

潜在型タイプβ1-トランスフォーミング増殖因子  
— ヒト血小板からの純化精製と構造解析

宮 園 浩 平

## a. 研究の背景

正常細胞をin vitroで培養する際には、血清を一定濃度加えることが重要である。血清中には、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, 以下PDGF) などのタンパク性細胞増殖因子が存在し、これらが重要な役割を果たしていると考えられる。細胞増殖因子に関する研究は近年、めざましい進歩をとげ、細胞増殖因子そのものや、その受容体、あるいは細胞増殖因子によって伝達されるシグナルと癌遺伝子産物とが構造や機能の上で密接に関連していることなどが明らかとなった(1)。一方、こうしたタンパク性因子の中には、増殖を促進するものばかりでなく増殖を抑制するものもあり、両者によって細胞増殖が調節されることが次第に明らかとなってきた(2)。増殖抑制因子の作用機序は最近注目されてきた癌抑制遺伝子 (tumor suppressor genes) との関連も予想され、興味深い(3)。

$\beta$ 型トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- $\beta$ , 以下TGF- $\beta$ ) は多くの細胞に作用し、その増殖や分化に様々な作用を発揮する(3-6)。TGF- $\beta$ は最初、ラット由来の正常線維芽細胞に作用し形質転換を引き起こす物質として見出されたが、その後、上皮由来の細胞(7)や血管内皮細胞(8-11)、T-リンパ球、B-リンパ球(12,13)、造血幹細胞(14-16)などに対しては、強力な増殖抑制因子として働くことが明らかとなった。一方、生体内では、TGF- $\beta$ は組織の線維化や血管新生、損傷の修復を促進することも知られている(17-19)。

TGF- $\beta$ は今日まで種々の正常組織や腫瘍細胞から純化されてきた。活性型TGF- $\beta$ は分子量12,500のポリペプチドがS-S結合で結合した2量体構造を有する。このポリペプチドは以下に述べるTGF- $\beta$ 1に相当するが、cDNAクローニングの結果、390個のアミノ酸より成る先駆ポリペプチドがプロセッシングを受けて出来たC末端側の112個のアミノ酸から成ることが示された(20,21)。また、TGF- $\beta$ 1のmRNAはほとんどの細胞で発現されていることが明らかとなった(20)。

TGF- $\beta$ とアミノ酸配列の類似したいくつかのタンパク質が存在することも知られている(6)。TGF- $\beta$ ファミリーのタンパク質としては、インヒビン、ミューラー管抑制因子、シヨウジョウバエのdecapentaplegic 遺伝子産物などがある。さらに、TGF- $\beta$ 1と、最近見出されたTGF- $\beta$ 2(22-25)およびTGF- $\beta$ 3(26,27)の間にはアミノ酸配列上、相互に70~80%の相同性が見られ、これらには類似した生理活性が検出されている。ブタの血小板にはTGF- $\beta$ 1とTGF- $\beta$ 2の両者が存在するが(22)、ヒトの血小板にはTGF- $\beta$ が豊富に存在する

にもかかわらず、TGF- $\beta$ 1 しか存在しない(22)。

一方、生物学的活性という見地からすると、TGF- $\beta$ 1 はまず高分子量の活性を示さない潜在型 (latent form TGF- $\beta$ 1、以下L-TGF- $\beta$ 1) として作られ、これは酸処理などによりはじめて活性化される(28,29)。TGF- $\beta$ は非常に多くの細胞に作用して強力な活性を有する物質であることから、そのin situでの活性化の機構はTGF- $\beta$ の作用の調節に関与しているものと考えられる。

そこで、この機構を解明するために、ヒト血小板からTGF- $\beta$ を潜在型のままで純化し、その構造を決定した(30)。さらに、L-TGF- $\beta$ 1の構造をもとに、TGF- $\beta$ がどのような機構で活性化されるかについて検討を加えた。

## b. 研究方法

細胞培養：ブタ大動脈由来血管内皮細胞は、ブタの大動脈をコラゲナーゼ処理して得た(31)。細胞は、10%ウシ胎児血清およびペニシリン・ストレプトマイシンを加えたHam's F-10培養液中で37℃で培養した。細胞の継代は、0.2%トリプシンで細胞を培養用ディッシュからはがした後、1:10の割合で新しいディッシュに播いて行った。ヒト赤白血病細胞HEL株(32)は、10%ウシ胎児血清およびペニシリン・ストレプトマイシンを加えたRPMI 1640培養液中で培養し、週2回の頻度で継代した。HELを巨核芽球様細胞に分化させるさいは、12-0-テトラデカノイル-ホルボル-13-アセテイト(TPA, シグマ社)を160nMの濃度で加え48時間培養した(32)。この後培養液をウシ胎児血清を含まないHam's F-10にかえさらに24時間培養し培養液を回収した。

TGF- $\beta$ 活性の測定：TGF- $\beta$ 活性は血管内皮細胞への[ $^3$ H]チミジンの取り込みの抑制によって測定した。測定にあたっては、ブタ大動脈由来血管内細胞を24穴プレート(Costar)に、1%ウシ胎児血清とペニシリン・ストレプトマイシンを含むHam's F-10培養液中で播き、24時間置いた後、測定するサンプルを加えた。16時間培養した後、0.2 $\mu$ Ciの[ $^3$ H]チミジン(6.7Ci/mmol, New England Nuclear)を加え、さらに8時間培養した。血管内皮細胞のDNAへの[ $^3$ H]チミジンの取り込みは、細胞を4℃で5%トリクロロ酢酸で処理した後、1M NaOHを加えて室温でタンパク質を溶解し、アクアゾール-2(New England Nuclear)を加え測定した(31,33)。

L-TGF- $\beta$ 1の純化：L-TGF- $\beta$ 1の純化にあたっては、PDGFの純化精製の最初の操作であるCM-セファデックス・クロマトグラフィー(34)のカラムに吸着しない画分、約15Lを一

回の操作に用いた。これはヒト血液 800~1,000Lから得られる血小板を用いた計算になる。サンプルはまずQAE-セファデックス・クロマトグラフィーを行なった(33)。カラムを10mMリン酸緩衝液(pH7.4) / 250mMNaClを含む溶液で洗った後、800mMNaClを含む溶液を加えてL-TGF- $\beta$ 1を溶出した。次に、得られたサンプルに硫酸アンモニウムを209g/L(35%飽和量)加えて4℃で2時間攪拌した後、2,075gで15分間遠心した。得られた沈澱物を回収し、100mlの150mMNaCl/10mMTris-HCl(pH7.4)に溶解した後、同じ溶液を用いて十分に透析した。得られたサンプルに等量の2M硫酸アンモニウム/10mMTris-HCl(pH7.4)溶液を加えて、2,075gで15分間遠心した後、前もって1M硫酸アンモニウム/10mMTris-HCl(pH7.4)溶液で平衡化したOctyl-Sepharoseカラム(20ml、ファルマシア社)に加えた。カラムは同じ溶液で洗った後、10mMTris-HCl溶液(硫酸アンモニウムを含まない)を加えて、L-TGF- $\beta$ 1を溶出した。得られたサンプルを10mMリン酸緩衝液(pH6.8) / 0.01mM $\text{CaCl}_2$ 溶液で透析した後、高速液体クロマトグラフィー(HP LC)用のハイドロキシルアパタイトカラム、HPHT(100×7.8mm、バイオラッド社)でさらに純化した。HPHTカラムは前もって10mMリン酸緩衝液(pH6.8) / 0.01mM $\text{CaCl}_2$ 溶液で平衡化し、サンプルを加えた後、0.5ml/minの流速で0.01mM $\text{CaCl}_2$ の存在下、10~300mM(pH6.8)のリン酸濃度勾配で、タンパク質を溶出した。hydroxylapatiteクロマトグラフィーで得られた分画のうち、L-TGF- $\beta$ 1を豊富に含むものを集めて、セントリコン10(アミコン社)を用いて100 $\mu$ lに濃縮し、Superose6カラム(HR10/30、ファルマシア社)に加えた。Superose6カラムはあらかじめ、500mMNaCl/10mMTris-HCl(pH7.4)溶液で平衡化し、同じ溶液で0.5ml/minの流速で溶出した。得られた分画のうちL-TGF- $\beta$ 1を多く含むものを集め、等量の2.8M硫酸アンモニウム/100mMリン酸緩衝液(pH6.8)を加え、あらかじめ1.4M硫酸アンモニウム/100mMリン酸緩衝液で平衡化したAlkyl-Superoseカラム(HR5/5、ファルマシア社)にかけた。カラムは100mMリン酸緩衝液(pH6.8)の存在下で1.4~0Mの硫酸アンモニウムの濃度勾配を加えて0.5ml/minの流速でタンパク質を溶出した。タンパク質の濃度は、特に記載しない限り、Bradfordの方法(35)に従って測定した。

SDS-ゲル電気泳動：SDS-ゲル電気泳動はBlobelおよびDobbersteinの方法(36)に従った。サンプルは10mMジチオスレイトール(DTT)の存在下もしくは非存在下で95℃、3分間加熱処理した後、ヨードアセタミドで酸化し、5~18%のアクリルアミドの濃度勾配を有するゲルに加えて泳動した。電気泳動後、ゲルはグルタルアルデヒドで固定し、銀染色を行

なった(37)。電気泳動の分子量マーカーとしては、ミオシン (200kDa)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116kDa)、ホスホリラーゼ b (94kDa)、ウシ血清アルブミン (67kDa)、卵白アルブミン (43kDa)、カルボニック・アンヒドラーゼ (30kDa)、ソイビーン・トリプシン・インヒビター (20.1kDa)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン (14.4kDa)を用いた。

逆相HPLCによる分離：逆相HPLCによる分離はアクアポア・ブチルBU-300カラム (7  $\mu$ m、2.1 $\times$ 30mmカートリッジ、Brownlee社)で行なった。サンプルは0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA)の存在下でアセトニトリルの濃度勾配にてタンパク質を溶出した。流速は100 $\mu$ l/min、カラムは35 $^{\circ}$ Cのオープン内で操作した。溶出液について、波長220nmで吸光度を測定した。

アミノ酸配列の分析：アミノ酸配列はアプライドバイオシステム社のモデル120A PTHアナライザーの付属したモデル470Aシーケンサーを用いて決定した。シーケンサーの1回毎の回収率は90~92%であった。

化学的脱糖鎖反応：化学的脱糖鎖反応は、Edgeら(38)およびHerzbergら(39)の方法によって、トリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS)を用いて行なった。サンプルは凍結乾燥した後、アニソール/TFMS液 (1:2の比) 200 $\mu$ lを加えて60分間室温で反応させた。この後サンプルをあらかじめ -40 $^{\circ}$ Cに冷却したジエチルエーテル400 $\mu$ lで希釈し、さらに等量の氷冷したピリジン (50%)を加えた。エーテル相を一旦除いた後、同様のエーテル抽出を3回くり返した。この後、サンプルを0.1M Tris-HCl (pH8.4) / 150mMグリシン / 0.1% SDS溶液で透析した後、凍結乾燥して、SDS-ゲル電気泳動、銀染色で解析した。

イムノプロットティング：TGF- $\beta$ 1 結合タンパク質に対する抗体は純化したTGF- $\beta$ 1 結合タンパク質もしくはKLHに結合させた合成ペプチドを家兎に注射して得た(40)。イムノプロットティングはSDS-ゲル電気泳動を行なった後、20%エタノール / 150mMグリシン / 20mM Tris-HCl (pH8.4) 溶液中で、室温で5時間、200mAの電流をかけてタンパク質をゲルからニトロセルロース膜上に移して行った(41)。非特異的なタンパク質の結合を150mM NaCl / 10mM Tris-HCl (pH7.4) / 5%ウシ血清アルブミン溶液で40 $^{\circ}$ C、30分間、ふ置してブロックした後、同じ溶液中に1:50の濃度比で抗血清を加えて、ニトロセルロース膜を室温で90分間反応させた。この後、ニトロセルロース膜を 150mM NaCl / 10mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液で10分間洗い、次に同じ溶液に0.05%トリトン X-100を加えた溶液で20分間ずつ2回洗った後、最後にもう一度トリトン X-100を含まない溶液で10分間洗った次に、ニトロセルロース膜を  $^{125}$ I で標識したプロテイン A (3 $\times$ 10<sup>5</sup> cpm/ml) を含んだ

150mM NaCl / 10mM Tris-HCl (pH 7.4) / 5% ウシ血清アルブミン溶液で30分間反応させた後、上に述べたのと同じ方法で洗い、オートラジオグラフィーによって解析した。

### c. 結果

L-TGF- $\beta$ 1 の純化精製：純化精製のさい TGF- $\beta$  活性はブタ大動脈由来の血管内皮細胞を標的細胞に用い、増殖抑制作用を見ることによってモニターした。測定に先だって、サンプルのうちの 5  $\mu$ l を取り、これに 25  $\mu$ l の 1 M HCl を加えて 30 分間室温に置いて TGF- $\beta$  を活性化した後、1M の NaOH で中和して測定に用いた。PDGF の純化精製のさいに得られる CM-セファデックスの素通り画分には L-TGF- $\beta$ 1 が豊富に含まれる。これは、TGF- $\beta$ 1 が塩基性タンパク質(42)であるのに対し、L-TGF- $\beta$ 1 は酸性タンパク質としての性質をもつことによる。この素通り画分を QAE-セファデックス・カラムに加え、pH 7.4 の条件で 75~250mM の NaCl で溶出する画分は血小板由来血管内皮細胞増殖因子の純化に(33)、250~800mM の NaCl で溶出する画分は以下に述べる L-TGF- $\beta$ 1 の純化に用いた。

QAE-セファデックス・クロマトグラフィーで得られたサンプルは 35% 硫酸沈澱によって精製し、さらに Octyl-Sepharose カラムを用いて純化した。次に HPLC のシステムを用いて hydroxylapatite クロマトグラフィーを行なうと、L-TGF- $\beta$ 1 は比較的ゆるやかなピークで溶出してきた(図 1A)。そこで L-TGF- $\beta$ 1 を最も豊富に含む画分を集めて濃縮し、Superose 6 カラムを用いてゲル濾過を行なった。L-TGF- $\beta$ 1 はサイログロブリンとフェリチンの間の位置に溶出し、ゲル濾過では分子量約 500kDa と計算された(図 1B)。純化精製の最後の操作は Alkyl-Superose クロマトグラフィーによって行なった。サンプルを 1.4M の硫酸アンモニウム濃度でカラムに加え、硫酸アンモニウムの濃度勾配によってタンパク質を溶出することにより L-TGF- $\beta$ 1 を 90% 以上の純度で得た(図 1C)。

Alkyl-Superose クロマトグラフィーによって得られる画分を SDS-ゲル電気泳動および銀染色を行なって含まれているタンパク質成分を解析した(図 1D)。非還元条件のもとでは分子量 25,000 と 210,000 のタンパク質が TGF- $\beta$ 1 活性と一致して観察され、これらが、L-TGF- $\beta$ 1 複合体を構成していると考えられた。分子量 110,000 のタンパク質が L-TGF- $\beta$ 1 に近接してカラムから溶出したが、TGF- $\beta$  活性とは明らかに異なる画分に豊富に見られた。還元条件のもとでは、TGF- $\beta$  活性を含む画分には分子量 13,000、40,000、125,000、135,000、150,000、160,000 の少なくとも 6 種のタンパク質が観察された(図 1D)。

300g の血小板由来のタンパク質からの純化精製を表 I にまとめた。TGF- $\beta$  活性は

2,000倍に増加し、純化したL-TGF- $\beta$ 1 では 5ng/mlの濃度で血管内皮細胞増殖抑制の最大活性が認められた。

L-TGF- $\beta$ 1 のゲル濾過による解析 : L-TGF- $\beta$ 1 を中性のpHの条件でゲル濾過すると分子量約500kDaの位置に溶出した (図2A)。一方、TGF- $\beta$ が活性化されるpH3.4 の条件で一旦L-TGF- $\beta$ 1 を処理し (図 6参照)、この後pH5.0のもとで、Superose6 クロマトグラフィーを行なうと、TGF- $\beta$ 活性はカラムの総容量(Vt)の位置に分子量約25,000のタンパク質として溶出してきた (図2B,C)。この分子量約25,000のタンパク質は還元条件のもとでは分子量約13,000となり、TGF- $\beta$ 1 そのものであると思われる。一方、タンパク質の大部分は、中性のpHで溶出した場合と同様に、分子量約 440,000の位置に溶出した。これを、SDS-ゲル電気泳動と銀染色で解析すると、210kDaのタンパク質が非還元の条件下で観察され (図2C) さらにこれを還元条件のもとで調べると、分子量40kDaと125~160kDaのタンパク質となった。25kDaのTGF- $\beta$ 1 と思われるタンパク質もゲル濾過で440kDa付近に溶出するのが観察されたが、これらの画分ではあらかじめ酸で処理しない限り、TGF- $\beta$ 活性はほとんど見られなかった。このことは、このpHの条件ではL-TGF- $\beta$ 1 の活性化が不十分であることによるものか (図 6参照)、または、一旦活性化されたあとでもTGF- $\beta$ が210kDaのタンパク質と再び結合しやすいという性質を有することによるものか、いずれかの理由によるものと考えられる。より低いpHでゲル濾過を試みたが、タンパク質がゲル基質に吸着され、満足できる結果は得られなかった。

L-TGF- $\beta$ 1 の構成成分の分離とその特徴 : L-TGF- $\beta$ 1 を構成するタンパク質を明らかにするため、純化したL-TGF- $\beta$ 1 をnarrow-bore C4カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにかけて分画したところ、3つのピークが得られた (図3A)。非還元の条件でSDS-ゲル電気泳動を行なうと、ピーク bは25kDaのタンパク質を含み、ピーク cは210kDaのタンパク質を含んでいた (図3C)。ピーク aは少量混入した110kDaのタンパク質 (図1D) に相当した。N末端のアミノ酸配列を決定したところ、25kDaのタンパク質は、Ala-Leu-Asp-Thr-Asn-Tyr-X-Phe-Ser-Ser-Thr-Glu (図3D) というアミノ酸配列を有し、これはヒトTGF- $\beta$ 1 のN末端側のアミノ酸配列(20)と同一であった。

図3Aのピーク cに見られる210kDaのタンパク質は還元条件のもとで電気泳動を行なうといくつかのバンドが見られる (図3C)。このため、ピーク cで得られたサンプルを一旦DTTで還元した後、4-ビニルピリジンで処理して、narrow-bore C4カラムでもう一度逆相クロマトグラフィーを行なった (図3B)。この結果、3つのピークが得られたが、ピーク

f は40kDaのタンパク質に、ピーク e は95~120kDaのタンパク質に相当した (図3C)。ピーク e の95~120kDaのタンパク質は還元条件下で電気泳動を行なうと図1Dや図4で見られる125~160kDaのタンパク質であった。一方ピーク d にはタンパク質のバンドは見られず (図3C)、おそらく加えた試薬による副産物であると思われる。

40kDa のタンパク質 (図3Bのピーク f)のN末端側のアミノ酸配列を決定したところ、Leu-Ser-Thr-Cys-Lys-Thr-Ile-Asp-Met-Glu-Leu-Val-Lys というアミノ酸配列が得られ、これはTGF- $\beta$ 1 の前駆体の一部のアミノ酸配列と同一であった。この配列はTGF- $\beta$ 1 前駆体の翻訳開始部位から30番目のアミノ酸残基から始まっており、この部分で疎水性のシグナル配列が切断されたことを示す。

図3Bのピーク e で得られるサンプルをSDS ゲル電気泳動で解析するといくつかのタンパク質のバンドが見られるが、逆相クロマトグラフィーでは単一の均一なピークとして溶出してくることから、これらのタンパク質は互いに関連のあるもの (おそらくは一つのタンパク質から由来するもの) であると考えた。そしてこのタンパク質をTGF- $\beta$ 1-結合タンパク質 (TGF- $\beta$ 1-BP) と名付けた。

Alkyl-SuperoseクロマトグラフィーでL-TGF- $\beta$ 1 と近接して溶出した110kDaのタンパク質 (図1C,D) をさらに詳細に解析した。このタンパク質をnarrow-bore C4のカラムで逆相クロマトグラフィーを行なうと30%のアセトニトリル濃度で均一なピークとして溶出し、これはTGF- $\beta$ 1-BPですでに得られた結果と類似している。さらにこの110kDaのタンパク質を還元した条件下でSDS-ゲル電気泳動を行なうと分子量125,000-160,000の間にいくつかのバンドが見られた。これらの結果から110kDaのタンパク質はTGF- $\beta$ 1-BPの遊離型であることが明らかとなった。

TGF- $\beta$ 1-BPのN末端側のアミノ酸配列を決定することを試みたが、N末端側はブロックされており、アミノ酸配列は得られなかった。このため、TGF- $\beta$ 1-BPをトリプシン処理して得られた分解産物を用いてアミノ酸配列を決定した(43)。この結果、TGF- $\beta$ 1-BPはこれまで知られているタンパク質とは明らかに異なるが、上皮成長因子(EGF)様のアミノ酸配列をくり返し有する一群のタンパク質ファミリーに属することが明らかになった(44)。

L-TGF- $\beta$ 1 の構造の解析 : L-TGF- $\beta$ 1 を構成するタンパク質が複合体の中でどのような構造を取っているかを明らかにするために、まずL-TGF- $\beta$ 1 をさまざまな濃度のDTT で処理し、SDS-ゲル電気泳動および銀染色で解析した (図4)。この結果、0.5~1.0mM DTT、37°C、30分の処理で、25kDaのTGF- $\beta$ 1 (2量体) は13kDaの単量体に切断された。210



kDaのタンパク質は、0.05mMのDTTで処理すると、分子量40,000、80,000、110,000の3つのタンパク質に分かれた。しかし、より高い濃度のDTTで処理すると分子量80,000のタンパク質は消失して分子量40,000のバンドがより濃くなった。このことは、80kDaのタンパク質は40kDaのタンパク質すなわちTGF- $\beta$ 1 前駆体のN末端部分がS-S結合で結合した2量体構造を作ること示す。一方、予想された通り、TGF- $\beta$ 1-BPはDTT濃度が高くなるにつれて分子量が110kDaから125-160kDaへと移行した。このことから210kDaのタンパク質は40kDaのタンパク質の2量体に、110kDaのTGF- $\beta$ 1-BPが結合した構造から成ると考えられる。TGF- $\beta$ 1-BPが210kDaのタンパク質複合体中に1個存在するか、2個あるかは明らかではないが、210kDaという分子量と、DTTの濃度を増加させていく過程で210kDaと110kDaの間に中間の分子量をもつバンドが観察されないことから、L-TGF- $\beta$ 1 はTGF- $\beta$ 1-BPを1個持っていると考えるのが妥当であろう。

TGF- $\beta$ 1 前駆体のN末端部分とTGF- $\beta$ 1-BPとの結合はSDS では解離しない。図4で明らかになった通り、TGF- $\beta$ 1-BPが1個しか存在しないと考えると、L-TGF- $\beta$ 1 は非対称性の構造を取ることになることから、TGF- $\beta$ 1-BPがTGF- $\beta$ 1 前駆体のN末端部分と非常に強固であるが非共有結合を形成している可能性を考え、以下の実験を行なった。純化したL-TGF- $\beta$ 1 を凍結乾燥した後、8M尿素を加えて95°Cで3分間加熱した。このサンプルを非還元条件下でSDS-ゲル電気泳動および銀染色を行なったが、こうした処理にもかかわらず210kDaのタンパク質複合体には変化が見られなかった。このことは、TGF- $\beta$ 1-BPが40kDaのTGF- $\beta$ 1 前駆体のN末端部分の2量体とS-S結合以外の強固な非共有結合で結合している可能性はきわめて少ないことを示している。

L-TGF- $\beta$ 1 の構造をさらに詳細に検討するためにTFMSを用いて化学的脱糖鎖を行なった(図5)。非還元条件のもとでSDS-ゲル電気泳動を行なうと、TFMS処理により210kDaのタンパク質は150-160kDaへと移行した。一方、25kDaのTGF- $\beta$ 1 はAsn 結合型の糖鎖は含まないことが知られており(20)、TFMS処理でも変化しなかった。還元剤で処理した条件下では40kDaのTGF- $\beta$ 1 前駆体N末端部分はTFMS処理で31kDaとなり、一方125-160kDaのTGF- $\beta$ 1-BPは115~125kDaとなった。これらの結果は、図4で得られたL-TGF- $\beta$ 1 複合体の構造を支持するものである。すなわち、糖タンパク質のコアの部分で計算すると、2個のTGF- $\beta$ 1 前駆体のN末端部分(31kDa)と1個のTGF- $\beta$ 1-BP(115-125kDa)で合計した分子量は図5で得られた分子量150~160kDaとほぼ一致する。

L-TGF- $\beta$ 1 の活性化 : L-TGF- $\beta$ 1 を種々のpHで室温で2時間処理すると、血管内皮細胞

の増殖抑制活性はpH3.5以下もしくはpH12.5以上で出現した(図6)。

さらにL-TGF- $\beta$ 1をさまざまな化学的処理を行なってTGF- $\beta$ の活性化を観察したところ、0.02% SDSや8Mの尿素による処理によってTGF- $\beta$ が活性化された。しかし、95°C 3分の熱処理や5MのNaCl処理では活性化されなかった(表II)。

ヒト巨核芽球様細胞株の産生するL-TGF- $\beta$ の構造：ヒトHEL細胞株を160 nM TPAで37°Cで48時間培養して巨核芽球様細胞に分化させた後、ウシ胎児血清を含まないHam's F-10培養液でさらに24時間培養して培養液を得た。この培養液中には、TPAで処理しないHEL株から得た培養液に比して約20倍のTGF- $\beta$ 活性が見られた。培養液を濃縮してSDS-ゲル電気泳動を行ない、TGF- $\beta$ 1-BP抗体を用いてイムノブロッティングを行なうと、非還元条件下では210kDaと110kDaの2本のバンドが、還元条件下では125-160kDaの数本のバンドが見られた(図7)。このことから巨核芽球様細胞が産生する潜在型のTGF- $\beta$ も、ヒト血小板から得られるL-TGF- $\beta$ 1と類似した構造を有することが示唆された。

#### d. 考察

TGF- $\beta$ 1を潜在型のままで純化したのは今回の報告が初めてである。ここで示した結果から明らかな様に血小板から純化したL-TGF- $\beta$ 1は分子量13,000、40,000、125,000-160,000の少なくとも3種類のタンパク質から構成されている。アミノ酸配列を決定した結果、この3種類のタンパク質はそれぞれTGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1前駆体のN末端部分、そして全く新しいタンパク質であるTGF- $\beta$ 1-BPであった。

今回得られたTGF- $\beta$ 1は2量体構造を取っており分子量もこれまで報告されている酸による抽出によって血小板から得たTGF- $\beta$ 1と同じであった(45)。今回の方法でもヒト血小板からはTGF- $\beta$ 2は得られなかった。

40kDaのタンパク質のN末端側のアミノ酸配列を決定したところ、TGF- $\beta$ 1前駆体の転写開始部位から30番目のロイシン残基から始まるアミノ酸配列が得られた。TGF- $\beta$ 1前駆体の第27および29番目のアミノ酸はそれぞれアラニン、グリシンという小さくて中性のアミノ酸であり、これはシグナル配列を取り除くための切断が起こりやすい部位に相当する(46)。TGF- $\beta$ 1前駆体の単量体からシグナルペプチドと活性型のTGF- $\beta$ 1の部分を除くと、分子量は計算上は28kDaとなり、これはTFMSで化学的脱糖鎖を行なった結果得られたタンパク質の分子量31kDa(図5)とよく一致する。このことはTGF- $\beta$ 1がその前駆体との間では単一の切断点で切断されていることを示す。TGF- $\beta$ 1前駆体にはAsn結合型の糖鎖が

結合できる部位が3ヶ所存在する。これらの部位に糖鎖が結合することによってSDS-ゲル電気泳動によって観察された40kDaのバンドになると考えられる。活性を有するTGF- $\beta$ 1分子と同様、TGF- $\beta$ 1前駆体のN末端部分もS-S結合で2量体を形成することが明らかとなった(図4)。TGF- $\beta$ 1前駆体のN末端部分は単量体あたり3個のシステイン残基を有しており、このシステイン残基がTGF- $\beta$ 1前駆体のN末端部分による2量体の形成およびTGF- $\beta$ 1-BPとの結合に使われているはずである。

L-TGF- $\beta$ 1の構造のモデルを図8に示す。TGF- $\beta$ 1前駆体の2量体のうちN末端の部分が1個のTGF- $\beta$ 1-BPとS-S結合で結合している。SDS-ゲル電気泳動の結果からL-TGF- $\beta$ 1複合体中にはTGF- $\beta$ 1-BPが1個存在すると考えるのが適切と思われる。すなわち、2個のTGF- $\beta$ 1前駆体N末端部分(40kDa $\times$ 2)と1個のTGF- $\beta$ 1-BP(125-160kDa)で合計205-240kDaとなり、SDS-ゲル電気泳動で観察された210kDaと一致する。高分子量の糖タンパク質はSDS-ゲル電気泳動ではしばしば実際の分子量より小さい分子量の位置に観察されることから、L-TGF- $\beta$ 1を化学的に脱糖鎖処理を行なってSDS-ゲル電気泳動を行なった。この結果では、2個の脱糖鎖を行なったTGF- $\beta$ 1前駆体N末端部分(31kDa $\times$ 2)と1個の脱糖鎖を行なったTGF- $\beta$ 1-BP(115-125kDa)で合計175-185kDaとなり、実際にSDS-ゲル電気泳動で得られた分子量150-160kDa(図5)とよく一致し、やはりL-TGF- $\beta$ 1複合体中にはTGF- $\beta$ 1-BPは1個しか存在しないということが支持された。これらの結果はL-TGF- $\beta$ 1の構造が非対称性であることを意味する。すなわち、1個のTGF- $\beta$ 1-BPが2個のN末端部分のそれぞれとS-S結合を形成するか、もしくはTGF- $\beta$ 1-BPが前駆体のN末端部分の2量体のうちの1個のみと結合していることを意味する。

L-TGF- $\beta$ 1の分子サイズをSDS-ゲル電気泳動の結果から計算すると235kDa(210+25kDa)で、これはゲル濾過の溶出部位(図2)から計算される分子サイズの約半分である。235kDaのL-TGF- $\beta$ 1はゲル濾過のさいにその分子量に比して速やかに溶出されてくるのかもしれないが、むしろL-TGF- $\beta$ 1複合体そのものもゲル濾過のさいには2量体を形成している可能性が考えられる。

TGF- $\beta$ 1前駆体のcDNAが最近チャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞に発現され、そのタンパク質産物の特徴が調べられた(47)。SDS-ゲル電気泳動とイムノブロッティングの結果から、前駆体タンパク質が大量に作られ、その一部がタンパク分解されてプロセッシングを受けていることが明らかとなった。また、ほとんどのTGF- $\beta$ 1活性は潜在型のままであったが、共有結合したTGF- $\beta$ 結合タンパク質は認められなかった。遺伝子組み換え型TGF-

$\beta 1$  の場合も TGF- $\beta$  活性が出現するためには一旦、酸で処理することが必要で、このことから TGF- $\beta 1$  が潜在型であるためには、TGF- $\beta 1$  前駆体の N 末端側が最も重要であると考えられこの部分を TGF- $\beta 1$ -LAP (latency associated peptide) と呼ぶことになった。

今回の実験結果からその存在が明らかとなった 125-160kDa の TGF- $\beta 1$ -BP の作用は現在のところ明らかでない。アミノ酸配列が一部明らかになった結果では、TGF- $\beta 1$ -BP は EGF 様の繰り返し配列を有する一群のタンパク質ファミリーに属することが分かった。この様な繰り返し配列は、凝固系に関与するセリンプロテアーゼや、ある種の細胞膜受容体、増殖因子などでも見られる (44)。チャイニーズハムスターの卵巣細胞に発現された TGF- $\beta 1$  の結果を見る限り、TGF- $\beta 1$ -BP は TGF- $\beta 1$  活性が潜在型であるのに必須ではない。TGF- $\beta 1$ -BP がプロテアーゼであり、TGF- $\beta 1$  のプロセッシング関与している可能性も考えられ、今後の研究を要する。

今回の研究からヒト巨核芽球様白血病細胞株も TGF- $\beta 1$ -BP を産生しており、チャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞に発現させた遺伝子組み換え型の TGF- $\beta$  ではなく、血小板から得られる潜在型 TGF- $\beta$  に似た構造をもつことが明らかとなった (図 7)。ヒトのホルモン依存性乳癌細胞株 MCF-7 は抗エストロゲン剤で増殖が抑制される細胞で、TGF- $\beta$  を産生する。抗エストロゲン剤で処理すると MCF-7 細胞では潜在型の TGF- $\beta$  の産生が増加するばかりでなく、酸処理を必要としないすでに活性型となった TGF- $\beta$  の量も増加することが明らかとなった (48)。この様に MCF-7 細胞を抗エストロゲン剤で処理すると、潜在型と活性型 TGF- $\beta$  の全体の産生が増加するばかりでなく、TGF- $\beta$  の活性化も促進され、L-TGF- $\beta$  の活性化機構が MCF-7 細胞ではホルモン依存性に調節されていることが示唆された。

最近、血清中のフィブロネクチン (49) や  $\alpha_2$  - マクログロブリン (50, 51) が遊離した TGF- $\beta 1$  と結合することが報告された。フィブロネクチンと結合した TGF- $\beta 1$  は依然として活性型のままであるが、 $\alpha_2$  - マクログロブリンと結合すると TGF- $\beta 1$  は不活性型となる (50, 51)。ここで示した TGF- $\beta 1$ -BP はフィブロネクチンや  $\alpha_2$  - マクログロブリンとは明らかに異なっている。TGF- $\beta 1$  は L-TGF- $\beta 1$  として血小板などに蓄積されており、これが一旦放出され活性化されると  $\alpha_2$  - マクログロブリンなどのタンパク質が結合して不活化し、取り除くと考えられる。L-TGF- $\beta 1$  は酸やアルカリ、SDS、尿素などの化学的処理によって活性化される (図 6 および表 II)。TGF- $\beta 1$  がさまざまな化学的処理によって活性化されることから、TGF- $\beta 1$  そのものはすでに TGF- $\beta 1$  前駆体の N 末端側から切断されており、210kDa の複合体と非共有的に結合して存在すると考えられる。もう一つの可能性

性として、これらの化学的処理によってすみやかにタンパク分解がおり、活性型TGF- $\beta$  1が前駆体タンパク質から切断されて放出されてくるということも否定できない。しかし最近の我々の研究によると、TGF- $\beta$ 前駆体N末端部分に存在する糖鎖が重要な役割を有しており、糖鎖を切断もしくは修飾することのみでTGF- $\beta$ が活性化されることが明らかとなり(52)、後者の可能性は低いと考えられる。TGF- $\beta$ 1はさまざまな細胞で産生されると同時にこれらの細胞に強力な作用を有することから、潜在型の複合体からの活性化機構は生体内で巧妙に調節されていると思われる。TGF- $\beta$ が生体内でどの様にして活性化されるかを明らかにすることが今後の研究の最も重要な目標である。

#### e. まとめ

ヒトTGF- $\beta$ 1を高分子量の潜在型として純化精製した。ヒトL-TGF- $\beta$ 1は25kDaのTGF- $\beta$ 1(2量体)と、これに非共有的に結合した210kDaのタンパク質とから構成されていた。210kDaのタンパク質は40kDaのTGF- $\beta$ 1前駆体のN末端部分が2量体を形成し、さらにこれに全く新しいタンパク質であるTGF- $\beta$ 1-BP(125-160kDa)が1個、S-S結合で結合したものであった。純化したL-TGF- $\beta$ 1は強度の酸やアルカリ、0.02%のSDS、8M尿素で活性化されたが、熱処理(95°C、3分)や5M NaClでは活性化されなかった。

(付) 本論文で用いた略語は以下の通りである。

PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; L-TGF- $\beta$ 1, latent form of TGF- $\beta$ 1; TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; HPLC, high performance liquid chromatography; SDS, sodium dodecyl sulphate; DTT, dithiothreitol; TFA, trifluoroacetic acid; TFMS, trifluoromethane sulfonic acid; KLH, keyhole limpet hemocyanin; TGF- $\beta$ 1-BP, TGF- $\beta$ 1-binding protein; EGF, epidermal growth factor; TGF- $\beta$ 1-LAP, TGF- $\beta$ 1-latency associated peptide.

f. 文献

1. Heldin, C.-H., Betsholtz, C., Claesson-Welsh, L., and Westermarck, B. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 907: 219-244
2. Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1988) *Nature* 332: 217-219
3. Klein, G. (1987) *Science* 238: 1539-1545.
4. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., and Assoian, R.K. (1986) *Science* 233: 532-534.
5. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., and de Crombrughe, B. (1987) *J. Cell Biol.* 105: 1039-1045.
6. Massague, J. (1987) *Cell* 49: 437-438.
7. Tucker, R.F., Shipley, G.D., Moses, H.L., and Holley, R.W. (1984) *Science* 226: 705-707.
8. Frater-Schroder, M., Muller, G., Birchmeier, W., and Bohlen, P. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 295-302.
9. Baird, A., and Durkin, T. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 476-482.
10. Heimark, R.L., Twardzik, D.R., and Schwartz, S.M. (1986) *Science* 233: 1078-1080.
11. Takehara, K., Leroy, C., and Grotendorst, G. (1987) *Cell* 49: 415-422.
12. Kehrl, J.H., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S.B., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986) *J. Immunol.* 137: 3855-3860.
13. Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew,

- S.B., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050.
14. Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Bassols, A., and Massague, J. (1987) *Nature* 329: 539-541.
15. Hino, M., Tojo, A., Miyazono, K. Urabe, A., and Takaku, F. (1988) *Brit. J. Haematol.* 70: 143-147.
16. Keller, J.R., Sing, G.K., Ellingsworth, L.R., and Ruscetti, F.W. (1989) *J. Cell. Biochem.* 39: 175-184
17. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4167-4171.
18. Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M.B., and Deuel, T.F. (1987) *Science* 237: 1333-1336.
19. Wiseman, D.M., Polverini, P.J., Kamp, D.W., and Leibovich, S.J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 793-800
20. Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Goeddel, D.V. (1985) *Nature* 316: 701-705.
21. Derynck, R., Rhee, L., Chen, E.Y., and Tilburg, A.V. (1987) *Nucl. Acid. Res.* 15: 3188-3190.
22. Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L.-S., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R., and Massague, J. (1987) *Cell* 48: 409-415.

23. Seyedin, S.M., Segarini, P.R., Rosen, D.M., Thompson, A.Y., Bentz, H., and Graycar, J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 1946-1949.
24. Wrann, M., Bodmer, S., de Martin, R., Siepl, C., Hofer-Warbinek, R., Frei, K., Hofer, E., and Fontana, A. (1987) *EMBO J.* 6: 1633-1636.
25. Marquardt, H., Lioubin, M.N., and Ikeda, T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12127-12131.
26. Ten Dijke, P., Hansen, P., Iwata, K.K., Pieler, C., and Foulkes, J.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4715-4719.
27. Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J., Moses, H.L., and Chen, E.Y. (1988) *EMBO J.* 7: 3737-3743.
28. Pircher, R., Lawrence, D.A., and Jullien, P. (1984) *Cancer Res.* 44: 5538-5543.
29. Wakefield, L.M., Smith, D.M., Masui, T., Harris, C.C., and Sporn, M.B. (1987) *J. Cell Biol.* 105: 965-975.
30. Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., and Heldin, C.-H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 6407-6415.
31. Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Yamanaka, M., and Takaku, F. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 83-88.
32. Tabilio, A., Rosa, J.-P., Testa, U., Kieffer, N., Nurden, A.T., Del Canizo, M.C., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W. (1984) *EMBO J.* 3: 453-459.
33. Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F., and Heldin, C.-H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 4098-4103.

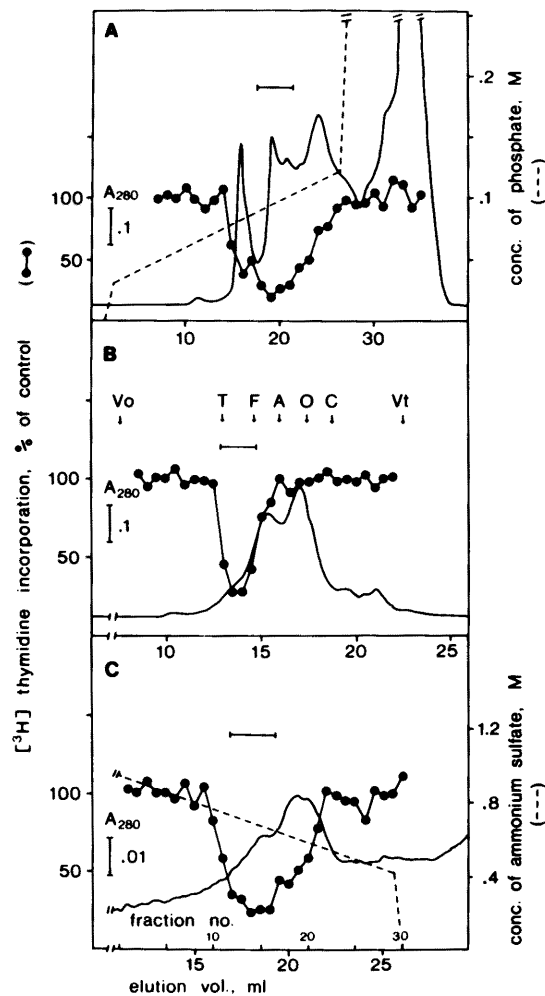


34. Heldin, C.-H., Johnsson, A., Ek, B., Wennergren, S.,  
Ronnstrand, L., Hammacher, A., Faulders, B.,  
Wasteson, A., and Westermarck, B. (1987) *Methods  
Enzymol.* 147: 3-13.
35. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
36. Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell Biol.*  
67: 835-851.
37. Morrissey, J.H. (1981) *Anal. Biochem.* 117: 307-310.
38. Edge, A.S.B., Faltynek, C.R., Hof, L., Reichert, L.E.,  
and Weber, P. (1981) *Anal. Biochem.* 118: 131-137.
39. Herzberg, V.L., Grigorescu, F., Edge, A.S.B., Spiro,  
R.G., and Kahn, C.R. (1985) *Biochem. Biophys. Res.  
Commun.* 129: 789-796.
40. Miyazono, K., and Heldin, C.-H. (1989) *Biochemistry*  
28: 1704-1710.
41. Burnette, W.N. (1981) *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
42. Frolok, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M.,  
and Sporn, M.B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
80:3676-3680.
43. Hellman, U., Miyazono, K., Wernstedt, C., and Heldin,  
C.-H. (1989) manuscript in preparation.
44. Apella, E., Weber, I.T., and Blasi, F. (1988) *FEBS  
Lett.* 231: 1-4.
45. Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller,  
D.M., and Sporn, M.B. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:  
7155-7160.
46. von Heine, G. (1984) *J. Mol. Biol.* 173: 243-251.
47. Gentry, L.E., Webb, N.R., Lim, G.J., Brunner, A.M.,

- Ranchalis, J.E., Twardzik, D.R., Lioubin, M.N.,  
Marquardt, H., and Purchio, A.F. (1987) *Mol. Cell.  
Biol.* 7: 3418-3427.
48. Knabbe, C., Lippman, M.E., Wakefield, L.M., Flanders,  
K.C., Kasid, A., Derynck, R., and Dickson, R.B.  
(1987) *Cell* 48: 417-420.
49. Fava, R.A., and McClure, D.B. (1987) *J. Cell. Physiol.*  
131: 184-189.
50. O'Connor-McCourt, M.D., and Wakefield, L.M. (1987) *J.  
Biol. Chem.* 262: 14090-14099.
51. Huang, S.S., O'Grady, P., and Huang, J.S. (1988) *J.  
Biol. Chem.* 263: 1535-1541.
52. Miyazono, K., and Heldin, C.-H. (1989) *Nature* 338:  
158-160.
53. Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., and Goeddel,  
D.V. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 4377-4379.

図 1 L-TGF- $\beta$ 1 の純化精製

純化精製は“研究方法”の項で示した方法で行なった。(A) HPLCを用いたhydroxylapatiteクロマトグラフィー。TGF- $\beta$ のバイオアッセイにあたっては、各画分から5  $\mu$ Qを取って1M HCl 25  $\mu$ Qを加えてTGF- $\beta$ を活性化し、1M NaOHで中和した後、細胞に2  $\mu$ Q/wellの濃度で加えた。(B) Superose 6クロマトグラフィー。TGF- $\beta$ のバイオアッセイのためのサンプルの調整は(A)に示した方法で行なった。分子量マーカー (T:サイログロブリン、669kDa; F:フェリチン、440kDa; A:アルドラーゼ、158kDa; O:卵白アルブミン、43kDa; C:キモトリプシノーゲン、25kDa)を矢印で示した。(C) Alkyl-Superoseクロマトグラフィー。サンプルの調整は(A)で示した通りだが、細胞には4  $\mu$ Q/wellの濃度で加えた。A, B, Cで—で示した画分を集めて次の精製段階へ用いるか、もしくは純化したL-TGF- $\beta$ 1として用いた。(D) SDS-ゲル電気泳動および銀染色による、Alkyl-Superoseクロマトグラフィーから得た画分の解析。SDS-ゲル電気泳動はDTTの存在下もしくは非存在下で行なった。



**D**

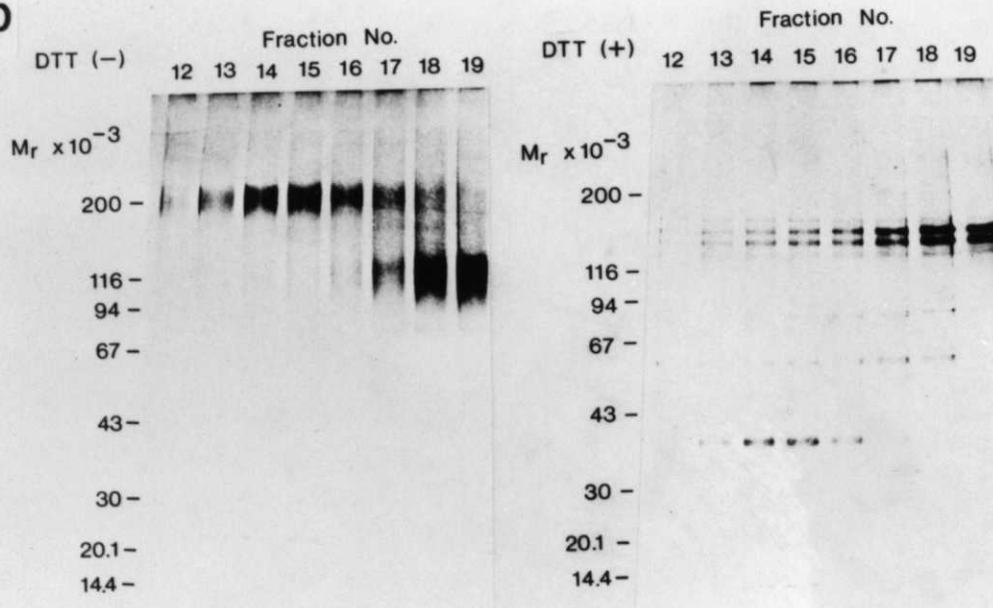


図 2 L-TGF- $\beta$ 1 のゲル濾過による解析

Alkyl-Superoseクロマトグラフィーより得たサンプルを濃縮した後、(A) 20mM Tris-HCl (pH7.4) / 500mM NaCl 溶液中、もしくは(B) 100mM 酢酸アンモニウム (pH5.0) 溶液中でゲル濾過を行なった。(B) で用いたサンプルは22°Cで30分間pH3.4 で処理した後、カラムにかけた。TGF- $\beta$ のバイオアッセイは酸による処理を行なったもの (●) と行なわなかったもの (○) の両方のサンプルを用いて測定した。(C) にはパネル(B) で得られた画分の非還元条件下でのSDS-ゲル電気泳動および銀染色による解析結果を示した。

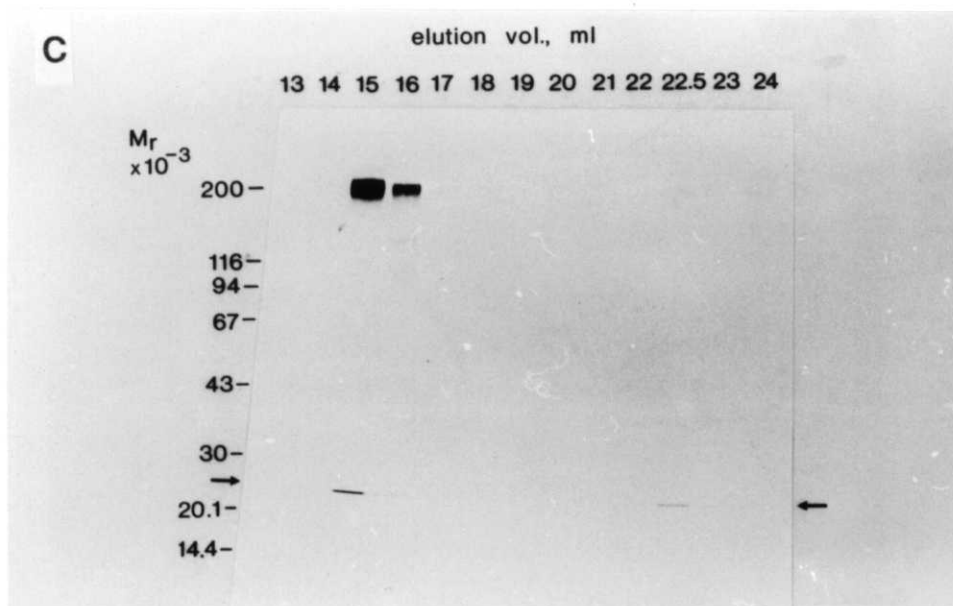
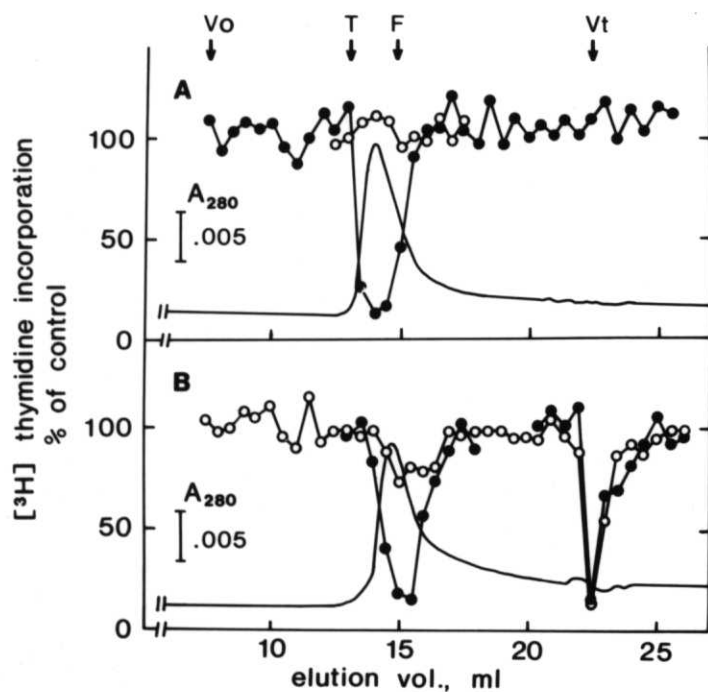
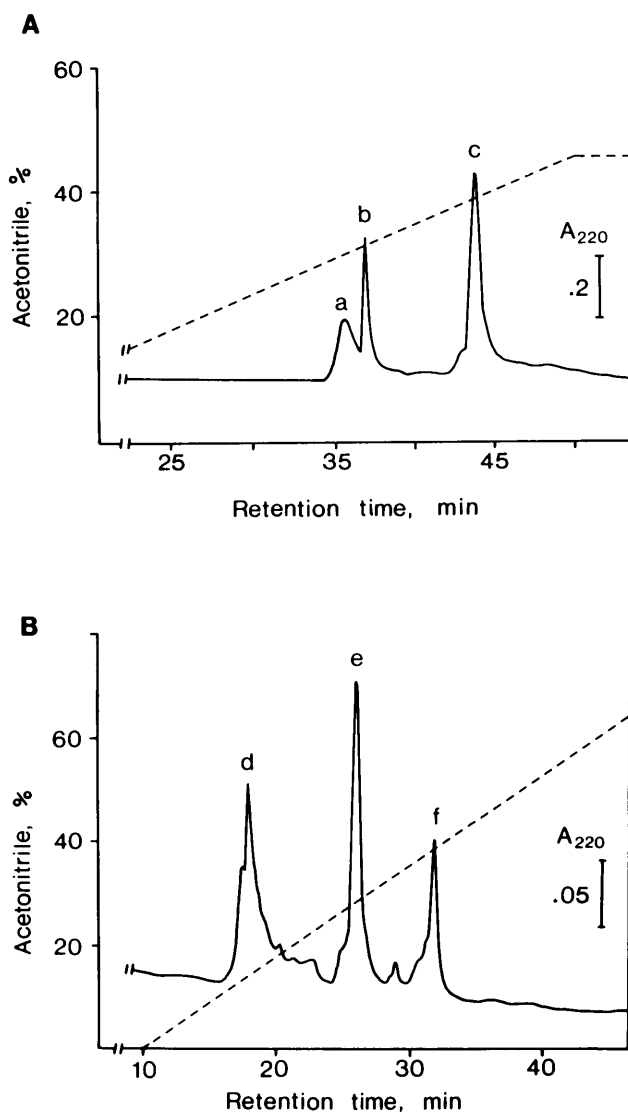
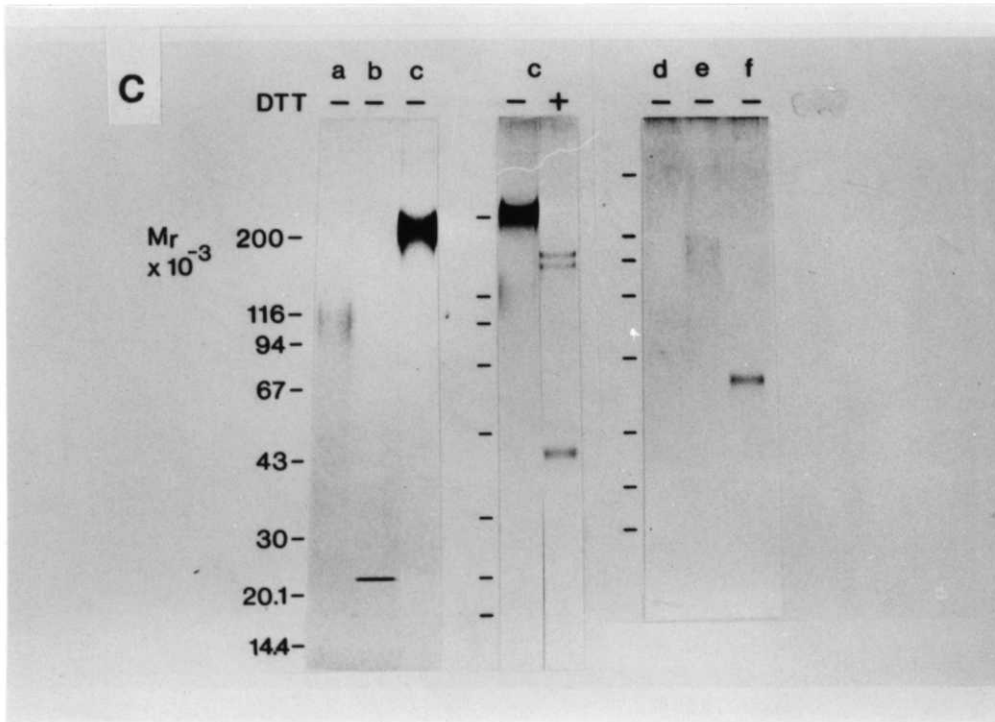


図 3 逆相HPLCクロマトグラフィーとアミノ酸配列の決定

(A) L-TGF- $\beta$ 1 の逆相クロマトグラフィー。Alkyl-Superoseで得られたサンプルを narrow-bore C4カラムにかけ、0.1%TFAの存在下でアセトニトリルの濃度勾配で溶出した。(B) 分子量 210,000のタンパク質を還元後の narrow-bore C4クロマトグラフィー。(A) で得られたピークc のサンプルをDTT で処理した後、narrow-bore C4カラムでもう一度分離した。(C) ピーク a ~ f で得られたサンプルの SDS-ゲル電気泳動および銀染色による解析。(D) ピーク b および f で得られたタンパク質のアミノ酸配列と TGF- $\beta$ 1 前駆体(20)のアミノ酸配列との比較。矢印はピーク b および f のサンプルから得たアミノ酸配列を示す。シグナル配列は上の線で示した。C 末端側の活性型 TGF- $\beta$ 1 は枠でかこった。3ヶ所の Asn 結合型糖鎖が結合できる部位は上の太線で示した。





**D**

1 MPPSGRLRLPLLLPLLWLLVLTGPPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEAIR  
f →

51 GQILSKRLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPE

101 ADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLL

151 SRAELRLLRRLKLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLNRLLAPSDSPEWLSFD

201 VTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLAT

251 IHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLY  
b →

301 IDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPG

351 ASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

図 4 種々のDTT濃度によるL-TGF- $\beta$ 1 の構成成分の分離

純化したL-TGF- $\beta$ 1 を2%SDS の存在下で種々の濃度のDTTを加え37°Cで30分間処理した。サンプルはアルキル化した後SDS-ゲル電気泳動および銀染色で解析した。

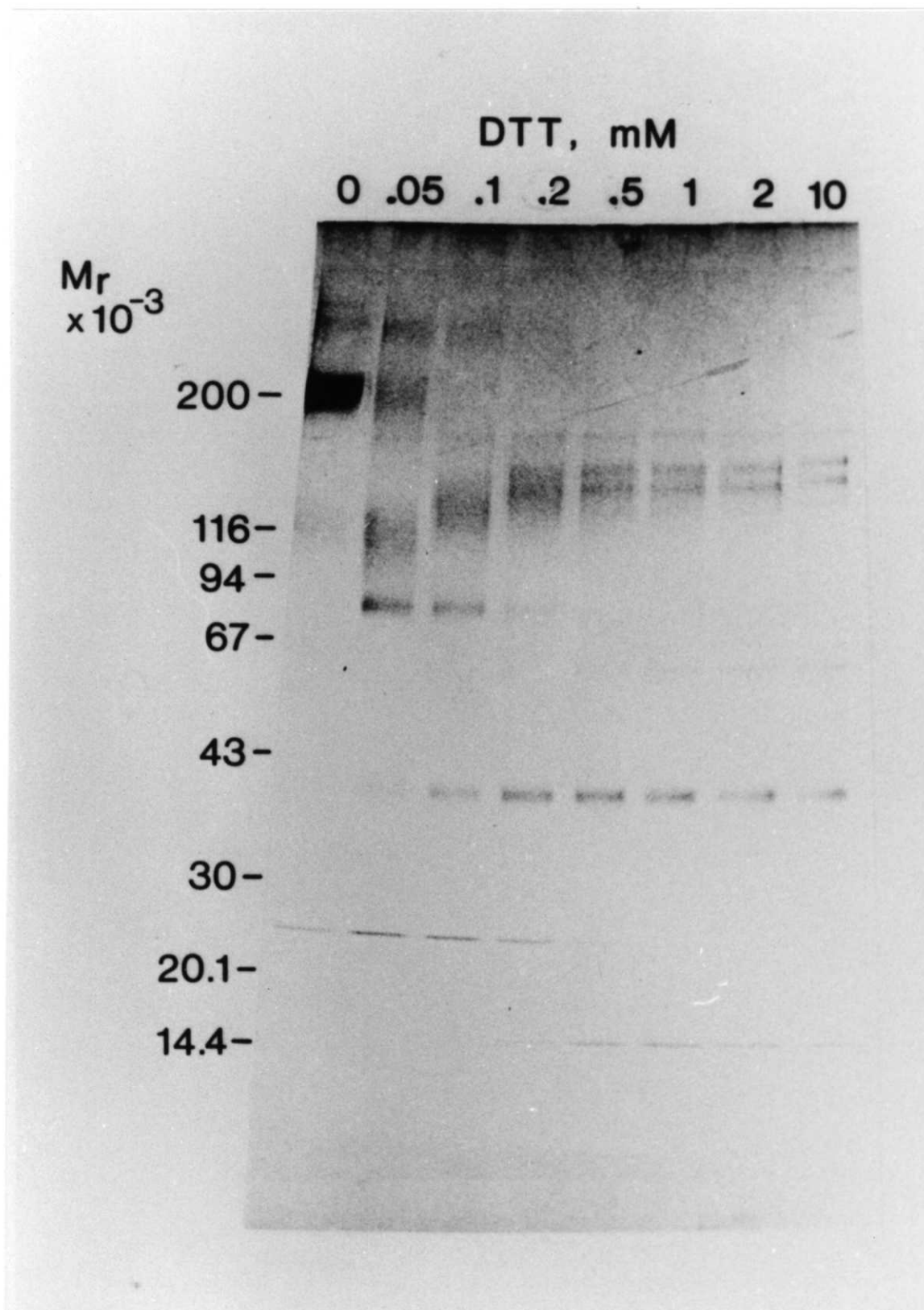




図 5 L-TGF- $\beta$ 1 の化学的脱糖鎖

化学的脱糖鎖はTFMSを用いて行なった。サンプルはDTTの非存在下もしくは存在下で解析した。分子量マーカーは▷で示す。分子量50,000~60,000に見られるバンドはTFMSの混入物によるものである。

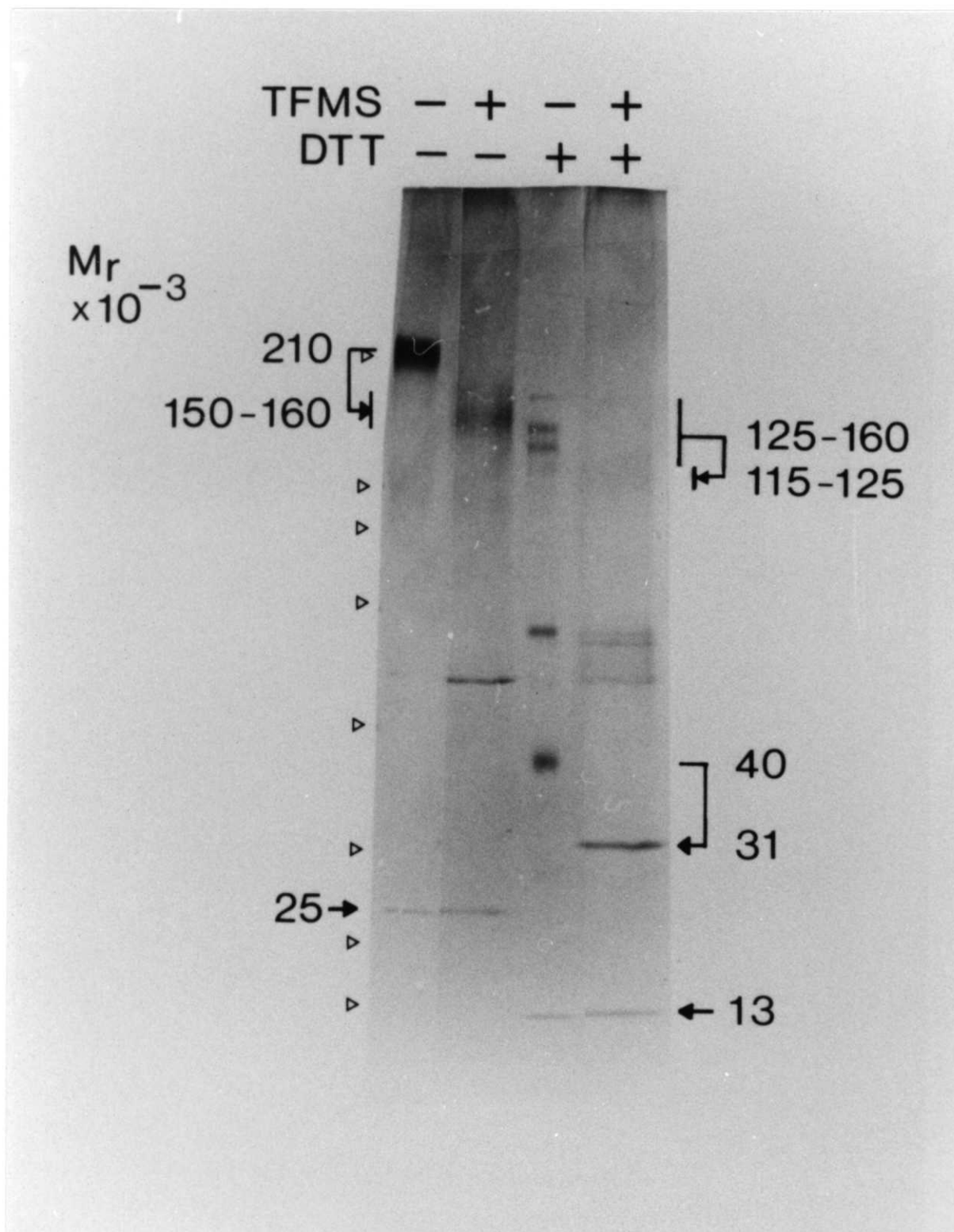


図 6 種々のpH処理によるL-TGF- $\beta$ 1 の活性化

Superose6 クロマトグラフィーによって高度に純化したL-TGF- $\beta$ 1 を図に示したpHを有する0.5Mの緩衝液を10倍量加え、室温で2時間反応させた。サンプルは3倍量の0.5Mリン酸緩衝液(pH7.4)で中和した後、バイオアッセイを行なった。サンプルは25ng/mlの濃度で細胞に加えた。

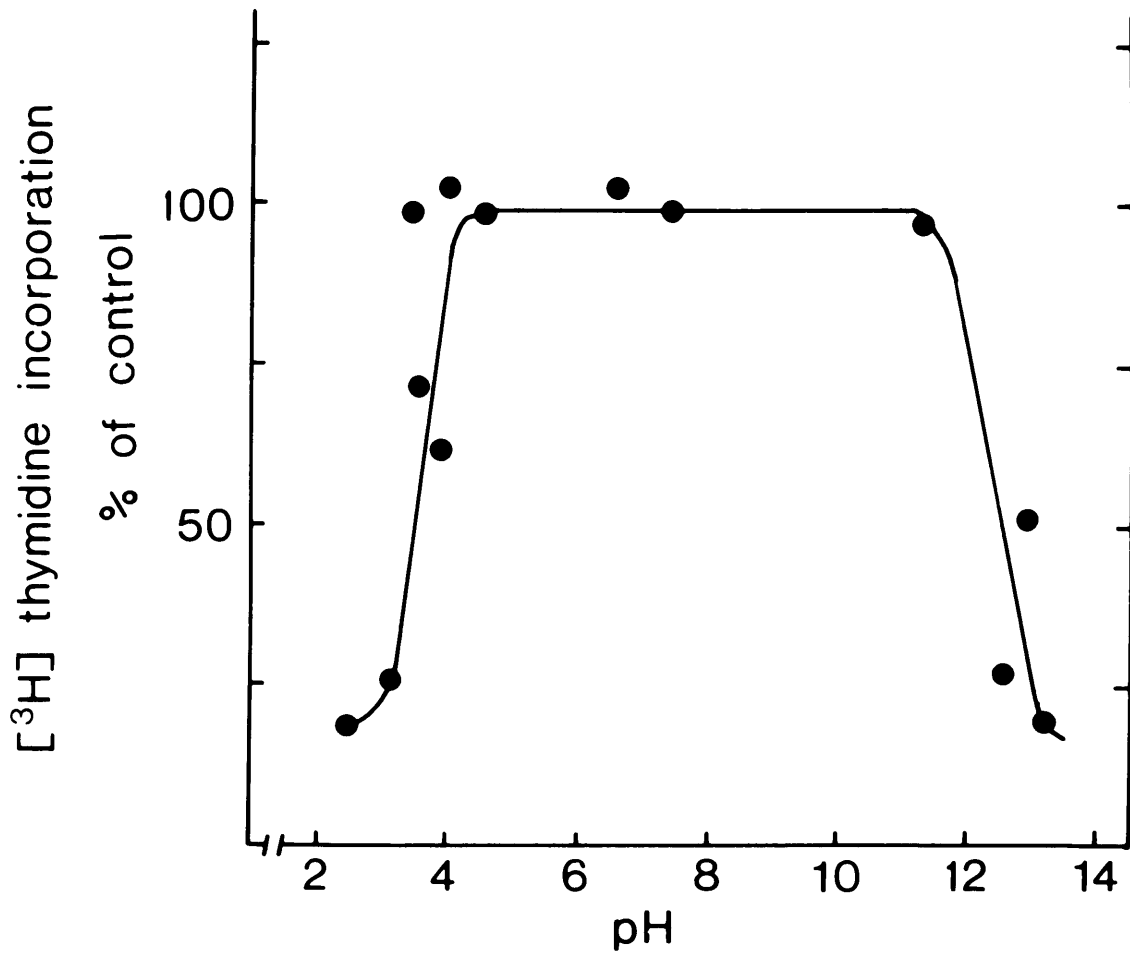


図 7 ヒトHEL 細胞株の産生するL-TGF- $\beta$ 1-BP

ヒトHEL 細胞株を 160 n MTPA で巨核芽球様細胞に分化させた後、得られた培養液中に存在するTGF- $\beta$ 1-BPをSDS-ゲル電気泳動およびイムノブロッティングにより解析した。非還元条件下では純化したTGF- $\beta$ 1-BPに対して作った抗体(AG39)を、還元した条件下ではTGF- $\beta$ 1-BPのアミノ酸配列から得たペプチドに対する抗体(AG37)を用いてイムノブロッティングを行なった。

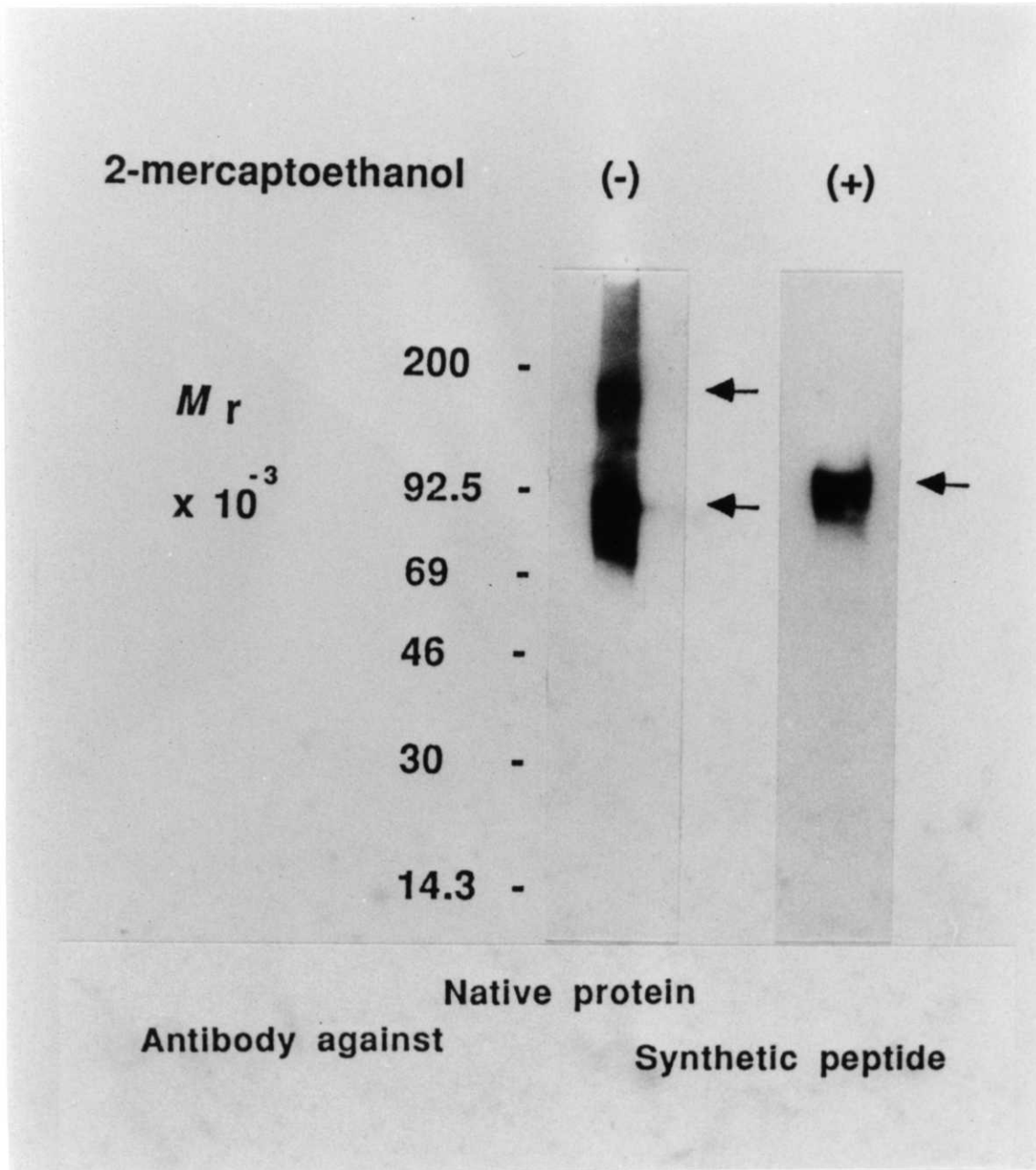


図 8 L-TGF-β1 の構造モデル

L-TGF-β1 は3つの異なる構成成分から成る。すなわち、TGF-β1、TGF-β前駆体のN末端部分（またはTGF-β1-LAP）、TGF-β1-BPの3つである。2量体構造のTGF-β1は、TGF-β1前駆体N末端部分からすでに切断されているが、非共有的に結合して、L-TGF-β1複合体の中に留まっている。CHOは糖鎖を示す。TGF-β1-BP中の糖鎖の数や位置は明らかではない。

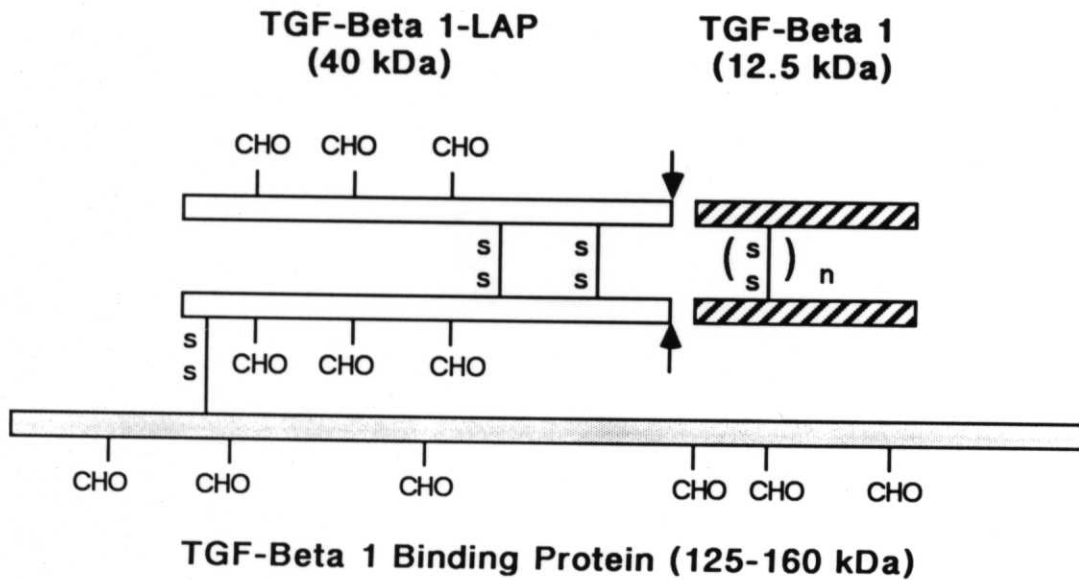


表 I L-TGF- $\beta$ 1 の純化精製

(a) 血小板抽出液そのものが酸で処理しなくとも血管内皮細胞の増殖を抑制することから最初の純化精製操作の回収率は算出できなかった。このためQAE-セファデックスで得られたサンプル中のTGF- $\beta$ 活性を 100%とした。

(b) タンパク質濃度は280nmにおける吸光度で計算し、1単位を1 mg/mlとした。

Purification step	Protein	Maximal inhibition	Purification	Yield
	<i>ug</i>	<i>ng/ml</i>	<i>-fold</i>	<i>%</i>
Platelet lysate (flow-through from CM-Sephadex)	300,000,000	10,000	1	-- <sup>(a)</sup>
QAE-Sephadex	2,600,000	2,000	5	100
Ammonium sulfate precipitation	380,000	900	11	32
Octyl-Sepharose	85,000	280	36	24
HPLC- hydroxylapatite	2,000	65	150	2.3
Superose 6	260	25	400	0.8
Alkyl-Superose	40 <sup>(b)</sup>	5	2,000	0.6

表 II L-TGF- $\beta$ 1 の種々の化学的処理による活性化

サンプルはL-TGF- $\beta$ 1 存在下もしくは非存在下で表に示した条件で22°C 30分間処理した  
(熱処理の場合を除く)。

Treatment	[ <sup>3</sup> H] Thymidine incorporation	
	With L-TGF $\beta$ 1	Without L-TGF $\beta$ 1
	<i>% of control</i>	
No treatment	100	100
Acidified at pH 2.5	14	ND
Heat		
56 <sup>o</sup> C, 30 min	98	ND
95 <sup>o</sup> C, 3 min	80	ND
Urea		
4 M	99	ND
8 M	3	102
NaCl		
2 M	97	ND
5 M	63	62
SDS		
0.02 %	18	87
0.002 %	74	101

ND, not done.