原 著

血小板膜糖蛋白に関する研究

1) 血小板抗体に対応する膜抗原の解析

藤村 欣吾* 高田 昇* 蔵本 淳*

Identification of Platelet Specific Membrane Protein Against Various Anti-platelet Antibodies

Kingo FUJIMURA*, Noboru TAKATA* and Atsushi KURAMOTO*

Key words: platelet membrane, platelet antibody, glycoprotein, double antibody immunoprecipitation method, lactoperoxidase iodination

This experiment was designed and carried out to isolate and identify the membrane receptor proteins and antigens in association with platelet functions.

The platelet specific membrane proteins against rabbit anti-human platelet antibody, rabbit anti- β_2 microglobulin, platelet antibodies 4 SLE and ITP patients were examined. The O type healthy human ACD blood (200—600 ml) was collected and the platelet suspension was prepared. The washed platelets were labelled with ^{125}I -Na by lactoperoxidase method, and then washed 3 times with the same buffer. The ^{125}I -labelled platelets were sonicated or disrupted by glycerol loading method, and this lysed platelet solution was layered on the top of a solution of 27% sucrose and centrifuged at 4°C at 23,000 rpm for 4 hours. The membrane fraction remained as a narrow band above the sucrose interface, and this band was isolated, suspended with phosphate buffer for washing, and centrifuged at 4°C at 23,000 rpm for 2 hours. These isolated ^{125}I -labelled membrane was solubilized with 0.1% Emalgen 911 (HLB 13.7) for 12—16 hours at 4°C, and centrifuged at 78,000 G for 2 hours. The supernatant was used for double antibody immunoprecipitation method. This method was performed as follows: solubilized, iodinated platelet membrane solution was incubated with IgG fraction of antiserum (rabbit anti-human platelet serum, SLE patient's serum, ITP patient's serum, normal rabbit and human serum or rabbit anti- β_2 microglobulin) for 1 hour at 37°C and 18 hours at 4°C. The IgG fraction of rabbit anti-human IgG or goat anti-rabbit IgG was added and the mixtures were again incubated in the same way. The immunoprecipitation was prepared by centrifugation, washed 3 times with PBS, then solubilized in 2% SDS solution and analyzed by 5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was cut into 1 mm slices and their radioactivities were counted.

The ^{125}I -labelled solubilized platelet membrane was precipitated as five radio-

* 広島大学原医研内科〔〒734 広島市霞 1—2—3〕, Department of Internal Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, 7, Japan.

active peaks by rabbit anti-human platelet antibody and their molecular weights (M.W.) were 18×10^4 , $16.5-15 \times 10^4$, $10.5-9 \times 10^4$, $6.8-6.0 \times 10^4$ and $5.2-5.0 \times 10^4$, respectively. Two of five peaks corresponded to glycoprotein I and III. When SLE serum was used, the radioactivities of glycoprotein III and M.W. 6×10^4 membrane protein were greater than those obtained by using normal human serum, but ITP serum did not show remarkable changes compared to normal. The anti- β_2 microglobulin bound to the glycoprotein IIa remarkably.

These results may suggest that the platelet has various specific antigen determinant sites against anti-human platelet antibody, platelet antibody-positive SLE serum and anti- β_2 microglobulin.

But to decide if these membrane proteins bind to each serum specifically or not, F(ab)₂ fragment of IgG from each serum must be used instead of IgG.

はじめに

血小板膜は血小板凝集の刺激を最初に受ける窓口であり、血小板膜蛋白と血小板機能との関連が血小板異常症等をモデルとして研究され始めてきている。しかし個々の膜蛋白との意味付けは非常に困難であるといわざるを得ない。最近になって ristocetin の結合部分として Glycoprotein I といわれる分子量155,000の血小板糖蛋白が Nachman らによって明らかにされた¹⁾。糖蛋白の欠如している Bernard-Soulier 症候群において ristocetin 凝集が欠如している所見がみ出され、また Thrombasthenia での glycoprotein IIb, III の減少と各種凝集剤に対する凝集異常との関連などは現在までに血小板膜蛋白とその特異的機能性が結びついた代表例と考えられる。このような、いわゆるリセプターといわれるものの実体の研究は、生物学領域全般において研究の対象になっているが、膜分離や充分量の膜蛋白の収穫ができないこと、あるいは膜の可溶化に関する問題等があり、今後の進歩が期待される。そこで、私どもは膜蛋白と機能を結びつける研究の一端として、血小板抗体に対応する血小板膜抗原、すなわち、血小板膜蛋白の同定を試み、ここにその予備成績を報告する(図1)。

I. 方 法

1～3人のヒトO型ACD血200～600mlより血小板を分離、洗浄する。Phillips¹⁾らの方法に準じて血小板浮遊液に lactoperoxidase、お

よび ^{125}I を加え混和後過酸化水素を30秒間隔で5回加え、さらに混和し、Tris-EDTA-NaCl-Glucose buffer で3回遠心洗浄後、Tris-EDT A-Sucrose buffer に浮遊させる。このような ^{125}I 標識血小板より Jamieson³⁾ らの方法に準じて膜を分離しリン酸 buffer にて洗浄した。得られた ^{125}I 標識血小板膜に、今回は非イオン性界面活性剤で、親水疎水比 (hydrophilic lipophilic balance: HLB) 13.7 をもつ Emulgen 911 を最終濃度0.1%になるように加え、約12～16時間4℃で放置した。その後78,000G 2時間超遠心を行い上清を ^{125}I 標識可溶化血小板膜成分として以下の実験に用いた。この段階での可溶化は disc electrophoresis で約5～7本の band が得られる程度である。

血小板抗体に対応する膜蛋白の同定には、今回は Nachman らの行った double antibody immunoprecipitation 法を用いた¹⁾。すなわち512倍の凝集抗体価をもつ抗ヒト血小板抗体ウサギ血清、クームス消費試験にて血小板抗体が陽性を示した、SLE、ITP 患者血清、さらには anti- β_2 microglobulin ウサギ血清、control として正常人血清、正常家兎血清よりそれぞれ TEAE cellulose column chromatography により $\gamma\text{-gl}$ を分画し、硫酸にて濃縮した。

これら広い意味での血小板抗体と ^{125}I 標識可溶化血小板膜とを一定量混和し、37℃で1時間さらに4℃で overnight それぞれ incubate した。さらに前述と同様に抗ヒト IgG ウサギ血清、あるいは、抗ウサギ IgG ヤギ血清より $\gamma\text{-gl}$ を分画し、ヒト $\gamma\text{-gl}$ には抗ヒトウサギ

Fig. 1 Detection procedure of specific antibody binding site on human platelet

Fig. 2 ^{125}I labelled precipitation peaks with rabbit anti-human platelet serum (IgG frac.)

γ -gI を、ウサギ γ -gI には抗ウサギ、ヤギ γ -gI をそれぞれ加え、前回と同様に incubate し、血小板膜蛋白と immune complex を形成させた。その後12,000G、20分、遠心して precipitate を得、3回 PBS で洗滌後、5% SDS acrylamide を用いて、disc electrophoresis を行った。得られた gel は約 4.8cm に渡って 1 mm 毎に切断し、それぞれの放射活性をオートガンマーにて測定した。

II. 結 果

1. 抗ヒト血小板異種抗体と結合する膜分画
可溶性膜成分に抗ヒト血小板抗体ウサギ血清を作用させ double antibody immunoprecipitation 法で得られた precipitate を SDS disc electrophoresis を行い、おのおの gel slice count より control の gel slice count をさし引いた値をプロットした (図2)。米印の部分

Table 1 Molecular weight determination of ^{125}I labelled membrane protein after immunoprecipitation

Anti-human platelet antibody (Rabbit IgG frac.)	M. W. ($\times 10^4$)	
Z	18	Myosin H. chain
Gp I	16.5—15	20
(Gp II a)	13.5	
(Gp II b)	12.5	
Gp III	10.5—9.2	
X	6.8—6.0	
Y	5.2—5.0	Actin
Si. F (SLE) · (IgG frac.)		4.3
Gp III	10.5—9.2	β -thromboglobulin
X	6.0	reduced 0.58
		unreduced 1.07
Mi. F (ITP) · (IgG frac.)		
not detectable	(—)	
Anti- β_2 microglobulin (Rabbit IgG frac.)		
Gp II a	13.5	
Gp II b	12.5	
(Gp III)	10.5—9.2	

の isotope count が対照に比し145%~257.5%と高く糖蛋白の I, III の部分と一致するが, 中には仮称 Z, X, Y の部分にも作成した血小板抗体と反応する蛋白が存在する可能性を認めた.

作成した血小板抗体 0.6ml を 2.7×10^9 の O 型血小板で吸収したいわゆる吸収抗血清と, 血小板抗体血清とを, おのおの可溶化血小板膜と反応させ比較すると, 可溶化血小板膜を泳動した場所と同一の糖蛋白を中心とした沈降物は吸収血清ではほとんど吸収されてしまう. 以上より, 作成したヒト血小板抗体ウサギ血清は, 糖蛋白 I, III をはじめとして, 約5つの血小板膜蛋白と何らかの型で反応すると考えられる.

2. 抗ヒト血小板同種抗体と結合する膜分画

次に, 血小板抗体陽性の, SLE, ITP 患者おのおの1例と, 抗 β_2 microglobulin 抗体について可溶化血小板膜蛋白との反応では, 正常人 IgG と SLE 患者 IgG を比較すると, SLE, IgG と結合する Glycoprotein III の方が正常人 IgG との場合に比し高値を示した. 今回用いた ITP 症例の IgG では, 正常人 IgG との間に明らかな差を認めなかった.

Anti- β_2 microglobulin より分画した IgG を

用いた場合, 正常人 IgG に比し, 糖蛋白 II a, II b, III の部位での ^{125}I の取り込みが多く, これらの蛋白との結合能の強いことがわかった.

正常人 IgG を用いた場合の glycoprotein I, II a, II b, III および, 仮称 X とした膜蛋白の各分画の net count に対する SLE, ITP, anti- β_2 microglobulin を用いた場合の各 net count の比をみると, SLE では glycoprotein III と X に, それぞれ131.9%, 139.3%と正常に比し多くの ^{125}I の集積を認め, anti- β_2 microglobulin では glycoprotein II a, II b, III に 135.5%, 156.7%, 132.5%とそれぞれ多くの放射活性を認めた.

以上の結果をまとめてみると(表1), ウサギで作成した血小板抗体は, 分子量16万, 10万の glycoprotein I, III と分子量18万, 6万, 5万に相当する Z, X, Y と仮称した膜蛋白と反応する.

今回用いた SLE 血清は血小板クームス消費試験陽性のもので, glycoprotein III と膜蛋白 X との間に反応を示したが, 同じクームス消費試験で弱陽性を示した ITP 症例の血清 IgG は, 正常人血清よりむしろ低い膜蛋白との反応性を

示した。

Anti- β_2 microglobulin は Glycoprotein II a, II b, III との反応性を示した。

III. 考 察

ヒトの血小板膜蛋白が各種血小板抗体といわれるものと反応することを明らかにしたが、これが specific なものか否かは多くの問題がある。すなわち、正常人 IgG や、正常ウサギ IgG 血清を用いてもある程度は膜蛋白と反応する。これについては、ヒト血小板とウサギ血清との反応には、ヒト血小板における heterophile antigen の存在を考えねばならないし、ヒト血小板とヒト血清との反応には血小板に存在する HLA 抗原の関与も考慮する必要がある。また、より根本的な問題として、今回用いた膜可溶化剤がはたして血小板膜抗原に対して適当なものであるのか否かの吟味も必要である。すなわち不十分な可溶化によって非特異的な膜蛋白をも検出している可能性もあり、膜蛋白によっては、消化酵素による可溶化や胆汁酵素によるものが良いとの報告もあり、目的とする膜蛋白の可溶化には今後、最適のものを選ぶ必要がある。一方では、用いる血小板抗体によっては、それぞれ複数の膜蛋白への結合が認められヒト血小板膜には種々の抗原性を有している可能性があるが、この中で glycoprotein III はいずれの血清とも反応した。このことは double antibody immunoprecipitation 法において反応液中で、血清と抗血清の間に immune complex が形成され、これが血小板膜蛋白上の Fc receptor と結合した結果か、あるいはまた、aggregated IgG が存在することによって Fc receptor との結合等の可能性を考えると glycoprotein III に Fc receptor の存在が推測

されるので、IgG の Fab 分画との反応系を計画していく必要がある。Anti- β_2 microglobulin との反応では glycoprotein II a, II b との結合を示したが、リンパ球では β_2 -microglobulin が Fc receptor あるいは Ia 抗原、HLA 抗原の一部を担っているといわれており今回得られた所見からすると、血小板においては、Fc receptor や HLA 抗原と glycoprotein II a, II b との関連が注目される場所である。しかしながら、マウスリンパ球での Fc receptor 分子量は約 35,000、ヒトの HLA 抗原は分子量約 30,000 と 11,600 の β_2 -microglobulin より構成されているといわれ、今回示した glycoprotein II a, II b の分子量は 12.5 万～13.5 万とかなりのへだたりがある。このことは Fc receptor や HLA 抗原とは異った膜蛋白を示しているのか、あるいはまた、これらの glycoprotein 上のごく一部の部分にこれらの抗原性が存在するのか現在のところ不明である。今回の知見を基礎として、より specific な膜抗原の分離・精製を検索中である。

文 献

- 1) Nachman, R. L., Jaffe E. A., and Weksler, B. B.: Immunoinhibition of ristocetin-induced platelet aggregation. J. Clin. Invest., **59**; 143~148, 1977.
- 2) Phillips D. R.: Effect of trypsin on the exposed polypeptides and glycoproteins in the human platelet membrane. Biochemistry, **11**; 4582~4588, 1972.
- 3) Barber, A. J. and Jamieson, G. A.: Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. J. Biol. chem., **245**; 23, 6357~6365, 1970.