<原 著>

ヒト肝の酸性Z蛋白の抽出と定量

神坂 和明 平野 正憲 都留 正展 岡野 健一*

要 旨: 肝細胞内の有機陰イオン結合蛋白の1つであるZ蛋白をヒト肝より抽出した。精製により酸性Z蛋白とアルカリ性Z蛋白が存在することを認めた。酸性Z蛋白の分子量は約11,000, 等電点は5.8であった。抗酸性Z蛋白抗体を家兎により作製し、ラジオイムノアッセイ法にて定量すると、1gあたりの肝に0.86mg, 血清中には約38.8ng/ml 存在していた。

索引用語: Z蛋白 リガンディン アルブミン BSP

はじめに

肝細胞内には、種々の有機陰イオンと比較的強い結合を示す acceptor protein(リガンディンおよびZ蛋白)が存在しており、血中におけるアルブミンの役割と同様に肝細胞内への摂取機序に関与するとともに、肝内輸送蛋白として重要な役割をしているものと考えられる。これらの結合蛋白に関しては、動物実験でその生化学的、生理的な面より詳細な検討がおこなわれている^{1,2)}。ラット肝のZ蛋白については、1969年に Levi ら³⁾が低分子の結合蛋白が存在することを報告してZ蛋白と名づけ、また Ketterer ら⁴⁾が1967年にアミノアゾ色素結合蛋白Aとして報告しているが、それ以後多くの検討がなされている。しかしヒトの肝臓における結合蛋白の検討は、現在のところリガンディンに関する報告のみであり⁵⁾、Z蛋白については、その存在、細胞内濃度、有機陰イオンとの結合力についての報告はみられない。我々はヒト肝より、Z蛋白の抽出、精製を試み、若干の知見をえたので報告する。

方 法

ヒト肝よりZ蛋白の抽出

心筋梗塞、大動脈瘤破裂により死亡した剖検肝で6時間以内のものを抽出の目的で-70°Cに貯蔵した。約150gの肝と0.25M 蔗糖-リン酸緩衝液0.01M, pH 7.4でホモゲネートとし、浮遊する脂肪はガラス綿を通過させることで除去した。溶液は日立20PR 型冷凍遠心器にて7,000rpm, 10分間遠心後、沈澱物を除去した。上清はさらに日立65p 型超遠心器にて90分間110,000×g で遠

心し、上清分画をえた。上清は透析膜 (Visking 社) に流入し、約12時間 pH 7.5, 0.01 Mリン酸緩衝液で透析を行ない、DEAE セルロース (Whatman 社) カラム (5×40cm, pH 7.5, 10mM リン酸緩衝液) に添加した。溶出してきた蛋白溶液は分子篩膜 DM 5(Amicon 社) にて加圧濃縮後、BSP 100mg (Sulfo bromophthalein 第一製薬) と共にセファデックス G-75 カラム (Pharmacia Fine Chemicals), (5×90cm, pH 7.4, 10mM リン酸緩衝液) に添加した。BSP と結合した蛋白溶液は分子篩膜で濃縮後、アンフォライン・エレクトロフォーカシングカラム (LKB 社) に添加した。泳動終了後、カラム内溶液は3ml ずつ分取し、その pH (Tōa Dempa Kōgyō HM-5A) と280nm の吸光度 (Hitachi Perkin Elmer 139) を測定した。280nm に吸収をもつ分画は透析膜にて pH 7.4, リン酸緩衝液で24時間透析後、さらにセファデックス G-50 カラム (1×80cm) に添加し、溶出した蛋白は濃縮後冷蔵庫に保存した。

分子量の測定

ゲル濾過はセファデックス G-50 カラム (1×80cm, pH 7.4, 10mM リン酸緩衝液) を使用し、蛋白100~200μg を含有する溶液を10μg の BSP と共に添加した。Standard としてチトクロームC, ミオグロビン (Schwarz/Mann 社) を使用した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は Weber Osborn の方法⁶⁾に従って、0.2% SDS を含むゲルを作製して行った。Standard として卵白アルブミン・キモトリブシンノーゲン, ミオグロビン, チトクロームC (Schwarz/Mann 社) を使用した。

エレクトロフォーカシング

分離用エレクトロフォーカシングは LKB 社8100—

* 東京大学第2内科学教室

<受付日52年12月21日>

1, 110 ml のカラムを使用し、アンフォライン・グラジェントミキサーにて蔗糖濃度勾配 (0~40%) を作製した。キャリアアンフォライトは pH 3.5~10 (3ml) を使用した。泳動は電圧400V で4日間行った。

ゲル・エレクトロフォoresisは Wringleyの方法⁷⁾に従い、約10cm のゲルを作製し、泳動電圧は300V 以下で行った。泳動終了後、ゲルは Malik, Berrie らの方法⁸⁾により染色、脱色を行った。また同時にゲルの一部は2.5mm 間隔に切断し、少量の蒸留水と共に2~3時間インキュベートし、各々の pH を測定した。

アミノ酸分析

精製蛋白の約600 μ g を20時間加熱下でインキュベートし、酸分解を行った後、JLC-6 AH 型アミノ酸分析器にて分析した。

蛍光分析

Hitachi MPF Fluorescence Spectrophotometer により分析した。280nm の励起光により330nm で内因性蛍光を測定した。BSP は低濃度で使用したため、内因性フィルター効果は無視できる範囲であった。

ラジオイムノアッセイ

抗体の作製は家兎に complete Freund Adjuvant と共に約100 μ g の Z 蛋白を皮内に注入し、以後2週間の間隔で4回 Z 蛋白を complete Freund Adjuvant と共に投与した。えられた血清は-40°Cに保存した。

¹²⁵I の標識は以下のごとく行った。精製蛋白10 μ g, 0.5Mリン酸緩衝液 pH 7.4 25 μ l, ¹²⁵I 800 μ Ci およびクロラミンT 75 μ g を加えて、約30秒反応させた後、Na₂S₂O₆ を200 μ g 附加した。遊離¹²⁵I との分離はセファデックス G-25 カラム (1 $\times$ 25cm) で行った。えられた比放射能は約10 μ Ci/ μ g であった。

ラジオイムノアッセイは二抗体法で行った。サンプル100 μ l, 標識蛋白100 μ l, 抗血清 (1,000倍希釈) 100 μ l, 0.5%ウシ血清アルブミンを加えた0.1M 硼酸緩衝液 pH 8.6 200 μ l を12時間、4°Cで反応させた。さらに抗家兎ガンマグロブリン山羊血清 (10倍希釈) と正常家兎血清 (100倍希釈) を各々100 μ l 加え4°C, 12時間反応させた後、2,000g 30分間で遠心し、放射能を測定した。

肝内血管に存在する血清アルブミンの測定

Behringwerke 社の M-パルチゲン-アルブミン板を使用し、正常肝ホモゲネートを7,000rpm で遠心した上清中のアルブミン濃度を測定した。

成 績

Z 蛋白の抽出

超遠心してえられた肝上清を、pH、モル数を調整した DEAE セルロースカラムに添加すると、高濃度のほぼ一峰性を示す蛋白溶液が溶出した。蛋白ピークのやや後方に出現し Z 蛋白を高濃度に含む分画を取り出し、濃縮後 BSP と共にセファデックス G-75 カラムに添加した。BSP の溶出は4峰性を示し、溶出の順に X 蛋白、アルブミン、リガネディン、Z 蛋白の出現する分画に相当し、特に Z 蛋白が存在すると思われる分画には著明な BSP ピークの出現が認められた (Fig. 1)。この分画

Fig. 1 Column chromatogram of Sephadex G-75

を濃縮後、等電点カラム電気泳動に添加すると、終了時には5峰性の蛋白ピークに分離された。等電点の酸性側より蛋白ピーク I~V と名づけると、それぞれ4.1, 4.5, 5.8, 8.7, 9.5の pI を示し、蛋白濃度はODで0.76, 0.74, 0.58, 0.50, 0.93を示した。なおピーク I, II, ピーク IV, Vは分離が悪く、両者間の重複は1回の泳動のみではさけられなかった。ピーク IV, Vに関しては、アンフォライト pH 8.5~10のものを使用して、再度フォーカシングを行うことにより、IV, Vのピークを完全に分離した。各々のピークの蛋白溶液は必要に応じて、セファデックス G-50カラムクロマトグラフィーを行い、contamination を除いた (Fig. 2)。精度の検定は

Fig. 2 Column chromatogram of Sephadex G-50

15% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点ゲル電気泳動で行ったが、いずれも一本のバンドとして染色された。

BSP との結合

カラム等電点電気泳動でえられた各ピークについては、セファデックス G-50カラムを使用して BSP との結合を観察した。ピークⅢおよびピークⅣは BSP との結合が明らかに認められたが、その他のピークは BSP と結合しなかった (Fig. 3)。さらにピークⅢについて

Fig. 3 Column chromatogram of Sephadex G-50

は、蛍光分析にて BSP との結合能を検討した。BSP と蛋白のモル比が1になるまでは内因性蛍光はほぼ直線的に減少を示し、BSP 濃度がさらに増すと蛍光の減少率は明らかに低下した。従って蛋白1モルに BSP 1モルが結合するものと考えられる。

アミノ酸分析

ピークⅡとピークⅢについて検討したが、測定可能であったアミノ酸はO-phos. Ser, Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ileu, Leu, Phe で、 $\mu\text{g}/\text{prot}$ で計算すると、ピークⅢは8.5, 11.4, 3.8, 8.6, 16.7, 6.1, 6.4, 3.0, 9.7, 5.1, n, d, ピークⅡは3.8, 8.4, 8.5, 6.5, 17.9, 6.0, 4.4, 3.9, 7.6, 5.4, 5.5で、Thr, O-phos. Ser, Phe で値が異なっていた。

分子量の測定

セファデックス G-50カラムクロマトグラフィーでは、チトクロームCよりやや後方にピークⅢの蛋白が出現し、分子量は11,700よりやや少なかった。さらに SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったが、同様にチトクロームCの前方に泳動され、片対数表にプロットしてみると約分子量11,000の蛋白でモノマーであることが確かめられた (Fig. 4)。

ピークⅢのラジオイムノアッセイ

抗ピークⅢ抗体を含む家兎血清でピークⅠ～Ⅴまでのラジオイムノアッセイを行ったが、ピークⅢに比較して、Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ, Ⅴの活性は1%以下であり、従ってビ

Fig. 4 The molecular weight of peak Ⅲ, was compared with different polypeptides with their electrophoretic mobilities.

●: Z protein

ークⅢの蛋白は他のピークの蛋白と異なるものと考えられる。

剖検非肝疾患肝IgあたりのピークⅢの濃度をラジオイムノアッセイで測定すると、 $0.86 \pm 0.07(\text{SD}) \text{ mg}$ 存在していた。なお正常血清13検体の値を測定したが、 $38.8 \pm 15.1(\text{SD}) \text{ ng/ml}$ と血清中にはごく少量しか存在していなかった。

肝内の血管に存在するアルブミン濃度

剖検非肝疾患肝Igあたりのアルブミン濃度をバルチゲンにて測定すると、3.1, 3.8, 3.4, 平均3.4mg 存在していた。

考 案

肝細胞内には有機陰イオンと結合する acceptor 蛋白の存在が以前より示唆されていたが、Z蛋白に関しては Ketterer⁴⁾, Levi³⁾ らによりその存在が明らかとなった。この蛋白は分子量12,000～14,000のモノマーで、酸性の等電点を有している。蛋白と結合する有機陰イオンとしては、ビリルビン、BSP、ICG、脂肪酸、エストラジオール、サイロキシン、胆汁酸などがあり^{9,10)}、特に脂肪酸との結合力が強いことが知られている。Mishkin らは、種々の脂肪酸との結合を観察し、特にオレイン酸、パルミチン酸などと強く結合し、Z蛋白の存在は肝のみならず、心筋、骨格筋、小腸粘膜、脂肪組織、腎などにも分布していると述べている¹¹⁾。また Ockner らは1972年に小腸粘膜に脂肪酸結合蛋白を見出し、この蛋白が肝のZ蛋白と同一のものであること、また小腸、肝では脂肪酸のエステル化に関与していることを認めている¹²⁾。

今回の我々の検討は、Z蛋白が肝上清中に存在し、しかもビリルビン、BSP との結合力はリガンドに劣らないことがラット肝Z蛋白で証明されており¹⁰⁾、脂肪

酸のエステル化の作用以外にも有機陰イオンの肝細胞内摂取、輸送に関与しているのではないかということで、細胞内のZ蛋白量を調べた。有機陰イオンの sinusoid 膜での摂取機序はエネルギーを必要としない受動担体輸送であり、従って細胞内外の結合蛋白と有機陰イオンの結合が問題となってくる。細胞内外の結合蛋白量を比較すると、細胞外のアルブミンは3.4mg/g 肝臓、細胞内のリガンディン量は1.36mg/g 肝臓¹³⁾、Z蛋白は0.86mg/g 肝臓であり、今回は検討していないアルカリ性Z蛋白(ピークIV)を加味すれば、細胞内外の結合蛋白量はほぼ同程度といえる。正常と比較して低アルブミン血症の症例ではBSPの肝への摂取が明らかに速くなることなどを考慮すれば¹⁴⁾、細胞内に大量に存在する結合蛋白の意義は、膜面より有機陰イオンを遊離させ、また内膜面への再附着を阻害することにより、細胞内への摂取を促進するものと推定される。

ま と め

ヒト肝上清より酸性Z蛋白を抽出した。この蛋白の抗体を家兎で作り、ラジオイムノアッセイ法で定量してみると0.86mg/g 肝存在し、リガンディン量とほぼ同程度の濃度で存在することがわかった。

* アミノ酸分析には協和醗酵 K.K., ラジオイムノアッセイにはダイナボット・ラジオアイソトープ研究所関口潔氏らの協力を得たことに感謝いたします。

** 本稿の一部は第12回日本肝臓病学会東部会シンポジウムにて発表した。

文 献

- 1) Fleischner, G. & Arias, I.M.: Structure and Function of ligandin and Z protein. In: Progress in liver diseases, ed. Popper, H. & Schaffner, F., Grune & Stratton Inc. N.Y. p.176, 1976.
- 2) 神坂和明: ビリルビンその他の有機陰イオンの肝における摂取機序. 肝臓病学の進歩, 2: 1—8, 1976.
- 3) Levi, A.J. et al.: Two hepatic cytoplasmic protein fraction, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, BSP and other anions. J. Clin. Invest., 48: 2156—2167, 1969.
- 4) Ketterer, B. et al.: The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rat given 4-dime thylaminoazobenzene. Biochem. J., 103: 316—324, 1967.
- 5) Kamisaka, K., Habig, W. et al.: Multiple forms of human glutathione S-transferases and their affinity for bilirubin. European J. Biochem. 60: 153—161, 1975.
- 6) Weber, K. & Osborn, M.: The Reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244: 4406, 1969.
- 7) Wringley, C.W.: Gel electrophoresis. In enzyme purification and related techniques. ed. Jakoby, W., Methods Enzymol, 22: 559, 1972.
- 8) Malik, N. & Berrie, A.: New stain fixative for proteins separated by gel isoelectric focusing based on Coomassie Brilliant Blue. Anal. Biochem., 49: 173—6, 1972.
- 9) Ketterer, B., Tipping, E. et al.: A low molecular weight protein from rat liver that resembles ligandin and its binding properties. Biochem. J., 155: 511—529, 1976.
- 10) Kamisaka, K., Listowsky, I. et al.: Circular dichroism analysis of the secondary structure of Z protein and its complexes with bilirubin and other organic anions. Biochem. Biophys. Acta, 393: 24, 1975.
- 11) Mishkin, S., Stein, L. et al.: The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: Binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun, 47: 997—1003, 1972.
- 12) Ockner, R.K. & Manning, J.A.: Fatty acid binding protein in small intestine. Identification, isolation and evidence for its role in cellular fatty acid transport. J. Clin. Invest., 54: 326—338, 1974.
- 13) Fleischner, G., Kamisaka, K. et al.: Human ligandin: Characterization and quantitation. Am. J. Gastroenterol, 69: 821, 1975.
- 14) 八辻行信, 平野正憲他: BSP, ICG 結合血清蛋白の検討およびその臨床的意義: 肝臓, 16: 763—769, 1975.

Purification and Quantitation of Acidic Z Protein from Human Liver

**Kazuaki KAMISAKA, Masanori HIRANO, Masanobu TSURU and
Kenichi OKANO***

Purification of Z protein from human liver is described. On the purification step, acidic and basic organic anion binding protein are separated. The acidic Z protein has a molecular weight of approximately 11,000 dalton and isoelectric point of about 5.8. Using anti-acidic Z protein antibody and radioimmunoassay method, quantitation of acidic Z protein in the normal liver is performed. 1 g of normal liver contains 0.86 mg and normal human sera contain 38.8 ± 15.1 (SD) of acidic Z protein.

* The Second Department of Internal Medicine, University of Tokyo (Tokyo)