

氏名(本籍)	やとうこ たけみ 八藤後 武 美 (千葉県)				
学位の種類	医 学 博 士				
学位記番号	博 甲 第 782 号				
学位授与年月日	平成 2 年 3 月 23 日				
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当				
審査研究科	医 学 研 究 科				
学位論文題目	血漿ビトロネクチンの生化学的及び細胞生物学的研究 (Dissertation 形式)				
主査	筑波大学教授	医学博士	添 田 周 吾		
副査	筑波大学教授	医学博士	杉 田 良 樹		
副査	筑波大学教授	医学博士	中 村 恭 一		
副査	筑波大学教授	医学博士	本 村 幸 子		
副査	筑波大学助教授	医学博士	藤 田 禎 三		

## 論 文 の 要 旨

### <目的>

ビトロネクチンは、動物の血液や組織に存在し、動物細胞を培養基質に接着させる働きを持つ細胞接着性糖タンパク質である。ビトロネクチンの精製法は、これまでヒトまたはウシ血清を材料にして、生化学的手法を組み合わせた方法や、モノクローナル抗体を用いる方法が報告されている。しかし操作が繁雑で再現性に乏しかったり、抗体を使用するために汎用性に欠けていた。従って、汎用性が高く、簡単に大量に精製標品が得られる方法が望まれていた。

ビトロネクチンは 8 M 尿素で処理することにより、ヘパリンに対する親和性が変化する点に着目し、本研究ではヒトおよび動物血漿から簡単にビトロネクチンを精製する方法を開発する。また精製した動物血漿ビトロネクチンの生化学的諸性質と細胞伸展活性を相互に比較する。

### <方法>

1. ビトロネクチン精製法について;動物血漿に  $\text{CaCl}_2$  を加えて血清とし、これを生理的条件下でヘパリンカラムに通過させた。通過画分を 8 M 尿素処理し、尿素存在下でヘパリンカラムに吸着させた。0.13M NaCl および 10mM  $\beta$ -メルカプトエタノールでカラムを洗浄した後、0.5M NaCl でビトロネクチンを溶出した。

2. 細胞伸展活性について;試料をコートした培養プレート上での BHK 細胞の伸展形態を観察した。

3. 精製動物ビトロネクチンについて;精製動物ビトロネクチンの SDS 電気泳動におけるバンドパ

ターンと分子量, 抗ヒトビトロネクチン抗体に対する反応性, アミノ酸組成, 糖組成, 及びN末端アミノ酸配列を比較した。

#### <結果>

1. ビトロネクチンは, 尿素存在下のヘパリンカラムから0.5MNaClで溶出され, 20~30%の回収率で, 約250倍に精製された。血漿100mlあたり。ヒトでは4~6mg, ウマでは2~3mg, ウシでは3~4mg, ニワトリでは3~6mg, ブタでは5~6mg, ウサギでは6~10mgのビトロネクチンが得られた。

2. 精製ビトロネクチンの細胞伸展活性は, 動物種間で差がなく, いずれも $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で50%活性を示した。この活性は, 抗ビトロネクチン抗体とGRGDSPペプチドで特異的に阻害された。また, ビトロネクチン上とフィブロネクチン上では, 伸展した細胞の形態が異なっており, フィブロネクチン上の方がより広がった形態をしていた。

3. 精製ビトロネクチンをSDS電気泳動で分析した結果, ヒトは75/65kDa, ウマは75/64kDa, ウシは78/68kDa, ニワトリは78/68kDaの2本のバンドが動物種にそれぞれ特異的な割合で検出された。またブタでは56kDa, ウサギでは68kDaの1本のバンドのみが検出された。アミノ酸組成は, ニワトリを除く5種の動物でビトロネクチン間で類似性が認められた。6種の動物ビトロネクチンは全てD-ガラクトース, D-マンノース, D-グルコサミン及びN-アセチルノイラミン酸を含んでいた。ヒトを除く5種のビトロネクチンはD-ガラクトサミンを含んでいた。またL-フコースはブタビトロネクチンに, N-グリコリルノイラミン酸はウシビトロネクチンにのみ検出された。

ヒトビトロネクチンのN末端領域を認識するモノクローナル抗体 $M_4$ ,  $M_5$ に対しては, 6種の動物ビトロネクチン全てが反応した。ヒトビトロネクチン分子の中央部分の認識する $M_1$ と $M_2$ に対しては, 反応するものとしなないものに別れた。N末端部分のアミノ酸配列は, 6種の動物ビトロネクチン間で, 高い相同性が認められた。

#### <考察>

本研究により, 動物血漿からビトロネクチンを簡単に精製することが可能となった。ビトロネクチンの細胞血漿からビトロネクチンの細胞伸展活性は, 8M尿素処理で損なわれたが, フィブロネクチンと比較すると伸展した細胞の形態が異なっていた。これは両者の細胞膜上のレセプターが異なるだけでなく, 細胞の内側の機構も異なっていると考えられた。またビトロネクチンはN末端領域は動物種間で高い相同性を示すことから, 多様性の原因は分子の中央部の糖鎖を含む領域にあると考えられた。

#### <結語>

ビトロネクチンの新しい精製法を開発し, 6種の動物血漿から(ヒト・ウマ・ウシ・ニワトリ・ブタ・ウサギ)からビトロネクチンを精製した。ビトロネクチンは動物種間で, 細胞伸展活性に差

はなかったが、分子量、糖組成などの多様性を示した。

## 審 査 の 要 旨

本研究ではビトロネクチンの新しい精製法を開発し、それを応用して各種動物血漿よりビトロネクチンを精製した。著者の開発した精製法は簡単で、かつ従来の方法の数倍の収量を得ることが出来、動物血漿への応用も容易である。これにより始めて各種動物のビトロネクチンの細胞伸展活性や、分子量、糖鎖などの比較も行われた。この精製方法により大量のビトロネクチンが得られるようになれば、臨床面の応用にも大きく貢献することが予想される大変価値のある論文である。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格があるものとみとめる。