思い出することなど：血小板膜糖蛋白について

半田 誠

慶應義塾大学輸血・細胞療法センター

はじめに

1979年、血液内科を専門とすることに決めて、その際に縁あって大学医局の血小板グループに所属することとなった。その当時はわが国においては未だ血栓・止血学の黎明期で、その後の血小板研究の華やかなりし時代を迎える予感があったように覚えている。安藤泰彦先生(のち東海大学臨床検査医学教授)を中心に、渡辺清明先生(のち臨床検査医学教授)と池田康夫先生(のち血液内科教授)が脇を固め、米国流のフランクでかつ自主性を重んじる自由な雰囲気のもとで楽しく研究を始めることができたことは、今から思うと幸運であった。当方のテーマは‘血小板のコラーゲン線維への粘着に関する研究’で、これが学位論文となった。研究は病棟の仕事を片付けた後に、仲間同士で採血し合って血小板を分離するといったことから始まり、深夜にまで及ぶことも多かったが、充実していた。その後、1983年からの米国留学、そして、1986年からの長い教職人生を通じて常に血小板が傍らにあり、振り返ってみると研究の楽しさと基礎から臨床に及んで血小板の面白さを実感し続けることができた。

血小板膜糖蛋白研究のきっかけ：とんだ思い違い

1981年頃、新潟大学の高橋芳右先生から、その当時世界的にみて数例しか報告のなかった血小板型フォン・ビレブランド病(VWD)2家系の血小板膜糖蛋白解析の依頼が研究室にあり、当方が担当することとなった。その当時の研究手法は、血小板 lysate を SDS 電気泳動法で展開したゲルを、クマシーブルーや PAS で蛋白部分や糖鎖を染色して、検出された糖蛋白(GP)バンドのパターンを比較解析すると

いう極めて単純なものであった。主要な GP は相対的分子量の高い順に番号を付けて GP I, GP II, GP III, GP IV・・・と、さらに分子量が近似しているもので異なるものでは a, b, c・・・などと添字をつけて命名され、先天性血小板機能異常症である Bernard-Soulier 症候群(BSS)では GP Ib が欠損していることが1975年に明らかにされ、それが血小板上のフォン・ビレブランド因子(VWF)の受容体であるらしいことがわかっていた。血小板型 VWD は血小板側の原因により、VWF の異常である VWD に類似した表現型を示す。つまり、GP Ib の異常が患者の血小板で予想されていた。そして、実際ふたを開けてみると、常染色体優性の遺伝形式を示す4人の患者に限ってはすべて、通常は一本のバンドである GP Ib(α 鎖)が、易動度の異なる二つのバンド(doublet)で構成されていることがわかった。一つは健常対照と同じ分子量(GP Ib)で、もう一つはそれより若干分子量の低いバンド(GP Ib')であった。そのときは大騒ぎとなり、まさにこの GP Ib' が疾患の病因となる分子異常(gain of function)を直接反映するものと考え、この結果を含んだ論文が1984年に発表されるに至った¹⁾。しかしこの推測は、とんだ思い違いであることが後に明らかとなった。GP Ib α 鎖(145 kDa)の細胞外部分(130 kDa)は、トリプシンの限定分解により、N末端を占める45 kDa部分と糖鎖の極めて豊富なC末端を占める Macroglycopeptide(MGP)に分断される。そして、MGPにはアミノ酸13残基で構成されたリピート(variable number tandem repeat: VNTR)が存在、そのリピート数がそれぞれ4, 3, 2, 1個保有して、この順に分子量の低くなる4種類のバリエーションが存在する²⁾。つまり、このとき検出された異常バンドは、後に明らかにされたこの疾患の分子異常(Val239 → Met 変異)に強く連鎖した VNTR

であったわけである³⁾。いずれにしろ、この発見をきっかけに、VWF 研究のメッカであるカリフォルニアの Scripps 研究所の TS Zimmerman 博士のラボに留学し、その当時全く不明であったこの VWF 受容体蛋白の構造と機能の関連の解明(VWF 結合部位の同定)に挑戦することとなった。ちなみに、同時期に奈良医科大学の藤村吉博先生(のち奈良医科大学輸血部教授)が留学され、VWF 分子の解析(GP Ib 結合部位の同定)により大きな業績を残された。

研究の成果：米国での経験

その当時は未だ分子生物学的手法は一般に登場しておらず、モノクローナル抗体を用いた蛋白レベルでの免疫化学的解析が主流であった。純化した蛋白を、酵素による限定分解で断片化し、種々の機能性・非機能性抗体のエピトープをその上に同定することで、その分子の構造-機能連関を解析するという戦略であった。しかしご多分に漏れずそうことは簡単でなかった。その理由は、対象が VWF のような可溶性血漿蛋白ではなく、ラボで技術的なノウハウを全く保持していない水に不溶の膜蛋白であることだった。ラボが保有しているただ一つの抗 GP Ib 抗体(LJ-P3)を頼りに、新たな抗体パネル作成の抗原に用いる蛋白を、抗体カラムを用いて精製することから始めた。海軍病院から毎日のように届く大量の血小板濃厚液と格闘し、血小板の分離・洗浄から可溶化、そして LJ-P3 抗体カラムに続き WGA レクチンカラムを併用した精製法を確立するまでに 2 年程を費やした。そして、新たに作成した二つの抗体、LJ-Ib1(強力な阻害抗体)と LJ-Ib10(非阻害抗体、後にトロンビン結合を強力に阻害することが判明)を加えて、固相化免疫分離法により、ヨード標識した精製蛋白の酵素断片上の抗体エピトープを同定した。そして、VWF の結合部位が N 末端を占める 45 kDa 断片に存在することを示す最終データが出そろったのは、3 年が経過して帰国の準備をしようとしているときであった。当該論文はその年の秋に出版され、終わりよければすべてよし、今までの苦勞が報われたと強く感じた⁴⁾。翌年には、共同研究者のワシントン大学の千谷晃一先生(のち藤田保健衛生大学教授)による当該 45 kDa 断片の全一次構造解析結

果が、他のグループによる cDNA クローニングの論文と back to back で報告された^{5,6)}。時代はまさに蛋白化学から分子生物学への転換期であった。

研究テーマを探す：盲目的モノクローナル抗体作成プロジェクト

研究の質・量ともの圧倒的な彼我の差を米国で体験したなかで、新たな研究テーマをしばらく模索した。そこで思いついたのは、血小板に対するモノクローナル抗体を盲目的に作製し、そのなかから興味ある抗体をつり上げて、それをツールとした研究を立ち上げるというものであった。マウスの免疫源としてまず用いたのは血小板膜の WGA レクチン結合分画であった。最初は、洗浄血小板固相化プレートを用いたスクリーニングにより 3 種類のクローン(WGA-1, -2, -3)を得たのみであった(のちに対応抗原はそれぞれ P-セレクチン、Integrin-associated protein, GPIb α と判明)。その後から宝酒造(片山政彦研究員)の全面協力を得て、免疫源やスクリーニング法を工夫することでおおよそ 50 種類に及ぶクローンを 1987 年から 1991 年にかけて選択することができ、多くの対応抗原分子が同定できた。

そのなかで予期しなかった分子の一つとして、1984 年に報告されたばかりの P-セレクチン(PS)があった。PS は血小板の α 顆粒や血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体の膜蛋白で、細胞の活性化に伴い細胞表面に移動し、白血球の接着の標的分子となるセレクチンファミリーに属する。1989 年には、cDNA クローニングされ、その翌年には遺伝子構造が明らかとなった⁷⁾。大変興味があることにはインタクトの膜貫通型(mPS)以外に、選択的スプライシングにより膜貫通部分を含んだ領域をコードするエクソン 14 を欠失した可溶型アイソソフォーム(asPS)のメッセージが巨核球や血管内皮細胞に少なからず存在することであった。ちょうど時を前後して、エピトープの交差しない二つの抗体の組み合わせ(WGA-1 と PL7-6)によるサンドイッチ ELISA 法を確立し、健康人の血漿中に 50–100 ng/mL レベルの可溶型 PS(sPS)を検出するとともに、さらに血小板の微小血栓が誘発される血栓性血小板減少性紫斑病や溶血性尿毒症症候群患者においては異常高値を示す

ことを把握していた⁸⁾。1992年から1995年にかけて、われわれも含む複数のグループから、急性血栓性疾患、急性肺障害、膠原病やマラリア感染症で血漿 sPS 濃度の異常高値(500 ng/mL 以上)が報告された。しかし、他の細胞接着因子受容体と同様に、その分子がコミットする病態において高値となる可溶性分子は、蛋白分解酵素により細胞表面から truncate されたもの(tPS)であると思われていたが、何の証拠も示されていなかった。そこで、膜貫通部分 C 末端(14C)および細胞内部分の N 末端(15N)アミノ酸配列に一致した合成ペプチドで免疫して、それぞれのウサギ抗体を作製した。血漿および血小板 lysate から抗体(WGA-1)吸着カラムで分離した抗原を免疫ブロット法で抗ペプチド抗体との反応性を見たところ、血漿由来のものは抗 15N 抗体に比して抗 14C 抗体の反応性が著しく低下していた。一方、血小板由来のものは、両方の抗体に同等の反応性を示した。これらのことは、メッセージレベルで予測されていた asPS が生体内で実際の産物として産生されている可能性を示唆するものであった。そこで、このことを直接証明するために、大量のヒト血漿(14 L)および血小板(120 単位)から抗体吸着カラムで抗原を分離/精製(収量と収率はそれぞれ 1.6 mg と 53%, 4 mg と 5.5%であった)し、酵素による分解断片の N 末端アミノ酸配列をシークエンサーで解析した。この仕事を担ったのは石綿紀久研究員(のち日産化学開発部長)と理化学研究の瀧尾擴士博士であった。その結果、血漿および血小板には mPS や tPS とともに asPS が少なからず存在していることが証明された⁹⁾。まさに、米国で学んだ蛋白レベルでの力技の勝利であった。

おわりに

自ら試験管を振っていた頃のことを思い出すままに書いた。その当時の、GP Ib の研究は臨床(患者の膜糖蛋白解析)から基礎へ、そして PS は基礎から臨床(sPS の測定)への方向性を図らずも示したものである。それから 30 年あまりが経過し、流動状態下(high shear stress 依存性)で誘導される VWF と GP Ib の動的な構造変化が、45 kDa 部分と VWF の GP Ib 結合部位である A1 ドメインのリコンビナント蛋

白で形成された複合体の結晶解析により明らかにされようとしている¹⁰⁾。一方、sPS 濃度は血栓性疾患の信頼できる分子マーカーとしての地位が確立されつつある¹¹⁾。どんなに些細なことでもそのときの研究成果がその後の研究の進歩に貢献できたなら、研究者にとって大きな喜びである。

文献

- 1) Takahashi H, Handa M, Watanabe K, Ando Y, Nagayama R, Hattori A, Shibata A, Federici AB, Ruggeri ZM, Zimmerman TS: Further characterization of platelet-type von Willebrand's disease in Japan. *Blood* **64**: 1254-1262, 1984.
- 2) López JA, Ludwig EH, McCarthy BJ: Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications. *J Biol Chem* **267**: 10055-10061, 1992.
- 3) Takahashi H, Murata M, Moriki T, Anbo H, Furukawa T, Nikkuni K, Shibata A, Handa M, Kawai Y, Watanabe K: Substitution of Val for Met at residue 239 of platelet glycoprotein Ib alpha in Japanese patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood* **85**: 727-733, 1995.
- 4) Handa M, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Ruggeri ZM: The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. Characterization by monoclonal antibodies and partial amino acid sequence analysis of proteolytic fragments. *J Biol Chem* **261**: 12579-12585, 1986.
- 5) Titani K, Takio K, Handa M, Ruggeri ZM: Amino acid sequence of the von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5610-5614, 1987.
- 6) Lopez JA, Chung DW, Fujikawa K, Hagen FS, Papayannopoulou T, Roth GJ: Cloning of the alpha chain of human platelet glycoprotein Ib: a transmembrane protein with homology to leucine-rich alpha 2-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5615-5619, 1987.
- 7) Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, McEver RP: Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J Biol Chem* **265**: 21381-21385, 1990.
- 8) Katayama M, Handa M, Araki Y, Ambo H, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y: Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol* **84**: 702-710, 1993.
- 9) Ishiwata N, Takio K, Katayama M, Watanabe K, Titani K, Ikeda Y, Handa M: Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *J Biol Chem* **269**: 23708-23715, 1994.
- 10) Blenner MA, Dong X, Springer TA: Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib. *J Biol Chem* **289**: 5565-5579, 2014.
- 11) Blann AD: Soluble P-selectin: the next step. *Thromb Res* **133**: 3-4, 2014.