



A Cell-Binding, Immunoglobulin-Like Protein from human Plasma. I. Isolation and Subunit Structure

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大堀, 兼男 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1307

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 30号	学位授与年月日	昭和62年 7月17日
氏 名	大 堀 兼 男		
論文題目	A Cell-Binding, Immunoglobulin-Like Protein from human Plasma. I. Isolation and Subunit Structure (ヒト血漿より単離された細胞結合性免疫グロブリン様タンパク質 I. 単離とサブユニット構造)		

A Cell-Binding, Immunoglobulin-Like Protein from human Plasma.

I. Isolation and Subunit Structure

(ヒト血漿より単離された細胞結合性免疫グロブリン様タンパク質)

I. 単離とサブユニット構造)

論文の内容の要旨

ヒト血漿および組織から、細胞接着性タンパク質がいくつか発見されている。その中で、フィブロネクチンは最もよく研究されたタンパク質で、コラーゲンをはじめ様々な分子と結合する。また、コンドロネクチンは軟骨細胞に対してのみ接着性がある。ビトロネクチンは、ガラスとの親和性がある。これらのタンパク質は、細胞との接着を介して、組織内における細胞の正常な機能発現のために必要であると考えられている。また、最近明らかにされてきているように、細胞接着性タンパク質は、単なる細胞接着力を持つタンパク質としてのみでなく、広く免疫系や血液凝固系その他の様々な生体内での機能に密接に影響を及ぼしているタンパク質であると考えられるようになった。

フィブロネクチンなどは、ヒト血漿からゼラチン-セファロースカラムを用いてとりだされている。そこで、今回、エラスチン-セファロースカラムより血漿タンパク質の分離を試みた。エラスチン-セファロースカラムから溶出した分画は、さらに3-15%のショ糖密度勾配遠心法で精製した。SDS(ソディウム・ドデシル・サルフェイト)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、この高分子タンパク質の分子量が、Immunoglobulin(以下「Ig」という)M(900,000)より大きいことがわかった。そのアミノ酸組成は、グリシン、半シスチン以外はIgMのアミノ酸組成と良く似ていた。しかし、フィブロネクチンとはアミノ酸組成が異なっていた。サブユニットは数種類あり、4つの部分に分けて、分子量の大きい順からA, B, C, Dとした。Aが大部分を占めていた(約45%)。サブユニットの分子量は、Aが約80,000、Bは約70,000、Cは約60,000、Dは約27,000だった。サブユニットA, Cがそれぞれ、IgM、およびIgGの重鎖とほぼ同一の分子量であり、サブユニットBはIgAの重鎖よりやや大きかった。そこでこのタンパク質のウサギ抗血清を作成し、その抗体活性を測定した。抗血清は、IgM, IgA, IgGのいずれとも抗体活性があり、このタンパク質はIgM, IgA, IgGの重鎖と類似のポリペプチドを含んでいることが示唆された。さらに、イムノブロッティングによってこのことを確認した。 α -キモトリプシン消化をIgM, IgGと比較したところ、このタンパク質はIgMと同じペプチドマップがえられ、IgMと類似の構造を含んでいることが示唆された。

このタンパク質には細胞結合性があることが確かめられているので(J. Biochem. 100, 843-848 (1986))、新しいタイプの細胞接着性タンパク質であると結論づけた。そこで、このタンパク質をcell-binding immunoglobulin-like protein、すなわちCIPと名付けた。サブユニット中に免疫グロブリン(IgM, IgA, IgG)の重鎖があることなどから、CIPは生体防御においてなんらかの役割を果たしていることが示唆される。また、細胞結合性を有することから、細胞間マトリックスに関係していることも考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文はエラスチンに結合するヒト血漿タンパク質を検索しようとした結果、分子量が900,000(以下900Kのように略)以上のタンパク質を見出したことを報告している。このものは免疫グロブリン(以下Ig)と似たタンパク質成分とアミノ酸組成を示した。この物質の細胞接着活性については協同研究者がすでに報告している。

〔方法〕血漿中のフィブロネクチンがゼラチン-セファロースカラムで抽出されたのになら、本実験では、エラスチンと活性化CH-セファロース4Bから作製したエラスチン-セファロースカラムを用いて健康人保存血の血漿から試料タンパク質を取り出している。カラムに結合したタンパク質を4M尿素で溶出し、

シ。糖密度勾配遠心でさらに精製している。分子量の解析にはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下SDS-PAGE）を用い、タンパク質成分の抗血清による検索にはウェスタン・ブロット法を用いている。

〔結果〕上述の方法により調製した本タンパク質を還元剤が存在しない条件でSDS-PAGEによりその大きさを解析すると、見かけの分子量は900 K以上であることが分かった。還元剤（2-メルカプトエタノール）が存在する条件で電気泳動を行うと、このものはおおむねA, B, C, Dの4成分に分かれた。これらの分子量は、それぞれ(A)80 K, (B)70 K, (C)60 K, (D)27 Kであった。

このタンパク質のアミノ酸組成を調べIgM（分子量900 K）及びフィブロネクチン（同450 K）のそれと比較したところ、IgMに対してはグリシンの含量はより高く、半シスチンのそれはより低い；フィブロネクチンに対してはアラニンとセリンの含量はより高く、半シスチンのそれはより低いという結果が得られ、いずれにも似てはいるが、一致はしなかった。

このもののタンパク質成分A, B, Cについてヤギ抗ヒトIg抗体によるウェスタン・ブロット解析を行ったところ、Aは抗IgMと、Bは抗IgAと、Cは抗IgGと反応することが分かった。

この物質をタンパク質分解酵素α-キモトリプシンで限定分解し、SDS-PAGEによるペプチドパターン解析を行ったところ、同処理したIgMのそれに近いパターンを示したが、IgGのそれとは異なっていた。

〔結論及び考察〕1. このものはヒト血漿タンパク質中最大級の大きさ（分子量900 K以上）を示す。2. 還元すると特徴的な4つのタンパク質成分に分かれる。3. タンパク質成分のうち3つはその分子量と抗原性においてIgM, IgG, IgAのH鎖に似ている。

これらの結果から、このものは今まで報告を見ない新しい血漿タンパク質である可能性がある。それだけに今後の研究により人工産物である可能性の否定、さらにくわしい分子構造の解明、生体における分布様式の検索、産生細胞の同定、生理機能の解明などが期待される。なお、本申請者らは協同研究者の得た結果に鑑み、本物質を“Cell binding immunoglobulin-like protein”（略してCIP）と名づけている。

また、以下の諸点について試問がなされた。

1. 本実験に用いた血漿の供給源
2. 血漿（血液）保存温度（寒冷凝集素の考慮）
3. ヒト新鮮血を用いた場合や他種動物の血漿での検討
4. CIPの収量
5. CIPの生体内分布（血漿以外）
6. CIPの分子構造
 - a. サブユニットの量比
 - b. Fc部分の検出
 - c. 可変領域・不変領域の検索
 - d. サブユニットのN末端アミノ酸配列の解析
7. CIPの糖タンパク質性
8. 疾患との関係
9. CIPの補体結合能

これらの質疑に対する申請者の応答はおおむね適切であった。以上から本論文は、医学博士の学位論文としてふさわしいものであることを全委員が一致して判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 山 下 昭 副査 教授 藤 瀬 裕

副査 助教授 金 井 弘 一 副査 助教授 寺 尾 俊 彦