SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による尿蛋白分画

I. 基礎的検討と正常および各種腎疾患の蛋白分画*

佐野紀代子・金森きよ子・間中 純子

長 裕子・蓮沼 紀子・保崎 清人**

Summary

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis was applied to fractionation of urine protein. Basic examinations on pretreatment of urine sample, gel concentration, reducing process and electrophoresis were carried out and their optimal conditions were described.

By this method, 8 bands were detected in normal urine and 21 bands in abnormal urine. The molecular weight of these proteins was presumed to range from 250,000 to 10,000.

Key words: SDS polyacrylamide gel electrophoresis, urinary protein.

緒 言

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以下 SDS-PAGE と略記する）は、生化学の各領域で盛んに用いられる特徴ある方法で、Shapiro ら¹⁾により初めて報告された。本法は操作が簡便であるだけでなく、概略分子量の決定も可能であるため、筆者ら^{2~4)}や Hayes ら⁵⁾により、体液蛋白の分析にも利用されている。本法はすでに尿蛋白の分析にも用いられているが、それらの報告^{6~8)}は本法の特徴を十分活用しているとはいえない。筆者らは本法による血清蛋白分画法を確立する際、泳動に関する諸条件の検討を詳細に行なったデータ^{2~4)}をもとに、一部改良して尿蛋白分析用の方法を考案した。

尿蛋白の分析は、いうまでもなく腎障害を知るうえで重要な検査法の1つである。そのためには対照とすべき正常尿蛋白の分析が必要である。本報告では、SDS-PAGE による尿蛋白分析のための測定条件の検討と合わせて、正常尿蛋白の分析結果について記述した。

実験材料および方法

1. 材 料

被検尿は正常尿、蛋白尿、糖尿、血尿、そして顕微鏡

的所見で異常が認められなかった東京医科歯科大学の職員及び学生の1日蓄尿、および同大学附属病院の外来、入院患者の1日蓄尿を用いた。

2. 試 薬

アクリルアミドは生化学工業、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、N,N,N',N'-テトラエチレンメチレンジアミン、2-メルカプトエタノールは東京化成、SDS は日本理化学、アミドブラック10B はメルクの製品を用いた。分子量を推定するための牛アルブミンはアーマー、フォスフォリラーゼ a、カタラーゼ、ピルベートキナーゼ、キモトリプシンノーゲン、チトクローム C はベーリンガーマンハイムの製品を用いた。ミオシンは順天堂大学医学部生化学教室より贈与されたものを用いた。他の試薬は和光純薬、小宗化学の製品を用いた。

3. 方 法

1) 尿蛋白の測定

正常尿は Saifer ら⁹⁾の方法、疾患尿はスルフォサリチル酸による比濁法によった。

2) 尿の前処理

蛋白濃度が 150 mg/dl になるように、原尿を希釈または濃縮を行なった。濃縮は、4℃ の条件下 Visking tube に尿を入れ、2 時間攪拌しながら蒸留水で透析後、30%カーボワックス溶液中で濃縮する方法によつ

* Application of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis to fractionation of urine protein. I. Basic examination of the method and protein fractions of normal and diseased urine.

** Kiyoko Sano, Kiyoko Kanamori, Junko Manaka, Hiroko Cho, Noriko Hasunuma, Seijin Hosaki, 東京医科歯科大学医学部附属病院検査部生化学。
(受付 1977年 3月11日)

た。

尿(蛋白濃度は150 mg/dl) 0.2 ml は、3% SDS を含む 0.030 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.1 ml に混じた後、2-メルカプトエタノール 0.012 ml を加え、37℃、2時間還元を行なった。

3) 泳動用ゲルの調製

ゲル濃度は7.5%を用い、Weber ら¹⁰⁾の方法によった。ミツミ科学産業製のディスク電気泳動装置を用い、ガラス管は内径5 mm、長さ100 mm のものを使用した。

4) 試料の調製

尿の前処理液にグリセリン 0.02 ml, 0.01% BPB 液 0.01 ml を加え良く混合した。各ゲル管にはその0.15 ml を負荷した。

5) 電気泳動

Weber ら¹⁰⁾の方法によった。1管当たり8 mA の条件で行ない、色素帯が $\frac{3}{4}$ 移動するのに、約3時間半を要した。

6) 染色、脱色

取り出したゲルは、各々試験管(内径12×長さ150 mm)に入れて、7%酢酸液に溶解した1%アミドブラック10B液を10 ml 加え、沸騰水浴中で1時間加温して染色した。染色液を別の容器に移しかえた後、試験管に7%酢酸液を入れ、37℃の恒温槽中で、時々液をとりかえながらゲルの脱色を行なった。

7) 分子量の決定

分子量の決定はWeber ら¹⁰⁾の方法に従った。

8) 定量

泳動像は、富士理研のFDA IV型デンスitomーターで600 nm のフィルターを用いてスキャンした。

結 果

1. 泳動に関する基礎的検討

1) ゲル濃度

5%および7.5%ゲル濃度における泳動像を比較するため、蛋白濃度370 mg/dl の慢性腎炎疾患尿、80 mg/dl の悪性高血圧症疾患尿の2例について泳動を行なった。

Fig. 1 のごとくいずれの試料でも、5%ゲルにくらべ7.5%ゲルの方がより明確に分画された。このことから以後の尿の分析には7.5%ゲルを用いた。

2) 還元剤

2-メルカプトエタノールの濃度を、0, 5, 10%と変化させ、37℃、2時間の還元条件のもとに2-メルカプトエタノールの濃度による泳動像の比較を行なった。

A-1 A-2 B-1 B-2

Fig. 1. Electrophoretic patterns of urine proteins in different gel concentration.

A-1: 5%, A-2: 7.5%.

Sample A: chronic nephritis (370 mg/dl).

B-1: 5%, B-2: 7.5%.

Sample B: malignant hypertension (80 mg/dl).

Fig. 2 に示したが、0%ではごく少量であるがゲル内に入りこめない蛋白がみられ、またBPBに対する相対易動度0.15のところ数本のバンドがみられ、これは5, 10%とは異なった泳動像を示した。一方、5%と10%では全く同一の泳動像を示した。このことから、5%, 10%のいずれでも良いと考えられ、本報告では特に断わらないかぎり5%濃度を用いた。

2. 尿蛋白分析に関する検討

1) 日内変動

疾患尿では薬剤などの因子が考えられるので、正常人の1日蓄尿と、夜間尿(23時から7時までの尿)、昼間尿(7時から15時までの尿)のそれぞれ8時間尿について、各々約50倍に濃縮後、尿蛋白バンドの変動をみた。2例について、夜間尿、昼間尿、1日蓄尿の蛋白分画を比較したところ、Fig. 3 のごとく相対易動度のバンドが共通して出現した以外は、各蛋白バンドの濃度差のみならず、出現するバンドの数も異なることから、1日蓄尿した尿を用いることとした。

Fig. 2. Electrophoretic patterns of urine proteins treated with different concentration of 2-mercaptoethanol.

1: 10%, 2: 5%, 3: 0%.

Sample: nephrotic syndrome (280 mg/dl).

2) 日差変動

日差変動をみるため、正常人5例で1日蓄尿を3日続けて行ない、泳動像を観察した。1例を除いて、出現するバンドの数には変わりなかったが、各バンドの濃度差は若干みられた。

3) 保存条件

1日蓄尿した尿を用いるためには、尿をためる間は室温に放置しなくてはならない。そのため1日放置による蛋白分画の変動をみた。450 mg/dl, 1,210 mg/dl, 850 mg/dlの蛋白濃度を有する3例の疾患尿につき検討した。尿を採取後ただちに泳動を行なったもの、さらにその尿に防腐剤を添加しないで1日室温放置後泳動を行なったものの両者の泳動像を比較した。Fig. 4のごとく、1, 2の症例については変化が認められなかったが、3の症例においては蛋白バンドの易動度に変化が認められた。そのため蓄尿時に0.01%の割合でメロサールを加えることを原則とした。

Fig. 3. Within-day variation of protein fractions in normal urine.

A-1: 24 hrs stock urine.

A-2: urine at daytime.

A-3: urine at night.

Sample A: normal (20.8 mg/dl).

B-1: 24 hrs stock urine.

B-2: urine at daytime.

B-3: urine at night.

Sample B: normal (8.5 mg/dl).

3. 尿蛋白泳動像

1) 正常尿蛋白濃度

正常人尿蛋白は、スルフォサリチル酸法では検出できない濃度であるため、尿蛋白を過塩素酸-アセトン混液で沈殿させ、沈殿物を10%水酸化ナトリウム液で溶解後、ローリー試薬で蛋白を発色させる Saifer ら⁹⁾の方法によった。正常尿21例について行なったところ、平均12.7 mg/dlで4.3から30.5 mg/dlの範囲であった。50~100 mg/dlの蛋白濃度をもつ尿10例につき、Saifer らの方法とスルフォサリチル酸による比濁法との値を比較したところ、Saifer らの方法が平均約2倍高い値を示した。そのため正常尿はSaifer らの方法で測定後、比濁法で150 mg/dlになるよう濃縮率をきめた。蛋白濃度の低いもので約50倍、平均24倍の濃

Fig. 4. Effect of storage on electrophoretic patterns of urine protein.

A-1 : fresh urine, A-2 : after one day.
Sample A : chronic nephritis (450 mg/dl).
B-1 : fresh urine, B-2 : after one day.
Sample B : lupus nephritis (1210 mg/dl).
C-1 : fresh urine, C-2 : after one day.
Sample C : nephrotic syndrome (850 mg/dl).

縮を必要とした。

2) 正常尿および各種腎疾患尿の蛋白分画

正常 21 例, ネフローゼ症候群 25 例, 慢性腎不全 36 例, 慢性腎不全(人工透析中) 7 例, SLE 6 例, 糖尿病性腎症 3 例, 骨髄腫 2 例, 計 100 例の尿蛋白分析を行った。その結果 Table 1-1 のごとく分子量 250,000 から 10,000 まで 21 の蛋白バンドが出現した。

正常では 8 つのバンドが出現した。しかし 8 つのバンドがいつも出現するのではなく, Table 1-2 に各バンドの出現頻度をパーセントで示したが, 100% 出現するのは, 分子量 13,000 のバンドのみであり, ついで, 94,000 のバンドが 95% の出現率であった。

一方各種腎疾患尿では, 多彩な泳動像を示した。本報告では出現する各バンドの出現頻度パーセントのみを Table 1-2 に示した。

Table 1-1. Apparant molecular weight of individual urine protein fraction by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Band No.	Relative mobility (BPB)	Molecular weight ($\times 10^3$)
1	0.06	250
2	0.11	180
3	0.12	170
4	0.14	165
5	0.16	145
6	0.18	130
7	0.19	125
8	0.23	110
9	0.28	94
10	0.33	84
11	0.39	71
12	0.46	60
13	0.51	52
14	0.55	47
15	0.63	37
16	0.69	32
17	0.73	20
18	0.82	23
19	0.98	15
20	1.03	13
21	1.15	10

考 察

まず筆者らは, SDS-PAGE による人血清蛋白分画法を確立する際の泳動に関する諸条件の検討を行なった。²⁾ すなわち, ゲル濃度に関する直線性は 9 種の既知蛋白を用いて検討した結果, 5% ゲルで 220,000 から 14,000 まで直線性があり, 7.5% では 94,000 以上では直線性がなくなること, 定量性に関しては, 1% アミドブラック 10B 液, 沸騰水浴 1 時間染色が 0.2~100 μ g まで定量性があること, 2-メルカプトエタノールを還元剤とすると, 5% 濃度で 37°C, 2 時間の還元が適当であることがわかった。この条件は尿蛋白を分析する際, 多少修正する必要がある。染色条件はそのまま採用することとし, ゲル濃度及び 2-メルカプトエタノールの濃度などについて検討した。

Fig. 1 の泳動像で, 1 番高濃度のバンドは, 分子量 71,000 でバンド 11 に相当する。尿蛋白では, それ以下の低分子の蛋白が多く存在するため, 低分子蛋白の分離がよい 7.5% ゲルを採用した。但し 7.5% を用いると分子量 94,000 以上になると直線性がなくなるため, 94,000 以

Table 1-2. Frequency of apparance of individual urine protein fraction in normal subjects and various renal diseases.

Band No.	Normal	Nephrotic syndrome	CRI* ¹	CRI* ¹ (hemodialysis)	SLE* ²	Diabetic nephropathy	Myeloma
1	0	4	0	0	0	0	50
2	0	16	19	0	33	67	0
3	0	8	0	0	0	33	50
4	0	20	38	0	0	0	0
5	0	84	86	86	83	100	0
6	0	52	33	0	33	67	50
7	0	12	0	0	0	6	50
8	0	80	86	86	83	100	100
9	95	92	94	100	100	100	100
10	40	100	100	100	100	100	100
11	81	100	100	100	100	100	100
12	0	100	100	100	100	100	50
13	71	84	72	71	83	100	100
14	0	44	37	43	81	0	100
15	43	56	33	100	50	100	50
16	0	20	0	14	33	33	0
17	57	88	86	100	83	100	100
18	50	20	6	100	17	67	100
19	0	8	19	57	33	0	50
20	100	24	17	43	17	33	100
21	0	0	0	0	0	0	50

*¹ CRI : chronic renal insufficiency.*² SLE : systemic lupus erytematosus.

上の蛋白に関しては、正確な分子量ではなく推定分子量として算出した。

蛋白濃度は血清に準じて、一管当り 100 μ g とした。そのためには 150 mg/dl の蛋白濃度を必要とするため、それ以下の蛋白濃度の検体は、150 mg/dl になるよう濃縮を行なった。また、150 mg/dl 以上の尿については透析による泳動像への影響をみたが、5 例中全例とも泳動パターンの変化、または易動度の違いがみられなかったので、150 mg/dl 以上の尿は透析せずに原尿のまま泳動の試料とした。

Boesken ら⁷⁾は、尿細管性蛋白尿(分子量60,000以下)であるか、糸球体性蛋白尿(分子量70,000以上)であるかを分子量の相異から判断するため、SDS-PAGE で 2-メルカプトエタノールで還元しない試料を用い泳動を行なっている。蛋白はサブユニットに分れないため、68,000 の alb を中心とし、泳動像から一見して分子量の推定が可能であるようにみえる。しかし、これに関して筆者らは次の点で反論したい。① S-S 結合を切らないものは、

蛋白と SDS の結合が十分でない可能性がある。②蓄尿の間に自然酸化されて、S-S 結合が生じ、蛋白の重合がおこる可能性がある。従って、2-メルカプトエタノールで還元しないで得たデータから臨床的意義を見出すのは危険であると考え、5%のメルカプトエタノールで、37℃、2時間還元することとした。

正常人における尿蛋白バンドの日内における変動をみたところ、夜間、昼間ではバンドの出現本数、濃度比が異なっていた。このことから1日蓄尿を用いた方がよいと考えた。また、個人間の蛋白分画の日差変動はほとんどなかった。1日蓄尿を試料とする時、放置時に尿中に存在するプロテアーゼによる分解が考えられる。事実3例中1例、蛋白バンドに変化が認められたことから、蓄尿時0.01%の割合でチメロサルを入れることを原則とした。やむをえない場合は4℃下で蓄尿を行なった。これらの条件下ではいずれも蛋白バンドに変化がみられなかった。

Saifer ら⁹⁾の方法により正常尿蛋白を測定したところ、

(232) 生物物理化学

平均 12.7 mg/dl であった。本法はスルフォサリチル酸による比濁法より感度が高く、蛋白濃度 10 mg/dl 以下の測定が可能である。しかし、両法を比較したところ、Saifer らの方法が約 2 倍高い値を示した。

正常尿では、蛋白濃度の低い検体は約 50 倍、平均 24 倍の濃縮を必要とした。50 倍以上に濃縮すると、粘度が高くなり尿の採取ができなくなるので、最高 50 倍としそれ以上の濃縮を必要とする時は、負荷する試料の量を多くすることによってこれに代えた。

本法によると正常尿蛋白バンドは 8 つに分画された。各種腎疾患尿ではかなり多彩な泳動像を示すことから、質的、量的に尿蛋白分画の変動を追跡することは臨床的意義があると思われた。

結 語

SDS-PAGE により尿蛋白分画のための基礎的検討を行ない、正常及び各種腎疾患の蛋白分析を行なったところ次の結論を得た。

1. ゲル濃度は 7.5% を用い、試料は 37°C、2 時間還元を行なった。
2. 本法によると蛋白濃度が 150 mg/dl あれば十分で、また 0.2 ml の少量で分析可能となった。
3. 正常尿では 8 つの蛋白バンドが出現し、各種腎疾患尿でのみ出現するバンドを加えると 21 に分画された。

4. 出現した蛋白の推定分子量は、250,000 から 10,000 の範囲であった。

この研究の一部は第 26 回電気泳動学会総会で報告した。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました東京医科歯科大学医学部生化学中尾 真教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Shapiro, A. L. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **28** : 815, 1967.
- 2) 佐野紀代子 : お茶の水医学雑誌, **23** : 117, 1975.
- 3) 佐野紀代子 : お茶の水医学雑誌, **23** : 123, 1975.
- 4) 佐野紀代子 : お茶の水医学雑誌, **23** : 133, 1975.
- 5) Hayes, L. C., et al. : Clin. Chim. Acta, **66** : 119, 1976.
- 6) Pesce, A. J. et al. : Clin. Chim. Acta, **40** : 27, 1972.
- 7) Boesken, W. et al. : Clin. Nephrology, **1** : 311, 1973.
- 8) 福原吉典等 : 生物物理化学, **18** : 225, 1974.
- 9) Saifer, A. and Gerstenfeld. S. : Clin. Chem., **10** : 321, 1964.
- 10) Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem., **244** : 4406, 1969.