

[36]

氏名(本籍)	宮本泰則(徳島県)				
学位の種類	理学博士				
学位記番号	博甲第620号				
学位授与年月日	平成元年3月25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	生物科学研究科				
学位論文題目	Modification of Adhesion between Cell and Extracellular Matrix Corresponding to Conformation Changes of Cell Spreading Protein in Serum (血清中の細胞伸展タンパク質の構造変化に対応する細胞-細胞外マトリックス間接着の修飾)				
主査	筑波大学教授	理学博士	石坂昭三		
副査	筑波大学教授	理学博士	平林民雄		
副査	筑波大学教授	理学博士	藤伊正		
副査	お茶の水女子大学 助教授	理学博士	林正男		

論文の要旨

多細胞生物の形態形成には、細胞-細胞間接着ばかりではなく、細胞-細胞外マトリックス間接着が必ず関与している。細胞外マトリックスを構成する分子には糖タンパク分子であるフィブロネクチンやビトロネクチンが、血清中から、抽出されている。それらの分子の一つの構造単位には細胞が結合し、他の構造単位にはそれぞれ他の細胞外マトリックス分子や支持体が結合する。細胞が支持体に多数の部位で接着すると、細胞伸展が見られる。本論文では、この接着の特徴である接着の修飾(他の構造単位に他の物質が結合することに依って、細胞結合活性が変わること)とタンパク分子の構造変化との対応が扱われ、この修飾機構の解明には二つの道がとられている。

第一は、修飾に伴い、修飾物質がタンパク分子に結合した部分以外に、特別な構造変化が見られるか否か。見られるとすると、それは細胞結合構造単位の変化か否か。修飾に伴う構造変化がそれぞれの構造の回転緩和時間の変化から検討されている。

ゼラチン、ヘパリンがそれぞれの構造単位に結合すると接着の修飾を受ける、血清から精製したフィブロネクチン(FN)が試料に用いられている。FNの細胞結合構造単位内SH基に励起寿命 τ の異なる三種類の蛍光分子が標識されている。それぞれの寿命は、ほぼ標識近傍、構造単位、分子全体の回転緩和時間相当に選択されている。蛍光標識されたFNが細胞伸展活性を保っている事を確かめた上で、三種類の蛍光標識されFNの蛍光偏光消滅度 $1/p$ が溶液の粘性 η を考慮して温度Tを

変えて測定されている。それぞれの結果について、 $1/p$ と τ/kT との関係（Perrin表示）から、傾斜 V/τ 。（ V ：有効体積）を求め、それぞれの $V\tau/kT$ は標識近傍、構造単位、分子全体の回転緩和時間に行き渡っていることが確認されている。

ゼラチンまたはヘパリンで修飾した三種類の蛍光標識されFNの偏光解消度 $1/p$ がゼラチンまたはヘパリン濃度を変えて（修飾されたタンパク分子の濃度を変えて）測定されている。分子全体の回転緩和時間はヘパリンの修飾では明瞭に延長し、ゼラチンの修飾でも短縮するとは言えない結果になっている。これは修飾分子の結合による回転能率増加から当然の結果である。にもかかわらず、細胞結合構造単位ないし蛍光標識の近傍の回転緩和時間は、逆に、ヘパリンの修飾に依ってゼラチンの修飾に依っても、短縮が観察されている。この結果は、細胞結合構造単位の内部回転状態が他の構造単位の結合に依り影響されていることを示している。

第二は、接着を仲介する細胞外マトリックスの構造を、適切な変性剤で計画的に変え、接着における修飾の変化を検討している。

血清中のビトロネクチン（VN）が、疎水性のアミノ酸残基を分子表面に露出させると言われているドデシル硫酸ナトリウム（SDS）処理されている。VNの抗体反応性は処理によって、失われなかったことを確認して、酸素標識抗体法によって、疎水性のポリスチレンに結合したVNの量が観測されている。0.1%SDS処理VNでは、無処理に較べて、10倍近い結合量の増加が見いだされている。

細胞は多数のVNを結合し、VNはポリスチレンに結合するので、細胞はポリスチレン板上に伸展する。VN除去したSDS処理血清は細胞伸展を起こさないことを確かめた上で、SDS処理血清の細胞伸展率は血清濃度を高めると共に単調に増加し、3%程で飽和することが見いだされている。SDS処理VNによる飽和した細胞伸展率はSDS処理していない精製したVNの細胞伸展率より低いことが見いだされている。VNのSDS処理は、ポリスチレン板への結合を助長している一方、伸展率を低下させているのであるから、他方では、VNの細胞結合単位の活性を低下させていることが見いだされている。

FN除去したSDS処理血清の細胞伸展率を測定すると、その細胞伸展率はSDS処理血清の細胞伸展率と等しい。これは、SDS処理しFNは細胞伸展率は零であることを示している。FNの細胞結合部位のアミノ酸残基配列はVNのものと同しいことが知れているので、FNでは、VNと異なり、SDS処理に依ってポリスチレン板への結合が著しく低下していることになる。

要約すると、本論文は、細胞外マトリックス分子に依る細胞接着の修飾と細胞結合構造単位の構造変化との対応を検討する手法を編み出している。修飾された構造変化は、分子全体、細胞結合構造単位、標識の近傍の回転緩和時間にそれぞれ相当する励起寿命を持った蛍光標識の蛍光偏光解消度の測定を組合せ、細胞結合構造単位の内部回転状態の変化として観測している。並行して、接着に関与する構造を、適切な変性剤を用いて計画的に変えて、接着における修飾の変化を細胞伸展率から観測している。

審 査 の 要 旨

細胞外マトリックス分子に依る細胞接着の修飾と細胞結合構造の変化の対応を観測する編み出された手法は生体の細胞集合ないし胚組織に適応できる。この手法の開発は多細胞生物の形態形成における細胞外マトリックス分子に依る細胞接着の機能を解析するうえに高く評価される。さらに、この手法を確立する諸条件の決定は並々成らぬ努力の賜であるに違いないことを特記したい。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。