〔シンポジウム〕 血漿糖蛋白質の新しい機能

3. ヒプロプロテイン*

山田貞子・周防武昭・平山千里**

緒 言

人血漿中にはコラーゲンに特有なアミノ酸であるヒドロキシプロリンを含む蛋白、ペプチドおよび遊離のヒドロキシプロリンが存在している。¹⁻³⁾ LeRoy ら⁴⁾はこの蛋白をヒプロプロテインと呼び、コラーゲン代謝が亢進している疾患では増加傾向を示すと報告した。その後補体第1成分 Clq がヒドロキシプロリンを含み、コラーゲン様構造をしていると明らかにされて来た。⁵⁾ 最近 Frey ら⁶⁾は血清中に Clq とは異なるコラーゲン様抗原が存在すると報告した。しかし、ヒプロプロテインの一般的な性状ならびに病態時における変動については不明である。今回沈殿法、ゲル濾過法、免疫学的方法ならびに電気泳動法を用いてヒプロプロテインの性状を検討するとともに、コラーゲン代謝が亢進している疾患における変動を測定し、その臨床的意義について考察を試みた。

対象と方法

1. 対 象

健康成人18例、慢性関節リウマチ6例、systemic lupus erythematosus (以下 SLE) 7例、慢性活動性肝炎12例、肝硬変11例を対象とした。12~15時間絶食後早期採血し、血清分離し、得られた血清は測定まで-20℃で保存した。

2. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの分離定量法

血清ヒドロキシプロリン含有ペプチドは、Fig. 1 に示すような方法で分離定量した。すなわち、血清 5 ml を Sephadex G-200 カラムに供し、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) + 1.0 M 塩化ナトリウムで溶出した。得られた分画の蛋白濃度は紫外線吸光法で求めた。各分画は Kibrick ら⁷⁾の方法にしたがって 6 N 塩酸 105℃、15時間加水分解し、Dowex 50WX8 カラムに供し 1 N 塩酸でヒドロキシプロリンを溶出した。溶出したヒドロキシ

プロリンは Bergman ら⁸⁾の方法に準じて比色定量した。

3. Clq 定量

ゲル濾過後の血清 Clq 量は単純放射状免疫拡散法を用いて定量した。⁹⁾ すなわち、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で抗ヒト Clq 抗血清 (ウサギ) 濃度 2%, アガロース濃度 1.5% となるようにプレートを調整した。試料は 7 μ l 用い室温で72時間放置後の沈降輪を測定した。標準として QS 血清, lot No. C-003 (ヘキスト社製) を使用した。

4. プレパラティブ寒天電気泳動

バルビタール緩衝液 (μ 0.05, pH 8.6) を用いてアガロース濃度 1.2% のプレート (11×20×0.2 cm) を作成した。試料は血清 2 ml 用い、150 V の定電圧で90分泳動した。泳動後のゲルは 5 mm 間隔で切断しヒドロキシプロリンの定量を行った。また、このプレートを Clq

Fig. 1. Method for determination of hydroxyproline-containing peptides.

* Hyproprotein

** Sadako Yamada, Takeaki Suou, Chisato Hirayama, 鳥取大学医学部第2内科学教室。

抗血清と反応させて沈降線を観察した。蛋白は7%クマシーブリリアントブルーRにて染色し、デンストメトリーは620 nmで行った。

5. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの分離分析

血清を Rosano ら¹⁰⁾の方法に準じて0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中に4℃で1夜放置し Clq を沈殿させた。次に LeRoy ら¹¹⁾の方法にしたがって pH 7.0 で硫酸アンモニウムを40%, さらに60%に飽和し, ペプチドを沈殿させた。40%および60%沈殿分画は Sephadex G-100, G-75, G-25 によるゲル濾過で分離分析した。ゲル濾過法での平衡化および溶出緩衝液は0.1 M トリス-塩酸 (pH 8.0) を用いた。ヒプロプロティン分画の分析には CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行った。すなわち, 0.9×30 cm のカラムを用い平衡化は0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) で行い, 溶出は同一の緩衝液で塩化ナトリウム 0~0.4 M のリニアグラジエントで行った。

6. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの分子量推定

ヒプロプロティンの分子量は Sephadex G-75 を用いたゲル濾過法で推定した。すなわち, 1.6×80 cm のカラムを使用し, ゲルの平衡化および溶出は0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に行った。Void volume はブルーデキストラン2000にて測定した。マーカープロティンとしては bovine serum albumin (分子量 67,000), beef heart cytochrome C (分子量 12,400), bovine insulin (分子量 5,500), glucagon (分子量 3,550) を用いた。

ヒドロキシプロリンペプチドの分子量は Sephadex G-25 を使用し同様の方法で行った。マーカーペプチドとしては bovine insulin, glucagon, bacitracin (分子量 1,411), glycyl-L-proline-p-nitroanilide tosylate (分子量 446) を用いた。

結 果

1. 血清中ヒドロキシプロリン含有ペプチドの性状

血清の Sephadex G-200 によるゲル濾過パターンは Fig. 2 に示すようになった。ヒドロキシプロリン含有ペプチドの大部分は最初の IgM 分画に溶出され, 一部分が alb 分画に溶出した。遅れてヒドロキシプロリンペプチドが溶出した。ゲル濾過後の分画中の Clq 量を定量すると, Clq 分画は Fig. 2 に示すようにヒドロキシプロリン含有ペプチドの大分子分画にほぼ一致して存在した。Clq が5.4%のヒドロキシプロリンを含んでいる⁵⁾として計算すると大分子分画の92%が Clq と計算された。

2. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの電気泳動

血清をアガロースを支持体として電気泳動すると Fig.

3 に示すようなパターンが得られた。各分画中のヒドロキシプロリンを定量すると約20%が β -glob 分画, 約80%が γ -glob 分画に存在した。このプレートを Clq 抗血清と反応させると沈降線は γ -glob 分画のみに表われた。

3. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの分離分析

ヒドロキシプロリン含有ペプチドを0.01 M 酢酸緩衝液および硫酸アンモニウム40%, 60%飽和にて分離した結果を Table 1 に示した。Clq は酢酸沈殿分画にのみ認められ回収率は77%であった。ヒドロキシプロリン含有ペプチドは酢酸で沈殿する分画に46%, 40%飽和硫酸アンモニウム分画に23%, 60%飽和硫酸アンモニウム分画に12%そして上清に7%認められた。回収率は88%であった。

40% 飽和硫酸アンモニウム沈殿ペプチドを Sephadex G-100 カラムで分析すると Fig. 4 に示すような2つの分

Fig. 2. Analysis of serum hydroxyproline-containing peptides and Clq by gel filtration and immunological assay.

Fig. 3. Analysis of serum hydroxyproline-containing peptides by electrophoresis.

画に分けられた。ヒドロキシプロリンの13%を分子量の大きな分画が占め、87%が分子量の小さな分画であった。分子量の小さな分画をさらにCM-セルロースカラムで分析すると Fig. 5 に示すような溶出パターンが得られ、ヒドロキシプロリン含有ペプチドのピークがほぼ1つに分離されて来た。

4. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの分子量推定

次にこのヒドロキシプロリン含有ペプチド（ヒプロロティン）とマーカープロティンの Sephadex G-75 からの溶出パターンを Fig. 6 に示した。Fig. 7 には Sephadex G-75 における マーカープロティンの分子量と分配係数 (K) の関係を片対数グラフにプロットした。ヒプロロティンの分子量は35,000~45,000と計算された。

同様にヒドロキシプロリンペプチドの分子量を Sephadex G-25 を用いたゲル濾過法によって推定すると1,400~3,000であった。

5. ヒドロキシプロリン含有ペプチドの病態時における変動

る変動

健康成人、慢性関節リウマチ、SLE、慢性活動性肝炎、肝硬変患者血清中ヒドロキシプロリン含有ペプチド含量は Table 2 に示すような値になった。すなわち、ヒドロキシプロリンは正常者で 6.9 $\mu\text{g/ml}$ であり、その内容は 79.7% が Clq, 8.7% がヒプロロティン, 11.6% がペプチドであった。健康成人では血清中ヒドロ

Fig. 5. Analysis of serum hydroxyproline-containing peptides by CM-cellulose chromatography.

Fig. 6. Analysis of serum hydroxyproline-containing peptides by gel filtration using Sephadex G-75.

Table 1. Precipitation of serum hydroxyproline-containing peptides by acetate buffer and ammonium sulfate.

	Clq		Hydroxyproline	
	$\mu\text{g/ml}$	%	$\mu\text{g/ml}$	%
Serum	143	100	8.3	100
ppt.				
Acetate buffer	110	77	3.8	46
40% Ammonium sulfate	0	0	1.9	23
60% Ammonium sulfate	0	0	1.0	12
Sup.	0	0	0.6	7

Fig. 4. Analysis of serum hydroxyproline-containing peptides by gel filtration using Sephadex G-100.

Fig. 7. Molecular weight vs distribution coefficient (K) on Sephadex G-75.

Table 2. Serum hydroxyproline*-containing peptides in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and chronic liver disease.

Group	No. of cases	Clq	Hypoprotein	Peptide
Normal controls	18	5.5±0.3	0.6±0.1	0.8±0.1
Rheumatoid arthritis	6	5.1±0.5	1.9±0.2**	1.4±0.5
Systemic lupus erythematosus	7	4.4±0.9	1.3±0.2**	1.3±0.3
Chronic active hepatitis	12	6.1±0.7	1.0±0.2***	0.9±0.1
Liver cirrhosis	11	6.9±0.8	1.0±0.2***	0.9±0.2

* hydroxyproline ug/ml, mean±SEM, ** P<0.01, *** P<0.05.

キシプロリン値の性差, 年齢差は見られなかった. Clq は慢性関節リウマチ, SLE では減少傾向, 慢性肝疾患では増加傾向を示した. このことは従来の Clq に関する報告^{11,12)}からも支持された. ヒプロプロティンは慢性関節リウマチ, SLE, 慢性活動性肝炎, 肝硬変の順に有意に増加した. ヒドロキシプロリンペプチドは慢性関節リウマチ, SLE では増加傾向を示したが有意差は見られなかった.

考 案

今回のわれわれの成績によると血清中のヒドロキシプロリン含有ペプチドはヒドロキシプロリン量にして 6.9 µg/ml となり, LeRoy ら⁴⁾の血漿での測定値 8.0 µg/ml よりやや低い, Kibrick ら⁷⁾の血清中の測定値とほぼ一致した. この正確な理由は不明であるがおそらく血液凝固時に Clq の一部が除去されるためと推定される. ゲル洩過による分析では Clq ヒプロプロティン, ヒドロキシプロリンペプチドから構成されており, その比はおおよそ 80:9:11 であった.

また, ヒドロキシプロリン含有ペプチドは電気泳動で β および γ-glob 域に認められた. γ-glob 域のペプチドは Clq 抗血清と沈降反応した. したがって β-glob 域のペプチドがヒプロプロティンと考えられた. また, 酢酸緩衝液および硫酸アンモニウムによる沈殿法によりヒプロプロティンは 40% 飽和硫酸アンモニウム沈殿分画に存在すると考えられた.

従来血清ヒドロキシプロリン含有ペプチドとしては, Clq とヒプロプロティンおよびおそらくヒドロキシプロリンペプチドの一部を合わせて測定しており,²⁻⁴⁾ その変動は主として Clq によるため病態時の増減が必ずしも明瞭でなかった. 事実, 今回のわれわれの成績によると血清中の Clq は測定される範囲内で有意の変動を示さなかった. これに反し, ヒプロプロティンは慢性関節リウマチ, SLE, そして慢性肝疾患で有意の増加を示し, 特に

慢性関節リウマチ, SLE では著明な増加が見られた.

このヒプロプロティンの分子量はゲル洩過法で推定して 35,000~45,000 であった. 以上の結果よりこのペプチドはコラーゲン代謝を反映する血漿蛋白の 1 つと推定することができた.

また, ヒドロキシプロリンペプチドの分子量は 1,400~3,000 と計算され, このペプチドもコラーゲンの代謝産物と考えることができるが, その分子性状から主として尿中に排泄されるものと推定された.

結 語

1. 人血清中のヒドロキシプロリンを含むペプチドは Clq とヒプロプロティンおよびペプチドに大別された.
2. ヒプロプロティンはアガロースを支持体とした電気泳動で β-glob 分画に泳動された.
3. ヒプロプロティンは 40% 飽和硫酸アンモニウムで沈殿し, ゲル洩過法で分析して分子量約 35,000~45,000 と推定された.
4. コラーゲン代謝が亢進している線維増殖性の疾患ではヒプロプロティンは有意に増加し, 病態の推定に有用な臨床的指標を与えると考えられた.

文 献

- 1) LeRoy, E. C. et al. : J. Biol. Chem., **239** : 3350, 1964.
- 2) Hirayama, C. et al. : Digestion, **5** : 31, 1972.
- 3) Dubovsky, J. et al. : Clin. Chim. Acta, **62** : 277, 1975.
- 4) LeRoy, E. C. et al. : J. Clin. Invest., **44** : 914, 1965.
- 5) Calcott, M. A. et al. : Biochemistry, **11** : 3443, 1972.
- 6) Frey, J. et al. : Clin. Chim. Acta, **99** : 235, 1979.
- 7) Kibrick, C. A. et al. : Clin. Chim. Acta, **46** : 173, 1973.
- 8) Bergman, I. et al. : Clin. Chim. Acta, **27** :

- 347, 1970.
- 9) Kohler, P.F. et al. : Science, **163** : 474, 1969.
- 10) Rosano, C.L. et al. : Clin. Chem., **23** : 1335, 1977.
- 11) Kohler, P.F. et al. : J. Clin. Invest., **51** : 868, 1972.
- 12) Charlesworth, J.A. et al. : Clin. Exp. Immunol., **28** : 496, 1977.