[シンポジウム：尿蛋白一病態解析へのアプローチ]

ヒトプロテイン 1 (クララ細胞 10kDa 蛋白)

——精製から臨床応用まで——

山口哲司・山田俊幸・奥谷竜太・伊藤喜久

SUMMARY

Human protein 1 (P1) was originally found in urine as a low molecular weight protein. We purified this protein from pathological urine, analyzed its amino acid sequences, and thus demonstrated structural identity with human lung Clara cell 10 kDa protein. Monoclonal antibodies were prepared and utilized for a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring P1 concentration. Considerable amount of P1 was found in seminal fluids. This gave a cause for marked sex-associated differences in urinary P1 levels. Serum P1 levels were decreased in smokers as compared with those in non-smokers, probably representing altered function of lung Clara cells. In order to investigate biological functions of P1, recombinant P1 was prepared. Confirming a previous report on the inhibition of phospholipase A₂, we also demonstrated that the protein inhibited phospholipase C activities, suggesting a possible role of P1 in modulation of inflammation at affected sites.

Key words: protein 1, Clara cell 10 kDa protein, monoclonal antibody, phospholipase A₂, phospholipase C

はじめに

ヒトプロテイン 1 (P1) は, Jackson ら¹⁾により腎不全患者尿から精製された分子サイズ 14 kDa, 等電点 (pI) 4.7 を示す低分子蛋白質であり, 70 アミノ酸残基からなるサブユニットが, 3 位と 69 位の 2 つのシステインによって S-S 結合したホモダイマーとして存在している. P1 は低分子蛋白質であり, 尿管障害における動態検索から, 妊婦²⁾ やカドミウム中毒患者³⁾ において他の低分子蛋白質と同様に尿中濃度が上昇することが認められている. 著者らは, これまで尿中より種々の蛋白質を分離同定しており, この研究過程で SDS-PAGE において分子量 14,000 付近に未同定のバンドの存在に気付いていた. そこで SDS-

PAGE をプローブに予備実験を行い, この結果を参考に精製に着手した.

本稿では, P1 の尿からの精製, 抗 P1 モノクローナル抗体の作製と測定系の確立, 血中, 尿中における P1 の動態とその意義, リコンビナント P1 による phospholipase A₂ と phospholipase C への作用など研究成果の一部を紹介する.

尿中よりの P1 精製

β_2 -ミクログロブリン⁴⁾, α_1 -ミクログロブリン⁵⁾などの精製法に準じて硫酸塩析法, 各種クロマトグラフィーを組み合わせる精製法を確立した. 尿中レチノール結合蛋白 (RBP) は分子量 21,000, pI 4.7 で P1 と性状が類似しており, 20 倍も尿中濃度が高いた

Human protein 1/Clara cell 10 kDa protein: From its purification to clinical application.

Tetsuji Yamaguchi, Toshiyuki Yamada, Ryuta Okutani, Yoshihisa Itoh; 自治医科大学臨床病理学教室

Correspondence address: Tetsuji Yamaguchi, Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, 3311-1, Minami-kawachi-machi, Tochigi 329-04, Japan.

第 47 回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

Fig. 1. Procedure for the purification of protein 1 from urine.

め分離に困難を要した。すなわち慢性腎不全患者尿を塩析し、Con A アフィニティークロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、RBP を抗体カラムで吸収後、Mono Q イオン交換クロマトグラフィーで P1 を最終的に精製した (Fig. 1)。精製 P1 の SDS-PAGE における分子サイズは 14 kDa であり、pI 4.7 で Jackson らの報告と一致した。還元処理により 7 kDa の単一バンドを形成することからホモダイマーであることが示唆された。モノクローナル抗体作製後は尿を塩析後、抗体結合アフィニティークロマトグラフィーと逆相 HPLC で精製を行い、41.6% から 60.2% への収量の改善を得た。

マスペクトロメトリーによる精製 P1 の分子量は 15,800 であり、アミノ酸配列から計算した値とほぼ一致した。

精製した P1 のアミノ酸配列は、データベース検索により肺クララ細胞 10 kDa 蛋白 (CC 10) と同一構造であることが判明した。

抗体の作製と測定系の確立

まず、抗 P1 モノクローナル抗体 (6D4) とポリクローナル抗体とを組み合わせた ELISA 法を確立し

Fig. 2. Standard curve of a sandwich ELISA for protein 1.

た⁶⁾。P1 の基礎、臨床研究を幅広く展開するために、さらに多くの種類のモノクローナル抗体の必要性を考え、モノクローナル抗体の作製を行い、8 種のモノクローナル抗体 (TY-1~8) が得られた (未発表データ)。

これらの抗体を組み合わせるサンドウィッチアッセイを行い、至適な 2 種抗体 (TY-1 と TY-2) を選択し、新たにビオチン-アビジンシステムによるサンドウィッチ ELISA 法を確立した (Fig. 2)。96 穴プレートにコーティングした TY-2 とビオチニル化した TY-1 で P1 をサンドウィッチし、酵素標識したストレプトアビジンを反応させた後、酵素活性を 490 nm で測定した。前 ELISA 法と比べ感度、測定範囲が、5 pg/ml~40 ng/ml と大きな改善を得、精度や回収率も良好な結果を示した。種々の体液測定において、前 ELISA 法との相関関係は、いずれも相関係数 0.95 以上であり、現在に至るまで本測定法を利用している。

体液中の P1 の分布と産生組織の追及

P1 は低分子蛋白質であり、種々の体液中に広く分布している (Table 1)。健康者尿における年齢性差別変動では、小学生には男女差はなく、中学生から男性は女性に比べ高値を示し性差が出現し、生殖年齢で顕著となった。この男女差の解明のために、成人 7 名について 4 分配尿の測定を行ったところ、男性尿では開始尿が高くここから漸減し、終末尿において女性尿中濃度と近似する結果を得た (Fig. 3)。性差の原因は、精漿由来の P1 が混入すると考え、そこで精漿中の P1 を測定したところ、1000 µg/l を超える濃度を示

Table 1. Protein 1 values in various body fluids⁷⁾.

Sample	No.	Mean (Range, $\mu\text{g/l}$)
Spot urine		
Male	18	14.2(1.7-42.7)
Female	18	1.0(0.2-4.2)
Seminal fluids	46	1030.0(145-8600)
Serum		
Male	9	11.8(3.0-19.1)
Female	9	13.4(8.3-19.1)
Bronchioalveolar lavage fluids	16	1222.2(147.2-2677.3)
Gastric juices	10	158.2(0-1221.8)
Cerebrospinal fluids	10	0.4(0-2.1)
Synovial fluids	4	4.6(4.2-5.2)

Fig. 3. Protein 1 value in 4 divided voided urine in male.

した。また、ウエスタンブロッティングにおいても尿中 P1 と構造的に同一であった。さらに P1 の産生組織の追及のため、RT-PCR を行い前立腺組織の mRNA の存在を確認した (Fig. 4)。つまり、男性尿中 P1 は、血漿由来と前立腺由来から構成され、後者は排尿時に精漿から尿へと混入され、この結果として女性尿に比べ高値を示すと考えられた。最近、酵素抗体染色により男性前立腺および女性前立腺 (Skene's gland) においても、P1 の局在が確認されている⁸⁾。

P1 が CC 10 と同一構造であることから、抗 P1 抗体を肺組織の酵素抗体染色に応用し、P1 のクララ細胞における局在を証明した⁹⁾。さらに喫煙者では、非喫煙者に比べ血中 P1 濃度が有意に低下していることを示した。肺胞洗浄液中 P1 濃度も喫煙者で同様に低下しており、組織化学的検索による P1 陽性細胞数の低下と染色性の低下を認め、血清や肺胞洗浄液における P1 の動態変化を裏付けた。

Fig. 4. RT-PCR for protein 1 in prostate.

lane 1, DNA maker; lane 2, RT-PCR of prostate RNA using P1 primers; lane 3, PCR of PlcDNA using P1 primers.

P1 の機能

尿からの P1 の精製には、多くの操作や時間を要するため、より大量に純度の高い、構造的に均一性のあ

Fig. 5. (a) Effect of recombinant protein 1 on phospholipase A₂ activity¹⁰⁾, (b) Effect of recombinant protein 1 on phospholipase C activity¹⁰⁾.

closed circles, porcine PLA₂; opened circles, cobra venom PLA₂.

るリコンビナント P1 (rP1) を作製した. λgt 11 に挿入した P1 の cDNA をテンプレートとし, PCR により増幅させた後 pET 21 a(+)-ベクターとライゲーションし, 大腸菌 BL 21 にトランスフォームした. 挿入部分の塩基配列は, DNA sequencing kit を用い確認した. その後, IPTG 刺激により rP1 を産生させた.

この rP1 を用いて, P1 の phospholipase 阻害作用について検討した. プタ臍臓, コブラ毒 phospholipase A₂ (PLA₂) と rP1 をブレインキュベーションした後, 基質として arachidonyl phosphatidylcholine を作用させると, rP1 濃度依存に両方の PLA₂ の活性を抑制した (Fig. 5a). その阻害様式については, P1 が直接 Ca イオンと結合する, または基質と結合するために PLA₂ の活性を阻害すると思われる. 一方, recombinant phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PLC) に rP1 と基質として phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate を作用させると, rP1 濃度依存に PLC の活性を抑制した (Fig. 5b). PLC の活性阻害様式についても, 同様な機序が作用しているものと推測できる. P1 は, インターフェロン γ の産生と活性を抑制するという報告¹¹⁾ もあり, P1 は炎症の制御に重要な役割をもつと思われる.

まとめ

慢性腎不全患者尿から P1 を精製し, モノクローナ

ル抗体の作製と測定系を確立した. 体液中における P1 の分布から, 尿における男女差の成因や喫煙との関係を明らかにし, 肺クララ細胞において P1 抗原を, 前立腺において P1 mRNA を検出した. さらに, リコンビナント P1 を用いて, P1 が PLA₂ のみならず PLC の活性をも阻害することを突き止めた.

本研究の一部は, 文部省科学研究費 (課題番号 08672648) および黒住医学振興財団研究助成金による.

文献

- 1) Jackson PJ, Turner R, Keen JK, Brooksbank RA, Cooper EH. Purification and partial amino acid sequence of human urine protein 1. *J Chromatogr* 1988; 452: 359-67.
- 2) Bernard A, Thielemans N, Lauwerys R, Lierde MV. Selective increase in the urinary excretion of protein 1 (Clara cell protein) and other low molecular weight proteins during normal pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 871-8.
- 3) Bernard AM, Roels H, Cardenas A, Lauwerys R. Assessment of urinary protein 1 and transferrin as early markers of cadmium nephrotoxicity. *Br J Ind Med* 1990; 47: 559-65.
- 4) Itoh Y, Kawai T. A latex agglutination test for urinary β_2 -microglobulin. *Contrib Nephrol* 1988; 68: 172-8.
- 5) Itoh Y, Kawai T. Human α -microglobulin: its

- measurement and clinical application. J Clin Lab Analysis 1990; 4: 374-6.
- 6) Okutani R, Itoh Y, Hirata H, Kasahara T, Mukaida N, Kawai T. Simple and high-yield purification of urine protein 1 using immunoaffinity chromatography: evidence for the identity of urine protein 1 and human Clara cell 10-kilodalton protein. J Chromatogr 1992; 577: 25-35.
 - 7) Itoh Y, Ishii S, Okutani R, Asano Y, Kawai T. Protein 1: its purification and application in clinical medicine. J Clin Lab Anal 1993; 7: 394-400.
 - 8) Zaviacic M, Danihel L, Ruzicova M, Blazekova J, Itoh Y, Okutani R, Kawai T. Immunohistochemical localization of human protein 1 in female prostate (Skene's gland) and the male prostate. Histochem J 1997; 29: 219-27.
 - 9) Shijyubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Shibuya Y, Morita Y, Hirasawa M, Okutani R, Kawai T, Abe S. Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. Eur Respir J 1997; 10: 1108-14.
 - 10) Okutani R, Itoh Y, Yamada T, Yamaguchi T, Singh G, Yagisawa H, Kawai T. Preparation and characterization of human recombinant Protein 1/Clara cell Mr 10000 protein. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 691-6.
 - 11) Dierynck I, Bernard A, Roels H, De Ley M. Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by Clara cell protein CC16. Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 12: 205-10.

要 旨

われわれは、患者尿からヒトプロテイン1 (P1) を精製し、構造解析、物理化学的性状を検索した。一次構造を決定したところ、クララ細胞産生 10 kDa 蛋白 (CC10) と同一であることを見出した。さらに抗 P1 モノクローナル抗体を作製し、サンドイッチ ELISA 法を確立し、体液中の P1 の測定を行った。精漿中には P1 が豊富に存在し、尿中濃度における男女差の原因であることを突き止めた。肺胞洗浄液にも豊富に存在することから、喫煙との関係を検索したところ、非喫煙者に比べて喫煙者の血清中 P1 の低下が認められた。リコンビナント P1 は、phospholipase A₂, phospholipase C の活性を抑制し、炎症反応に関与する可能性が示唆された。