

von Willebrand 因子 (vWF) フラグメント (97 kDa, 52/48 kDa, 及び FIII-T2) と抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 の免疫反応性

奈良県立医科大学小児科学教室

新家 興, 武田以知郎, 中井 寛 明

西尾 健 治, 宮田 茂 樹, 嶋 緑 倫

吉岡 章, 福井 弘

奈良県立医科大学輸血部

藤 村 吉 博

IMMUNOREACTIVITY OF AN ANTI-VON WILLEBRAND FACTOR (VWF) MONOCLONAL ANTIBODY NMC-4 WITH SOME TRYPTIC VWF FRAGMENTS (97kDa, 52/48kDa, FIII-T2 FRAGMENTS)

KOU NIINOMI, ICHIRO TAKEDA, HIROAKI NAKAI,

KENJI NISHIO, SHIGEKI MIYATA, MIDORI SHIMA,

AKIRA YOSHIOKA and HIROMU FUKUI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

YOSHIHIRO FUJIMURA

Department of Blood Transfusion, Nara Medical University

Received November 30, 1989

Summary: We have shown that an anti-von Willebrand factor (vWF) monoclonal antibody designated as NMC-4 blocks both the ristocetin- and botrocetin-induced (¹²⁵I) vWF bindings to platelet glycoprotein (GP) Ib. Using NMC-4 coupled Sepharose 4B column or electroelution apparatus, a 97kDa fragment and a 130kDa fragment were distinctively purified from a whole tryptic digest of vWF. The 97kDa fragment, which was shown to be a homodimer of the amino acid residue 449-728 of vWF subunit, retained the activity to inhibit both the ristocetin- and botrocetin-induced (¹²⁵I) vWF binding to GP Ib as found in the parent molecule. Another vWF fragment, the FIII-T2 fragment, which is a twin heterodimer composed of two H-chains (residue 273-511) and two L-chains (residue 674-728) held together by disulfide-bonds, was also purified by high pressure liquid chromatography. FIII-T2 fragment showed no inhibitory effect on botrocetin-induced vWF binding to GP Ib, whereas it blocked the ristocetin-induced vWF binding. On Western blotting analysis and dot blot assay, NMC-4 failed to react with both the reduced and nonreduced FIII-T2 fragment. These results indicate that the vWF binding domains to GP Ib expressed by either ristocetin or botrocetin are different and the amino acid residue Leu512-Lys673 is important for both botrocetin-induced vWF binding and NMC-4 binding.

Index Terms

vWF fragments, Western blotting, ristocetin, botrocetin, NMC-4

結 言

嶋ら¹⁾によって作成された抗 von Willebrand 因子 (vWF) モノクローナル抗体 NMC-4 は抗生物質 ristocetin により惹起されるヒト多血小板血漿の血小板凝集を終濃度約 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に抑制することをすでに報告した。著者ら²⁾は、NMC-4 が ristocetin および蛇毒 botrocetin 依存性の vWF の血小板膜糖蛋白 (GP) Ib への結合反応ならびに asialo-vWF (AS-vWF) の直接的な GP Ib への結合を終濃度ほぼ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に抑制することを観察するとともに、NMC-4 を用いて vWF のトリプシン分解物より 130 kDa および 97 kDa (52/48 kDa フラグメントの homodimer 型) のフラグメントを分離した。Marti et al (1987) は純化 vWF を *Staphylococcus aureus* V8 protease で処理して得られた Fragment III をさらにトリプシンで 2 次分解して L-chain (アミノ酸残基 694-728) および H-chain (アミノ酸残基 273-511) からなり各々ジスルフィド結合にて結ばれた twin heterodimer である FIII-T 2 の分離に成功したが、これが ristocetin による vWF 結合を $100 \mu\text{M}$ で完全に抑制することを報告した³⁾。今回著者らは FIII-T 2 フラグメント、130 kDa および 97 kDa の各フラグメントについて NMC-4 に対する免疫反応性を含め比較検討した。

試材及び方法

1) vWF 部分純化物：市販第 VIII 因子濃縮製剤 (Armour Pharmaceutical, Kankakee, IL) より免疫吸着体を用い純化した vWF を Dr. Zimmermann (Scripps clinic, USA) より提供された。すべてのマルチマー型を有する native vWF は、有効使用期限の過ぎた中間型第 VIII 因子製剤 RCG-5 (日本赤十字社より提供) より既報の方法²⁾に準じ純化した。

2) 抗 vWF マウスモノクローナル抗体 (NMC-4)：ristocetin 依存性のヒト多血小板血漿の血小板凝集を完全に抑制する NMC-4 は嶋ら¹⁾の作製した抗体を使用した。IgG は Steinbuch and Audran の方法⁵⁾に準じ、マウス腹水より純化した。

3) 52/48 kDa フラグメント、Fragment I、Fragment II、Fragment III および FIII-T 2 の作製：還元・s-カルボキシメチル化 (S-CM) 52/48 kDa フラグメントは Fujimura et al. の方法⁶⁾により作成した。vWF の V 8 protease 分解産物である Fragment II 及び III は Girma et al. の方法⁷⁾、そして Fragment III の TPCK-

trypsin による 2 次分解産物である FIII-T 2 は Marti et al. の方法⁸⁾に準じて native vWF より作製した。

4) SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)：SDS 5-20% gradient gel を用い Laemmli の方法⁹⁾に準じ電気泳動を行なった。

5) Western blotting 法：Towbin et al. の方法⁹⁾に準じ、 0.45μ のニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell 社製) を用いて行なった。

6) オートラジオグラフィー：まず 0.1 M リン酸 0.15 M 食塩緩衝液 (pH 7.3) に終濃度 2 mM の PMSF、 0.02% NaN_3 および 5% skim milk を加え Blotto 液を作製した。この Blotto 液に転写したニトロセルロース膜を浸し 30 分間ゆっくりと振盪した。次に一次抗体 (NMC-4) を含んだ Blotto 液 (blotto 液 100 ml にマウス腹水 $100 \mu\text{l}$) にニトロセルロース膜を移し 2 時間反応させた後、blotto 液で 10 分間 3 回洗浄し、さらに 2 次抗体 (^{125}I 標識家兎抗マウス IgG) を含んだ blotto 液に移し 30 分間反応させた。次いで blotto 液で 3 回、リン酸緩衝液で 1 回各 10 分間洗浄した後に乾燥させ、X-ray フィルムに暴露させた。

7) モノクローナル抗体カラムによる vWF フラグメントの精製：97 kDa フラグメントは既報の方法²⁾に準じ、NMC-4 を CNBr で固定化した Sepharose 4 B カラムを作成し、トリプシン消化 vWF より免疫純化した後、HPLC 逆相カラムに添加して精製した。130 kDa フラグメントはトリプシン処理した vWF について SDS-PAGE を行い、ゲルより Hunkapiller et al. の方法¹⁰⁾に準じ electroelution にて精製した。

8) binding inhibition assay：ホルマリン固定血小板 および ^{125}I -vWF を用いた著者らの既報の方法²⁾に準じ、ristocetin および botrocetin で惹起される ^{125}I -vWF の GP Ib 結合に対する FIII-T 2 および 97 kDa フラグメントの競合的抑制効果をみた。

9) Dot-blot assay：純化 vWF、Fragment III、Fragment II、FIII-T 2 および純化した 97 kDa フラグメントの希釈列を作製し、東洋アドバンテック社の Dot-blot assay 装置を用い 0.45μ のニトロセルロース膜に蛋白を転写した。転写した蛋白は一旦ブロッキングした後、NMC-4 と反応させ、結合した NMC-4 (IgG) を ^{125}I 標識家兎抗マウス IgG を用いて検出した。その後ニトロセルロース膜の各 Dot の部分をカットし γ -カウンターにて放射活性を測定した。

結 果

1. Ristocetin ならびに botrocetin に発現される vWF の GP Ib 結合における 97 kDa フラグメントおよび FIII-T 2 の抑制効果

97 kDa フラグメントは ristocetin および botrocetin 依存性 vWF 結合のいずれも濃度依存的に完全に抑制した。FIII-T 2 は, ristocetin 依存性 vWF 結合を濃度依存的に抑制するも, botrocetin 依存性 vWF 結合については抑制しなかった (Fig. 1).

2. 97 kDa, 130 kDa フラグメントおよび FIII-T 2 の NMC-4 との免疫反応性

97 kDa, 130 kDa フラグメントおよび FIII-T 2 について, ジチオスレイトール (DTT) 存在・非存在下で 5~20% SDS-PAGE を行い, Coomassie Blue 染色及び Western blotting 後のオートラジオグラフィーで NMC-4 との免疫反応性を検討したところ, 97 kDa, 130 kDa フラグメントは DTT 存在下 (還元状態) でそれぞれ 52/48 kDa, 74 kDa を呈しいずれも NMC-4 との免疫反応性を認めた。しかし, FIII-T 2 は Coomassie Blue 染色では非還元で 105 kDa, 還元で H-chain・L-chain に各々相当すると思われる 38 kDa・9 kDa の band を認めるも, オートラジオグラフィーでは NMC-4 との免疫反応性は認めなかった (Fig. 2).

3. 純化 vWF, Fragment III, Fragment II, 97 kDa フラグメントおよび FIII-T 2 の Dot-blot assay による NMC-4 との免疫反応性

97 kDa フラグメントは純化 vWF 及び Fragment III

に比べ低下するものの NMC-4 とは免疫反応性を示した。しかし Fragment II 及び FIII-T 2 は NMC-4 に対し反応性を示さなかった (Fig. 3).

考 察

近年, 抗生物質 ristocetin あるいは蛇毒 botrocetin により惹起されるヒト多血小板血漿の血小板凝集は, 血漿中の vWF と GP Ib との結合を介することが知られるようになった¹¹⁾¹²⁾。Fujimura et al.⁹⁾は, 精製した S-CM 52/48 kDa フラグメントが ristocetin, botrocetin による GP Ib 結合, さらに脱シアル酸処理された asialo-vWF の直接的な GP Ib への結合のいずれも完全に競合的に抑制することから, vWF の GP Ib 結合ドメインがこのフラグメント内にあることを明らかにした。教室の嶋ら¹⁾が作製した抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 も各 GP Ib 結合を低濃度で抑制することから, 著者は NMC-4 のエピトープ解析を企図して NMC-4 固相化カラムを作製し, トリプシン分解した純化 vWF より免疫純化したところ, vWF subunit のアミノ酸残基 273-728 に相当するフラグメントの homodimer である 130 kDa, アミノ酸残基 449-728 に相当する 52/48 kDa の homodimer である 97 kDa フラグメントが得られた。これらフラグメントは DTT 存在・非存在下において, NMC-4 とは免疫反応性を示したが, さらに 97 kDa フラグメントについて 2 次分解を行うと免疫反応性は消失しエピトープの狭小化は困難であった。

Marti et al. (1987) は, vWF を V 8 protease で分解して得た Fragment III を TPCK-トリプシンでさらに

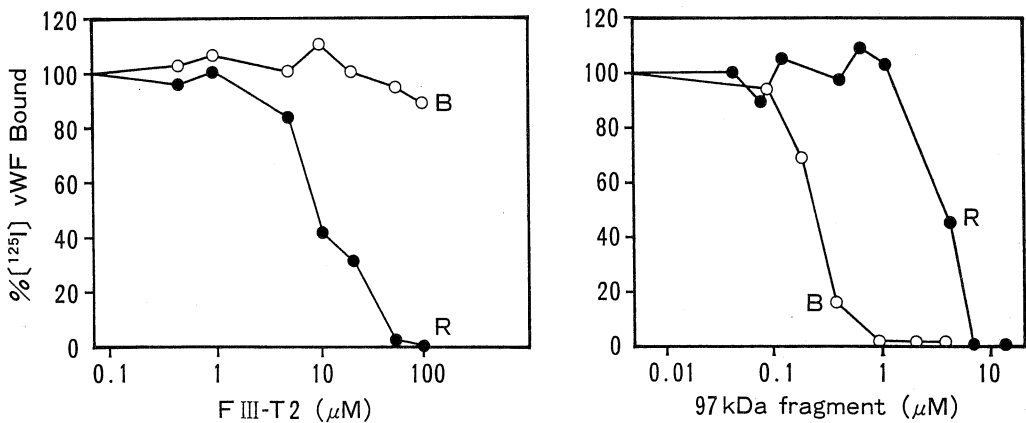


Fig. 1. Effect of "FIII-T2" fragment (left) and 97kDa fragment (right) on vWF bindings to GP Ib. Ristocetin (●) and botrocetin (○) induced vWF binding were measured in the presence of competing ligands.

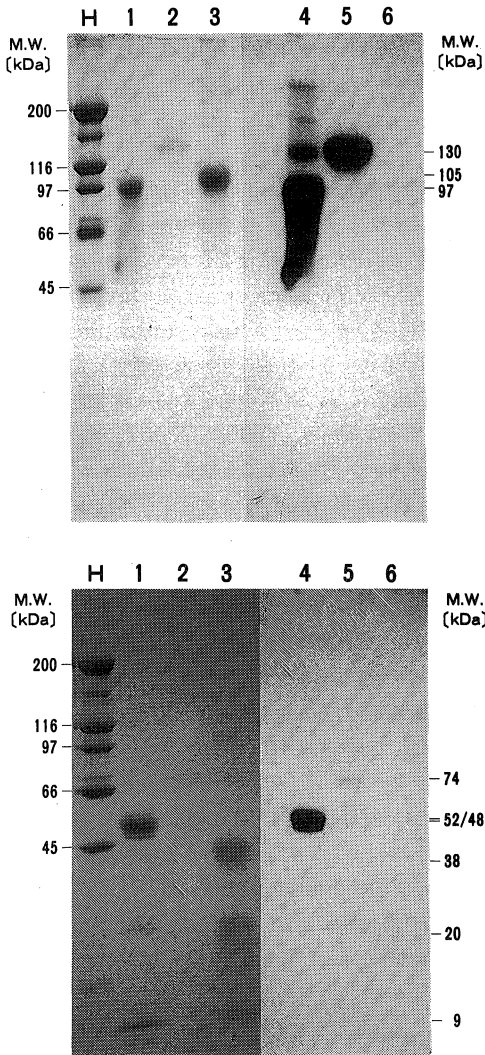


Fig. 2. SDS 5-20% PAGE analysis of the purified vWF fragments and Western blotting studies using anti-vWF MoAb NMC-4. Top panel: coomassie blue staining of the purified proteins (left) and immunoblot (right) under nonreduced condition. Lane H; high molecular weight standard (BioRad), lanes 1 and 4; the 97kDa fragment, lanes 2 and 5; the 130kDa fragment, and lanes 3 and 6; "FIII-T2" fragment (105kDa). Bottom panel: coomassie blue staining of the purified proteins (left) and immunoblot (right) under reduced condition. After reduction, the molecular weights of respective proteins turned to 52/48kDa (lane 1), 74kDa (lane 2), and two chains of 38kDa and 9kDa (lane 3).

2次分解して FIII-T2を得た。このフラグメントは vWF subunit のアミノ酸残基 273~511 の H-chain と 674~728 の L-chain がそれぞれ2ヶづつジスルフィド結合した twin heterodimer であるが、ristocetin 依存性 vWF 結合を濃度依存性に抑制した。このフラグメントと 97 kDa, 130 kDa フラグメントを模式的に示すと Fig. 4 のようになるが、今回、著者らは構造的に似通った3種のフラグメントに着目しそれぞれの NMC-4 との免疫反応性ならびに vWF 結合能についてを比較検討した。SDS-PAGE を行なった後、Western blotting 法およびオートラジオグラフィーにて NMC-4 との免疫反応性を観察したところ、97 kDa・130 kDa いずれの homodimer とも還元・非還元状態で NMC-4 と免疫反応性を示したのに対し、FIII-T2 は還元・非還元状態ともに NMC-4 と反応性をしめさなかった。SDS-PAGE を用いた Western blotting 法では SDS による蛋白の構造変化が起こる可能性があるため、Dot-blot assay を用いて各 vWF フラグメントについて NMC-4 の免疫反応性を検討したが同様な結果であった。また 97 kDa フラグメントが ristocetin 及び botrocetin 依存性の vWF 結合をいずれも抑制するのに対し、FIII-T2 は ristocetin 依存性 vWF 結合を抑制するにもかかわらず botrocetin 依存性 vWF 結合を抑制しなかった。これより FIII-T2 において欠落したアミノ酸残基 512~673 の部分が botrocetin 依存性 vWF 結合の際の GP Ib 結合ドメインとして、また NMC-4 に対する抗原性を発現するために重要な部分であると考えられる。

結 語

GP Ib 結合ドメインのより狭少化をめざして3種の vWF フラグメント (97 kDa, 130 kDa, FIII-T2) について NMC-4 との免疫反応性および GP Ib 結合能について検討した。

1. Fragment III の TPCK-trypsin 分解産物である FIII-T2 は、ristocetin 依存性 vWF 結合を抑制するも botrocetin 依存性 vWF 結合は抑制しなかった。
2. 97 kDa, 130 kDa の各 vWF フラグメントは還元・非還元のいずれの状態も NMC-4 と免疫反応性を示すのに対し、FIII-T2 は還元・非還元ともに NMC-4 との反応性を示さなかった。

以上より FIII-T2 で欠落したアミノ酸残基 512~673 に相当する部分が、botrocetin により発現される GP Ib 結合ドメインとして、また NMC-4 に対する抗原性の発現において重要であると考えられた。

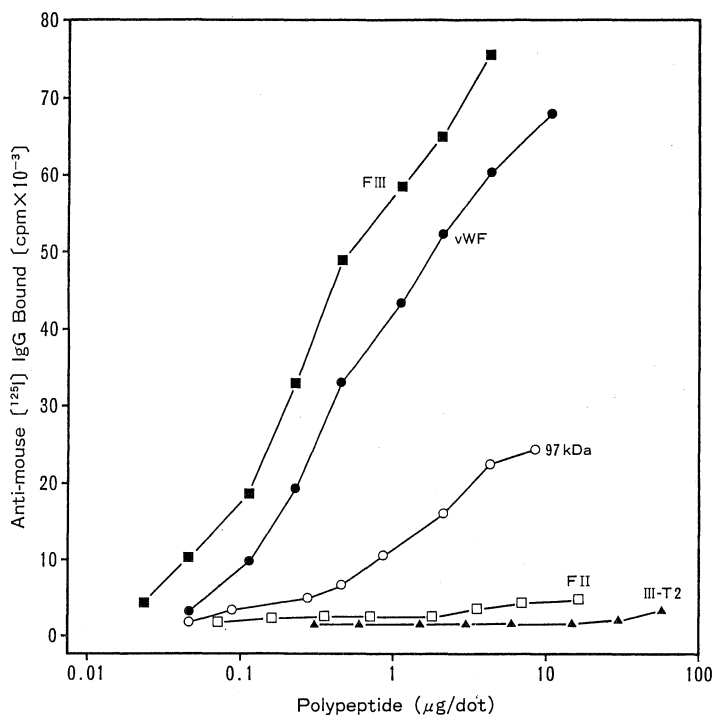


Fig. 3. Dot-blot assay of the purified vWF or vWF fragments. Serial dilution of each purified protein (nonreduced) was fixed on a nitrocellulose membrane using a Biorad dot blot apparatus. Non-specific binding was blocked by "blotto", then the membrane was incubated with "blotto" containing NMC-4 ascites essentially the same as in Western blotting. Radioreactivity of rabbit anti-mouse (¹²⁵I) IgG bound to each dot was counted by gamma-counter after punching the dots out.

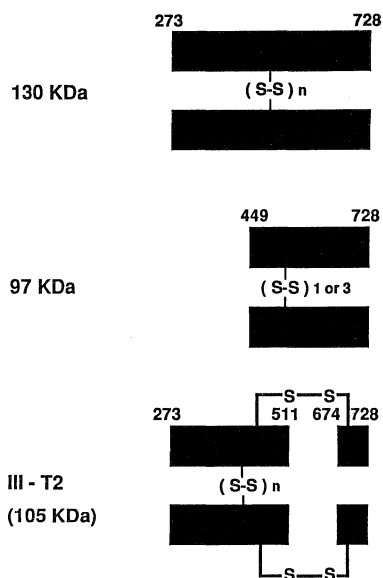


Fig. 4. Schematic representation of the three different tryptic fragments of vWF. Top: 130kDa fragment. Middle: 97kDa fragment. Bottom; "FIII-T2" fragment.

本研究は平成元年度文部省科学研究費重点領域研究「血栓性素因」の助成を受けた。

文 献

- 1) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘: von Willebrand 因子 (vWF) に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. 奈医誌. **36**: 662-669, 1985.
- 2) 新家 興: 抗 von willebrand 因子 (vWF) モノクローナル抗体 NMC-4 による血小板膜糖蛋白 (GP) Ib 結合ドメインの解析. 奈医誌. 投稿中
- 3) Marti, T. M., Roesselet, S. J., Titani, K. and Walsh, K. A.: Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* **26**: 8099-8109, 1987.
- 4) 西尾健治: 蛇毒 botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究. I. Botrocetin cofactor 活性測定の検討. 奈医誌. **39**: 673-682, 1988.
- 5) Steinbuch, M. and Audran, R.: The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**: 279-284, 1969.
- 6) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman T. S.: von Willebrand factor; a reduced and alkylated 52/48kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **261**: 381-385, 1986.
- 7) Girma, J. P., Chopek, M. W., Titani, K. and Davie, E. H.: Limited proteolysis of human von Willebrand factor by staphylococcus aureus V-8 protease. Isolation and partial characterization of a platelet binding domain. *Biochemistry* **25**: 3156-3163, 1986.
- 8) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-682, 1970.
- 9) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **76**: 4350-4354, 1979.
- 10) Hunkapiller, M. W., Lujan, E., Ostrander, F. and Hood, L. E.: Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol.* **91**: 227-236, 1983.
- 11) Ruggeri, Z. M., De Marco, L., Gatti, L., Bader, R. and Montgomery, R. R.: Platelets have more than one binding for von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* **72**: 1-12, 1983.
- 12) Fujimura, Y., Holland, L. Z., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: The von Willebrand factor domain mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein Ib lies between Val 449 and Lys 728. *Blood* **70**: 985-988, 1987.