尿蛋白質の研究(第2報)

Bence-Jones 蛋白尿の熱変性に関する 超遠心分析による検討*

只 野 寿太郎**

Summary

Although Bence-Jones proteins are characterized by the property of precipitating on heating at 44–60°C and of redissolving on boiling, the factors governing this unusual solubility behavior have never been defined quantitatively, nor has the phenomenon been satisfactorily explained.

Measurements of the property of precipitating phenomena at high temperatures have been performed by Putnam with various optical instruments.

An ultracentrifugal study of the molecular size and shape changes occurring in Bence-Jones proteins in the temperatures ranging 30–100°C has become possible only with a reliable high temperature accessory to the analytical ultracentrifuge. This report describes the ultracentrifugal analysis of heat denaturations of Bence-Jones protein in solution at 30–100°C. The results obtained are as follows.

- 1) The Bence-Jones protein forms unstable rapidly sedimenting boundaries above a critical temperature of 60°C, and the sedimentation coefficient could not be obtained.
- 2) Molecular aggregation occurred when the solution of Bence-Jones protein was heated above 60°C and various types of aggregation products were suspected.
- 3) The method was found to be not satisfactory for the study of heat denaturation of the urinary Bence-Jones protein in this temperature range.
- 4) The technical problems associated with this study were discussed.

緒 言

Bence-Jones 蛋白質(以下 B-J 蛋白質)は44～60°C 加温で白濁, 沈殿し 100°C で再溶解する性質があるが, この現象の機序の明確な説明はない. 1944年 Jacobson ら¹⁾が, また1959年には Putnam ら²⁾が光学的手段で熱溶解性の変化と蛋白の種類, 蛋白濃度, pH 依存性, 電解質の濃度, 反応時間などとの関係を詳細に検討し, B-J 蛋白質を0.5g/dl 以上含む pH 4.9, イオン強度0.1 の溶媒を60°Cに加熱した時に最も強い白濁, 沈殿が見られると報告した. またこの蛋白質は 100°C で沈殿が再溶解する性質もあり, 現在日常検査室では「44～60°Cで白濁, 沈殿, 100°C で再溶解する現象」の観察が定性試験として広く行なわれている. この実験の目的は B-J

蛋白尿よりできるだけ混在する蛋白質を除いた試料を Putnam ら²⁾の提出した条件にあわせて調製し, 加温による溶解性の変化を超遠心分析的に捉えようとしたものである.

実 験 方 法

1. 試料の調製

臨床的に多発性骨髄腫とされた1名の患者より約5l の蛋白尿を得た.

この尿を成書³⁾に記載されている B-J 蛋白質の検出法で検査した. このあと全部の尿を流水で24時間透析しコロジオンバッグで蛋白濃度約 2g/dl 迄濃縮した. 濃縮試料は Sephadex G-75 カラムを用いる Snapper ら⁴⁾の方法で出来るかぎり alb を除去し, 再び 1/15M, pH 7.4

* Studies on urinary proteins, II. Ultracentrifugal studies on Bence-Jones protein at elevated temperatures.

** Jutarō Tadano, 順天堂大学医学部臨床病理学教室.

(78) 生物物理化学

のリン酸緩衝液で透析し実験試料とした。

2. Sephadex G-200 による薄層ゲル濾過

Sephadex G-200 による薄層ゲル濾過を患者血清と濃縮実験試料で行ない、同時に流したヒト alb, ヒト γ -glob との相対的位置関係から検量線を作製し試料中の B-J 蛋白質の分子量を推定した。

3. 免疫電気泳動

抗 Lambda, 抗 Kappa を用い実験試料の抗原性を検討した。

4. 超遠心分析

実験試料を酢酸緩衝液で蛋白濃度 0.5g/dl, pH 4.9 に調整した。分析用超遠心機は日立 282 型加熱用超遠心機を用い、回転数 60,000, シュリーレン角度 70°, 耐熱チタンローターを使用し分析した。分析温度は 30°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C で試料の加熱はローター中にセルをセットしたままで行なった。運転はローター中のセルが所定の温度に達した後 10 分間放置してから行なった。シュリーレン図形は一定の時間間隔で撮影したが、回転を始めてから所定の回転数 (60,000 回転) に達した時を 0 分とし第 1 回目のシュリーレン図形を撮影した。

5. シュリーレン図形の解析

沈降係数の算定は Schachaman の方法⁷⁾ に準じたが、シャープなピークが得られないものはシュリーレン図形より試料中の物質の不均一性の推定をした。

結 果

試料の分析結果は Fig. 1. および Fig. 2. に示した。Sephadex G-200 による薄層ゲル濾過法では血清中に 4S alb 分画より小さな蛋白が検出された。実験試料尿では 2 個のスポットが見られ、ヒト alb, ヒト γ -glob との相対的位置関係からみて 4S よりやや小さな蛋白と約 2S と推定される蛋白が混在することがわかった。

特異抗血清での検索では B-J の Lambda 型であった。超遠心分析の結果は Fig. 3. にまとめた。シュリーレンパターンは時間の経過と共に急速に平坦化し沈降係数は 30°C, 80°C, 100°C 加熱処理の試料でのみ算定され、30°C で $S_{20,w}$ = 3.6, 80°C で 4.2, 100°C で 4.1 であった。他の温度処理のものは 2 峰性のパターンを示したが 3~9 分後にはいずれも左右不対称のパターンとなり沈降係数の算定は出来なかった。また 60°C 以上の実験では運転後に急速に移動するピークを認めているが、いずれも 1 分以内に消失してしまいシュリーレン図形の撮影はできなかった。

Fig. 1. Thin layer gel filtration (Sephadex G-200) patterns of pathologic sera (upper) and urine (lower).

Fig. 2. Immunoelectrophoretic pattern of pathologic urine by specific anti-sera.

Upper : Anti-Kappa type
Lower : Anti-Lambda type

Fig. 3. Ultracentrifugation patterns of Bence-Jones protein in 0.1 ionic strength buffer, pH 4.9, at elevated temperatures.

考 察

日常検査室で利用されている B-J 蛋白質の熱溶解性の機序を超遠心分析的に捉える試みは、この実験結果からは明らかにできなかった。Putnam ら²⁾は pH 5.0 の溶媒中で B-J 蛋白質を加温するとその 80% は 2 分以内に沈殿し、以後 120 分以上観察しても沈殿量は増加しないと報告した。つまり B-J 蛋白質は加温とほぼ同時に肉眼的に白濁、沈殿する蛋白質と反応にあずからなかった蛋白質に分れ、両者の混合比で白濁、沈殿の程度が決まる。このような反応と時間的経過の関係を超遠心分析法でとらえる場合、Gilbert ら³⁾の沈降界面の数や沈降速度が反応の性質や種類に依存することを示す理論式がある。この式は B-J 蛋白質の熱溶解性の変化を「単一物質の会合・解離反応」と仮定すれば使うが、実際には異性化反応や混在する他の蛋白質による 2 成分系の会合・解離反応がおきていないという保証はなく、この理論式は適用できない。また反応の解析には時間的経過と共に反応生成物の形成過程を見なければならぬが、本実験で使用した加熱型超遠心機は、ローター中にセットされた試料を一定温度に加熱する迄に 10 分以上かかり、時間的経過を追って反応を見ることが出来なかった。

沈降係数の算定に関しても所定の回転数に達する迄に白濁の原因とみられる蛋白塊は沈降してしまい、また 30℃, 80℃, 100℃ 以外のものではシュリーレン図形のピークがシャープでなく算定不能であった。このように著しく分子量の異なる溶質を含む試料の実験でどのような分子量の蛋白質が形成されるか不明であるのに 60,000 回転という一定の回転数を用いざるをえなかったことに問題があった。沈降係数が算定できた 30℃, 80℃, 100℃ の実験で、いずれも $S_{20,w} = 3.6 \sim 4.2$ という値が得られたが、これは加熱処理で aggregate しなかった蛋白質であろう。事実、Warner ら⁴⁾は加熱処理した蛋白溶液中には、生の蛋白質、加熱処理に抵抗性のあるもの、変性をうけるが aggregate しないもの、2 種類の aggregate したものの 5 種類が存在すると報告したが、B-J 蛋白溶液でも同様のことが起っており、このうち超遠心分析的にとらえ得たのは aggregate しなかったものだけと考えられる。

実験で得られたシュリーレン図形からは溶媒中に不均一な溶質が混在することが推定される。すなわちシュリーレン図形が独立したピークとなるためには、各溶質間の沈降速度に差のある場合で混合成分間の沈降速度が近接していると成分ごとの独立したピークを示さず、この実験でえられたようにおり重なって幅広いひとつのパ

ーンとなる。このようなパターンを構成する成分の沈降係数の分布状態を求める場合は Gralen ら⁵⁾の「沈降界面の広がり効果より不均一性の推定」をする方法、Singer-Gross ら⁶⁾の「沈降係数分布曲線への変換」の方法、あるいは Williams ら⁷⁾の「沈降界面の形状の解析理論式」などがあるが、いずれも連続した沈降係数の算定が必要でこの実験のデータにはあてはまらない。

以上述べたごとく超遠心分析法による沈降速度の測定は高分子の混合溶液の分析に最も有力なもののひとつとされているが、本実験の目的には限界があったことを認めねばならない。B-J 蛋白質の場合は

- 1) 熱溶解性の変化が加熱温度、時間により差がある、
- 2) 加熱した B-J 蛋白溶液中には肉眼で認められる程大形の aggregate した蛋白質から全く変性を受けないものまで混在している、
- 3) 加熱変性した蛋白質間の相互作用が沈降図形におよぼす影響の解析が出来なかった点、
- 4) また分析機の性能からいえばローターの温度調節や回転数が熱溶解性の変化をとらえ得る程フレキシブルでなかった点、

が本実験の結果をより不明確にしたと考えた。

結 論

B-J 蛋白尿を用い熱溶解性の変化を超遠心分析的に解明する目的で実験を行なった。

- 1) 熱溶解性の変化は加熱中の条件に大きく影響され、本実験で用いた超遠心機では変化をとらえきれなかった。
- 2) 白濁、沈殿を起した B-J 蛋白溶液中には肉眼で観察される程巨大な蛋白塊から未反応のものまで混在し各分画の分離ができなかった。
- 3) 変性を受けた蛋白質間の相互作用が沈降図形におよぼす影響は不明であった。
- 4) 高分子化合物の分析に有力な手段である超遠心分析もこのような実験には限界がある。

文 献

- 1) Jacobson, B. M. et al: The detection of urinary Bence-Jones protein. *Am. J. Clin. Path.* **14**, 138-149 (1944).
- 2) Putnam, F. W. et al: The heat precipitation of Bence-Jones protein. *Arch. Biochem and Biophys.* **83**, 115-130 (1959).
- 3) Davidsohn and Henry: *Clinical diagnosis by laboratory methods*. 14th edition W. B. Saunders, Philadelphia 48-49 (1969).
- 4) Snapper, I. et al: Separation of albnmin from Bence-Jones protein by filtration through

(80) 生物物理化学

- Sephadex G-75. Am. J. Med. **38**, 405-408 (1965).
- 5) Gilbert, G. A. : Ultracentrifugal analysis in theory and experiment. Academic Press, New York, 73-75 (1963).
- 6) Warner, R. C. et al. : Denaturation of bovine plasma albumin. J. Am. Chem. Soc. **8**, 5735-5744 (1958).
- 7) Schachaman, H. K. : Ultracentrifugation in biochemistry. Academic Press, New York, 131-134 (1959).
- 8) Williams, J. W. et al. : Boundary spreading in sedimentation velocity experiments. J. Am. Chem. Soc. **74**, 1542-1547 (1952).