

論文の内容の要旨

論文題目 Structure and Function of the Multimeric Fibronectin

(多量体フィブロネクチンの構造と機能)

氏名 酒井恵子

細胞外マトリクスタンパク質は、生体内で細胞の支持体としての役割を果たすばかりではなく、細胞の増殖、分化を制御する役割を担っている。細胞外マトリクスタンパク質は細胞外に分泌された後、アSEMBルし超分子構造体となって細胞活性の調節を行っている。アSEMBルした細胞外マトリクスタンパク質がどのように細胞活性を調節するのかを調べることは、細胞の制御機構を理解する上で重要である。

フィブロネクチン(FN)は、細胞外マトリクス成分の一つで、多細胞動物に広く分布する多機能性の糖タンパク質である。肝臓で二量体として生合成・分泌され体内を循環する血漿FNと、各組織において細胞が二量体として自己の周囲に分泌する細胞性FNが存在する。両者とも同一の遺伝子から生合成され、細胞表面上でアSEMBルし細胞外マトリックスに取り込まれる。アSEMBルし不溶化したFNを超分子構造体の状態で分離精製することは困難なため、その構造及び生物学的な機能の研究は遅れている。本研究は、血漿中に大量に存在するFNを用いて生理的条件下無細胞系でFNが多量体を形成する過程と、その構造及び機能を探ることを目的とした。

第一章では、本研究の背景を論じる。二量体FNの構造と機能については膨大な研究がある。また、細胞培養系における多量体形成の機構についても多数報告されている。しかし、繊維性FNの構造と機能について報告した例はほとんどない。一方、生理的条件下における無細胞系での多量体形成に関しては、Morla等が報告しているのみである。この多量体FNの生物学的な機能としてはガン細胞の転移を阻害することが報告されているが、形成過程及び構造に関する研究は行われていない。

第二章では、成牛血清より精製した血漿 FN は生理的な条件 (pH, イオン強度, 温度) で低濃度のジチオスレイトール(DTT)と処理することで、分子内ジスルヒド結合の分子間への交換反応により多量体を形成する事を述べる。DTT 濃度が高すぎると多量体は形成されないが、タンパク質濃度は多量体形成にあまり影響しない。イオン強度は多量体の形成に影響しないが、二価カチオンは EDTA の存在に比べて多量体の形成速度を遅らせた。尿素処理によりコンホメーションが少し変化した FN では、多量体形成に必要な DTT 濃度が高くなった。ポリペプチド鎖中に埋もれているスルフヒドリル基は多量体の形成には関与しない。カルpain処理によりカルボキシ末端側の領域が除去された FN では多量体が形成されない。一定条件で形成された多量体 FN は、二量体 FN と同程度のヘパリン結合能及び細胞接着活性を保持していたが、ゼラチン結合能を失っていた。また、コラーゲン分子との結合も二量体 FN に比べ低下していたが、コラーゲンゲルへの取り込みは特異的であった。大量にそして比較的簡便に精製できる血漿 FN を用いて、極めて単純な系で多量体を形成させることが可能なことが分かった。このような条件での多量体 FN 形成は他に報告がなく、安定した標品が得られれば広汎な応用が考えられる。

第三章では、DTT 処理による血漿 FN の多量体形成過程におけるコンホメーションの影響及び形成された多量体の構造につき述べる。血漿 FN のコンホメーションは温度による影響を受け、カルpainによる切断の感受性も異なる。このようなコンホメーションの差異は、DTT 処理による多量体形成に影響し、30℃以下では多量体の形成が悪くなる。DTT 処理後 4 時間ぐらゐまでは、FN のコンホメーションの変化は大きく、その後は緩やかに変化し 8 時間以降はほとんど変化しない。第二章で述べたように、DTT 処理 4 時間では、多量体はほとんど形成されないため、多量体形成前に FN のコンホメーション変化が起こると考えられる。37℃で 4 時間 DTT 処理した後、低温でさらにインキュベーションを行うと、25℃では半分以上が、4℃でも一部が多量体に変換していた。このことは、多量体形成前のコンホメーション変化が 30℃以下では律速になっている事を示唆する。また、コンホメーションの変化後も DTT が存在していないと多量体は形成されない。一旦形成された多量体は、37℃でも 4℃でも、DTT 再処理により二量体には変換しない。形成された多量体 FN の CD スペクトルは、二量体の CD スペクトルとは異なり、DTT 処理により起こった変化を維持していた。この CD スペクトルは熱変性した FN と類似はしているが異なる。また、電子顕微鏡観察により、この多量体 FN は線維性のアグリゲーションであることが示され、生体で形成される線維性の FN に近いものではないかと推測された。第四章では、この多量体 FN の細胞培養系における生物学的な機能につき述べる。多くの形質転換細胞は自分で細胞外マトリクスタンパク質を合成できないか、あるいは細胞外マトリクスを構築できない。このことが、形質転換細胞の不安定な接着の原因の一つと考えられる。ヒト繊維肉腫細胞 HT1080 は正常な繊維芽細胞 TIG-1 (ヒト胎児胚由来) とは異なり、培養液中に FN を分泌せず、細胞層中に FN を沈着もしない。この細胞は、増殖してコンフレントになった後、培養基質より容易に脱着する。これは、HT1080 が細胞外マトリクスを構築できず接着が不安定であるためと考えられる。細胞培養系では細胞は焦点接着斑を形成して安定に接着し増殖する。HT1080 も接着後 1 時間では伸展し焦点接着斑を形成した。しかし、3 時間後には二量体 FN 上

では焦点接着は消失し、細胞形態も丸くなった。一方、多量体 FN 上の HT1080 は 3 時間後でも伸展した状態で接着斑を保持していた。多量体 FN 上の HT1080 では $\alpha 3$ インテグリンが細胞膜の周辺に集まり安定した接着を形成すると考えられている。細胞の増殖は多量体 FN でも二量体 FN 上でも差異は見られないが、コンフレントになった後、二量体 FN 上の HT1080 は迅速に基質より脱着したが、多量体 FN 上では脱着は遅れた。細胞は生体内において必ずしも下面側だけで細胞外マトリクスと接しているわけではなく、細胞全体が細胞外マトリクスと接している。そこで、培養液の中に多量体 FN を添加することでさらに細胞の脱着が阻止されることが予測された。細胞の脱着は添加した多量体 FN の濃度依存的に阻止された。フィブロネクチンの分布を調べたところ、多量体 FN は細胞の接着面と上面側の両方にみられたが、二量体 FN は分散していた。HT1080 は細胞外に大量にマトリクス分解酵素を分泌することが知られている。長期培養によって、二量体 FN をコートした細胞層においては FN は分解されていた。以上のことは、多量体 FN が細胞接着の初期において安定した接着を行い、細胞が増殖した状態でも安定した接着を保持する機能を持っていることを示している。これは二量体 FN には見られない多量体 FN の顕著な機能である。生体組織中において FN はコラーゲン繊維と共局在していることが知られている。第二章でも述べたように多量体 FN はゼラチン結合能を失っているが、コラーゲンをゲル化した三次元構造体への取り込みは特異的に行われる。培養液に多量体 FN を添加し HT1080 をコラーゲンゲル内培養した。多量体 FN を添加した培養では、細胞はゲル内で繊維芽細胞様に比較的細長い形態となりコロニーを形成するように集まる。このことは、多量体 FN が形質転換細胞を正常な細胞形態を取るように機能することを示唆する。

第五章では第二章、第三章、第四章の結果を踏まえ、FN が多溶体を形成することの生物学的な意義につき考察する。また、多量体形成におけるいくつかの問題点に関し論ずる。最後に、多量体 FN の応用面につき可能な方向を探る。

以上、本研究の結果より、血漿 FN の DTT 処理による多量体形成過程及びその構造の研究は、生体内に存在する繊維性 FN の形成の機構及びその構造を明らかにしていく上で有用な手段の一つになりうると思われる。またこのような単純な系で形成される多量体 FN は、細胞工学的にも応用面は広いことが予測される。例えば、ガン化細胞の転移阻止分子として、人工皮膚の構築成分の一つとして、人工血管における内皮細胞の安定化分子として、或いは眼の角膜の点眼治療薬としての応用が期待される。