トピックス

血小板糖蛋白の molecular biology

半田 誠* 池田 康夫* 川合 陽子**
山本 美保子** 渡辺 清明**

Molecular biology of platelet membrane glycoproteins

Makoto HANDA*, Yasuo IKEDA*, Yoko KAWAI**,
Mihoko YAMAMOTO** and Kiyoaki WATANABE**

Key words: platelet membrane glycoprotein, adhesive glycoprotein
receptor Bernard-Soulier syndrome, thrombasthenia,
molecular biology

はじめに

生理機構における血小板の役割, すなわち破損した血管内皮の場合への速やかな集簇による一次止血への係わりを端的に表わす言葉を一つ選ぶとすれば, それは細胞接着現象ではなかろうか。この言葉は現代生物学において最も基本的な現象で, 細胞の分化・成長, 創傷の治癒, 免疫細胞を介した種々の免疫機構, さらに癌細胞の進展・転移等多くの生物現象がこの言葉をもって理解されるようになってきている。そして血小板かというと, 細胞・細胞間ならびに細胞・基質間の接着がそれぞれ血小板の凝集, 粘着に対応するというわけである。実際この細胞接着現象を介在するのが膜表面にある内在性糖蛋白であり, 細胞接着因子受容体と呼ばれており¹⁾, 糊の役目をするのが血管内皮下組織や血漿中に存在する, フォンビルブランド因子(vWf), フィブリノーゲン(FG), フィブロンectin(FN), ビトロネクチン(VN), トロンボスポンジン(TSP), コラーゲン(CL), ラミニン(LN)などで, それら受容体のリガンドとして働いている²⁾。本稿では血小板膜糖蛋白を細胞接着因子受容体として扱い, 最近の分子生物学を手法とした研究のトピックスについて述べてみたい。

I. 細胞接着因子受容体としての

血小板膜糖蛋白

種々の細胞種より様々な細胞接着因子受容体の一次構造が塩基配列より決定された。そして驚くべきことに, 全く異なった機能を持った細胞間で複数の共通したあるいは類似した受容体を有していることがわかった。血小板も例外ではなく表1に示すように多数の受容体が同定されている¹⁾²⁾。まず第一にあげられるのがGPIb-IX複合体である。この膜糖蛋白は血流の速い高ずり応力(high shear stress)の存在下でのみ, 内皮下組織に存在するvWfの受容体として血小板粘着を起こさせる。巨核球の形質を有するcell lineのHEL cellよりGPIb α , β 鎖のcDNAが分離されたが, もう一つの構成成分であるGPIXは未だ同定されていない。特にリガンドの結合部位である α 鎖はよく研究されており, その遺伝子は極めてユニークでその内部にイントロンを持っていないことが解った³⁾。また血漿中に存在し機能不明なleucine rich glycoprotein(LRG)と α 鎖, β 鎖ともに一次構造の相同性が極めて強く, 保存されたドメイン構造から考えて基本的な祖先遺伝子より進化した蛋白群であることは明らかである。以前より血管内皮細胞や平滑筋細胞上にこの複合体が

* 慶応大学輸血センター〔〒160 東京都新宿区信濃町35〕; Blood Center, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

** 同 中央検査部; Central Laboratory, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

表1 血小板膜糖蛋白

細胞接着因子受容体	類似蛋白	分布(血小板以外)	リガンド	cDNA 分離	遺伝子局在
Shear 依存性受容体					
GP I b-IX	LRG	ナシ	vWf	I b α I b β IX	+ + + 17p12-13 — —
Integrin 複合体					
GP II b-III a	VNR (α II b β_3)	ナシ	FG, FN, vWf VN, TSP	II b	+ 17q21-23
GP160-III a ¹²⁾	VNR (α V β_3 , α V β_3)	血管内皮細胞, 平滑筋細胞	VN, TSP, FG vWf	α V	+ 2
GP I a-II a	VLA-2 (α_2 β_1)	T リンパ球, 血管内皮細胞, 線維芽細胞	CL	III a (β_3) I a	+ + 17q21-23 5
GP I c-II a	VLA-5 (α_5 β_1 , α F β_1)	リンパ球, 単球, 血管内皮細胞	FN	I c (α_5)	+ 12q11-13
GP I c-II a	VLA-6 (α_6 β_1)	上皮細胞, 血管内皮細胞	LN	I c (α_6)	— —
単一蛋白群				II a (β_1)	+ 10
GMP-140 ⁵⁾	ELAM-1	血管内皮細胞	?		+ —
GPIV		単球, 血管内皮細胞	TSP, CL		— —
64KDaGP ⁶⁾	C _{1q} 受容体	血管内皮細胞	CL		— —

存在するのではないかという議論があったが, mRNA の解析からこの説はほぼ否定された. その意味で血小板に特異的であり, 血小板の役割のユニークさを荷っている受容体といえる. 第二に掲げられるのが integrin 複合体である⁴⁾. この受容体群はすべての細胞に存在し, 二つの遺伝的に異なった支配を受けた膜糖蛋白による heterodimer で構成されている ($\alpha\beta$ 複合体). そして共通の β 鎖とリガンド特異性のある α 鎖により, さらにサブファミリーに分類される. 血小板では表 1 のように VN 受容体 (β_3 受容体, GP III a が β_3 に対応) と VLA 複合体 (β_1 受容体, GP II a が β_1 に対応) に区分される 5 つの異なった受容体が同定されている. その中で GP II b-III a 複合体はユニークで mRNA の解析より血小板にのみ発現 (GP II b すなわち α II b が) していることが確認された. 実際, この複合体は血小板が活性化されてはじめて複数のリガンドと結合するようになり, 他の integrin と異なっている点である. 第三に掲げられるのは複合体を形成せず, 単一の蛋白として受容機能を示すもので, 現在その全貌がかなり明らかかなものが 3 種類ある. その中で GMP-140 は, その一次構造が cDNA より解析され, ド

メイン構造の類似性よりサイトカインで刺激された血管内皮細胞上に表現される ELAM-1 という糖蛋白と同じ受容体群に属するのではないかと考えられている⁵⁾. この糖蛋白は血小板の α 顆粒の膜に内在し, 血小板が活性化されてはじめてその膜表面に再分布するもので ELAM-1 の機能から類推して炎症細胞の接着に関与している可能性が示されている.

II. 血小板膜分子病の分子生物学的アプローチ

主要糖蛋白の cDNA が分離された現在, Bernard-Soulier 症候群 (BSS) や血小板無力症 (TA) などの先天性血小板膜異常症の遺伝子レベルでの異常の解析が最もホットなテーマである. 従来より血小板の母細胞である巨核球を分離することは至難とされ, 血小板の形質を有する cell line が cDNA library のもとに使用されていた. そして疾患での解析は不可能とされていた. しかし成熟血小板にもわずかに残遺した mRNA が存在することが証明され, さらに Taq ポリメラーゼを用いた PCR がキット化され, 解析に必要な量の DNA の増幅が可能となった. 実際その報告はまだ preliminary

ry であるが BSS, TA における遺伝子異常の解析の試みが発表され, これら疾患での異常は極めて複雑で多様性に富んでいることがわかった。

1. GPIb-IX 複合体と BSS

現在 Finch らによる BSS 1 家系での研究が唯一の報告である⁷⁾。本疾患は常染色体劣性の遺伝形式をとり, 血小板膜上の GPIb-IX 複合体の量的, 質的異常症である。それぞれ独立した遺伝子で支配される三つの異なった膜糖蛋白すなわち GPIb α , β 鎖ならびに GPIX が同時に欠損しており, 分子レベルでの異常のメカニズムを探ることは非常に興味があった。実際この受容体の機能の中心となる Iba 鎖の cDNA がプローブとして用いられた。そして, 1 家系でのゲノムならびに血小板 mRNA を解析した。しかし α 鎖遺伝子内にある Taq I による RFLP は家系内での疾患の発現と link しなかった。また, 大きな deletion あるいは rearrangement も証明できなかった。さらに, 患者血小板の mRNA は量的, 質的に正常に存在していた。以上のことは, この家系においては, 疾患の原因となる遺伝子レベルでの異常は少なくとも α 鎖遺伝子にはないとの考えを強く支持するものであった。複数の異なったサブユニットで構成された複合体糖蛋白の細胞表面への発現は, その中のどれか一つに異常があっても成功しないと考えられる。従って, BSS の分子レベルでの異常を解明するためには, プローブとして既に入手できる α , β 鎖以外に未だ分離されていない GPIX 遺伝子の早急な分離, 同定が是非必要である。

2. GPIIb-IIIa 複合体と TA

TA も常染色体劣性遺伝形式をとる GPIIb-IIIa 複合体の量的, 質的異常を有する分子病である。両者の cDNA よりゲノム遺伝子の解析が行われ, 両遺伝子は 17q₂₁₋₂₃ 上わずく 24 kb の間隔で存在することが証明された。他の integrin を構成する膜糖蛋白の染色体上での分布は多様であることに比べて, なぜこの両者の遺伝子がこれ程, 近接して存在するのか。このことは両遺伝子が常に物理的に共同で働くことを意味している可能性があり, TA における両膜

糖蛋白の欠損の一つの説明になるのではないかと考えが打ち出された。

一方, この複合体の巨核球レベルでの生合成過程が解明され, さらに両遺伝子を組み込んだ vector で transfect させた Cos-1 細胞を使用した研究より, 両膜糖蛋白は常に共同で行動し, 翻訳後早期に複合体を形成することが, 細胞表面への発現に不可欠であることが証明された⁸⁾。そして, 一方の膜糖蛋白の量的, 質的異常は複合体の形成異常をもたらし, processing の段階で, 他方の正常な膜糖蛋白も分解されてしまう。

TA の異常の多様性は以前より蛋白レベルでの解析より指摘されていた。例えばパレスチナに住む, アラブ人ならびにイラク出身のユダヤ人における同疾患を多発する家系での研究では⁹⁾, 表面には複合体がないにもかかわらず, 血小板内には GPIIIa 由来と思われる複数の蛋白が immunoblotting 法にて同定された。これらの蛋白は, 生合成過程の異常により血小板内で分解された GPIIIa であろうと推定され, それぞれの人種間で異なったパターンを示した。続いて, これら二つのグループ間での遺伝レベルの異常の比較がごく最近発表された¹⁰⁾。それぞれの cDNA をプローブとしてゲノムの解析が行われたが, すべての患者に大きな deletion は発見できなかった。一方, 両遺伝子内に存在する RFLP を追跡した結果では, アラブ人の 2 人の患者で GPIIb 遺伝子に link した RFLP が証明され, 彼らが一つの異常遺伝子の homozygote であることが指摘された。しかしユダヤ人のグループではなんら異常はみつからなかった。以上から同じ表現型をとる TA のような疾患でも分子レベルの異常は多様であることが示唆され, また, この疾患においては遺伝子の point mutation が関与している可能性を示した。一方, Bray¹¹⁾ もその血小板表面に全く複合体を証明できない疾患の一家系を同様の方法で解析した。そして二人の患者とその父親において正常 GPIIIa 遺伝子内の 3' 端に存在する EcoRI による polymorphism の異常パターンが発見された。これはこの家系における異常の一つが GPIIIa 遺伝子の rearrangement である

ことを示している。しかし、TA は常染色体劣性遺伝形式をとり、母親もなんらかの GPⅢa 遺伝子の異常を持っていないなければならないが同定はできなかった。血小板には GPⅡb-Ⅲa 以外に VNR として GPⅢa を共有する複合体 (GP160-Ⅲa) が存在する¹²⁾。GPⅢa の分子レベルの異常がある TA においては VNR の発現は興味がある。Lam ら¹²⁾は TA 血小板において VNR の発現を証明しているし、また Giltary ら¹³⁾は、TA の新生児臍帯由来の血管内皮細胞での正常の VNR の発現を確認した。いずれの例でも、もし GPⅢa の生合成異常が存在していれば、VNR の発現も異常となるはずである。したがって用いられた例では、その異常の本質はたぶん GPⅡa 遺伝子にあると考えることができる。実際、Nurden ら¹⁴⁾は immunoblotting を用いて 7 人の TA 患者血小板に残存している GPⅡb, Ⅲa を半定量した。そして三つのパターンを見出した。すなわち、①わずかの GPⅡb とかなりの量 (～10%) の GPⅢa, ② GPⅡb は完全に欠除しているが、GPⅢa はわずかに残存、③両膜糖蛋白とも全く欠除、がそれぞれ 3 人、3 人そして 1 人であった。しかしこの研究では血小板表面に存在する複合体の量については言及していない。したがって、GPⅢa が残存する患者においては分子レベルの異常が GPⅡb 遺伝子にあり、結果として GPⅢa と複合体を形成する VNR は正常に発現していると考えられなくもないが、推測の域を出ない。TA は多様な分子レベルの異常が原因となっており、GPⅡb, GPⅢa の量的、質的異常に加えて、VNR の発現の有無等により、また異常の本質が GPⅡb あるいは GPⅢa 遺伝子に関連があるかで、分類上再検討の時期になったと考えられる。

おわりに

他の細胞種と同様、血小板膜糖蛋白の研究の主体は今や、分子生物学を武器とした一次構造の解析に移っている。塩基配列を知ることで他の既知の蛋白との相同性の比較が行われ、本稿で示したように機能を異にする蛋白群への再分類が行われつつある。また分子病を研究するこ

とで、生合成過程の知識が得られるはずで、BSS や TA の異常の多様性が示されつつある。その武器として PCR は大きな助けとなる。 β_2 integrin 複合体の分子病である leukocyte adhesion deficiency の 1 家系でその異常が β_2 遺伝子の point mutation による mRNA のスプライシングにあることが PCR と S_1 nuclease protection を組み合わせることで決定された¹⁵⁾。また typeⅡA フォンビルブランド病で、血小板 mRNA を PCR で増幅、解析することで、異常の本質が vWf 遺伝子内の point mutation であることが報告された¹⁶⁾。これらの方法論はそのまま血小板の分子病に適用されるに違いなく、その研究過程はその模範となるう。

文 献

- 1) 半田 誠, 池田康夫: 血小板膜蛋白の分子構造と機能. 日本臨牀, **47**; 778～787, 1989.
- 2) 半田 誠, 池田康夫: 血小板と細胞間接着因子. Immunohaematology, **10**; 437～443, 1988.
- 3) Wagner, R. H., Kieffer, N., Wicki, A. N. and Clemetson, K. J.: Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein I b α gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., **156**; 389～395, 1988.
- 4) Hynes, R. O.: Integrins: a family of cell surface receptors. Cell, **48**; 549～554, 1987.
- 5) Johnston, G. I., Cook, R. G. and McEver, R. P.: Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelet and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. Cell, **56**; 1033～1044, 1989.
- 6) Peerschke, E. I. B. and Ghebrehiwet, B.: Human blood platelet C_{1q} receptors participate in collagen-induced platelet aggregation but not adhesion. Blood, **72**; 335a, 1988.
- 7) Finch, C. N., Milller, J. L., Peterson, E. and Handin, R. I.: Evidence that an abnormality in the glycoprotein I b α gene is not the cause of abnormal platelet function in a family with classic Bernard-Soulier disease. Blood, **72**; 321a, 1988.
- 8) Bennett, J. S., Vilaire, G. and Poncz, M.:

- Expression of human platelet glycoprotein IIb and IIIa in cultured mammalian cells. *Blood*, **72**; 316a, 1988.
- 9) Collier, B. S., Seligsohn, U. and Little, P. A.: Type I Glanzmann thrombasthenia patients from the Iraqi-Jewish and Arab populations in Israel can be differentiated by platelet glycoprotein IIIa immunoblot analysis. *Blood*, **69**; 1696~1703, 1987.
 - 10) Schwartz, E., Malladi, P., Poncz, M. and Rappaport, E.: Polymorphisms and haplotypes associated with thrombasthenia in Arabs and Iraqi Jews. *Blood*, **72**; 338a, 1988.
 - 11) Bray, P. F. and Shuman, M. A.: Molecular analysis of the genes for platelet glycoproteins (GP IIb) and GP IIIa (GP IIIa) in a normal population and a family with Glanzmann thrombasthenia: Identification of two polymorphisms and rearranged GP IIIa gene. *Blood*, **72**; 317a, 1988.
 - 12) Lam, S. C. T., Plow, E. F., D'Souza, S. E., Cheresch, D. A., Frelinger III, A. L. and Ginsberg, M.H.: Isolation and characterization of a platelet membrane protein related to the vitronectin receptor. *J. Biol. Chem.*, **264**; 3742~3749, 1989.
 - 13) Giltay, J. C., Leeksa, O. C., Breederveld, C. and van Mourik, J. A.: Normal synthesis and expression of endothelial IIb/IIIa in Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*, **69**; 809~812, 1987.
 - 14) Nurden, A. T., Didry, D., Kieffer, N. and McEver, R. P.: Residual amounts of glycoprotein IIb and IIIa may be present in the platelets of most patients with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*, **65**; 1021~1024, 1985.
 - 15) Kisimoto, T. K., O'Conner, K. and Springer, T.A.: Leukocyte adhesion deficiency. *J. Biol. Chem.*, **264**; 3588~3595, 1989.
 - 16) Ginsburg, D., Konkle, B. A., Gill, J. C., Montgomery, R.R., Bockenstedt, P.L., Johnson, T. A. and Yang, A. Y.: Molecular basis of human von Willebrand disease: Analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**; 3723~3727, 1989.
-