはバンド 2 であ

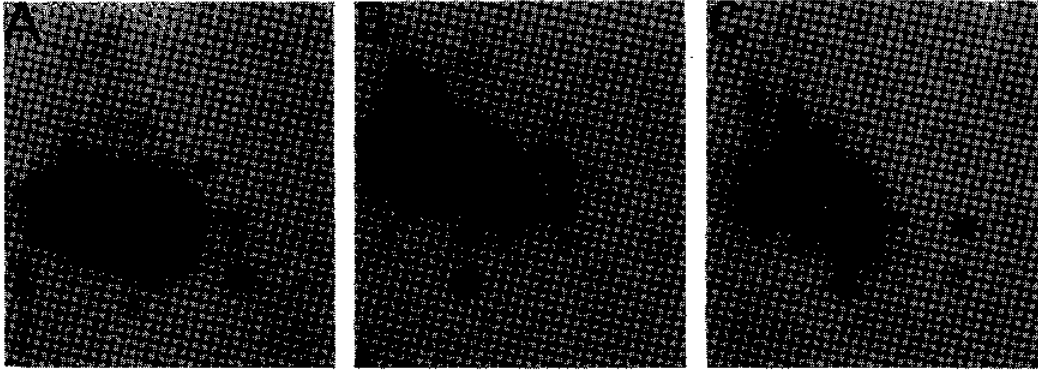


図 7. 140K フィブロンectinレセプターのペプチドマップ¹⁸⁾

図6で分離した140Kの各バンドをSDSゲルのまま切り出し、¹²⁵I標識後、トリプシン処理し、2次元薄層クロマトグラフで展開した。図は展開後のプレートのオートラジオグラムである。Aはバンド1(155K)、Bはバンド2(135K)、Cはバンド3(120K)である。A~C相互に一致するスポットがほとんどなく、バンド1, 2, 3はそれぞれまったく別のポリペプチドである。

ろろ。なお、分子量が140Kということから、JG 22 Eの抗原は一時、プロコラーゲンではないかとも疑われたが、アミノ酸分析の結果、ヒドロキシプロリンが検出されず、その可能性も否定された¹⁹⁾。また、140Kのリノ酸化は認められなかった。

ここまでの結果は、ウィスター研究所のBuckとペンシルバニア大学のHorwitzのグループが、CSATと名づけた別のモノクローン抗体を用いて得た結果とほぼ一致する。そして、JG 22 EとCSATが同一の抗原、すなわち140Kを認識していることは間違いない。ここまでは比較的すんなりとことが運んだが、問題はこれからであった。すなわち、140Kがフィブロンectinレセプターであることを証明するためには、140Kがフィブロンectinと直接結合することを示さなければならない。NIHのYamada研究室では、いちばん最初にJG 22 Eを手がけた長谷川悦子(現、名大・理)がこの結合をとらえるために、140Kを吸着させたニトロセルロース膜にフィブロンectinやフィブロンectinを被膜したビーズの結合を調べたり、フィブロンectinを吸着させたニトロセルロース膜への放射能標識140Kの結合を調べたりして、精力的な研究を行なったが、ついに肯定的な結果は得られなかった。次いで、筆者が140Kをリボソームに組み込んだり、フィブロンectinのアフィニティカラムを作ったりして、最後には、S. AkiyamaとS. Yamada (Kenneth M. Yamada夫人)組がフィブロンectinの細胞結合ドメイン断片のアフィニティカラムを作り、140Kとの結合を調べたが、いずれも満足すべき結果は得られなかった。

これに対して、Buckらは1985年のゴードン会議で、フィブロンectinアフィニティカラムに140Kが強く

結合することを報告した。しかし、筆者はBuckの結果を信用していない。筆者は彼らの実験を追試したが、結果は否定的であったからである。一方、Horwitzからは、140Kリボソームを作りフィブロンectinカラムへの結合性を調べたところ、弱いながらも結合するという非公式の情報が流れてきた。しかも、この140Kはフィブロンectinよりもラミニンのほうに、より強い親和性を示したともいう¹⁹⁾。なんと言うことだ。

モノクローン抗体からアプローチすることでは、テキサス大学のJuliano研究室²⁰⁾でも独立に同じ140Kに到達したことを述べておかななくてはなるまい。彼らのモノクローン抗体PB1とPB2は、CHO細胞のフィブロンectinへの接着を特異的に阻害するが、ビトロネクチン、ラミニン、血清への接着を阻害しない。そして、その抗原は140K膜蛋白質であった。

B. RGDペプチドによる同定・精製

抗体を用いたフィブロンectinレセプターの同定を何人も研究者が進め、その最後のツメのところではそれぞれイマイチすっきりしないところに、ラホヤのRuoslahtiは、1985年のゴードン会議で一味違う手法を用いて、フィブロンectinレセプターの本命と思われるものを同定したという衝撃的な発表をした。彼ら²¹⁾はまず、フィブロンectinの細胞結合ドメイン断片のアフィニティカラムを作った。ヒト骨肉腫MG-63細胞を¹²⁵Iで細胞表面標識後オクテリルグルコシド抽出し、そのカラムに結合する140Kの蛋白質を同定・精製してきた。ポイントはRGDと近縁だがDをEに変えたために、細胞接着阻害活性のない合成ペプチドGRGESPでは溶出されずに、阻害活性のある合成ペプチドGRGDSPによって特異的に溶出される分画に、フィブロンectinレセ

表 3. 接着性蛋白質のレセプター

| レセプター分子の名称 | な し | コネクチン (connectin) | な し | アンコリンCII (anchurin CII) | コリガン (colligin) |
|-------------|----------------------------|----------------------|-------------|----------------------------|--------------------|
| 接着性蛋白質 | フィブロネクチン | ラミニン | ビトロネクチン | II型コラーゲン | IV型コラーゲン とゼラチン |
| 分子重量 | 約 140K | 68K | 125/115K | 31K | 47K |
| リン酸化 | なし | ? | ? | ? | あり |
| 癌化との相関 | ? | あり | ? | ? | あり |
| 抗体をもっている研究室 | Ruoslahti 研, Yamada 研ほか | Liotta 研 | Ruoslahti 研 | von der Mark 研 | ? |

いずれのレセプター蛋白質もアミノ酸配列、遺伝子クローニングは報告されていないが、フィブロネクチンレセプターに関しては Ruoslahti 研と Hynes 研が研究を開始したらしい。

プターを検出するという、味なことをした点にある。なお、この 140 K はラミニンとの結合性はない。筆者も BHK 細胞を用いて、この実験を追試したところ、やはり 140 K の膜蛋白質がフィブロネクチンカラムに結合し、溶出されてくることが確認できた。しかし、まったく同じ実験がニワトリ線維芽細胞では再現されず、先の JG 22 E の抗原との相似性を論じることができない。用いたフィブロネクチンがニワトリでなく、ヒト由来であったためなのか、別に原因があるのか今のところわからない。

以上、現状では 140 K 蛋白質がフィブロネクチンレセプターである可能性がいちばん高いが、結合の特異性など明らかにすべき問題がまだ多く残されていて、フィブロネクチンレセプターと断言するのはまだ少し時期尚早と思われる。

C. 140 K 以外の候補

多少話を変えて、あまり可能性の高いものではないが、フィブロネクチンレセプターの他の候補を軽くみてみよう。1 つは Hughes 研究室で発見された 47 K 蛋白質であり²³⁾、光感受性の架橋剤 (4'-azidoazobenzene-4-oxysuccinimide ester) を用いた実験である。あらかじめ、カバーガラスにフィブロネクチンを共有結合させ、そのフィブロネクチンに架橋剤を結合させておく。その上に細胞を播くと、細胞はフィブロネクチンに反応して伸張する。細胞がある程度伸張したところで、光を当てると、フィブロネクチンに結合あるいは非常に接近していた細胞表面の物質が架橋されることになる。この実験で 47 K 膜蛋白質が検出された。しかし、最近の非公式な話によると、この 47 K は細胞膜のみならず、細胞質中にもかなりの量が存在するという。ハテナ?

また、ある種のガングリオシド (糖脂質の一種) を外部から加えると、フィブロネクチンによる細胞伸張が阻害されることから、細胞表面膜上にあるガングリオシドがフィブロネクチンレセプターではないかという可能性

も指摘されている²³⁾。

2. 他の接着性蛋白質レセプター

他の接着性蛋白質ラミニン、ビトロネクチン、コラーゲンなどの動物細胞表面にあるレセプターも探索されてきている。それぞれを詳細に述べるつもりはないが、これらがフィブロネクチンレセプターとかわかってくるので、それぞれを概説しつつ、フィブロネクチンレセプターとの関係を述べていく。まず、レセプターの一覧を表 3 に示す。

A. ラミニンレセプター

ラミニンレセプターは、ラミニンに強い親和力をもっているので、ラミニンのアフィニティカラムで精製できる。単離されたレセプターは分子量 67~68 K で、コネクチン (connectin) と名づけられ、ニトロセルロース膜に固定しても、リボソームに取り込ませても、ラミニンを結合する活性を失わない。なお、NIH の Liotta 研究室ですでにそのモノクローン抗体を調製している²⁴⁾。このラミニンは癌細胞の転移能と関係が深く、高転移性の癌細胞は、その細胞表面にラミニンレセプターが多くなることで血管の基底膜 (ラミニンは主成分の 1 つ) に結合しやすくなるのだと考えられている。そこで、マウス黒色腫の転移能へのフィブロネクチンの効果を調べると、なんとフィブロネクチン存在下では黒色腫のラミニン結合能は低下し、また同時に、転移能も減少したと Terranova ら²⁵⁾は報告している。つまり、フィブロネクチンレセプターにフィブロネクチンが結合すると、何らかの仕組みが働いて、ラミニンレセプターの減少を招くらしく、これを彼らは「陰陽説」と称している。

B. ビトロネクチンレセプター

ビトロネクチンは、フィブロネクチンと同じ細胞結合ペプチド RGD をもち、また、それを含む合成ペプチドで細胞接着活性が阻害される。したがって、ビトロネクチンレセプターはフィブロネクチンレセプターと共通だ

ろうと思われる状況も一時的にはあったが、結局、Ruoslahti 研究室でフィブロネクチンレセプターとは異なる 125 K と 115 K の複合体蛋白質が同定・精製された²⁰。しかも、それはフィブロネクチンレセプターを同定・精製したのに用いたものと同じ骨肉腫 MG-63 細胞からである。精製には合成ペプチド GRGDSP のアフィニティカラムを用いているが、そこには、140 K フィブロネクチンレセプターは結合してこない。少し変な気もするが、140 K は RGD に対する親和力が弱いのだと説明されている。取れた 125/115 K を組み込んだリポソームは、ビトロネクチンにのみ結合し、ラミニンやフィブロネクチンには結合しない。また、140 K フィブロネクチンレセプターはフィブロネクチンのみに結合し、ラミニンやビトロネクチンには結合しない。ビトロネクチンのほうがはるかに感度がよいとはいえ、同じ RGD という細胞結合活性部位をもち、しかも同じくらいの量が血液中に存在しているながら、フィブロネクチンとビトロネクチンはまったく同じ細胞に対して別々のレセプターを必要とするとは、どのような生物学上の意味があるのだろうか？ フィブロネクチンよりもビトロネクチンのほうが癌細胞の接触走性 (haptotaxis) を幅広く引き起こす²¹ことと関係があるのだろうか？ 今のところ、ビトロネクチンの研究は萌芽的段階で、比較しよりもビトロネクチンのほうはあまりにもわかっていないことが多い。とはいえ、I 節で述べたように、アメリカではビトロネクチンの遺伝子クローニングと 1 次構造の完全解明も終わり、ビトロネクチンレセプターの抗体もできている。アメリカでの研究のスピードの速さには呆然とするばかりである。

C. コラーゲンレセプター

コラーゲンは強い細胞親和力をもっているので、アフィニティカラムを用いてコラーゲンレセプターを単離することが可能であった。西ドイツの von der Mark 研究室²²では、ニワトリ軟骨細胞から II 型コラーゲンのレセプターとして分子量 31 K の蛋白質を同定・精製し、アンコリン C II (anchoring C II) と名づけた。一方、Kurkinen ら²³は、N 型コラーゲンやセラチンに結合する細胞膜上にある分子量 47 K の蛋白質を同定・精製し、コリガン (colligin) と名づけている [木堂弘治博士 (名大・理) によると、コリジンではなく、コリガンと発音するとのことである]。このコリガンの消長とそのリン酸化は、細胞の癌化と関係しているということである。なお、コリガンはウシ血清アルブミンアフィニティセファロースにも結合するらしく、その結合の特異性が問題だとい

噂もある。

さて、話は少し変わるが、永田 (現、京大・結核研) ら²⁴は、フィブロネクチンによる細胞作用が I 型コラーゲンによって変化を受けることを報告している。具体的にはフィブロネクチンの BHK 細胞への結合に I 型コラーゲンは変化を与えないが、フィブロネクチンによる細胞伸展やフィブロネクチンを被膜したビーズの食作用を阻害するという。推定では、コラーゲンがコラーゲンレセプターに結合すると、フィブロネクチンレセプターの細胞膜上での動きを抑えてしまうと考えているらしい。また、未確認情報だが、バージニア大学の Little は、ニワトリ胚の細胞膜分画中からコラーゲンアフィニティカラムに結合する 140 K 糖蛋白質を最近になって精製したという。その 140 K も非還元下の SDS 電気泳動で 3 本のバンドを示し、それらの移動度は JG 22 E の抗原と同じだったそうである。

以上、A~C 項をまとめると、それぞれ別々の接着性蛋白質と思われ、解析されてきたものが、A 項のラミニンレセプターと C 項のコラーゲンレセプターは 140 K フィブロネクチンレセプターそのものである可能性も若干噂されている。しかし、大勢としては一応、別の蛋白質と考えるのが妥当だろう。これらラミニンレセプター、コラーゲンレセプター、フィブロネクチンレセプターの三者は細胞内で何らかのつながりをもっていて、それらの消長や生化学的変化は細胞の癌化または癌細胞の転移と関係深い。また、B 項のビトロネクチンレセプターに至っては、同じ活性部位 RGD を認識しているにもかかわらず、フィブロネクチンレセプターとは別の蛋白質であることなど、フィブロネクチンを中心としたこれらの接着性蛋白質の細胞表面での挙動が、新しい局面を展開しているように思えてならない。

おわりに ここに解説した研究領域は、場面がガラリと変わるようにして今まで発展してきたので、近い将来、再び新たな転機があっても不思議ではない。しかし、転機を待つのではなく、むしろ読者の中からその転機をもたらすスターが現われるのを期待している。筆者らとしては、そういう冒険心と熱意に富んだ若い人が、この発展しつつある領域に勇気をもって飛び込んでくるのを心より歓迎したい。

紙面の関係で割愛した部分は、フィブロネクチンなどの実験法²¹や総説²²⁻²⁴、伊勢村のフィブロネクチンレセプターに関する解説²⁵、フィブロネクチンと同類の接着

性蛋白質であるコンドロネクチン、エビネクチンなどの記述、別類の接着性蛋白質であるカドヘリン、キヤム、コネクソン、内在性レクチン、またさらにヘパラン硫酸などのプロテオグリカンなど、細胞表面で細胞間の相互作用を担う分子群についての記述である。さらに、これらが細胞間相互作用の役割を演じることによって、どのようにして組織構築に関与したり、癌細胞とかがわたりしているかなどの生体内での機能を十分に論じる余裕はなかった。なお、1986年5月イタリアのジェノアで「フィブロネクチンと接着性蛋白質」のEMBOワークショップが、また、1987年1月、アメリカ・カリフォルニア州オクスナードで第3回目のフィブロネクチン・ゴードン会議 [座長はマサチューセッツ工科大学の R. O. Hynes] が開催される予定であること、日本の生命科学の健全な発展のために接着性蛋白質の研究推進母体確立が必須に思えることを付記しておくたい。

[追記1] アメリカ細胞生物学会年會に併設されたミーティング「フィブロネクチン以外の血清中接着蛋白質」(1985年11月18日開催。世話人は Barnes Stenn) で、ビトロネクチンはそれまで補体系の蛋白質として知られていた S-protein と同一のものであるという驚くべき事実が報告された。論文はその直後に発表された [Jenne, Stanley: *EMBO J.*, 4, 3153-3157(1985)]。

[追記2] 1986年1月にロンドンで開催されたプロテオグリカン関連の會議で、ビトロネクチンはさらに細胞溶解素サイトリジン (cytolysin) にも似ているという話が出たそうである。御教示下さいました木全先生に感謝いたします。

文部省科学研究費補助金の援助、K.M. Yamada 博士、W.-T. Chen 博士、筑波大・院生の赤間高雄君、林 和子の協力に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kornblihtt, A. R. et al.: *EMBO J.*, 4, 1755-1759 (1985) [3332-3340 (1983)]
- 2) Hayashi, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258,
- 3) Hayashi, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 11292-11300 (1981) [9937 (1979)]
- 4) Timpl, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 9933-
- 5) Edgar, D. et al.: *EMBO J.*, 3, 1463-1468 (1984) [12548-12552 (1983)]
- 6) Barnes, D. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258,
- 7) Suzuki, S. et al.: *EMBO J.*, 4, 2519-2524 (1985) [1138 (1985)]
- 8) Hayashi, M. et al.: *J. Biochem.*, 98, 1135-
- 9) Suzuki, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 259, 15307-15314 (1984) [(1978)]

- 10) Pearlstein, E.: *Int. J. Cancer*, 22, 32-35
- 11) Grinnell, F. et al.: *Exp. Cell Res.*, 142, 499-504 (1982) [97, 466-472 (1983)]
- 12) McKeown-Longo, P. J. et al.: *J. Cell Biol.*,
- 13) Akiyama, S. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 260, 4492-4500 (1985)
- 14) Goldberg, B.: *Cell*, 16, 265-275 (1979)
- 15) Pierschbacher, M. D. et al.: *Nature*, 309, 30-33 (1984) [*Sci. USA*, 78, 6071-6075 (1981)]
- 16) Kundsén, K. A. et al.: *Proc. Natl. Acad.*
- 17) Chen, W.-T. et al.: *J. Cell Biol.*, 100, 1103-1114 (1985) [307-318 (1985)]
- 18) Hasegawa, T. et al.: *J. Cell. Biochem.*, 28,
- 19) Horwitz, A. et al.: *J. Cell Biol.*, 101, 2134-2144 (1985) [(1985)]
- 20) Brown, P. J. et al.: *Science*, 228, 1448-1451
- 21) Pytela, R. et al.: *Cell*, 40, 191-198 (1985)
- 22) Aplin, J. D. et al.: *Exp. Cell Res.*, 134, 488-494 (1981) [343-351 (1981)]
- 23) Yamada, K. M. et al.: *J. Cell. Physiol.*, 109,
- 24) Liotta, L. A. et al.: *Exp. Cell Res.*, 156, 117-126 (1985) [985 (1984)]
- 25) Terranova, V. P. et al.: *Science*, 226, 982-
- 26) Pytela, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5766-5770 (1985) [2494 (1985)]
- 27) Basara, M. L. et al.: *Cancer Res.*, 45, 2487-
- 28) Mollenhauer, J. et al.: *J. Cell Biol.*, 98, 1572-1578 (1984) [5919-5922 (1984)]
- 29) Kurkinen, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 259,
- 30) Nagata, K. et al.: *J. Cell Biol.*, 101, 386-394 (1985) [803-831 (1982)]
- 31) Ruoslahti, E. et al.: *Meth. Enzymol.*, 82,
- 32) Yamada, K. M.: *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 761-799 (1983) [(1985)]
- 33) Hynes, R. O.: *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1, 67-90
- 34) 林 正男: 本誌, 29, 1964-1980 (1984)
- 35) 伊勢村 護: 本誌, 30, 483-485 (1985)

公 募

九州大学理学部分子遺伝学講座担当教授

職 名: 分子遺伝学講座担当教授

専攻分野: 分子遺伝学

提出必要書類(警留郵便にて送付のこと):

- 1) 履歴書
- 2) 研究業績目録および主要論文の別刷各1部

提出が望ましい書類:

- 1) 現在までの研究の内容と将来の展望、九州大学に着任した場合の教育・研究に対する抱負
- 2) 推薦書

締切期日: 昭和61年4月15日

送 付 先: 〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1

九州大学理学部生物学教室 向井輝美
電話 (092) 641-1101, 内線 4404