

抗 von Willebrand 因子 (vWF) モノクローナル抗体 NMC-4 による血小板膜糖蛋白 (GP) Ib 結合ドメインの解析

奈良県立医科大学小児科学教室

新 家 興

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF PLATELET GLYCOPROTEIN (GP) Ib BINDING DOMAIN OF VON WILLEBRAND FACTOR (VWF) USING ANTI-VWF MONOCLONAL ANTIBODY DESIGNATED AS NMC-4

KOU NIINOMI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received November 30, 1989

Summary: An anti-von Willebrand factor (vWF) mouse monoclonal antibody designated as NMC-4 was shown to induce the inhibition of both the ristocetin- and botrocetin-induced vWF bindings to platelet glycoprotein (GP) Ib, as well as the block of desialylated vWF (AS-vWF) binding to GPIb. Using NMC-4 coupled Sepharose 4B column, a 97kDa fragment was immunopurified from a tryptic digest of native vWF in nonreduced condition. The 97kDa fragment showed a doublet polypeptide with a M. W. 52/48kDa after reduction with dithiothreitol on SDS-polyacrylamide gel. The NH₂-terminal sequence and amino acid analysis of the 97kDa fragment indicated that it was a homodimer composed of vWF peptide (amino acid residue 449-728). These results demonstrated the possible presence of one or three interchain disulfide-bonds involving the cysteine residues 459, 462, and/or 464. This fragment competitively inhibited both the ristocetin- and botrocetin- induced vWF bindings to GP Ib as well as AS-vWF binding to GP Ib. On Western blotting, NMC-4 reacted with the reduced 97kDa fragment with less intensity than the nonreduced one. Two synthetic peptides, Cys 474-Pro 488 and Leu 694-Pro 708, inhibited ristocetin-induced binding of 97kDa fragment to GP Ib. But neither of them inhibited botrocetin-induced binding of 97kDa fragment to GP Ib or its direct binding to GP Ib. These results clearly indicate that the GP Ib binding domain expressed by either ristocetin or botrocetin resides on a different portion within the 97kDa fragment.

Index Terms

von Willebrand factor, platelet glycoprotein Ib, NMC-4, ristocetin, botrocetin

緒 言

von Willebrand 因子 (von Willebrand factor, vWF) は血漿中に存在し障害血管壁への血小板の粘着に必須な巨大分子糖蛋白質である。ヒト vWF は染色体 12 番目上に位置する vWF 遺伝子の支配を受け、血管内皮細胞及び骨髄巨核球内で合成され、分子量 270 kDa の単一の subunit が諸種の程度に重合し、 $0.5 \times 10^3 \sim 20 \times 10^3$ kDa

にいたる multimers のシリーズを形成している¹⁾²⁾³⁾。vWF subunit の一次構造は Sadler ら⁴⁾ (1985) の分子クローニングによる cDNA の解析及び千谷ら⁵⁾ (1986) の蛋白生化学的手法より、2050 個のアミノ酸配列からなることならびに糖鎖鎖付着部位などが明らかにされた。vWF 蛋白質の構造と機能についてはこの subunit の Ser 1 から Arg 272 は第 VIII 因子結合ドメインで、Val 449 から Lys 728 は血小板膜糖蛋白 (glycoprotein; GP) Ib

結合ドメインおよびヘパリン結合ドメイン, Gly 911 から Glu 1365 は collagen 結合ドメイン, 1744~1747 の Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) は GP II b/III a 結合ドメインであることが明らかになった⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾. 教室の Fujimura はヒト vWF 純化物をトリプシン分解後, 還元アルキル化処理し, HPLC クロマトフォーカシングカラムで精製し, 52/48 kDa の doublet polypeptide を得て, この polypeptide は vWF subunit のアミノ酸残基 449-728 より成り, in vitro で抗生物質 ristocetin ならびに蛇毒 botrocetin 依存性の血小板結合及び凝集を抑制することより GP Ib への結合 peptide であることを明らかにした. 一方, 教室の嶋ら¹²⁾は vWF に対するモノクローナル抗体を5種類作製し, その免疫学的特性を検討したが, うち NMC-4 は ristocetin 存在下のヒト多血小板血漿の血小板凝集を抑制する抗体であることを報告した. つづいて西尾ら¹³⁾はこの NMC-4 が蛇毒 botrocetin によって惹起される血小板凝集をも抑制することを見いだした.

Ristocetin 及び蛇毒 botrocetin によって惹起される in vitro での血小板凝集は血漿中の vWF の GP Ib への結合で開始されると考えられているので, 著者はまず vWF の GP Ib 結合能に対する NMC-4 の抑制効果を検討し, ついで NMC-4 を用いて, トリプシン消化 vWF 分解物より GP Ib に特異的に結合する 97 kDa のフラグメントを分離し, その性状及び機能について検索を行なった.

試材及び方法

1) 試薬: 牛トリプシン (bovine pancreatic trypsin Type I), Soybean trypsin inhibitor (SBTI), p-aminophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride (p-APMSF), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 粗製 *bothrops jararaca* venom は Sigma 社 (St. Louis, MO). ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA), アクアサイド II は Calbiochem 社 (La Jolla, CA). Ristocetin は Lundbeck 社. ¹²⁵I-Na および ¹²⁵I 家兎抗マウス IgG はそれぞれアマシャムジャパン社, 第一化学薬品. X-ray フィルムは Kodak 社製のものを使用した.

2) vWF 部分純化物: 市販第 VIII 因子濃縮製剤 (Armour Pharmaceutical, Kankakee, IL) より免疫吸着体を用い純化した vWF を Dr. Zimmerman (Scripps clinic, USA) より提供された. またすべての multimer 型を有する native vWF は, 有効使用期限を過ぎた中間型第 VIII 因子製剤 RCG-5 (日本赤十字社より提供) よりゼ

ラチンアガロースカラム, 40%飽和硫酸沈澱および Sepharose 4 B カラムを用いて精製した¹³⁾.

2) Botrocetin の部分純化: Read らの原法に準じた西尾の方法¹³⁾にて, 粗製 *bothrops jararaca* venom より純化を行なった.

3) ホルマリン固定血小板の作製: 健康成人より採取した全血と ACD (Acid citrate dextrose) 液を5対1容に混和し, Walsh らのアルブミン勾配法¹⁴⁾を用い洗浄血小板を作成し, その後1%ホルマリンで固定した. ホルマリン固定血小板は血小板数を $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ となるように調整し, 0.02% NaNO₃ を含む 0.1 M リン酸 0.15 M 食塩緩衝液 (pH 7.3) に浮遊液として 4°C で保存した.

4) 抗 vWF マウスモノクローナル抗体 (NMC-4): 嶋ら¹²⁾の作成したマウスモノクローナル抗体 NMC-4 を用いた. この NMC-4 を含むマウス腹水より, Steinbuch & Audran の方法¹⁵⁾に準じて n-caprylic acid を用い IgG 分画を作成した.

5) 52/48 kDa vWF フラグメントおよび desialylated-vWF の調整: 還元-s-カルボキシメチル化 (S-CM) 52/48 kDa フラグメントは Fujimura et al.⁹⁾の方法により作成. Desialylated-vWF (asialo-vWF: AS-vWF) は De Marco et al. の方法¹⁶⁾に準じ, vWF を protease free neuraminidase で処理して作製した.

6) Iodination: 各々の蛋白は Franker & Speck の方法¹⁷⁾に準じ Iodogen 法にて ¹²⁵I 標識を行なった. ¹²⁵I 標識した蛋白の比活性は $0.62 \sim 0.98 \times 10^6$ cpm/mg であった.

7) Binding inhibition assay: Eppendorf tube に, ホルマリン固定血小板及び ¹²⁵I-vWF の終濃度が各々 $10^8 / \text{ml}$, $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ および各濃度のリガンドを含めて総容量が $112.5 \mu\text{l}$ となるように添加した. ここに ristocetin (終濃度 $1 \text{ mg} / \text{ml}$) あるいは純化 botrocetin (終濃度 $57.5 \text{ mg} / \text{ml}$) を $12.5 \mu\text{l}$ 加え室温にて 30 分間インキュベートした. この混和物を, 20% sucrose 2% BSA 加タイロッド緩衝液 (pH 7.4) を $300 \mu\text{l}$ ずつ分注した 2 本の microcentrifuge tube に各々 $50 \mu\text{l}$ ずつ重層し, 13,000 rpm で 5 分間遠心した後, tube 底部の血小板沈層の部分を切断し γ -カウンターにて測定, その平均値を求め血小板に結合した ¹²⁵I-vWF 量を算出した. この際, 50 倍量の非標識 vWF 存在下での結合量を非特異的結合 (0%), 単に反応緩衝液存在下でのみの結合量を 100% とした.

¹²⁵I-AS-vWF の binding assay については惹起物質の非存在下にホルマリン固定血小板及び ¹²⁵I-AS-vWF を各々終濃度 $10^8 / \text{ml}$, $30 \mu\text{g} / \text{ml}$ となるように加え,

各濃度の競合的リガンドを含めた総容量が125 μ l となるように調整し、vWF の場合と同様に 125 I-AS-vWF の結合量を測定した。

8) SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE): Laemmli の方法¹⁹⁾に準じた。種々濃度の SDS-polyacrylamide gel はスラブゲル電気泳動装置 (Bio-rad 社製) を用いて 0.1% SDS 加 25 mM トリス 192 mM グリシン緩衝液 (pH 8.3) でゲル一枚につき 9 mA で 16 時間泳動した。

9) Western blotting 法: Towbin et al. の方法¹⁹⁾に準じた。ゲルメンブレン転写装置 (Bio-rad 社製) を用い、polyacrylamide gel からニトロセルロース膜への転写は 20% (v/v) メタノール、25 mM トリス 192 mM グリシン緩衝液 (pH 8.3) で 0.25 A 一昼夜行なった。

10) Autoradiography: まず 0.1 M リン酸 0.15 M 食塩緩衝液 (pH 7.3) に終濃度 2 mM の PMSF, 0.02% NaN_3 および 5% skim milk を加え blotto 液を作製した。この blotto 液に転写したニトロセルロース膜を浸し 30 分間ゆっくと振盪した。次に一次抗体を含んだ blotto 液 (blotto 液 100 ml にマウス腹水 100 μ l) にニトロセルロース膜を移し 2 時間反応させた後、blotto 液で 10 分間 3 回洗浄し、さらに 2 次抗体 (125 I 標識家兎抗体マウス IgG) を含んだ blotto 液に移し 30 分間反応させた。次いで blotto 液で 3 回、リン酸緩衝液で 1 回各 10 分間洗浄した後乾燥させ、X-ray フィルムに暴露させた。

11) vWF のトリプシン消化: vWF 純化物を牛トリプシンで酵素 (E) / 基質 (S) 比 1/50, 1/100 および 1/500 で各々 37°C 2 時間反応させ、p-APMSF で反応を終了させた後、dithiothreitol (DTT) による還元あるいは非添加 (非還元) 状態で 5%~20% SDS-PAGE を行い、Western blotting そして autoradiography を行なった。

12) モノクローナル抗体カラムによる vWF フラグメントの精製: 抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 を CNBr-Sepharose 4 B に固相化し抗体カラムを作製した。vWF 部分純化物を牛トリプシンにて E/S=1/50 で 37°C, 1 時間反応させた後、牛トリプシンの 10 倍量の SBTI と終濃度 5 mM の p-APMSF を加え反応を終了させ抗体カラムに添加した。1 時間吸着させた後、0.02% NaN_3 加 0.05 M トリス 0.15 M 食塩緩衝液 (pH 7.35) で 4°C にて一昼夜カラムを洗浄した。さらに 0.1 M トリス 0.5 M 塩化リチウム緩衝液 (pH 8.0), 0.05 M トリス 0.15 M 食塩緩衝液 (pH 7.35) で洗浄した後、3 M NaSCN 加 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で溶

出し void volume をプールし、アクアサイド II で濃縮した後 0.02% NaN_3 加 0.05 M トリス 0.15 M 食塩緩衝液 (pH 7.35) にて 4°C で二昼夜透析した。さらに精製するため透析後の vWF を凍結乾燥した後、1% リン酸 (pH 3.2) に溶解して HPLC 逆相カラム (C3) に添加し acetonitril にて溶出した。

また vWF 部分純化物の一部を牛トリプシンにて、E/S=1/100 で 37°C 2 時間反応させた後、SBTI 及び p-APMSF で反応を終了させ NMC-4 固相化カラムで vWF フラグメントを純化した。この vWF フラグメントについて SDS-PAGE を行い、Coomassie Blue 染色で認められた subband 部分のゲルを細かくカットし、Hunkapiller et al. の方法²⁰⁾に準じ electroelution を行なった。

12) アミノ酸分析及び N 末端アミノ酸配列の解析: アミノ酸分析は、Bidlingmeyer et al. の Waters Picotag 法²¹⁾に準じ行なった。また N 末端アミノ酸配列の決定は、Matudaira の方法²²⁾に準じ PVDF 膜を用いて行なった。

13) 合成ペプチド: Gutte & Merrifield の方法²³⁾²⁴⁾に準じ作製された vWF subunit のアミノ酸残基 C 474~P 488 及び L 694~P 708 に相当する 2 種の合成ペプチドを用いた。

成 績

1. vWF の GP Ib 結合に対する抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 の抑制効果

NMC-4 は ristocetin 及び蛇毒 botrocetin により惹起されるヒト多血小板血漿の凝集を抑制する特性を有していたので、両凝集惹起物質存在下での純化 vWF の GP Ib への結合能及び AS-vWF の GP Ib への直接的結合に対する NMC-4 の抑制効果を binding assay にて検討した。

ホルマリン固定血小板、 125 I 標識純化 vWF 及び NMC-4 の IgG の混液に ristocetin あるいは純化 botrocetin を反応させ、血小板に結合した 125 I-vWF 量を測定した。Ristocetin 及び蛇毒 botrocetin により誘導される 125 I-vWF の GP Ib への結合はいずれも終濃度ほぼ 10 μ g/ml で完全に抑制された (Fig. 1, top 及び middle)。また凝集惹起物質の添加なしに、 125 I-AS-vWF を GP Ib へと直接的に結合せしめ、これに対する NMC-4 の抑制効果を検討したところ、この結合をほぼ同濃度の IgG で完全に抑制された (Fig. 1, bottom)。

2. トリプシン消化 vWF フラグメントの NMC-4 との反応性

vWF フラグメントの DTT 非添加条件の SDS-PAGE 後の NMC-4 を 1 次抗体とした autoradiography 像は、トリプシン未処理ではゲル上端部(200 kDa 以上)に band が認められ、E/S=1/500 でゲル上端部から 130 kDa までの連続 band 像と 97 kDa の band が観

察された。E/S が 1/100~1/50 では 130 kDa と 97 kDa が main band として検出された。トリプシン消化 vWF フラグメントの DTT 添加による還元 band 像は、非消化物の 225 kDa から E/S=1/100 では 74 kDa 及び 52/48 kDa の 2 band が観察され、E/S=1/50 では 52/48 kDa の単一 band のみが検出された (Fig. 2)。従って NMC-4 はトリプシン消化 vWF フラグメントと DTT 還元あるいは非還元条件でともに反応性を示したが、還元フラグメントではその反応性が弱くなることが観察された。

3. 97 kDa フラグメントの精製及びそのアミノ酸組成

NMC-4 を CNBr-Sepharose 4 B にカップリングせしめ固相化カラムを作製し、vWF 純化物を牛トリプシンで E/S=1/50 で 2 時間反応させた消化物を添加・吸着させ、トリス塩酸緩衝液で洗浄後結合した蛋白を 3 M NaSCN 加酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で溶出し

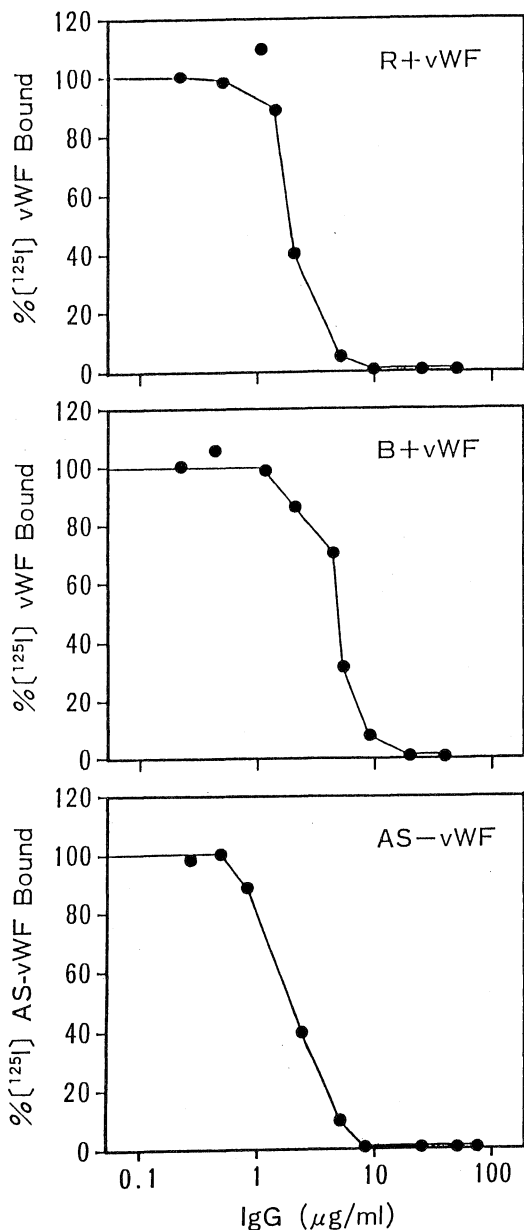


Fig. 1. The inhibitory effect of purified IgG from NMC-4 on the vWF or AS-vWF binding to platelet GP Ib. Top: ristocetin induced vWF binding. Middle: botrocetin induced vWF binding. Bottom: AS-vWF binding.

Table 1. NH₂-terminal sequence of the non-reduced 97 kDa fragment and its amino acid composition

NH₂-terminal sequence of the non-reduced 97kDa fragment

	97kDa analysed	Amino acid residues expected
Cycle 1	Val	Val-449
2	Thr	Thr-450
3	Leu	Leu-451
4	X	Asn-452
5	Pro	Pro-453
6	Ser	Ser-454

Amino acid composition of a tryptic 97kDa fragment

	97kDa analysed (% residues)	Amino acid residue 449-728 (% residues)
D/N	8.0	7.1
T	3.7	3.6
S	7.7	7.8
E/Q	12.5	12.1
P	9.4	8.2
G	5.7	4.6
A	7.2	6.4
C	3.0	2.5
V	10.2	10.4
M	1.3	1.8
I	5.0	5.0
L	11.7	11.1
Y	0.7	2.9
F	2.4	2.9
H	3.4	2.1
K	4.2	5.4
R	3.9	5.7
W	ND	0.4

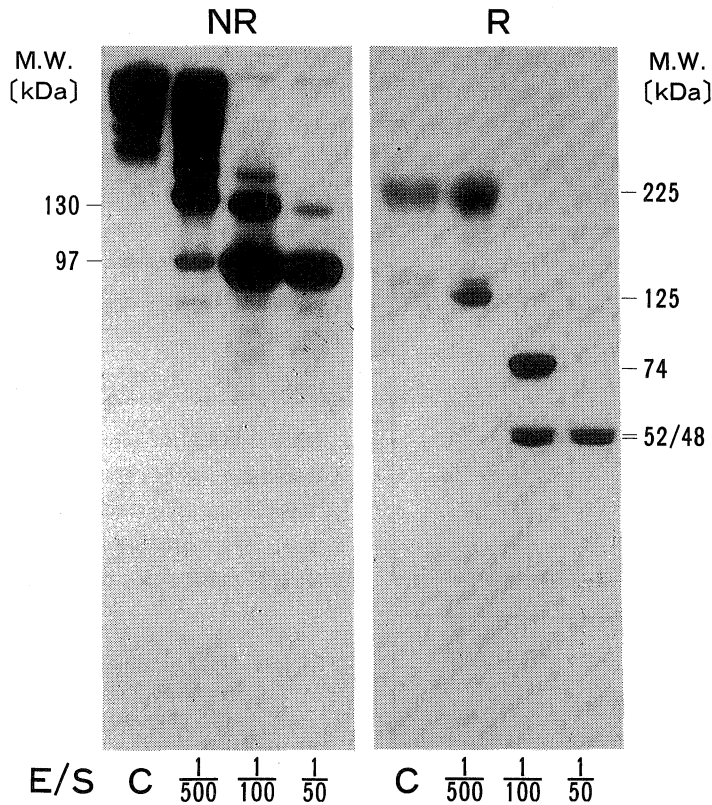


Fig. 2. The immunoreactivity of NMC-4 to tryptic vWF fragments generated by various enzyme to substrate (E/S) ratios. SDS 5-20% PAGE was followed by Western blotting analysis under nonreduced (NR) and reduced (R) condition. In each lane, a total of 33 μ g of whole tryptic digest of vWF was applied. The E/S ratio is indicated below. C: control (undigested vWF)

た。濃縮・透析後、凍結乾燥し、HPLC 逆相カラム(C3)に添加して major peak を得た (Fig. 3)。このものは SDS-PAGE で分子量 97 kDa を示した。また非還元サンプルの N 末端のアミノ酸配列は Val-Thr-Leu-X-Pro-Ser で、アミノ酸残基 449~454 に相当し、さらに subunit を構成するアミノ酸残基 Val 449~Lys 728 に相当する 52/48 kDa フラグメントの組成とはほぼ一致した (Table 1)。

4. 純化 vWF の GP Ib 結合に対する 97 kDa フラグメント及び 52/48 kDa フラグメントの抑制効果

ダイマーである 97 kDa フラグメント及びモノマーである S-CM 52/48 kDa フラグメントについて 125 I-vWF の GP Ib 結合に対する競合的抑制効果を検討した。Ristocetin により誘導される 125 I-vWF の GP Ib 結合は両フラグメントによりほぼ同じモル濃度 (10 μ M) で完全

に抑制された。Botrocetin により誘導される vWF の GP Ib への結合も両フラグメントは 10 μ M の濃度でほぼ同様に抑制した。また AS-vWF による GP Ib への直接的結合も両フラグメントにより競合的に抑制された (Fig. 4)。

5. 合成ペプチドによる vWF 及び 97 kDa フラグメントの GP Ib 結合抑制効果

vWF subunit の GP Ib 結合ドメインであるアミノ酸配列 449~728 残基のうち、ristocetin 依存性の vWF の GP Ib 結合を特異的に抑制する 2 つのペプチド即ち Cys 474~Pro 488 と Leu 694~Pro 708 を合成し、 125 I-vWF の botrocetin 依存性の GP Ib への結合に対する抑制効果を検討した。既報のごとく ristocetin により誘導される vWF の GP Ib 結合は両ペプチドにより濃度依存性に抑制されたが、botrocetin に誘導される vWF の GP Ib

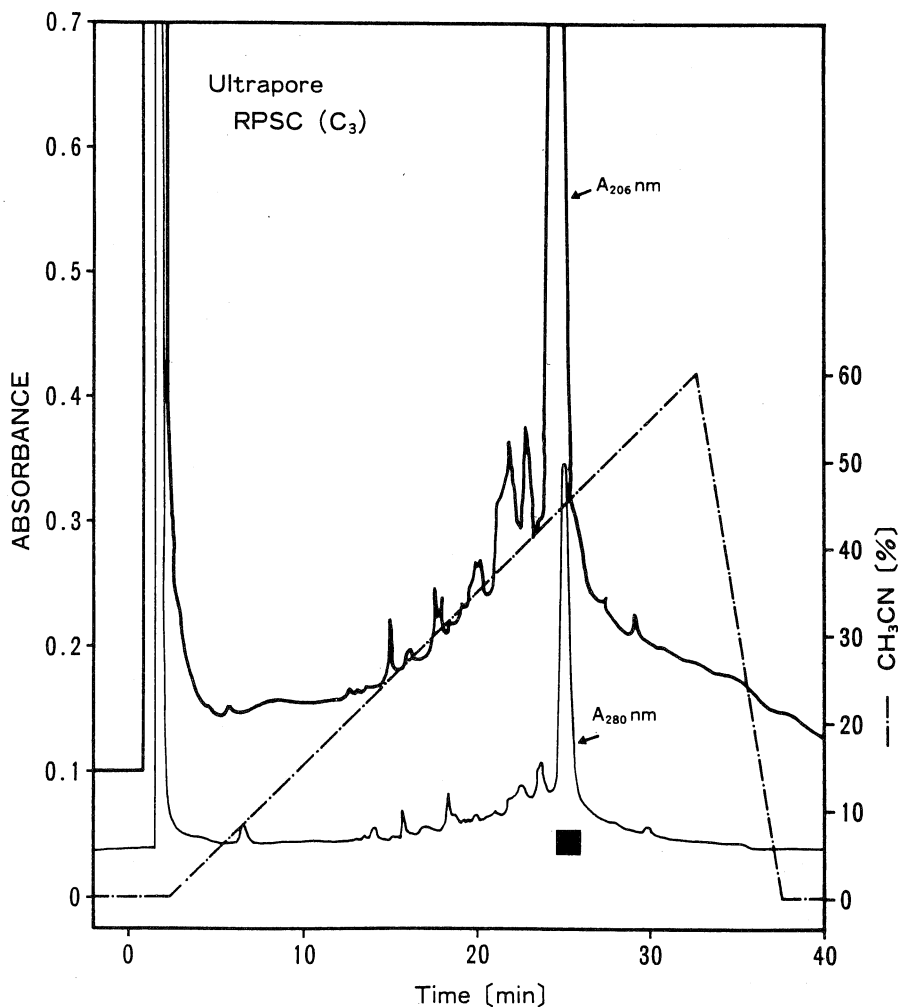


Fig. 3. The purity analysis of an immunopurified 97kDa fragment of vWF. A total of 450 μ g of the 97kDa fragment was subjected to reverse-phase HPLC on ultrapore RPSC (C₃) column. By the gradient elution of acetonitril from 0 to 60%, a major protein peak was recorded at the absorbance 206 and 280 nm.

結合はいずれのペプチドによっても抑制されなかった (Fig. 5). 同様に ¹²⁵I で標識した 97 kDa フラグメントの GP Ib 結合に対する抑制効果を検討したが, ristocetin に誘導される 97 kDa フラグメントの GP Ib 結合は両ペプチドにより濃度依存的に抑制されたが, botrocetin に誘導される 97 kDa フラグメントの GP Ib 結合は抑制されなかった. また ¹²⁵I 標識 97 kDa フラグメントの直接的な GP Ib 結合も両ペプチドでは抑制されなかった (Fig. 6).

考 察

NMC-4 は教室の嶋ら¹²⁾によって作成された 5 種類の抗 vWF モノクローナル抗体の一つで, 抗生物質 ristocetin 及び蛇毒 botrocetin により惹起されるヒト多血小板血漿の凝集を抑制する特性を有している. 両惹起物質による血小板凝集は血漿中の vWF の血小板膜上の GP Ib への結合を介して行なわれ, vWF 上の結合ドメインは vWF -subunit のアミノ酸配列中の 449 残基~728 残基で構成される polypeptide (52/48 kDa フラグ

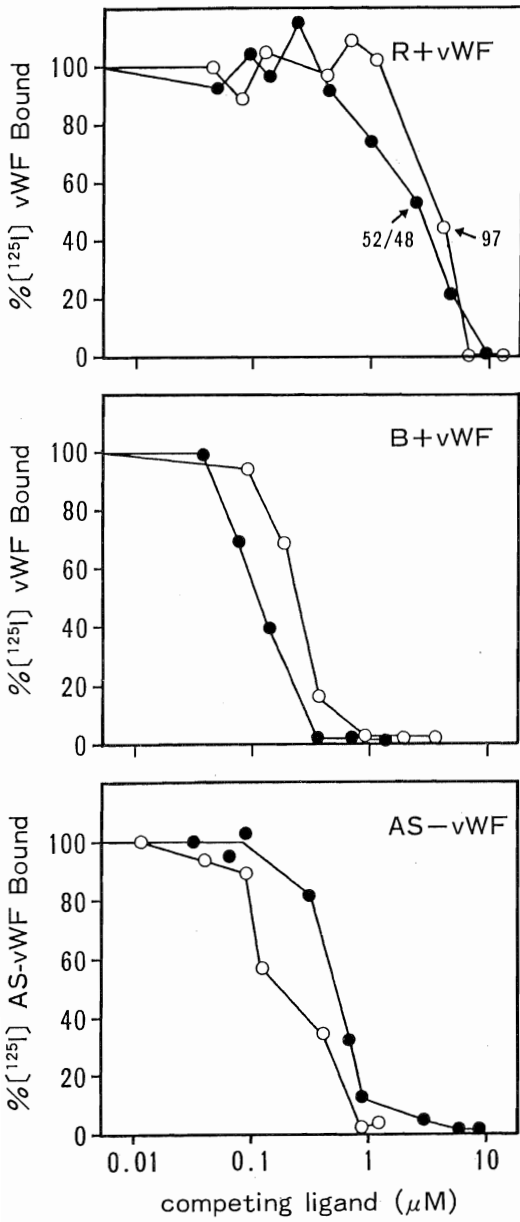


Fig. 4. Competitive inhibition of vWF or AS-vWF binding to GP Ib by the 97kDa-(○) or the 52/48kDa-(●) fragment. Top: ristocetin-induced vWF binding. Middle: botrocetin-induced vWF binding. Bottom: AS-vWF binding.

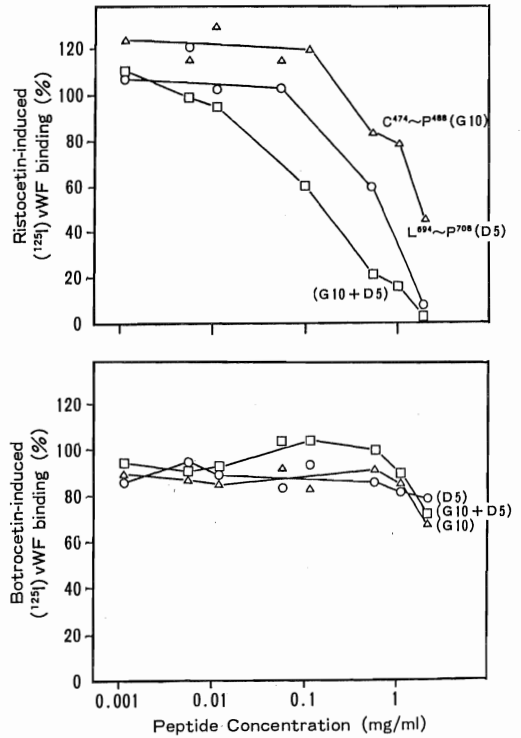


Fig. 5. Inhibitory effect of two synthetic peptides, C474-P488 and L694-P708, on the bindings of vWF to GP Ib induced by ristocetin (top) or botrocetin (bottom). The bindings of vWF to formalin-fixed platelets was assayed essentially as described in "Materials and Methods".

メント)であることが Fujimura et al⁸⁾によって明らかにされている。著者はNMC-4の binding siteの検索をするため、まず、vWFのGP Ib結合能に対するNMC-4の抑制効果と、NMC-4に対応するvWFのドメインを蛋白質レベルで検討した。

¹²⁵I 標識純化 vWF、ホルマリン固定血小板及び ristocetin あるいは botrocetin 存在下の vWF-GP Ib 結合反応系に種々の濃度の NMC-4 の IgG 分画を添加したところ、ristocetin 及び botrocetin により誘導される ¹²⁵I-vWF の GP Ib への結合はいずれも終濃度 10 μg/ml で完全に抑制された。また純化 vWF を neuraminidase で処理した AS-vWF を ¹²⁵I で標識し、ristocetin あるいは botrocetin の非存在下にて GP Ib への直接的な結合に対する NMC-4 の抑制効果を検討したが、10 μg/ml の濃度で完全に抑制された。従って NMC-4 は ristocetin, botrocetin により誘導される vWF-GP Ib 結合を抑制するのみならず、両惹起物質の非存在下での GP

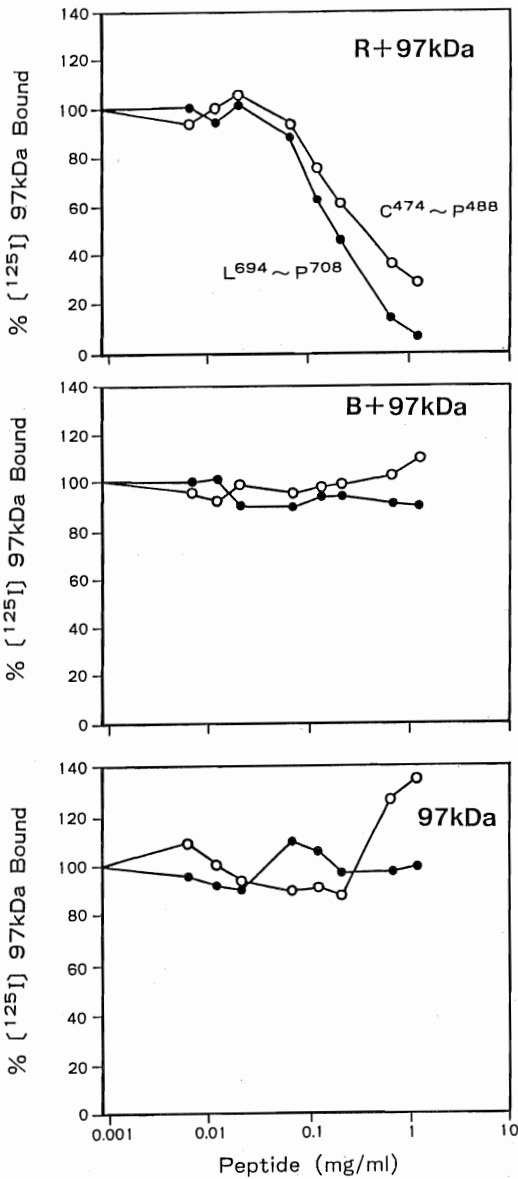


Fig. 6. Inhibitory effect of two synthetic peptides, C474-P488 and L694-P708, on the bindings of 97kDa fragment to GP Ib. The binding of 97kDa fragment to formalin-fixed platelets was assayed in the presence of ristocetin (top) or botrocetin (middle), and in the absence of these inducers (bottom).

Ib への結合をも抑制する抗体であることを認めた。このことより NMC-4 に対応する vWF ドメインを検索するため、トリプシンで消化した vWF フラグメントの SDS-PAGE を行い、Western blotting の後 NMC-4 と反応させ、autoradiography を行い band を観察した。

E/S=1/100~1/50 消化物の DTT 非添加(非還元)条件では 130 kDa 及び 97 kDa フラグメントの band が、また還元条件では 74 kDa 及び 52/48 kDa の 2 種の band が観察されたが、還元フラグメントの免疫反応性は非還元条件下のそれらより低下していた。従って、NMC-4 のエピトープは基本的にはアミノ酸一次構造により規定されているものではあるが、vWF の高次構造により依存しているものと考えられた。E/S=1/50 で 2 時間反応させた vWF のトリプシン消化物は 130 kDa フラグメントよりも 97 kDa フラグメントが主体であったので、この条件の vWF のトリプシン消化物を NMC-4 固相化 Sepharose カラムに添加して、97 kDa フラグメントを免疫分離した。さらに HPLC-reverse phase C3 カラムで 97 kDa フラグメントの純化物を得た。この 97 kDa フラグメントの N 末端の 6 つのアミノ酸配列は Val-Thr-Leu-X-Pro-Ser で、vWF subunit のアミノ酸残基 449~454 に一致した。また、このフラグメントのアミノ酸組成は 449~728 残基の値とほぼ同じであった。従って 97 kDa フラグメントはアミノ酸残基 449~728 よりなる 52/48 kDa フラグメントの homodimer と同定しえた。52/48 kDa フラグメント中には Cys 残基が 7 つ存在し、このうち 471 と 474 残基、509 と 695 残基はフラグメント内でジスルフィド結合を形成していることが Marti ら²⁵によって示されている。また vWF subunit 内には free の Cys 残基が存在しないことが報告されている。97 kDa フラグメントが 52/48 kDa フラグメントの homodimer であることが今回証明されたことより、459、462 及び 464 の Cys 残基は Fig. 7 のように 2 つの様式のいずれか即ち、1 ケまたは 3 ケが subunit 間のジスルフィド結合を形成しているものと考えられた。

97 kDa フラグメント及び S-CM 52/48 kDa フラグメントについて ¹²⁵I 標識 vWF の GP Ib 結合に対する競合的抑制効果を検討したところ、ristocetin により誘導される ¹²⁵I-vWF の GP Ib への結合は両フラグメントにより同じモル濃度で完全に抑制された。botrocetin により誘導される vWF の GP Ib への結合も同様に両フラグメントにより抑制され、また AS-vWF による GP Ib への結合も ristocetin あるいは botrocetin の添加なしに両フラグメントにより競合的に抑制された。従ってダイマーである 97 kDa フラグメントとモノマーである S-

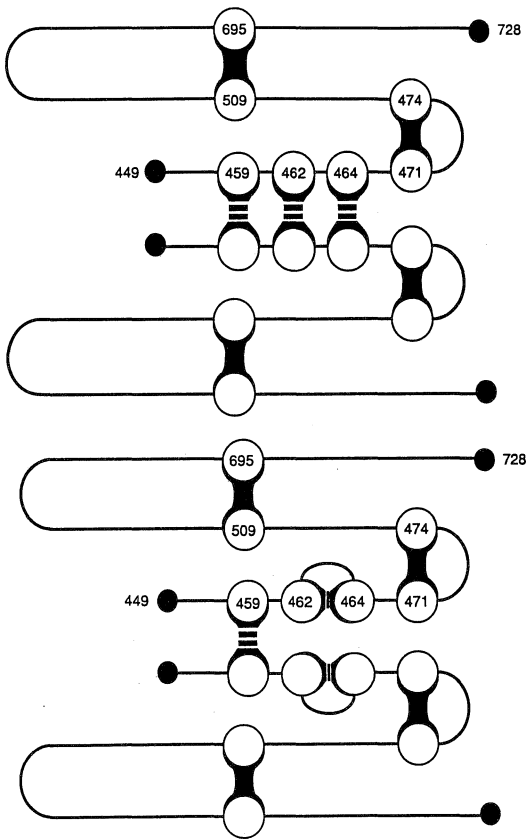


Fig. 7. Schematic representation of a dimeric 97kDa fragment of vWF and position of disulfide-pairings. Within seven cysteine residues in the 52/48kDa fragment (Val449-Lys728), two disulfide-pairings were determined as well as no existence of free cysteine residue within vWF subunit. Thus, one or three possible intersubunit disulfide-bonds are positioned as shown in the figure.

CM 52/48 kDa フラグメントは構造的には異なるも同様の GP Ib 結合をすると考えられ、また 97 kDa フラグメントは直接的に GP Ib に結合しようと考えられた。これらの結果より、97 kDa フラグメントは NMC-4 に対応するエピトープを含み、かつ GP Ib 結合ドメインと考えられるので、このドメインを狭小化するため 97 kDa フラグメントの 2 次分解を試みた。この 97 kDa フラグメントは TPCK-trypsin, thermolysin, subtilisin, α -chymotrypsin, arginylendopeptidase などの酵素に抵抗性を示し、lysylendopeptidase で分解されたが、NMC-4 との免疫反応性はただちに消失した。従って、NMC-4 と反応する 97 kDa フラグメントの 2 次分解産物は得

られなかった。また、97 kDa フラグメントおよび DTT 添加によるその還元状態の 52/48 kDa フラグメントがともに NMC-4 と免疫反応性を示したのに対し、S-CM 52/48 kDa フラグメントでは NMC-4 との免疫反応性は消失していた。このことから 52/48 kDa フラグメントが NMC-4 に対する抗原性を発現するためには Cys 残基が重要な役割を果たすものと考えられる。

Mohri ら²⁶⁾ (1988) は vWF subunit の 52/48 kDa フラグメントを構成するアミノ酸残基 449~728 のうち、それぞれ 15 残基からなる合成ペプチドを約 50 種作製し、N 末端由来のアミノ酸残基 474~488、C 末端由来 694~708 の 2 種が ristocetin 依存性 vWF 結合さらには AS-vWF の直接的な GP Ib 結合を抑制することを報告した。著者もアミノ酸残基 474~488 および 694~708 に相当する 2 種の合成ペプチドを作成し、両ペプチドが ristocetin 依存性 vWF 結合を濃度依存的に抑制することを認めた。しかし botrocetin 依存性 vWF 結合は両ペプチドによって抑制されなかった。97 kDa フラグメントを ¹²⁵I で標識し、ristocetin あるいは botrocetin 存在下で GP Ib 結合せしめ、この結合に対する両合成ペプチドの抑制効果を検討したところ、ristocetin 依存性の結合は抑制されたが、botrocetin 依存性の結合は抑制されなかった。また両ペプチド存在下にて 97 kDa フラグメントの直接的な GP Ib 結合についても抑制されなかった。これらのことより、97 kDa フラグメントに含まれる ristocetin 依存性 GP Ib 結合ドメインは vWF subunit の 474~488 残基および 694~708 残基の不連続の両部位にあるのに対して、botrocetin で発現される GP Ib 結合ドメインは少なくともこれら 52/48 kDa フラグメントの N および C 末端部位には存在しないことが示された。また惹起物質非存在下での直接的結合はあずかる結合ドメインもこれら両部位には存在しないことより 97 kDa フラグメントにおいて、惹起物質存在下での GP Ib 結合あるいは非存在下での直接的な GP Ib 結合にあずかる結合ドメインはいずれも異なると考えられる。

結 論

抗 von willebrand 因子 (vWF) モノクローナル抗体 NMC-4 を用いヒト vWF subunit 中の GP Ib 結合ドメインについて解析した。

1. NMC-4 は ristocetin および botrocetin により誘導される vWF の GP Ib 結合を完全に抑制した。また AS-vWF の GP Ib 結合も完全に抑制した。

2. 非還元下での vWF のトリプシン水解物の SDS-PAGE で、NMC-4 反応性の分子量 130 kDa, 97 kDa の 2 band を認めた。

3. NMC-4 固相化カラムを用いて、vWF のトリプシン消化物より 97 kDa フラグメントを精製した。97 kDa フラグメントは 52/48 kDa フラグメントの homodimer で、ristocetin 及び botrocetin 依存性 vWF 結合そして AS-vWF の直接的結合も抑制した。

4. 非還元条件で得られた 97 kDa フラグメントに比べ還元で得られた 52/48 kDa フラグメントの方が NMC-4 に対する免疫反応性が低下した。これより NMC-4 が単にアミノ酸一次構造のみでなく高次構造をも認識する抗体であることが示唆された。

5. ristocetin および botrocetin で発現する GP Ib 結合部位は互いに異なり、ristocetin 依存性 vWF 結合にはアミノ酸残基 474~488, 694~708 の不連続的な 2 つの部位が関与する。

稿を終えるにあたり、アミノ酸分析及びアミノ酸配列の解析さらに合成ペプチドの作成にご援助いただいた藤田学園保健衛生大学医高分子 千谷晃一教授に深謝致します。

尚、本研究は平成元年度文部省科学研究費重点領域研究「血栓性素因」の助成を受けた。

本論文の要旨は、第 11 回日本血栓止血学会(1988, 東京), 第 51 回日本血液学会総会 (1989, 前橋), XIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (1989, Tokyo) に於て発表した。

文 献

- 1) **Collers, B. S.**: von Willebrand disease; Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. (Colman, R. W., Hirsh, Marder, V. J. and Salzman, Z. W., eds.). 2nd ed., Lippincott Co., Philadelphia, p 60, 1987.
- 2) **Ruggeri, Z. M. and Zimmerman T. S.**: von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* **70**: 895-904, 1987.
- 3) 藤村吉博: von Willebrand 因子の構造と機能. *血液と脈管* **20**: 1-12, 1989.
- 4) **Sadler, J. E., Shelton-Inloses, B. B., Sorace, J. M., Harlan, J. M., Titani, K. and Davie, E. W.**:

Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6394-6398, 1985.

- 5) **Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Ashida, K., Walsh, K. A., Chopek, M. W., Sadler, J. E. and Fujikawa, K.**: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* **25**: 3171-3184, 1986.
- 6) **Foster, P. A., Fulcher, C. A., Marti, T., Titani, K. and Zimmerman, T. S.**: A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **262**: 8443-8446, 1987.
- 7) **Takahasi, Y., Kalafatis, M., Girma, J-P., Sewerin, K., Anderson, L-O. and Meyer, D.**: Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* **70**: 1679-1682, 1987.
- 8) **Fujumura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.**: von Willebrand factor; a reduced and alkylated 52/48kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **261**: 381-385, 1986.
- 9) **Pareti, F. I., Niiya, K., Kostel, P. J., McPherson, J. M. and Ruggeri, Z. M.**: Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J. Biol. Chem.* **262**: 13835-13841, 1987.
- 10) **Kalfatis, M., Takahasi, Y., Girma, J-P. and Meyer, D.**: Localization of a collagen interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues gly-911 and glu-1365. *Blood* **70**: 1577-1583, 1987.
- 11) **Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A. and Ginsberg, M. H.**: The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 8057-8061, 1985.
- 12) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘: von Willebrand 因子 (vWF) に対

- するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. 奈医誌. **36**: 662-669, 1985.
- 13) 西尾健治: 蛇毒 botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究 I. Botrocetin cofactor 活性測定を検討. 奈医誌. **39**: 673-682, 1988.
- 14) Walsh, P. N., Mills, D. C. B. and White, J. G.: Metabolism and function of human platelets washed by albumin density gradient separation. Brit. J. Haematol. **36**: 281-296, 1977.
- 15) Steinbuch, M. and Audran, R.: The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. Arch. Biochem. Biophys. **134**: 279-284, 1969.
- 16) De Marco, L. and Shapiro, S. S.: Properties of human asialo-factor VIII; a ristocetin-independent platelet-aggregation agent. J. Clin. Invest. **68**: 321-328, 1981.
- 17) Fraker, P. J. and Speck, J. C.: Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. **80**: 849-857, 1978.
- 18) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature **227**: 680-682, 1970.
- 19) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrodephoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **76**: 4350-4354, 1979.
- 20) Hunkapiller, M. W., Lujan, E., Ostrander, F. and Hood, L. E.: Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Methods Enzymol. **91**: 227-236, 1983.
- 21) Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A. and Tarvin, T. L.: Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. J. Chromatogr. **336**: 93-104, 1984.
- 22) Matsudaira, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane. J. Biol. Chem. **262**: 10035-10038, 1987.
- 23) Gutte, B. and Merrifield, R. B.: The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. J. Am. Chem. Soc. **91**: 501-502, 1969.
- 24) Gutte, B. and Merrifield, R. B.: The synthesis of ribonuclease A. J. Biol. Chem. **246**: 1922-1941, 1971.
- 25) Marti, T. M., Roesselet, S. J., Titani, K. and Walsh, K. A.: Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. Biochemistry **26**: 8099-8109, 1987.
- 26) Mohri, H., Fujimura, Y., Shima, M., Yosioka, A., Houghten, R. A., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein I b. J. Biol. Chem. **263**: 17901-17904, 1988.