Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

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　亘（すがの　わたる）　（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^b (Pen^a) ALLOANTIGEN

血小板同種抗原 Yuk^b 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^a／Yuk^b 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^b 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^b 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 pI 5.1-5.8 と pI 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^{A1} 抗体でも同様に認められ Yuk^b 抗原と Pl^{A1} 抗原の違いは明らかでなかった。しかし、Pl^{A1} 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^b 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^b 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^b 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^b 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^b血清、抗Pl^{A1}血清は新生児血小板減少性紫斑病の母親から得た。

Protease処理

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

Endoglycosidase H処理

未処理の血小板膜蛋白とchymotrypsin処理した血小板膜蛋白それぞれ150μgに対しendo-β-N-acetylglucosaminidase H（endoglycosidase H）0.05Uを100mM sodium citrate pH 5.4のbuffer中で37℃、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phenylmethylsufonyl 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処理した血小板膜蛋白、endoglycosidase H処理した血小板膜蛋白、chymotrypsinとendoglycosidase H処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^bまたは抗Pl^{A1}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^bまたは抗Pl^{A1}血清を用いてimmunoblottingを実施した。

Mixed passive hemagglutination（MPHA）test

endoglycosidase H処理した血小板より抽出した上清をpolystyrene mictotiter U-trayに吸着させ、各種濃度に希釈した抗Yuk^b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の沈澱状態を肉眼で観察し、沈澱しているものを陰性とした。

［結果］

immunoblottingでは抗Yuk^b抗体は抗Pl^{A1}抗体と同様に未処理の血小板膜蛋白の96kDaと110kDaの二つのbandを認識した。96kDaのbandは分子量よりGPⅢaと同定された。二次元電気泳動で抗Yuk^b抗体、抗Pl^{A1}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処理した血小板膜蛋白のimmunoblottingではYuk^b抗原は一部分解されたが、

Pl^{A1} 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 Yuk^b 抗原は完全に消失した。一方、pl^{A1} 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 Yuk^b 抗原は完全に消失したが Pl^{A1} 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 Yuk^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 Pl^{A1}／Pl^{A2} と Yuk^a／Yuk^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 Pl^{A1} 抗原と Pl^{A2} 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、Yuk^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 Yuk^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 Pl^{A1} 抗体でも認識され、Yuk^b と Pl^{A1} 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 Yuk^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 Pl^{A1} 抗体はこの fragment に反応した。しかし抗 Yuk^b 抗体はこの fragment に反応しなかった。従って Yuk^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 Yuk^b 抗原に及ぼす影響を検討した。Yuk^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 Yuk^b 抗原が上清中に移動することが確認できた。一方、Pl^{A1} 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 Yuk^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、Yuk^b 抗原は Pl^{A1} 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Pl^{A1}／Pl^{A2}抗原系が見い出され以後Bak^a／Bak^b、Br^b／Br^a、Yuk^a(Pen^b)／Yuk^b(Pen^a)、Sib^a／Sib^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Pl^{A1}／Pl^{A2}抗原系の遺伝子レベルの検索によってPl^{A1}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Pl^{A2}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Pl^{A1}ではロイシンで一方Pl^{A2}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Pl^{A1}とYuk^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ってい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Pl^{A1}抗体とYuk^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96kDaが5.1-5.8にあることを示し、immunoblot上の性状からはPl^{A1}とYuk^b抗原の違いを見つけることができなかったので、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Pl^{A1}抗原は三本のbandsに分解されるが、Yuk^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Pl^{A1}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Yuk^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Yuk^b抗原が上清に移行することからYuk^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Pl^{A1}抗原とYuk^b抗原の生化学的性状の違いを明らかにした。本研究はYuk^a／Yuk^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Yuk^a／Yuk^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。