

RGD 構造を持つ軟骨由来コラーゲン線維結合蛋白質の cDNA の単離, 一次構造決定およびその発現と機能の検討

橋 本 和 人

Cloning and Expression of cDNA Encoding Chondrocyte Collagen Associated Protein Containing an RGD Sequence

Kazuto Hashimoto

(平成 8 年 1 月 11 日 受付)

緒 言

軟骨細胞は成長板で増殖して基質を産生し, さらに肥大化して石灰化を誘導する。これらの細胞は種々の細胞変化を経ながら, 軟骨小柱構造の中で移動して最終分化段階に至る。この過程で軟骨細胞はコラーゲン, プロテオグリカンといった主要成分に加え, フィブロネクチンや cartilage-matrix protein などの細胞外基質を産生する¹⁻⁴⁾。これらの細胞外基質は相互作用して分子複合体を形成し, 単に支持組織として機能するだけでなく, インテグリンなどの膜蛋白質を介して基質分子複合体の持つ細胞外情報を細胞内に伝達し, 細胞の接着, 移動, 増殖および分化を制御する⁵⁾。このような細胞と細胞外基質との相互作用には多数の基質分子が関与しているが, 特にコラーゲン線維は細胞の足場として枢軸的な役割を果たしている。したがって, 実験的 II 型コラーゲン遺伝子変異マウスでは, 四肢の短小化, 胸郭の萎縮, 頭顔部の発育異常, 骨格の奇形などの重篤な軟骨形成不全症が起こる^{6,7)}。また, 実験的 X 型コラーゲン変異遺伝子導入マウスでは成長板で肥大層が減少して小柱構造は不規則化する⁸⁾。さらに, 軟骨細胞培養系でコラーゲンおよびフィブロネクチンは細胞の接着, 増殖および分化を促進する⁹⁾。軟骨細胞の増殖, 分化に及ぼすコラーゲンの作用機構は不明であるが, その作用の一部はコラーゲンに結合する蛋白質が仲介している可能性がある。そこで, 本

研究では, 軟骨においてコラーゲンと結合して細胞-細胞外基質間の相互作用に関与する蛋白質を探索した。まず, ブタ軟骨からコラーゲンを含む繊維様の不溶性物質を分離し, この繊維より 64 k-66 kDa の蛋白質 (RGD-CAP) を分離した。次に, RGD-CAP の cDNA のクローニングを行い, その一次構造を決定した。また, 大腸菌で組み替え RGD-CAP を発現してコラーゲン結合能を検討した。さらに, アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて, 軟骨細胞の接着, 伸展に対する RGD-CAP の機能を追求した。

材料および方法

1. 軟骨基質線維の分離

出生後の 7-10 日のブタの肋軟骨の成長板を分離して, メスで 0.5×0.5×0.5 mm に細断した。この組織片 (乾燥重量 2.8 g) を 0.1% トリプシン, EDTA を含む 30 ml の PBS (Ca²⁺, Mg²⁺-free) 中で 37°C で 1 時間インキュベートした。次いで, 組織片を 0.03% のコラゲナーゼ (type I, Sigma 社) を含む 30 ml の α -MEM 中で攪拌しながら 1.5 時間インキュベートした。その後, 10% FBS 含有 α -MEM 中で組織と細胞をピペットを用いて分散させナイロンメッシュ (Number 150, NBC 工業) に通した。細胞はメッシュを通過するが, 通過しない軟骨由来の線維を含む組織断片をメッシュ上で PBS で洗浄した後, PBS にてこれらを 50 ml 遠心管に回収した。さらに, 組織断片を 0.5% tritonX-100 を含む PBS に懸濁してガラスホモゲナイザー (内径 10 mm) にて 50 回上下させ, 細胞成分と非線維性の基質を線維より分断, 分離させた。この懸濁液を 1000 g で 10 分間遠心して, 上澄みを除いた。こ

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 赤川安正教授) 本論文の要旨は, 平成 7 年 8 月の第 13 回日本骨代謝学会および平成 7 年 9 月の第 63 回日本生化学会において発表した。

の操作を計5回繰り返すことにより、基質線維(乾燥重量5mg)を沈殿画分に分離した。

2. 軟骨基質線維結合蛋白質の分離

基質線維画分(乾燥重量3mg)をLaemmliの緩衝液¹⁰⁾ 200 μ lに懸濁して100°Cで5分間煮沸した。これをProSieve Gel System (FMC BioProducts社)のアガロースゲルにかけて、蛋白質を分離した。分子量50 k-70 kDaの蛋白質を含む画分のゲルを切り出して、ここから蛋白質を製造者のマニュアルに従って70°Cで加熱してアガロースから分離した。これで得られた蛋白質は、分子量1万の限外濾過膜(セントリカット, Millipore社)で濃縮した後、Laemmliの緩衝液に溶解した。次に、これを4-20%のポリアクリルアミド濃度勾配を作製したSDS-ポリアクリルアミドゲル(第一化学)内で電気泳動した(SDS-PAGE)。さらに、Towbinら¹¹⁾の方法でゲル中の蛋白質を電気的にPVDF膜に転写した後、クマシーブリリアントブルーで染色した。64 k および 66 kDaの蛋白質のバンドのアミノ酸配列は、自動アミノ酸シーケンサー(476A型機, Applied Biosystems社)にかけて分析した¹²⁾。

3. コラーゲン結合能

I, II, IIIあるいはIV型コラーゲン(5mg蛋白質/1ml gel)をアフィゲル10(1ml)(Bio-Rad社)とインキュベートして、コラーゲンを固定化したカラムを作製した。Tris-HCl, pH 7.0および蛋白質分解酵素阻害剤(10 mM EDTA, 10 mM N-ethylmaleimide, 10 μ M APMSF)を含む4 M グアニジン塩酸溶液で線維画分(乾燥重量1mg)を溶解して、これを分子量10万の限外濾過膜(セントリカット, Millipore社)で濾過してII型コラーゲンを除去した。その濾液を分子量1万の限外濾過膜(セントリカット, Millipore社)で濃縮して、さらに溶液を10 mM Tris-HCl, pH 7.4に置き換えた。0.2 mlのコラーゲンゲルカラムに、この溶液(0.5 ml)を展開した(fraction 1)。次いで、0.5 mlの10 mM Tris-HClで2回カラムを洗浄した(fraction 2, 3)。さらに、0.5 mlの1 M NaCl含有10 mM Tris-HClで3回カラムを洗浄した(fraction 4, 5, 6)。続いて、0.2 mlの6 M 尿素含有10 mM Tris-HClにて4回カラムを洗浄した(fraction 7, 8, 9, 10)。なお、さらに大量の6 M 尿素含有緩衝液でカラムを洗浄しても蛋白質はほとんど溶出しなかった。各画分の80 μ lを分子量1万の限外濾過膜(セントリカット, Millipore社)で濃縮して溶液を60 μ lのLaemmliの緩衝液に置換した。その内、15 μ lを4-20%のポリアクリル

アミド濃度勾配中でSDS-PAGEにかけて蛋白質を分離しSilver stain(第一化学)にて染色した。

別の実験で、肋軟骨成長板を細断して20倍量の4 M グアニジン溶液中で4°Cで48時間インキュベートして基質高分子を抽出した。次に、cesium chloride溶液中(比重1.47 g/ml)で超遠心して高分子プロテオグリカンを除いた。すなわち、軟骨粗抽出液としてD2-D4画分¹³⁾を実験に用いた。0.2 mlのコラーゲンゲルカラムに、軟骨粗抽出液(0.1 mgの蛋白質を含む0.5 mlの10 mM Tris-HCl緩衝液, pH 7.4)あるいは牛血清アルブミン(0.1 mgの蛋白質を含む0.5 mlの10 mM Tris-HCl緩衝液, pH 7.4)を展開した。次いで、0.5 mlの10 mM Tris-HClで2回カラムを洗浄した(fraction 11, 14)。さらに、0.5 mlの1 M NaCl含有10 mM Tris-HClで3回カラムを洗浄した(fraction 12, 15)。続いて、0.2 mlの6 M 尿素含有10 mM Tris-HClにて4回カラムを洗浄した(fraction 13, 16)。なお、さらに大量の6 M 尿素含有緩衝液でカラムを洗浄しても蛋白質はほとんど溶出しなかった。

各画分をセントリカット(分子量1万)で濃縮して液量を合わせ、溶液を30 μ lのLaemmliの緩衝液に置換した。その内、2 μ lをSDS-PAGEにかけて蛋白質を分離してゲル中の蛋白質をSilver stain(第一化学)にて染色した。

4. 軟骨細胞の培養

生後10日のブタ肋軟骨を分離し、メスで細断(0.5×0.5×0.5 mm)した。これをShimomuraら¹⁴⁾, Katoら¹⁵⁾の方法に準じて0.1% EDTA, 0.1%トリプシン含有PBS中にて、37°Cで1時間インキュベートした。次に0.05%のコラーゲナーゼ(Worthington Biochemical社)含有ダルベッコ変法イーグル培地(日本製薬)中にて、37°Cで3時間、インキュベートした。次いで、ナイロンメッシュ(120 μ m, NBC工業)を通過した細胞を回収した。単離した軟骨細胞は、コラーゲンコートした培養皿(Corning社)に1 cm²あたり2.5×10⁴個で播種し、10%胎児ウシ血清(FBS:三菱化成社), 60 μ g/mlカナマイシン(明治製薬), 50 μ g/mlアスコルビン酸(和光純薬), 250 μ g/mlアンホテリシンB(ICN Biochemical社), 32単位/mlペニシリンを含むアルファ変法イーグル培地(α -MEM)(三光純薬)にて、37°C, 5% CO₂気相下で培養した。なお、プラスチック培養皿は12 μ g/mlのI型コラーゲン(高研)を含有する0.1 M NaHCO₃溶液と37°Cで2時間インキュベートすることによりコラーゲンでコートした。また、アスコルビン酸(50 μ g/ml)は培地交換時に毎回添加した。

5. ブタ組織及び各種培養細胞からの total RNA および poly (A)+RNA の分離

total RNA の分離は Smale ら¹⁶⁾ の報告に準じて以下の方法で行った。まず、培養細胞あるいは組織を 4 M guanidine thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.5% N-lauroyl sarcosine 溶液中でポリトロン型ホモゲナイザーにて破碎して得られる懸濁液を 3000 g で10分間遠心し、上清を回収した。次に、上清を比重1.57の cesium trifluoroacetate, 1 mM EDTA を含む溶液上に重層し 200,000 g にて24時間遠心した。沈殿物を 150 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA にて溶解し、100 μ l の 6.3 M ammonium acetate および 625 μ l の ethanol を加えることで RNA を沈殿させた。この RNA を 80% ethanol で洗い、total RNA を得た。得られた total RNA よりオリゴ dT セルロースカラム (宝酒造) を用いて poly (A) + RNA を精製した。poly (A) + RNA の精製は Aviv ら¹⁷⁾ の方法に準じて行った。すなわち、緩衝液 A (500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% SDS) に溶解した total RNA を 70°C で10分間処理し、RNA の高次構造を解除した後、緩衝液 A にて平衡化したオリゴ dT セルロースカラムにかけ、0.1% diethylpyrocarbonate にて処理した滅菌蒸留水を用いて溶出し、poly (A) + RNA を得た。

6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) による cDNA 断片の増幅とその塩基配列の決定

ブタ軟骨 total RNA より Kawasaki らの方法¹⁸⁾ に従って RT-PCR-を行い、ブタ RGD-CAP の部分的 cDNA のクローニングを行った。プライマーは 64 kDa コラーゲン結合蛋白質のアミノ酸配列と β -igh3 の塩基配列より得られた情報をもとに設計した (上流特異プライマー: 5'-GCTGTGAGAAGGTTATTGGCA-3', および下流特異プライマー: 5'-GGTACATAGAGGTGAGGGTCAT-3')。RT-PCR には GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer Cetus 社) を使用して行い、DNA の増幅には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus 社) を用いた。まず、total RNA 0.5 μ g から下流特異的プライマーにより、RNA の逆転写反応を行った。次に、上流特異的プライマーを加えて増幅反応を行い、目的とする RGD-CAP cDNA 断片を得た。増幅反応プログラムは、変性反応を 95°C で1分間、アニーリングおよび伸長反応を 60°C で1分間に設定し、23回増幅を行った。得られた RGD-CAP cDNA は、pBluescript SK (-) ベクター (Stratagene 社) の Sma I サイトにサブクローニングし、ジデオキシ法に

より塩基配列を決定した¹⁹⁾。塩基配列の決定は、Sequenase Ver. 2.0 キット (USB 社) を用いた。

7. ノーザンプロット及び PCR-サザンプロット

ノーザンプロットは、RNA 変性剤としてホルムアルデヒドを用い、クローニングした。RGD-CAP cDNA 断片をプローブとして以下の方法で行った。ホルムアルデヒドにて変性した培養軟骨細胞 total RNA 10 μ g を、0.6 M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲル上で、80 V, 90分間電気泳動した。ゲル中の RNA を 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate) を用い、ナイロンメンブレン (Nytran S & S 社) に転写した。また、PCR-サザンプロットは PCR により得られた DNA を 1% アガロースゲル上で、80 V, 60分間電気泳動した。ゲル中の DNA を 1.5 M NaCl を含む 0.5 N NaOH 溶液中で1時間変性した後 1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, で30分間中和し、20 X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate) を用い、ナイロンメンブレン (Nytran S & S 社) に転写した。このナイロンメンブレンを十分に乾燥させた後、80°C で1時間処置することで、RNA とナイロンメンブレンの架橋固定を行った。非特異的反応を阻害するために、固定されたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液 (6×SSC, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml sonicated DNA) で 68°C, 90分間反応させた後、変性 [³²P] 標識 RGD-CAP プローブ 1 μ g (10⁸ cpm/ μ g) を含んだハイブリダイゼーション緩衝液中で 68°C, 16時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後のナイロンメンブレンをノーザンプロットでは 2×SSC, 0.5% SDS 溶液に浸し3回洗浄し、サザンプロットでは 0.2×SSC, 0.5% SDS 溶液に浸し3回洗浄し、室温で風乾した後、オートラジオグラフィを行った。なお、対照としてノーザンプロットでは変性 [³²P] 標識 G3PDH プローブ 1 μ g (10⁸ cpm/ μ g) を使用し、サザンプロットでは G3PDH の PCR-サザンプロットを同時に行った。プローブの標識にはオリゴラベリングキット (Pharmacia Biotec 社) を用いた。また、放射活性の測定には BAS2000 Image analyzer (Fujix 社) を使用した。

8. ヒトの各種の細胞からの RNA の抽出と RGD-CAP mRNA レベルの分析

ヒト軟骨細胞は自然流産した胎生 6 カ月の胎児の膝関節の骨端軟骨から分離し、メスで細断した。これを 8 mg/ml のプロナーゼ E および 5% 胎児ウシ血清を含有した α -MEM にて、37°C で30分間インキュベートした後、1 mg/ml のコラーゲナーゼ含有 α -MEM 中に

て、37°Cで90分間インキュベートした。単離した軟骨細胞は、I型コラーゲンでコートした培養皿に1 cm²あたり3×10⁵個で播種し、10%胎児ウシ血清、60 μg/ml カナマイシン、50 μg/ml アスコルビン酸、250 μg/ml アンホテリシンB、32単位/ml ペニシリンを含むα-MEMにて、37°C、5% CO₂気相下で培養した。尚、アスコルビン酸(50 μg/ml)は培地交換時に毎回添加した。骨肉腫由来細胞株(HOS, MG63)、肺由来線維芽細胞株(MRC9)は5%胎児ウシ血清を含有したα-MEMにて培養した。また、広島大学歯学部岡本哲治博士より供与されたヒトの各種培養細胞²⁰⁻²²⁾、口腔粘膜由来上皮細胞(HK1)、歯肉由来細胞(GF)、多形性線腫細胞(PA)、顎下腺由来細胞(SMG)、悪性黒色種細胞(MM)、神経外胚葉由来細胞株(RS-1, RS-2)、唾液腺由来腺癌細胞株(HSY, HSG)、扁平上皮癌細胞株(KA, NAK, NI)はRPI1640培地(極東製薬)およびダルベッコ変法培地(極東製薬)を1:1の割合で配合した後(RD培地)、1-5%胎児ウシ血清を含有した培地にて培養した。さらに、数人の臍帯から分離したヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)はウシ脳抽出液を含有したRD培地にて、また、広島大学歯学部柴秀樹博士より供与された歯髓由来細胞²³⁾は5%胎児ウシ血清を含有したα-MEMにてそれぞれ培養した。これらの細胞をコンフルエントに達するまで培養した後、total RNAを調製しRT-PCR-サザンプロットにてRGD-CAP mRNAレベルについて解析を行い、放射活性を測定し比較検討した。放射能の測定にはBAS2000 Image analyzer (Fujix社)を使用した。

9. RGD-CAP cDNA のクローニング

ブタ成長板軟骨より抽出したpoly(A)+RNAを用いcDNAライブラリーの作成を行った。poly(A)+RNA 5 μgよりTimeSaver cDNA合成キット(Pharmacia Biotec.社)を用いcDNAを合成した後、EcoRI-NotIリンカー(Pharmacia Biotec.社)ライゲーションを行い、Sephacryl S400 spun column(Pharmacia Biotec.社)にて400 bp以上のcDNA画分を回収した。得られたcDNAをEcoRI消化したλZAP(Stratagene社)1 μgにライゲーションさせた。さらにGigapack II Gold(Stratagene社)を用いてin vitroパッケージングを行った。なお、宿主大腸菌としてXL1-blue(Stratagene社)を用いブランクハイブリダイゼーションを行った。RT-PCRより得られたPCR産物をサブクローニングし、精製したインサートをプローブ作製に用いた。プローブの標識にはオリゴラベリングキット(Pharmacia Biotec.社)を使用し、25 ng

のcDNAインサートを25 mCi[α-³²P]dCTPを用いて標識し、cDNAライブラリーをスクリーニングした。

10. cDNA の一次構造の決定

得られたRGD-CAP cDNAはin vivo excision法によりpBluescript SK(-)に変換した後、cDNAを適切な制限酵素にて消化し断片化し、各断片をそれぞれpBluescript SK(-)に組み込みなおし、ジデオキシ法¹⁹⁾により塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Sequenase Ver. 2.0(USB社)を用いた。

11. 大腸菌による組み換え RGD-CAP の発現およびその精製

pET28a発現ベクター(Novagen社)にcDNA insertをライゲーションして構築したベクターを、インサートの方向及び配列を確認した後、HMS174(DE3)大腸菌(Novagen社)に形質転換し、30 μg/mlのkanamycinを含むLB培養液にて37°Cで培養し、OD₆₀₀が0.6に達したところでIPTGを加え、さらに3時間の培養を行った(図1)。この後、遠心操作にて菌体を回収し、50 mlの50 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1 mM EDTA、0.3 mg/ml Lysozyme溶液にて懸濁し、水中で20分間放置した。さらに、100 mlの0.2% sodium deoxycholateを加え水中で20分間放置した後、超音波処理を行い、遠心操作にて沈殿物を回収した。この沈殿物をさらに、50 mlの50 mM Tris-HCl(pH

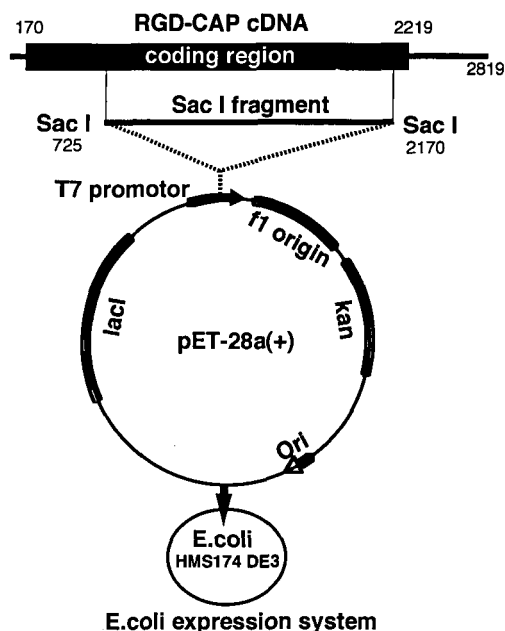


図1 発現ベクターの構築と大腸菌発現系の模式図

7.5), 10 mM EDTA, TritonX, 0.5%, 0.1 M NaCl 溶液に懸濁し, 遠心操作にて沈殿物を回収した。沈殿物は 7 M 尿素で可溶化した後, 10 mM Tris- HCl (pH 7.5) 緩衝液で透析し, 10 mM Tris- HCl (pH 7.5) 緩衝液にて平衡化した 24 ml のゲル濾過カラム (Superose 6, 10×300 mm, Pharmacia Biotec. 社) にかき, 流速 0.5 ml/min で 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液で溶出した。さらに, 組み替え体を含む画分を, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液にて平衡化した 1 ml のイオン交換カラム (Mono Q, 5×50 mm, Pharmacia Biotec. 社) にかき, 20 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液にて洗浄後, 流速 0.5 ml/min で 2 M NaCl を含有する 10 mM Tris- HCl (pH 7.5) 緩衝液にて溶出した。

12. RGD-CAP アンチセンスオリゴマーの軟骨細胞に及ぼす影響

アンチセンスオリゴマー (asl) 5'-TGCAGTTGGT GAAGTA-3', およびセンスオリゴマー (sl) 5'-TACTTCACCAACTGCA-3' の作製はサワデーテクノロジー社に依頼した (図 2)。培養軟骨細胞を 96 well 培養皿に 3000個/well の細胞密度で蒔き, 24時間後に最終濃度 0~10 μ M のアンチセンスオリゴマーを添加した。コントロールとしてセンスオリゴマーを添加した。細胞形態はオリゴマーを添加した後 3 日と 10 日目に位相差顕微鏡にて観察した。

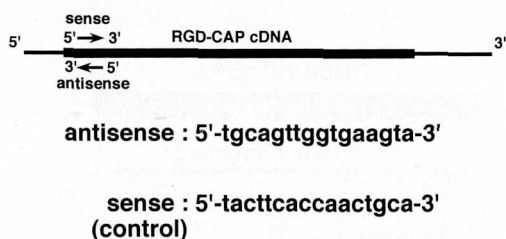


図 2 アンチセンスおよびセンスオリゴマーの塩基配列 RGD-CAP cDNA との位置関係を示す。

結 果

1. 軟骨基質線維の分離

酵素処置した軟骨から, detergent 存在下でホモゲナイズすることにより線維を分離した (図 3A)。この線維を Laemmli の緩衝液で溶解して SDS-PAGE に展開すると, 図 3B のように分子量 64 k-66 kDa の蛋白質を含めて数種類の CAP が分離された。この線維は PBS および Tris-HCl 緩衝液には不溶性であるが, pure bacterial collagenase (Sigma type II, 1 unit/ml) と 15 時間インキュベートすることにより溶解した。ま

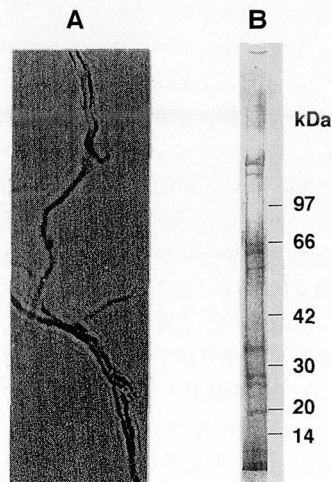


図 3 軟骨基質線維の位相差顕微鏡像 (A) およびその SDS-PAGE での分離パターン (銀染色) (B)

た, pure collagenase とのインキュベーション後, この溶液中の蛋白質を SDS-PAGE で分析すると, 分子量 120 kDa 付近の蛋白質バンド (II 型コラーゲン) は消失したが, 他の蛋白質は変化しなかった (データ示さず)。この結果は, 本研究で分離した基質線維は不溶性のコラーゲンに数種類の可溶性蛋白質 (CAP: collagen-associated protein) が接着したものであることを示唆している。

2. CAPs とコラーゲンとの結合

軟骨基質線維に結合している蛋白質のうち分子量 25 kDa 以下の蛋白質はコラーゲンに結合せず Tris-HCl 緩衝液画分に回収された。一方, 64 kDa と 66 kDa の CAP は, 一部非結合画分に回収したが, 大部分は II 型コラーゲンと強固に結合して, 1 M NaCl でも溶出せず, 6 M 尿素によって溶出した。一方, BSA および粗軟骨抽出画分の蛋白質は, 全て Tris-HCl 緩衝液画分に溶出した (図 4)。同様な結果は I, III, IV 型コラーゲンカラムを用いて得られた (データ示さず)。

3. 64 k-66 kDa CAP のアミノ酸配列

軟骨基質線維に存在する 64 kDa および 66 kDa の CAP をアガロースゲル電気泳動と SDS-PAGE により分離した後, その N-端近傍のアミノ酸配列を決定した。64 kDa と 66 kDa の CAP は同じ N-末端アミノ酸配列を示した (表 1)。このアミノ酸配列は, ヒトの β -igh3²⁴ がコードする蛋白質の配列と一致した。 β -igh3 は human lung adenocarcinoma cell line が TGF- β

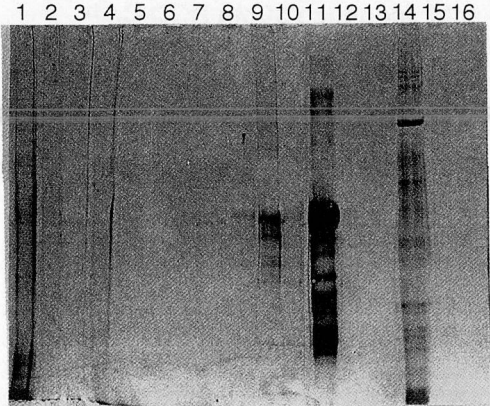


図4 コラーゲンアフィニティーカラムクロマトグラフィーでの各溶出画分の SDS-PAGE 分析 (銀染色)

レーン 1, 2, 3, 11, 14: 0 M NaCl
 レーン 4, 5, 6, 12, 15: 1 M NaCl
 レーン 7, 8, 9, 10, 13, 16: 6 M 尿素
 レーン 1-10は軟骨基質線維
 レーン 11-13はウシ血清アルブミン
 レーン 14-16は粗軟骨抽出画分

表1 64, 66 kDa CAP および β -*igh3* の N 末端アミノ酸配列の比較

66 kDa CAP:	G P A K S P Y Q L V L Q H X R L X G
64 kDa CAP:	G P A K S P Y Q L V L Q H S R L R G

β - <i>igh3</i>	: G P A K S P Y Q L V L Q H S R L R G

*印は一致したアミノ酸を示す

に応答して産生する mRNA に対応する cDNA であり、蛋白質としての実在は報告されていなかった。 β -*igh3* にはシグナル配列に相当する部分が存在し、これを切断した成熟蛋白質の分子量は 64 k-66 kDa CAP とほぼ一致する。また、64 k-66 kDa の CAP の N-末端アミノ酸配列は β -*igh3* 蛋白質のシグナル配列様領域を除いた後の N-末端アミノ酸配列と一致した。

4. 64 k-66 kDa の CAP の cDNA の一次構造の決定およびその構造解析

cDNA ライブラリーよりスクリーニングによって 64 k-66 kDa の CAP cDNA のクローンを数種類得た (図 5)。これらのクローンの制限酵素地図および塩基配列の解析結果から、つなぎ合わせた 64 k-66 kDa の CAP の cDNA は 2819 bp の長さを持っていた。ノーザンブロット解析から 64 k-66 kDa の CAP

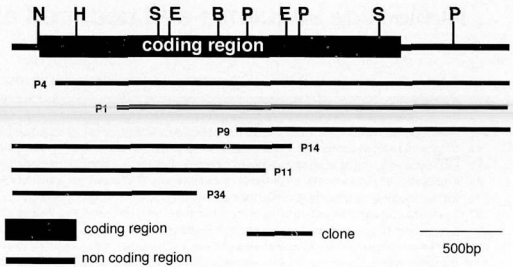


図5 単離された主な cDNA とその制限酵素地図

P: Pst I, N: NcoI, S: Sac I, H: Hind III, B: Bam HI, E: Eco RI

mRNA のサイズは 2.8 kb 前後であったことから、これは RGD-CAP mRNA の大部分をカバーすると考えられる。open reading frame は 171 番目のヌクレオチドから始まり、683 のアミノ酸に翻訳された (図 6)。翻訳されたアミノ酸配列は、分泌蛋白質に典型的なシグナル配列と 4 つの繰り返し構造を持ち、C 端近傍にはインテグリン認識サイトとして知られる RGD 配列²⁵⁾を有していたことから、改めて 64 k-66 kDa の CAP を RGD-CAP と命名した。また、RGD-CAP の 4 番目の繰り返し構造内には N-glycosylation site が存在した。シグナル配列を除いた 660 アミノ酸配列から求めた理論分子量は 72 kDa となり、これは 64 k-66 kDa CAP の分子量とほぼ一致しており、またシグナル配列を除いた N 末端アミノ酸配列は、精製した 64 k-66 kDa の CAP の N 末端アミノ酸配列と 100% 一致した。さらに、アミノ酸一次配列に基づいて EMBL data base をコンピューター検索した結果、RGD-CAP は骨芽細胞で特異的に発現する遺伝子として発見された osteoblast specific factor 2 (OSF-2)²⁶⁾ およびショウジョウバエの神経軸策の膜蛋白質であるファシクリン I²⁷⁾ と類似していることが判明した。これらの蛋白質と RGD-CAP の相同性はアミノ酸レベルで β -*igh3* とは 92%、OSF-2 とは 45%、ファシクリン I とは 22% であり、これらの分子はいずれも 4 つの繰り返し構造を有していた (図 7)。この繰り返し構造中には、昆虫の細胞外基質であるファシクリン I から哺乳類の細胞外基質である OSF2, RGD-CAP まで非常に保存の高い領域 H1, H2 が存在していた (図 8)。

5. RGD-CAP mRNA の発現

ノーザンブロットおよび RT-PCR-サザンブロット解析の結果、軟骨細胞培養系で TGF- β は 12 時間後より RGD-CAP mRNA レベルを上昇させ、この作用は 24 時間後で最大となり、以後減少した。バイオイメージアナライザーにより測定した放射能に基づく、

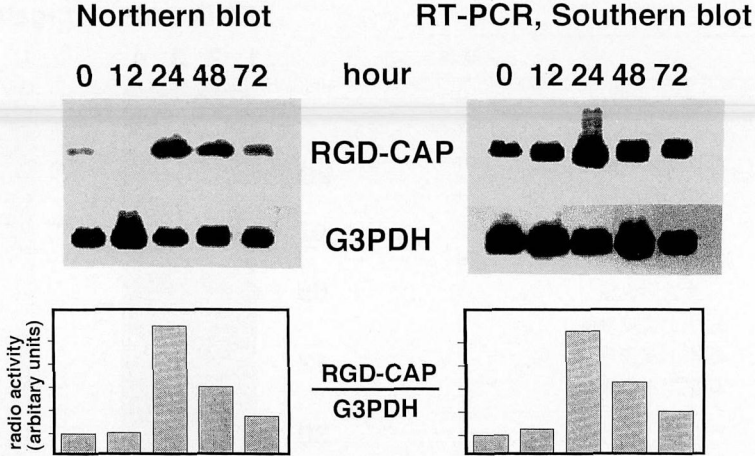


図9 軟骨細胞培養系における RGD-CAPmRNA の発現
TGF- β (3 ng/ml) 添加12, 24, 48, 72時間後の RGD-CAPmRNA レベルについて、ノーザンブロット法および RT-PCR サザンブロット法によるオートラジオグラフィの結果を示す。
グラフは、各バンドの放射活性を測定し、対照の G3PDH の放射活性により補正した値を示す。

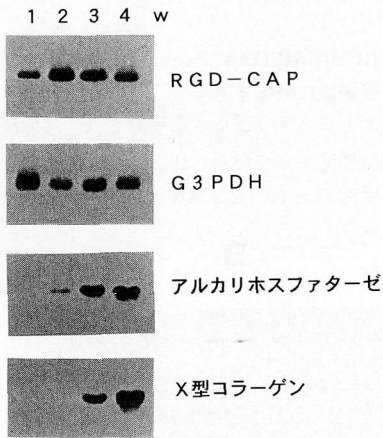


図10 軟骨細胞培養系での細胞分化に伴う RGD-CAPmRNA レベルの変動
培養1, 2, 3, 4週における, RGD-CAP, G3PDH mRNA レベル (RT-PCR サザンブロット法) およびアルカリホスファターゼ, X型コラーゲン mRNA レベル (ノーザンブロット法) のオートラジオグラフィの結果を示す。

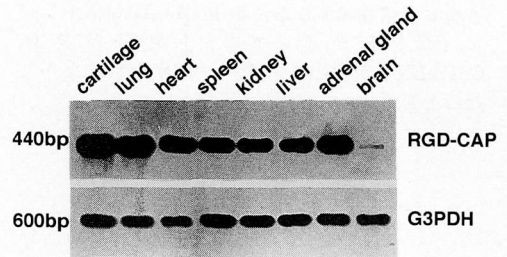


図11 各臓器における RGD-CAPmRNA レベル (RT-PCR サザンブロット法) のオートラジオグラフィの結果を示す。

6. コラーゲンに対するリコンビナント RGD-CAP (rRGD-CAP) の親和性

RGD-CAP がコラーゲン線維に直接結合している事を証明するためには、他の軟骨組織由来の蛋白質が存在しない状態で rRGD-CAP がコラーゲンと結合する事を示す必要がある。そこで大腸菌発現系で rRGD-CAP を発現させ、精製した rRGD-CAP をコラーゲンカラムに展開した。rRGD-CAP は Tris-HCl 緩衝液画分に一部回収されたものの (レーン 1), 1.5 M の NaCl では溶出されず (レーン 2), 7 M の尿素にて溶出された (レーン 3) (図12)。対照として同じ発現ベクターにて発現させたベータガラクトシダーゼは Tris-HCl 緩衝液画分に回収されて (レーン 4), 1.5 M の NaCl, 7 M 尿素画分には存在しなかった (レーン 5, 6)。

現を比較すると、軟骨細胞、多形成腺腫由来細胞 (PA)、歯髓由来細胞 (HP) には RGD-CAP mRNA が存在したのに対して、2種類の神経外胚葉由来細胞 (RS-1, RS-2)、血管内皮細胞 (HUVEC)、顎下腺由来細胞 (SMG) では RGD-CAP mRNA が検出できなかった (表2)。

表 2

細胞		発現
	軟骨細胞	+
	上皮細胞	+
	歯肉線維芽細胞	+
PA	多形成腺腫	+
HP	歯髓細胞	+
MRC9	肺由来線維芽細胞	+
MM	悪性黒色腫	+
KA	扁平上皮癌細胞	+
NA	扁平上皮癌細胞	+
NIS	扁平上皮癌細胞	+
HOS	骨芽細胞	+
MG63	骨芽細胞	+
RS-1	神経外胚葉由来細胞	-
RS-2	神経外胚葉由来細胞	-
HSY	唾液腺癌細胞	-
HSG	唾液腺癌細胞	-
SMG	唾液腺細胞	-
HUVEC	血管内皮細胞	-

各種ヒト培養細胞における RGD-CAPmRNA レベル (RT-PCR サザンプロット法) + は RGD-CAPmRNA が検出された, - は検出されなかったことを示す。

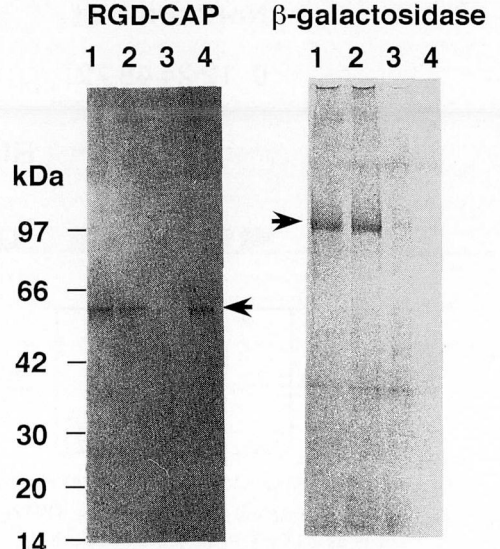


図12 コラーゲンファンクティークロマトグラフィーでの, 組み替え体の各溶出画分の SDS-PAGE 分析 (銀染色)

7. RGD-CAP DNA アンチセンスオリゴマーの軟骨細胞に及ぼす影響

アンチセンスオリゴマー添加群では, 添加後3日目から細胞形態が丸くなり, 10日目でも細胞は球状を呈した。対照の as1 のセンスオリゴマー (s1) 添加群で

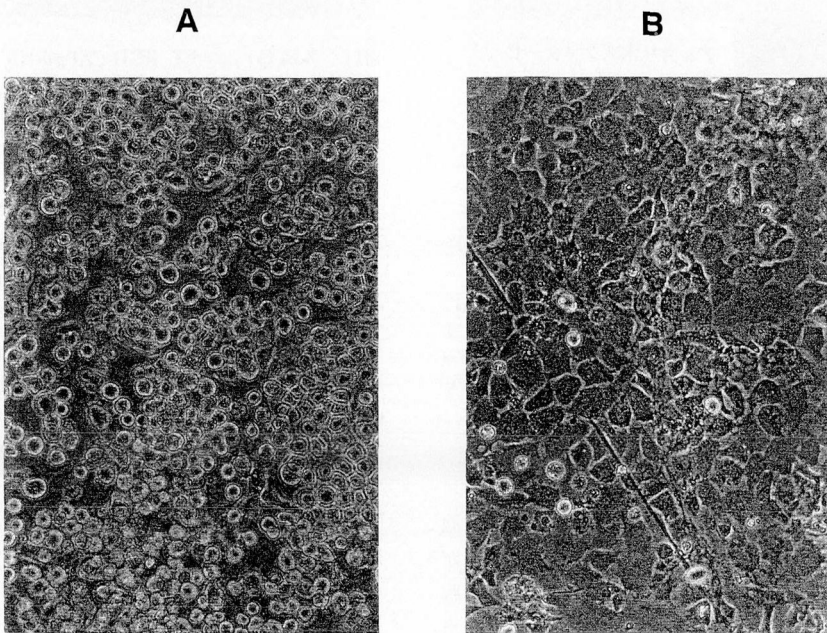


図13 アンチセンス (A) およびセンスオリゴマー (B) 添加群の位相差顕微鏡像

は、非添加の培養軟骨細胞と同様に、培養皿に接着、伸展し軟骨細胞に特有な多角形の形態を示した (図 13)。なおアンチセンスオリゴマーを 1, 3, 5, 10 μ M 添加したところ、5 および 10 μ M で著明な形態変化が観察された。

考 察

コラーゲン線維に結合してかつ軟骨細胞機能を制御する蛋白質を探求するために、まずブタ軟骨から繊維様の不溶性物質を分離した。そして 64 k-66 kDa のコラーゲン結合蛋白質 RGD-CAP を分離した。その N 末端アミノ酸配列および cDNA の一次構造から、ブタ RGD-CAP はヒト肺由来腺癌で発見された遺伝子 β -igh3 と相同性が高いことが判明した。 β -igh3 の cDNA は TGF- β に依存して増加する mRNA をスクリーニングする事によりクローニングされ、その組み替え体は、ある種の癌細胞の増殖を抑制し、正常上皮細胞の接着を促進することが報告されている^{30,31}。また、骨芽細胞に特異的に発現する OSF-2 およびバタの神経軸索の膜蛋白質であるファシクリン I とも RGD-CAP は相同性を示した。ファシクリン I は細胞間ホモフィリックな接着分子ではないかと考えられているが³²、これらの蛋白質の機能は未だ不明である。RGD-CAP アミノ酸配列を解析した結果、分子内に 4 つの繰り返し構造があり、C 端近傍にはインテグリン認識サイトとして知られる RGD 配列²⁵を有することが判明した。 β -igh3 以外のホモログである OSF-2、ファシクリン I は RGD 配列は有していないものの、4 つの繰り返し構造を有していた。この繰り返し構造内には昆虫の膜蛋白質であるファシクリン I から哺乳類の細胞外基質である OSF2、 β -igh3、RGD-CAP まで高度に保存された領域 H1、H2 が存在した。H1、H2 領域は 80 から 100 アミノ酸の距離を保っており、Chou Fasman、Chou Fasman Rose、Robinson の各方法から求めた H1、H2 の 2 次構造は、疎水性のアミノ酸が構成する β シートである。これらの結果は H1、H2 の領域は種や分子を超えた共通の機能に関与することを示唆している。

RGD-CAP はコラーゲンカラムから 1.5 M NaCl で溶出せず、7 M 尿素で初めて溶出された。大多数の軟骨基質分子はコラーゲンカラムから 0-0.2 M NaCl で溶出されることより³³、RGD-CAP のコラーゲンへの結合能は非常に強力であることが示唆された。また、RGD-CAP はコラーゲンと非イオン性の様式で直接結合していると考えられる。最近、フィブロネクチン、エラスチンなどのコラーゲン結合蛋白質はコラーゲンに結合することで、コラーゲンの分解を抑制する

ことが報告されている³⁴。したがって、RGD-CAP もコラーゲンの分解制御に関わる可能性がある。

一方、コラーゲンアフィニティーカラムの非結合画分に、微量ではあるが RGD-CAP が存在した。この知見は、RGD-CAP はコラーゲンと結合するおよび結合しない両者の二次構造をとりうることを示唆している、あるいは軟骨からの RGD-CAP の精製および rRGD-CAP の合成過程で一部の RGD-CAP が変性したかもしれない。

軟骨を含め多くの組織で RGD-CAP mRNA が発現していたが、脳での発現は非常に低く、神経外胚葉由来細胞でも RGD-CAP mRNA は検出されなかった。一方、 β -igh3 は眼球において角膜上皮に特異的に発現しており³⁵、ファシクリン I は昆虫の神経軸索に特異的に、また、OSF2 は骨芽細胞に特異的に発現していることから、これらの分子の組織分布およびその役割が異なっていることが判明した。また、本研究の結果は同一臓器内でも細胞種によって RGD-CAP mRNA の発現レベルが異なることを示している。血管内皮細胞には RGD-CAP mRNA は検出されなかったが、歯肉由来細胞、歯髓由来細胞、骨肉腫由来細胞は RGD-CAP mRNA を発現した。したがって、RGD-CAP は口腔組織の発生および疾患とも関係していると推察される。

TGF- β は種々の細胞系でコラーゲン、フィブロネクチン、オステオネクチンなどの細胞外基質の合成を促進する^{36,37}。さらに、TGF- β はインテグリンなどの基質分子の受容体の発現にも影響する³⁸。軟骨においても TGF- β はオートクラインもしくはパラクライン機構で細胞の増殖、分化を制御している³⁹。また、in vivo において成長板や仮骨および関節炎の滑液に TGF- β が高レベルに存在することが報告されている⁴⁰。軟骨細胞培養系において、TGF- β は RGD-CAP の mRNA レベルを上昇させた。しかも、本研究で用いた TGF- β の濃度 (3 ng/ml) は組織改変が亢進している関節炎の滑液中の活性型 TGF- β の濃度 (4-10 ng/ml) に相当している⁴⁰。これらの知見は、軟骨の発生および修復に RGD-CAP が関与していることを示唆している。

アンチセンスオリゴマーは、特定蛋白質の発現を特異的に抑制する。その作用機構は不明だが、転写段階、mRNA 前駆体のプロセッシング段階、mRNA の核膜透過段階、翻訳段階での 5' 末端領域、リボソーム結合領域、開始コドン近傍領域への RNA への結合を介して蛋白質合成を阻害すると考えられている。本研究で as1 アンチセンスオリゴマーは、軟骨細胞の形態を球形に変化させた。一方、対照の as1 のセ

ンスオリゴマー s1 添加あるいは無添加群では細胞は培養皿に接着、伸展し多角形状となった。これらの形態変化は RGD-CAP が軟骨の細胞伸展に関与していることを示唆している。

RGD-CAP は C 末側にインテグリン認識サイトとして知られる RGD 配列を有していた。この RGD 配列はヒトの β -igh3 にも存在していた。RGD 配列を有しかつ、コラーゲンと結合する細胞外基質としてはインテグリンのリガンドとして知られているフィブロネクチン⁴¹⁾、ラミニン⁴²⁾、ピトロネクチン⁴³⁾、ナイドゲン⁴⁴⁾が知られている。しかし、RGD-CAP の RGD 配列がインテグリンとの結合に関与しているのかは不明である。RGD 配列をもつ蛋白質は数多く報告があるが、これらがすべてインテグリンと結合するわけではない。Yamada らは RGD 配列が蛋白質の表面に露出しないとインテグリンに認識されないと報告している⁴⁵⁾。事実、コラーゲンは RGD 配列を持っているにも関わらず、この部分ではインテグリンと結合せず、コラーゲンの DGEA 配列でインテグリン $\alpha 2\beta 1$ に結合する⁴⁶⁾。一方、Montgomery らは、悪性黒色種細胞の培養系において、添加したコラーゲンが細胞由来のコラーゲナーゼにより部分分解されると、RGD 配列が露出してこれを介してインテグリン $\alpha v\beta 5$ と結合するようになることを報告している⁴⁷⁾。熱処理やコラーゲナーゼにより変性したコラーゲンでも同じ様式でインテグリンとの結合様式が変化することが証明されている⁴⁷⁾。すなわち、RGD 配列とインテグリンとの結合はリガンド蛋白質の構造に大きく依存している。したがって、RGD-CAP の RGD 配列の役割についてはさらに検討する必要がある。

結 論

1 ブタ軟骨のコラーゲン含有線維画分より分離した RGD-CAP の一次構造には、4つの繰り返し構造があり、さらにその繰り返し構造内には特に保存性の高い領域が2つ存在した。また、RGD-CAP は C 端近傍領域に RGD 配列を有していた。

2 RGD-CAP mRNA は軟骨を含む多くの組織で発現していたが、脳では低レベルであり、血管内皮細胞と神経細胞株ではほとんど検出されなかった。

3 軟骨細胞において TGF- β は RGD-CAP mRNA レベルを上昇させた。

4 精製した RGD-CAP および rRGD-CAP とともに非イオン性の様式で I-IV 型コラーゲンと強固に結合した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに前本学歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、終始御懇切なる御指導ならびに御助言を頂いた本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に衷心より感謝の意を表します。さらに、本論文作成上、御助言ならびに御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座土肥敏博教授に深謝致します。

本研究遂行上および本論文作成上終始御懇切なる御指導、御助言を頂いた本学口腔生化学講座能城光秀助教授、河本健博士に深謝致します。また、本論文作成上、御懇切なる御指導、御助言を頂いた本学口腔細菌学講座菅井基行助教授、本学予防歯科学講座島津篤博士、本学歯科薬理学講座今井康夫博士に深謝致します。さらに、本研究に際し御懇切なる御指導、御助言を頂いた本学歯学部口腔外科学第一講座岡本哲治博士に深謝致します。

最後に、本研究を進めるに際し多大なる御支援を頂いた本学歯科補綴学第一講座ならびに口腔生化学講座の関係各位に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Reese, C.A. and Mayne, R.: Minor collagens of chicken hyaline cartilage. *Biochemistry* 20, 5443-5448, 1981.
- 2) Vaughan, L., Winterhalter, K.H. and Bruckner, P.: Proteoglycan Lt from chicken embryo sternum identified as type IX collagen. *J. Biol. Chem.* 260, 4758-4763, 1985.
- 3) Inoue, H., Hiasa, K., Samma, Y., Nakamura, O., Sakuda, M., Iwamoto, M., Suzuki, F., and Kato, Y.: Stimulation of proteoglycan and DNA syntheses in chondrocytes by centrifugation. *J. Dent. Res.* 69, 1560-1563, 1990.
- 4) Doege, K.J., Sasaki, M., Kimura, T., and Yamada, Y.: Complete cording sequence and deduced primary structure of the humancartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. *J. Biol. Chem.* 266, 894-902, 1991.
- 5) Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Shinomura, T., Yamagata, M., Uritani, M., and Suzuki, S.: A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo. *J. Biol. Chem.* 261, 13517-13525, 1986.
- 6) Vandenberg, P., Khillan, J.S., Prockop, D.J., Helminen, H., Kontusaari, S., and Ala-Kokko, L.: Expression of a partially deleted gene of human

- type II procollagen (COL2A1) in transgenic mice produces a chondrodysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7640-7644, 1991.
- 7) Garofalo, S., Vuorio, E., Metsaranta, M., Rosati, R., Toman, D., Vaughan, J., Lozano, G., Mayne, R., Ellard, J., Horton, W., and Crombrughe, B.: Reduced amounts of cartilage collagen fibrils and growth plate anomalies in transgenic mice harboring a glycine-to-cysteine mutation in the mouse type II procollagen $\alpha 1$ -chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 9648-9652, 1991.
 - 8) Warman, M.L., Abbott, M., Apte, S.S., Hefferon, T., McIntosh, I., Cohn, D.H., Hecht, J.T., Olsen, B.R., and Francomano, C.A.: A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nature Genet.* 5, 79-82, 1993.
 - 9) Kato, Y.: Effects of exogenous extracellular matrices on chondrocyte proliferation and phenotypic expression, in: Cell proliferation and glomerulonephritis (Shimizu, F., Kihara, I., and Oite, T. eds.) pp. 41-56, Nishihara, Tokyo, 1986.
 - 10) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
 - 11) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149, 1992.
 - 12) Matudaira, P.: Sequense from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262, 10035-10038, 1987.
 - 13) Hascall, V.C., and Heinegard, D.: Aggregation of cartilage proteoglycans. II. Oligosaccharide competitors of the proteoglycan-hyaluronic acid interaction. *J. Biol. Chem.* 249, 4242-9, 1974.
 - 14) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tiss. Res.* 19, 179-187, 1975.
 - 15) Kato, Y., and Iwamoto, M.: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* 265, 5903-5909, 1990.
 - 16) Smale, G. and Sasse, J.: RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate. *Anal. Biochem.* 203, 352-356, 1992.
 - 17) Aviv, H., and Leder, P.: Purification of biological active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69, 1408-1412, 1972.
 - 18) Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Champlin, R., Witte, O.N., and McCormick, F.P.: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 5698-5702, 1988.
 - 19) Sanger, F.: Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214, 1205-1210, 1981.
 - 20) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, J.D., and Takada, K.: Release of fibroblast growth factor-1 by human squamous cell carcinoma correlates with autocrine cell growth. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A, 790-5, 1994.
 - 21) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J.D., and Takada, K.: Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *J. Oral. Pathol. Med.* 23, 451-6, 1994.
 - 22) Fujita, Y., Okamoto, T., Noshiro, M., McKeehan, W.L., Crabb, J.W., Whitney, R.G., Kato, Y., Sato, J.D., and Takada, K.: A novel heparin-binding protein, HBp15, is identified as mammalian ribosomal protein L22. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 199, 706-13, 1994.
 - 23) Shirakawa, M., Shiba, H., Nakanishi, K., Ogawa, T., Okamoto, H., Nakashima, K., Noshiro, M., and Kato, Y.: Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J. Dent. Res.* 73, 1509-14, 1994.
 - 24) Skonier, J., Neubauer, M., Madisen, L., Bennett, K., Plowman, G.D., and Purchio, A.F.: cDNA cloning and sequence analysis of β ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor- β . *DNA. Cell. Biol.* 11, 511-522, 1992.
 - 25) Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E.: Influence of stereochemistry of the sequence gly-asp-xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 262, 17294-17298, 1987.
 - 26) Takeshita, S., Kikuno, R., Tezuka, K., and Amann, E.: Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem. J.* 294, 271-278, 1993.
 - 27) Zinn, K., McAllister, L., and Goodman, C.S.: Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and Drosophila. *Cell* 53, 577-587, 1988.
 - 28) Jikko, A., Aoba, T., Murakami, H., Takano, Y., Iwamoto, M., and Kato, Y.: Characterization of the mineralization process in cultures of rabbit growth plate chondrocytes. *Dev. Biol.* 156, 372-380, 1993.
 - 29) Kato, Y., Nakashima, K., Iwamoto, M., Murakami, H., Hiranuma, H., Koike, T., Suzuki, F.,

- Fuchihata, H., Ikehara, Y., Noshiro, M., and Jikko, A.: Effects of interleukin-1 on syntheses of alkaline phosphatase, type X collagen, and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor, and matrix calcification in rabbit chondrocyte cultures. *J. Clin. Invest.* **92**, 2323-2330, 1993.
- 30) Skonier, J., Bennett, K., Rothwell, V., Kosowski, S., Plowman, G., Wallace, P., Edelhoff, S., Disteché, C., Neubauer, M., Marquardt, H., Rodgers, J., and Purcho, A.F.: beta ig-h3: a transforming growth factor- β -responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol.* **13**, 571-84, 1994.
- 31) Lebaron, R.G., Bezverkov, K.I., Zimber, M.P., Pavelec, R., Skonier, J., and Purchio, A.F.: β ig-h3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor- β , is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 844-849, 1995.
- 32) Mcallister, L., Goodman, C.S., and Zinn, K.: Dynamic expression of the cell adhesion molecule fasciclin I during embryonic development in *Drosophila*. *Development* **115**, 267-276, 1992.
- 33) Wu, L.N., Genge, B.R., Lloyd, G.C., and Wuthier, R.E.: Collagen-binding proteins in collagenase-released matrix vesicles from cartilage. Interaction between matrix vesicle proteins and different types of collagen. *J. Biol. Chem.* **266**, 1195-1203, 1991.
- 34) Middelkoop, E., de Vries, H.J., Ruuls, L., Everts, V., Wildevuur, C.H., and Westerhof, W.: Adherence, proliferation and collagen turnover by human fibroblasts seeded into different types of collagen sponges. *Cell Tiss. Res.* **280**, 447-453, 1995.
- 35) Escribano, J., Hernando, N., Ghosh, S., Crabb, J., and Coca-Prados, M.: cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to β ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium. *J. Cell. Physiol.* **160**, 511-521, 1994.
- 36) Ignatz, R.A., and Massague, J.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**, 4337-45, 1986.
- 37) Centrella, M., Casinghino, S., Ignatz, R., and McCarthy, T.L.: Multiple regulatory effects by transforming growth factor- β on type I collagen levels in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* **131**, 2863-72, 1992.
- 38) Ignatz, R.A., and Massague, J.: Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. *Cell* **51**, 189-97, 1987.
- 39) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F., and Takano, Y.: Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor β and serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 9552-6, 1988.
- 40) Fava, R., Olsen, N., Keski-Oja, J., Moses, H., and Pincus, T.: Active and latent forms of transforming growth factor β activity in synovial effusions. *J. Exp. Med.* **169**, 291-6, 1989.
- 41) Yamada, K.M., and Kennedy, D.W.: Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J. Cell. Biol.* **99**, 29-36, 1984.
- 42) Chakravarti, S., Tam, M.F., and Chung, A.E.: The basement membrane glycoprotein entactin promotes cell attachment and binds calcium ions. *J. Biol. Chem.* **265**, 10597-603, 1990.
- 43) Beck, K., Hunter, I., and Engel, J.: Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* **4**, 148-60, 1990.
- 44) Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E. G., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E.: Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J.* **4**, 2519-24, 1985.
- 45) Yamada, T., Song, H., Inaka, K., Shimada, Y., Kikuchi, M., and Matsushima, M.: Structure of a conformationally constrained Arg-Gly-Asp sequence inserted into human lysozyme. *J. Biol. Chem.* **270**, 5687-5690, 1995.
- 46) Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B.A., and Santoro, S.A.: Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha 2 \beta 1$ integrin in collagen. *J. Biol. Chem.* **266**, 7363-7367, 1991.
- 47) Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A., and Cheresch, D.A.: Integrin $\alpha 3 \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 8856-8860, 1994.