ラット肥満細胞顆粒における HNK-1 エピトープ の存在 (続報)

——M 6764 抗体を用いての検討——

岡山吉道*1), 小幡邦彦*2), 黒沢元博*1)

*Rat mast cell granules reacting with HNK-1 antibody
observed by staining with M 6764 antibody*

Rat mast cell granules and the plasma membrane fractions were obtained by the homogenization of highly purified rat mast cells and their isolation in a Percoll or sucrose gradient respectively. Immunostainings of non-stimulated rat mast cells, compound 48/80 or calcium ionophore A 23187-stimulated rat mast cells, the granules and the plasma membrane fractions were performed with a monoclonal antibody, M 6764, which recognizes HNK-1 epitope. HNK-1 epitope was present in rat mast cells and the granules, but not in the plasma membrane fractions. The granules fixed with glutaraldehyde showed ring-like figures by immunostaining with M 6764. Rat mast cells and the granules treated with chloroform-methanol after fixation were also densely stained with M 6764. Western blot analysis of rat mast cells and the granule homogenates with M 6764 antibody showed broad protein bands ranging from 100 to 250 KDa.

These results showed the presence of HNK-1 epitope in rat mast cell granules. This HNK-1 epitope could be a glycoprotein.

Yoshimichi Okayama*1), Kunihiko Obata*2),
Motohiro Kurosawa*1)

**key words : mast cell, granules, HNK-1
antibody, M 6764**

1981年, Abo らにより開発されたマウス IgM モノクローナル抗体 HNK-1 (Leu-7) は, ヒト natural killer (NK)細胞と反応する¹⁾が, myelin-associated glycoprotein (MAG)²⁻⁴⁾ や酸性糖脂質抗原⁵⁾とも反応する. また, モノクローナル抗体 NC-1⁶⁾や M 6764⁷⁾も HNK-1 と同じエピトープを認識することが明らかにされ, これらは HNK-1 エピトープと総称される.

筆者らは, すでにラット肥満細胞が M 6764 抗体および抗 MAG 体で染色されることより, ラッ

ト肥満細胞が HNK-1 エピトープを発現し, その発現部位としては肥満細胞顆粒が強く考えられる可能性を報告^{8,9)}した. 今回は, それをさらに確認するために, M 6764 抗体を用いて前報⁹⁾と同様の検討を行い, ラット肥満細胞顆粒には糖蛋白質として HNK-1 エピトープが存在し, ウェスタンブロッティング法により分子量 100~250 KDa の幅広いバンドとして認められることを明らかにしたので報告する.

材料と方法

(1) 材料

カルシウムイオノフォア A 23187, ウシ血清アルブミン(BSA), トルイジンブルー, クロロナフトール, β -メルカプトエタノール(Sigma 製); パーコール, 電気泳動用分子量マーカー(Pharmacia 製); FITC 標識抗マウス IgM, HRP 抗マウス IgM(Cappel 製); アプロチニン(Bayer 製); ポリエチレングリコール1500(Boehringer 製); HAHY ニトロセルロース膜 (Millipore 製); sodium dodecyl sulfate (SDS), アクリルアミド, ビスアクリルアミド, アミドブラック, ブロムフェノールブルー(Bio Rad 製); その他すべての試薬は和光純薬製特級を用いた.

(2) ラット肥満細胞および肥満細胞顆粒分離法
すでに報告した方法¹⁰⁾に準じた. すなわち, Sprague-Dawley 系雌性ラット(250~300 g, 日本 SLC より購入)の腹腔洗浄液中に, 白血球およびその他の細胞と混在した肥満細胞を採取した. 洗浄液は10単位/ml のヘパリンを含む balanced salt solution (BSS) で, 4.0 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9mM CaCl_2 , pH 7.2 からなり, 0.046%(w/v)BSA を含有した. パーコール比重法¹¹⁾により分離した肥満細胞(トルイジンブルー染色法で純度90%以上)

*1) First Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine 群馬大学医学部第一内科学教室

*2) National Institute for Physiological Sciences 岡崎国立共同研究機構生理学研究所

を Branson Sonifier 細胞破碎装置185型 により破碎(60 W, 3分30秒間処置)したあと, Kruger ら¹²⁾の方法に従い, 肥満細胞顆粒を分離, 採取した. 実験には形態学的に膜の保たれた肥満細胞顆粒を用いた.

(3) 肥満細胞細胞膜分離法

前報⁹⁾に準じた. すなわち, パーコール比重法により分離精製した肥満細胞を Brounsonic 1516 細胞破碎装置(75 W, 5分間処置)で破碎したあと, 4°C, 1,200×gで5分間遠心し, 核成分である pellet を除去した. ついで, 上清を, 30, 40, および 50%(w/v)の不連続ショ糖密度勾配に重層し, Beckman SW 50 ローターを用い, 4°C, 120,000×gで1時間遠心し, 細胞膜を分離した.

(4) M 6764 抗体

M 6764 抗体は受精第3日ニワトリ胚脳から得られた神経管および原節に対して産生されたものである⁷⁾. すなわち, 神経管と原節はタングステン針を用いて分離し, 100単位/ml アプロチニンを含む蒸留水でホモジナイズしたあと, 4°C, 1,000×gで, 30分間遠心した.

ついで上清を採取し, さらに 4°C, 100,000×gで, 60分間遠心した. 得られた pellet を生理食塩水で洗浄して免疫原として用い, 雌性 Balb/c マウスに1週間間隔で5回(4回は腹腔内に, 最後の1回は静脈内に)接種した. 最終接種より84時間後に脾細胞を採取し, 50%(v/v)ポリエチレングリコール1,500溶液で, X 63-Ag 8-653 骨髄腫細胞と融合させた. ハイブリドーマ細胞とそれらのクローニングの培養は, 一般的基本法に従った. M 6764 抗体は, アメリカ合衆国 Yale 大学 R.K. Yu 博士より供与された硫酸化グルクロン酸糖脂質¹³⁾を認識することが確認されている (Obata, K. and Ando, S., unpublished data).

(5) 間接蛍光抗体法

前報⁹⁾に準じて, 試料を phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄したあと, スライドガラス上に塗抹, 乾燥し, 10%(v/v)ホルマリンあるいは 1%(v/v)グルタルアルデヒドー 4%(v/v)パラホルムアルデヒドで固定し, 間接蛍光抗体法¹⁴⁾により染色した. すなわち, M 6764 抗体を室温で30分間作用させたあと, Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaN₃, 1 mM EGTA, pH 7.4)で15分間洗浄し,

図1 Immunostainings of rat mast cell granules and the plasma membrane fractions with M 6764 (×400)

A: rat mast cell granules fixed with formalin
C: rat mast cell granules fixed with glutaraldehyde
E: the plasma membrane fractions fixed with formalin
B, D and F: phase-contrast micrographs of A, C and E respectively
An arrow in F indicates the plasma membranes from the mast cell residues

ついで FITC 標識抗マウス IgM を室温で30分間作用させた. ついで, TBS で15分間洗浄したあと, 90%(v/v) グリセリンで封入し, 落射型蛍光顕微鏡で観察した.

(6) ウェスタンブロッティング法

試料を SDS sample buffer[2%(w/v)SDS, 5%(v/v)β-メルカプトエタノール, 0.4 M Tris,

図2 Effect of chloroform and methanol treatment on the immunostainings of rat mast cells and the granules with M 6764 ($\times 400$)

A・B: rat mast cell granules fixed with glutaraldehyde

C・D: calcium ionophore A 23187-stimulated rat mast cells fixed with formalin

A・C: without chloroform and methanol treatment

B・D: with the treatment

0.4 M グリシン, 40%(v/v)グリセリン, 0.01%(w/v)ブロムフェノールブルー]でホモジナイズし, 100°C で5分間煮沸したあと, 実験に供した. 分離用ゲルは SDS-ポリアクリルアミドゲル¹⁵⁾ [6.5%(w/v)]を用い, 電気泳動は 25 mM Tris, 0.1%(w/v) SDS, 192 mM グリシン, pH 8.3のバッファーを電極液として, 10 mA 定電流で3時間施行した. 泳動の終了したゲルを Towbin ら¹⁶⁾の方法に従い, ニトロセルロース膜へブロッティングを行った.

トランスファーしたニトロセルロース膜の分子量マーカーは, アミドブラックにて染色し, 残りはただちに 3%(w/v)BSA を含む TBS (10 mM Tris, 130 mM NaCl, pH 7.4)のなかに移し, 室温で60分間, ゆっくりと振盪した.

ついで, M 6764 抗体(1:200希釈)と室温で, 2時間反応させたあと, 抗体希釈液を除き, TBS で十分洗浄した. さらに, HRP 抗マウス IgM で90分間処理し, 再度洗浄したあと, 0.06%(w/v)クロロナフトール, 0.05%(v/v) H_2O_2 で発色さ

せた.

結 果

(1) 肥満細胞顆粒の M 6764 抗体による蛍光染色

肥満細胞顆粒を 10%(v/v)ホルマリンにより固定した後蛍光染色すると, 顆粒全体が強く染色された(図1a). 1%(v/v)グルタルアルデヒド-4%(v/v)パラホルムアルデヒド固定では, リング状に蛍光が認められる顆粒が散在してみられた(図1c). 一方, 肥満細胞細胞膜は染色されず(図1e, ホルマリン固定), 細胞残渣の状態にある細胞膜(図1f 白矢印)においても, 蛍光は認められなかった.

(2) M 6764 抗体が認識する肥満細胞顆粒の抗原分子解析

肥満細胞顆粒をクロロホルム・メタノール(1:1)と室温で15分間反応させたあと, 1%(v/v)グルタルアルデヒド-4%(v/v)パラホルムアルデヒドで固定し M 6764 抗体と反応させたが(図2a),

未処理のもの(図2b)と比較して、染色性に差は認められなかった。また、肥満細胞をカルシウムイオノフォア A 23187 で3分間刺激したあと、10%(v/v)ホルマリンで固定し、同様の検討を行ったが、肥満細胞および顆粒の染色性はクロロホルム・メタノール処理により明らかに影響されなかった(図2c, d)。

ついで、ウェスタンブロッティング法により、肥満細胞および肥満細胞顆粒に存在する M 6764 抗体認識抗原分子の解析を行ったところ、肥満細胞および肥満細胞顆粒において、分子量100~250 KDa に幅広い蛋白質バンドが検出され、対照として用いたニワトリ胚脳においても、同様のバンドが認められた。一方、細胞膜は免疫染色されなかった(図3)。

考 察

モノクローナル抗体 HNK-1 は、NK 細胞表面抗原と特異的に反応する¹⁾と考えられてきたが、その後、神経性外胚葉起源の細胞に対しても反応することが明らかにされた^{17,18)}。また、神経組織では膜蛋白である MAG²⁻⁴⁾や N-cell adhesion molecules (N-CAM)¹⁹⁾などが HNK-1 エピトープを持つことも報告されている。

受精第3日のニワトリ胚脳の神経管および原節に対する抗体として産生された M 6764 抗体は、HNK-1 エピトープを認識する⁷⁾が、受精30時間のニワトリ胚脳において HNK-1 により免疫染色され、神経管に出現する細胞は、神経節および原節である²⁰⁾ことが明らかにされている。

先に筆者ら^{8,9)}は、M 6764 抗体および抗 MAG 抗体によりラット肥満細胞が染色されることを明らかにし、その染色部位としては顆粒が強く考えられる可能性を報告したが、本研究では、この HNK-1 エピトープを確認するため、M 6764 抗体を用いてさらに詳細な検討を行った。肥満細胞顆粒を10%(v/v)ホルマリンで固定すると、顆粒全体が染色され、一方、1%(v/v)グルタルアルデヒド-4%(v/v)パラホルムアルデヒド固定では、リング状に蛍光が観察された。これは、ホルマリン固定では顆粒膜が破壊され、抗体が顆粒内に侵入し、可溶性成分が染色されるため顆粒全体が染色され、グルタルアルデヒド固定では膜の保持が比較的良好なため、顆粒表面が染色される

図3 Western blot analysis of rat mast cells, the granules, the membrane fractions and chicken embryonic brain homogenate with M 6764

Proteins were electrophoresed on 6.5% (w/v) SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose sheets.

1. molecular weight standards which were stained with amido black
2. rat mast cells
3. the granules
4. the membrane fractions
5. chicken embryonic brain

ためと考えられた。しかし、今回の検討では、肥満細胞顆粒を顆粒膜と、その内部の顆粒とに分離して検討することは成功せず、HNK-1 エピトープの正確な局在は明らかにならなかった。

HNK-1 エピトープの本体は、硫酸化グルクロン酸で²¹⁾、糖蛋白質および糖脂質として存在する²²⁾と考えられる。肥満細胞顆粒および肥満細胞の染色性はクロロホルム・メタノール処理により影響を受けなかったことから、糖脂質の可能性は少ないものと思われる。実際、NK 細胞を用いた検討でも、抗原分子は HNK-1 エピトープを持つ糖蛋白質であると報告¹⁷⁾されている。ついで、ウェスタンブロッティング法により肥満細胞および肥満細胞顆粒に存在する M 6764 抗体認識抗原分子を解析したところ、肥満細胞および肥満細胞顆粒のいずれにおいても、分子量 100~250 KDa に幅広い蛋白質バンドが検出された。

対照として用いたニワトリ胚脳でも、同様のバンドが認められたことより、分子量 100~250KDa の幅広い蛋白質バンドは M 6764 抗体認識抗原決定基蛋白質であることが確認された。

ラット腹腔肥満細胞顆粒には、多量のヘパリンが存在することより肥満細胞顆粒に存在する M 6764 抗体認識部位の特異性が問題点となる可能性があげられる。しかし、肥満細胞顆粒に存在する高分子ヘパリンの分子量は、750 KDa である²³⁾こと、また、対照として用いたニワトリ胚脳でも同様のバンドが認められたことより、肥満細胞顆粒に存在する M 6764 抗体認識部位はニワトリ胚脳の HNK-1 エピトープと同一物質と思われる。しかし、この点についてはさらに詳細な検討が必要である。

Kubagawa ら²⁴⁾は、HNK-1 陽性細胞である HSB-2, Molt-4, RPMI 7760 を用いた検索で、HNK-1 抗原決定基蛋白質として分子量約 110 KDa の主要蛋白質を検出し、また、末梢血単核球では、分子量 95 KDa と 110 KDa の蛋白質を HNK-1 抗原決定基蛋白質として検出した。

Sato ら²⁵⁾は、HSB-2 のホモジネートを用いた実験で、抗 HNK-1 抗体、ウサギポリクローナル抗 MAG 抗体、およびヒトモノクローナル抗 MAG 抗体により、分子量 130 KDa と 80 KDa の二つの蛋白質バンドを検出した。

肥満細胞および肥満細胞顆粒に存在する M6764 抗体認識抗原決定基が、幅広い蛋白質バンドとして染色されたその理由としては、抗原決定基である糖蛋白質の糖鎖部分の大きさによることが考えられる。Tucker ら⁶⁾は、受精第11日のニワトリ大脳から、HNK-1 と NC-1 に反応性の 200~300 KDa の幅広い蛋白質バンドと 130 と 180 KDa のバンドを分離したが、肥満細胞顆粒に存在する HNK-1 認識抗原決定基との異同は興味あるところである。

近年、肥満細胞と NK 細胞との類似性が注目されつつある²⁶⁻²⁹⁾が、HNK-1 エピトープの存在は NK 細胞と肥満細胞との類似性の新たな一面を示し、今後、肥満細胞の機能的研究に、一つの手がかりを与えるものと考えられる。

文 献

- 1) Abo, T., Cooper, M.D., Balch, C.M.: Characterization of HNK-1⁺(Leu-7) human lymphocytes. 1. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. *J. Immunol.* 129: 1752-1757, 1982.
- 2) McGarry, R.C., Helfand, S.L., Quarles, R.H., Roder, J.C.: Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1. *Nature* 306: 376-378, 1983.
- 3) Sato, S., Baba, H., Tanaka, M., Yanagisawa, K., Miyatake, T.: Antigenic determinant shared between myelin-associated glycoprotein from human brain and natural killer cells. *Biomed. Res.* 4: 489-494, 1983.
- 4) Murry, N., Steck, A.J.: Indication of a possible role in a demyelinating neuropathy for an antigen shared between myelin and NK cells. *Lancet* 1: 711-713, 1984.
- 5) Ilyas, A.A., Quarles, R.H., Brady, R.O.: The monoclonal antibody HNK-1 reacts with a human peripheral nerve ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 1206-1211, 1984.
- 6) Tucker, G.C., Aoyama, H., Lipinski, M., Tursz, T., Thiery, J.P.: Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes. *Cell Differ.* 14: 223-230, 1984.
- 7) Obata, K., Tanaka, H.: Molecular differentiation of the otic vesicle and neural tube in the chick embryo demonstrated by monoclonal antibodies. *Neurosci. Res.* 6: 131-142, 1988.
- 8) 岡山吉道, 黒沢元博, 小林節雄, 小幡邦彦: ラット肥満細胞顆粒膜における HNK-1 エピトープの存在. *医学のあゆみ* 147: 707-708, 1988.
- 9) 岡山吉道, 小幡邦彦, 黒沢元博: ラット肥満細胞顆粒における HNK-1 エピトープの存在—抗 myelin-associated glyco-protein (MAG) 抗体を用いての検討. *炎症* 10: 109-113, 1990.
- 10) 黒沢元博: ラット mast cell リン酸化反応に関する研究(第1報)—顆粒膜 diposphoinositide—. *炎症* 5: 31-36, 1985.
- 11) Enerback, L., Svenson, I.: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density of Percoll. *J. Immunol. Methods* 39: 135-145, 1980.
- 12) Kruger, P.G., Lagunoff, D., Wan, H.: Isolation of rat mast cell granules with intact membranes. *Exp. Cell Res.* 129: 83-93, 1980.
- 13) Ariga, T., Kohriyama, T., Freddo, L., Latov, N., Saito, M., Kon, K., Ando, S., Suzuki, M., Hemling, M.E., Rinehart, Jr. K.L., Kusunoki, S., Yu, R.K.: Characterization of sulfated glucuronic acid containing glycolipids reacting with IgM M-proteins in patients with neuropathy. *J. Biol. Chem.* 262: 848-853, 1987.
- 14) 小幡邦彦: ニューロンの染色・標識法モノクローナル抗体. *生体の科学* 36: 384-385, 1985.
- 15) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

1) Abo, T., Cooper, M.D., Balch, C.M.: Characterization of HNK-1⁺(Leu-7) human lympho-

- T 4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 16) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354, 1979.
 - 17) Lipinski, M., Braham, K., Caillaud, J.-M., Carlu, C., Tursz, T.: HNK-1 antibody detects an antigen expressed on neuroectodermal cells. *J. Exp. Med.* 158: 1775-1780, 1983.
 - 18) Schuller-Petrovic, S., Gebhart, W., Lassmann, H., Rumpold, H., Kraft, D.: A shared antigenic determinant between natural killer cells and nervous tissue. *Nature* 306: 179-181, 1983.
 - 19) Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., Schachner, M.: Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L₂ and HNK-1. *Nature* 311: 153-155, 1984.
 - 20) Duband, J.L., Thiery, J.P.: Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev. Biol.* 93: 308-323, 1982.
 - 21) Chou, K.H., Ilyas, A.A., Evans, J.E., Quarles, R.H., Jungalwala, F.B.: Structure of glycolipid reacting with monoclonal IgM in neuropathy and with HNK-1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 128: 383-388, 1985.
 - 22) Feizi, T., Childs, R.A.: Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumor associated antigens and components of receptor systems. *Trends Biochem. Sci.* 10: 24-29, 1985.
 - 23) Yurt, R.W., Leid, R.W. Jr., Austen, K.F., Silbert, J.E.: Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* 252: 518-521, 1977.
 - 24) Kubagawa, H., Abo, T., Blach, C.M., Cooper, M.D.: Biochemical analysis of antigenic determinants recognized on human natural killer cells by HNK-1 (Leu-7) antibody. *Fed. Proc.* 42: 1219, 1983.
 - 25) Sato, S., Tanaka, M., Miyatani, H., Baba, H., Miyatake, T.: Shared antigen between the myelin-associated glycoprotein (MAG) and a cell line from human T cell leukemia (HSB-2). *J. Neuroimmunol.* 7: 287-298, 1985.
 - 26) Ernst, P.B., Petit, A., Lee, T.G.E., Befus, A.D., Bienenstock, J.: Mast cell mediated cytotoxicity resembles natural cytotoxic (NC) activity. *Fed. Proc.* 44: 584, 1985.
 - 27) Okuno, T., Takagaki, Y., Pluznik, D.H., Djeu, J.Y.: Natural cytotoxic (NC) cell activity in basophilic cells: Release of NC-specific cytotoxic factor by IgE receptor triggering. *J. Immunol.* 136: 4652-4658, 1986.
 - 28) Galli, S.J., Dvorak, A.M., Ishizaka, T., Nabel, G., Simonian, H.D., Cantor, H., Dvorak, H.F.: A cloned cell with NK function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors. *Nature* 298: 288-290, 1982.
 - 29) Stevens, R.L.: Secretory granule proteoglycans of mast cells and natural killer cells. *Ciba Found. Symp.* 124: 272-285, 1986.

*

*

*