C-反応性蛋白 (CRP) の免学的研究, 第1報*

— CRP の精製とその結晶化* —

野又康博・佐久間実孝・曲山実男・平岡謙一**

Summary

Purified method of CRP in large scale and physicochemical properties of purified CRP were studied.

Human CRP was isolated from pleural and ascitic fluids using procedure as follows; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, DEAE-cellulose (DE-52), and gel-filtration (Sephacryl S-200).

A single protein band was observed on disc electrophoresis and on immunoelectrophoresis suggested pure that CRP was isolated by the above procedure. It was found that the purified CRP was crystallized with ease in the process of concentration by ultra-filtration. On analytical ultracentrifugation, purified CRP was found to be 7.38 Sw_{20} .

From amino acid analysis, it was determined that amino acid components of this purified CRP agrees with the result reported by Edelman et al.

Specific antibody activity of antiserum obtained from rabbits immunized by the purified CRP was confirmed by immunoelectrophoresis.

Key words: CRP, purification, crystallization, property.

C-反応性蛋白 (CRP) は、古くから急性相反応蛋白の1種として広く研究され、臨床的な意義づけがなされてきた。

CRP の精製方法は広く研究され、¹⁻⁶⁾ 蛋白化学的性状についても種々のことが報告されている。すなわち CRP は分子量 21,500 の同一のサブユニット5~6個よりなり、それが円型に結合し、⁷⁾サブユニットのアミノ酸配列の決定により、⁸⁾その構造の一部はアミロイド成分および補体の $\text{C}_{3\text{t}}$ に似ていることなどが明らかにされてきた。

CRP 様物質はヒト以外の動物の血流中にも存在が認められ、構造および性状はヒトの CRP に似ていることも明らかにされた。⁹⁾

CRP の生物学的機能については、補体系の活性化を有すること、¹⁰⁻¹²⁾ 血小板凝集抑制能を有すること、^{13,14)} リンパ球を中心とした免疫応答系に関連することが報告されている。¹⁵⁻²¹⁾

これらの研究をより進めるためには高純度に精製され

た標品が大量に必要と考えられるが、現在までの精製方法はこの点に障害を有していた。

著者らは CRP の免疫学的研究を行うにあたり、高純度でしかも大量に得られる精製法の確立が必要と考え、種々の精製法を検討し、その結果 CRP を含む腹水、胸水を用い、硫酸塩析法、DEAE-セルロースおよびセファクリル S-200 カラム精製法を使用することにより、グラム単位の高純度標品が得られることがわかった。本報告では精製方法と精製した標品の免疫学的および蛋白化学的性状について記述した。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験には、心筋炎、癌などの患者から得られた CRP を含む腹水、胸水を用いた。実験にはすべて分析用試薬を用いた。

2. 実験方法

* Purification and crystallization of C-reactive protein (CRP).

** Yasuhiro Nomata, Mitaka Sakuma, Mituo Magariyama, Kenichi Hiraoka, 栄研化学株式会社。
(受付 1979年10月5日)

(320) 生物物理化学

腹水, 胸水より下記のような段階を経て CRP を精製した。

1) 硫酸塩析法

材料 800 l を体液分画プラント内で硫酸塩析した。1/2 ~ 3/4 飽和沈殿分画物 (約 45 kg) を蒸留水 200 l に溶解し, 0.05 M クエン酸緩衝液, pH 7.0 (含 0.1 M NaCl) に透析後, 遠心分離, 滲過して生じた沈殿物を除去した。

2) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

DEAE-セルロース (DE 52, ワットマン社) を常法により活性化し, 0.05 M クエン酸緩衝液 pH 7.0 (含 0.1 M NaCl) で平衡化し, カラム (φ 20 cm × 110 cm) に充填し試料 (約 200 l) を吸着させた。カラム内を上記緩衝液で洗浄後 0.05 M クエン酸緩衝液 pH 5.2 (含 0.5 M NaCl) により連続溶出させた。流速は 1 l/hr として 300 ml ずつ分画した。蛋白の溶出状況はフローセルを用いた UV モニター (波長 OD 280 nm, LKB 社) で連続的に測定した。

3) セファアクリル S-200 カラムクロマトグラフィー

DEAE-セルロースカラム溶出液中の粗 CRP 分画 (300 mg) をセファアクリル S-200 カラム (φ 10 cm × 110 cm) によりゲル滲過を行った。緩衝液は 0.05 M クエン酸緩衝液 pH 7.0 (含 0.1 M NaCl, 5×10^{-3} M EDTA) を用いアップフロー方式で行った。流速は定流ポンプを用い 200 ml/hr 一定とし, 20 ml に分画した。蛋白の溶出状況は 2) と同様にフローセルを用いた UV モニターで連続的に測定した。操作はすべて 4°C 一定とした (Table 1)。

4) 結晶化

ゲル滲過した試料 (0.7 mg/ml) を徐々に塩濃度を下げながら限外滲過にて濃縮結晶化させた。

5) 抗 CRP 血清の作成

精製 CRP 5.5 mg を生理食塩水 1 ml に溶解し, コンプリートアジュバント 1 ml を加えてエマルジョンとし, 3 kg ウサギの背部皮下数個所に注射して初回免疫を行った。その後 3 週間隔で初回免疫と同量の CRP を 6 回追加免疫し, 最終免疫より 2 週間後採血を行い抗 CRP 血清を得た。

6) 免疫電気泳動法

Grabar and Williams²²⁾ の方法に従って行った。

7) ディスク電気泳動法²³⁾

Davis の方法に従い 7.5% アクリルアミドゲルを使用して行った。

8) アミノ酸分析

加水分解は 6 N HCl 110°C, 減圧封管中で 48, 60 時間

Table 1. Procedure for Purification of C-reactive protein.

A) Fractionation with ammonium sulfate

B) DEAE-cellulose column chromatography

(Whatman DE 52)

Column size : φ 20 × 110 cm

Buffer : 0.05 M sodium citrate (0.1 M NaCl) pH 7.0

Flow rate : 1000 ml/hr

Elution : gradient with 0.05 M sodium citrate buffer containing 0.5 M NaCl, pH 5.2 (300 ml)

Fraction : 300 ml/tube

C) Gel filtration on Sephacryl S-200

Sample : 4 mg/ml 100 ml

Column size : φ 10 × 110 cm

Buffer : 0.05 M sodium citrate (0.1 M NaCl, 5×10^{-3} M EDTA pH 7.0)

Flow rate : 300 ml/hr

Fraction : 20 ml/tube

行った。減圧乾固後アミノ酸量を (KLA-5 型, 日立社) アミノ酸分析装置で測定した。各測定値は零時外そう法により求めた。また, アミノ酸の個数は CRP のサブユニットの分子量を 21,500 として算出した。

9) 超遠心分析

日立 282 型分析用超遠心機を使用し, シュリーレン光学系, ダブルセクターセルを用い, 0°C, 60,000 rpm で行った。

結 果

材料 CRP 陽性腹水, 胸水 800 l から硫酸分画 1/2 ~ 3/4 沈殿分画物は 45 kg 得られた。この硫酸分画物を約 200 l の蒸留水に溶解し, 透析後そのすべてを DEAE-セルロースカラムにアプライし粗 CRP 分画 5.2 g を得た。この粗分画物は, ディスク電気泳動, 免疫電気泳動で調べた結果 CRP 以外に 2 ~ 3 種のヒト血清成分を含んで

いた。続いて粗 CRP 分画物 300 mg をセファクリル S-200 カラムにアプライし、ゲルろ過を行った (Fig. 1)。

Ⅲ-1 分画には蛋白は認められず糖のみが検出された。Ⅲ-2, Ⅲ-3 分画においては糖は検出されなかった。ディスク電気泳動において Ⅲ-2 分画には CRP 以外にわずかのきょう雑蛋白を認めたが、Ⅲ-3 分画にはきょう雑蛋白は認められず、CRP だけの単一バンドが認められた (Fig. 2)。

オクテロニー法でも同様な結果であった。結晶化と免疫の結果から Ⅲ-3 分画は高純度で均一な標品であることが確認出来た (Fig. 3)。

Fig. 1. Gel filtration of crude CRP Fraction III on Sephacryl S-200.

Flow rate : 300 ml/hr, 20 ml/tube
Pooled : A-Ⅲ-1, B-Ⅲ-2, C-Ⅲ-3

Fig. 2. Disc electrophoretic pattern of purified CRP.

免疫電気泳動においても抗 CRP 血清とのみ反応し、抗ヒト全血清とは反応しなかった。オクテロニー法においても同様な結果であった。Ⅲ-3 分画で得られた蛋白量は 212 mg で回収率は約 70% であった。Ⅲ-3 分画 (0.72 mg/ml) 溶液 15 ml をセロファンチューブに入れ、蒸留水で透析しながら濃縮を行った。操作はすべて 4°C 一定で行った。減圧にしながら濃縮を行ったところ内容物が約 1 ml になった時結晶が析出した (Fig. 4)。

Fig. 3. Immunoelectrophoretic pattern of purified CRP and immunized rabbit serum.

(X200)

Fig. 4. Crystal of purified CRP.

(14min)

Fig. 5. Ultracentrifugation of purified CRP.

結晶析出までの濃縮期間は4日間、析出時の蛋白濃度は1.06%であった。結晶型は六方晶状を示し層状構造を持っていた。Ⅲ-3分画をウサギにくりかえし、免疫して得られた抗血清はCRPのみと反応し、他のヒト血清蛋白とは反応しなかった (Fig. 3)。

Ⅲ-3分画の超遠心分析では単一の沈降図が認められ、得られた Sw_{20} 値は7.38であった (Fig. 5)。

Ⅲ-3分画のアミノ酸分析値を Table 2 に示す。分析値は今まで報告された分析値と良く一致することがわかった。

Table 2. Amino acid composition of purified CRP.

Amino acid	mol/mol of CRP
LYS	12
HIS	2
ARG	5
ASP	17
THR	14
SER	20
GLU	22
PRO	13
GLY	18
ARA	9
1/2 CYS	2
VAL	17
MET	2
ILEU	10
LEU	14
TYR	8
PHE	14
TRY	nd

nd : not determind

考 察

CRP の精製に関して多くの研究者の報告があり大別すれば、

- a) 肺炎球菌 C-多糖体と Ca^{++} を用いる方法
 - b) DEAE-セルロースやセファデックスカラムを用いる方法
 - c) 硫酸バリウムを用い CRP を特異的に沈殿させる方法
 - d) affinity chromatography にて単離する方法
- になる。著者らも CRP 精製法について種々検討したが、どの方法においても大量に高純度 CRP 標本を回収

することは困難であった。しかし、今回著者らが行った DEAE-セルロースカラムの連続溶出法、つづいてセファクリル S-200 によるゲル濾過を行うことにより、高純度 CRP をグラム単位で回収されることがわかった。

Ⅲ-3分画は糖を含んでいないこと、また電気泳動易動度から Hokama らのいう g 型 CRP であろうと推測された。

この分画の結晶型は Hokama らの報告とは相反し六方晶状を示し層状構造を有していたが、Hokama らは硫酸ナトリウムで結晶化を行っており、著者らは濃縮法で結晶化を行ったためと推測される。ウサギにⅢ-3分画を多量にしかもくりかえし免疫しても、CRP 以外のヒト血清成分と反応する非特異抗体が免疫電気泳動あるいはオクトロニー法で検出されないことは、この分画が単一の標品であることを裏づける。

また、この分画の沈降定数、またアミノ酸分析値は既報の精製 CRP での値と近似の値が得られた。

謝 辞

稿を終るに当り実験指導をしていただきました東京大学医学研究所アレルギー研究室松橋 直教授、アミノ酸分析・超遠心分析に御助力くださいました大阪大学第2薬理学教室榊原隆三博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Tillet, W.S. and Francis, T. : J. Exp. Med., **52** : 561, 1930.
- 2) Abernethy, T. J. and Avery, O. T. : J. Exp. Med., **73** : 173, 1941.
- 3) MacLeod, C. M. and Avery, O. T. : J. Exp. Med., **73** : 183, 1941.
- 4) Anderson, H. C. and MacCarty, M. : J. Exp. Med., **8** : 445, 1950.
- 5) Hokama, Y. and Riley, R. F. : Biochin. Biophys. Acta, **74** : 305, 1963.
- 6) Gotschlich, E. C. and Edelman, F. M. : Proc. Natl. Acad. Sci., **54** : 558, 1965.
- 7) Alexander, P. O. and Bernard, F. : Proc. Natl. Acad. Sci., **74** : 739, 1977.
- 8) Eduardo, B. O. and Gotschlich, E. C. : Proc. Natl. Acad. Sci., **8** : 3148, 1977.
- 9) Hector, D. Croxatto. et al. : J. Immunol., **100** : 563, 1968.
- 10) Kindmark, C. O. : Clin. Exp. Immunol., **8** : 941, 1971.
- 11) Kaplan, M. H. and Volanakis, J. E. : J. Immunol., **112** : 2135, 1974.
- 12) Siegel, J. et al. : J. Exp. Med., **140** : 631, 1974.

- 13) Hokama, Y. et al. : J. Bacteriol., **83** : 1017, 1962.
- 14) Kindmark, C.O. : Clin. Exp. Immunol., **11** : 215, 1972.
- 15) Wood, H.F. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **76** : 843, 1951.
- 16) Horung, M. and Fritchi, S. : Nature (New Biol.), **230** : 84, 1971.
- 17) Jondal, M. et al. : J. Exp. Med., **136** : 207, 1972.
- 18) Mortensen, R. et al. : J. Exp. Med., **141** : 821, 1975.
- 19) Murgita, R. and T. Tomasi. : J. Exp. Med., **141** : 440, 1975.
- 20) Richard, F. et al. : J. Immunol., **116** : 1244, 1976.
- 21) Stobo, J.D. et al. : J. Immunol., **110** : 652, 1973.
- 22) Grabar, P. and Williams, C.A. : Biochim. Biophys. Acta, **10** : 193, 1953.
- 23) Davis, B.J. : Ann. N. Y. Acad. Sci., **121** : 404, 1964.