血小板膜糖蛋白 Glycoprotein V (GPV) の精製

前浜 修爾* 竹本 元義* 小田 健司*
藤元 哲郎* 下村 壮司* 藤村 欣吾*
蔵本 淳*

Purification of platelet membrane glycoprotein V (GPV)

Shuji MAEHAMA*, Motoyoshi TAKEMOTO*, Kenji ODA*,
Tetsuro FUJIMOTO*, Takashi SHIMOMURA*, Kingo FUJIMURA*
and Atsushi KURAMOTO*

Key word: platelet membrane glycoprotein V,
purification, anti-GPV antibody

GPV has a very important role of activating platelets in the presence of thrombin. We now have established a new rapid method for the purification of GPV. The purification procedure consists of ① extraction of GPV ② ammonium sulfate precipitation ③ gel permeation HPLC ④ anion exchange HPLC ⑤ WGA-affinity chromatography.

We recently purified GPV which showed a single silver and PAS stained band on the SDS-PAGE and the apparent molecular weight was 80 K dalton. The GPV was hydrolysed by thrombin but not by endoglycosidase F. IEP was estimated as 5.6~6.6.

Anti-GPV antibody was raised by immunizing a rabbit and its reactive protein was analysed on a nitrocellulose membrane by using a Western blotting method.

Anti-GPV IgG reacted only with GPV and its fragment, but it did not inhibit the thrombin-induced platelet aggregation. The anti-GPV antibody reactive material in plasma was quantified by using Dot-ELISA method. Two patients showed relatively high concentrations of the antibody reactive material before their thrombotic attacks.

We conclude that GPV purified by our rapid technique has the same characteristics as reported before and the detection of anti-GPV antibody reactive materials in patient's plasma is useful for the prediction and/or diagnosis of thrombosis.

* 広島大学原医研内科 [〒734 広島市南区霞 1-2-3], Department of Internal Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

受付: 1988. 1. 10. 受理: 1988. 6. 15.

緒 言

Glycoprotein V (GPV) はトロンビンにより水解をうける唯一の血小板膜糖蛋白で、GP Ibとともにトロンビンによる刺激伝達プロセスの中心的役割をなしている¹⁾²⁾。著者らはヒト血小板より GPV を精製し、その物理化学的性質について検討するとともに、家兎免疫により抗 GPV 抗体を作製し、この抗体のもつ性質についても検討を加えた。

I. 方 法

1. GPV の精製

健常人より採取した血小板を 10 mM Hepes-0.15 M NaCl-1 mM EDTA (pH 7.6) にて3回洗浄した後、10 mM Hepes-0.3 M NaCl-1 mM EDTA (pH 7.6) の buffer で 2×10^9 個/ml に調節し、37°C、24時間 incubate し、GPV を抽出した。50 mM potassium phosphate-1 mM EDTA (pH 6.8) (KPB) に対して透析した後、

40~60% 硫酸沈殿にて分画し、さらにファルマシア社 FPLC システムを用い、Superose 12 カラムにてゲル濾過を行なった。GPV rich fraction は Mono Q カラム (KPB で平衡化) を素通りさせた後、同じ buffer で平衡化した WGA-Sepharose カラムに結合させ、最終的に 2.5% N-acetylglucosamine を加えた buffer で GPV を溶出した。

2. 抗 GPV 抗体の作製

精製 GPV 約 100 μ g を Freund complete adjuvant と共に家兎に主免疫し、同量の GPV で3週間毎に2回のブースター免疫を施行した後、血液を採取した。血清を非動化後、0~35% 硫酸沈殿、DEAE-Sephacel カラムにて IgG を分離した。

II. 結 果

1. GPV の性状

精製 GPV は 7.5% SDS-PAGE にて単一の銀染色、PAS 染色バンドを示し、分子量は約 80K と算定された (図1)。その移動度は ³H 標識した血小板表面 GPV の移動度と一致した。GPV はトロンビン 5 U/ml の処理にて水解され、分子量約 65K の GPV α と考えられるバンドに移行したが、endoglycosidase F 1.2 U/ml の処理では糖鎖の切断は認められなかった。等電点電気泳動では pI は 5.6~6.6 と広く分布していた。さらに精製 GPV 純度検定のため、C₁₈ reverse phase HPLC を施行したところ、約 50% acetonitrile にて単一の蛋白ピークが認められ、SDS-PAGE においても分子量約 80 K の単一の PAS-マシブルー二重染色バンドを示した (図2)。一方、精製 GPV 110 μ g を用いて N 末端アミノ酸配列を検討したが、解析不可能であった。なお、total yield と

Fig. 1 7.5% SDS-PAGE of purified GPV

Fig. 2 C_{18} reverse phase HPLC of purified GPV

7.5 % SDS-PAGE of C_{18} column retained sample

しては、 2×10^{11} 個血小板より約 110 μ g の GPV が回収された。

2. 抗 GPV 抗体の性状

精製抗 GPV ポリクロナル抗体は IEP により純粋 IgG であることを確認した。Western Blotting 法を用いて抗 GPV IgG の反応性を検討したところ、抗体は、GPV およびそのフラグメントのみと反応した。さらに種々の濃度の抗 GPV IgG を用いてトロンビン凝集を観察したが、凝集反応に変化は認められなかった。血漿中に存在する抗 GPV 抗体反応物質を Dot-ELISA 法を用いて半定量したところ血栓症患者 2 例の血漿中には血栓症状の出現に先立って抗 GPV 抗体と反応する物質が増加しており、経過とともに減少する傾向を示した。

結 語

GPV の精製は Berndt らにより報告され³⁾、その性状が検討されたが、今回われわれは精製過程に HPLC, Affinity chromatography を使用し、より迅速な精製法を確立した。精製 GPV

はその物理化学的性質の検討より既報の GPV に一致するものと考えられた。今回作製した抗 GPV 抗体は GPV および GPVfl のみに反応する特異性の高いものであり、血漿中の抗 GPV 抗体反応物質が血栓症の経過と共に推移する事実は、血栓性疾患の予知、診断に有力な手段となり得ると考えられた。

文 献

- 1) Fujimura, K., Machama, S. and Kuramoto, A.: The effect of protease on platelet membrane proteins: The mode of thrombin action on Glycoprotein I and V and on platelet functions. *Acta Haematol. Jpn.*, **43**: 1168~1177, 1980.
- 2) 前浜修爾, 藤村欣吾, 蔵本 淳: GP Ib と GP V. 血小板 1986—血小板細胞骨格と膜糖蛋白, 科学評論社, pp 175~189, 1986.
- 3) Berndt, M.C. and Phillips, D.R.: Purification and preliminary physicochemical characterization of human platelet membrane glycoprotein V. *J. Biol. Chem.*, **256**: 59~65, 1981.