原 著

von Willebrand 病における第Ⅷ因子関連蛋白の wheat germ agglutinin 親和性交差免疫電気泳動像

安居 資司* 植田 真永* 高橋 幸博*
西野 正人* 三上 定昭* 福井 弘*

Factor VIII related protein in von Willebrand's disease :
Analysis by crossed affinoimmunoelectrophoresis
using wheat germ agglutinin

Motoshi YASUI*, Masanaga UEDA*, Yukihiro TAKAHASHI*,
Masato NISHINO*, Sadaaki MIKAMI* and Hiromu FUKUI*

Key words: factor VIII related protein, von Willebrand's
disease, crossed affinoimmunoelectrophoresis,
wheat germ agglutinin

The nature of sugar chain of factor VIII related protein (VIIIIR) in the plasma of normal subject and patients with type I and IIA of von Willebrand's disease was examined by crossed affinoimmunoelectrophoresis using anti-human factor VIII rabbit serum, with inserted wheat germ agglutinin (WGA) agarose layer. Molecular weight distribution and affinity for WGA of factor VIII related antigen (VIIIIR : AG) were estimated by the electrophoretic patterns.

VIIIIR : AG, in normal plasma and in type I of von Willebrand's disease, showed high affinity for WGA at the portion over 3×10^6 daltons of molecular weight. On the other hand, VIIIIR : AG in plasma of type IIA consists only of the multimers smaller than 3×10^6 daltons, showing a very weak affinity for WGA.

These results suggested that VIIIIR-multimers in type IIA may be poor in sialic acid reactive with WGA, in addition to incomplete polymerization.

はじめに

常染色体遺伝性出血性疾患の1つである von Willebrand 病は現在、第Ⅷ因子複合体の構成

部分の第Ⅷ因子関連蛋白 (VIIIIR, von Willebrand 因子蛋白) の量的合成欠陥と質的合成欠陥にもとづく数種の病型の存在することが知られている。近年、SDS-アガロース電気泳動法あ

* 奈良県立医科大学小児科 [〒637 奈良県橿原市四條町 840], Department of Pediatrics, Nara Medical College, Kashihara, Japan.

るいは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、ヒト血漿中の VIII R は分子量 230,000 dalton の subunit の諸種の程度に重合した multimer series よりなりたっており、von Willebrand 病の homozygous 病型では全 multimer が欠如し、classical form (Type I) では正常のそれと同様の multimer series よりなるが量的に低下、variant form (Type II) では multimer 構成の異常が認められることなどが明らかにされている¹¹⁻¹⁷⁾。Type II も VIII R の larger multimer の欠乏とリストセチンコファクター活性 (VIII R : RC) の低下を特徴とする II A, larger multimer は欠如するがリストセチン凝集能が亢進している II B, multimer の triplet 構造の異常な II C などの病型の存在することが見出されている。

純化 VIII R は約10%の糖を含むが、neuraminidase および galactosidase で処理すると VIII R : RC の低下することが Gralnick⁸⁾, Sodez⁹⁾ などにより報告され、VIII R 中の糖鎖は VIII R : RC の発現に重要と考えられている。Gralnick は von Willebrand 病の VIII R は糖鎖異常が存在することを主張しているが、一方、Zimmerman ら¹⁰⁾ は否定的である。

著者ら^{11,12)} はすでに、von Willebrand 病の homozygous 病型、Type I および II A の血漿中の VIII R の糖構成要素を Concanavalin A (Con A) および Ricinus communis agglutinin-120 (RCA-120) を用いた親和性交差免疫電気泳動法で検索し、糖鎖の共通コアおよびその近辺に存在するマンノースは Type I および II A ではともに存在すること、また、末端糖の一つであるガラクトースは Type I には正常と同様に存在するが、Type II A では低下していると推察されることを報告した。今回、著者らはさらに末端糖であるシアル酸含有を検索する目的で、特異親和性を有するレクチンである Wheat germ agglutinin (WGA) を用いたレクチン親和性交差免疫電気泳動と、さらに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の WGA 親和性交差免疫電気泳動法における沈降像の変化を観察した。

I. 試料および方法

1. 試料

i) クエン酸加血漿：3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容を含む新鮮全血より血漿を得た。

ii) クリオプレシピテート：上記クエン酸加血漿を -70°C 凍結後 4°C にて一昼夜放置し、10,000回転 20 分遠心後、沈渣を 0.32% クエン酸ナトリウム加生理食塩水にて出発容量の 1/10 容に再溶解した。

2. 検索対象

von Willebrand 病 12 例について検索した。内訳は、VIII R : RC, VIII R : AG とともに著明に低下し、常染色体性劣性遺伝と考えられる homozygous 病型 3 例、VIII R : RC, VIII R : AG とともに低下し常染色体性優性遺伝性の classical form (Type I) 6 例、VIII R : RC は低下するも VIII R : AG が存在し、かつ交叉免疫電気泳動で陽極側に移動する variant form (Type II A) 3 例である。

3. 方法

i) VIII R : AG の WGA 親和性交差免疫電気泳動法 (WGA-CIE)

一次元電気泳動は 1% アガロース上で被検血漿 $20\mu\text{L}$, 2.7 mA/cm , 3 時間泳動を行なった。二次元電気泳動の際 Børg-Hansen の方法¹³⁾ に準拠して、抗体層との中間に 1% アガロース 9 容、WGA 溶液 1 容を混和した幅 8 mm の WGA アガロース層を置いた。WGA の終濃度は $20\mu\text{g/ml}$ とし、WGA 無添加のものを対照とした。さらに WGA $20\mu\text{g/ml}$ 添加層に WGA の拮抗剤である N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を終濃度 0.1M になるごとく加えたアガロースも作成した二次元電気泳動は 0.8 mA/cm で 20 時間泳動した。除蛋白は免疫沈降物以外の WGA 反応物を除去する目的で 0.1M GlcNAc 添加生理食塩水中で 2 昼夜放置した。蛋白染色は Coomassie brilliant blue によった。

ii) VIII R : AG の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の WGA 親和性交差免疫電気泳動法 (SDS-PAGE-WGA-CIE)

一次元電気泳動法は Mikami らの方法⁷⁾ に準拠した。被検血漿より作製したクリオプレシピテート $33\mu\text{L}$ を添加し、SDS 1.5% PAGE を行

なった。二次元電気泳動の際、1.5% トリトン X-100 中間ゲルに WGA 液を添加した。WGA の終濃度は $40\mu\text{g/ml}$ とした。WGA 無添加のもの、さらに 1.5% トリトン X-100 中間層に WGA $40\mu\text{g/ml}$ と WGA の拮抗剤である GlcNAc (終濃度 0.1M) を添加したものも作成し、それぞれ 1.2mA/cm で 20 時間泳動した。除蛋白法、染色法は WGA-CIE と同様に行なった。分子量 1×10^6 dalton 以下の検定には HMW protein (Pharmacia Fine Chemical) キットを用い、 1×10^6 dalton 以上の検定には Furlan らの方法¹⁴⁾により IgM (Cappel Laboratories) のポリマーを作成し、それぞれの PAGE を行ない沈降 peak と比較して分子量を測定した。

II. 成 績

1. 正常血漿中の VIII R:AG の WGA 親和性 二次元交叉免疫電気泳動 (WGA-CIE) 像

正常ヒト新鮮血漿中の VIII R:AG の WGA-CIE 像は中間ゲル層に WGA を添加しなかった場合、それに接続した抗体層上に非対称性の山形の沈降 arc が出現した。WGA $20\mu\text{g/ml}$ 含有中間ゲル層を挿入して二次元交叉免疫電気泳動法を行なった場合、VIII R:AG の arc 高は低下し、とくに arc 上の陰極側の高さが低下していた。WGA $20\mu\text{g/ml}$ 含有中間層に、さらに WGA 拮抗剤の GlcNAc を終濃度 0.1M 加えて VIII R:AG の二次元交叉免疫電気泳動を行なった場合、VIII R:AG の沈降 arc は WGA 無添加の場合の arc 高に近似する状態となった (図 1)。

2. von Willebrand 病各種病型血漿中の VIII R:AG の WGA-CIE 像

von Willebrand 病の homozygous form (severe form) の血漿では、中間ゲル層の WGA 無添加および $20\mu\text{g/ml}$ 添加のいずれの場合も VIII R:AG の沈降 arc は出現しなかった。Type I 6 例の血漿では、いずれも中間ゲル層に WGA を添加しなかった場合の二次元交叉免疫電気泳動法による VIII R:AG の沈降 arc は低下したが、泳動位置は正常血漿のそれと同じであった。中間ゲル層に WGA $20\mu\text{g/ml}$ 添加して行

Fig. 1 Patterns of plasma VIII R:AG in WGA affino-crossed immunoelectrophoresis in normal subject.

なった WGA-CIE 法による VIII R:AG の沈降 arc は、無添加の場合の arc 高よりさらに低下した。一方、Type IIA 3 例の血漿では、中間層に WGA 無添加の場合の VIII R:AG の泳動 arc は正常血漿の VIII R:AG の沈降 arc よりも陽極側に出現したが、WGA $20\mu\text{g/ml}$ 含有中間ゲル層挿入時の VIII R:AG の arc は WGA 無添加の場合のものと同位置でかつ arc 高もほとんど低下しなかった (図 2)。

3. 正常血漿中の VIII R:AG の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の WGA 親和性交叉二次元電気泳動 (SDS-PAGE-WGA-CIE) 像

正常血漿より作成し $1/10$ 容に濃縮したクリオプレシピテート液 $33\mu\text{l}$ を SDS 1.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 後、さらに上記の WGA-CIE を行なって得られた VIII R:AG の沈降 peak を HMW protein および IgM のポリマーの SDS-PAGE 像と比較しつつ分子サイズを測定した。正常ヒトクリオプレシピテート中の VIII R:AG の SDS-PAGE 後の CIE 像は WGA 無添加の場合、数個の連続した沈降 peak が観察されその分子サイズは $0.8 \sim 10 \times 10^6$ dalton の間に分布していた。SDS-PAGE 後、WGA $40\mu\text{g/ml}$ の中間ゲル層を挿入して

Fig. 2 Patterns of plasma VIII:AG in WGA affino-crossed immunoelectrophoresis in the patients with von Willebrand's disease.

Fig. 3 Patterns of VIII:AG in SDS polyacrylamide gel-WGA affino-crossed immunoelectrophoresis in normal cryoprecipitate fractions.

行なった CIE 像は分子量 3×10^6 dalton 以上の沈降 peak 高が明らかに低下したが 3×10^6 dalton 以下の沈降 peak 像は、ほとんど変化を認めなかった。WGA $40 \mu\text{g/ml}$ 含有中間ゲル層に GlcNAc (終濃度 0.1 M) を添加した場合のクリオプレシピテート中の VIII:AG の SDS-PAGE-WGA-CIE 像は、WGA 無添加の場合の沈降像に近似する状態となった (図 3)。

4. von Willebrand 病各種病型血漿中の VIII:AG の SDS-PAGE-WGA-CIE 像

von Willebrand 病の Type I ではクリオプレシピテート中の VIII:AG の SDS-PAGE 後の CIE 像は沈降 peak は低下したが分子サイズは正常クリオプレシピテートのそれと同様に分布していた。SDS-PAGE 後の WGA $40 \mu\text{g/ml}$ 中間ゲル層を挿入して行なった CIE 像は分子量 3×10^6 dalton 以上の沈降 peak 高が低下したが、 3×10^5 dalton 以下の沈降 peak 像はほとんど変化を認めなかった。一方、Type IIA のクリオプレシピテートでは中間層に WGA 無添加の場合、VIII:AG の SDS-PAGE 後の CIE 像は数個の連続した沈降 peak が観察され、そ

Fig. 4 Patterns of VIII R:AG in SDS polyacrylamide gel-WGA affino-crossed immunoelectrophoresis in patients with von Willebrand's disease.

の分子サイズは $0.8 \sim 3 \times 10^6$ dalton の間に分布していた。SDS-PAGE 後 WGA $40 \mu\text{g/ml}$ 含有中間ゲル層挿入時の CIE 像は WGA 無添加の場合のものと同じ分子サイズに分布し、沈降 peak 高もほとんど低下しなかった (図 4)。

III. 考 案

特定の糖と特異的に結合するタンパクであるレクチンを用いた交叉親和性免疫電気泳動は Børg-Hansen ら¹³⁾ (1975) が Concanavalin A (Con A) を用いて血清および尿の糖蛋白の分析を行なって以来、細胞膜および血漿中の糖蛋白の分析に有用な方法として応用されている。諸種のレクチンのうち α -マンノースおよびグルコースとに結合する Con A、ガラクトースに特異的な Ricinus communis agglutinin-120 (RCA-120)、シアル酸および N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に結合性のある Wheat germ agglutinin (WGA) などが繁用されるが、これらのレクチンを中間ゲル層に挿入してある種の糖蛋白についての二次元交叉免疫電気泳動法を行なうと特定のレクチンに結合性のある糖が含有されている場合、中間層のレクチンに捕足されて、その免疫沈降像は低下する。この像を観察することにより添加サンプル中の糖の性状、含有量の多寡などの情報が得られる。しかし、本法による血漿凝固因子の糖性状についての検討

はほとんどない。

すでに著者ら¹¹⁾ は、von Willebrand 病患者血漿中の第 VIII 因子関連蛋白 (VIII R) の糖構成について、Con A を用いて Con A 親和性免疫電気泳動法で検索し、 α -マンノースは von Willebrand 病 Type I および Type IIA では正常の VIII R と同様に含有されていることを報告した。次いで、糖鎖末端糖であるガラクトースに関して糖特異親和性を有する RCA-120 を用いて検索し、正常および Type I の VIII R は分子量 3×10^6 dalton 以上の larger multimer に RCA-120 親和性を示すが、smaller multimer より構成される Type IIA では RCA-120 親和性が低下していることからガラクトース含有量の低下が示唆されることを報告した¹²⁾。

今回、さらに末端糖であるシアル酸含有に関してその特異的レクチンである WGA を用いて二次元交叉免疫電気泳動法で VIII R: AG のパターンを検討した。血漿を用いた場合、免疫沈降線以外のレクチン-蛋白結合物が通常の除蛋白法では除去できず判別し難かったので、著者らは除蛋白法として WGA 拮抗剤である GlcNAc・生理食塩水に 48 時間置くことを試みた。本操作で免疫沈降線以外の蛋白結合物は溶出され、沈降像の観察は比較的容易となった。

中間層ゲルに WGA $20 \mu\text{g/ml}$ 添加して親和性交叉免疫電気泳動を行なうと正常血漿中の VIII

R:AG の沈降像は、無添加のそれに比して明らかに低下し、Ⅷ R:AG には WGA に親和性を示す糖が存在すると推察された。von Willebrand 病の homozygous 病の病型では沈降像は出現しなかった。Type I ではⅧR:AG の arc は低い、WGA 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加でさらに arc は低くなることを認め、本病型のⅧR:AG は WGA 親和性を示す糖が含まれていると考えられた。Type II A のⅧR:AG は CIE では陽極側に arc が出現したが、中間層に WGA 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加して行なった親和性交免疫電気泳動のⅧR:AG の arc は、WGA 無添加の場合と同じ陽極側の位置で arc 高の低下もほとんど認められなかった。したがって WGA に親和性を有する糖は極めて少ないと推察された。

次に WGA-CIE のパターンの変化を分子量的に明らかにする目的で SDS-PAGE-WGA-CIE を行なった。Mikami ら⁷⁾ は SDS-PAGE-CIE 法で、正常血漿中のⅧR は分子量 0.8~10 $\times 10^6$ dalton に及ぶ種々の multimer より構成されていることが観察されることを報告している。本法の中間ゲル層であるトリトン X-100 層に WGA を混和して SDS-PAGE-WGA-CIE を行なうと、正常クリオプレシペートでは分子量 3 $\times 10^6$ dalton 以上の higher multimer 部の沈降 peak が低下し、この部が WGA 親和性を有すると考えられた。WGA はシアル酸以外にも GlcNAc に親和性を有するレクチンである。GlcNAc は α -マンノース同様、糖鎖の共通コアおよびその近辺に含有されている。前述したごとく、Con A-CIE 法で糖鎖共通コア部分の α -マンノースは von Willebrand 病の Type I および Type II A のⅧR:AG 中には正常のそれと同様に存在することより、GlcNAc もこの三者で存在することが推察される。WGA がⅧR:AG 中に含有される末端糖のシアル酸および共通コア部の GlcNAc と等しく、かつ、高度に結合したとすると正常、von Willebrand 病 Type I および II A のⅧR:AG の arc はいずれも多少の程度の差はあっても低下することが予想される。すなわち、higher multimer および lower multimer の peak は全体として低くなることが推定される。しかし、

SDS-PAGE-WGA-CIE 法では 3 $\times 10^6$ dalton 以上の higher multimer の部分の各 arc は低下したが、3 $\times 10^6$ dalton 以下の lower multimer 部分の arc の低下はほとんどみられなかった。したがって、SDS-PAGE-WGA-CIE の波形の変化は主として higher multimer に存在するシアル酸と WGA との親和性による変化と考えられた。WGA 親和性の低下している分子量 3 $\times 10^6$ dalton 以下の lower multimer はガラクトースに加えてシアル酸の含量の低下も併せて存在することが示唆された。von Willebrand 各病型では、Type I は正常クリオプレシペートと同様 higher multimer のみに親和性が認められた。Type II A では親和性が低下し、波形の変化はほとんどなかった。以上の成績より、Type II A ではⅧR の重合不全につけ加えて糖鎖の共通コア部分は存在するが、末端糖であるガラクトースおよびシアル酸の低下していることが示唆された。Type II A のⅧR:RC の低下の本質は、正常ⅧR の lower multimer 同様、糖鎖の欠陥による可能性も想定されるので、重合不全にこれら糖の低下がどのように関与しているか今後さらに検討を進めたい。

結 語

正常ヒトおよび von Willebrand 病 homozygous 型 3 例、Type I 6 例、Type II A 3 例の血漿およびクリオプレシペートを用いて WGA 親和性交免疫電気泳動像を観察した。WGA-CIE では正常血漿では、山形沈降像は低下した。Type I では正常血漿と同様のパターンを示したが、Type II A では親和性は低下し沈降像の変化はほとんど認められなかった。

クリオプレシペートを用いた SDS-PAGE-WGA-CIE では、Type I は正常ⅧR 同様分子量 3 $\times 10^6$ dalton 以上の higher multimer 部が WGA 親和性を有するため低下した。分子量 3 $\times 10^6$ dalton 以下の lower multimer 部および Type II A では親和性が低下しており、波形の変化はほとんど認められなかった。

以上の成績から Type II A では正常ⅧR の lower multimer 同様、重合不全につけ加えて末端糖であるシアル酸の低下が示唆された。

本論文の要旨は昭和57年第5回日本血栓止血学会にて発表した。

文 献

- 1) van Mourik, J.A. and Bolhuis, P.A.: Diversity of human factor VIII-von Willebrand factor. *Thromb. Res.*, **13**; 15~24, 1978.
- 2) Beck, E.A., Tranqui-pouit, L., Chapel, A., Perret, B.A., Furlan, M., Hudry-Clergeon, G. and Suscillon, M.: Studies on factor VIII-related protein. I. Ultrastructural and electrophoretic heterogeneity of human factor VIII-related protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **578**; 155~163, 1979.
- 3) Hoyer, L.W., Shainoff, J.R.: Factor VIII related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimer. *Blood.*, **55**; 1056~1059, 1980.
- 4) Over, J., Bouma, B.N., van Mourik, J.A., Sixma, J.J., Vlooswijk, R. and Bakker-Wouderberg, I.: Heterogeneity of human factor VIII. I. Characterization of factor VIII present in the supernatant of cryoprecipitate. *J. Lab. Clin. Med.*, **91**; 32~45, 1978.
- 5) Meyer, D., Obert, B., Pietu, G., Lavergne, J.M. and Zimmerman, T.S.: Multimetric structure of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.*, **95**; 590~602, 1980.
- 6) Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S.: Variant, von Willebrand's disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J. Clin. Invest.*, **65**; 1318~1325, 1980.
- 7) Mikami, S., Takahashi, Y., Nishino, M., Okubo, Y. and Fukui, H.: Heterogeneity of molecular size of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. *Thrombs. Haemost.*, **45**; 272~275, 1981.
- 8) Gralnick, H.R.: Factor VIII/von Willebrand factor protein. Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. *J. Clin. Invest.*, **62**; 496~499, 1978.
- 9) Sodez, J.M., Paulson, J.C., Pizzo, S.V. and McKee, P.A.: Carbohydrate on human factor VIII/von Willebrand factor. Impairment of function by removal of special galactose residues. *J. Biol. Chem.*, **253**; 7202~7206, 1978.
- 10) Zimmerman, T.S., Voss, R. and Edgington, T.S.: Carbohydrate of the factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.*, **64**; 1298~1302, 1979.
- 11) 三上定昭, 植田真永, 安居資司, 西野正人, 松岡宏明, 福井 弘: von Willebrand 病血漿第VIII因子関連抗原の Concanavalin A 親和性免疫電気泳動像. *奈医誌*, **33**; 108~114, 1982.
- 12) 植田真永, 三上定昭, 高橋幸博, 安居資司, 福井 弘: von Willebrand 病第VIII因子/von Willebrand 因子の糖構成における異種性: 交叉レクチン(Ricinus communis) 親和性免疫電気泳動法による解析. *日血誌*, **46**; 95~101, 1983.
- 13) Bøg-Hansen, T.C. and Brogren, C.H.: Identification of glycoproteins with one and two or more binding site to Con A by crossed immuno-affinoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.*, **4** (Suppl. 2.); 135~139, 1975.
- 14) Furlan, M. and Beck, E.A.: Cross-linking of human fibrinogen with glutaraldehyde and tetranitromethane. *Thromb. Res.*, **7**; 827~838, 1975.