ラット子宮液, 血清, 初乳及び腸管液の蛋白質成分 に関する比較検討

長谷川喜久*・菅原七郎・竹内三郎

(東北大学農学部 家畜繁殖学教室)

著者らはラット子宮液の蛋白質に関する今までの報告の中で, 量的および質的变化, 卵巣ホルモンによる変化の支配, 血清蛋白質との差異または血清蛋白質の子宮腔への透過性および子宮液と血清中における免疫グロブリンの成分についての差異を明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。本研究においては, 子宮液中の蛋白質と他の外分泌液中の蛋白質との比較検討を試みた。

材料および方法

子宮液, 血清および初乳の採取は前報と同様に行った^{1,5)}。腸管液は胃側から 30 cm の長さの小腸を摘出し, 氷冷した pH 7.1 の PBS (phosphate buffer saline) 5 ml を用いて灌流した。灌流液を 5°C で 12,000 r. p. m. 遠心分離を行い, その上清をカーボワックスにより 100 倍に濃縮し, 実験に供した。子宮液の採取と同じ発情前期の 22 時の卵管 50 個を集め, PBS 3 ml により抽出し, 遠心分離後の上清を卵管抽出液とした。column chromatography は sephadex-G200 と sepharose-6B を用い前報と同様に行った⁵⁾。免疫電気泳動法, disc 電気泳動法および SDS gel 電気泳動法は前述の方法に準じた^{1,3,4)}。Ouchterlony 法および染色法はいずれも前報³⁾と同様に行った。

結 果

1. Column chromatography による子宮液, 血清, 初乳乳清と腸管液の分画像とそれらの蛋白質成分について

血清の分画像は Fig. 1 に示した。第 1 峰に IgA が

*現所属: 群馬大学医学部産婦人科学教室

Comparative studies of protein components in rat uterine fluid, serum, colostrum whey and intestinal fluid.

HASEGAWA, Yoshihisa*, Shichiro SUGAWARA & Saburo TAKEUCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Tohoku University, Sendai; *Present address: Department of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi 371)

Jap. J. Animal Reprod. 22(4), 1977.

Fig. 1. Analysis of serum proteins by sephadex-G200 (Top) and disc electrophoresis (Bottom).

められ, 第 2 峰の蛋白質の多くは IgG であった。

また, 初乳の乳清蛋白質の約 100 mg の sephadex-G200 column chromatography と disc 電気泳動および免疫電気泳動による分析の結果, 第 1 峰は IgM と IgA を含んでおり, 第 2 峰の主な成分は IgG であることがわかった。第 3 峰から 5 峰は, それぞれ albumin, lactoglobulin と lactoalbumin が主成分であった (Figs. 2 & 3)。子宮液の sephadex-G200 による chromatography (2×100) の結果は Fig. 4 に示した。すなわち 2 峰に分離されたので, さらに 1×100 の細い column を用いて分離を試みたが, やはり 2 峰に分離されただけであった。ついで sepharose-6B を用いて分離を行ったところ Fig. 5 に示すように, 9 分画が得られた。これの分画の蛋白質を免疫電気泳動法によって分析したところ, 分画 1 は IgM を含み分画 2 には IgM と IgA が認められた。分画 3 から 6 は, はっきりした沈降線を示

Fig. 2. Analysis of colostrum whey protein by sephadex-G200 chromatography (Top) and disc electrophoresis (Bottom). T: total protein components in colostrum whey.

Fig. 3. Immunoelectrophoretic patterns of colostrum whey proteins in fractions presented in Fig. 2.

Fig. 4. Chromatographic analysis of proteins in uterine fluid by sephadex-G200. A: diameter of column 2 cm. B: diameter of column 1 cm.

さなかったが分画 7 に子宮液に特異的に多い蛋白質が認められた。また, prealbumin は分画 7 に認められ, albumin は分画 8 に最も多量認められた。

腸管液の蛋白質は 2 峰は分画され, 第 1 峰は IgG より速い位置に, 第 2 峰は albumin より遅い位置に認められた。

2. SDS gel 電気泳動による血清液, 血清, 初乳乳清及び腸管液の蛋白質分画像について

子宮液, 血清, 乳清 および 腸管液の蛋白質の SDS gel 電気泳動による分画像は Fig. 7 に示した。血清では, albumin と IgG が最も含有率の多い蛋白質であり, それらの分子量は, standard protein である牛の albumin と γ -globulin とほぼ同じ大きさであった。

子宮液の蛋白質分画像は血清とは著しく異なり, albumin に相当する蛋白質は顕著に少なく, IgG およびそれよりわずかに分子量の大きい蛋白質分画が多いことが特徴的であった。また血清に比べ albumin より低分子の蛋白質が多く認められた。高分子分画はわずかに見られるだけであった。

腸管液の蛋白質分画像は, column chromatography の結果からも推察されたように, 高分子型の IgA と推定される位置と, 分子量 1 万位の分画の 2 つの蛋白質が主成分であり, albumin はわずかに見られる程度であった。高分子分画の蛋白質は Fig. 7C に示すとおり 2-ME 処理により認められなくなった。

乳清の蛋白質分画像は, これら 3 つの外分泌液のうち

Fig. 5. Analysis of uterine fluid proteins by sepharose-6B chromatography (Top) and immunoelectrophoresis (Bottom).

最も血清に類似していた (Fig. 7D)。IgG 分画より高分子の分画は IgG に比べると血清のそれより多く、lactoalbumin と lactoglobulin に由来する低分子の蛋白質が血清より多いことが特徴的であった。2-ME 処理により、分子量が IgG より大きい蛋白質分画は認められなくなった。

3. 子宮液と他の外分泌液の蛋白質の異同について

子宮液と血清の蛋白質の共通性については既に明らかにしたが³⁾、本報においてはさらに子宮液と初乳乳清と腸管液などのそれぞれの蛋白質との間の異同を検討した。また、生殖管の一部である卵管の抽出液と子宮中の蛋白質の共通性についても検討した。

それぞれの蛋白質の免疫化学的分析の結果は Fig. 8 に示した。既に明らかにされているように³⁾、子宮液の蛋白質のうち 4 ないし 5 成分は血清蛋白質と共通であった。血清と共通の蛋白質の抗体を吸収除去した抗子宮液

Fig. 6. Column chromatograph of intestinal fluid by sephadex-G200.

抗体 (AUF+S) は、初乳乳清および腸管液の蛋白質と 2 本の沈降線を形成した。腸管液を泳動し、抗ラット血清抗体と抗子宮液抗体と反応させた結果、前者とは主に IgG の位置に、後者とは IgA 他に数本の沈降線を形成した。

卵管抽出液の蛋白質の多くは血清と共通であったが、子宮液の特異的な蛋白質ともわずかながら共通性を有していた。

考 察

sephadex-G200 column chromatography によるラットの血清と初乳の蛋白質の分画が試みられているが^{6,7)}、その蛋白質成分についての詳細な研究はあまり行われていない。本研究の結果あるいは他の研究者の報告から⁷⁻⁹⁾、Fig. 1 の 34 から 40 までの分画は IgM、37 から 45 は IgA、40 から 54 までの分画は主に IgG であると考えられる。sephadex-G200 column chromatography により分画された初乳蛋白質成分は、disc 電気泳動と免疫電気泳動により明らかにされた。すなわち、immunoglobulin, albumin, lactoglobulin や lactoalbumin の位置が明らかにされた。

子宮液の蛋白質の sephadex-G200 column chromatography による分画は JOSHIDA¹⁰⁾によっても試みられているが、彼らは本研究の結果のように 2 峰に分離することに成功していない。しかしながら、早期に流出する分画に endopeptidase が含まれていると述べている。sepharose-6B column chromatography によって、より多くの分画に分離でき、さらに免疫電気泳動により分画された各 peak の蛋白質成分を明らかにし、各 immunoglobulin, 子宮液に特異的な蛋白質, prealbumin や albumin の溶出位置を定め、それらの蛋白質成分を半定

量的に示すことができた。

血清および外分泌液のそれぞれの蛋白質の分析から興味ある結果が得られた。血清ですでに明らかにしたように albumin が最も多く immunoglobulin では IgG, IgA, IgM の順に多いと考えられる。初乳乳清は、乳清蛋白質として特異的な lactoalbumin や lactoglobulin を除くと、血清の蛋白質分画像に類似していた。しかしながら、IgG に対する IgA の割合が血清のそれよりも多いことが示唆され、外分泌液の特異性を窺わせた。腸管液の蛋白質成分は最も顕著な外分泌液としての性質を示しており、IgA を多量に含み、albumin や IgG は殆ど認められず、また同定不明の低分子の蛋白質を多く含んでいた。

一方、子宮液は血清および腸管液の蛋白質の分画像とも異なっていた。albumin と IgG は殆ど認められず、また、IgA の含有量が少ないことはすでに示した⁵⁾。しかしながら、IgG に近似した分子量の蛋白質が多く含まれていたのが特徴的であった。免疫化学的分析の結果から、その蛋白質成分は血清蛋白質と共通の成分を有し、さらに詳細に検討したところ、 γ -globulin であり、免疫電気泳動により沈降反応は IgA のそれに類似していた⁵⁾。

以上の結果から、子宮液、初乳乳清および腸管液等の外分泌液の蛋白質成分、なかでも特に immunoglobulin のそれぞれの割合の異なることは興味深い。

子宮液中には血清には存在しない多くの蛋白質が含まれているが⁵⁾、これらの蛋白質の中には他の外分泌液蛋白質成分と共通のものが証明された。卵管抽出液の蛋白質が、子宮液に特異的な蛋白質とわずかながら共通性を示すことから、それらの蛋白質は、受精の場においても、ある役割を果たしていると考えられる。血清中には認められない子宮液の蛋白質と乳清および腸管液の蛋白質との間で、それぞれ2つの蛋白質成分が共通であった人の子宮頸管粘液中に lactoferrin が含まれていること¹¹⁾、また精漿中には lactoferrin と他にもう1つの乳清蛋白質と共通抗原があることなどを考え合わせると非常に興味深い。

要 約

本研究では、子宮液、血清、乳清および腸管液中の蛋白質を物理化学的あるいは免疫化学に検討し、子宮液と他の外分泌液の蛋白質との間の異同を明らかにした。

ゲル透過および SDS gel 電気泳動と免疫電気泳動により、それぞれの分泌液の蛋白質成分を明らかにし、immunoglobulin の存在とそれらのおおよその比率についての比較あるいは外分泌液の蛋白質の特異性について示した。乳清、子宮液および腸管液の蛋白質組成には血清蛋白質と共通した部分が認められるが、共通部分は乳清に最も多く、子宮液、腸管液の順であった。

免疫化学的分析によれば、血清に存在しない子宮液蛋白質の8成分のうち2成分は乳清および腸管液の蛋白質と共通であった。

以上の結果から、子宮液の蛋白質は、血清に見られない蛋白質成分の一部は他の外分泌液と共通であり他の大部分は子宮液に特異的であると推定される。

(1976. 7. 15 受付)

文 献

- 1) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 19, 26, 1973.
- 2) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 19, 73, 1973.
- 3) HASEGAWA, Y., S. SUGAWARA & S. TAKEUCHI: *Tohoku J. Agr. Res.*, 25, 67, 1974.
- 4) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 22, 109, 1976.
- 5) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 22, 139, 1976.
- 6) JONES, V. E.: *Immunology*, 16, 589, 1969.
- 7) STECHSCHULTE, D. J. & K. F. AUSTEN: *J. Immunol.* 104, 1052, 1972.
- 8) BISTANY, T. S. & T. B. TOMASI: *Immunochem.*, 7, 453, 1970.
- 9) BAZIN, H., A. BECKERS & P. OUERINJEAN: *Eur. J. Immunol.*, 4, 44, 1974.
- 10) JOSHI, M. S., A. YARON & H. R. LINDNER: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 38, 52, 1970.
- 11) 磯島(晋): 医学のあゆみ, 82, 921, 1972.

Summary

In previous papers¹⁻⁵⁾, an alteration of protein in rat uterine fluid, and physicochemical and immunological analysis of protein components in uterine fluid and serum were studied.

In the present report, it was designed to compare uterine fluid with serum other external secretions for immunoglobulins and other protein components.

PLATE

Fig. 7. Analysis of proteins in serum (A), uterine fluid (B), intestinal fluid (C), and colostrum whey (D) by SDS gel electrophoresis.

2ME, electrophoretic patterns of protein treated with 2-melcaptoethanol.

Fig. 8. Comparison of protein components between uterine fluid, serum, colostrum whey, intestinal fluid and oviduct extract.

UF, uterine fluid; C, colostrum whey; S, serum; IF, intestinal fluid; OE, oviduct extract; AUF, anti-uterine fluid antiserum; AUF+S, AUF absorbed with serum.

Results obtained were as follows:

1. Protein components in serum and colostrum whey fractionated by sephadex-G200 column chromatography, were analyzed by disc electrophoresis and immunoelectrophoresis (Figs. 1~3). Uterine fluid and intestinal fluid (Figs. 4 & 6) were resolved into only two peaks although the fractionation of the uterine fluid protein by the use of sepharose-6B column chromatography obtained several peaks (Fig. 5). Their protein patterns represented the immunoglobulins and specific protein components in each secretions.

2. Physicochemical properties of proteins in serum, uterine fluid, colostrum whey and intestinal fluid were furthermore analyzed by means of SDS gel electrophoresis. Specificity and community of protein components in each secretions were showed in Fig. 7.

3. It was confirmed by immunochemical analysis that some of the specific protein in uterine fluid appeared in other external secretions (Fig. 8).