〔原 著〕

ヒト α_1 -T glycoprotein の精製に関する研究

和田守史* 伊藤喜久* 櫻林郁之介*

河合 忠* 上村 孝** 今泉 厚**

SUMMARY

Tryptophan-poor α_1 -glycoprotein was initially isolated by Haupt and Heide in 1964, and designated as α_1 -T glycoprotein (α_1 -T). α_1 -T was originally isolated from pooled human serum, with 5 steps of chromatography, and improved by introducing affinity chromatography conjugated with anti α_1 -T monoclonal antibody.

The molecular weight of purified α_1 -T was about 77,500 daltons determined by SDS-PAGE.

Amino acid composition were determined and was almost identical to that obtained by Schwick. Partial amino acid sequence was-Glu-Ser-Leu-Leu-Asn-His-Phe-Leu-Tyr-Glu……which did not show any homology to that reported with all existing proteins.

Anti α_1 -T rabbit serum and anti α_1 -T monoclonal antibody were prepared with purified α_1 -T.

Key words: Tryptophan-poor α_1 -glycoprotein (α_1 -T), affinity chromatography, amino acid composition, a partial amino acid sequence, monoclonal antibody

緒 言

1964年に Haupt と Heide¹⁾により初めて報告された α_1 -T glycoprotein (α_1 -T) は、他の血漿蛋白に比較してアミノ酸組成中のトリプトファン含量が少ないことから Tryptophan-poor α_1 -glycoprotein とも呼ばれている。この α_1 -T の血清中濃度は5~10mg/dl と微量であり、免疫電気泳動で α_1 領域に泳動される糖蛋白である。その物理化学的性状については、Schwick ら²⁾によって一部明らかになりつつあるが、一次構造の決定等の諸問題はほとんど解決されていないと言ってよい。従って、 α_1 -T の機能および臨床的意義に至っては、全く不明である。

われわれは、信頼性の高い測定法を確立することにより、 α_1 -T 測定 of 臨床的意義を明らかにする目的で研究を進めており、今回ヒト血清からの α_1 -T 精製法を確立するとともに、アミノ酸組成と一次構造の一部を決定したので以下に報告する。

材料および方法

1. 精製法 (Table 1)

精製材料には、健康人プール血清を使用した。血清に飽和硫酸を45%になるように添加し沈殿物分画を除去後、上清に更に飽和硫酸を75%になるよう添加して得られた沈殿物分画を蒸留水に溶解し、0.1M 酢酸緩衝液 pH6.0 (0.5M NaCl 含有) で透析した。透析終了

A study on purification of α_1 -T glycoprotein.

Morifumi Wada*, Yoshihisa Itoh*, Ikunosuke Sakurabayashi*, Tadashi Kawai*, Takashi Kamimura**, and Atsushi Imaizumi**.

*自治医科大学臨床病理学.

**帝人微生物医学研究所.

Correspondence address: Morifumi Wada, Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, Tochigi 329-04, Japan.

(受付 1986年8月1日, 受理 1986年9月13日)

(8) 生物物理化学

Table 1. Procedure for purification of α_1 -T

後、遠心分離して異物を除去した試料を透析に使用した緩衝液と同じ緩衝液で平衡化しておいた ConA-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) カラム (5.2×25cm) に添加し、充分に上記緩衝液で洗浄後、0.3M α -D-メチルグルコピラノシドにて溶出した。溶出させた糖蛋白分画は、0.2M NaCl, 0.1% NaN₃ 含有0.05M リン酸緩衝液 (PB, pH7.2) で透析後、抗アルブミンアフィニティークロマトカラム (自家製, 2.6×30cm) に添加した。

次に、この溶出液を0.05M PB, pH7.2で透析し、予め同じ緩衝液で平衡化した Blue-Sepharose Cl-4 B (Pharmacia Fine Chem.) カラム (2.6×20cm) に添加した。溶出は、0~1.5M NaCl の濃度勾配をかけて行った。

更に Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chem, 2.6×95cm) によるゲル濾過を行い得られた α_1 -T rich 分

画は、0.03M PB pH6.0にて透析し、同じ緩衝液で平衡化しておいた CM-Sephadex C-50 (Pharmacia Fine Chem.) カラム (2.6×50cm) に添加し同一緩衝液で溶出させて精製 α_1 -T を得た。

モノクローナル抗体を作製した後は、精製法の一部を変更して、ConA-Sepharose クロマトグラフィーの次に抗 α_1 -T モノクローナルアフィニティークロマトグラフィーを行い、最後に Sephadex G-200 のゲル濾過で α_1 -T を得るという3段階のカラム操作により精製した。

精製 α_1 -T の純度は、Davis ら³⁾ の7.5%ディスク電気泳動法 (PAGE) で行い、分子量は SDS-PAGE (Weber-Osborn⁴⁾ の方法, 10%PAG), 等電点電気泳動法 (PAG-IEF) は堀尾ら⁵⁾ の方法により行い各々検定した。

2. 免疫化学的分析

精製 α_1 -T の分析は、抗 α_1 -T (Serotec Co., UK) および抗ヒト全血清 (MBL 社) と種々の血漿蛋白に対する市販抗血清 (Dako, Sweden) を用いて免疫電気泳動法と Ouchterlony 法⁶⁾ に行行った。前者は、Grabar-Williams⁷⁾ の方法に従って行い 後者は、1% agar (Oxoid Co.) ゲル板を用いた。

3. 自家製抗 α_1 -T およびモノクローナル抗体の作製法

精製 α_1 -T 1mg を Freund's complete adjuvant (FCA) と等量混合しウサギのフットパットに免疫し、2週間ごとに精製 α_1 -T 0.2mg を背部皮下に追加免疫して約3ヵ月後に採血し抗血清を得た。

抗 α_1 -T モノクローナル抗体は、精製 α_1 -T 0.1mg を FCA と等量混合して Balb/c の腹腔内に免疫し、1ヵ月後同様に追加免疫した後、更に1ヵ月後、精製 α_1 -T のみを0.01mg 尾静脈から免疫した。最終免疫後4日目に脾細胞を採取し、Milstein ら^{8,9)} の方法に従い、マウス骨髄腫株化細胞 (SP-2) と融合させて作製した。自家製抗 α_1 -T ウサギ血清の分析は、免疫電気泳動法および Ouchterlony 法に行行った。モノクローナル抗体の検定は、PAGE と SDS-PAGE により精製 α_1 -T を用いた Western blotting を Towbin¹⁰⁾ らの方法に従って行行った。なお、モノクローナル抗体はビオチン化したものを用いアビジン-パーオキシダーゼとの反応により確認した。

4. 精製 α_1 -T のアミノ酸組成および部分一次構造の決定法

精製 α_1 -T アミノ酸組成は3Nメルカプトエタンスルホン酸加水分解法^{11,12)} により110℃, 24時間で α_1 -T を分解しアミノ酸分析機 (日本電子 JCL-200A) を使用して分析した。

また、精製 α_1 -T の部分一次構造は、 α_1 -T をトリプシン消化し、これを HPLC (Bio-Rad, RP-318 0~120分, 0~60% CH₃CN/0.1% TFA/ml/min) で分離し、得られた α_1 -T 由来のペプチドについて N-末端解析を行い決定した。

結 果

1. α_1 -T の分離精製

出発材料の健康人プール血清中の α_1 -T 濃度を7 mg/dl とすると5段階のカラム操作による α_1 -T の精製法は、精製純品を Folin-Lowry 法¹³⁾ で蛋白質量を測定した結果より、収率約3%であり、抗 α_1 -T モノクローナルアフィニティーカラムを使用した精製法での収率は約8%であった。両方の精製法により精製した α_1 -T は、PAGE, SDS-PAGE および PAG-IEF の結果が同一であり、PAGE では α_1 領域に、SDS-PAGE では分子量77,500の位置に、PAG-IEF では pI 約4.5 の位置に各々単一のバンドとして認められた (Fig. 1)。

Fig. 1. Purified α_1 -T analysed by disc electrophoresis (A), SDS-PAGE (B) and Isoelectric focusing (C).

1: Marker 2: Purified α_1 -T

2. 精製 α_1 -T の免疫化学的分析

Ouchterlony 法では精製 α_1 -T は抗 α_1 -T および抗ヒト全血清とのみ反応して沈降線が形成され、しかも両者は完全に融合していた。しかし、抗 α_1 -T と抗ヒト全血清以外の種々の血清蛋白質に対する抗血清との反応は全く認められなかった (Fig. 2)。免疫電気泳動法では、抗ヒト全血清との反応は非常に弱かったが、抗 α_1 -T との沈降線と同じ α_1 領域の位置に確認することができた (Fig. 3)。

Fig. 2. Ouchterlony immunodiffusion analyses of purified α_1 -T.

1: purified α_1 -T 2: anti Prealb 3: anti Alb
4: anti α_1 -AT 5: anti α_1 -ACT 6: anti α_1 -AG
7: anti α_1 -m 8: anti α_2 -M 9: anti Cp 10: anti Hpt
11: anti Hx 12: anti RBP 13: anti Tf
14: anti α_1 -T 15: anti WHS

Fig. 3. Immunoelectrophoretic patterns of purified α_1 -T.

3. 自家製抗 α_1 -T 血清および抗 α_1 -T モノクローナル抗体の分析

精製 α_1 -T で免疫したウサギから得た自家製抗血清は、免疫電気泳動においては精製 α_1 -T との反応で市販の抗 α_1 -T と同じ α_1 領域の位置に沈降線を形成し (Fig. 3), Ouchterlony 法では精製 α_1 -T と健常ヒト血清との反応において各々単一の沈降線を示し、それらは完全に融合した (Fig. 4)。一方、抗 α_1 -T モノクローナル抗体は、精製 α_1 -T の PAGE と SDS-PAGE による Western blotting の結果、PAGE では α_1 領域、SDS-PAGE では分子量 77,500 の蛋白染色と同一の位置に発色バンドが認められた (Fig. 5)。

Fig. 4. Specificity of anti α_1 -T rabbit serum analysed by Ouchterlony immunodiffusion.

1: NHS 2: purified α_1 -T 3: anti α_1 -T (rabbit)
4: anti α_1 -T (serotec) 5: anti WHS

Fig. 5. Specificity of anti α_1 -T monoclonal antibody analysed by Western blotting.

1: Marker 2: α_1 -T stained with amido black 10B
3: α_1 -T detected by Western blotting

4. 精製 α_1 -T のアミノ酸組成と部分一次構造の決定

3 Nメルカプトエタンスルホン酸加水分解法により分析した精製 α_1 -T のアミノ酸組成は Table 2 に示した。分析結果は、トリプトファンがほとんど含まれず、その組成も Schwick ら²⁾の結果とほとんど一致した。また、精製 α_1 -T の部分一次構造については、N末端がブロックされていたためトリプシン処理により精製 α_1 -T をペプチドに切断し、その中の3つのペプチドについてアミノ酸配列を決定した (Table 3)。このうち10個のアミノ酸配列を決定した T₁ ペプチド (Glu-Ser-Leu-Leu-Asn-His-Phe-Leu-Tyr-Glu-) については、三井情報開発の PRINAS で検索した結果、これまで一次構造が明らかにされているいかなる蛋白質とも homology を有するものは全く見出されなかった。他の2つのペプチドについては、部分的にどちらのアミノ酸が決定できない所があった。

Table 2. Amino acid composition of α_1 -T .

Amino acids	composition (residues per 100 amino acid residues)	
	3N mercaptoethane sulfonic acid	Unpublished results by Schwick
Asp	13.7	12.1
Thr	5.9	4.6
Ser	6.8	6.8
Glu	10.1	13.9
Pro	4.2	4.6
Gly	3.3	2.8
Ala	6.0	5.0
half-Cys	^a ND	4.9
Val	7.1	5.5
Met	1.2	1.2
Ileu	4.2	4.1
Leu	8.8	8.5
Tyr	2.0	3.1
Phe	9.3	6.8
His	3.4	2.2
Lys	9.4	9.3
Trp	^a ND	0.3
Arg	4.6	4.1

^aND ; not detected

Table 3. Partial amino acid sequences of α_1 -T.

T ₁ - Peptide	Glu-Ser-Leu-Leu-Asn-His-Phe-Leu-Tyr-Glu-.....
T ₂ - Peptide	Phe-Leu-Pro-Asn-Leu- [°] Val-Ser-Lys
T ₃ - Peptide	Leu-Ala-Val-Gln-Leu- [°] Val-Ser-Thr-Glu-Glu-Leu- [°] Ala-Val -Leu-Gly-Glu-.....

。..... not determined

考 察

α_1 -Tの精製法に関する報告は、これまでほとんどなく、われわれは、ヒト血清から高純度の α_1 -Tを得る方法を初めて確立した。その結果、 α_1 -Tの部分一次構造を決定することができ、また、精製 α_1 -Tを使用して抗 α_1 -T血清および抗 α_1 -Tモノクローナル抗体を得ることができたが、これらは、今後の α_1 -Tの機能や臨床的意義の解明の基礎となるものである。

α_1 -Tの分子量は、HauptとHeideらは60,000と報告し、その後同じグループのSchwickらは85,000としているが、われわれの行ったSDS-PAGEによる結果では、77,500であった。これらの差は、おそらく精製法の相違、ことに、 α_1 -Tの安定性への影響が考えられる。等電点については、Schwickらの結果とほぼ一致しており、アミノ酸組成の結果も同様に一致していた。アミノ酸組成の中でCysおよびTrpが決定できなかったのは、3 Nメルカプトエタンスルホン酸で加水分解したときCysは分解し易いこと、Trpについては、 α_1 -T中の含量が非常に少ないことによるものである。

以上の点や免疫電気泳動およびOuchterlony法等の結果により、われわれの精製した蛋白は α_1 -Tであり、その純度も充分なものであることがわかった。従って、この精製 α_1 -Tをトリプシン処理して得られたペプチドの10個のアミノ酸配列は、他の血漿蛋白の一次構造に一致するものがなかったことから、 α_1 -Tの部分一次構造を示すものであることが確認できる。

今回精製した α_1 -Tを使用して作製した抗 α_1 -T血清および抗 α_1 -Tモノクローナル抗体は、抗 α_1 -T血清については、ヒト血清との反応において市販抗 α_1 -T血清とOuchterlony法で融合すること、抗 α_1 -Tモノクローナル抗体については、Western blottingで精製 α_1 -Tと確実に反応することなどから α_1 -Tのみに特異的な抗体である。今後、われわれは、これらの抗

体を使用して α_1 -Tの機能、産生部位および病態検査上の意義について更に研究を進め解明して行きたい。

ヒト α_1 -Tの精製の研究当初、著者らは、今までに報告されている唯一の α_1 -T精製法であるHauptとHeide¹⁾らの硫酸-リバノール-エタノール沈殿法による分離を試みたが充分に α_1 -Tを精製し得なかった。理由としては、沈殿法だけでは、数種の組み合わせをしても他の血漿蛋白成分が微量入ってきてしまうためであり、後々抗血清を作製するときにも吸収操作により力価を下げる一因になる。そこで5段階のカラムクロマトにより α_1 -Tの精製を新たに開発したが、 α_1 -Tが血漿蛋白としては含量が少ないこと、分子量がアルブミン、トランスフェリンなどの主要血漿蛋白と近似し、また物理化学的性状も種々の血漿蛋白と大きく異なる点が少ないことから、精製法のカラム分離ステップが多くなり、その結果高収率の精製品を得ることは、困難であった。より高い精製収率を上げるため一つの方法として、 α_1 -Tに対するモノクローナル抗体のアフィニティークロマトグラフィーを利用して3段階のカラム操作を行うことによりかなり改善されたと考えられる。

今後、更に収率を上げて行くためには、今回得られたアミノ酸組成からみたときに α_1 -Tはかなり親水性に富む蛋白と考えられ、この性質を利用したハイドロフォービッククロマトグラフィーを分離ステップに組み入れることが有用であるかも知れない。

ま と め

ヒト α_1 -T glycoproteinを血清より分離精製し、アミノ酸組成と部分一次構造を決定し、特異抗体(monoclonal and polyclonal)を作製した。 α_1 -Tは、分子量77,500、等電点PI4.5、アミノ酸組成では、トリプトファンが極めて低含量であった。

文 献

- 1) Haupt, H. and Heide, K. : Clin. Chim. Acta, **10** : 555, 1964.
- 2) Schwick, H. G., and Putnam, F. W. : The Plasma Proteins 4 . 177, Academic Press, Inc. 1984.
- 3) Davis, B. J. : Ann. N. Y. Acad. Sci., **121** : 404, 1964.
- 4) Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem., **244** : 4406, 1969.
- 5) 堀尾武一, 他 : 臨床化学, **10** : 102, 1981.
- 6) Ouchterlony, O. : Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1967.
- 7) Graber, P. and Williams, C. A. : Biochim. Biophys. Acta, **10** : 193, 1953.
- 8) Kohler, G. and Milstein, C. : Nature, **256** : 495, 1975.
- 9) Kohler, G. and Milstein, C. : Eur. J. Immunol., **6** : 511, 1976.
- 10) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 4350, 1979.
- 11) Penke, B., Ferenczi, R. and Kovacs, K. : Anal. Biochem., **60** : 45, 1974.
- 12) Creamer, L. K. and Matheson, A. R. : N. Z. J. Dairy. Sci. Technol., **11** : 211, 1976.
- 13) Lowry, O. H. : J. Biol. Chem., **193** : 265, 1951.