腎疾患患者尿蛋白質のミクロ2次元電気泳動法による分析*

真鍋 敬**・高橋裕子**・奥山典生**

田中祥子***・本宮成雄***

Summary

The urinary proteins from 19 patients of renal disease were analyzed with micro two-dimensional electrophoresis in the absence of denaturing agents. The two-dimensional electrophoretic patterns of the urinary proteins resembled with those of plasma proteins, although the contents of high molecular weight plasma proteins were low. The patterns of the patients with nephrotic syndrome were characterized by the high content of α_1 -acid glycoprotein. Comparing the urinary protein patterns, differences in the contents of G γ -globulin, prealbumin, α_2 HS-glycoprotein, IgG polymer and unidentified low molecular weight proteins were demonstrated.

Key Words : two-dimensional electrophoresis, urine protein analysis, urine proteins from renal patients, α_1 -acid glycoprotein increase in nephrotic syndrome, native protein electrophoresis

はじめに

我々は変性剤を用いない2次元電気泳動法によりヒト体液（血漿^{1,2)}、脊髄液^{2,3)}、尿^{2,3)}、腹水³⁾など）の蛋白質が高分解能に分離されることを示し、それぞれの試料についての蛋白質地図上で、蛋白質の位置の同定をすすめてきた^{2,4)}。また、脊髄液や尿のように、蛋白質濃度の低い試料の分析を容易にし、多数の蛋白質試料についてのスクリーニングを可能にするために、ミクロ多検体2次元電気泳動法を開発した^{3,5)}。

従来、腎疾患患者尿中の蛋白質の分析については、SDS電気泳動法を用いた多くの報告がある⁶⁻¹⁰⁾。また、最近 Edwards ら^{11,12)}は、O'Farrell の方法¹³⁾に基づいて正常人尿中のポリペプチドを2次元電気泳動で分析している。

しかし、これらの報告は試料蛋白質を SDS や高濃度尿素で変性させ、ポリペプチドとして分析するため、実際に尿試料中で蛋白質が示している等電点、分子量を知ることとはできない。また、Edwards らのように電気泳

動に数十時間を要するのでは、多数の尿試料中の蛋白質のパターンを互に比較したい場合、困難がある。そこで、我々はミクロ多検体2次元電気泳動法を用い、腎疾患患者尿中の蛋白質を、変性剤のない条件で分析した。患者尿は濃縮操作なしでも蛋白質の分布状態を知ることが可能であったが、要すれば約10倍〜20倍濃縮して試料とした。

実験材料ならびに実験方法

1. 試 薬

両性担体は LKB 社のアンフォライン (pH 3.5-10, pH 3.5-5)、アクリルアミド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、過硫酸アンモニウムは和光純薬社の電気泳動用特製試薬、トリスアミノメタン、グリシンは和光純薬社の特級試薬、コマジープリリアントブルー R-250 は半井化学社の電気泳動用特製試薬を用いた。銀染色用のグルタルアルデヒド、硝酸銀、クエン酸、アンモニア、フォルムアルデヒドは和光純薬社特級を用いた。プロテイン

* Analysis of urinary proteins from patients of renal disease by micro two-dimensional electrophoresis.

** Takashi Manabe, Yuko Takahashi, Tsuneo Okuyama, 東京都立大学理学部化学教室

*** Shoko Tanaka, Shigeo Motomiya, 松園会東葛クリニック検査部

(受付 1983年12月20日, 受理 1984年1月24日)

グ用のウサギ抗ヒト血清蛋白質血清はヘキスト社より、ベルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体はマイルス社のものを用いた。ジアミノベンジジンは和光純薬社ドータイト試薬、ニトロセルロース膜は Schleicher and Schüll 社のポアサイズ $0.45\mu\text{m}$ のものを用いた。

2. 尿試料

昭和58年7月に東葛クリニック外来に来院した各種腎疾患患者19例（6歳～59歳の男14例，女5例）及び正常人3例の尿を試料とした。それぞれの尿 $200\mu\text{l}$ をふた付きマイクロ試験管（外径 $8\text{mm}\times$ 高さ 5cm ）に取り，蔗糖 80mg を加え溶解したものを電気泳動用尿試料とした。濃縮尿試料は，尿 2.5ml をミニコン CS 15（アミコン社）で約10倍～80倍に濃縮後，40%（w/v）になるよう蔗糖を加えたものを用いた。蔗糖添加前の尿は -80°C に，添加後は -20°C に保存した。上記腎疾患患者は各種臨床症状および臨床検査結果から以下のように診断分類された。

ネフローゼ症候群	3例
慢性腎炎	15例
腎不全	1例

3. 方法

1) ミクロ2次元電気泳動

ミクロ多検体2次元電気泳動は既報³⁾ のように行なっ

た。ただし低分子量の蛋白質を検出するため2次元目の泳動時間は約60分，マーカーの BPB がゲル下端に達するまでとした。染色は0.1% コマジーブルー R-250-50% メタノール-7% 酢酸中で振とうしながら15分間，脱染色は70% メタノール-7% 酢酸中で振とうしながら2時間行なった。ゲルは写真撮影後，過度の脱色を防ぐために7%酢酸に移し， 0.3mm 厚ポリエチレン袋に7%酢酸とともに封入して保存した。

2) 銀染色

コマジー染色で充分染色されないゲルはさらに銀染色を既報³⁾ のように行なった。ただし今回は染色時のコマジーブルーの濃度を0.1% と高くしたため，脱染色を充分に行わないと銀染色の際バックグラウンドが濃くなるので注意を要する。我々は脱染色後のゲルをさらに30% メタノール-7% 酢酸で1夜振とうしたのち，グルタルアルデヒド処理を開始している。

3) プロッティングと免疫化学的染色

ミクロ2次元ゲル4枚を1度にプロッティングし，各ゲルから5枚，計20枚のプロットを得るための装置及び方法については別に詳述する（真鍋他，投稿準備中）。得られた各プロット上での抗原蛋白質の検出は，Towninらの方法¹⁴⁾ に準じて，既報⁴⁾ のように行なった。すなわち，各プロットを抗ヒト血清蛋白質ウサギ抗体で処理し

Fig. 1. Micro two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins.

- A pattern of 80-fold concentrated normal urine, stained with Coomassie blue R-250. Sample volume applied was $8\mu\text{l}$. The position of albumin (Alb) is indicated.
- Silver staining of the slab shown in A. Arrows show the positions of protein spots which were not detectable in the patterns of normal human plasma proteins.
- A pattern of un-concentrated urine from a renal patient. Sample volume was $8\mu\text{l}$ and the gel was stained with Coomassie blue. Arrows with name show the positions of plasma proteins: IgG, immunoglobulin G; Tf, transferrin; Gc, Gc-globulin; PA, prealbumin. Arrows without name indicate some of the proteins which were not detectable in the patterns of normal human plasma proteins.

たのち、ベルオキシンダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体で処理し、ジアミノベンジジン-過酸化水素で発色させた。

結 果

Fig. 1 A に正常人尿80倍濃縮試料 8 μ l を2次元電気泳動後コマジー染色した泳動像の1例を示す。正常人尿試料の場合、80~100倍濃縮した試料を用いても、アルブミン (Alb) が淡く染色されるのみであった。Fig. 1 A に示したゲルを銀染色したもの Fig. 1 B を示す。約30のスポットが検出されたが、正規化した血漿蛋白質パターン(既報²⁾)と比較すると、血漿パターンでは顕著でなかった10個以上のスポット(図中矢印)が検出されている。これらは正常人試料に再現的に認められた。これに対し、腎疾患患者尿では、全く濃縮を行なわない試料 8 μ l を泳動し、コマジー染色したのみで、Fig. 1 C に示すように多くの蛋白質スポットが検出された。しかしそれらの殆どは血漿蛋白質と同じ泳動位置にあり、Alb, Gc グロブリン (Gc), IgG, トランスフェリン(Tf), プレアルブミン (PA) のように同定された。但し血漿蛋白質のうちでも、分子量の大きい LDL(分子量約90万), α_2 -マクログロブリン (α_2 M, 分子量約50万), ハプトグロビンポリマー (Hp, 分子量約20万~約100万) 等は検出されていない。また、腎疾患患者尿中にも、血漿蛋白質パターンでは顕著でない蛋白質スポットが存在する

(図中矢印)。

腎疾患患者尿中の蛋白量は患者により異り、約 5 mg/dl から約 1,000 mg/dl まで、広い分布を示した。臨床検査においては、尿中蛋白量の測定にテストペーパーが広く用いられている。Fig. 2 A, B, C に BM テストペーパー(ベーリンガー・マンハイム社)を用いて 1+, 2+, 3+ (仕様書によれば、それぞれ 30 mg/dl, 100 mg/dl, 500 mg/dl に相当する)と評価された患者尿につき、濃縮操作なしにそれぞれ 8 μ l を試料として泳動した例を示す。Fig. 2 A の試料では、Alb, Tf が濃く染色されている。Fig. 2 B の尿試料では、Alb, Tf 以外に IgG, IgA などが検出されている。Fig. 2 C の試料では、さらに α_2 M, Hp, C3 などが染色され、ほとんどすべての血漿蛋白質が検出されている。

Fig. 2 に示したように、患者尿中の蛋白量には大きな差がある。そこで蛋白レベルの低い試料については、ミニコン濃縮器により濃縮し、蛋白レベルをほぼ等しくして、試料同志で蛋白質分布パターンを比較した。Fig. 3 は Fig. 2 A に示した患者尿を約20倍に濃縮し、その 8 μ l を試料として2次元電気泳動したパターンである。濃縮前のパターン (Fig. 2 A) と比較すると、濃縮前には淡いスポットとしてしか検出されていなかった IgG, Gc, PA 等が明瞭に染色されている。しかし、Fig. 3 を Fig. 2 C に示した高蛋白レベルの尿試料と比較すると、Fig. 3 では α_2 M, Hp, C3 などのスポットが検出され

Fig. 2. Micro two-dimensional electrophoresis of urinary proteins from renal patients.

Some of the protein patterns of unconcentrated urine samples were shown. Sample volume was 8 μ l and the gel was stained with Coomassie blue.

- A pattern of a urine sample, protein level was 1+ by BM Test Paper.
 - A pattern of a urine sample, protein level was 2+ by BM Test Paper.
 - A pattern of a urine sample, protein level was 3+ by BM Test Paper.
- α_2 M, α_2 -macroglobulin; Hp, haptoglobin polymers; C3, C3 component.

Fig. 3. A protein pattern of a concentrated urine sample.

The urine sample shown in Fig. 2 A was concentrated by 20-fold and 8 μ l of the concentrate was subjected to two-dimensional electrophoresis. The gel was stained with Coomassie blue.

Fig. 4. Identification of α_1 -acid glycoprotein after blotting-immunochemical staining.

- A. A section of the acrylamide slab gel, used for short time electroblotting and stained with Coomassie blue.
- B. A section of the nitrocellulose blot treated with anti- α_1 -acid glycoprotein rabbit serum and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat immunoglobulin. The blot was stained with diaminobenzidine- H_2O_2 . The arrowed spot in Fig. 4 A was stained.

ていないなど、蛋白質の分布状態は大きく異なっている。

Fig. 3 において、Alb より低分子量で等電点約 3.5 の位置にあるスポット (図中矢印) は、試料により Alb との相対量に差が認められた。従来このスポットは血漿蛋白質の 2 次元パターン上でも同定されていないので、ブロッティング-免疫化学的染色法により同定を試みた。

Fig. 4 A に腎疾患患者 (ネフローゼ) 尿の 7 倍濃縮物 8 μ l を試料として 2 次元電気泳動後、短時間 (10 分間) ブロッティングした後、ゲルをコマーシブル染色したものの部分を示す。Fig. 4 B は得られたニトロセルロース膜を抗ヒト α_1 acid glycoprotein (α_1 AG) ウサギ血清及びペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体で処理し、ジアミノベンジン- H_2O_2 で発色させた結果を示す。Fig. 4 A に矢印で示したスポットの位置が濃く染色された。Fig. 4 B で、最も濃いスポットに接してその上部も染色されているのは、免疫化学的染色法の検出感度が高いため、コマーシブル染色では検出されていない α_1 AG も検出できたためと考えられる。

濃縮した患者尿試料の 2 次元電気泳動パターンを比較すると、蛋白質スポットの分布状態に大きな差が認められた。Fig. 5 A~D に特に差の大きいゲル部分 (等電点約 5.5~3.5, 分子量約 10 万~1 万の領域) について比較した例を示す。Fig. 5 A は腎不全患者尿パターンで、Alb, Tf 以外に Gc, PA, α_1 AG 等が検出されている。それに対し Fig. 5 B に示したネフローゼ患者パターンでは、 α_1 AG の量が非常に多いほか、Gc, PA が明瞭なスポットとして検出されていない。 α_1 AG が大量に検出されることは、ネフローゼと診断された患者尿 3 例に共通した特徴であった。Fig. 5 C の慢性腎炎患者パターンでは、Gc や PA が明瞭には検出されていないほか、低分子量領域に Fig. 5 A では検出されなかった 2 個のスポットが検出されている (図中矢印)。Fig. 5 D も慢性腎炎の例であるが、Gc と PA が検出され、また図中に示した等電点 3.5 付近の一連の低分子量のスポットが検出された。しかし Fig. 5 A~C に共通して検出された、 α_2 HS glycoprotein (Gc とほぼ同じ分子量でより酸性側のスポット) が検出されていない。

Fig. 5 に示した酸性低分子量域以外にも蛋白質分布状態の差は認められたが、Fig. 6 に IgG 領域に変化のあった例を示す。腎不全患者試料で、矢印で示した IgG のポリマーと思われるスポットが検出された。このようなスポットは、患者尿 19 例中 2 例で認められた。

以上のような大きな差異は、正常人血漿蛋白質パターン 10 例を互に比較した場合にも²⁾、脊髄液蛋白質パター

Fig. 5. Sections of two-dimensional electrophoretic patterns of urinary proteins. Urine samples from renal patients were concentrated with Minicon CS-15 concentrators, $8 \mu\text{l}$ was subjected to two-dimensional electrophoresis and the gels were stained with Coomassie blue.

A. A pattern of a patient of a chronic renal failure. α_2 HS, α_2 HS-glycoprotein; α_1 AG, α_1 -acid glycoprotein.

B. A pattern of a patient of nephrotic syndrome.

C. A pattern of a patient of chronic nephritis. The arrows show the positions of spots not detected in Fig. 5 A, B, or D.

D. A pattern of a patient of chronic nephritis. The arrow shows the area of low-molecular weight proteins which were not detected in Fig. 5 A~C.

Fig. 6. A section of a two-dimensional electrophoretic patterns of urinary proteins.

IgG region of a urinary protein pattern from a renal patient was shown. The arrowed spot was detected in 2 samples out of 19.

ン40例を互に比較した場合にも⁴⁾見られなかったものである。

考 察

尿中蛋白質組成の電気泳動法による分析については多くの報告がある。Virella ら⁸⁾は, monoclonal gammopathy により腎障害の生じた患者につき尿中蛋白質の組成を, SDS 電気泳動法, セルロースアセテート膜電気泳動法, および免疫電気泳動法により分析し, 蛋白尿を糸球体型 (主として Alb より分子量の大きい蛋白質が排泄されている), 尿細管型 (主として免疫グロブリン light chain が排泄されている), 混合型の3種に分類した。その後尿蛋白質の分析には SDS 電気泳動法がしばしば用いられており, 例えば Lubega⁹⁾ は種々の腎疾患患者尿を上記3種に分類し, 診断への利用の可能性を調べている。しかし, 橋本ら¹⁰⁾が腎疾患患者尿中の分子量 3,000~90,000 のポリペプチドを SDS 電気泳動法により分析した結果から示されているように, ポリペプチド組成は患者尿試料間でそれぞれ差があり, 疾患と尿蛋白質組成の関連については, 高分解能な分析法によるより詳細な研究が必要となってきた。

最近 Edwards ら^{11,12)}は, O'Farrell 法に基づいた2次元電気泳動法により, 正常人及び骨髄腫患者の尿中ポリペプチド組成の分析を行なった。しかしこの方法は, 高分解能ではあるが, 蛋白質を高度濃度尿素, SDS で変性させ, ポリペプチドとして分析するものであるため, 臨床化学の利用に適しているとはいえない。そこで

我々は, 蛋白質を未変性の条件で分析する2次元電気泳動法を用いて, 腎疾患患者尿蛋白質の分析を試みた。

患者尿は 100 mg/dl 程度の蛋白濃度があれば, 濃縮せずそのまま 8 μ l を泳動しても, コマジー染色で蛋白質分布状態を知ることが可能であった (Fig. 1 C)。蛋白濃度が 50 mg/dl 程度以下の場合, ミニコン CS 15 濃縮器を用いて10~20倍に濃縮した。限外濾過法による濃縮の際, 分子量約 1 万以下の蛋白質の濃度効率が悪い可能性がある。そこで濃縮前の尿試料 8 μ l を泳動し, コマジー染色後銀染色したものと, 同じ試料を約20倍濃縮してコマジー染色したものについて, 蛋白質の分布状態を比較したが, 特に差は認められなかった。これは, 殆どの試料について, 尿中蛋白質の分子量は最も小さいものでも約 2 万程度であったためであろう。

Fig. 1 に示したように, 腎疾患患者尿の蛋白質パターンは, 正常人尿パターンと比較して, より血漿蛋白質パターンに近い。これは血漿蛋白質が, 腎障害により尿中に漏出しやすくなったと考えることができる。確かに, Fig. 2 C に示した高蛋白尿の場合, 蛋白質分布パターンは血漿のそれによく似通っている。しかし, 殆どの尿試料について, 血漿蛋白質のうちでも高分子量のもの, すなわち α_2 M, LDL, Hp ポリマー等は, コマジー染色では認められない。また, 中程度以下の蛋白量の尿同志でも, 濃縮して試料蛋白量をほぼ等しくして比較した場合, 蛋白質の分布状態に相違が認められた (Fig. 5, Fig. 6)。すなわち, ネフローゼ患者3例については, α_1 AG が大量に存在することが共通の特徴であった。ネフローゼ患者尿中に α_1 AG が増加することは, 従来から知られていたことであるが, 2次元電気泳動法でこれが確認できたうえ, 同時に他の蛋白質の分布状態についても知ることが可能であった。また, 2次元デンストメトリーにより各蛋白質の定量も可能である。

Fig. 5 A~D 及び Fig. 6 に示したように, 試料により Gc, PA, α_2 HS, IgG ポリマーなどの量比が大きく異なっていることは, 血漿試料10例²⁾あるいは脊髄液試料40例⁴⁾の2次元電気泳動パターンを互に比較した場合には見られなかった結果である。このことは, これらの蛋白質の分布状態の相違も, ネフローゼにおける α_1 AG と同様に, 種々の腎障害を特徴づける目安となりうる可能性を示している。

現在, 各尿試料パターン上でのそれぞれの蛋白質の量比を, TVカメラとマイクロコンピュータを用いた定量システム¹⁵⁾により計測する作業をすすめている。

文 献

- 1) Manabe, T. et al. : J. Biochem., **85** : 649, 1979.
- 2) Manabe, T. et al. : J. Biochem., **87** : 451, 1980.
- 3) Manabe, T. et al. : Clin. Chem., **28** : 824, 1982.
- 4) Manabe, T. et al. : Electrophoresis '83 : in press.
- 5) 真鍋 敬他 : 生物物理化学, **25** : 7, 1981.
- 6) Virella, G. et al. : Clin. Chim. Acta, **50** : 63, 1974.
- 7) Ballant, L. et al. : Clin. Chim. Acta, **54** : 27, 1974.
- 8) Cachera, C. et al. : Clin. Chem., **26** : 1588, 1980.
- 9) Lubega, J. : Clin. Chim. Acta, **128** : 151, 1983.
- 10) Hashimoto, F. et al. : Anal. Biochem., **129** : 192, 1983.
- 11) Edwards, J.J. et al. : Clin. Chem., **28** : 160, 1982.
- 12) Edwards, J.J. et al. : Clin. Chem., **28** : 941, 1982.
- 13) O'Farrell, P.H. : J. Biol. Chem., **250** : 4007, 1975.
- 14) Towbin, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 4350, 1979.
- 15) Manabe, T. and Okuyama, T. : J. Chromatogr., **264** : 435, 1983.