

ヒト胎盤由来 ecto-ATP diphosphohydrolase : その精製, 部分構造解析とずり応力惹起血小板凝集阻害作用に関する研究

奈良県立医科大学第二内科学教室

牧 田 香 理

HUMAN PLACENTAL ECTO-ATP DIPHOSPHOHYDROLASE : ITS STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND INHIBITION ON SHEAR-INDUCED PLATELET AGGREGATION

KAORI MAKITA

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received October 24, 1997

Abstract : Human placental ecto-ATP diphosphohydrolase (ATPDase, a 82 kDa single-chain glycoprotein with a pI of 5.6-6.2) was highly purified by a specific murine monoclonal antibody (mAb) MK 33 (IgG₁- κ) with a high yield of protein (305-451 μ g from one placenta) and specific activity (15-20 units/mg/min for ATP-/ADP hydrolysis), and characterized structurally and functionally. After endoglycosidase-F treatment, the 82 kDa-enzyme turned to a 62 kDa-protein with a significant loss of activity. Structurally, the N-terminal unambiguous 30 residue sequence of MKGTKDLTSQQKESNVKTF_xSKNILAILGF was determined (where x was unidentified). The first 11-residue sequence was quite unique and not homologous to any other protein, but the following 19-residue sequence was almost identical to that of residues 5-23 of human CD 39 lymphoid cell activation antigen deduced by cDNA sequencing. This purified enzyme immunoreacted with an anti-CD 39 mAb, indicating that these two proteins are closely related, but different molecules. Functionally, MK 33 mAb-purified enzyme at a final concentration of 2 μ g/ml totally inhibited the secondary aggregation of platelets induced by platelet agonists. Most interestingly, this enzyme blocked low shear stress-induced platelet aggregation in a dose-dependent manner and completely at a final concentration of 0.5 μ g/ml. Whereas under high shear stress this protein mediated the disaggregation in the later phase of aggregation without affecting the initial aggregation. Further, the purified enzyme at a final concentration of 1 μ g/ml also totally inhibited both fibrinogen and von Willebrand factor (vWF) binding to activated platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa, but did not affect vWF binding to GPIIb in the presence of ristocetin. Immunohistochemical analysis of this enzyme using mAb MK 33 has localized to the syncytiotrophoblasts of placental microvilli and umbilical vein, but much less intense in umbilical arteries. These results taken together suggest that placental ecto-ATPDase, via its ADP-scavenging effect, functions as a potent inhibitor on platelet aggregation in fetomaternal circulation.

Index Terms

placenta, ecto-ATPDase, monoclonal antibody anti ATPDase, shear-induced platelet

aggregation, CD 39

緒 言

ecto-ATP diphosphohydrolase(ATPDase)は細胞膜上にあって，ATP，ADPを加水分解する酵素である。ecto-ATPDaseには幾つかの種類があるが，ヒト胎盤由来ecto-ATPDaseはその酵素活性の発現に，Ca²⁺やMg²⁺の二価陽イオンを必要とし，他のF⁻，P⁻，V⁻タイプのATPase阻害物質には感受性がないことから，E-type ATPDaseに分類される¹⁾。今までにもヒト以外の生物由来のE-type ATPDaseは幾つか分離精製されており，そのアミノ酸配列一次構造はcDNAクローニングにより明らかにされている²⁻⁵⁾。しかし，ヒト由来のecto-ATPDaseは，臍帯静脈内皮細胞由来の分子量75 kDaのもの⁶⁾，胎盤由来の分子量82 kDaのもの⁹⁾の二種類が，一本鎖糖蛋白として精製されているのみである。また，これらは蛋白質のN末端のアミノ酸配列さえ決定されておらず，またこれらが同一のものであるか否かも不明である。いずれのecto-ATPDaseも最終精製過程で，5' AMP-Sepharose 4 B カラムを使用しているが，このカラムはATPDaseに親和性が弱いと蛋白量の回収率も低く，この方法で精製された蛋白質は構造解析を行うには純度が不十分と考えられた。

1996年にWang & Guidotti⁸⁾が，1997年にはMarcus⁹⁾らが，ヒトCD 39リンパ球活性化抗原¹⁰⁾とpotato apyrase⁵⁾とのcDNAクローニングから推定されたアミノ酸配列に部分的な相同性がみられることを報告した。またKaczmarekら¹¹⁾は，既にChristoforidisら⁷⁾が5' AMP-Sepharoseで精製したヒト胎盤由来ecto-ATPDaseを用いて，一部決定していた内部アミノ酸配列がCD 39のそれと高い相同性があること，さらにCD 39遺伝子を組み込んだCOS細胞やCHO細胞がATPDase活性を持つことを示し，CD 39はvascular ecto-ATPDaseであると推論した。しかし，これはCD 39遺伝子を組み込んだCOS細胞やCHO細胞からのATPDaseの精製はなされておらず，これらの両者の異同は蛋白質レベルでは未だ十分に解明されていない。

このようにecto-ATPDaseの構造解析が困難な理由としては，1) これら蛋白質が組織中に極く少量しかないこと，2) 蛋白質を可溶化するのに界面活性剤が必要なこと，3) 可溶化と精製との過程で蛋白質の酵素活性の大半が損なわれることなどである。

そこで，著者はヒト胎盤由来ecto-ATPDaseの構造

機能解析のため，この蛋白質に特異的なモノクローナル抗体(mAb)MK 33をまず作成し，この抗体を固相化したカラムで胎盤由来ecto-ATPDaseの迅速かつ高純度の精製方法を確立した。次に，この精製蛋白質のN末アミノ酸配列を30残基決定し，さらに同酵素のアゴニスト惹起血小板凝集(agonist-induced platelet aggregation)およびずり応力惹起血小板凝集(shear-induced platelet aggregation: SIPA)に対する阻害作用の面から機能解析を行い，最後にMK 33 mAbを用いた免疫組織染色で胎盤・臍帯における同酵素の局在を明らかにした。

試 薬 ・ 方 法

試薬

Ristocetin, Triton X-100, phenylmethylsulfonyl-fluoride(PMSF), potato apyrase(grade IV), bovine serum albumin(BSA), ATP, ADPおよびAMPはSigma Chemical Co. から，DEAE-Sepharose CL-6 B, AMP-Sepharose 4 B, Protein A-Sepharose CL-6 B, CNBr-Sepharose 4 BゲルはPharmacia-LKB(Uppsala, Sweden)から，Iodo-GenはPierce(Rockford, IL)から，collagenはHormon-Chemie(Munich, Germany)から，Endoglycosidase-F(Endo-F)はタカラバイオケミカルから購入した。Fibrinogen, vWF, α -thrombin(specific activity, 2700 NIH units/mg)はそれぞれFujimuraらの方法で純化した^{12,13)}モノクローナルIgG以外の蛋白質の濃度はBSAを基準としたBCAキット(Pierce社)で測定した。抗ヒトCD 34 mAb(NU-4 A 1: IgG 1)と抗ヒトCD 39 mAb(AC 2: IgG 1)とはニチレイ(Tokyo, Japan)とImmunotech(Marseilles, France)とから購入した。vWFとGP Ibとの結合を阻害する抗GP Ib mAb(AP-1)とfibrinogenのGP IIb/IIIaの結合を阻害する抗GP IIb/IIIa mAb(LJ-CP 8)はScripps研究所のDr. Zaverio M. RuggeriとThomas J. Kunichiより恵与された。

電気泳動

Laemmli¹⁴⁾の方法に従って，SDS存在下7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-7.5% PAGE)を行い，泳動後ゲルを銀染色した。等電点電気泳動は3.5-9.5のpH幅のAmpholine PAG plate(Pharmacia-LKB)を用い，泳動後同様に銀染色した。

ATP-/ADPase 活性

ATP-/ADPase 活性は LeBel ら¹⁵⁾ の方法に従って測定し、酵素活性 1 単位は、37°C で 1 時間に 1 μ mol の無機燐(Pi)を遊離分解するのに必要な酵素量と定義した。

胎盤絨毛刷子縁膜小胞(Brush border membrane vesicles : BBMV)分画の調整

BBMV 分画は、Smith ら¹⁶⁾ の方法を改変した Iioka ら¹⁷⁾ の変法で調整した。本研究を行うにあたって、まず正常妊婦に研究目的のインフォームドコンセントを行い、同意書を得た。方法は、分娩後 2 時間以内に得られた合併症のない満期産胎盤を氷片上に置き、卵膜と脱落膜を丁寧に除去した後、絨毛組織を約 1 cm³ に細断し、冷生食で二度洗浄した。その後、0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF を含んだ 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を 250 ml 入れ、Polytron homogenizer (Switzerland)で 10,000 回転/分 15 分間ホモジェナイズした。その後、4°C で 7,000 g, 15 分間遠心し、不溶物を除去後、上澄を更に 100,000 g, 60 分間、超遠心し、クリーム状の BBMV 沈殿を得た。この BBMV は可溶化するまで 300 mM のマンニトールに懸濁し、終濃度 10-15 mg/ml にして -80°C で凍結保存した。

免疫に用いる胎盤由来 ecto-ATPDase の精製

前記マンニトールに懸濁した状態で凍結保存してある BBMV から Christoforidis ら⁷⁾ の方法にて精製した。即ち、凍結サンプルを超遠心してマンニトールを除去後、沈殿物を 0.2 % Triton X-100, 0.5 M NaCl, 0.5 mM PMSF を含む Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)に入れ、4°C で一昼夜スターラーで攪拌し、蛋白質を可溶化した。翌日 4°C で、100,000 g, 60 分間超遠心し、上澄を DEAE-Sepharose CL-6 B, 5' AMP-Sepharose 4 B アフィニティーカラムにかけて ecto-ATPDase を精製した。分離精製した蛋白質は SDS-7.5 % PAGE で非還元条件下で分離し銀染色すると、82 kDa の major バンドと 62-75 kDa の分子量を示す薄い 3 本の minor バンドが見られた。5' AMP-Sepharose 4 B ゲルは 3-4 回の使用で、高い純度の ATPDase 精製が不可能となるので、最初の 2 回の分離精製で得た蛋白質をマウスに mAb 作成時の免疫原として用いた。

抗胎盤由来 ecto-ATPDase mAb の作成

ヒト胎盤由来 ecto-ATPDase に対する mAb は常法で作成した。即ち、fusion と subcloning の後、抗体の一

次スクリーニングは精製抗原でコーティングした 96 穴プレートを用い、酵素免疫測定法で 6 つの陽性クローンを検出した。それぞれのクローンは 20 ml の培養チューブで増殖させ、その培養液上清を用い、二次スクリーニング検査として western blotting を行い、陽性反応を呈した 6 クローンを得た。この中で、非還元条件下で 82 kDa のバンドと強く反応する一つのクローンを得、MK 33 と銘名した。この抗体の免疫グロブリンの subclass と idiotype はアインタイプングキット(Dynatech Lab Inc, VA)で IgG₁- κ と同定した。他のクローンは 82 kDa のバンドとは特異的反応はなかった。

MK 33 mAb(IgG)固相化カラムによるヒト胎盤由来 ecto-ATPDase の精製

テンジクネズミの腹水から Protein A-Sepharose CL-6 B カラムで精製した 5 mg の MK 33 mAb(IgG)を 1.5 g の CNBr-Sepharose 4 B ゲルに固相化後、1 M glycine-Tris(pH 8.5)で未反応基をブロックし、抗体固相化カラムを作成した。MK 33 をカップリングしたビーズは 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF, 0.2 % Triton X-100 を含んだ 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に浮遊させ、平衡化した。次に一つの胎盤から得られた約 300 μ g の凍結 BBMV を融解し、4°C で 100,000 g, 60 分間超遠心し、マンニトールを除去後、1 % の Triton X-100 を含む 10 mM Tris-saline 緩衝液(TBS, pH 7.4)10 ml を加え、4°C で一晩、スターラーで攪拌し可溶化した。可溶化後、超遠心し、その上澄を TBS で 5 倍希釈してさらに 60 分間超遠心を加え、この上澄約 5 ml を MK 33-Sepharose 4 B beads 約 5 ml と混合し、さらに上記ゲル平衡緩衝液を加えて計 50 ml とし、4°C で一晩 rotary shaker で混和して抗原をゲルに吸着させた。翌日吸着ゲル 5 ml をカラムに詰め、0.2 % Triton X-100 を含む平衡緩衝液で流速 5 ml/hr で洗浄し、更に 0.5 M の LiCl を含んだ同緩衝液で非特異的結合蛋白質を洗浄除去し、続いて再度開始緩衝液で洗浄した。洗浄後、結合蛋白質は 0.2 % Triton X-100, 1 mM PMSF を含む 0.2 M glycine-HCl (pH 3.0)で 2 ml 宛溶出し、溶出した分画は直ちに 1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で中和し、ATP-/ADPase 活性と蛋白濃度を測定した。得られた蛋白質を 0.05 % Triton X-100 を含む TBS で透析し、glycerol を 50 % となるように加え、-80°C で凍結保存した。なおこの免疫吸着カラムは繰り返し 7 回まで使用可能であった。

Endo-F 酵素処理

純化した胎盤由来 ecto-ATPDase 200 μ g を Tris-

HCl 緩衝液(pH 8.0)で透析後、ATPDase 1 μg あたり 1 mU の Endo-F を加え、0.05% Triton X-100 存在下、室温で一晩酵素処理した。

N 末端アミノ酸配列分析

蛋白質のアミノ酸配列は、免疫吸着カラムで精製した胎盤由来ecto-ATPDaseを非還元下に SDS-7.5% PAGE で蛋白を分離した後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に blot し、PE Applied Biosystems Precise Protein Sequencer を用いて行った¹²⁾。

血小板凝集試験

3.8% クエン酸 Na 加正常ヒト全血から多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を得、血小板数を 300×10^6 /ml に調整し、agonist 惹起血小板凝集を NKK Hematracer-1 (SSR Engineering, Tokyo) にて測定した。この測定系で使用した agonist の終濃度は ADP 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, collagen 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ristocetin 1.25 mg/ml, α -thrombin 0.1 U/ml であった。またずり応力惹起血小板凝集は東レ社製のコーンプレートタイプの機器を用い、PRP の濃度を 300×10^6 /ml に調整し、6-108 dyes/cm² のずり応力勾配、及び一定ずり応力下に測定した^{13,18)}。

Binding assay

まず、1.8 mM の CaCl₂ を含んだ Tyrode buffer (pH 7.3) を用い、正常ヒト洗浄血小板を PRP から作成した。agonist により惹起される ¹²⁵I-fibrinogen または ¹²⁵I-vWF の血小板への結合は、Fujimura ら¹²⁾, De Marco ら¹⁹⁾ の方法によった。本研究では、アッセイ前に種々の濃度のecto-ATPDase と血小板を室温で5分間孵置し、その後 agonist と ¹²⁵I で標識したリガンドとを混和、計 125 μl として測定した。また実験の測定にあたっては、¹²⁵I-fibrinogen (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, f. c.) または ¹²⁵I-vWF (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, f. c.) を活性化した GP IIb/IIIa に結合させるのに、ecto-ATPDase で処理した血小板を α -thrombin (0.1 U/ml, f. c.) を加え5分間孵置した後、20倍量のヒルジンを加え thrombin 活性を中和した。一方、¹²⁵I-vWF の GPIb への結合は、上記と同様、ecto-ATPDase で孵置した後の血小板に ristocetin を終濃度 1 mg/ml で添加し、この後 ¹²⁵I-vWF を加えた。共に血小板へのリガンドの結合量はガンマカウンターで測定した。また、非特異的結合量は標識していない50倍量のリガンド存在下での血小板への結合量とし、全結合量から非特異的結合量を差し引いた量を特異的結合量とし、100% で表示した。

免疫組織染色

新鮮な胎盤の凍結切片(6 μm 幅)は chromalum-gelatin をコートしたスライドガラスを用いて作製した²⁰⁾。4%パラホルムアルデヒドで固定した後、風乾し、0.3%過酸化水素を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を停止させた。一次抗体として MK 33 mAb

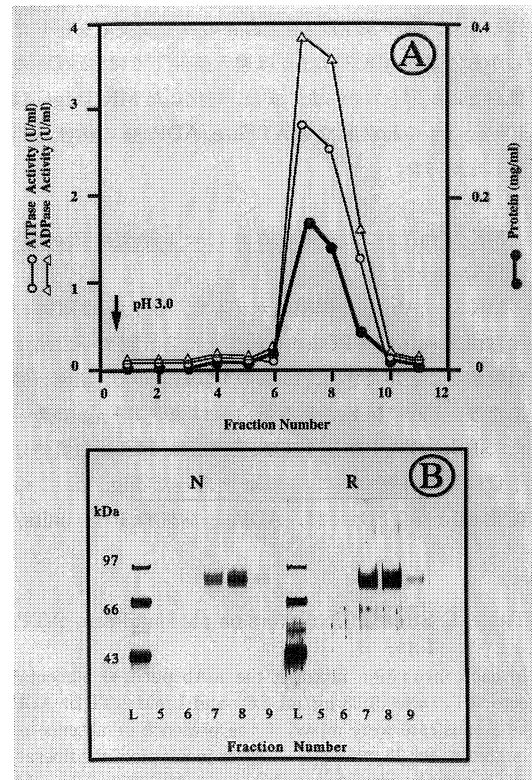


Fig. 1. Purification of human placental ecto-ATPase on a mAb MK33 affinity column. Panel A: The MK33 (IgG)-coupled Sepharose 4B gel equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF (TBS-P), and 0.2% Triton X-100, was used. 2 ml-fractions were collected, and immediately neutralized by the addition of 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Protein concentration and ATP or ADPase activity were then determined. Panel B: SDS-7.5% PAGE analysis of the purified enzyme, visualized by a silver staining, only shows a 82 kDa-band under non-reducing (N) or reducing (R) conditions, where the lane L indicates the proteins of low molecular mass weight marker (Bio-Rad), and the lanes 5-9 are fraction number (See Experimental Procedures for details).

を、二次抗体として抗マウス IgG を用い、Vectastain ABC キット (Burlingame, CA) にて、avidin-biotin immunoperoxidase 染色で検出した。なお、核はヘマトキシリンで染色した。

成 績

抗ヒト胎盤由来 ecto-ATPDase mAb MK 33

Western blotting にて MK 33 mAb (IgG₁- κ) は非還元下に、SDS-7.5% PAGE で分離された胎盤由来蛋白質のうち、唯一 82 kDa の蛋白とのみ免疫反応を示した。しかし、この MK 33 mAb は還元条件下では 82 kDa の蛋白とは反応しなかった。また、純化した MK 33 IgG は 100 μ g/ml の高濃度でも ATPase/ADPase の活性を阻害しなかった。

MK 33 mAb により純化されたヒト胎盤由来 ecto-ATPDase の性状

MK 33 mAb (IgG) 固相化カラムで、分子量 82 kDa の胎盤由来 ecto-ATPDase をわずかに 2 日間で一段階で精製することができた。15 回の実験結果から、胎盤一個あたり、1 回に精製される蛋白質は 305-451 μ g であった。SDS-7.5% PAGE 後の銀染色では、精製蛋白質の分子量は還元前後で共に 82 kDa であった (Fig. 1)。この純化 ecto-ATPDase は、ADPase 活性は 15-20 units/

mg/min, ATPase 活性は 17-20 units/mg/min の加水分解活性を有していた。

精製胎盤 ecto-ATPDase の酵素活性は 10 mM の EDTA にはほぼ完全に失活し、1 mM の Na-vanadate や 10 mM の NaN₃ で部分的に阻害されたが、ouabain では 10 mM の濃度でも全く阻害されなかった (Table 1)。

Table 1. Effect of inhibitors on placental ecto-ATPDase

In each incubation mixture, the mAb-purified placental ecto-ATPDase (0.05 μ g/ml, f.c.) and 1 mM ATP or ADP as a substrate were mixed in the presence or absence of inhibitors for 15 min at 37°C. After incubation, the liberated inorganic phosphate (Pi) was determined by the method of LeBel et al. (15). 100% indicates the amount of the liberated Pi in the absence of inhibitors, and 0% is determined in the absence of ATP or ADP. The results are averages of duplicate measurements.

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative Activity (%) with	
		ATP	ADP
None	—	100	100
EDTA	1	13	17
	10	2	4
NaN ₃	1	93	106
	10	52	62
Ouabain	1	105	103
	10	108	97
Na-vanadate	1	58	69
	10	20	28

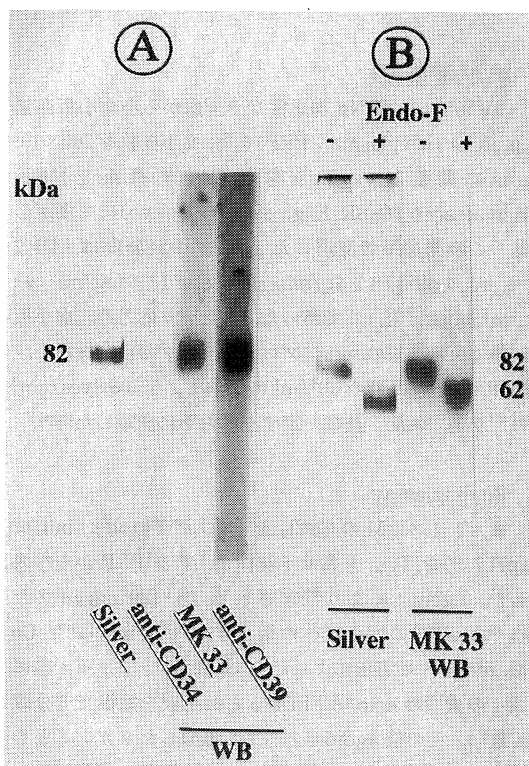


Fig. 2. Western blotting analysis of the mAb-purified placental ecto-ATPDase. Panel A: The mAb-purified placental ecto-ATPDase with a molecular mass of 82 kDa was separated by SDS 7.5% PAGE under non-reducing conditions, then western blotting (WB) studies using anti-CD34 mAb, MK33, and anti-CD39 mAb. The immunoreactive proteins were visualized by autoradiography using ¹²⁵I-labeled anti-mouse IgG rabbit serum. Silver indicates silver-stained gels. Panel B: The molecular mass (82 kDa) of the purified enzyme turned to 62 kDa after endo-F digestion by SDS-7.5% PAGE analysis under non-reducing conditions. The Asn-linked carbohydrate-depleted 62 kDa-protein was also immunoreactive with MK33 on WB analysis.

等電点電気泳動で精製酵素は pI 5.6-6.2 の幅の広いバンドとして認められた。また、この蛋白質は、western blotting では抗 CD 34 mAb とは全く反応しなかったが、抗 CD 39 mAb とは強く反応した (Fig. 2 A)。この蛋白質を Endo-F 処理すると、62 kDa の一本鎖蛋白質となり、また、MK 33 mAb との反応性も保持していた (Fig. 2 B)。しかし、Endo-F 処理後の 62 kDa 蛋白質は、処理前の 82 kDa 蛋白質の ATP 加水分解活性と比較すると、その酵素活性は $69 \pm 9\%$ 減少していた。

胎盤由来 ecto-ATPDase の N 末端アミノ酸はブロックされておらず、同定し得た 30 残基の N 末端アミノ酸配列は MKGTKDLTSQQKESNVKTFxSKNILAILGF である。最初の 11 アミノ酸残基は他の蛋白質と sequence homology がなく、続く 19 残基はヒト CD 39 リンパ球活性化抗原⁹⁾ の N 末端アミノ酸 5-23 残基とはほぼ同じ配列である (Fig. 3)。また、ノルウエー産ダイコクネズミ (*Rattus norvegicus* : *R. n.*) の CD 39 抗原²⁰⁾ とも高い homology を示していた。これより、胎盤由来 ecto-ATPDase はヒト CD 39 抗原とは同じ分子ではないが、sequence homology が高いのみならず、mAb の免疫交差性からも極めて近い分子と考えられる。

ヒト胎盤由来 ecto-ATPDase の血小板凝集阻害作用

ADP や collagen, α -thrombin, ristocetin などの agonist で惹起される血小板の一次凝集に対し、精製した胎盤由来 ecto-ATPDase はほとんど阻害作用がなく、二次凝集に対しては濃度依存性に阻害し、終濃度 $2 \mu\text{g}/$

Table 2. The N-terminal amino acid analysis of the purified placental ecto-ATPDase

Cycle	PTH amino acid	Yield (pmol)
1	Met	2.60
2	Lys	3.06
3	Gly	2.73
4	Thr	1.66
5	Lys	2.64
6	Asp	2.28
7	Leu	3.07
8	Thr	1.43
9	Ser	0.92
10	Gln	2.72
11	Gln	3.14
12	Lys	1.90
13	Glu	1.62
14	Ser	0.72
15	Asn	1.24
16	Val	1.65
17	Lys	1.63
18	Thr	0.88
19	Phe	1.47
20	x*	—
21	Ser	0.45
22	Lys	1.07
23	Asn	0.58
24	Ile	1.28
25	Leu	1.79
26	Ala	0.96
27	Ile	1.34
28	Leu	1.82
29	Gly	1.12
30	Phe	1.13
31	x	x

The reduced and S-carboxyamidomethylated enzyme was analysed.

x* denotes the unidentified amino acid residue.

Placental ecto-ATPDase	1	M	K	G	T	K	D	L	T	S	Q	Q	K	E	S	N	V	K	T	F	x	S	K	N	I	L	A	I	L	G	F	30
Human CD39-antigen	1	M	E	D	T	---	---	---	---	---	---	---	K	E	S	N	V	K	T	F	C	S	K	N	I	L	A	I	L	G	F	23
R.n. ecto-apyrase	1	M	E	I	K	D	---	---	S	K	V	K	R	---	---	F	C	S	K	N	I	L	I	L	L	G	F	---	---	---	---	23

Fig. 3. Comparison of the N-terminal amino acid sequences of the mAb-purified placental ecto-ATPDase, human CD39 lymphoid cell activation antigen, and *Rattus norvegicus* ecto-apyrase. The N-terminal 30 residue sequence of the mAb-purified placental ecto-ATPDase was determined as described in Experimental Procedures. A high degree of homology is seen with the respective sequences for human CD39 lymphoid cell activation antigen (9), and *Rattus norvegicus* (*R.n.*) ecto-apyrase (20), but they are not identical each other. Gaps (—) are inserted to obtain the maximum homology. X denotes the undetermined residue, and the identical residues are enclosed.

ml でほぼ完全に阻害した(Fig. 4).

ずり応力惹起血小板凝集では、この蛋白質は6-108 dynes/cm² のずり勾配下で血小板凝集を濃度依存性に抑制した(Fig. 5 A). さらに、個々のずり応力下での実験では、12 dynes/cm² の一定の低ずり応力下において濃度依存性の阻害作用がみられ、終濃度 0.5 μ g/ml で完全阻害が認められた(Fig. 5 B). 一方、108 dynes/cm² の一定の高ずり応力下ではこの蛋白質は初期凝集を阻害せず、後期凝集を濃度依存性に阻害し、終濃度 0.5 μ g/ml にてほぼ完全な凝集の再解離がみられた(Fig. 5 C).

ヒト胎盤由来 ecto-ATPDase の vWF/Fibrinogen と血小板との結合阻害作用

前もって洗浄血小板を ecto-ATPDase と孵置後、 α -thrombin で刺激し、活性化した血小板 GP IIb/IIIa への ¹²⁵I-fibrinogen 結合と ¹²⁵I-vWF 結合を測定すると、

ecto-ATPDase 濃度依存性にこの結合を阻害し、終濃度 1 μ g/ml で両リガンドの結合をほぼ完全に阻害した(Fig. 6 A). しかし、同様にこの酵素で孵置しておいた血小板を ristocetin で刺激した場合の、¹²⁵I-vWF の血小板 GPIb への結合は、ecto-ATPDase の終濃度 10 μ g/ml でも、全く阻害されなかった(Fig. 6 B).

mAb MK 33 の免疫組織染色による ecto-ATPDase の局在

胎盤絨毛や臍帯動静脈との免疫組織染色では、MK 33 mAb は胎盤絨毛膜合胞体栄養層を濃染した。コントロールに用いた抗 CD 39 mAb も同様にこの組織の同じ部位を濃染したが、抗 CD 34 mAb は陰性結果を示した(Fig. 7 A). 臍帯静脈については MK 33, 抗 CD 39 および CD 34 mAb は何れも一層の内皮細胞を濃染した(Fig. 7 B). しかし、興味あることに臍帯動脈内皮細胞については CD 34 mAb で濃染されるが、MK 33 や抗

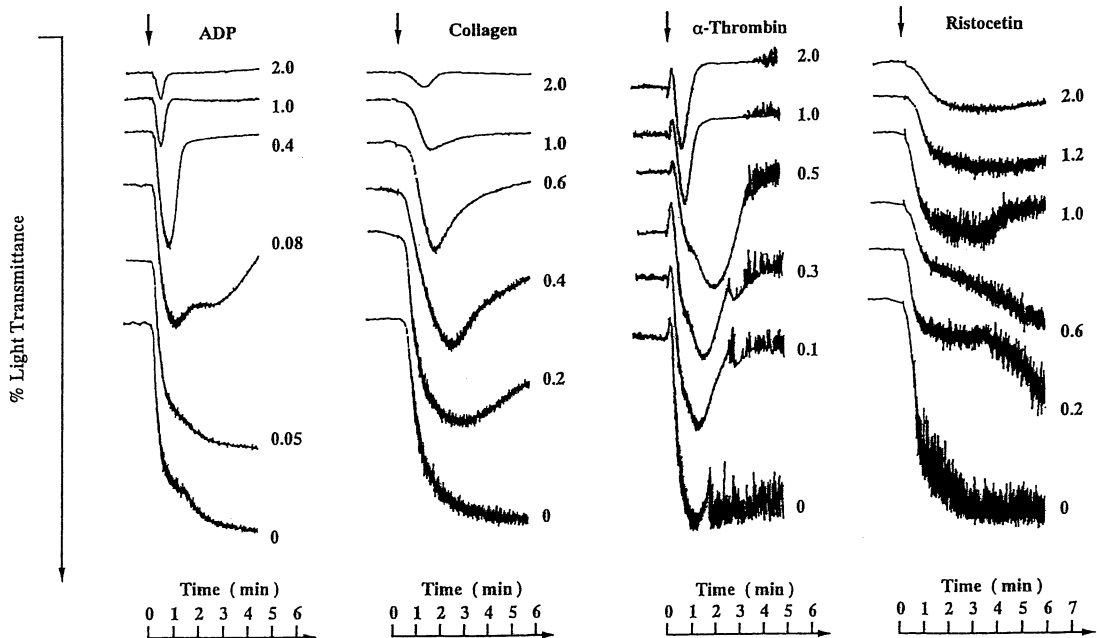


Fig. 4. Effects of the mAb-purified placental ecto-ATPDase onto agonist-induced platelet aggregation. The normal citrated PRPs, pre-incubated with various concentrations of the purified placental ecto-ATPDase at 37°C for 5 min, were used for this study. Final concentrations (μ g/ml) of this enzyme in the mixture are shown in each figure right. The platelet agonists were then added to this incubation mixture at the final concentrations of ADP (2 μ g/ml), collagen (2 μ g/ml), α -thrombin (0.1 U/ml), and ristocetin (1.25 mg/ml), from left to right.

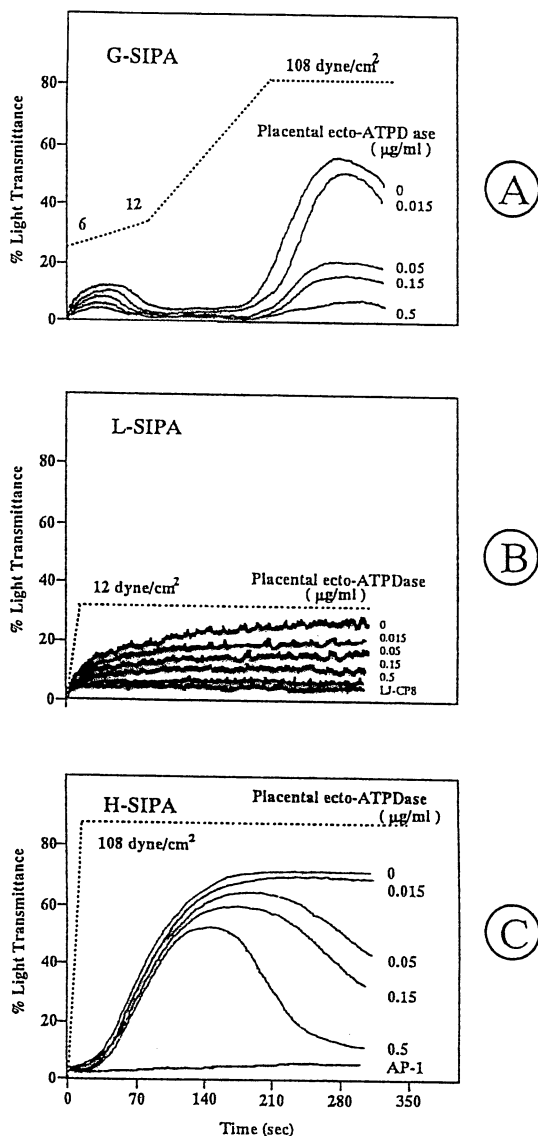


Fig. 5. Effects of the mAb-purified placental ecto-ATPase onto shear stress-induced platelet aggregation. The citrated PRPs from normal individuals were used in this study. Panel A: Purified placental ecto-ATPase inhibited platelet aggregation under gradient shear stress (6-108 dynes/cm²: G-SIPA) in a dose-dependent manner. Panel B: Under a constant low shear stress (12 dynes/cm²: L-SIPA), the purified enzyme also clearly inhibited platelet aggregation in a dose-dependent manner, and showing total inhibition at a f. c. of 0.5 µg/ml. Anti-GPIIb/IIIa mAb LJ-CP8 (10 µg/ml, final) was used to show a complete inhibition of L-SIPA under this circumstance. Panel C: However, under a constant high shear stress (108 dynes/cm²: H-SIPA), the enzyme did not inhibit the initial phase of platelet aggregation, but rather induced the disaggregation of platelets in the later phase in a dose-dependent manner, and showing almost total disaggregation at a f.c. of 0.5 µg/ml. Anti-GPIb mAb AP-1 (10 µg/ml, final) was used to show a complete inhibition of H-SIPA under this circumstance.

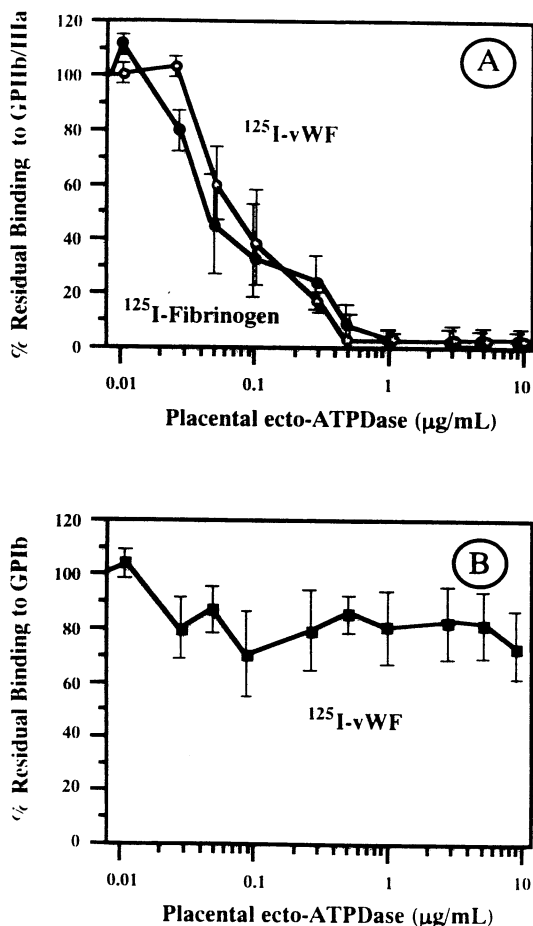


Fig. 6. Effects of the mAb-purified placental ecto-ATPase on vWF or fibrinogen binding to platelets. For ¹²⁵I-fibrinogen or vWF binding to GPIIb/IIIa, washed platelets were pre-incubated with various concentrations of the purified placental ecto-ATPase, then stimulated with α -thrombin for 5 min followed by neutralization with hirudin. ¹²⁵I-labeled ligands were then added to the mixture, and the bound radioactivity was measured (Fig. 6A). For ¹²⁵I-vWF binding to GPIIb, washed platelets pre-incubated with various concentrations of the enzyme were mixed with ¹²⁵I-vWF in the presence of ristocetin (Fig. 6B). In both instances, nonspecific binding was measured in the presence of a 50-fold excess of unlabeled ligand, and the specific binding was subtracted from the total. Residual binding of 100% indicates specific binding in the presence of buffer alone. The results indicate the mean \pm 1 S.D. of three different experiments. (See Experimental Procedures for details.)

CD 39 mAb での染色はいずれも陰性であった(Fig. 7 C).

考 察

従来、ヒト並びに非ヒト由来の ecto-ATPase の高度精製の最終段階に必須とされてきた 5' AMP-Sepharose 4 B ゲルは、胎盤由来 ecto-ATPase がこのゲルに対し親和性が低く、また精製過程で同酵素が失活するため、本酵素の構造・機能解析を行うための充分量の蛋白量を得る事が困難であった。著者は今回、従来の方法で部分精製された抗原を用い、特異的 mAb(MK 33)を作成する事により、これらの問題を解決した。

まず、この MK 33 mAb の同酵素に対する特異性は、抗体固相化カラムを用いた吸着クロマトグラフィーで溶出された蛋白質が分子量 82 kDa の一本鎖糖蛋白質で、ATP-/ADPase の比活性が 15-20 units/mg/min と高い事から証明された。精製酵素は Endo-F で処理し、Asn 結合型糖鎖を除去すると分子量 62 kDa となることから、この蛋白質の分子量の約 25 % は Asn 結合型糖側鎖で占められており、分子を構成するアミノ酸残基数は最大ほぼ 600 と見積られる。また、等電点電気泳動で、pI 5.6-6.2 の幅の広いバンドとして検出された事はこれらの糖側鎖に heterogeneity がある事を示唆している。この免疫吸着法で精製された胎盤由来 ecto-ATPase の N 末端から同定された 30 個のアミノ酸配列は MKGTKDLTSQQKESNVKTFx-SKNILAILGF であった。最初の 11 残基の配列は、現在までに知られているどの蛋白質とも全く相同性はないが、続く 19 残基はヒト CD 39 リンパ球活性化抗原⁹⁾ の N 末端 6-23 番目のアミノ酸配列とほぼ同じで、また、ノルウエーラット(R.n.)の CD 39 抗原⁹⁾ とも高い相同性を示した。また、この精製酵素は western blot で抗 CD 39 mAb と交差免疫反応を示すことから、両蛋白質は免疫学的にも共通抗原を有することが示された。最近、ヒト CD 39 抗原の cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列が potato apyrase のそれと相同性があることが判明した。そして上述した 5' AMP-Sepharose 4 B カラムで微量ながら高度に精製された胎盤 ecto-ATPase の一部内部配列がやはり CD 39 抗原と相同性のあることが明らかとなった。この他 CD 39-cDNA を組み込んだ CHO 細胞や COS 細胞に ATP-/ADPase 活性が発現される^{8,10,11)} 事などから、CD 39 抗原が即ち vascular ecto-apyrase そのものであると推論されている。しかし、今回の成績は胎盤 ecto-ATPase と CD 39 抗原は構造的にも免疫学的にも極めて似かよってはいるが、同一ではなく、両者は明らかに異なる分子で

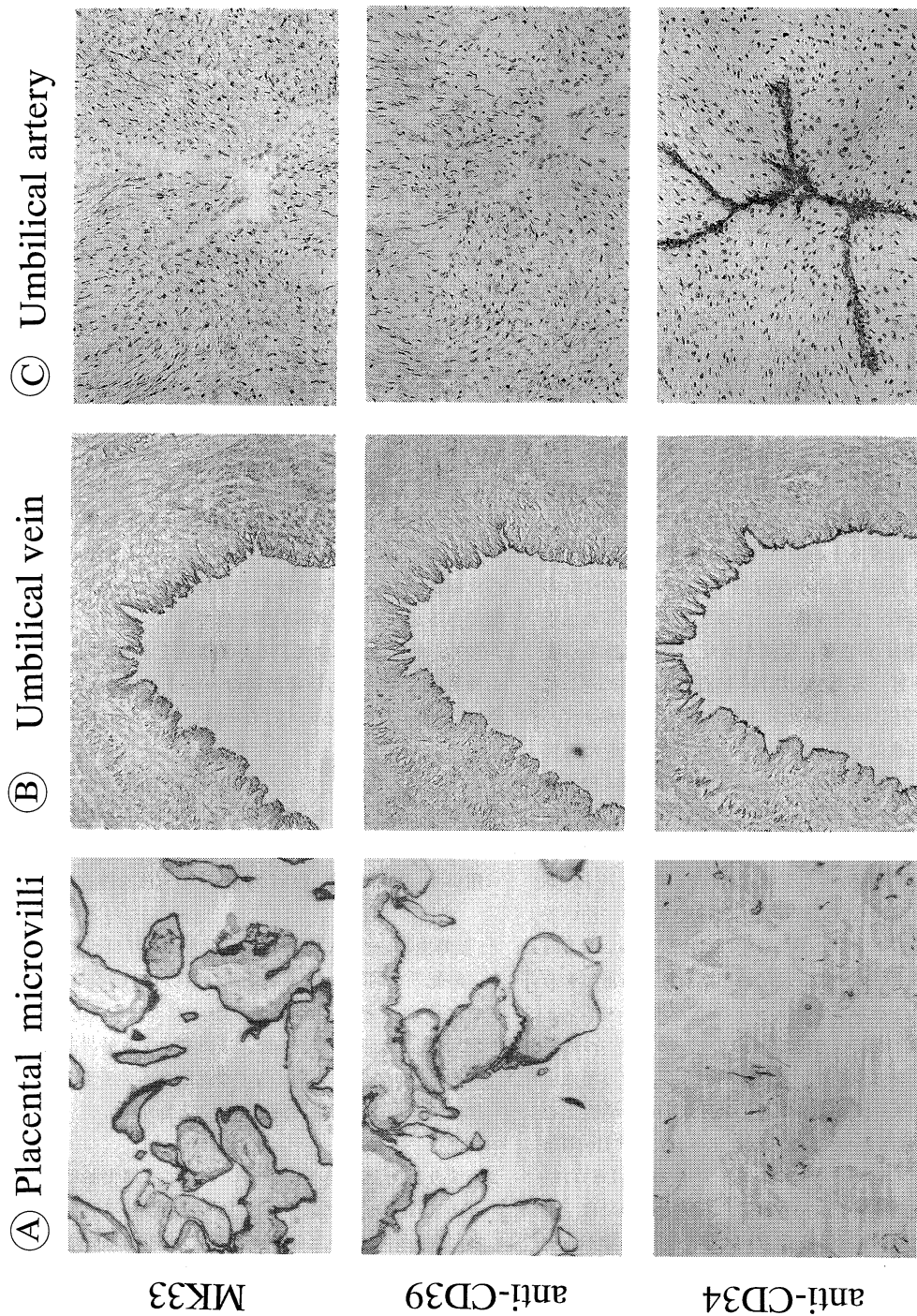


Fig. 7. Immunolocalization of ecto-ATPDase in human placental microvilli and cord vessels: comparison with mAbs against CD39 and CD34. Both anti-placental ecto-ATPDase mAb MK33 and anti-CD39 mAb stained syncytiotrophoblasts in the microvilli, but anti-CD34 mAb did not (Fig. 7A, $\times 200$ magnification). These three mAbs stained the endothelial cells in umbilical cord vein (Fig. 7B $\times 50$ magnification). In umbilical cord artery, anti-CD34 mAb stained the endothelial cells, but neither MK33 nor anti-CD39 mAb immunoreacted with these cells (Fig. 7C $\times 100$ magnification).

ある事を示した。現時点では、この違いは恐らく共通の genome から alternative splicing により、異なった isoform が発現されている事によるものと推論されるが、最終的には胎盤 ecto-ATPDase に特異的な cDNA クローニングの結果が待たれる。

一方、ヒト胎盤やウシ大動脈から部分的に精製された ecto-ATPDase の血小板凝集に対する作用については、ADP や collagen などの agonist により惹起される血小板凝集が阻害される事が既に幾つかのグループから報告されている²¹⁾。著者は今回、精製胎盤 ecto-ATPDase が、ADP, collagen, α -thrombin 惹起血小板凝集の一次凝集には殆ど影響を与えないものの、二次凝集を濃度依存性に完全阻害する事を確認した。この阻害は血小板の一次凝集の後、血小板のデルタ顆粒から放出される内的 ADP が同酵素によって瞬時に分解され、血小板の自己活性化が起こらないためと説明される。さらに、ずり応力惹起血小板凝集に関するこの酵素の阻害作用は極めて興味あるものであった。即ち、低ずり応力下惹起血小板凝集は精製 ecto-ATPDase で濃度依存性に初期凝集から阻害され、終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に阻害された。従来、低ずり応力下での血小板凝集は ADP 非依存性と考えられてきたが、この成績は、このような条件下の血小板凝集にも ADP が重要な役割を果たしている事を示唆している。一方、高ずり応力下惹起血小板凝集に対して胎盤 ecto-ATPDase はその初期凝集を殆ど阻害せず、後期凝集は終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にてほとんど完全に阻害するという再解離性様式を示した。この阻害様式は血小板 GP IIb/IIIa のレセプターブロッカーである抗 GP IIb/IIIa mAb を用いたものとは大きく異なり、ecto-ATPDase に特徴的な所見と考えられる。即ち、今日、コンプレート型ずり応力惹起血小板凝集の機序については、高ずり応力下での血小板凝集は二段階でおけると説明されている。まず、第一段階の初期凝集は多重体構造を持つ vWF の基本サブユニットの N 末端ドメインと GP Ib との結合によって起こり、この結合が Ca^{2+} の血小板内への流入を引き起こし、それが引き金となって血小板内でのシグナル伝達を介して GP IIb/IIIa の活性化を起こす。第二段階として、この活性化された GP IIb/IIIa への vWF サブユニットの C 末端ドメイン (RGDS) の結合によって後期凝集が維持される。本研究の結果は、この第一段階でのシグナル伝達機構において血小板から放出される内的 ADP による血小板の自己活性化が重要な機能を果たしている事を示している。

この結論は、実際 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の胎盤 ecto-ATPDase の存在下において、 α -thrombin で刺激された血小板か

ら放出される内的 ADP が、血小板の自己活性化を起こすことなく、瞬時にその作用を封じられ、vWF 結合が完全に阻害されるという binding assay の結果からも支持された。

MK 33 mAb を用いた免疫組織染色法で、胎盤絨毛膜小胞の合胞体栄養層に胎盤由来 ecto-ATPDase が高密度に局在していることを証明した。さらに臍帯静脈内皮細胞にもこの抗原が局在するが、興味ある事に臍帯動脈内皮細胞にはこの抗原は殆ど存在しない。また、これらの分布様式は抗 CD 39 mAb で染色した場合も MK 33 の場合とほぼ同じであった。胎盤絨毛膜小胞は母体と胎児との血液循環の接触面に位置し、栄養やガス交換が盛んに行なわれている場所であるが、解剖学的には、狭小で複雑な構造をとるため種々の程度のずり応力が生じる。これらのずり応力にもかかわらず、正常妊娠経過では同所での血小板血栓の形成は殆どない。事実、thrombomodulin や annexin などの幾つかの抗血栓作用を有する蛋白質が胎盤組織の中から発見されており²⁴⁻²⁶⁾、胎盤 ecto-ATPDase もまたこれら抗血栓機能に関与している重要な物質の一つと考えられる。一方、臍帯動脈内皮細胞で同酵素分布に顕著な差異が見られた理由は不明であるが、 O_2 分圧が高い臍帯脈では活性酸素の産生量が多く、活性酸素による内皮細胞障害とそれに関連する血栓形成とに対する防衛機構の一つとして ecto-ATPDase が機能しているのではないかと考えられる。

結 語

1. ヒト胎盤由来 ecto-ATPDase に対する特異的 mAb MK 33 を作製した。この抗体固相化免疫吸着カラムを用いて、同酵素を一段階で純化する方法を確立した。
2. 胎盤由来 ecto-ATPDase の N 末端より 30 個のアミノ酸配列を同定した。この配列は最初の 11 残基は今までの蛋白質とは相同性がなかったが、続く配列は CD 39 とほぼ同じであった。またそれぞれ特異的なモノクローナル抗体の反応より構造的にも免疫学的にも極めて似かよった蛋白質であることを示した。
3. ずり応力惹起血小板凝集において、純化胎盤由来 ecto-ATPDase は低ずり応力下で濃度依存性に血小板凝集を阻害した。一方高ずり応力下では初期凝集には影響を与えなかったが、後期凝集には濃度依存性に凝集を阻害するという再解離パターンの阻害を示した。また、binding 実験においては、この純化 ecto-ATPDase は vWF の活性化 GP IIb/IIIa への結合を GP Ib

への影響なしに阻害した。このことより, 血小板のADPはGP IbからGP IIb/IIIaへのシグナル伝達に重要な役割をしていると考えられた。

4. mAbを用いた免疫組織染色では, 胎盤由来ecto-ATPDaseは胎盤絨毛膜合体栄養層に濃染した。また, 臍帯静脈内皮細胞にもこの抗原は存在しているが, 臍帯動脈内皮細胞にはほとんど存在しなかった。この事は胎盤由来ecto-ATPDaseもまた母児間の循環において抗血栓作用の重要な役割を果たしていると考えられた。
5. 精製した酵素蛋白により, 今後, 習慣性流産や, 他の血栓症に対しての治療薬として役立つと考えられた。

本稿を終えるにあたり御指導, 御校閲を賜った, 本学第二内科学講座成田亘啓教授ならびに, 直接御指導, 御教示頂いた本学輸血部藤村吉博教授に心から深謝いたします。また, 御検閲, 御助言を賜りました, 本学小児科学講座吉岡章教授および産婦人科学講座森川肇教授に深く感謝を捧げるとともに, さらに, アミノ酸配列の部分同定を行っていただいた, 藤田保健衛生大学総合医科学研究所・医高分子学部門千谷晃一教授に感謝いたします。また実験の遂行にあたってお世話いただいた, 本学輸血部, 第二内科, 小児科, 産婦人科ならびに, 藤田保健衛生大学総合医科学研究所・医高分子学部門諸兄姉に御礼申し上げます。

この論文の要旨は

第17回 日本血栓止血学会(1994年11月, 東京)

第19回 日本血栓止血学会(1996年11月, 山梨)

第2回 Thrombosis and Rheology学会
(1997年2月東京)

第16回 国際血栓止血学会(1997年6月イタリア)

第20回 日本血栓止血学会(1997年9月, 金沢)

において発表した。

文 献

- 1) Plesner, L. : *Int. Rev. Cytol.* **158** : 141-214, 1995.
- 2) Lin, S-H. and Fain, J. N. : *J. Biol. Chem.* **259** : 3016-3020, 1984.
- 3) Lin, S-H. and Guidotti, G. : *J. Biol. Chem.* **264** : 14408-14414, 1989.
- 4) Stout, J. G., Strobel, R.S. and Kirley, T. L. : *J. Biol. Chem.* **270** : 11845-11850, 1995.
- 5) Handa, M. and Guidotti, G. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218** : 916-923, 1996.
- 6) Yagi, K., Kato, N., Shinbo, M., Shimba, L. and Miura, Y. : *Chem. Pharm. Bull.* **40** : 2143-2146, 1992.
- 7) Christoforidis, S., Papamarcaki, T., Galaris, D., Kellner, R. and Tsolas, O. : *Eur. J. Biochem.* **234** : 66-74, 1995.
- 8) Wang, T-F. and Guidotti, G. : *J. Biol. Chem.* **271** : 9898-9901, 1996.
- 9) Marcus, A. J., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H. F., Islam, N., Alyonycheva, T. N., Safier, L. B., Hajjar, K. A., Posnett, D. N., Schoenborn, M. A., Schooley, K. A., Gayle, R. B. and Maliszewski, C. R. : *J. Clin. Invest.* **99** : 1351-1360, 1997.
- 10) Maliszewski, C. R., Delespesse, G. J. T., Schoenborn, M. A. and Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S.-D. : *Gayle III, R. B. J. Immunol.* **153** : 3574-3588, 1994.
- 11) Kaczmarek, E., Koziak, K., Sevigny, J., Siegel, J. B., Anrather, J., Beaudoin, A. R., Bach, F. H. and Robson, S. C. : *J. Biol. Chem.* **271** : 33116-33122, 1996.
- 12) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. R., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S. : *J. Biol. Chem.* **261** : 381-385, 1986.
- 13) Fujimura, Y., Ikeda, Y., Miura, S., Yoshida, E., Shima, H., Nishida, S., Suzuki, M., Titani, K., Taniuchi, Y. and Kawasaki, T. : *Thromb. Haemost.* **74** : 743-750, 1995.
- 14) Laemmli, U. K. : *Nature* **227** : 680-685, 1970.
- 15) LeBel, D., Poirier, G. G. and Beaudoin, A. R. : *Anal. Biochem.* **85** : 86-89, 1978.
- 16) Smith, N. C., Brush, M. G. and Luckett, S. : *Nature* **252** : 302-303, 1974.
- 17) Iioka, H., Akada, S., Shimamoto, T., Yamada, Y., Sakamoto, Y., Moriyama, S. I. and Ichijyo, M. : *Placenta* **14** : 75-80, 1993.
- 18) Ikeda, Y., Handa, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Anbo, H., Kawai, Y., Watanabe, K., Itagaki, I., Sakai, K. and

- Ruggeri, Z. M. : J. Clin. Invest. 87 : 1234-1240, 1991.
- 19) DeMarco, L., Mazzucato, M., Masotti, A., Fenton, J. W. II. and Ruggeri, Z. M. : J. Biol. Chem. 266 : 23776-23783, 1991.
- 20) Saito, S., Motoyoshi, K., Saito, M., Kato, Y., Enomoto, M., Nishikawa, K., Morii, T. and Ichijyo, M. : Lymphokine Cytokine Res. 12 : 101-107, 1993.
- 21) Cote, Y. P., Filep, J. G., Battistini, B., Gauvreau, J., Sirois, P. and Beaudoin, A. R. : Biochem. Biophys. Acta 1139 : 133-142, 1992.
- 22) Moake, J. L., Turner, N. A., Stathopoulos, N. A., Nolasco, L. and Hellums, J. D. : Blood 71 : 1366-1374, 1988.
- 23) Alevriadou, B. R., Moake, J. L., Turner, N. A., Ruggeri, Z. M., Folie, B. J., Phillips, M. D., Schreiber, A. B., Hrinda, M. E. and McIntire, L. V. : Blood 81 : 1263-1276, 1993.
- 24) Salem, H. H., Maruyama, I. and Ishi, H. : J. Biol. Chem. 259 : 12246-12251, 1984.
- 25) Tait, J. F., Sakata, M., McMullen, B. A., Miao, C. H., Funakoshi, T., Hendrickson, L. E. and Fujikawa, K. : Biochemistry 27 : 6268-6276, 1988.
- 26) Preissner, K. T. : Haemostasis 18 : 271-306, 1988.