



## Endoglycosidase H digestion of Yukb(Pena) alloantigen

菅野, 亘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1148

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001148>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 菅野 壱 (岡山県)  
 博士の専攻 分野の名称 博士 (医学)  
 学位記番号 博い第823号  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 学位授与の日付 平成5年2月28日  
 学位論文題目 ENDOGLYCOSIDASE H DIGESTION OF Yuk<sup>b</sup> (Pen<sup>a</sup>)  
 ALLOANTIGEN  
 血小板同種抗原 Yuk<sup>b</sup> に関する研究

審査委員 主査 教授 山口延男  
 教授 高井義美 教授 前田盛

### 論文内容の要旨

#### [概要]

血小板同種抗原 Yuk<sup>a</sup> / Yuk<sup>b</sup> は血小板不適合による新生児血小板減少性紫斑病の母親から発見された抗体で同定された抗原型である。しかし、その抗原部位に関する詳細な報告はない。そこで、血小板 Yuk<sup>b</sup> 抗原の特徴を蛋白分解酵素や糖分解酵素の反応から解明した。immunoblotting では、抗 Yuk<sup>b</sup> 抗体は非還元下では 96kDa と 110kDa の血小板膜蛋白を認識した。二次元電気泳動では、これらの二つの band はそれぞれ pl 5.1-5.8 と pl 5.2-5.7 に認められた。96kDa の band は血小板糖蛋白 (GP) IIIa と同定されたが、110kDa の band の本体は不明であった。これらの二つの band は抗 Pl<sup>A1</sup> 抗体でも同様に認められ Yuk<sup>b</sup> 抗原と Pl<sup>A1</sup> 抗原の違いは明らかでなかった。しかし、Pl<sup>A1</sup> 抗原が chymotrypsin や endoglycosidase H 処理後も抗原性を保持していたのに反して、Yuk<sup>b</sup> 抗原は chymotrypsin 処理により抗原性が一部破壊され、さらに endoglycosidase H によりその抗原性が完全に消失した。血小板を endoglycosidase H で処理すると Yuk<sup>b</sup> 抗原が上清に移動することが mixed passive hemagglutination test で確認された。これらの成績より Yuk<sup>b</sup> 抗原は GP IIIa から endoglycosidase H 処理により遊離される N-linked high mannose carbohydrate chain または hybrid type chain に存在していることが示唆された。

#### [目的]

Yuk<sup>b</sup> 抗原の特徴を chymotrypsin や endoglycosidase H に対する反応から明らかにすることを試みた。

## [方法]

血小板膜は Barber と Jamieson らの方法で採取した。抗 Yuk<sup>b</sup> 血清、抗 Pl<sup>A1</sup> 血清は新生児血小板減少性紫斑病の母親から得た。

### Protease 处理

血小板膜蛋白を  $\gamma$ -chymotrypsin type II (chymotrypsin) と 1 : 10 (W : W) の割合で 100mM PBS pH 7.4 の buffer 中で 37°C、60 分間反応させた。

### Endoglycosidase H 处理

未処理の血小板膜蛋白と chymotrypsin 处理した血小板膜蛋白それぞれ 150  $\mu$  g に対し endo-  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (endoglycosidase H) 0.05 U を 100mM sodium citrate pH 5.4 の buffer 中で 37°C、15 時間反応させた。また、未処理の血小板膜蛋白を 7.5% の SDS-PAGE で展開した後 nitrocellulose 膜に転写し、上記の条件で nitrocellulose 膜上の血小板膜蛋白を endoglycosidase H で処理した。N-linked high mannosecarbohydrate chain と hybrid type chain の抽出は洗浄血小板と endoglycosidase H を PBS pH 5.4 の buffer 中で反応させて行った。すべての反応に phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を添加し protease 活性の影響を除いた。

### 二次元電気泳動

未処理の血小板膜蛋白を O'Farrell の方法に従い 9.5% urea、4 % acrylamide、2.5% Amphorine で等電点電気泳動した後、7.5% SDS-PAGE で分離し nitrocellulose 膜に転写した。

### Immunoblotting

未処理の血小板膜蛋白、chymotrypsin 处理した血小板膜蛋白、endoglycosidase H 处理した血小板膜蛋白、chymotrypsin と endoglycosidase H 处理した血小板膜蛋白を非還元下で 7.5% SDS-PAGE で電気泳動後 nitrocellulose 膜に転写した。immunoblotting は nitrocellulose 膜上で抗 Yuk<sup>b</sup> または抗 Pl<sup>A1</sup> 血清を反応させビオチン化マウス抗ヒト IgG を反応させた後 Vectastatin ABC kit で発色させた。二次元電気泳動で転写した nitrocellulose 膜、endoglycosidase H で処理した nitrocellulose 膜も同様に抗 Yuk<sup>b</sup> または抗 Pl<sup>A1</sup> 血清を用いて immunoblotting を実施した。

### Mixed passive hemagglutination (MPHA) test

endoglycosidase H 处理した血小板より抽出した上清を polystyrene microtiter U-tray に吸着させ、各種濃度に希釈した抗 Yuk<sup>b</sup> 血清を反応させた後、indicator cell を浮遊させた。4 時間静置した後 indicator cell の沈殿状態を肉眼で観察し、沈殿しているものを陰性とした。

## [結果]

immunoblotting では抗 Yuk<sup>b</sup> 抗体は抗 Pl<sup>A1</sup> 抗体と同様に未処理の血小板膜蛋白の 96kDa と 110 kDa の二つの band を認識した。96kDa の band は分子量より GP IIIa と同定された。二次元電気泳動で抗 Yuk<sup>b</sup> 抗体、抗 Pl<sup>A1</sup> 抗体が認識した二つの band の pl は 96kDa が pl 5.1-5.8 そして 110kDa が pl 5.2-5.7 にあることが明らかとなり、両者の抗原部位に違いが認められなかった。

chymotrypsin 处理した血小板膜蛋白の immunoblotting では Yuk<sup>b</sup> 抗原は一部分解されたが、

$\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原は 57kDa の band として認められた。また endoglycosidase H 処理した血小板膜蛋白、chymotrypsin 処理後 endoglycosidase H 処理した血小板膜蛋白では  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は完全に消失した。一方、 $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原は endoglycosidase H 処理した血小板膜蛋白の 48、56、68kD の band に認められ chymotrypsin 処理後さらに endoglycosidase H 処理した血小板膜蛋白では 48kDa に認められた。nitrocellulose 膜上に転写した血小板膜蛋白を endoglycosidase H で処理した後 immunoblotting すると  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は完全に消失したが  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原は 110、96kDa の band として認められた。endoglycosidase H 処理した血小板から抽出した上清は抗  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  血清と反応することが MPHA 法で確認できた。

#### [考察]

血小板 GPⅢa 上には  $\text{Pl}^{\text{A}1} / \text{Pl}^{\text{A}2}$  と  $\text{Yuk}^{\text{a}} / \text{Yuk}^{\text{b}}$  の二つの血小板同種抗原が局在していることが知られている。最近  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原と  $\text{Pl}^{\text{A}2}$  抗原は GPⅢa の 33 番目のアミノ酸が leucine / proline になっている事による抗原性の違いであることが明らかにされた。一方、 $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は GPⅢa に存在していることは知られているがその抗原部位の詳細な報告はない。本研究者の今回の実験で抗  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗体は GPⅢa (96kDa) と反応する事を確認したが、さらに 110kDa の band とも反応し二次元電気泳動で 96kDa の band は pl 5.1-5.8、110kDa の band は pl 5.2-5.7 に存在することを明らかにした。これらの抗原部位は抗  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗体でも認識され、 $\text{Yuk}^{\text{b}}$  と  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原部位に違いが認められなかった。なお、110kDa の band は GPⅢa の前駆物質と考えたいが、この本体については一層の研究が必要である。そこで chymotrypsin と endoglycosidase H の  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原に及ぼす影響を観察した。GPⅢa は chymotrypsin で 57kDa の fragment に分解され、抗  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗体はこの fragment に反応した。しかし抗  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗体はこの fragment に反応しなかった。従って  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は chymotrypsin により分解遊離される fragment または carbohydrate に存在することが推測された。そこで endoglycosidase H の  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原に及ぼす影響を検討した。 $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は endoglycosidase H 処理により抗原性を完全に消失することが明らかになった。また、血小板膜 endoglycosidase H で処理すると  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原が上清中に移動することが確認できた。一方、 $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原は endoglycosidase H 処理によって全く影響を受けなかった。endoglycosidase H は N-linked high mannose carbohydrate chain または hybrid type chain の糖鎖を切断しアミノ酸鎖近位の GlcNAc に fucose が結合している糖鎖には反応しないことが知られている。従って  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原の epitope は GPⅢa の N-linked high mannose carbohydrate chain または hybrid type chain の上に局在することが示唆され、 $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原と異なった部位に局在することが明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

血小板にも赤血球の ABO 型のように色々な型があることが、新生児血小板減少性紫斑病 (NTP) や、血小板輸血不応状態の患者血清を用いた血清学的な検討から明らかにされていた。まず最初に

NTP を来たした患児の母親から得られた抗血清の反応から  $\text{Pl}^{\text{A}1}/\text{Pl}^{\text{A}2}$  抗原系が見い出され以後  $\text{Bak}^{\text{a}}$  / $\text{Bak}^{\text{b}}$ 、 $\text{Br}^{\text{b}}$  / $\text{Br}^{\text{a}}$ 、 $\text{Yuk}^{\text{a}}(\text{Pen}^{\text{b}})/\text{Yuk}^{\text{b}}(\text{Pen}^{\text{a}})$ 、 $\text{Sib}^{\text{a}}/\text{Sib}^{\text{b}}$  などの血小板型が報告されるに至った。興味あることにこれらの同種抗原は血小板機能発現に重要な役割を果たしている膜糖蛋白 (GP) 上に局在している事が明らかにされている。最近になって  $\text{Pl}^{\text{A}1}/\text{Pl}^{\text{A}2}$  抗原系の遺伝子レベルの検索によって  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  ホモ接合体の人は GPⅢa 遺伝子の 196 番目の塩基がチミンで、一方  $\text{Pl}^{\text{A}2}$  ホモ接合体の人はシトシンとなっているため、GPⅢa の N 末端から 33 番目のアミノ酸が  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  ではロイシンで一方  $\text{Pl}^{\text{A}2}$  ではプロリンとなりこの違いがそれぞれの抗原性を支配していることも明らかにされた。しかし他の抗原系の遺伝子支配や生化学的特徴はまだ充分に解明されていない。本研究は GPⅢa 上に発現している  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  と  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原を蛋白分解酵素と糖分解酵素で分解して同じ膜糖蛋白上に存在する二つの異なる血小板型の違いを生化学的に明らかにしようとしたものである。まず NTP を来たした患児の母親から  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗体と  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗体を得てこの抗体の認識する抗原を immunoblotting で検討し、いずれの抗体も 110kDa と 96kDa の二つの蛋白を認識することそして 90kDa の蛋白は分子量から GPⅢa に相当することを明らかにした。これは従来の報告に一致していたとしている。しかし本研究が初めて明らかにした 110kDa についての本体は不明であるが GPⅢa の前駆体の可能性があるとしているが、今後の解明が期待される。同時にこれら二つの bands の pI が 110kDa が 5.2-5.7 に 96 kDa が 5.1-5.8 にあることを示し、immunoblot 上の性状からは  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  と  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原の違いを見つけることができなかつたので、本研究者は chymotrypsin あるいは endoglycosidase H で血小板膜を処理してこれらの抗原がどのように変化するかを検討した。chymotrypsin で処理すると  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原は三本の bands に分解されるが、 $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原の発現している 110kDa と 96kDa の二つの bands は部分的な分解を受けるということから二つの血小板型は蛋白分解酵素に対する反応に違いがあることを見い出した。さらに endoglycosidase H で処理すると  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原は chymotrypsin 処理によって出現した三つの bands は全く分解されないが、興味あることに  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は endoglycosidase H で完全に分解されることを観察した。ついでに血小板膜を endoglycosidase H で処理すると  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原が上清に移行することから  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原は GPⅢa 上の N-linked high mannose carbohydrate chain あるいは hybrid type chain 上に局在している可能性があることを示し、同じ GPⅢa 上に発現している  $\text{Pl}^{\text{A}1}$  抗原と  $\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原の生化学的性状の違いを明らかにした。本研究は  $\text{Yuk}^{\text{a}}/\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原系には糖鎖が重要な役割を果たしていることを示し、現在進んでいる  $\text{Yuk}^{\text{a}}/\text{Yuk}^{\text{b}}$  抗原の遺伝子レベルの検索に貢献するとともに、GPⅢa 上に発現している血小板型を同定するために chymotrypsin や endoglycosidase H の反応の違いを見ることが有用であることを示したもので、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。