

トランスグルタミナーゼに対する細胞接着

東京工業大学 生命理工学部

齊 藤 佑 尚

Transglutaminases (TGases) are enzymes which catalyze cross-link formation between specific glutamine residues and lysine residues in substrate proteins. We report here that two of the TGases, blood coagulation factor XIIIa (FXIIIa) and tissue-type TGase (TGc), are capable of mediating adhesion of various cells through different mechanisms. When coated on plastic surfaces, they promoted adhesion and spreading of various cells of both normal and tumor origin, in a concentration-dependent manner. The adhesion was not inhibited by antibodies against possible contaminants in the enzyme preparation such as fibronectin and vitronectin, but was completely inhibited by a polyclonal antibody against the enzymes. It is obvious, therefore, that contaminants, if there were any, cannot account for the observed cell adhesion to the enzymes. Furthermore, phosphorylations of tyrosine residues in 120 kDa- and 70 kDa-proteins were very clearly shown in human fibroblasts adhered to the enzyme. Formation of actin stress fibers was also quite unambiguously observed in the adhered cells. These biochemical reactions, which are also observed when cells adhered to a typical cell adhesion protein fibronectin, are believed to be of importance in the process of cell adhesion. Although the adhesion to FXIIIa is dependent on its TGase activity, the TGc-mediated cell adhesion is independent of its TGase activity: 1) The modification of the active center cysteine with iodoacetamide blocked the enzyme activity without any effect on the cell adhesion. 2) The addition of Mg^{2+} did not induce the enzyme activity, but it was as effective as Ca^{2+} for the cell adhesion. 3) The addition of NH_4^+ inhibited the enzyme activity, yet it did not affect the adhesion significantly. The integrins involved in these cell adhesions are quite different. In the case of F XIIIa, $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins are involved and consequently the RGD peptide substantially inhibited the adhesion. On the other hand, the cell adhesion to TGc is mediated by $\alpha 4 \beta 1$ integrin, and the RGD peptide was without effects. It is possible that these two molecules may mediate cell adhesions under different physiological or pathological situations.

1 緒 言

血中に存在する血球細胞を除けば、殆ど全ての細胞は単独にまた孤独な状態にあるのではなく、いわゆる細胞外マトリックス或いは他の細胞に接着してある種の細胞社会を形成しないと生存出来ないと言っても過言ではない。さらに秩序だって異なる細胞が寄り集まって多種類の器官や臓器を形成する。このように考えると、細胞接着反応は細胞ひいては生体にとってかなり根元的に重要な事であると考えられる。細胞外マトリックスを形成する分子には多種類のタンパク質が知られている。代表的な物として、コラーゲン、ファイブ

ロネクチンやヴィトロネクチンが挙げられよう。ところでこれら多種類のタンパク質がいわゆる巨大な超分子とも考えられるマトリックスを形成するには、タンパク質分子同士が結合せねばならない。このタンパク質の架橋結合の形成を担うのが酵素トランスグルタミナーゼである。本酵素は、一つのタンパク質中の特異的なグルタミン残基と他のタンパク質中のリジン残基を、アンモニアを放出することによって形成する“イソペプチド結合”により結合する¹⁾。上述の3種類の細胞外マトリックスタンパク質、特にファイブロネクチンへの細胞接着反応は、近年多くの研究者の注目を集め、細胞生物学、分子生物学、また最新の生物化学的な手法を駆使しここ数年極めて詳細に研究されている。私たちの研究室では、血小板と血管内皮細胞によって特異的に合成される或るタンパク質が、代表的な細胞外マトリックス中のタンパク質成分とトランスグルタミナーゼの作用によって結合することを発見した²⁾。さらに、このタンパク質が



Cell Adhesion to Transglutaminases
Yuji Saito
Faculty of Bioscience and
Biotechnology, Tokyo Institute of
Technology

新規な細胞接着性のタンパク質であることも明らかにした³⁾。

そこで私たちがさらに考えた事は、細胞外マトリックスを形成するための酵素であるトランスグルタミナーゼそのものにも細胞が接着しないかという可能性である。トランスグルタミナーゼにもいくつかの種類が存在するが、血液凝固第 XIII 因子 (FXIII) と組織型トランスグルタミナーゼ (TGc) の二種は他の物と異なり、細胞外にも存在することが知られている。今回私たちはこれら二種類のトランスグルタミナーゼに対する細胞接着反応を検討したので、ここに報告する。

2 実験

FXIII は日本ヘキストマリオナルセル社より頂いた物を、さらにアフィニティークロマトグラフィー⁴⁾やイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、ほぼ完全に純品になった物を使用した。TGc は宝酒造より購入し、不純物が殆ど混入されていないことを確かめて利用した。細胞接着の検討に用いた細胞は、大体は財団法人がん研究振興財団より入手した物である。各種インテグリンに対するモノクロナル抗体は、市販の物および国内外の研究者から供与して頂いた物を用いた。

細胞接着反応は次のようにして検討した：先ずトランスグルタミナーゼなどのタンパク質を 6 mm 四方のプラスチック小片に 4℃ で 16 時間結合させ、次いでタンパク質などで覆われずに残っているかも知れないプラスチックの表面を大過剰のアルブミンで覆い尽くす。そこに培養皿から剥離した細胞を加え、37℃ で 90 分間静置して接着させ、接着しなかった細胞を良く洗ってプラスチック表面から除き、染色後に顕微鏡下で接着した細胞を観察しながら計数する。

3 結果

細胞がファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質に接着する際には、細胞は単にタンパク質に結合するだけではなく、一般的には細胞表面のインテグリンと呼ばれる接着受容体を介して細胞外部から内部にその情報が伝えられ、また逆に内部から外部にも情報が伝達されと考えられている⁵⁾。その結果の代表的な現象として細胞接着に伴う細胞骨格タンパク質アクチンの配向がある。Fig. 1 は、線維芽細胞がファイブロネクチンと活性化 FXIII とに細胞が接着した際のアクチン繊維の配向を調べたものである。図の A では各々の基質タンパク質に接着した細胞の形態を位相差顕微鏡で観察したものであるが、いずれの

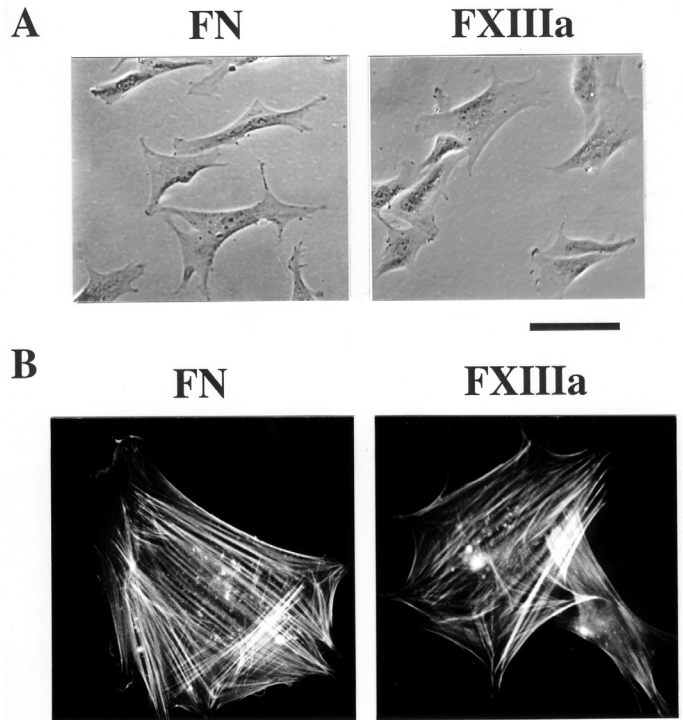


Fig. 1. The cell adhesion to FXIIIa. A, Human fibroblast TIG-1 cells were plated on plastic chips coated with 20 μ g/mL fibronectin (FN) or 30 μ g/mL FXIIIa and viewed under a phase contrast microscope. Bar, 100 μ m, magnification, $\times 100$. B, TIG-1 cells adhered to FN or FXIIIa were fixed, permeabilized and actin fibers were stained with rhodamine-phalloidin conjugate for fluorescence microscopy. Bar, 50 μ m, magnification, $\times 400$.

場合も細胞が接着して良く伸展しているのが明らかである。図のBでは、アクチンに特異的に結合するファロイディンという物質に蛍光物質を結合させ、アクチン繊維を蛍光顕微鏡で観察したものであるが、いずれの場合にも繊維が一定方向に配向しているのが明らかである。

ところでここで重要な点は、FXIII への接着はファイブロネクチンの際とは異なり、FXIII がタ

ンパク質分解酵素トロンピンによる限定分解とカルシウムイオンによる活性化を予め受けていなければならない点である。従ってトランスグルタミナーゼの酵素活性を必要とする極めて異色の細胞接着反応ということになる。この点は、Fig. 2 に示したように本酵素の活性中心のシステインをヨードアセトアミドによりアルキル化すると酵素活性の減少にほぼ平行して細胞接着活性も減少することによって先ず証明された。この現象が本試薬の添加による非特異的な効果ではないことは、用いた最高濃度においてもファイブロネクチンへの接着にはなんら影響が無いことによって示されている。さらにその特異的な効果は、Fig. 3 に示されているように他の多数の接着基質タンパク質への接着においては全く認められなかった。さらには本酵素反応はアンモニアを産生するので、逆に反応系にアンモニアを加えると、反応の平衡をずらし酵素活性を阻害する事が出来る⁶⁾。その際に細胞接着活性が如何に変化するかを検討したのがFig. 4である。ここでも明らかに酵素活性と細胞接着活性はほぼ平行して加えたアンモニアの濃度に依存して阻害されている。さらにアンモニアの影響は特異的で、例えばファイブロネクチンへの接着に対してはこの濃度範囲では何等影響しないことも示されている。しかしこれとは対照的にTGc に対する細胞接着においてはその酵素活性は

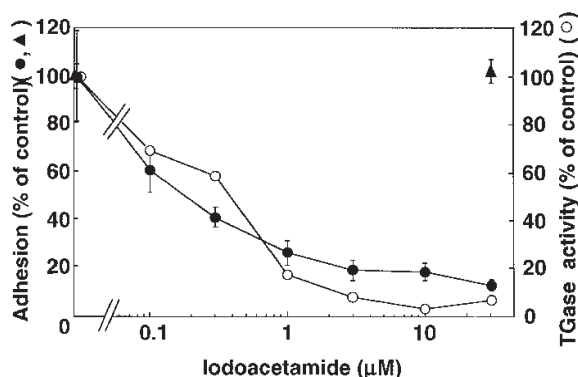


Fig. 2. Effects of the treatment of FXIIIa with iodoacetamide (IAA) on TGase and the cell adhesion activity. FXIIIa (30 μg/mL) or FN (20 μg/mL) was incubated with varying concentrations of IAA at 37°C for 90 minutes and was subjected to the cell adhesion assay using TIG-1 cells or TGase assay. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments. The data of cell adhesion assay are mean ± s.e.m. of a representative experiment in which triplicate determinations were made: TGase activity, open circles; the cell adhesion to FXIIIa closed circles; the cell adhesion to FN, closed triangles.

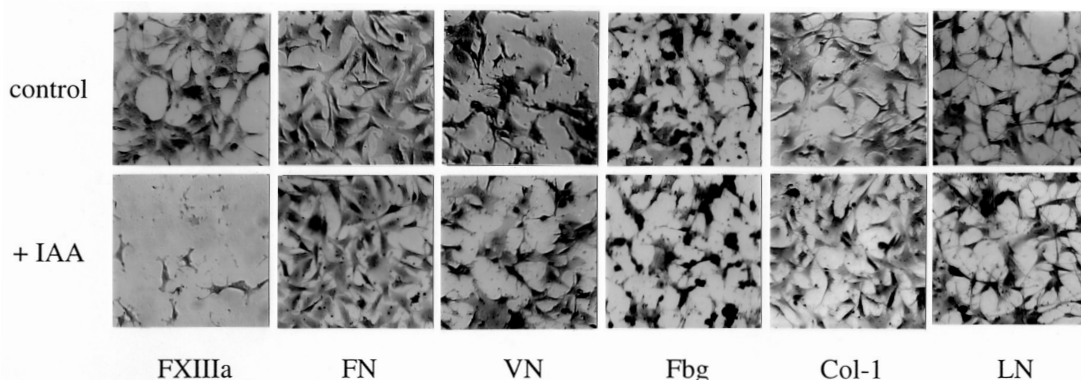


Fig. 3. Thirty μg/mL FXIIIa, 10 μg/mL FN, 3 μg/mL vitronectin (VN), 10 μg/mL fibrinogen (Fbg), 3 μg/mL type-1 collagen (Col), and 10 μg/mL laminin (LN) were treated with 30 M IAA, then were subjected to the cell adhesion assay using TIG-1 cells. Note that the cell adhesion to neither FN, VN, Fbg, type-1 Col nor LN was affected but the cell adhesion to FXIIIa was completely inhibited by the treatment with IAA. Magnification, × 100.

全く必要ないことが判明した。Fig. 5に示した様に、FXIIIとは対照的にTGcにおいてはヨードアセトアミドによって確かにその酵素活性は激減するが、細胞接着活性は殆ど変化しない。またアンモニアの影響も殆ど認められなかった。さらにはイオンの影響を調べたところ興味深い結果が得られた。通常インテグリンが関与する細胞接着反応には2価の金属イオンが必要であると考えられている。ところでトランスグルタミナーゼの活性発現にはカルシウムイオンが極めて特異的に要求されることも良く知られている。そこで2種類のトランスグルタミナーゼに対する細胞接着反応におけるイオンの要求性を比較した。Fig. 6に示したように、FXIIIにおいてはカルシウムイオンは酵素活性の発現のみならず細胞接着反応にもほぼ同様の濃度で有効であるが、マグネシウムイオンは酵素活性を予想通りに賦活化することが出来ず、細胞接着反応も全く認められなかった。一方TGcにおいては、確かにカルシウムイオンを添加すると酵素活性を発現し細胞接着も顕著であるが、酵素活性を些かも賦活化しないマグネシウムイオンがカルシウムイオンと同程度に細胞接着活性を促進することを明らかにした。この事はTGcに対する細胞接着反応には酵素活性が不必要であるという事をさらに裏づけることになる。

ところでこれほど細胞接着の機構が異なるとすれば、関与する細胞側の接着受容体も異なる可能性がある。そこで各種のインテグリンに対するモノクロナル抗体の影響を調べることによって、各々の反応に関与する特異的なインテグリンを決定する実験を行った。先ずFXIIIの場合だが、Fig. 7に示したように、線維芽細胞を用いた際には何れのモノクロナル抗体でも単独で

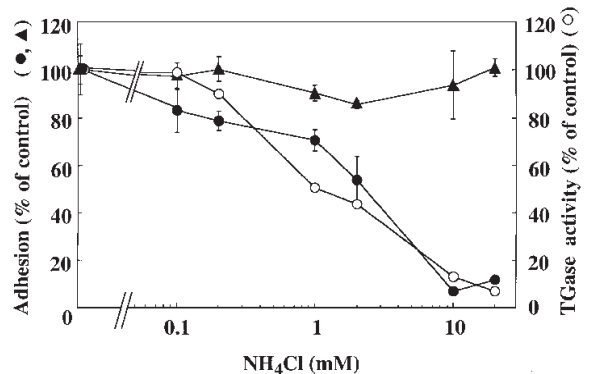


Fig. 4. Effects of ammonium ion on TGase and the cell adhesion activity. TGase and the cell adhesion of TIG-1 cells were determined in the presence of varying concentrations of ammonium chloride. In the case of the cell adhesion assays, the reagent was added to the cell suspension. TGase and the cell adhesion activities were expressed as percent of control values obtained in the absence of ammonium chloride. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments. The data of cell adhesion assay are mean \pm s.e.m. of a representative experiment in which triplicate determinations were made: TGase activity, open circles; the cell adhesion to FXIIIa, closed circles; the cell adhesion to FN, closed triangles.

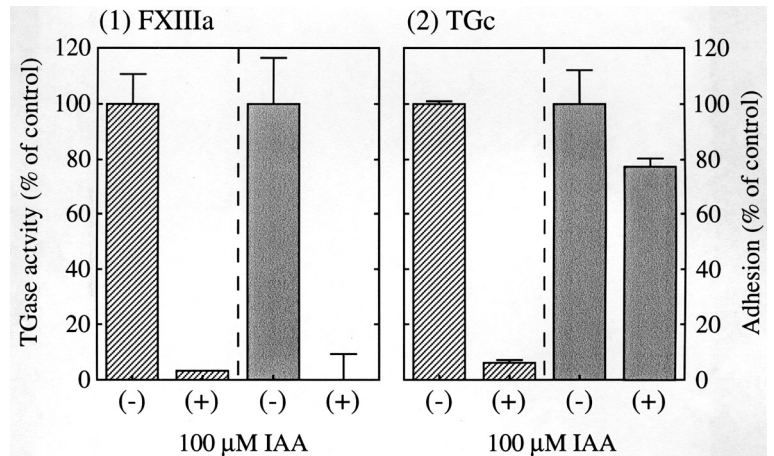


Fig. 5. The cell adhesion to TGc is not affected by the modification by IAA. The determinations of TGase activity (hatched columns) and cell adhesion of TIG-1 cells (closed columns) were performed using FXIIIa (1) or TGc (2) with (+) or without (-) modification of enzymes with IAA. The modification of TGc (10 μ g/mL) or FXIIIa (30 μ g/mL) with 100 μ M IAA was carried out at 37°C for 30 minutes. The cell adhesion assay data are mean \pm s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made. Values are expressed as relative to the control values.

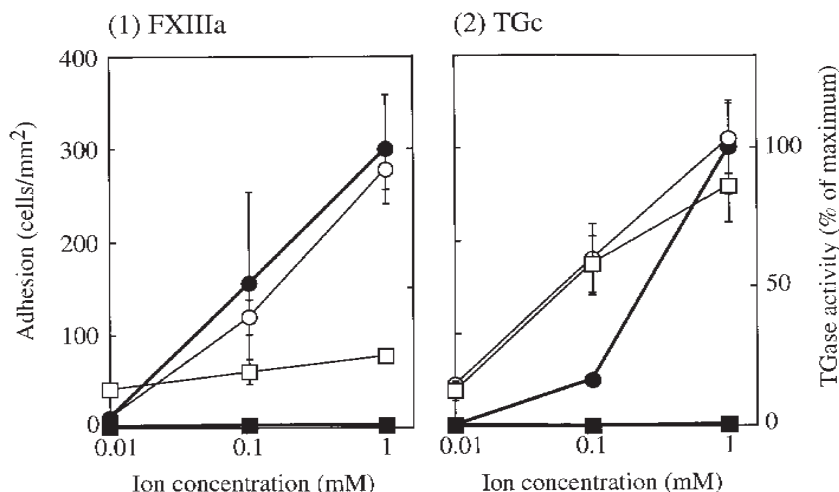


Fig. 6. Dependence of the TGc-mediated cell adhesion on Ca^{2+} or Mg^{2+} . TIG-1 cells were incubated with 5mM EDTA at 37°C for 10 minutes, and washed two times with HEPES-Tyrosine buffer. Cells were then suspended in the same buffer containing either Ca^{2+} (open circles) or Mg^{2+} (open squares) at varied concentrations, and subjected to the cell adhesion to FXIIIa (1) or to TGc (2). TGase activity of FIIIa (1) and TGc (2) was also determined in the presence of varied concentrations of Ca^{2+} (closed circles) or Mg^{2+} (closed squares).

顕著に阻害するものは無く、単独のインテグリンが関与するとは考えられなかった。そこで複数種類のモノクローナル抗体を組み合わせで加えたところ、この図で明かな様に $\alpha\text{v}\beta 3$ および $\beta 1$ インテグリンに対する抗体を加えた際に接着はほぼ完全に阻害された。さらにその接着する細胞の特異性などから、少なくとも $\alpha\text{v}\beta 3$ および多分 $\alpha 5 \beta 1$ が共に接着反応に携わっていると考えられる。一方 TGc への細胞接着だが FXIII の場合とは全く異なり、Fig. 8 に明らかに示されているように α サブユニットに対する抗体のなかで単独で細胞接着を阻害するものは認められなかったが、 $\beta 1$ インテグリンに対する抗体によって単独でほぼ完全に接着が阻害された。従って TGc に対する細胞接着においては $\beta 1$ を含むインテグリンのみが関与し、 $\beta 3$ を含むインテグリンは全く関与しない事が明らかとなった。さらに白血病細胞

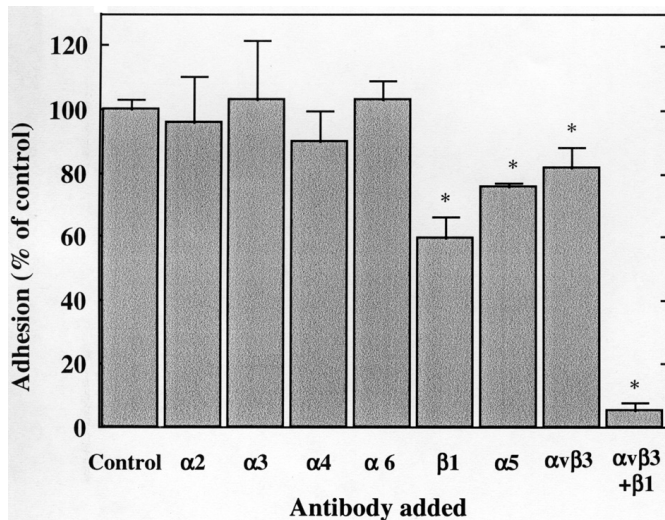


Fig. 7. The effect of antibodies against various integrins on the cell adhesion to FXIIIa. TIG-1 cells were preincubated with antibodies against various integrins at room temperature for 30 minutes and the adhesion to FXIIIa was measured. It was expressed as relative to the control value obtained in the experiment carried out in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preimmune rabbit IgG and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ control mouse IgG. The following concentrations of antibodies were used: $\alpha 2$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 2$ mAb (6F1); $\alpha 3$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 3$ mAb (P1B5); $\alpha 4$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 4$ mAb (SG/73); $\alpha 6$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 6$ mAb (GoH3); $\beta 1$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\beta 1$ mAb (4B4); $\alpha 5$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 5$ mAb (BIIIG2); $\alpha\text{v}\beta 3$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-VN receptor polyclonal antibody. The lowest possible concentrations to give the maximum effect were chosen if the effects of antibodies were positive. The highest possible concentrations were chosen, on the other hand, if the effects of antibodies were negative. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments. The data are mean \pm s.e.m. of triplicate determinations from a representative out of three experiments. The * on the bars means that $p < 0.05$. The p values for the experiments without * were more than 0.1 ($p > 0.1$).

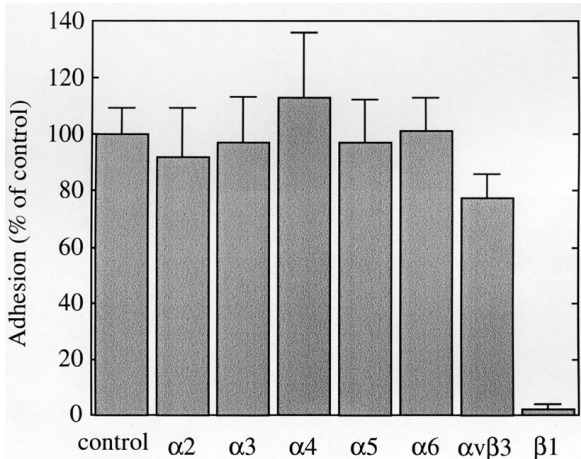


Fig. 8. Effects of anti-integrin antibodies with function-blocking activity on the cell adhesion to TGc. TIG-1 cells were preincubated with function-blocking antibodies against various integrins at room temperature for 30 minutes and the adhesion to TGc was measured. It was expressed as relative to the control value obtained in the experiment carried out in the presence of 100 μ g/mL preimmune rabbit IgG and 10 μ g/mL control mouse IgG. The following concentrations of antibodies were used: α 2, 10 μ g/mL anti- α 2 mAb (6F1); α 3, 10 μ g/mL anti- α 3 mAb (P1B5); α 4, 10 μ g/mL anti- α 4 mAb (HP2/1); α 5, 10 μ g/mL anti- α 5 mAb (BIIG2); α 6, 10 μ g/mL anti- α 6 mAb (G0H3); β 1, 5 μ g/mL anti- β 1 mAb (4B4); α v β 3, 100 μ g/mL anti-VN receptor polyclonal antibody. It was confirmed that these concentrations of antibodies were high enough to inhibit the cell adhesions to well known adhesion proteins used as each positive control. The data are mean \pm s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made.

を用いて検討したところ、Fig. 9に示したように、 β 1 インテグリンを特異的に活性化するモノクローナル抗体の存在下でのみ細胞接着し、しかもこの細胞接着が α 4 インテグリンに対するモノクローナル抗体によって完全に阻害される事より、この細胞接着においては α 4 β 1 が関与するインテグリンであることを解明した。さらにこの関与するインテグリンの種類の相違を裏づけるために合成ペプチドの細胞接着への影響を検討した。ファイブロンネクチンの細胞接着ドメインを探索した研究から明らかとなった事だが⁷⁾、ある種のインテグリン例えば α v β 3 や α 5 β 1 が関与する細胞接着反応では分子中の ARG-GLY-ASP を含むドメインが関与するためにこれらを含む合成ペプ

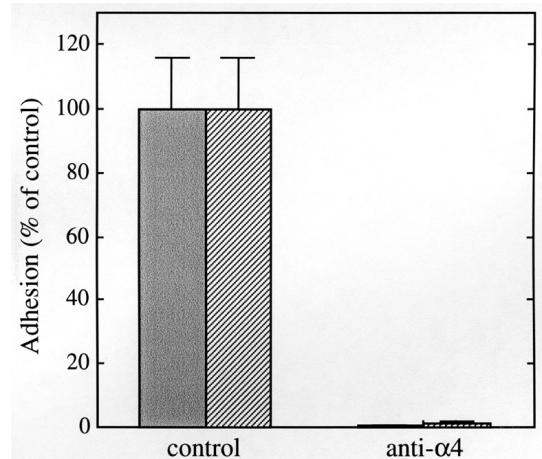


Fig. 9. Effect of anti- α 4 integrin antibody on the cell adhesion to TGc. MOLT-3 cells (human lymphoma cell line) were preincubated with 20 μ g/mL anti- α 4 function-blocking antibody (HP2/1) at room temperature for 30 minutes in the presence of 5 μ g/mL β 1 integrin-activating mAb (TS2/16) and 0.25 mM Mn^{2+} and the adhesions to TGc (closed columns) and FN(hatched columns) were measured. It was expressed as relative to the control value obtained in the experiment carried out in the presence of 10 μ g/mL control mouse IgG. The data are mean \pm s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made.

チド (RGD) によって接着が阻害されるが、 α 4 β 1 インテグリンが関与する細胞接着の際には全く異なるドメインが担当するためにこれらのペプチドを加えても接着は殆ど阻害されないとされる。そこで RGD ペプチドおよびそのネガティブコントロールとして ASP の代わりに GLU を含むペプチド (RGE) を加える実験を行った。Fig.10に示したように、FXIII およびファイブロンネクチンに対する細胞接着反応は RGD ペプチドによってかなりの阻害を受けたが、TGc に対する接着においては殆ど阻害が認められなかった。勿論ネガティブコントロールとして用いた RGE ペプチドは何れの細胞接着においても何等阻害効果を示さなかった。この結果は、Fig. 8 および Fig. 9 で得られた結果

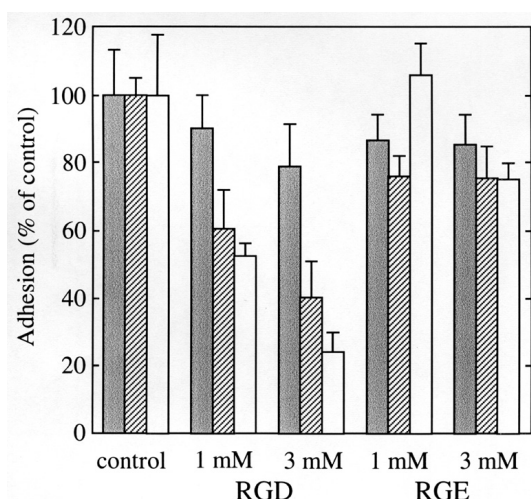


Fig. 10. The cell adhesion to TGc is not inhibited by a RGD peptide. TIG-1 cells were mixed with either a synthetic peptide GRGDSP or GRGESPP at indicated concentrations, and the cell adhesions to following proteins were measured: 10 μ g/mL TGc (closed columns), 30 μ g/mL FXIIIa (hatched columns), or 3 μ g/mL FN (open columns). The data are mean \pm s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made.

をさらに支持するものである。

4 考 察

上述のようにトランスグルタミナーゼという酵素に細胞が接着することを発見した。さらに全く異なる機構によって細胞が2種類のトランスグルタミナーゼに接着する事を明らかにした。ところでFXIIIの場合その酵素活性は細胞接着反応に如何に関与するのであろうか。これまでに細胞接着反応に酵素活性が関与するという報告は全くない。一つのヒントが次の実験から得られた。先ず活性化されたFXIIIに細胞を接着させ、その細胞を接着面から剥離し、再びFXIIIに対して接着させてみたのである。このような実験をした理由は、インテグリンは通常は不活性な状態にあり、何らかの機構によって活性化され初めて細胞接着に参加する事が出来ると考えられているからである。例えば、フォルボルエステルなどがその代表的な物質である。即ちトランスグルタミナーゼによって

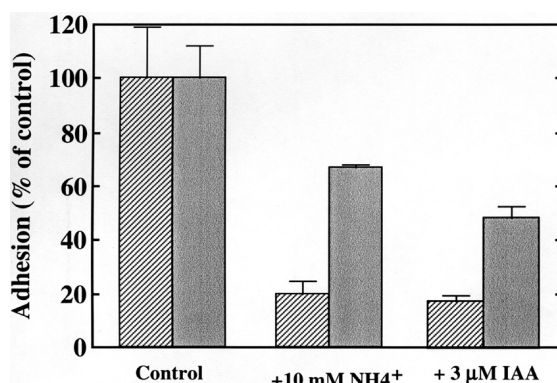


Fig. 11. Dual functions of FXIIIa for the cell adhesion. The TIG-1 cells once attached to FXIIIa (30 μ g/mL) (solid bars) or FN (20 μ g/mL) (hatched bars) were detached by incubation with EDTA, washed 2 times with the medium MEM, and were subjected to the second cell adhesion assay to another FXIIIa (30 μ g/mL)-coated surface to investigate the effects of IAA or ammonium ion. Values were expressed as relative to the control values. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments; the cells detached from both substrata adhered similarly well in the second adhesion assay to FXIIIa. The data are mean \pm s.e.m. of triplicate determinations from a representative experiment.

インテグリンの活性化が起こるのではないかと考えたのである。その結果はFig.11に示した通りである。ここで明らかな通り、一度FXIIIに接着した細胞を再度FXIIIに接着させる際には、あたかも酵素活性を要しないかの如く、アンモニウムイオンやヨードアセタミドの添加によって阻害が受けにくくなっていた。これはFXIIIに一度接着した面のインテグリンは既に活性化されているために再度の活性化の必要が無いからであると解釈できる。ところでこれらの試薬が二度目の接着の際に全く阻害しないのではなく、ある程度は阻害する理由は、細胞が最初にFXIIIに接着する際には接着しない表面に存在するインテグリン分子は活性化されていないからであろうと考えられる。一方一度ファイブロネクチンに接着した後に剥離した細胞をFXIIIに接着させた場合には、明らかにこれらの処理によって接着が大きく阻害された。すなわちFXIIIに対する細胞接着においては、二段階で反応が進行し、一段目ではインテグリンが

活性化されるのであろうと考えられる。実際に、FXIIIに一度接着させ再度FXIIIに接着させた際にはFXIIIは必ずしも活性化されている必要が無いことも分かった。私たちはそれでは具体的に如何なるタンパク質がトランスグルタミナーゼ活性によって架橋されているのかを検討したが、現在までのところ明確な答えは未だ得られていない。これまでの結果を総合すると、FXIIIではその酵素活性によってインテグリンを活性化し、その後はファイブロネクチンなどと同様に活性化されたインテグリンに結合してシグナルを与え、アクチンの配向などを伴う変化を細胞内部に引き起こし細胞接着を完了するものと考えられる。ところがTGcの場合は酵素活性によってインテグリンを活性化することが無いので、他の物質によって活性化されたインテグリンを用いるしかない。従ってこれまでに見つかったファイブロネクチンやコラーゲンという細胞接着タンパク質と同様に考えることが出来る。ここで興味あることの第一点は、TGcが $\alpha 4\beta 1$ というインテグリンを接着に用いる点である。現在までにこの種類のインテグリンを接着受容体に用いるタンパク質はファイブロネクチン、VCAM-1および私たちが以前報告したフォンビルブランド因子のプロポリペプチドとその種類が限られていることである。この点に関しては、今後その細胞接着に関与するドメインを可能な限り限定し、これまでに得られているものと比較したいと考えている。ところでTGcに対する細胞接着において、 $\alpha 4$ インテグリンに対する抗体が白血病細胞においては完全に阻害したのとは対照的に線維芽細胞を用いた際には全く無効であったのは、後者においては $\beta 1$ インテグリンと結合している全く異なる α サブユニットを有するインテグリンが関与しているからであると考えられる。実際にこの線維芽細胞には $\alpha 4\beta 1$ インテグリンは存在しないことが知られている。そうだとすると、異なるドメインが各々異なるインテグリンへの接着に関与している可能性がある。第二点は、線維芽細胞に関してはインテグ

リンを活性化すること無しにTGcに良く接着することである。またこの二種類のトランスグルタミナーゼに接着する細胞の種類が異なるのは、関与するインテグリンが異なることによって理解されるが、これらが細胞接着反応に関与する際の生理的局所の差を示唆しているのかも知れず興味深い。将来可能であれば、より生理的な条件下での細胞接着に関して検討していきたいと考える。

引用文献

- 1) Aeschlimann, D. and Paulsson, M.: Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids, *Thromb. Haemost.*, 71, 402-415, 1994.
- 2) Usui, T., Takagi, J. and Saito, Y.: Propolypeptide of von Willebrand Factor serves as a substrate for Factor XIIIa and is cross-linked to laminin, *J. Biol. Chem.*, 268, 12311-12316, 1993.
- 3) Isobe, T., Hisaoka, T., Shimizu, A., Okuno, M., Aimoto, S., Takada, Y., Saito, Y. and Takagi, J.: Propolypeptide of von Willebrand factor is a novel ligand for very late antigen-4 integrin, *J. Biol. Chem.*, 272, 8447-8453, 1997.
- 4) McDonagh, R. P. : Affinity chromatography of human plasma and platelet factor XIII on organomercurial agarose, *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 345-357, 1976.
- 5) Hynes, R. O. : Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 69, 11-25, 1992.
- 6) Takagi, J., Saito, Y., Kikuchi, T. and Inada, Y. : Modification of transglutaminase assay: Use of ammonium sulfate to stop the reaction, *Analyt. Biochem.*, 153, 295-298, 1986.
- 7) Ruoslahti, E. : Fibronectin and its receptors, *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 375-413, 1988.