

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 (<sup>125</sup>I) 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 (<sup>125</sup>I) 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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-T2 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<sup>3)</sup>。今回著者らは FIII-T2 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<sup>2)</sup>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<sup>1)</sup>の作製した抗体を使用した。IgG は Steinbuch and Audran の方法<sup>5)</sup>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-T2 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<sup>6)</sup>により作成した。vWF の V8 protease 分解産物である Fragment II 及び III は Girma et al. の方法<sup>7)</sup>、そして Fragment III の TPCK-

trypsin による 2 次分解産物である FIII-T2 は Marti et al. の方法<sup>8)</sup>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<sup>9)</sup>に準じ電気泳動を行なった。

5) Western blotting 法：Towbin et al. の方法<sup>9)</sup>に準じ、 $0.45 \mu$  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  $0.1 \text{ M}$  リン酸  $0.15 \text{ M}$  食塩緩衝液 (pH 7.3) に終濃度  $2 \text{ mM}$  の PMSF、 $0.02 \%$   $\text{NaN}_3$  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  $100 \text{ ml}$  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 ( $^{125}\text{I}$  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<sup>2)</sup>に準じ、NMC-4 を CNBr で固定化した Sepharose 4B 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<sup>10)</sup>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  $^{125}\text{I}$ -vWF を用いた著者らの既報の方法<sup>2)</sup>に準じ、ristocetin および botrocetin で惹起される  $^{125}\text{I}$ -vWF の GP Ib 結合に対する FIII-T2 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-T2 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  $0.45 \mu$  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  $^{125}\text{I}$  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  $\gamma$ -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<sup>11)12)</sup>。Fujimura et al.<sup>9)</sup>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<sup>1)</sup>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

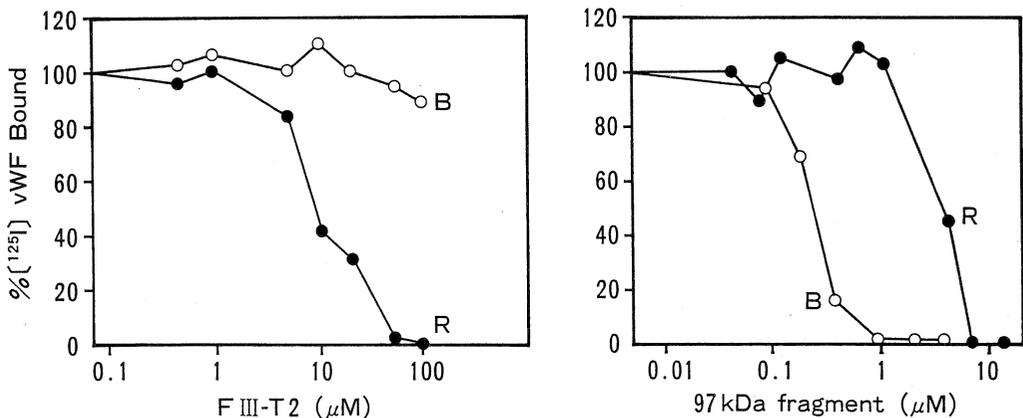


Fig. 1. Effect of "FIII-T2" fragment (left) and 97 kDa fragment (right) on vWF bindings to GP Ib. Ristocetin (●) and botrocetin (○) induced vWF binding were measured in the presence of competing ligands.

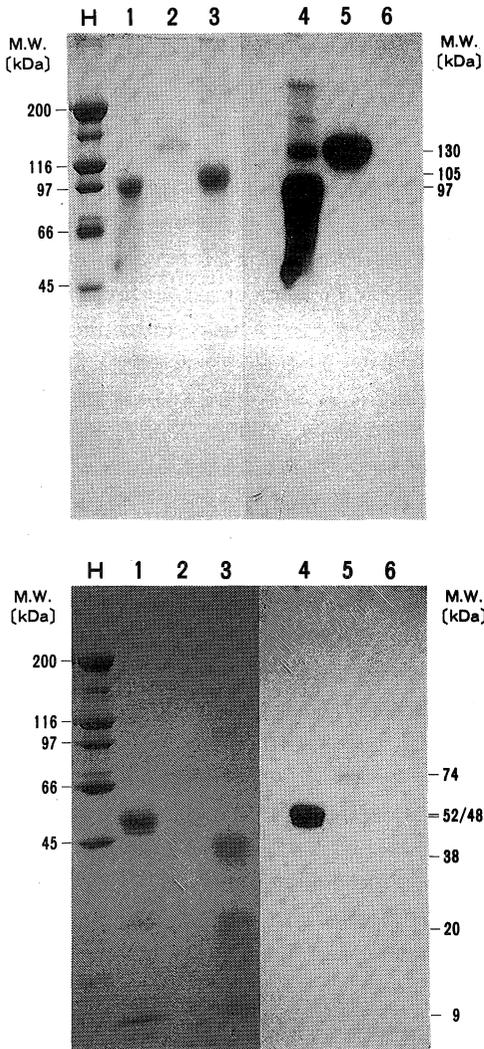


Fig. 2. SDS 5-20% PAGE analysis of the purified vWF fragments and Western blotting studies using anti-vWF MoAb NMC-4. Top panel: coomassie blue staining of the purified proteins (left) and immunoblot (right) under nonreduced condition. Lane H; high molecular weight standard (BioRad), lanes 1 and 4; the 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 ケ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。

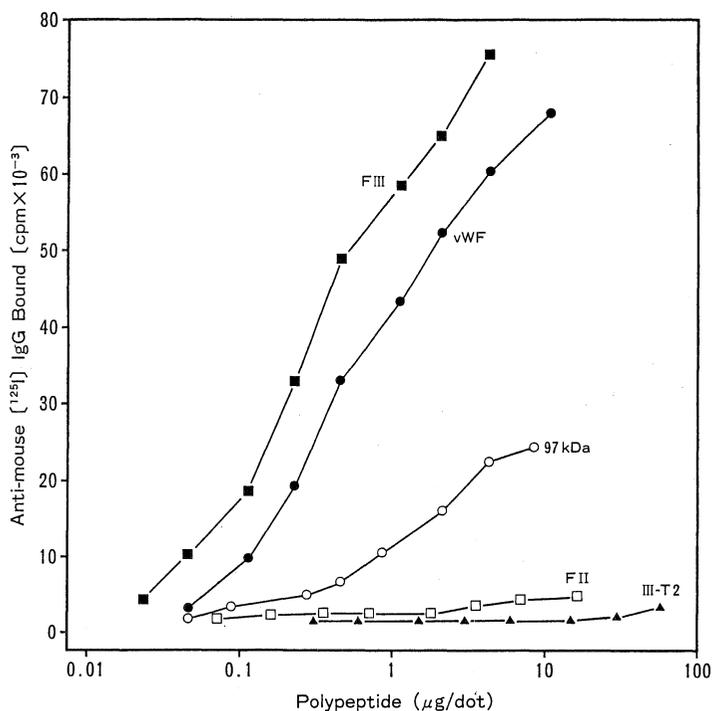


Fig. 3. Dot-blot assay of the purified vWF or vWF fragments. Serial dilution of each purified protein (nonreduced) was fixed on a nitrocellulose membrane using a Biorad dot blot apparatus. Non-specific binding was blocked by "blotto", then the membrane was incubated with "blotto" containing NMC-4 ascites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

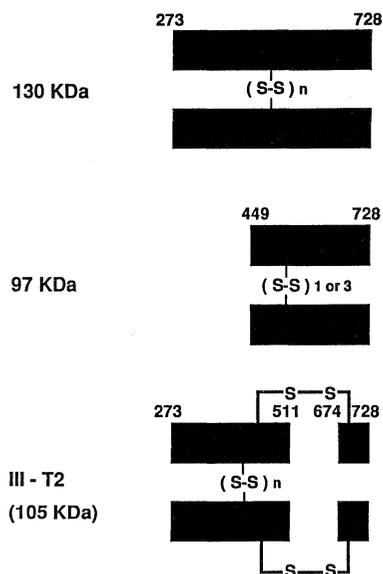


Fig. 4. Schematic representation of the three different tryptic fragments of vWF. Top: 130kDa fragment. Middle: 97kDa fragment. Bottom; "FIII-T2" fragment.

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.