

人胎盤由来の腎炎惹起性糖蛋白について (精製法および超音波処理による抽出法)

奈良県立医科大学産婦人科学教室

飯岡 秀晃 森山 郁子 伊藤 公彦
尼崎 真実 一條 元彦

国立病院医療センター臨床研究部

柴 田 整 一

Nephritogenic Glycoprotein Isolated from Human Placenta —Purification and Isolation by Sonication—

Hideaki IIOKA, Ikuko MORIYAMA, Kimihiko ITOH

Mami AMASAKI and Motohiko ICHIJO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

Seiichi SHIBATA

Clinical Research Institute, National Medical Center, Tokyo

概要 人胎盤より人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の物質の抽出に成功したことを前報において報告した。今回は、胎盤より抽出した試料を腎由来の腎炎惹起性糖蛋白の精製方法を用いて精製を行ない、その化学組成を明らかにした。

1) 精製に用いた手段は、Zone 電気泳動, Concanavalin A (Con A) affinity column chromatography, Bio Gel P200 column chromatography 等の方法を用いた。精製収量は胎盤絨毛組織250g (湿重量) より0.7mg (乾燥重量) であった。

2) 精製を行なった人胎盤抽出試料は Con A と特異的な親和性をもつことより、その本体が糖蛋白であることが判明した。

3) その糖組成およびアミノ酸組成について分析した結果、糖組成ではグルコースを主体とすることが判明した。またアミノ酸組成では hydroxyproline, hydroxylysine 等の collagenous component を欠く non collagenous な物質であることが明らかになった。

4) 人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清を用いてオクタロニー法によるゲル内二重拡散法を行なった結果、人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白および人胎盤絨毛基底膜より酵素消化により抽出精製した試料および人胎盤絨毛基底膜より超音波処理により可溶化抽出した試料および S.L.E.患者の尿より抽出された腎炎惹起性糖蛋白のすべての間に共通の一本の完全に融合する沈降線が形成された。

Synopsis Previously, we reported that we succeeded in isolating from human placenta a substance comparable to human renal nephritogenic glycoprotein prepared from glomerular basement membrane (GBM). This time we purified a sample isolated from human placental trophoblast basement membrane (TrBM) with the methods for purifying renal nephritogenic glycoprotein and clarified its chemical composition.

1) To purify the sample prepared from human placental TrBM, we fractionated the sample by Zone Electrophoresis, Concanavalin A(Con A) affinity column chromatography and Bio Gel P200 column chromatography.

2) As the active fraction of the sample purified from human placental TrBM bound specifically with Con A, it proved to be a glycoprotein.

3) The monosaccharide composition of this glycoprotein was rich in glucose (glucose, galactose and mannose were in the ratio of 1.00 : 0.30 : 0.33) and the amino acid composition of this glycoprotein contained no collagenous components.

4) Ouchterlony gel diffusion demonstrated the existence of a common precipitin line between antiserum

to human renal nephritogenic glycoprotein prepared from GBM and human renal nephritogenic glycoprotein prepared from GBM, purified human placental glycoprotein, the sample prepared from human placental TrBM by sonication and nephritogenic glycoprotein prepared from urine of S.L.E. patient.

Key words: Placenta • Trophoblast basement membrane • Nephritogenic glycoprotein • Kidney • Toxemia

緒 言

人胎盤（絨毛基底膜）より人腎（糸球体基底膜）由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の物質の抽出に成功したことを報告し、本物質と妊娠中毒症の発症機序について検討してきている。腎由来の腎炎惹起性糖蛋白は、動物実験で慢性腎炎、萎縮腎に進行する腎炎を惹き起こすことが判明している物質である⁸⁾。さらにその局在部位は腎のみならず、肺・大動脈・肝等の他臓器にも広く分布しており⁹⁾、本物質は単に腎炎のみならず、広く全身臓器の毛細血管の基底膜障害を惹き起こすものではないかと考えられている³⁾。

したがって、本物質と同様の物質が胎盤に存在することより、妊娠時の胎盤由来の本物質による母体腎、胎盤等の毛細血管の基底膜障害という新しい観点から妊娠中毒症の病態を見直せるのではないかという考えを前回の報告¹⁾では述べた。さらに腎由来の腎炎惹起性糖蛋白は、その化学組成について、詳しく調べられた結果、その化学構造がほぼ完全に解明された物質である²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾。そして、その特異な化学構造および化学的な性質が腎炎惹起能という生物活性と密接に関係することが判明してきている³⁾¹⁶⁾。したがって、今回は前回¹⁾の胎盤より抽出に成功した試料を腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の手段で、さらに精製を進め、その化学組成および化学的な性質につき検討を加えた。また、腎由来の腎炎惹起性糖蛋白は糸球体基底膜に強力な超音波処理を施すことにより可溶化されることが判明している⁵⁾が、胎盤由来の本物質に対しても同様の性質が認められるかについてもあわせて検討した。

方 法

1) 絨毛基底膜の分離

材料として分娩直後の妊娠満期人胎盤を用いた。胎盤からの絨毛基底膜の分離は、Gang et al.の方法⁴⁾の変法によった。まず、胎盤絨毛組織よりメッシュ操作により終末絨毛を分離し、次いで超

音波処理により絨毛基底膜を分離した。なお、詳細は前回の報告¹⁾で述べた。

2) 絨毛基底膜の可溶化

絨毛基底膜は、トリプシンを用いて、37℃ 3時間消化して可溶化し、27,000r.p.m.35分間の超遠心後、上清を透析し凍結乾燥した¹⁾。このようにして可溶化された絨毛基底膜（TrBM TR (3)と略称する）を得た。

3) 超音波処理による絨毛基底膜の可溶化

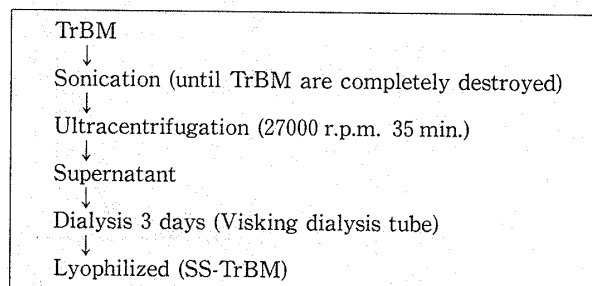
1) で得た絨毛基底膜分画を生理的食塩水に懸濁し、Sonic Oscillator（久保田 KMS 250）を用いて、最大出力（150W 100V）の条件で約10分間、絨毛基底膜がばらばらにちぎれて細片状になるまで超音波処理後、懸濁状になつたサンプル液は超遠心管に移し、27,000r.p.m.35分間超遠心し、得られた上清を採取して、visking cellulose tubeに移し72時間透析を行なつた後凍結乾燥し、超音波処理により可溶化された絨毛基底膜（以下 SS-TrBM と略称）を得た。

4) 可溶化絨毛基底膜（TrBM TR(3)または SS-TrBM）の精製

a) プロナーゼ消化

TrBM TR(3)または SS-TrBM をプロナーゼを用いて、37℃、72時間徹底消化し、27,000r.p.m.35分間の超遠心を施した後、上清を透析し凍結乾燥した¹⁾。このようにして徹底消化された可溶化絨毛基底膜（以下 TrBM TR (3) Pr(72) または SS-TrBM Pr (72) と略称）を得た。

図1 胎盤絨毛基底膜の超音波処理による可溶化



b) ELISA 法

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清を用い、ELISA 法を行ない、分画された各試料の腎炎惹起性糖蛋白活性を調べた¹⁾。

c) ゾーン電気泳動

前報¹⁾と同様の操作を行なった。

d) Con A affinity column chromatography

0.5M NaCl を含有する0.02M Tris HCl buffer pH 7.8で平衡化された Con A Sepharose 4B (1.0×20cm)を用い、流速毎時3ml で試料をカラムにかけ、ついで150ml の buffer で素通り部を洗浄した後、次に2.0% Methyl α -D mannopyranoside を含む buffer を用い、Con A に吸着した glycoprotein を置換流出させた。試料は6ml 毎に分画し、各分画毎に蛋白量、糖量を測定し、また ELISA 法を行なった。

e) Bio Gel P200 column chromatography

前報¹⁾と同様の操作を行なった。

5) 抗血清

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清は既に報告された方法により作製されたものを用いた¹¹⁾。

6) Ouchterlony 法

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清を用いて Ouchterlony の方法⁶⁾に従い、ゲル内二重

拡散法を行なった。

7) 蛋白含量・糖含量の測定

Zone 電気泳動、カラムクロマトグラフィー等によつて分画された各分画中の蛋白含量は O.D. 280 を測定し推定した。また各分画中の糖含量については、glucose を standard にして Anthrone 法⁷⁾により測定した。

8) 化学組成の決定

人胎盤抽出精製試料の糖組成は、ガスクロマトグラフィー(島津製作所 GC-RIA)を用いて決定した。またアミノ酸組成は、アミノ酸自動分析装置(日本電子 type 200A)を用いて決定した。

成 績

1) Zone 電気泳動による分画パターン

プロナーゼ消化を加えた可溶性絨毛基底膜試料(TrBM TR (3) Pr (72)) 220mg を Zone 電気泳動により分画した結果、図2のごとく1つの糖のピークが得られたが、腎炎惹起性糖蛋白活性は糖の前半部に特に強く見られた。この活性の強い前半部の分画(Fraction α と命名)を集め、次の Con A affinity column chromatography により精製を進めた。

2) Con A affinity column chromatography による分画パターン

図3のごとく、腎炎惹起性糖蛋白活性は Con A

図2 Zone Electrophoresis による胎盤抽出試料〔TrBM TR (3) Pr (72)〕の分画パターン

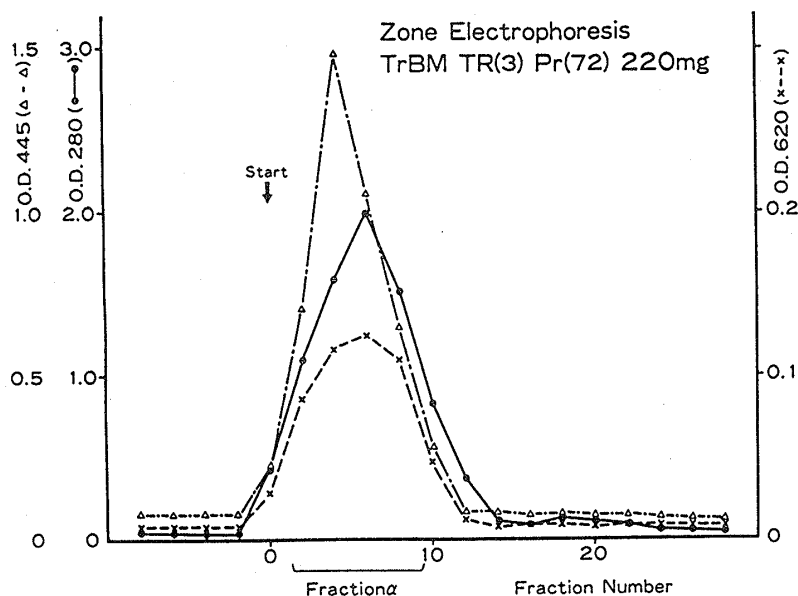


図3 Con A-Sepharose 4B カラムによる胎盤抽出試料 [Fraction α (Zone)] の分画パターン

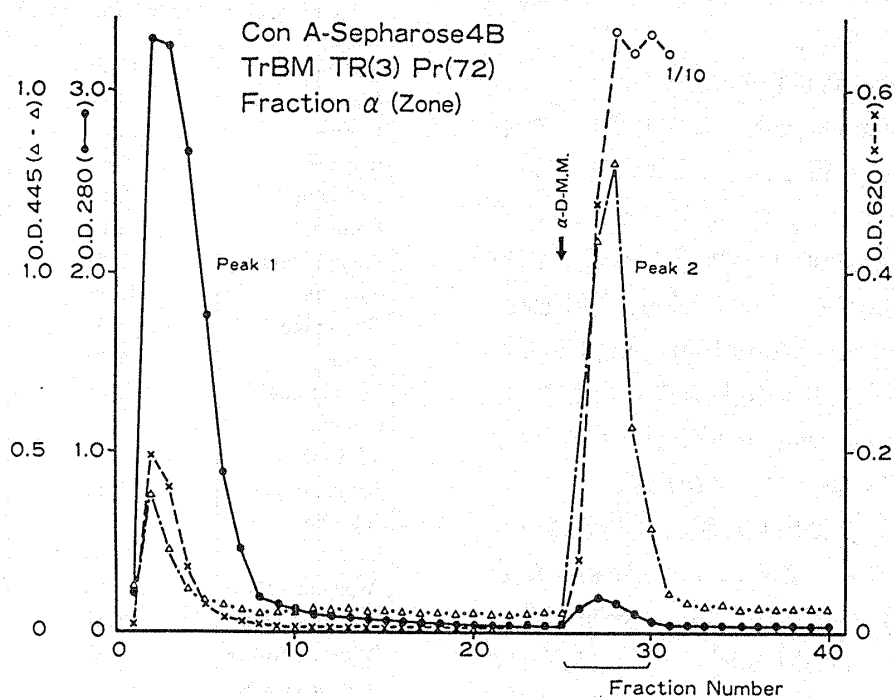
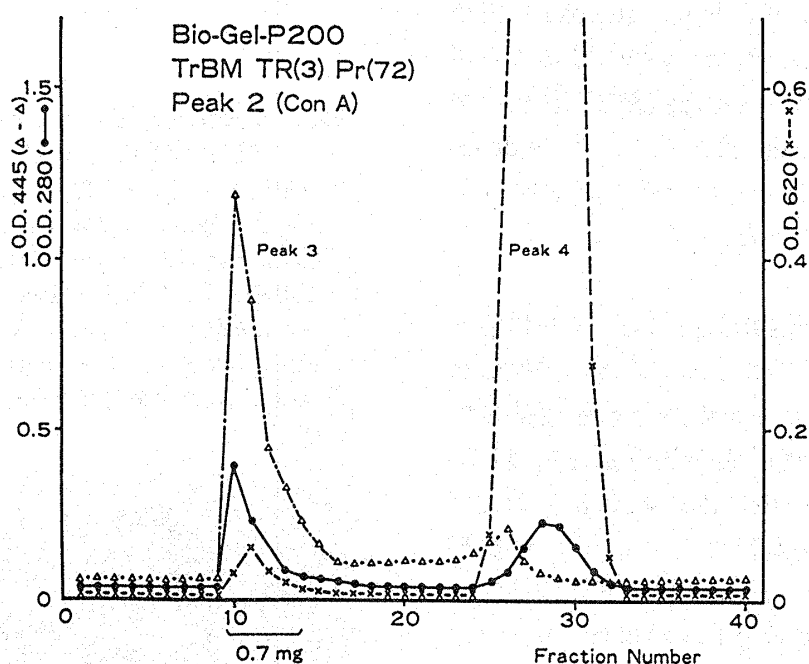


図4 Bio-Gel-P200カラムによる胎盤抽出試料 [Peak 2 (Con A)] の分画パターン



吸着分画 (Peak 2) に存在し, Con A 非吸着分画 (Peak 1) には, ほとんど認めなかった。腎由来の腎炎惹起性糖蛋白は Con A と特異的な親和性をもつことが判明しているが, 胎盤由来の物質も同様の性質をもつことが確認された。ついで Con A 吸着分画 (図3の Peak 2) をさらに Bio Gel P200

column chromatography を用いてゲル濾過し精製を進めた。

3) Bio Gel P200 column chromatography による分画パターン

図4のごとく, 腎炎惹起性糖蛋白活性は void 分画 (Peak 3) に存在した。活性が void 分画に存在

する性質は腎由来の腎炎惹起性糖蛋白の性質とよく一致し、それは本物質が凝集しやすい性質をもつためと考えられている。

4) 胎盤抽出試料の精製収量について

胎盤絨毛組織250g(湿重量)より出発し、絨毛基底膜20g(湿重量)が得られ、これをトリプシン消化で可溶化しプロナーゼ消化を加えたところ220mg(乾燥重量)の試料(TrBM TR(3) Pr(72))が得られた。この試料を、つぎに Zone 電気泳動, Con A affinity column chromatography, Bio Gel P200ゲル濾過の手段を用い精製を進めたところ、最終的な精製収量は0.7mg(乾燥重量)であつた。

5) 胎盤抽出試料の糖・アミノ酸組成

今回我々が胎盤より抽出した試料(TrBM TR(3) Pr(72))ならびに、さらにこれを精製した分画(図3の Peak 3)の糖組成を調べた結果は表1のごとくであつた。TrBM TR(3) Pr(72)では glucose, galactose, mannose の比は1.00:0.74:1.00であつたが、精製を進めた試料ではその比が1.00:0.30:0.33となり、glucoseの占める割合が精製を進めるにしたがい増加することが判明した。一方、胎盤より抽出精製した試料のアミノ酸組成を調べた結果、表2のごとく、hydroxylysine, hydroxyproline等のコラーゲン成分を欠くことが明らかとなつた。

6) Ouchterlony 法

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清を用いて、Ouchterlony 法によるゲル内二重拡散法を行なつた結果、人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白(NG-GP-human GBM)、胎盤より抽出精製した試料(TrBM TR(3) Pr(72)(peak 3))および胎盤より超音波処理施行により抽出した試料(SS-TrBM Pr(72))の3者の間に唯1本の完全に融合する共通の沈降線の形成が認められ、また

表2 胎盤抽出試料のアミノ酸組成

Amino acid	TrBM TR(3) Pr(72)	TrBM TR(3) Pr(72) (Peak 3)
Glycine	17.58	13.82
Alanine	8.63	10.04
Valine	5.72	7.32
Leucine	7.01	7.07
Isoleucine	3.85	3.64
Proline	6.52	4.30
Phenylalanine	2.51	3.64
Tyrosine	Trace	—
Threonine	5.58	6.40
Serine	6.72	8.29
Cysteic acid	2.88	1.84
Cystein	—*	—
Methionine	—	—
Arginine	2.14	2.61
Histidine	2.33	6.45
Lysine	4.63	4.68
Aspartic acid	11.25	9.83
Glutamic acid	12.62	9.88
Hydroxyproline	—	—
Hydroxylysine	—	—

*not detectable

図5 Ouchterlony 法によるゲル内二重拡散法

1. SS-TrBM Pr(72)(胎盤より超音波処理により抽出された試料), 2. NG-GP-S.L.E. Urine (S.L.E.尿より抽出された腎炎惹起性糖蛋白), 3. NG-GP-human GBM (人腎由来腎炎惹起性糖蛋白), 4. TrBM TR(3) Pr(72)(Peak 3)(胎盤より抽出精製された試料), 5. TrBM TR(3) Pr(72)(胎盤より抽出された試料), C.W. anti NG-GP-human GBM serum (人腎由来腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清)

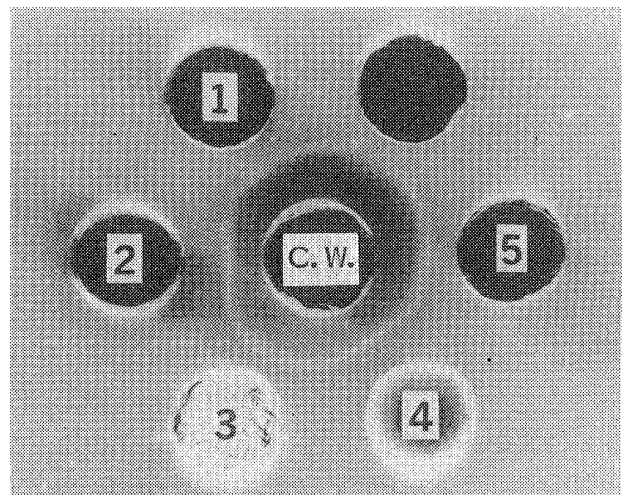


表1 胎盤抽出試料の糖組成

	Glucose	Galactose	Mannose
TrBM TR(3) Pr(72)	1.00	0.74	1.00
TrBM TR(3) Pr(72) (Peak 3)	1.00	0.30	0.33

* Estimated by gas-liquid partition chromatography

この沈降線はSLE患者の尿中より抽出された腎炎惹起性糖蛋白(NG-GP-S.L.E. Urine)のそれとも一致した。この結果、上記4者は免疫学的に同一物質であることが確認された。

考 案

腎由来の腎炎惹起性糖蛋白(糖ペプチド)はnon collagenousな糖蛋白であり、その構造解析がほぼ完全になされた物質であり²⁾¹⁷⁾、特にその腎炎惹起能を担っている糖部分の立体構造は核磁気共鳴法(NMR法)等を用いて、その解析が完全に行なわれている²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。その結果、糖部分は3個のグルコースが直鎖型に結合していること、また糖部分とペプチド部分の結合は α -N-グリコシド結合であることなどが明らかにされた。前回、我々は人胎盤より腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の物質の抽出に成功したことを報告した¹⁾が、今回は、胎盤より抽出した物質について、さらにその精製を進め、その化学的性質と化学組成についても腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と一致するかについて検討してみた。はじめに、腎由来の腎炎惹起性糖蛋白がCon Aと特異的に結合する性質をもつ¹⁰⁾ことに注目し、Con A affinity column chromatographyを用いて分画してみた結果、胎盤由来物質も腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様に、Con Aと特異的に結合する糖蛋白であることが確認された。またCon Aと特異的に結合することにより、その立体構造の一部にCon Aと結合する糖鎖が存在することが判明した。さらにその化学組成について検討した結果、その糖組成はグルコースを多く含むこと、また精製を進めた試料ではそのグルコース含量の比率が増加していることを明らかにした。一方、そのアミノ酸組成は、collagenousな成分を欠いていることが確認された。

以上の成績より、胎盤由来の糖蛋白は、腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の化学構造をもつ糖蛋白であることが明らかである。つぎに腎由来の腎炎惹起性糖蛋白は腎糸球体基底膜から強力な超音波処理により可溶化されることが判明している⁵⁾。今回の成績より、胎盤由来の糖蛋白も同様に、絨毛基底膜より強力な超音波処理により可溶化されることが判明した。超音波処理により可溶

化されるという事実は本物質の基底膜内での存在様式を考える上で興味深い知見である。また今後、本物質を胎盤から純化する場合、酵素消化による純化よりも超音波処理による方がより自然な方法であると思われ、より化学的構造を保った型での純化の可能性が示された。

さて、今回の結果より、胎盤由来糖蛋白は免疫学的にも化学的にも腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と一致する物質であることが判明した。本物質は疾患医学の病態解明に、化学構造の明らかにされた物質を用いるという新しい手法を示したことで注目されている。また本物質は腎疾患(S.L.E., 膜性腎炎等)を有する患者の尿中に多量に排泄されることより¹¹⁾¹²⁾尿中よりの本物質の検出を、臨床診断へ応用することも試みられている。今回の成績より、人胎盤由来の糖蛋白は、この腎疾患患者の尿中に排泄される腎炎惹起性糖蛋白とも免疫学的に同一物質であることが判明した。したがって、今後、妊娠中毒症患者の尿を用いて、本物質と妊娠中毒症の関係につき検討を行ない、診断の予知が行なえる可能性が示された。

文 献

1. 飯岡秀晃, 森山郁子, 一條元彦, 柴田整一: 人胎盤由来の腎炎惹起性糖蛋白. 日産婦誌, 35: 827, 1983.
2. 中西洋志, 柴田整一: ラットの腎糸球体基底膜から得られた腎炎惹起性糖ペプチドの立体構造. 蛋白質・核酸・酵素, 26: 16, 1981.
3. 柴田整一: 腎炎惹起物質 nephritogenoside について. 蛋白質・核酸・酵素, 26: 1, 1981.
4. Gang, N.F. and Gelfand, M.M.: Isolation of trophoblast basement membrane from full-term human placenta. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 140: 188, 1972.
5. Naruse, T. and Shibata, S.: Mechanical extraction of the water-soluble antigen that induce nephrotoxic antiserum from rat glomerular basement membrane. Immunology, 22: 925, 1972.
6. Ouchterlony, O.: 'Antigen-antibody reactions in gels'. Acta Path. Microbiol. Scand., 26: 507, 1949.
7. Roe, J.H.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
8. Shibata, S., Nagasawa, T., Miyakawa, Y. and

- Naruse, T.*: Nephritogenic glycoprotein. I. Proliferative glomerulonephritis induced in rats by a single injection of the soluble glycoprotein isolated from homologous glomerular basement membrane. *J. Immunol.*, 106: 1284, 1971.
9. *Shibata, S. and Nagasawa, T.*: Nephritogenic glycoprotein. II. Immunochemical studies on nephritogenic activity of homologous water-soluble glycoprotein extracted from various rat organs. *Immunology*, 26: 217, 1974.
10. *Shibata, S., Nagasawa, T. and Miura, K.*: Nephritogenoside, the receptor glycoprotein for concanavalin A in rat glomerular basement membrane. Demonstration of α -D-Glucopyranosyl unit at the non-reducing terminus. *Bioch. Biophys. Acta*, 499: 392, 1977.
11. *Shibata, S. and Nagasawa, T.*: Glycoproteinuria, as an indicator of the glomerular basement membrane damage. *J. Lab. Clin. Med.*, 39: 207, 1977.
12. *Shibata, S., Sakaguchi, H. and Nagasawa, T.*: Nephritogenic glycoprotein. VI. Induction of proliferative glomerulonephritis with the immunofluorescent "Mesangial pattern" in rats by a single injection of soluble glycoprotein isolated from human urine. *Contr. Nephrol.*, 4: 22, 1977.
13. *Shibata, S.*: Nephritogenic glycopeptide (Nephritogenoside): Noncollagen glycopeptide isolated from glomerular basement membrane. *Glomerulonephritis* (eds. Y. Yoshitoshi and Y. Ueda), 23. University of Tokyo Press, Tokyo, 1979.
14. *Shibata, S. and Nakanishi, H.*: Structure of the sugar moiety in the nephritogenic glycopeptide from rat glomerular basement membrane. *Carbohydrate Research*, 81: 345, 1980.
15. *Shibata, S. and Nakanishi, H.*: The α -D-Configuration of the glycosyl-N linkage in the nephritogenic glycopeptide isolated from rat glomerular basement membrane. *Carbohydrate Research*, 86: 316, 1980.
16. *Shibata, S. and Miura, K.*: A third glycopeptide (Nephritogenoside) isolated from the glomerular basement membrane. *J. Biochem.*, 89: 1737, 1981.
17. *Shibata, S., Saito, H. and Nakanishi, H.*: Sugar composition of the nephritogenic glycopeptide, nephritogenoside, isolated from rat glomerular basement membrane. *Biochem. Biophys. Acta*, 714: 456, 1982.
- (No. 5414 昭58・11・11受付)