

軟骨細胞に発現する膜型トランスフェリン様糖蛋白質 p 76 の精製と性質

藤 井 理 史

Purification and characterization of a membrane type transferrin like glycoprotein (p 76) specifically expressed in chondrocytes

Masashi Fujii

(平成 8 年 1 月 12 日 受付)

緒 言

軟骨細胞は内軟骨性骨化の過程で、増殖を開始し、細胞外基質を産生する成熟軟骨細胞を経て肥大軟骨細胞へと最終分化する¹⁾。この増殖と分化は、骨格の発生と形態形成、個体成長および骨修復の過程で重要な役割を果たしている。しかし、軟骨細胞の分化の調節機構については、未だ不明な点が多い。

軟骨の形成は、早期に分化した少数の軟骨細胞から周囲の未分化な間葉系細胞への働きかけにより加速度的に、かつ局所的に進行する。この現象には軟骨細胞自身が産生する局所因子群が関与しており、その一部はインスリン様成長因子 (IGF)^{2,3)} やコンドロモジュリン (ChM-I)⁴⁻⁸⁾ などの既知の成長因子によって説明できるが、これら以外にも強力な分化誘導因子が存在すると考えられている。

一方、レクチンはリンパ球の増殖機構を追究するために広く用いられており⁹⁻¹²⁾、細胞表面の糖蛋白質に結合することにより細胞の分化、増殖および形態に影響を与えている^{13,14)}。しかし、糖鎖特異性の異なる多様なレクチンが非特異的にリンパ球の増殖を促進するため、リンパ球を用いたレクチンの研究は行き詰まっている。さらに、レクチンの増殖作用を仲介する受容体も未だ不明である。

顔らの報告によると¹⁵⁾、軟骨細胞培養系でタチナタ

マメのレクチンであるコンカナバリン A (ConA) は、一次分化マーカーであるプロテオグリカンとⅡ型コラーゲンの合成を著明に促進した後、最終分化マーカーであるビタミン D₃ 受容体¹⁶⁾、アルカリホスファターゼ、X型コラーゲン¹⁷⁻¹⁹⁾ および石灰化を誘導した。しかもその作用は非常に強力であるのに対して ConA 以外のレクチンは、効果がないことが判明している。

石田らの報告によると²⁰⁾、軟骨細胞の形質膜には少なくとも約20種の ConA 結合蛋白が存在し、その中でも 76 kD の蛋白 (p 76) と 140 kD の蛋白が軟骨の分化と連動して増加あるいは減少した。また、p 76 はレチノイン酸処置により減少することも判明している。そこで本研究では、ConA の軟骨分化誘導作用を仲介する ConA 受容体を探究する試みとして、軟骨の分化に伴って出現する軟骨特異的 ConA 結合膜蛋白 p 76 を精製し、その構造と発現機構について検討した。

材 料 と 方 法

1 ConA 結合糖膜蛋白質 p 76 の精製

(1) 軟骨細胞

ウサギ肋軟骨の軟骨細胞は Kato²¹⁾、Shimomura らの方法²²⁾ に準じて単離した。すなわち、生後 4 週齢の雄性ニュージーランド白色ウサギの肋骨静止軟骨部を分離し尖刃刀にて軟骨を細切した後、0.1% EDTA と 0.1% トリプシン (以上 Difco 社) を含む PBS にて 1 時間、0.15% コラゲナーゼ (Worthington 社) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) にて 3 時間培養した後、ピペット操作を行い、120 μm ナイロンフィルター (NBC 工業) を通過する細胞を回収し

広島大学歯学部歯科保存学第一講座 (主任: 新谷英章教授) 本論文の要旨は、平成 6 年 9 月の第 67 回、平成 7 年 9 月の第 68 回日本生化学会、および平成 7 年 8 月の第 13 回日本骨代謝学会において発表した。

た。この細胞を組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) に播種し、37°C 5% CO₂ 気相下にて 10% 牛胎児血清 (三菱化成)、60 µg/ml カナマイシン (明治製薬)、50 µg/ml アスコルビン酸 (和光純薬)、25 µg/ml amphotericin B (ICN Biochemistry) を含むアルファ変法イーグル培地 (αMEM 培地、日本製薬) 中で培養した。

(2) 軟骨細胞膜蛋白質の単離

直径 150 mm 組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) にてコンフルエント後、3 日間培養したウサギ静止軟骨細胞を PBS で 3 回洗浄しラバーポリスマンにて回収した。回収したウサギ静止軟骨細胞を、4 倍量の緩衝液 A (0.25 M sucrose, 5 mM MOPS/KOH pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM amidino phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM pepstatin A) に懸濁し、氷温中で、ホモゲナイザー (ポリトロン) によりホモゲナイズした²³⁾。ホモゲナイズした細胞をさらに細粉化するため、懸濁液中の細胞をテフロンチューブ付きのガラスホモゲナイザーにてホモゲナイズ後、4°C, 900×g にて 10 分間遠心を行い、その上清をさらに 4°C 105000×g で 1 時間超遠心をした。沈澱物をさらに 24 ml の緩衝液 A に懸濁させて、2 ml の 17% ショ糖溶液と 3 ml の 40% ショ糖溶液上にのせ 4°C 1 時間 200000×g にて超遠心した。遠心後、17% ショ糖溶液と 40% ショ糖溶液との界面に存在する軟骨細胞膜を単離した。

(3) ConA 結合膜糖蛋白質 p 76 の分離

単離した軟骨細胞膜画分からショ糖を除くため膜画分を緩衝液 B (5 mM MOPS/KOH pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 µM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM pepstatin) にて 4 倍に希釈し、100000×g で 4°C 1 時間遠心した。沈澱物を 1% デオキシコール酸 (DOC) を含む緩衝液 C (10 mM トリス塩酸, pH 7.4, 50 µM amidino phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM pepstatin A) により可溶化した。この膜画分を緩衝液 C にて平衡化した WGA セファロースカラム (40 mm×250 mm, Pharmacia) につけ、その非結合膜画分を緩衝液 C で平衡化した ConA セファロースカラム^{24,25)} (50 mm×150 mm, Pharmacia) に結合させた。ConA 結合糖蛋白質は 0.5 M methyl- α -mannopyranoside (MeMan, Sigma) を含む緩衝液 C (40 ml) を用いて溶出した。この溶出画分を限外ろ過膜 (CENTRIPREP, Amicon) を用いて濃縮し、塩濃度を下げるため緩衝液 D (20 mM トリス塩酸 pH 7.8, 0.05% DOC) にて希釈し、Mono-Q カラム (10×10 mm, Pharmacia) に 0 から 1.0 M までの NaCl の濃度勾配を作製し、0.5 ml/min の流速で展開し、0.5 ml 毎に回収した。これらの画

分は、Laemmli 法²⁶⁾ に従って、4%/20% のポリアクリルアミド勾配ゲル内で還元条件下で、SDS ポリアクリルアミドゲル (第一化学) を用いて電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、銀染色にて染色した。

2 ConA 結合糖蛋白質 p 76 の内部構造

(1) アミノ酸配列の決定

N 末端ペプチドシーケンスは、ConA 結合膜蛋白質 0.2 mg を SDS-PAGE に展開し、PVDF メンブランに、電気的に転写した²⁷⁾。さらに、PVDF メンブラン上の蛋白質を Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色して分子量 76 kD の p 76 のバンドを切り出して自動アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystems, 476A 型機) につけ解析した。

一方、内部シーケンスは、20 µg の p 76 と 45 mM ジチオスレイトールを含む 50 µl の 8 M 尿素 -0.4 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 溶液を 50°C で 15 分間インキュベートした後、5 µl 100 mM iodoacetamide を加えて、室温で 15 分間放置して、カルボキシメチル化した。さらに 3 µg/ml のトリプシンを含む 140 µl の水を加え 37°C で 24 時間インキュベートした。以上処置した試料をスマートシステム (Pharmacia) に連結した µRPC C2/C18 SC 2/10 のカラムに展開して、0.1% TFA を含む純水および 0.1% TFA を含むアセトニトリルを用いたアセトニトリルの 0-100% の濃度勾配中で、100 µl/min の流速で溶出した。続けて分離した代表的なフラグメントについてアミノ酸配列を分析した。

(2) PCR プライマーの設計

内部ペプチドシーケンスの結果より p 76 はヒト melanotransferrin²⁸⁾ (以下 MTF p 97 と略す) の相同蛋白質であると考えられた。そこで、MTF p 97 の核酸配列を基に、下記の通り PCR プライマーを設計し、ウサギ軟骨細胞での発現を調べた。

上流プライマー

5'-GGCTGGAACGTGCCCGTGGGCTA-3'

下流プライマー

5'-GTCCTGGGCCTTGCCAGCAGTC-3'

(3) 軟骨細胞培養系からの RNA の回収

total RNA の抽出は、Smale らの報告²⁹⁾ に準じて行った。すなわち、コンフルエントまで培養した静止軟骨細胞の培養液を吸引した後、PBS にて 1 回洗浄し、洗浄後、細胞層を 4 M グアニジンチオシオネート、0.1 M トリス塩酸 pH 7.5、0.1% 2-メルカプトエタノール、0.5% N-lauroyl sacrosine 溶液で浸し、ラバーポリスマンにて回収した。回収した細胞層を 3000×g で 10 分間遠心して、その上清を比重 1.57 の

57% CsTFA 1 mM EDTA を含む溶液上に重層し 200000×g にて20時間超遠心した後、沈殿物を 150 μ l の 10 mM トリス塩酸 pH 7.5, 1 mM EDTA にて溶解し 100 μ l の 6.3 M 酢酸アンモニウムおよび 625 μ l のエタノールを加えることで、RNA を沈殿させた。得られた RNA を 80% エタノールで脱塩し、total RNA を得た。

(4) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

上記の方法で得られた total RNA および PCR プライマーを用いて、Kawasaki らの報告³⁰⁾ に準じて RT-PCR を行った。RT-PCR には、Takara LA PCR Kit Ver. 2 (Takara Biotechnology) を使用した。まず 2.0 μ g の total RNA 及び 0.5 μ g の下流特異的プライマーを加え、RNA の逆転写反応を行った。さらに、上流特異的プライマー 0.5 μ g を加え増幅反応を行い、目的とする PCR 産物を得た。増幅反応プログラムは、95°C で30秒間、アニーリングおよび伸長反応を 68°C でそれぞれ 1 分間行い、この過程を 1 サイクルとし 35 サイクルの増幅を行い、PCR 産物を得た。得られた PCR 産物を、pBluescript SK (-) ベクター (Stratagene, USA) の Sma I サイトにサブクロニングし、さらに Bal 31 酵素 (Takara Biotechnology) を使用してダイラオキニンターミナルチェーン法により切断した後、塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、Sequenase Ver. 2.0 キット (USB Corp., USA) を用いた。

以上示した Long PCR 法により得られた PCR 産物を基に新たに 3' 側および 5' 側へと PCR プライマーを設計し Forhman ら³¹⁾ によって報告された Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により RT-PCR を行った。まず、RACE 法による 3' 末端の増幅を以下の方法で行った。なお、逆転写反応および PCR は、Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH Laboratories, Inc) を用いて行った。アダプター配列を含むオリゴ dT プライマー (GCTCTAGAACTAGTGATCC) を用いて、42°C、1 時間逆転写反応を行い 3' 末端を含む p 76 cDNA を作製した。次に部分的な p 76 cDNA の塩基配列を基に設計した 3' 増幅用プライマー (5'-GTCCGGCCGACACCAACATCTTC-3') を用いて伸長反応を行った。その後変性反応 95°C、1 分間、アニーリング 55°C、2 分間、伸長反応 72°C、3 分間を 1 サイクルし、このプログラムを 35 サイクル行うことにより、3' 増幅用プライマーおよびアダプタープライマーでは含まれた 3' 末端を含む p 76 cDNA を増幅した。5' 側も同様に、まず 5' 逆転写用プライマー (GCTCGTAACTCTCTTTGCTG) を用いて 42°C、

1 時間逆転写反応を行い 5' 末端を含む p 76 cDNA を作製した。その後の反応は 3' 末端の増幅方法と同様に、アダプター配列を含むオリゴ dT プライマーを用いて伸長反応を行った後、5' 増幅用プライマー (5'-AGAGGGACTCCGAGTATCTGGTCTC-3') およびアダプタープライマーでは含まれた 5' 末端を含む p 76 cDNA を増幅した。増幅プログラムは、3' 末端と同様に行い、得られた p 76 cDNA を、それぞれ pBlue-script SK (-) ベクター (Stratagene, USA) の Sma I サイトにサブクロニングし、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Sequenase Ver. 2.0 kit (USB Corp., USA) を用いた。以上の操作から 3 つの p 76 cDNA 断片を得て p 76 の全長の構造を解析した。

3 p 76 の組織分布

(1) 各組織からの RNA の回収

total RNA の抽出は、Smale らの報告²⁹⁾ に準じて行った。すなわち、ウサギの各臓器を 4 M グアニジンチオシオネート、0.1 M トリス塩酸 pH 7.5, 0.1% 2-メルカプトエタノール、0.5% N-lauroyl sarcosine 溶液中でポリトロン型ホモゲナイザーにてホモゲナイズした後、3000×g で10分間遠心して、その上清を比重 1.57 の 57% CsTFA, 1 mM EDTA を含む溶液上に重層し 200000×g にて20時間超遠心した後、沈殿物を 150 μ l の 10 mM トリス塩酸 pH 7.5, 1 mM EDTA にて溶解し 100 μ l の 6.3 M 酢酸アンモニウムおよびエタノールを加えることで、RNA を沈殿させた。得られた RNA を 80% エタノールで脱塩し、total RNA を得た。

(2) RT-PCR

PCR プライマーは、MTF p 97 の核酸配列を基に上流プライマー：5'-CTCGAGATCCAGAAGTGTGGAGA-3' および下流プライマー：5'-GAATTCTGGCCGTTTGTGTTGTC-3' を設計し、上記の方法で得られた RNA 並びに PCR プライマーを用いて Kawasaki らの報告³⁰⁾ に準じて RT-PCR を行った。RT-PCR には、GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd, USA), DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus Instrument Co. Ltd, USA) を用いた。すなわち、40 μ l の 10 mM トリス塩酸 pH 8.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1U ribonuclease inhibitor, 2.5U reverse transcriptase 中に total RNA 1.0 μ g 及び下流特異的プライマー 0.2 μ g を加え、42°C で15分間逆転写反応を行い cDNA を得た。さらに、上流特異的プライマー 0.2 μ g および Ampli Taq DNA polymerase 2.5U を加え、変性反応 95°C で

アニールおよび伸長反応 60°C でそれぞれ 1 分間行い、この過程を 1 サイクルとし 34 サイクルの増幅を行い、PCR 産物を得た。

(3) サザンブロット

得られた PCR 産物 10 μ l を 1.2% アガロースゲルにて 80 V の定電圧で 60 分間電気泳動した。ゲル中の DNA を 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl で 1 時間変性した後、1 M トリス塩酸 pH 8.0, 1.5 M NaCl で 30 分間中和し、20 \times SSC (3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム) を用いてナイロンメンブレン (Nytran, Schleicher and Schuell Co. Ltd, USA) に転写した。

このナイロンメンブレンを室温にて十分乾燥した後、80°C 陰圧下で 2 時間処置し架橋固定を行った。さらに、非特異的反応を防止するため、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 \times SSC, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml sonicated DNA) 中で、68°C 下にて 1 時間プレハイブリダイズした。さらに新鮮な緩衝液に交換し、変性 [³²P] 標識プローブ 1 mg をその中に入れ 68°C オーバーナイトにて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 2 \times SSC, 0.5% SDS 溶液で 37°C で 5 分間 6 回洗浄を行い、室温で乾燥した後、オートラジオグラフィを行った。

4 p 76 の調節機序

(1) レチノイン酸 (RA) 処置

レチノイン酸処置 (1 μ M) は、軟骨細胞を播種 (10 cm シャーレに 50 万個) 後、コンフルエント直前約 70% より 24 時間毎に計 3 回行い、72 時間後、回収した。回収した軟骨細胞を PBS にて洗浄した後、4 M のグアニジンチオシオネート、0.1 M トリス塩酸、0.1% 2-メルカプトタノール、0.5% N-lauroyl sarcosine 溶液にてホモゲナイズし、3000 \times g で 10 分間遠心して、その上清を比重 1.57 の CsTFA と 1 mM EDTA を含む溶液上に重層し超遠心 200000 \times g して、沈殿物を 10 mM トリス塩酸 pH 7.5, 1 mM EDTA にて溶解した。さらに、エタノール沈殿にて RNA を 80% エタノールで脱塩して、total RNA を得た。

(2) ノーザンブロット

ノーザンブロットは、RNA 変性剤としてホルムアルデヒドを用い、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静止軟骨細胞の total RNA (20 μ g), 0.6 M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルにて、80 V 電圧下で 120 分間電気泳動をした。ゲル中の RNA は、20 \times SSC によって、ナイロンメンブレン (Nytran, Schleicher and Schuell Co Ltd, USA) に転写した。転写されたナイロンメンブレンを室温にて

十分乾燥させた後、架橋固定させるため、UV 光線を 5 分間照射し、80°C で 2 時間ベーキング処置を行った。引き続き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 \times SSC, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml sonicated DNA) 中で、68°C 90 分間プレハイブリダイゼーションを行なった。その後、新しいハイブリダイゼーションバッファーと交換し、変性 [³²P] 標識 p 76 (1.4 Kbp) プローブを加えて、68°C で 12 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 1 \times SSC, 0.5% SDS で 55°C 下において 10 分間計 3 回洗浄した。

実験結果

1 ConA 結合膜蛋白 (p 76) の精製

ConA 結合膜蛋白 p 76 は、ウサギ静止軟骨細胞を 1 週間培養し、その膜画分を WGA アガロースカラムにかけ、その非結合画分を ConA セファロースカラムにかけて溶出し、最後に FPLC の MonoQ カラムにかけ p 76 を NaCl の濃度勾配存在下で溶出した。

図 1 に示すように、p 76 は MonoQ カラムより、0.5 M NaCl で溶出され、均一にまで精製された。

2 ConA 結合膜蛋白 p 76 のアミノ酸配列の部分的決定

精製した p 76 の N 末端近傍のアミノ酸配列は、自動気相シーケンサーを用いて分析した。その結果、図 3 に示すように 15 残基のアミノ酸配列が判明した。

また、精製した p 76 をトリプシンで部分的に分解し、スマートシステム (Pharmacia) を用いてそのペプチドフラグメントの分離を図 2 のように行い、4 つのペプチドフラグメントを得た。それらを自動気相シーケンサーにかけ分析した結果、図 3 に示すようにそれぞれ 9, 16, 18, 20 残基のアミノ酸配列が判明した。

以上 5 つのペプチドフラグメントのアミノ酸配列をコンピューターにより検索したところ、図 4 に示すように、MTF p 97 と N 末端ペプチドシーケンスで 53.3%, 4 つのペプチドフラグメントはアンダーラインの位置でそれぞれ、76.5 77.8 93.8 100% と高い相同性を示した。

3 p 76 の全核酸配列とアミノ酸配列

RT-PCR および RACE 法³¹⁾ により得られた 3 つの PCR 産物を用いて決定した p 76 の全長の cDNA 配列と制限酵素地図およびそれに基づいて翻訳したアミノ酸配列をそれぞれ図 5 および図 6 に示す。p 76 cDNA の全長は 2388 bp で、オープンリーディングフレーム

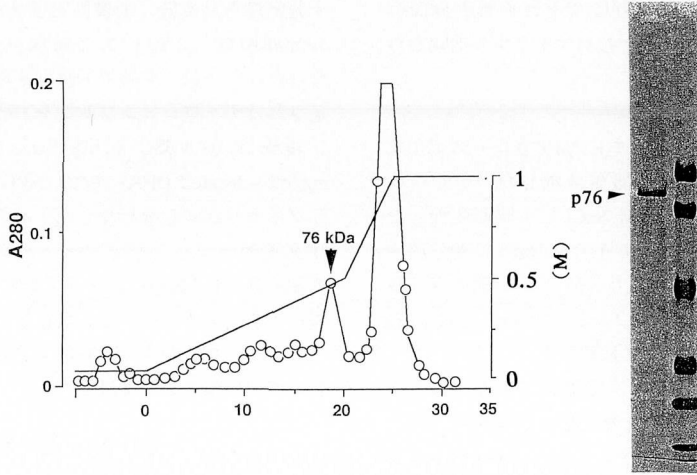


図1 p76の精製

静止軟骨細胞を1週間培養し、その膜成分をWGAアガロースカラムに展開した。素通り画分をConAセファロースカラムに展開し、その結合タンパクをメチルマンノースで溶出し、最後にFPLC-MonoQに展開した。0.5 M NaClで溶出された画分には均一に精製されたp76が存在した。右パネルには分子量マーカーと精製したp76のSDS-PAGEの分離パターンを銀染色で示す。

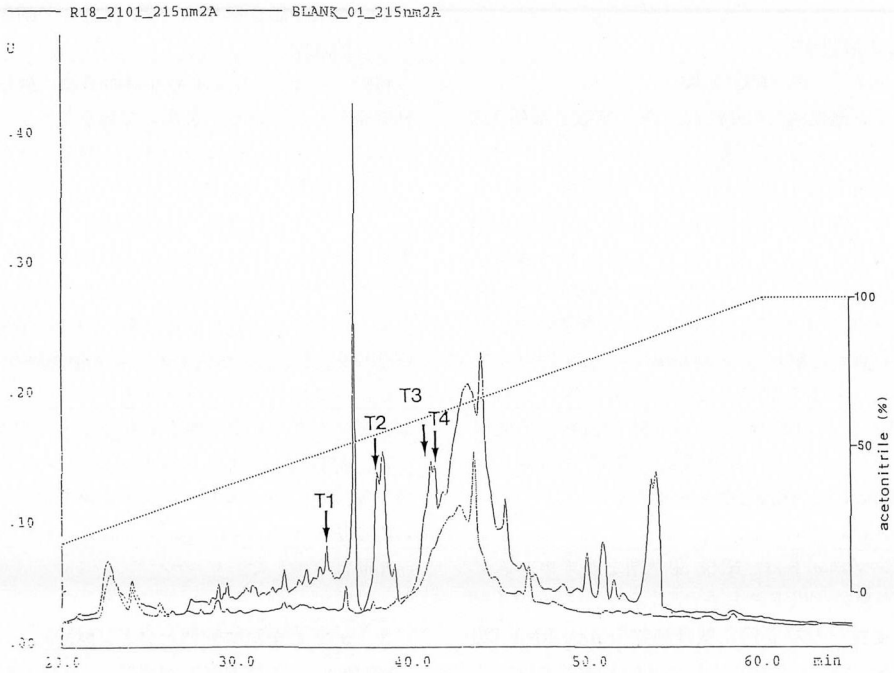


図2 p76断片の分離

p76をカルボキシメチル化後、トリプシン処置を行い、分解産物をスマートシステムで分離した。なお、p76存在下(実線)、非存在下(破線)でトリプシン処置したこれらの資料を同条件で μ IRPC C2/C18 SC2/10のカラムに展開した。

NH₂ terminus: NH₂-GVEVRWXTASEPEQQ

Trypsin fragment:

T1: NH₂-YYDYSGAFR

T2: NH₂-HTTIFDNTNGHNPEPXAA

T3: NH₂-TVGWNVPVGYLVDSGR

T4: NH₂-TTYQDTLGPDYVAALEGGQS

図3 p76の部分ペプチドシーケンス

ConA 結合膜蛋白質 (0.1~0.2 mg) を SDS-PAGE に展開し PVDF 膜に電氣的に転写した後、膜を CBB 染色して p76 のバンドを切り出し、気相シーケンサーにて N 末端アミノ酸配列を決定した。内部シーケンスは、p76 をカルボキシメチル化後、トリプシン処置を行い、その分解産物をスマートシステムで分離して溶液サンプルのアミノ酸配列を分析した。

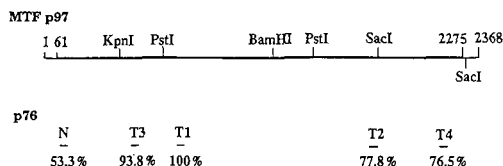


図4 p76 ホモロジー検索

p76 の N 末端および 4 つのフラグメントは、p97 (MTF) と下線の位置で、高い相同性を示した。

は 60 番目から始まり、736 個のアミノ酸に翻訳された。一方 MTF p97 は、739 個のアミノ酸からなるが、図 7 に示すように、p76 は MTF p97 と 87% の相同性を示し、ヒト血清トランスフェリンとは、47% の相同性を示した。

これらの結果は、p76 はトランスフェリンファミリーの 1 つであることを示している。

また、構造解析より他のトランスフェリンと同様に p76 にも 2 つの繰り返し構造がそれぞれ N 側ドメインと C 側ドメインに存在することが判明した (図 7)。

4 p76 の組織分布

RT-PCR を用いて p76 の組織分布を検討したところ、p76 は各種の軟骨 (成長板軟骨、関節軟骨、静止軟骨) に存在した (図 8)。

また HOS, MG63³²⁾ などの骨肉腫細胞にも p76 mRNA は低レベルで存在していたが、腎臓、脳、脾臓、小腸には p76 mRNA はほとんど存在しなかった。

この結果は、石田らの報告にあるウエスタンブロッティングでの p76 蛋白質の臓器分布の結果と一致した²⁰⁾。

5 p76 の調節機序

ノーザンブロット法を用いて p76 の mRNA レベルに及ぼすレチノイン酸の影響を検討した。

図 9 に示すように、p76 の mRNA がほとんど検出されないコンフルエント直後に比較して、コンフルエント後、2 週間では p76 mRNA レベルは著しく増加し、4 週間目でそのレベルは少し低下した。

一方、レチノイン酸処置により脱分化した軟骨細胞には p76 mRNA はほとんど存在していなかった。この結果は、レチノイン酸の作用点は、蛋白翻訳前であることを示唆している。

考 察

細胞膜糖蛋白質は細胞間相互作用、細胞外基質-細胞相互作用、細胞認識に重要な役割を果たしている。軟骨細胞の分化においても、膜糖蛋白質は、分化の誘導や石灰化の制御などに関わっていると推察される。

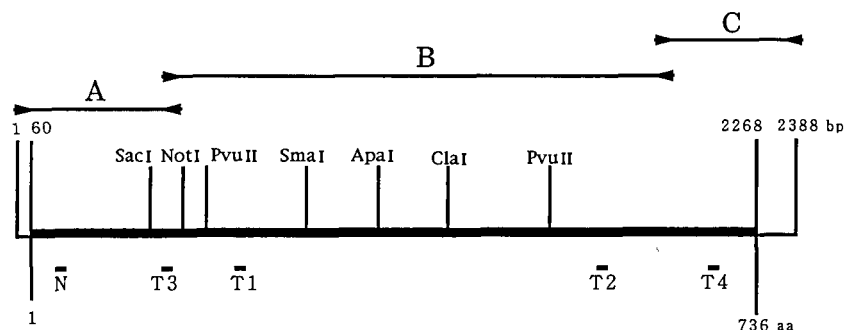


図5 p76の全長のcDNA配列および制限酵素地図

cDNAの全長は、2388 bpでオープンリーディングフレームは、60番目から始まり、736個のアミノ酸に翻訳された。

CCCCGCCCTACTCGTTCGCACTCGGACTCAGACCAGTCCGACCCCTGGACTGCGCC	-1
ATCGCGTGGCCGAAGCCGGCTATGTGATCTTCCTGGCCCTGCGCACCCGACTCGGCAGCGTGGAGGTCCGGTGGACCCGCTCCGAG	90
MetArgCysArgSerAlaMetTrpIlePheLeuAlaLeuArgThrAlaLeuGlySerValGluValArgTrpCysThrAlaSerGlu	30
CCCGAGCAGCAGAAGTCCGAGGACATGACCCAGGCTTCCCGGAAGCCGCTCCAGCCCGCCTGCTGTGCGTGCAGGGCACCTCGGCC	180
ProGluGlnGlnLysCysGluAspMetSerGlnAlaPheArgGluAlaGlyLeuGlnProAlaLeuLeuCysValGlnGlyThrSerAla	60
GACCACTGCTCAGCTATCGCGGCCACGAGGCCGACCCACTCTGGACGGAGGACCAATTTACGAGCCGGGGAAGGAACACCGCC	270
GlyHisCysValGlnLeuAlaAlaHisGluAlaAspAlaIleThrLeuAspGlyGlyAlaIleTrpGluAlaPheLysGluHisGly	90
CTGAAGCCCGTGGTGGCCGAAGTGTATGACCAAGAGTGGGCACCTCTACTACGCTGTGGCCGTGGTCAAGAGGAGCTCCAACGTGACC	360
LeuLysProValValGlyGluValTyrAspGlnGluValGlyThrSerTyrTyrAlaValAlaValValLysArgSerSerAsnValThr	120
ATCAACACCCTGAGAGGCGTGAAGTCTGCCACACGGGCATCAACCCGACGGTGGCTGGAACGTGCTGTGGCTTACCTGGTGGACAGC	450
IleAsnThrLeuArgGlyValLysSerCysHisThrGlyIleAsnArgThrValGlyTrpAsnValProValGlyTyrLeuValAspSer	150
GGCCGCTCTCAGTGTAGTGGCTGTGACGTGCTCAAGCGGTCACGGAGTACTTCCGGGGCAGCTGCTCCCTGGGGCAGGAGACACAGA	540
GlyArgLeuSerValMetGlyCysAspValLeuLysAlaValSerGluTyrPheGlyGlySerGluValProGlyAlaGlyGluThrArg	180
TACTCGGAGTCCCTCTGCTGCTTCCGGGGCAGACCTCCCGGGAGGGGGTGTGTGACAAGACCCCTGGAGCGGTACTACGACTAC	630
TyrSerGluSerLeuLysCysArgLeuCysArgGlyAspThrSerGlyGluGlyValCysAspLysSerProLeuGluArgTyrTyrAspTyr	210
AGCGGGCCCTCCGGTGCCTGGCAGAAGCGCGAGGGACCTGGCCCTTTGTGAAGCACAGCACGGTGTGGAGAACCGGATGGGAGAACA	720
SerGlyAlaPheArgCysLeuAlaGluGlyAlaGlyAspValAlaPheValLysHisSerThrValLeuGluAsnThrAspGlyArgThr	240
CTGCCCTCTGGGGCCACATGCTGATGTCACGGGACTTTGAGCTGCTGCCGGGACGGCAGCCGGCCAGCTCACCGAGTGGCAGCAC	810
LeuProSerTrpGlyHisMetLeuMetSerArgAspPheGluLeuLeuCysArgAspGlySerArgAlaSerValThrGluTrpGlnHis	270
TGCCACTGGCCCGGGTGGCCGCCACCGCCGCTGGTGGTCCGGCCGACCCGACGAGGCTCATCTCCGGCTTCTCAATGAGGGCCAG	900
CysHisLeuAlaArgValProAlaHisAlaValValArgAlaAspThrAspAlaGlyLeuIlePheArgLeuAsnGluGlyGln	300
CGCGTGTTCAGCCACGAGGGCAGCAGCTCCAGATGTTACGCTCGGAGCCCTACGGCCAGAAGAACCTGTGTTCAAGACTCCACGCTG	990
ArgLeuPheSerHisGluGlySerSerPheGlnMetPheSerSerGluAlaTyrGlyGlnLysAsnLeuLeuPheLysAspSerThrLeu	330
GAGCTGGTGGCCATCGCCACAGACCTACGAGGCTGGCTGGGCCCGGAGTACCTGACGCGCATGAAGGCTGTGCTGTGACCCCAAC	1080
GluLeuValProIleAlaThrGlnThrTyrGluAlaTrpLeuGlyProGluTyrLeuHisAlaMetLysGlyLeuLeuCysAspProAsn	360
CGCGTCCCCCATCCTCGCTGGTGGCTGCTGCCACCCCGAGATCCAGAAGTGGAGACATGGCCGCTGGCCCTCAGCCGGCAGAGG	1170
ArgLeuProProTyrLeuArgTrpCysValLeuSerThrProGluIleGlnLysCysGlyAspMetAlaValAlaPheSerGluHisGln	390
CTCAAGCCGAGATCCAGTGTGCTCGCGGAGTCCCGCCAGCACTGCATGGAGCAGATCCAGGCTGGGCACATCGATGCTGTGACCCCTG	1260
LeuLysProGluIleGlnCysValSerAlaGluSerProGlnHisCysMetGluGlnIleGlnAlaGlyHisIleAspAlaValThrLeu	420
AACGGGAGGACATTCACACAGCGGGGAGACTTATGGGCTGATCCCGGCTGCGGGGAGCTGTATGCGCGGACGACAGGAGTAACCTG	1350
AsnGlyLeuAspIleHisThrAlaGlyLysThrTyrGlyLeuIleProAlaAlaGlyLeuTyrAlaAlaAspAspArgSerAsnSer	450
TACTTCGTGGTGGCCCTGGTGAAGCGAGACCGCCCTACCCCTACCGTGGAGCTGGCGGGGAAGCCCTCTGCCACCCCGGCTTC	1440
TyrPheValValAlaValValLysArgAspSerAlaTyrAlaPheThrValAspGluLeuArgGlyLysArgSerCysHisProGlyPhe	480
GGCAGCCCGCCGGCTGGGACGCTCCGGTGGGCCCTCATCCACTGGGGCTACATCCGGCCAGGAACCTGGACCTCTCACAGCGGTG	1530
GlySerProAlaGlyTrpAspValProValGlyAlaLeuIleHisTrpGlyTyrIleArgProArgAsnCysAspValLeuThrAlaVal	510
GGTCAGTTCTCAACGCCAGCTGTGTGCCGGTGAACAACCCCAAGAAGTACCCTCCCTCGCTGTGGCCACTCTGCTGGGTGACGAGCAG	1620
GlyGlnPhePheAsnAlaSerCysValProValAsnAsnProLysLysTyrProSerSerLeuCysAlaLeuLysCysValGlnAspTyrGlu	540
GGCCGCAACAGTGCACTGGCAACAGCCAGGAGCGGTACTATGGCGACAGTGGCCCTTCAGGTGCTGGTGGAGGGTCAAGGGACGCTG	1710
GlyArgAsnLysCysThrGlyAsnSerGlnGluArgTyrTyrGlyAspSerGlyAlaPheArgCysLeuValGluGlyAlaGlyAspVal	570
GCCCTCGTCAAGCACAGCCATCTTTGACAACACAATGGCCACAATCCCGAGCCGCTGGCCCTCTCAGGAGCCAGGACTACGAG	1800
AlaPheValLysHisThrThrIlePheAspAsnThrAsnGlyHisAsnProGluProTrpAlaAlaHisLeuArgSerGlnAspTyrGlu	600
CTGCTGTGCCCAACCGCCGGCTGAGCGCAGCCAGCTTTCGCGCTGCAACCTGGCCAGATTCCGCTCCACGCGCTCATGGTGGC	1890
LeuLeuCysProAsnGlyAlaArgAlaGluAlaHisGlnPheAlaAlaCysAsnLeuAlaGlnIleProSerHisAlaValMetValArg	630
CCCGACACCACATCTTACCGTTTACGGACTCCTGGACAAAGCCCGAGGACCTGTTTGGAGACGACCACAACAAGACGGTTCAGATG	1980
ProAspThrAsnIlePheThrValTyrGlyLeuLeuAspLysAlaGlnAspLeuPheGlyAspAspHisAsnLysAsnGlyPheLysMet	660
TTCGACTCCCTCAGCTACCACGGCCGAGACCTGCTCTCAAGGACCCAGGTCGCGCTGTGCTGGCGGAGAGGACACCTACCCAG	2070
PheAspSerSerTyrTyrHisGlyArgAspLeuLeuPheLysAspAlaThrValArgAlaValProValGlyGluArgThrThrTyrGln	690
GACTGCCTGGGGCCGACTACGTGGCGGCTCTGGAAGGGATGCAGTACAGCGGTGCTCAGGGCAGCCGCTGGCCGCCCGGGGCTCG	2160
AspTrpLeuGlyProAspTyrValAlaAlaLeuGluGlyMetGlnSerGlnArgCysSerGlyAlaAlaValGlyAlaProGlyAlaSer	720
CTGCTGGCTGCTGCTCCCTGGCTGGGGCCCTCTGCTGCTTCCGCTCTGAGAGCAGCCCGGGCAGCTCGGCCCGGAGGGAGCCCT	2250
LeuLeuAlaLeuProLeuAlaGlyLeuLeuLeuSerSerLeu *	
GGCCGGAAGCTTCTGAACGAGCCCGCCCTGGCTGGATGTGTTACTCGCGAGCCCGGGCCCGGCTTCCCCCG	

図6 p76の全長のcDNA配列および翻訳後のアミノ酸配列

軟骨細胞膜上の ConA 結合膜蛋白である p76 は、約20種ある ConA 結合膜蛋白のうち、その発現量が最も多く、また、レチノイン酸添加により、減少する唯一の蛋白質であり、軟骨細胞が分化している時期に発現している。このような知見から、p76の構造とその役割を追求することが重要であると考えたわけであ

るが、本研究での構造決定により、p76はトランスフェリンファミリーの1つであることが判明した。現在のところ、トランスフェリンは大きく以下の4種類に分類されている。血清中に含まれる血清トランスフェリン (STF)、乳汁等に存在するラクトランスフェリン (LTF)³³⁾、卵白にあるオボトランスフェリ

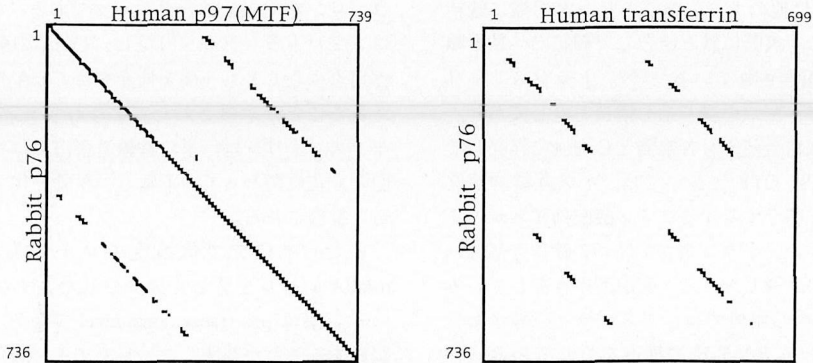


図7 p76 と p97 (MTF), および p76 と血清トランスフェリンとの相同性
p76 は p97 (MTF) と87%の相同性を示し、同じトランスフェリンファミリーの血清トランスフェリンとは47%の相同性を示した。

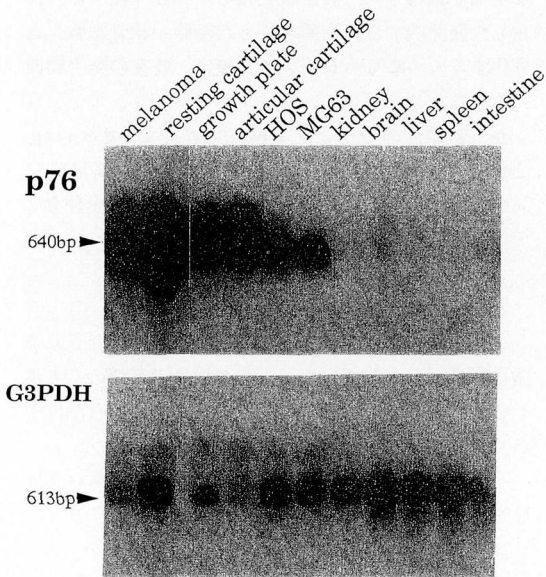


図8 ウサギ各組織における p76 mRNA の発現 (RT-PCR およびサザンブロット分析)

ン (OTF), そして p76 と87%と最も相同性の高かったメラノトランスフェリン (MTF p97) とに分類される。STF, LTF, OTF はいずれも体液中に存在しているのに対して, MTF p97 は細胞膜上に存在している。本研究で, p76 は血清トランスフェリンと47%の相同性を示したが, 同じく細胞膜上に存在している MTF p97 により高い相同性を示した。p76 がウサギの軟骨細胞に存在している蛋白であるのに対して, メラノトランスフェリンはヒトのメラノーマより分離された。このことを考慮すると, p76 が新規のトランスフェリンファミリーの一員であるか否かは不明であ

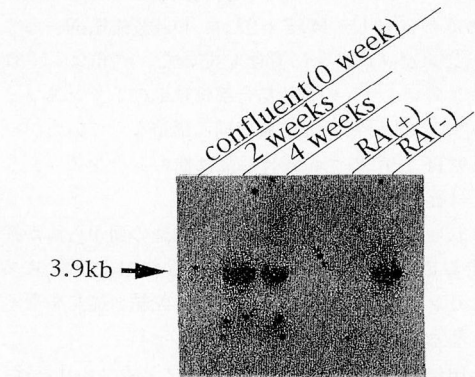


図9 ウサギ静止軟骨細胞における p76 mRNA の発現, およびレチノイン酸 (RA) の影響 (ノーザンブロット分析)

るが, p76 の分子量や組織分布は従来報告されている MTF p97 とは大きく異なっているので, 両者の関係は今後さらに追究する必要があると思われる。

PCR 法で分析したところ, p76 は軟骨細胞に特異的に存在していた。これに対して, 元来メラノトランスフェリンは, ヒトの悪性腫瘍細胞の細胞膜に存在する蛋白³⁴⁾で, 正常のメラノサイト, あるいは他の正常組織には存在しない。メラノーマでトランスフェリン様蛋白が高レベルに発現する理由は不明であるが, メラノサイトが癌化する際の遺伝子発現機構の異常によりメラノトランスフェリンが異所性に合成されるものと考えられる。これに対して, 正常の成熟動物では, 軟骨細胞にしか膜型トランスフェリン様蛋白は存在しないので, 本来 p76 は軟骨形成に関わっている蛋白と考えられる。そこで著者は p76 をコンドロトランスフェリン (CTF) と命名した。

MTF p 97 には他のトランスフェリンと同様に鉄結合部位が存在し、実際に鉄と結合して細胞内へ鉄を輸送することが報告されている³⁵⁻³⁸⁾。トランスフェリンファミリーは、2つの繰り返し構造を有しており、したがって、鉄結合部位もN端側とC端側に存在している。STF, LTF, OTF においては、その鉄結合部位および鉄結合に関与するアミノ酸配列領域がいずれも一致していた。トランスフェリンの鉄結合部位には、D-Y-Y-H の共通したアミノ酸配列が存在しているが、MTF p 97 のC端側では、アスパラギン酸がセリンに置換している S-Y-Y-H の構造を有している。一方、p 76 コンドロトランスフェリンもN端側は保存されているが、C端側はアスパラギン酸がアスパラギンに、チロシンがアスパラギン酸に置換した N-Y-D-H の構造を有していた。さらに、亜鉛の結合部位についても STF, LTF, OTF は共通の構造 -LGHEYLHAM- であるのに対し、MTF p 97 は -LGPEYLHAM- とヒスチジンがプロリンに置換していた。p 76 コンドロトランスフェリンの亜鉛結合部位は他のトランスフェリンファミリーと同じ位置で同じ構造をしていた。一方、MTF p 97 の亜鉛結合部位は他のトランスフェリンとは存在位置が異なっていた。

これらの結果より、あくまでも構造の面からしか推察することはできないが、p 76 も他のトランスフェリンと同様、鉄結合能および亜鉛結合能を少なくとも部分的に有していると考えられる。

石田はすでに、p 76 コンドロトランスフェリンは、軟骨細胞の形質膜上に存在していることを報告している²⁰⁾。細胞膜蛋白分子にはその局在様式により膜成分のイノシトールリン脂質に糖鎖を介して共有結合する GPI アンカー結合型および蛋白分子が直接細胞膜内に局在する蛋白アンカー型が存在する³⁹⁾。MTF p 97 は、前者の方に分類される。p 76 コンドロトランスフェリンは、その構造が MTF p 97 に類似していることから、GPI アンカー結合型と推察できる。事実、予備実験のデータもそれを支持した。

軟骨細胞はコンフルエント後 1~2 週間で 1 次分化を終了するが⁴⁰⁻⁴⁵⁾、p 76 mRNA レベルは、コンフルエント直後に比較してコンフルエント 2 週間後に増加したことから、コンドロトランスフェリンは、軟骨細胞の一次分化に伴って発現することが明らかとなった。

予備実験で p 76 コンドロトランスフェリンに対する抗体を軟骨細胞培養系に添加すると、ConA を添加した時と同じように、細胞の形態が球形化して分化が抗進した。このように、ConA と抗 p 76 抗体が軟骨細胞の分化を誘導すること、p 76 コンドロトランス

フェリンが ConA 結合タンパクであることから、p 76 コンドロトランスフェリンは、ConA の軟骨細胞への作用を少なくとも一部を仲介する ConA 受容体糖蛋白であることが示唆された。すなわち p 76 コンドロトランスフェリンは、単に鉄輸送蛋白ではなく、軟骨細胞の分化に関わっている新しい軟骨分化マーカーであると推察される。

また、本研究で低濃度のレチノイン酸は p 76 mRNA レベルを著しく減少させた。すなわち、レチノイン酸は pre-translational level で p 76 の生合成を制御することが判明した。レチノイン酸は軟骨・骨の形態形成の調節に重要な役割を果たしており、その欠乏および過剰はいずれも骨格の奇形を誘発する。肢芽では、レチノイン酸によって軟骨細胞への分化が可逆的に阻害されることにより、未分化間葉系細胞の活発な増殖が維持され、肢芽は長軸方向へと伸長する。伸長した肢芽内では、増殖を終えた細胞が軟骨細胞へと分化する。つまり、レチノイン酸は、肢芽の発生調節に重要な役割を演じている。コンドロトランスフェリンが、低濃度のレチノイン酸にตอบสนองして、down-regulation されることは、この膜タンパクが骨格形成に対するレチノイン酸の作用の少なくとも一部を仲介していることを示唆している。

結 論

1 p 76 cDNA は、736個のアミノ酸に翻訳される蛋白質をコードしていた。この蛋白には2つのくり返し領域が存在して、鉄結合部位および亜鉛結合部位が各くり返し領域に存在した。

2 p 76 は、メラノトランスフェリンと高い相同性を示したことから、トランスフェリンファミリーの一員であることが判明した。

3 p 76 mRNA は、軟骨に特異的に存在しており、骨肉種細胞にも低レベルの発現が観察されたが、骨格以外の組織には p 76 mRNA は全く検出されなかった。

4 レチノイン酸による p 76 の生合成の調節は、pre-translational レベルで行われていた。

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広島大学歯学部歯科保存学第一講座新谷英章教授に深厚なる謝意を表わします。また、本研究を進めるに際し、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加藤幸夫教授に深く感謝の意を表わします。さらに、本論文作成上、御助言、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。

また、本研究遂行上終始御指導、御鞭撻頂いた本学口腔生化学講座能城光秀助教授、笛吹恵美子博士、Yan Weiqun 博士、河本健博士、本学歯科補綴学第一講座石田秀幸博士に深謝致します。

最後に本研究を進めるに際し、終始御助言、御支援を頂いた本学歯科保存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。

文 献

- 1) 須田立雄, 小沢英浩, 高橋栄明: 骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 18-23, 1985.
- 2) 開 祐司, 宿南知佐, 井上博之: 軟骨内骨形成のメカニズム—軟骨から骨への置換. 実験医学 13, 406-414, 1995.
- 3) Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A.: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor 1 (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72, 1993.
- 4) Kato, Y., Nomura, Y., Daikuhara, Y., Nasu, N., Tsuji, M., Asada, A. and Suzuki, F.: Cartilage-derived factor (CDF) 1, Stimulation of proteoglycan synthesis in rat and rabbit costal chondrocytes in culture. *Exp. Cell Res.* 130, 73-81 1980.
- 5) Hiraki, Y., Tanaka, H., Inoue, H., Kondo, J., Kamizono, A. and Suzuki, F.: Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodurin-1, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 971-977, 1991.
- 6) Kato, Y., Hiraki, Y., Inoue, H., Kinoshita, M., Yutani, Y. and Suzuki, F.: Differential and synergistic actions of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. *Eur. J. Biochem.* 129, 685-690, 1983.
- 7) Hiraki, Y., Kato, Y., Inoue, H. and Suzuki, F.: Stimulation of DNA synthesis in quiescent rabbit chondrocytes in culture by limited exposure to somatomedin-like growth factors. *Eur. J. Biochem.* 158, 333-337, 1986.
- 8) 鈴木不二男, 開 祐司: 軟骨由来増殖制御因子コンドロモジュリン-1. 広川タンパク質化学第8巻 成長因子 広川書店 135-139, 1993.
- 9) Weiss, A., Imboden, J. and Hardy, K.: The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* 4, 593-619, 1993.
- 10) MacDonald, H.R. and Nabholz, M.: T-cell activation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2, 231-53, 1986.
- 11) Isakov, N.S. and Altman, A.: Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. *Immunology Today.* 7, 271-7. 1986.
- 12) Imboden, J.B.: The regulation of intracellular signals during lymphocyte activation. *Immunology Today*, 9, 17-18, 1988.
- 13) Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462-467, 1960.
- 14) Sharon, N. and Lis, H.: レクチン (大沢利明, 小浪悠紀子, 訳) 学会出版センター, 東京, 37-48, 1990.
- 15) Yan, W., Nakashima K., Iwamoto, M. and Kato, Y.: Stimulation by concanavalin A of cartilage matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte culture. *J. Biol. Chem.* 265, 10125-10131, 1990.
- 16) Suda, S., Takahashi, N., Shinki, T., Horiuchi, N., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Enomoto, S. and Suda, T.: 1 α -25-dihydroxyvitamin D3 receptors and their action in embryonic chick chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* 37, 82-90, 1985.
- 17) Gibson, G.J., Schor, S.L. and Grant, M.E.: Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: Synthesis of low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell Biol.* 93, 767-774, 1982.
- 18) Capasso, O., Tajana, G. and Cancedda, R.: Location of 64k collagen producer chondrocytes in developing chick embryo tibitae. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1163-1168, 1984.
- 19) Schmid, T.M. and Conrad, H.E.: Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.* 257, 12451-12457, 1982.
- 20) 石田秀幸: 軟骨細胞の伸展, 分化に関与するコンカナバリン A 結合膜蛋白質に関する研究. 広大歯誌 27, 195-209, 1995
- 21) Kato, Y. and Gospodarowicz, D.: Effect of exogenous extracellular matrix on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J. Cell Biol.* 100, 486-495, 1985.
- 22) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tissue Res.* 19, 179-187, 1975.
- 23) Mollenhauer, J. and von der Mark, K.: Isolation and characterization of a collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes. *EMBO. J.* 2, 45-50, 1983.
- 24) Kowai, R. and Parsons, R.G.: Stabilization of proteins immobilized on Sepharose from leakage by glutaraldehyde crosslinking. *Anal. Biochem.* 102, 72-76, 1980.
- 25) Campbell, K.P. and MacLennan, D.H.: Purification and characterization of the 53,000-dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 256, 4626-4632, 1981.

- 26) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
- 27) Matsudaira, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038, 1987.
- 28) Rose, T.M., Plowman, G.D., Teplow, D.B., Dreyer, W.J., Hellstrom, K.E, and Brown, J.P.: Primary structure of the human melanoma-associated antigen p 97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1261-1265, 1986.
- 29) Smale, G. and Sasse, J.: RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate. *Anal. Biochem.* **203**, 352-356, 1992.
- 30) 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.
- 31) Forhman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R.: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002, 1988.
- 32) 小山秀機, 鮎沢大編集: 細胞バンクと細胞の入手法. 蛋白質核酸酵素. **36**, 2337, 1991.
- 33) Anderson, B.F., Baker, H.M, Dodson, E.J., Norris, G.E., Rumball, S.V., Waters, J.M., and Baker, E.N.: Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1769-1773, 1987.
- 34) Brown, J.P., Woodbury, R.G., Hart, C.E., Hellstrom, I. and Herstrom, K.E.: Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p 97 in normal and neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 539-543, 1981.
- 35) Adrian, G.S., Bowman, B.H., Herbert, D.C., Weaker, F.J., Adrian, E.K., Robinson, L.K., Walter, C.A., Eddy, C.A., Riehl, R., Pauerstein, C.J. and Yang, F.: Human transferrin expression and iron modulation of chimeric genes in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **265**, 13344-13350, 1990.
- 36) Rouault, T.A., Tang, C.K., Kaptain, S., Burgess, W.H., Haile, D.J., Samaniego, F., McBride, O.W., Harford, J.B. and Klausner, R.D.: Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein—the human iron-responsive element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7958-7962, 1990.
- 37) Hentze, M.W., Rouault, T.A., Caughman, S.W., Dancis, A., Harford, J.B. and Klausner, R.D.: A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6730-6734, 1987.
- 38) Garratt, R.C. and Jhota, H.: A molecular model for the tumour-associated antigen, p 97, suggests a Zn-binding function FEBS. *Lett.* **305**, 55-61, 1992.
- 39) 中熊秀喜: GPI アンカー型膜蛋白発現異常と発作性夜間血色素尿症. 実験医学 **11**, 2118-2123, 1993.
- 40) Takigawa, M., Ishida, H., Takano, T. and Suzuki, F.: Polyamine and differentiation: Induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of differentiated chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1481-1485, 1980.
- 41) Solursh, M. and Meier, S.: The selective inhibition of mucopolysaccharide synthesis by vitamin A treatment of cultured chick embryo chondrocytes. *Calcif. Tissue Res.* **13**, 131-142, 1973.
- 42) Shapiro, S.S. and Poon, J.P.: Effect of retinoic acid on chondrocyte glycosaminoglycan biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **174**, 74-81, 1976.
- 43) Benya, P.D. and Padilla, S.R.: Modulation of the rabbit chondrocyte phenotype by retinoic acid terminates type II collagen synthesis without inducing type I collagen: The modulated phenotype differs from that produced by subculture. *Dev. Biol.* **118**, 296-305, 1986.
- 44) Horton, W.E., Yamada, Y. and Hassell, J.R.: Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev. Biol.* **123**, 508-516, 1987.
- 45) 高後 裕, 加藤淳二, 近藤 仁: 鉄結合蛋白質トランスフェリンとその受容体—発現制御機構と臨床応用— 蛋白質核酸酵素 **37**, 58-65, 1992.