

コイ血漿フィブロネクチンの精製と性質

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	内田, 直行 渡辺, 正治 垣内, 麻由美
巻/号	56巻2号
掲載ページ	p. 315-322
発行年月	1990年2月

コイ血漿フィブロネクチンの精製と性質^{*1}

内田直行, 渡辺正治, 垣内麻由美, 安斉 寛, 西出英一

(1989年9月16日受付)

Purification and Characterization of Fibronectin from the Plasma of Carp

Naoyuki Uchida,^{*2} Masaharu Watanabe,^{*2} Mayumi Kakiuchi,^{*2}
Hirosi Anzai,^{*2} and Eiichi Nishide^{*2}

Fibronectin in the plasma of carp *Cyprinus carpio* (CpFN) was purified to homogeneity on SDS-PAGE by sequential column chromatographies on thermally denatured carp skin collagen (carp gelatin)-Sephacryl 4B, arginine-Sepharose 4B and Sepharose CL-4B.

The compositions of carbohydrate and amino acid of the purified CpFN were quite similar to those of bovine plasma fibronectin (BpFN) purified by the procedures similar to those for the CpFN. The CpFN reduced with 2-mercaptoethanol showed two bands, 215 kDa and 220 kDa, on SDS-PAGE, and the unreduced CpFN showed a single band of about 440 kDa, suggesting that the CpFN was a disulfide-bonded dimer of two nonidentical subunit polypeptides, which were slightly smaller than those of the BpFN. The CpFN had some fragments resistant to the digestion with thermolysin, trypsin, elastase and subtilisin, whose patterns on SDS-PAGE showed distinct differences from those of the BpFN.

フィブロネクチンは細胞表面あるいは血液中に存在する巨大糖タンパク質である。このタンパク質は細胞の接着、伸展および食作用の促進などの生理活性があり、細胞の分化および形質発現の調節や創傷の治癒などの生体内における重要な生理機能に関与していることが明らかにされている。また、これら生理機能と分子構造の関連についても遺伝子レベルで高等脊椎動物を中心として解明されつつある。¹⁻⁴⁾

フィブロネクチンあるいはフィブロネクチン様タンパク質は多細胞動物に広く分布することが免疫組織学的に確認されている。⁵⁾ しかし、分子レベルでの研究は高等脊椎動物以外では少ない。魚類ではフナ *Carassius auratus* における免疫組織学的な分布の確認⁶⁾ およびデンキナマズ *Torpedo californica* の血漿にフィブロネクチンと同様な電気泳動的挙動を示すゼラチン親和性タンパク質の存在が確認されている⁷⁾ にすぎない。

本研究では魚類フィブロネクチンの性質を明らかにするため、コイ *Cyprinus carpio* の血漿よりフィブロネクチンを分離精製し、その性質をウシ血漿より得たフィブロネクチン (BpFN) と比較検討した。

実験方法

試薬 フェニルメチルスルホニルフルオリド

(PMSF), *N*-エチルマレイミド (NEM), スブチリシン (Protease Type VIII), トリプシン (Type XIII) およびエラスターゼは Sigma Chemical Company, ベンズアミジン および 1-1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン (TPCK) は Aldrich Chemical Company Inc., (*p*-アミノフェニル) メタンスルホニルフルオリド塩酸塩 (APMSF) およびサモライシンは和光純薬工業株式会社, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) はドータイト株式会社, *p*-アミノ安息香酸エチルは東京化成工業株式会社およびウシ Type I コラーゲンは株式会社ニッピ製のものをを用いた。

血漿 既報⁸⁾ の方法により研究室にて流水下飼育したコイを 70 ppm の *p*-アミノ安息香酸エチルにて麻酔し、尾部環動脈より 2% クエン酸ナトリウムを凝固防止剤として採血した。採血後ただちに氷水中に移し、終濃度 0.01 mM になるように APMSF を、血液と同量の 5 mM ベンズアミジン-10 mM EDTA-2 mM NEM-1 mM PMSF/Dulbecco のリン酸緩衝塩類溶液 (CaCl₂, MgCl₂ を除く) (PBS (-)), pH 7.4, (buffer A) を加え、2,000 xg, 20 分の遠心分離により血漿を得、ただちに実験に供した。

ウシ血漿は凝固防止剤として 10% クエン酸ナトリウムを用いて採血し、同様の遠心分離により得た。これを

*1 本研究の一部は昭和 63 年度日本大学学術研究助成金 (一般研究) により行った。

*2 日本大学農獣医学部水産学科 (Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma, Setagaya, Tokyo 154, Japan).

-35°C に保存し, 適宜実験に供した。

コイゼラチンおよびアルギニン-セファロース 4B の調製 基本的には Vuento の方法⁹⁾に準じておこなった。氷冷 1 M Na₂CO₃ 中で CNBr により活性化したセファロース 4B (ファルマシア LKB) 100 ml を, 常法¹⁰⁾により得たコイ真皮コラーゲン 100 g を 100 ml の 0.2 M NaHCO₃-1 M NaCl, pH 9.5, 中で 45°C, 30 分間熱変性させたゼラチン溶液に加え, 室温にて 16 時間攪拌し, 固定化した。活性基の不活性化はエタノールアミンにより行った。アルギニンの場合はリガンド溶液として 1 M アルギニン/0.2 M NaHCO₃-1 M NaCl, pH 9.5, を用いて同様に行った。ただし, この場合はエタノールアミンによる処理は省いた。

フィブロネクチンの精製 コイ血漿に最終濃度 5 mm になるようにベンズアミジンを加え, 十分に溶解後, 20,000×g, 60 分の遠心分離により上澄液を得た。これを buffer A で平衡化したセファロース 4B カラム (3.5×13 cm) をプレカラムとするコイゼラチン-セファロース 4B カラム (2×7 cm) に付し, 引き続き buffer A により洗浄した。次いで, コイゼラチン-セファロース 4B カラムのみを 0.02 M 酢酸 buffer, pH 5.0, (buffer B) で洗浄後, 同カラムに吸着したフィブロネクチンを buffer B 中の NaBr 濃度を直線的に変化 (0~3 M, 全量: 400 ml) させることにより溶出した。得られたフィブロネクチン画分は 1 mM EDTA-2 mM NEM-1 mM PMSF/50 mM Tris-HCl, pH 7.5, (buffer C) に対する透析後, 同 buffer で平衡化したアルギニン-セファロース 4B カラム (1.4×10 cm) に重層し, 同 buffer で洗浄後, 0.1 M NaCl/buffer C で溶出した。溶出されたフィブロネクチン画分は 0.1 M NaCl/buffer C で平衡化したセファロース CL-4B カラム (2.5×90 cm) によるゲルろ過によりさらに精製し, コイ血漿フィブロネクチン (CpFN) を得た。BpFN はウシ血漿より同様な操作により精製した。ただし, コイゼラチンの代わりに熱変性ウシ Type I コラーゲン (ウシゼラチン) をリガンドとするセファロース 4B カラムを用い, 同カラムからの BpFN の溶出には NaBr 濃度 0~2 M を用いた。

プロテアーゼ抵抗性フラグメントの比較 基本的には Hayashi の方法¹¹⁾に準拠した。CpFN および BpFN の 0.1 M NaCl-10 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 溶液 (約 1 mg/ml) にサーモライシン, トリプシン, エラスターゼおよびスブチリシンの各酵素液を 1 ml 当り 30 μg 加え, 20°C で 0~2 時間反応させた。反応の停止は, サーモライシンの場合, 1/4 容の 0.2 M EDTA を, 他の酵素には 1 ml 当り 5 μl の 0.2 M PMSF/エチルアルコールを加え, ただちにドライアイス-アセトンで凍結し, 真空凍結乾燥することにより行った。生成するフラグメ

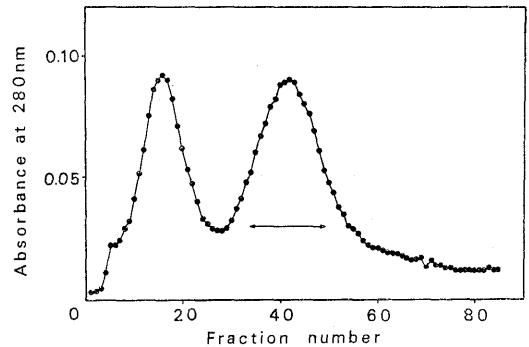


Fig. 1. Affinity column chromatography of the carp plasma on carp gelatin-Sepharose 4B.

Citrated blood was collected from the artery at the tail of carp, followed by addition of APMSF to a final concentration of 0.01 mM and an equal volume of 5 mM benzamidine-10 mM EDTA-2 mM NEM-1 mM PMSF/phosphate buffered saline (Mg²⁺, Ca²⁺ free) (PBS (-)), pH 7.5, (buffer A). Plasma was separated from the citrated blood by low speed centrifugation (2,000×g for 20 min) and then clarified by high speed centrifugation (20,000×g for 60 min) after addition of benzamidine to a final concentration of 5 mM. The plasma was passed through a Sepharose 4B column (3.5×13 cm) equilibrated with buffer A and then applied to a carp gelatin-Sepharose 4B column (2×7 cm) equilibrated with buffer A. The column was continuously washed with buffer A and 0.02 M acetate buffer, pH 5.0, (buffer B). Fibronectin was eluted with a linear gradient of NaBr concentration in buffer B (0-3 M, total volume: 400 ml) and fractions (5 ml/fraction) indicated with the arrow in this figure were pooled as a fibronectin fraction. All of this procedure and subsequent operations for the purification were carried out at 4-6°C.

ントの比較は Laemmli の方法¹²⁾に従い, 5~20% のグラジエントスラブゲルを用いるドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により行った。なお, トリプシン溶液は 1 mg のトリプシンを 1 ml の 1 mM EDTA-1 mM NEM-1 mM TPCK を含む 0.1 M NaCl-10 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 中で 20°C, 15 分間ブレインキューブトしたもの, 他の酵素液は PBS に 1 mg/ml になるように溶解したものをを用いた。

その他の分析 分子量の測定は 5~20% グラジエントスラブゲルを用いる SDS-PAGE により, 未変性状態での分子量は Margolis の方法¹³⁾に準拠し, 4~30% グラジエントスラブゲルを用い, 3~5°C, 300 V で 20 時

間泳動する PAGE により求めた。中性糖はグルコースを標準物質としてフェノール硫酸法¹⁴⁾により、シアル酸は *N*-アセチルノイラミン酸を標準物質として Warren の方法¹⁵⁾により測定した。糖組成は常法¹⁶⁾によりトリメチルシリル化後、2% シリコン OV-17/ユニポート HP (80~100 メッシュ) ガラスカラム (0.3×200 cm) を用いた GLC-FID (島津 GC-7 A) により *myo*-イノシトールを内標準として、アミノ酸組成は 6 N HCl, 110°C, 24 時間の加水分解後、HPLC (日本分光トリロータ) により分析した。トリプトファンは常法¹⁷⁾により、タンパク質濃度は $A_{1\%}^{280nm} = 12.8^{18)}$ を用い分光光学的に定量した。

結 果

CpFN の精製 コイ血漿を コイゼラチン-セファロース 4 B カラムに重層し、buffer A および B で洗浄後、吸着成分を NaBr の直線濃度勾配により溶出した溶出図を Fig. 1 に示す。コイ血漿中のゼラチン吸着成分は NaBr 濃度約 0.4 M と 1.4 M をピークとする 2 成分に分離できた。このうち図中矢印で示す高親和性成分の画分を集め、buffer C に透析した後、アルギニン-セファロース 4 B カラムに付した。なお、ここで得られた低親和性成分 (fraction number 10~20) は CpFN と化学組成は類似しているが分子構造が明らかに異なる糖タンパク質を含んでいる。*アルギニン-セファロース 4 B カラムの溶出図を Fig. 2 に示す。buffer C で非吸着成分を溶出した後、0.1 M NaCl を含む buffer C で吸着成分を溶出した。得られたピークのうち図中に示す画分を集め、さらに、セファロース CL-4 B によるゲルろ過により精製した。その溶出図を Fig. 3 に示す。その結果、ほ

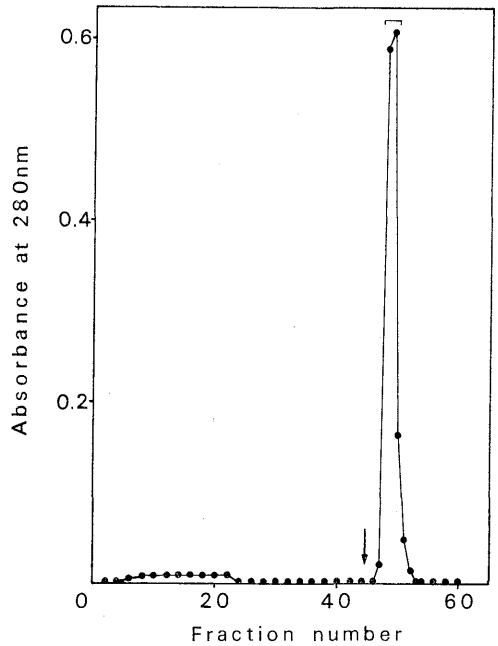


Fig. 2. Purification of the fibronectin fraction by an arginine-Sepharose 4B affinity column chromatography.

The fibronectin fraction pooled in Fig. 1 was dialyzed against 1 mM EDTA-2 mM NEM-1 mM PMSF/50 mM Tris-HCl, pH 7.5, (buffer C) and applied to an arginine-Sepharose 4B column (1.4×10 cm) equilibrated with buffer C. Adsorbed fibronectin was eluted with 0.1 M NaCl/buffer C at the position of the arrow. Fractions (3 ml/fraction) indicated with bracket in this figure were pooled.

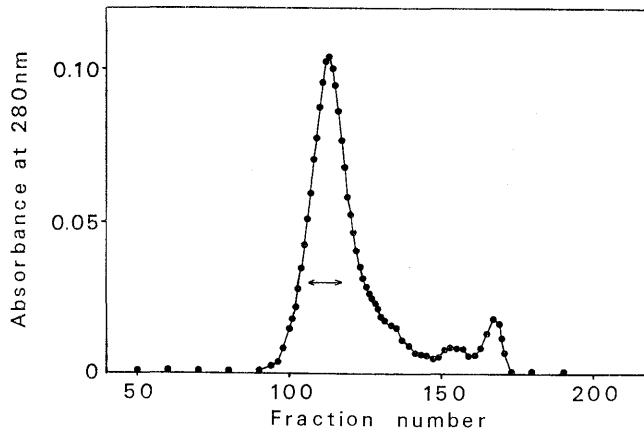


Fig. 3. Gel filtration of the fibronectin fraction on Sepharose CL-4B.

The fibronectin fraction pooled in Fig. 2 was applied to a Sepharose CL-4B column (2.5×90 cm) equilibrated with 0.1 M NaCl/buffer C. Fractions (1.6 ml/fraction) indicated with the arrow in this figure were pooled as purified fibronectin and stored in ice or lyophilized.

* 内田直行, 渡辺正治, 安齊 寛, 西出英一: 昭和 62 年度日本水産学会秋期大会講演要旨集 p. 179.

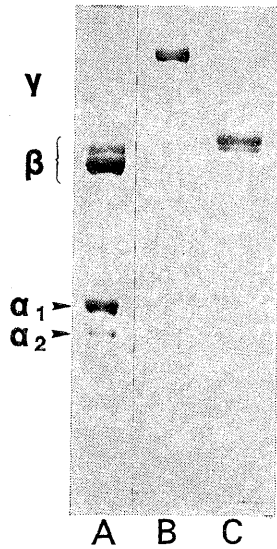


Fig. 4. Purity of the CpFN on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Electrophoresis was performed at 20 mA according to the method of Laemmli¹²⁾ with 5% acrylamide slab gel 1 mm thick. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R. A: carp skin collagen, B: unreduced CpFN, C: CpFN reduced with 5% 2-mercaptoethanol.

ほぼ対称の高分子成分と少量の低分子成分に分離された。このうち図中に示すタンパク質濃度の比較的高い画分を集め精製 CpFN とした。

得られた CpFN の純度を 5% ゲルを用いる SDS-PAGE により検討した。Fig. 4 に示すように CpFN は 2-メルカプトエタノール非存在下 (未還元下) では同時に泳動したコイ真皮コラーゲンの γ 鎖より高分子の単一なバンドを示し、存在下 (還元下) では β 鎖より僅かに高分子の 2 本のバンドのみを示した。このことから、得られた CpFN は SDS-PAGE において単一で、そのサブユニット組成は高等脊椎動物フィブロネクチンと類似していると推測された。

CpFN の性質 5~20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE の結果を Fig. 5 に示す。CpFN は同様な方法でウシ血漿から精製した BpFN に比べ僅かに速い移動度を示した。標準タンパク質の移動度に基づいて算出した分子量は未還元下で 440 kDa, 還元下で 220 kDa および 215 kDa であり、BpFN の、それぞれ 470 kDa, 240 kDa および 230 kDa に比べ明らかに低分子量を示した (Fig. 7)。なお、ここで得られた BpFN のそれぞれの分子量は Iwanaga ら¹⁰⁾ によって求められたウシの cold-insoluble globulin (BCIg, ウシ血漿フィブロネクチンの旧称) の 450 kDa, 220 kDa および 212 kDa に比べ

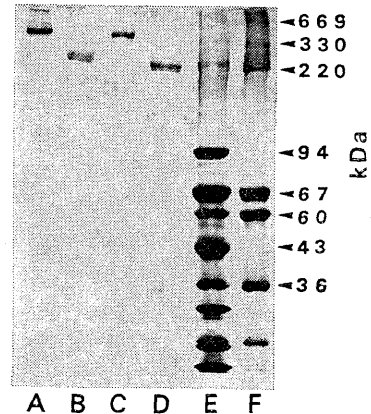


Fig. 5. SDS-PAGE of the CpFN and the BpFN.

Electrophoresis was performed by the same conditions as described in the legend to Fig. 4 except that we used a 5~20% acrylamide gradient slab gel. The BpFN was purified by the same procedures as the CpFN except that we used a thermally denatured bovine Type I collagen (bovine gelatin)-Sepharose 4B column instead of carp gelatin-Sepharose 4B. Molecular weight standard proteins used were thyroglobulin and its subunit: 669 kDa and 330 kDa; ferritin (half unit): 220 kDa; phosphorylase b: 94 kDa; bovine serum albumin: 67 kDa; catalase (subunit): 60 kDa; ovalbumin: 43 kDa; and lactate dehydrogenase (subunit): 36 kDa. A: unreduced BpFN, B: BpFN reduced with 5% 2-mercaptoethanol, C: unreduced CpFN, D: CpFN reduced with 5% 2-mercaptoethanol, E: a mixture of electrophoresis calibration kit for low molecular weight proteins (LMW kit E, Pharmacia LKB) and high molecular weight proteins (HMW kit E Pharmacia LKB) reduced with 5% 2-mercaptoethanol for 7 min at 100°C, F: HMW kit E reduced with 1% 2-mercaptoethanol for 15 min at 60°C.

高い値を示している。これは泳動条件の違いによるものと推測される。また、CpFN の還元により生ずる 2 本の染色バンドの比は BpFN の場合と明らかに異なるが、これは 2 本のサブユニットの染色性に起因しているものと考えられ、440 kDa の 1 本のバンドが還元により 220 kDa および 215 kDa の 2 本のバンドを呈したと考えられる。未変性状態での分子量をみるために 4~30% グラジエントゲルを用いた PAGE を行い (Fig. 6)、球状タンパク質を標準として分子量を求めたところ (Fig. 7)、未変性 CpFN は約 800 kDa と SDS-PAGE で見積もられた約 2 倍の分子量を示した。また、参考のために SDS-PAGE 用試料を同時に検討したところ、未還元試料では 760 kDa と未変性試料に比べ僅かに小さい

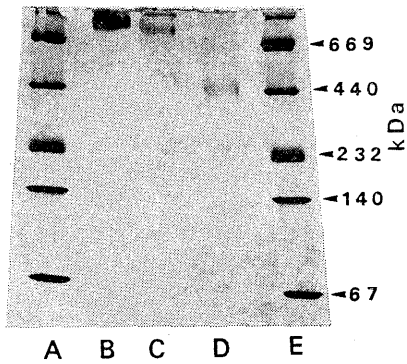


Fig. 6. PAGE of the CpFN.

Electrophoresis was carried out for 20 hours at 300 V according to the method of Margolis¹⁹⁾ with 4–30% acrylamide gradient slab gel 1 mm thick. The molecular weight standard proteins used were thyroglobulin: 669 kDa; ferritin: 440 kDa; catalase: 232 kDa; lactate dehydrogenase: 140 kDa; and bovine serum albumin: 67 kDa. A and E: HMW kit E, B: native CpFN, C: CpFN denatured at 100°C for 3 min in 2.3% SDS, D: CpFN reduced with 5% 2-mercaptoethanol in 2.3% SDS.

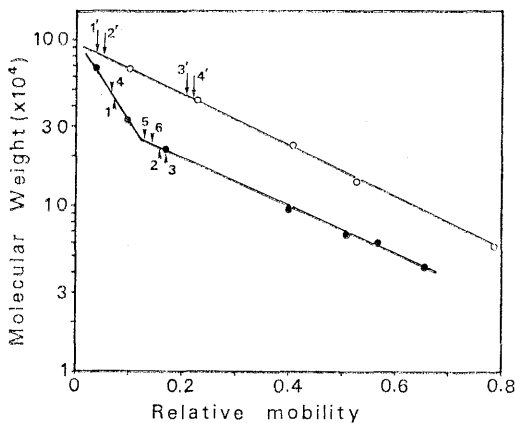


Fig. 7. Estimation of molecular weight of the CpFN and the BpFN by SDS-PAGE (●) and PAGE (○).

1: unreduced CpFN, 2 and 3: reduced CpFN, 4: unreduced BpFN, 5 and 6: reduced BpFN, 1': native CpFN, 2': C in Fig. 6, 3' and 4': D in Fig. 6.

値を示し、還元試料では 460 kDa および 440 kDa と SDS-PAGE の約 2 倍の値を示した。これは本タンパク質が未変性状態では単純な球状タンパク質と異なる立体構造を有していることを示唆している。

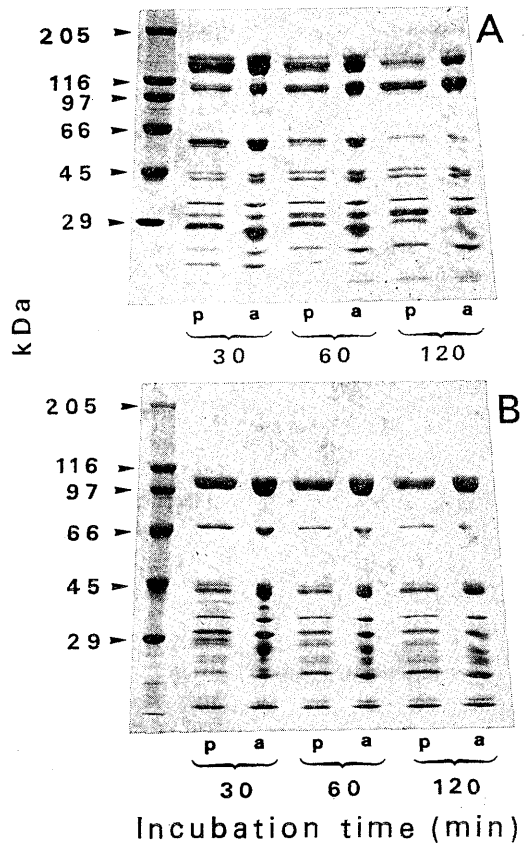


Fig. 8. Time course of thermolysin digestion of the CpFN (B) and the BpFN (A).

The fibronectins (about 1 mg/ml) were digested with thermolysin (30 μ g/30 μ l of PBS) in 0.1 M NaCl-10 mM CaCl_2 /50 mM Tris-HCl, pH 7.0, at 20°C. The reaction was terminated by addition of one fourth volume of 0.2 M EDTA (pH 7.0), followed by rapid freezing in dry ice-acetone and lyophilizing. SDS-PAGE was performed in the presence (p) or in the absence (a) of 2-mercaptoethanol as described in the legend to Fig. 5. The molecular weight standard proteins used were rabbit muscle myosin: 205 kDa; β -galactosidase: 116 kDa; phosphorylase b: 94 kDa; albumin (bovine): 66 kDa; albumin (egg): 45 kDa; and carbonic anhydrase (bovine erythrocytes): 29 kDa.

CpFN の糖およびアミノ酸組成を Table 1 に示す。同時に分析した BpFN および参考のために BCIg¹⁹⁾ およびハムスター血漿フィブロネクチン (HpFN)²⁰⁾ の結果を併記した。CpFN はいずれにおいても他の血漿フィブロネクチンと顕著な差を示さなかった。

構成糖としてマンノース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミンおよびシアル酸のみが検出され、ハムスタ

Table 1. Chemical compositions of the CpFN and the BpFN

Component		CpFN	BpFN	HpFN* ¹	BCIg* ¹
Carbohydrate content (%)	Neutral sugar* ²	1.66	1.64	1.92	1.80
	Sialic acid* ²	1.18	1.29	1.16	1.10
Sugar composition* ² (mole ratio)	Man	1.00	1.00	1.00	—* ⁴
	Gal	0.79	0.85	0.80	—
	GlcNAc	0.75	0.78	1.23	—
Amino acid composition (residue/100 residues)	Asp	10.2	9.5	9.4	9.1
	Thr	10.8	10.4	10.4	9.8
	Ser	7.9	8.0	7.3	8.0
	Glu	11.3	12.0	12.0	11.4
	Pro	7.4	8.0	8.5	7.9
	Gly	8.9	8.1	8.6	9.1
	Ala	4.6	3.9	4.4	4.6
	Val	6.9	6.9	7.2	7.6
	Cys* ³	1.9	2.5	2.9	2.0
	Met	1.6	1.0	1.0	1.0
	Ile	4.2	4.5	4.7	4.3
	Leu	5.7	5.7	5.6	5.6
	Tyr	3.8	4.2	4.1	4.0
	Phe	2.4	2.3	2.4	2.2
	Lys	3.3	4.0	3.6	3.9
	His	2.0	2.0	1.9	1.5
Arg	5.5	5.4	5.3	5.2	
Trp* ⁴	1.7	1.7	—	1.8	

*¹ Values of HpFN (hamster plasma fibronectin) and BCIG (bovine cold insoluble globulin) were calculated from the results obtained by Sekiguchi *et al.*²⁰⁾ and Iwanaga *et al.*¹⁹⁾ respectively.

*² Neutral sugar and sialic acid were determined by the phenol-sulfate method¹⁴⁾ and the method of Warren,¹⁵⁾ respectively. Sugar composition was determined by gas liquid chromatography according to the method of Ikenaka *et al.*¹⁶⁾

*³ Determined as cysteic acid after performic acid oxidation.

*⁴ Spectrophotometry determined according to the method of Edelhoch.¹⁷⁾

*⁵ Not determined.

一細胞性フィブロネクチン²¹⁾およびヒト胎盤フィブロネクチン²²⁾に見出されるフコースは認められなかった。この結果から CpFN は BCIG と同様な複合型糖鎖²³⁾をもつ糖タンパク質であると推測される。

CpFN および BpFN のサーモライシン消化により生成するフラグメントの経時変化を Fig. 8 に示す。生成するフラグメントは両タンパク質共に 60 分以降で還元、未還元において著しい変化を示さず、CpFN は BpFN と同様にサーモライシン抵抗性のフラグメントをもつことが判る。ここには図示しなかったが、CpFN はトリプシン、エラスターゼおよびスプテリシンに対しても抵抗性フラグメントの存在を示した。CpFN の各プロテアーゼ抵抗性フラグメントの組成を BpFN のそれと比較するため、それぞれの酵素により 20°C で 120 分間反応させて得たフラグメントパターンを Fig. 9 にまとめた。サーモライシン、トリプシンおよびエラスターゼ消化により得られるフラグメントパターンは両者間で類似しているものの明確な差が認められた。特に、サーモライシンにおける 20 kDa 以下および 100 kDa 以上、トリプシンの 20 kDa 以上、エラスターゼの 60 kDa 以上で顕著

な差を示した。一方、スプテリシン消化により得られるパターンには著しい差異があり、BpFN では認められない 30 kDa 以上のフラグメントが CpFN で認められた。以上の結果、CpFN は BpFN と化学組成は類似しているが、一次配列において顕著な差があることが推測された。

考 察

フィブロネクチンは海綿以上の広範な多細胞動物に分布し、またほとんどの組織に認められることから、組織構築に重要な役割を担っていると考えられている。また、種々の生理作用に関与することから高等脊椎動物を中心に非常に多くの研究が各方面からなされている。それによると、検討された種間では大きな相違はなく、基本的には 220 kDa~240 kDa の 2 種サブユニットがジスルフィド結合したヘテロダイマーであり、各サブユニットには各種生理活性をもつ機能ドメインがほぼ同様な配列をしているものと考えられている。¹⁻⁴⁾ しかし、分子レベルでの研究は高等脊椎動物以外では非常に少なく、SDS-PAGE において還元下で約 220 kDa の 2 本

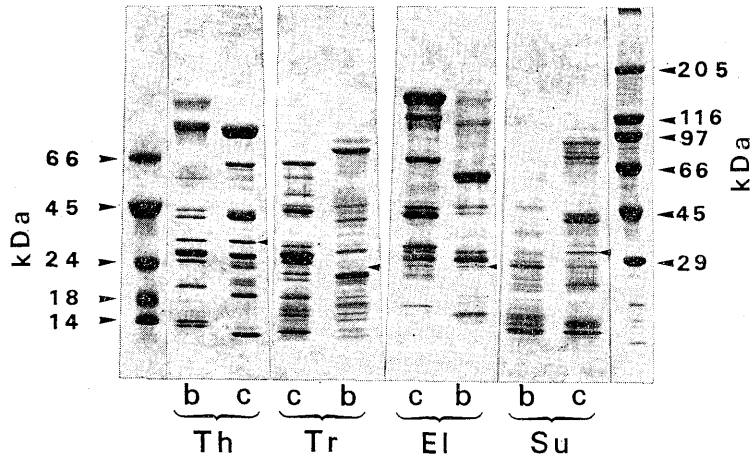


Fig. 9. SDS-PAGE of the reduced proteolytic fragments of the CpFN (c) and the BpFN (b).

The fibronectins (about 1 mg/ml) were digested by a variety of protease (30 μ g/30 μ l) in 0.1 M NaCl-10 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7.0, at 20°C for 120 min. Trypsin was preincubated in 1 mM EDTA-1 mM NEM-1 mM TPCK-0.1 M NaCl-10 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7.0, at 20°C for 15 min and other proteases were dissolved in PBS. The reaction was terminated by addition of 1/4 volume of 0.2 M EDTA (pH 7.0) for thermolysin and 1/200 volume of 0.2 M PMSF/ethanol for the other proteases, followed by the same procedure as described in the legend to Fig. 8. SDS-PAGE was carried out according to the methods described in the legend to Fig. 5. The band indicated with the arrow on the gel is for each enzymes used. The molecular weight standard proteins used were trypsinogen (PMSF treated): 24 kDa; β -lactoglobulin: 18 kDa; lysozyme: 14 kDa; and the standard proteins described in the legend to Fig. 8. Th: thermolysin, Tr: trypsin, El: elastase, Su: subtilisine.

のバンドを示し、未還元下でこの2量体に相当するバンドを呈するフィブロネクチンあるいはフィブロネクチン様タンパク質の存在は海綿 *Microciona prolifera* の組織,⁵⁾ イモリ *Necturus maculosus*²⁴⁾ およびデンキナマズ⁷⁾ の血漿中で確認されているに過ぎず、この事が動物界に共通な性状であるとは断定し難い。しかし、これらの結果と本研究で得られた結果から考えると、動物界に広く存在するフィブロネクチンの基本構造は約 220 kDa の 2 種のサブユニットがジスルフィド結合したヘテロダイマーであると予測される。

一方、CpFN と BpFN の各種プロテアーゼ消化フラグメントパターンの相違より、一次構造あるいはドメイン配列においてかなりの種間差が有るものと推測される。

フィブロネクチンの立体構造については現在論争中の点が多い。PAGE により算出された CpFN の分子量は SDS-PAGE で求めたときの約 2 倍の値を示した。ここで用いた PAGE はいわゆる Pore-limit PAGE²⁵⁾ であり、タンパク質の移動度はそのタンパク質の大きさに依存することから、未変性の CpFN は中性付近の溶液中では変性状態 (SDS 結合状態) の約 2 倍の大きさの球状タンパク質に相当する大きさを持っていることになる。

これは CpFN がこの状態で会合しているか、軸比の高い楕円の立体構造を有していることを意味している。SDS-処理した CpFN が PAGE において、SDS-未処理試料とほぼ同じ分子量を示すこと、ヒト血漿フィブロネクチンの軸比が 2 : 1.1²⁶⁾ であることから考え、未変性 CpFN は血漿フィブロネクチンで一般的に考えられている²⁷⁾ 様に中性溶液中で軸比の高い楕円立体構造を保持しているものと考えられる。また、各サブユニットの分子量も両方法において約 2 倍の違いを示すことから、これらも 2 量体と同様な軸比をもつ楕円構造を有するものと思われ、未変性 CpFN は Odermatt と Engel により提案されているモデル²⁷⁾ と同様に、中性溶液中で楕円形の 2 種のサブユニットが末端同志でジスルフィド結合した「く」の字形の立体構造を保持していると推測される。

文 献

- 1) K. H. Yamada: *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 761-799 (1983).
- 2) K. M. Yamada, T. Hasegawa, E. Hasegawa, D. W. Kennedy, H. Hirano, M. Hayashi, S. K. Akiyama, and K. Olden: *Prog. Clin. Biol. Res.*, **151**, 1-15 (1984).

- 3) R. Hynes: *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**, 67-90 (1985).
- 4) T. E. Petersen, K. Skorstengaard, and K. Vibe-Pedersen: in "Fibronectin" (ed. by D. F. Mosher), Academic Press, San Diego, 1989, pp. 1-24.
- 5) S. K. Akiyama and M. D. Johnson: *Comp. Biochem Physiol.*, **76B**, 687-694 (1983).
- 6) P. G. Natali, D. Galloway, M. R. Nicotra, and C. De Martino: *Connect. Tissue Res.*, **8**, 199-204 (1981).
- 7) E. Engvall, E. Ruoslahti, and E. J. Miller: *J. Exp. Med.*, **147**, 1584-1594 (1978).
- 8) 内田直行, 武蔵達也, 勝浦洋, 安斉寛, 西出英一: *日本誌*, **54**, 129-133 (1988).
- 9) A. Vuento and A. Vaheri: *Biochem. J.*, **183**, 331-337 (1979).
- 10) S. Kimura, Y. Ohno, Y. Miyauchi, and N. Uchida: *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 27-34 (1987).
- 11) M. Hayashi and K. M. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **256**, 11292-11300 (1981).
- 12) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 13) J. Margolis and C. W. Wrigley: *J. Chromatogr.*, **106**, 204-209 (1975).
- 14) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 15) L. Wareen: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971-1975 (1959).
- 16) 池中徳治, 長谷純宏, 妻鹿友弘: 続生化学実験講座(日本生化学会編), **2**, 東京化学同人, 東京, 1987, pp. 215-218.
- 17) H. Edelhoch: *Biochemistry*, **6**, 1948-1954 (1967).
- 18) M. W. Mosesson and R. A. Umfleet: *J. Biol. Chem.*, **245**, 5728-5736 (1970).
- 19) S. Iwanaga, K. Suzuki, and S. Hashimoto: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**, 56-73 (1978).
- 20) K. Sekiguchi, M. Fukuda, and S. Hakamori: *J. Biol. Chem.*, **256**, 6452-6462 (1981).
- 21) M. Fukuda and S. Hakamori: *J. Biol. Chem.*, **254**, 5451-5457 (1979).
- 22) M. Isemura, Y. Yamaguchi, H. Munakata, J. Aikawa, M. Kan, I. Yamane, and Z. Yosizawa: *J. Biochem.*, **96**, 163-169 (1984).
- 23) S. Takasaki, K. Yamashita, K. Suzuki, S. Iwanaga, and A. Kobata: *J. Biol. Chem.*, **254**, 8548-8553 (1979).
- 24) L. A. Repesh, L. T. Furcht, and D. Smith: *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 937-945 (1981).
- 25) G. C. Slater: *Anal. Chem.*, **41**, 1039-1041 (1961).
- 26) V. E. Koteliansky, M. A. Glukhova, M. V. Bejanian, V. N. Smirnov, V. V. Filimonov, O. M. Zalite, and S. Yu. Venyaminov: *Eur. Biochem.*, **119**, 619-624 (1981).
- 27) E. Odermatt and J. Engel: in "Fibronectin" (ed. by D. F. Mosher), Academic Press, San Diego, 1989, pp. 25-45.