

◆トピックス◆

ビトロネクチンの欠損マウス

中 富 靖*, 友 清 和 彦*, 水 口 純*

Targeted Gene Disruption of Vitronectin in Mice

Yasushi NAKATOMI*, Kazuhiko TOMOKIYO* and Jun MIZUGUCHI*

Key words: vitronectin, gene targeting, adhesive protein, extracellular matrix, serum spreading factor, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)

はじめに

周知の如く、胚発生・創傷治癒・組織（再）構築・腫瘍転移・動脈硬化・免疫防御など重要な生体現象は、細胞の接着や移動を常に伴い、細胞同士や細胞と細胞外マトリックス（extracellular matrices: ECM）との相互作用が中心的役割を果たす。その際、一連の接着蛋白質群が重要な構成要素であり、本稿で紹介するビトロネクチン（VN）もその一つである。

ヒトVNの遺伝子と蛋白質構造についてまとめると^{1)~5)}、①遺伝子は全長3 kbで、8つのエクソンと7つのイントロンからなる。②染色体上の位置は17q11で、ヒトのほか哺乳類における欠損症の報告は未だない。③ヒトとマウスではその遺伝子制御領域に違いがあり、インターロイキン6に対する反応性が異なる。④ヒトVNは459アミノ酸残基からなる分子量約75,000の糖蛋白質であり、血漿中では一本鎖分子と、Arg-379/Ala-380で切断され、S-S結合で連結した二本鎖分子（分子量65,000と10,000）が約50%ずつ存在する。⑤主として肝臓で合成されるが、マウスでは少量ながら脳・脂肪組織・心臓・骨格筋・肺、および胚発生過程の中樞神

経系でmRNAが検出されている。⑥血中濃度は0.25~0.45 mg/mlであり、その他、血小板や皮膚のエラスチン線維などにも存在する。⑦アミノ末端よりソマトメジンBドメイン、連結領域、ヘモペキシンIおよびIIの各ドメインから構成されており、連結領域には接着蛋白に特徴的なArg-Gly-Asp (RGD) 配列、さらにヘモペキシンIIドメインにはヘパリン結合領域を含む。

VNは、細胞接着はもとより、免疫系、血液凝固線溶系に広く関わっているが、主な機能を挙げると^{1)~7)}、①VN特異的なインテグリンは見つかっていないものの、 $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha IIb\beta 3$ などに結合して、細胞の接着や移動を促進する。②VNは連鎖球菌やブドウ球菌と特異的に結合し、抗体や補体などと同様、細菌付着を媒介するオプソニンとして働く。③VNは補体系で同定されたSタンパク質（プロテインCの補酵素であるプロテインSとは異なる）と同じもので、補体のC5b-7膜侵襲複合体に結合し、補体を介しての細胞破壊を制御する。④ヘパリンのスカベンジャーとして作用することにより、アンチトロンビンIII (AT-III) のトロンビン (IIa) 不活化を非競合的に阻害し、AT-

* (財)化学及血清療法研究所, 血液製剤研究部 [〒860-8568 熊本市大窪1-6-1]

Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute [1-6-1 Ookubo, Kumamoto, 860-8568, Japan.]

III:IIa 複合体のクリアランスにも関与する。⑤ 血中では plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) と複合体を形成し, 安定化させる作用をもつ。⑥ urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) と結合し, 細胞の接着や酵素活性の調節に関与している。

VN の PAI-1 結合部位として, N 末端のソマトメジン B ドメインと C 末端のヘモペキシン II ドメインの二つが報告されているが, 最近, uPAR を介した VN の細胞接着作用が VN のプラスミンによる限定分解 (Arg-361/Ser-362) や PAI-1 の添加によって阻害されることから, uPAR と PAI-1 はともに VN のヘモペキシン II ドメインに結合するのではないかと推測されている⁹⁾。また, IIa:PAI-1 複合体の LDL receptor-related protein (LRP) や gp 330 によるクリアランスを VN が促進する報告⁹⁾¹⁰⁾ や, VN が uPA:可溶性 uPAR 複合体と結合して, 細胞表面や細胞外マトリックスに局在化させ, 細胞移動や組織改変に必要な PA 活性を蓄積さ

せる報告¹¹⁾ もあり, VN の多種多様な機能が示唆されている。

VN 欠損マウスから得られる情報

1995 年, Zheng ら⁶⁾ は相同組換えにより 8 つのエクソン全てを不活化させた VN 遺伝子を, 胚性幹 (ES) 細胞に導入し, ヘテロ接合体 (VN^{+/-}) マウスを作出した。そして VN^{+/-} マウス同士を交配させたところ, 各遺伝型は, VN^{+/+} (約 24%), VN^{+/-} (約 49%), VN^{-/-} (約 28%) の割合で産出され, 性差も観察されなかった。ホモ接合体 (VN^{-/-}) マウスのサザンブロッティングの結果から, VN をコードする全ての配列が欠失しており, 血漿のウエスタンブロット分析からも VN の発現はみられなかった。また, VN^{+/-} マウスでは明らかに VN レベルが減少していることが確認された。

180 匹以上の VN^{-/-} マウスが得られたが, 5 カ月以上の観察で行動や形態的な異常は認めら

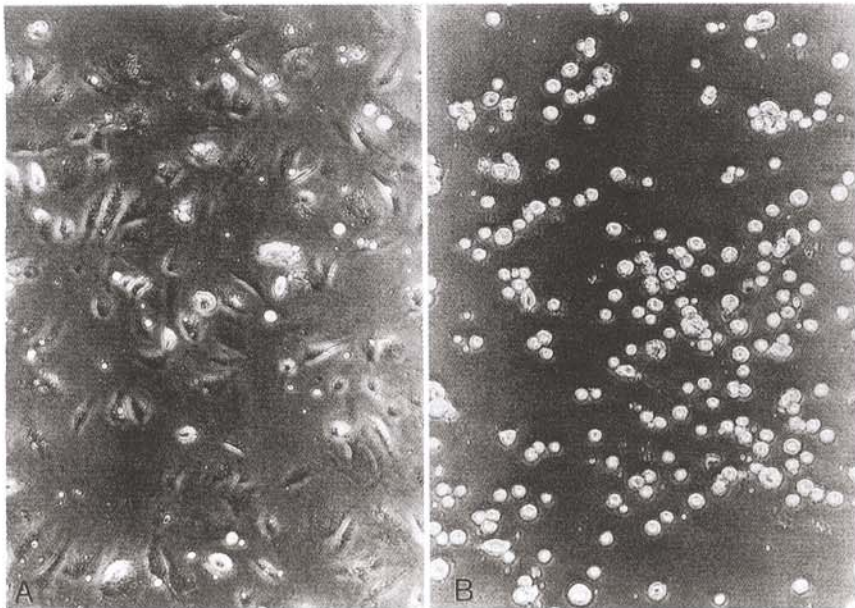


図1 COS細胞の伸展に対するVNの効果(文献6より引用)
野生型(VN^{+/+})および, VN欠損(VN^{-/-})マウスの血清(5%)を含む培地でCOS細胞を2時間培養したもの(倍率:×110)。VN^{+/+}:(A), VN^{-/-}:(B)
(Copyright (1995) National Academy of Sciences, U.S.A.)

れず、発育・生存率ともに野生型マウスと区別できなかった。また、全血球数等の一般的な分析はもとより、中枢神経系、心臓、肺、肝臓、腎臓における詳細な組織学検査でも全く異常はなかった。生殖能力も正常で、 $VN^{-/-}$ マウス同士の交配による出産数は 7.2 ± 2.9 匹であり、 $VN^{+/-}$ マウスでの結果(6.3 ± 1.6 匹)と大差なく、いずれも正常範囲内であり、出産周期も正常であった。

一方、 $VN^{-/-}$ マウス由来の血清を使って、 VN の細胞伸展能力を *in vitro* で調べたところ劇的な効果が観察された。COS, HeLa およびマウス胎仔由来初代線維芽細胞を常法通り培養後、5%の $VN^{-/-}$ マウス由来の血清を含んだ培地に移し変えて培養したところ、細胞の伸展が全く見られなかった(図1)。野生型マウス由来の血清で同様な実験を行った結果、正常な細胞の伸展が観察された。野生型と $VN^{-/-}$ マウス血清を、1:1あるいは1:2の割合で混合させたものでは、通常の細胞伸展が観察された。この *in vitro* での細胞伸展に対する VN 欠損の劇的な効果について Zheng らは、 VN の正常血清濃度が $0.25 \sim 0.45 \text{ mg/ml}$ とかなり高いことと、 VN がプラスチックへ高い親和性を示すことを要因としてあげている。細胞接着因子として有名なフィブロネクチン(FN)も細胞の接着・伸展活性を示すが、FN 欠損血清でも細胞の接着・増殖は可能であり、 VN は10%血清存在下でもプラスチックに結合できるが、FN は結合できない。従って、上記の結果は、 VN が接着伸展活性を担っていると報告¹²⁾と一致する。

VN は血漿中における PAI-1 の主要なキャリア蛋白質であり、PAI-1 活性を安定化させ、血中半減期を1.5時間から3時間延長させる。野生型マウス血清でコートしたマイクロタイタープレートでは、マウス組換え PAI-1 の結合を飽和したのに対し、 $VN^{-/-}$ マウス血清は PAI-1 結合能力を完全に欠失していた(図2)。血中の PAI-1 濃度は細菌由来のエンドトキシン投与により劇的に上昇するが、エンドトキシンの投与

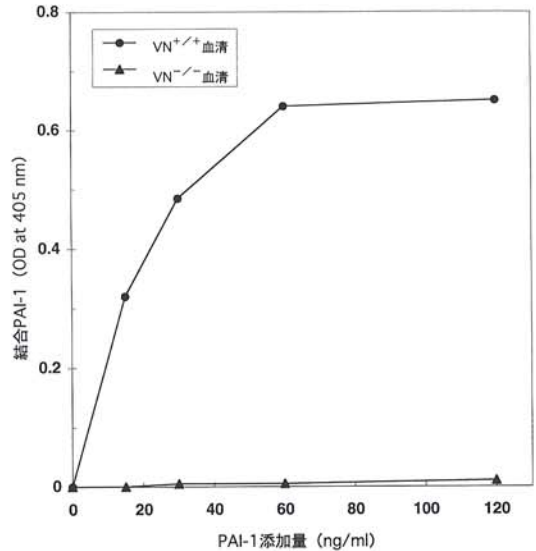


図2 マウス血清の PAI-1 結合能力 (文献6より引用, 改変)
マイクロプレートに、野生型 ($VN^{+/+}$) および VN 欠損型 ($VN^{-/-}$) マウスの血清 (終濃度1%) をコートし、マウス由来 recombinant PAI-1 を反応させ、結合した PAI-1 を ELISA により検出した。(Copyright (1995) National Academy of Sciences, U.S.A.)

により、野生型マウスの血中 PAI-1 濃度が $< 2 \text{ ng/ml}$ から $264 \pm 67 \text{ ng/ml}$ に上昇したのに比べて、 $VN^{-/-}$ マウスでは $144 \pm 76 \text{ ng/ml}$ と野生型の約50%にとどまった。従って VN が血漿中における唯一の重要な PAI-1 結合蛋白質であり、またストレス時における PAI-1 濃度の上昇を手助けしていることが示唆される。さらに、血管外では PAI-1 の局在化に VN が重要な役割を演じている可能性もあろう。一方、 $VN^{-/-}$ マウスが大きな止血障害をきたさないことは、PAI-1 欠損マウスがマイルドな線溶亢進状態を呈する以外、野生型と変わらなかったこと¹³⁾とつじつまがあう。しかし、ヒトにおける PAI-1 欠損は中等度の出血症状を呈する¹⁴⁾ので、一概にマウスとヒトを同列で論じることはできず、 VN と PAI-1 の相互作用に関しても今後の解析が待たれる。

VNに関するこれまでの多くの研究は、胚の発育、特に中枢神経系と心器官形成におけるVNの重要性を示唆してきた。にもかかわらず、今回、VNを完全に欠損させたマウスで正常な発生と発育が観察されたことは意外であり、それ故、これらの重要な発生機能をECMのほかの接着蛋白質が部分的に重複・代償していることが示唆される。VNの研究とは対照的に、FNのノックアウトでは胚形成に重い障害を起し致死であることが報告されている¹⁵⁾。ECMを構成する多くの接着蛋白質の複雑な相互作用を詳細に分析するためには、今後、各蛋白質のノックアウトモデルおよびその組み合わせが必要である。

おわりに

以上を要約すると、①VN^{-/-}マウスは、発生・発育・生殖において野生型と差はなく、組織学的にも異常は見られなかった。②*in vitro*において、VNは血清中の主要な細胞伸展因子であることが確認された。③VN^{-/-}マウスでは、エンドトキシン投与による血中PAI-1濃度の上昇が正常マウスの50%程度しかなかった。これらの所見から、VNはマウスの発生過程に必須ではなく、ほかの因子がVNの役割を部分的に代償していることが示唆される。

謝辞: 御校閲を戴きました岩永貞昭先生(藤田保健衛生大学・客員教授)に深謝いたします。

文 献

- 1) Preissner KT: Structure and biological role of vitronectin: *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**: 275-310, 1991.
- 2) Tomasini BR, Mosher DF: Vitronectin: *Prog. Hemostasis Thromb.* **10**: 269-305, 1991.
- 3) Seiffert D, Curriden SA, Jenne D, Binder BR,

- Loskutoff DJ: Differential regulation of vitronectin in mice and humans *in vitro*: *J. Biol. Chem.* **271**: 5474-5480, 1996
- 4) Seiffert D, Crain K, Wagner NV, Loskutoff DJ: Vitronectin gene expression *in vivo*; Evidence for extrahepatic synthesis and acute phase regulation: *J. Biol. Chem.* **269**: 19836-19842, 1994.
- 5) Seiffert D, Iruela-Arispe ML, Sage EH, Loskutoff DJ: Distribution of vitronectin mRNA during murine development.: *Dev. Dyn.* **203**: 71-79, 1995.
- 6) Zheng X, Saunders TL, Camper SA, Samuelson LC, Ginsburg D: Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12426-12430, 1995.
- 7) Preissner KT, Boer HD, Pannekoek H, Groot PGD: Thrombin regulation by physiological inhibitors; The role of vitronectin: *Semin. Thromb. Hemostas.* **22**: 165-172, 1996.
- 8) Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA: Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulation the interaction between the urokinase receptor and vitronectin.: *J. Clin. Invest.* **100**: 58-67, 1997.
- 9) Stefansson S, Lawrence DA, Argraves WS: Plasminogen activator inhibitor-1 and vitonectin promote the cellular clearance of thrombin by low density lipoprotein receptor-related protein 1 and 2.: *J. Biol. Chem.* **271**: 8215-8220, 1996.
- 10) 中原洋, 神窪勇一: LRPの欠損マウス, 日本血栓止血学会誌 **9**: 205-214, 1998.
- 11) Chavakis T, Kanse SM, Yutzy B, Lijnen HR, Preissner KT: Vitronectin concentrates proteolytic activity on the cell surface and extracellular matrix by trapping soluble urokinase receptor-urokinase complexes.: *Blood* **91**: 2305-2312, 1998.
- 12) Underwood PA, Bennett FA: A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin.: *J. Cell. Sci.* **93**: 641-649, 1989.
- 13) 濱本高義, 岩永貞昭: PAI-1の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **8**: 406-409, 1997.

-
- 14) Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, Schleef RR, Ginsburg D: Brief report ; complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation : N. Engl. J. Med. **327** : 1729-1733, 1992.
- 15) George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO : Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. : Development **119** : 1079-1091, 1993.
-