

糖尿病性腎症における尿中糖蛋白分析：  
ウエスタンブロッティング分析によるレクチン結合パターン

奈良県立医科大学第1内科学教室

中島靖夫

ANALYSIS OF URINARY GLYCOPROTEINS FOR DIABETIC NEPHROPATHY :  
WESTERN BLOTTING ANALYSIS USING PEROXIDASE LABELED LECTINS

YASUO NAKASHIMA

*The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received November 21, 1994

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the clinical usefulness of polyacrylamide gel electrophoresis, followed by reaction with peroxidase-coupled lectins using urinary glycoproteins in 20 patients with diabetic nephropathy. After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), high performance lectin affinity chromatography (HPLAC) and immunoblotting of urinary glycoproteins with  $\alpha_1$ -acid glycoprotein ( $\alpha_1$ -AG) and  $\alpha_1$ -microglobulin ( $\alpha_1$ -MG) were performed.

The lectins used were derived from *Triticum vulgare* (WGA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E<sub>4</sub>), *Dolichos biflorus* (DBA) and *Lens culinaris* (LCA), which had a high affinity for  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc), N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc),  $\alpha$ -galactosamine ( $\alpha$ -GalNAc) and  $\alpha$ -mannose ( $\alpha$ -Man) residues, respectively.

Electrophoretic patterns of urinary glycoproteins clearly showed the presence of lectin-reactive glycoproteins with molecular weights lower than that of albumin. The molecular weights of the main bands that reacted with WGA, namely PHA-E<sub>4</sub> and LCA, were respectively 50,000 and 38,000 daltons, and increased with the progression of diabetic nephropathy.

WGA reacted strongly with many glycoproteins having a wide range of molecular weights. LCA and PHA-E<sub>4</sub> reacted preferentially with glycoproteins of molecular weight lower than 50,000 daltons, but with DBA no reaction was observed.

These results suggest that low molecular-weight glycoproteins that are observed in the urine of patients with diabetic nephropathy have abundant carbohydrate residues such as GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc, GalNAc and  $\alpha$ -Man, and include  $\alpha_1$ -AG and  $\alpha_1$ -MG.

The excretion of low-molecular-weight glycoproteins with high affinities for some lectins suggests organic impairment in diabetic nephropathy.

**Index Terms**

diabetic nephropathy, electrophoretic analysis, high performance lectin affinity chromatography, lectin

---

## はじめに

糖尿病の糸球体病変は蛋白尿に先行して出現する<sup>1)</sup>ので、糖尿病性腎症の早期診断は腎生検に頼らざるを得ないのが現状である。したがって、尿蛋白陰性時期での糸球体病変の推定を可能にする臨床指標の確立は糖尿病性腎症の早期診断に欠かせないことになる。そこで、アルブミン<sup>2)</sup>、NAG 活性<sup>3,4)</sup>、 $\alpha_1$ -microglobulin( $\alpha_1$ -MG)<sup>4)</sup>、シアル酸<sup>5)</sup>、酸可溶性蛋白(acid soluble proteins; ASP)<sup>6,7)</sup>などの尿中排泄物質に関する検討がすすめられているが、現時点では単一あるいは複数の尿中排泄物質を測定しても糖尿病性腎症を確実に診断できるとはいえない。教室の西浦<sup>8)</sup>は尿中糖蛋白の電気泳動分析が糖尿病性腎症の病期判定に有用であると報告したが、尿中糖蛋白の質的变化や糖鎖構造の変化は不明のままである。そこで著者は糖尿病性腎症患者の尿中糖蛋白に対して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)およびウエスタンブロッティング法を実施し、糖尿病性腎症患者における尿中糖蛋白結合糖鎖の特異性を標識レクチン染色法で検討した。つまり著者は、植物レクチンがそれぞれ固有の糖鎖構造と特異的に結合する性質を利用して糖蛋白の尿中排泄動態を検討し、さらにレクチン親和性高速液体クロマトグラフィー(high performance lectin affinity chromatography; HPLAC)で分離した

糖尿病性腎症患者の尿中糖蛋白を酵素抗体法で同定した。

## 対象と方法

## 1. 対象

対象は腎生検を施行し得たインスリン非依在性糖尿病患者 20 例であり、その性別が男性 12 例、女性 8 例、年齢が 35~64(平均 52)歳であった。なお、健常対照に 26~35(平均 30)歳の男性 5 例を選んだ。

## 2. 方法

## (1) 検体

24 時間尿の一部を冷凍庫内(-25℃)で凍結保存し、本研究に供した。被検尿を 100×g、5 分間遠心後、上清 15 ml を透析チューブ Spectrapor-6(Spectrum Medical Industries 社, USA)を用いて 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> に対して 4℃、48 時間透析し、分子量 1,000 以下の低分子成分および塩を除去した。透析後に試料を凍結乾燥し、0.4 ml の 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> に溶解した(濃縮尿)。

また、健常対照の空腹時血清を比較試料とした(対照血清)。

## (2) 蛋白量測定

濃縮尿の蛋白量は BCA(Bicinchoninic acid)蛋白質定量試薬(Pierce 社, USA)を用いる Smith et al.<sup>9)</sup>の方法に準じて測定した。本法による蛋白の検出限界は 5 μg/ml であった。

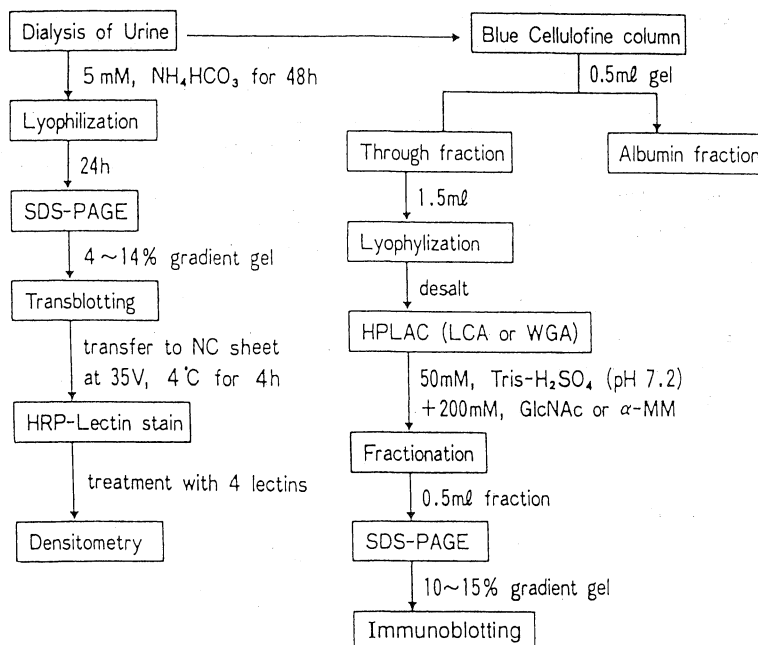


Fig. 1. Analytical methods.

## (3) SDS-PAGE

10  $\mu$ l の濃縮尿あるいは対照血清を1% 2-mercaptoethanol と1% SDS を含有する10  $\mu$ l の8M 尿素溶液と混和して、65°C で30分間、放置して蛋白質を変性させ、泳動用試料とした。支持体には、4~14%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル(スラブ型、厚さ1mm)を、泳動用緩衝液には0.1% SDS 含有0.1M リン酸緩衝液(PBS)(pH 7.2)を用いた<sup>10)</sup>。試料には蛋白量を5  $\mu$ g/ $\mu$ l に調整した尿を用い、10  $\mu$ l の試料を濃度勾配ゲルに添加して室温で60 mV、15時間泳動した(Fig. 1)。

## (4) ウェスタンブロッティング法

上記の電気泳動後、トランスブロッティング装置(AE 3280型、アトー社)を用いる Towbin et al.<sup>11)</sup>の方法に準じ、直ちにスラブゲルを0.45  $\mu$ m のニトロセルロース膜(NC膜; アドバンテック社)に密着させて糖尿白質を転写した。転写用緩衝液には25 mM トリス、192 mM グリシン、20%メタノール(pH 8.3)を用い、4°C、35V で4時間通電した。転写後、NC膜のSDSを除去するため、0.9% NaCl、0.05% Tween 20 含有10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で10分間の緩徐な振盪洗浄を3回反復した。

## (5) レクチン染色

糖鎖結合特異性の異なるペルオキシダーゼ標識レクチンとして、小麦胚芽レクチン(WGA, 豊年製油社)、アカインゲンマメレクチン(PHA-E<sub>4</sub>, 豊年製油社)、ドリコスマメレクチン(DBA, 豊年製油社)およびレンズマメレクチン(LCA, 豊年製油社)を用いた(Table 1)。終濃度が5  $\mu$ g/ml になるようにレクチンを溶解した1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.9% NaCl 加50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)でNC膜を覆い、室温で30分間反応させた。ついで、0.9% NaCl、0.05% Tween 20 含有0.01 M リン酸緩衝液(PBS)で5分間の緩徐な振盪洗浄を6回反復した。ペルオキシダーゼ反応の基質に用いた0.3% 4-chloro-1-naphthol のメタノール溶液と0.018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有0.1 M PBS の混合溶液(1:5)でNC膜を覆い、室温で5分間染色した<sup>12)</sup>。蒸留水でNC膜を洗浄し、反応を停止させた。NC膜の泳動像を直ちに写真撮影し、二波長

クロマトスキャナー(Model CS-920, 島津製作所)で波長680 nm の走査による濃度分布を測定した。なお分子量マーカーには分子量17,000, 27,000, 39,000, 50,000, 75,000 および130,000 の6種類の Pre-stained SDS-PAGE standards(Bio-Rad社, USA)を使用した。

## (6) HPLAC

凍結乾燥した尿50  $\mu$ l をブルーセルロファイン(Pharmacia Fine Chemicals社, Sweden)0.5 ml に吸着させてアルブミンを除去し、WGA およびLCA 結合カラム(4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mm, 豊年製油社)のゲルにそれぞれ10  $\mu$ l の試料を添加し、HPLAC(流速0.5 ml/min, 分析温度25°C)を実施した。WGA カラムではA液(50 mM ト

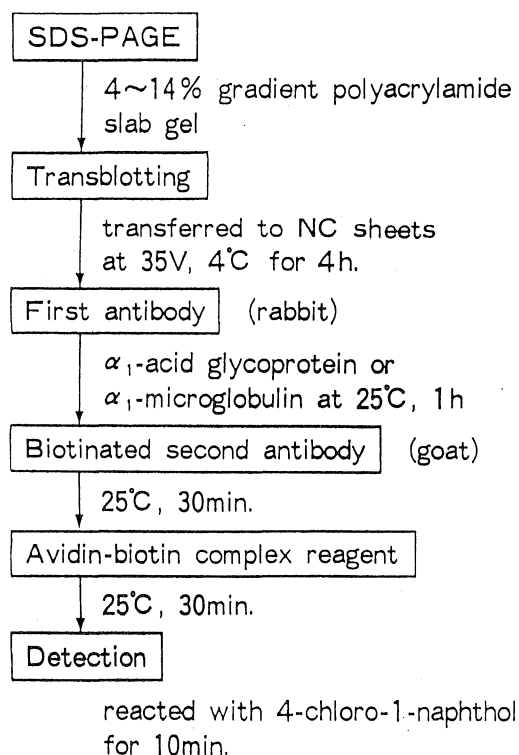


Fig. 2. Immunoblotting procedure of urinary glycoproteins from diabetic patients.

Table 1. Lectin used in this study

Lectin	Source	Sugar specificity
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 N-acetyl-D-Glucosamine Sialic acid
PHA-E <sub>4</sub>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	bisecting N-acetyl-D-Galactosamine
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	$\alpha$ -N-acetyl-D-Galactosamine
LCA	<i>Lens culinaris</i>	$\alpha$ -D-Mannose > $\alpha$ -D-Glucose Fucose

リス硫酸緩衝液, pH 7.2) に対する B 液 (200 mM N-acetyl glucosamine ; GlcNAc) の濃度勾配 (A → B : 20 分間) で溶出し, LCA カラムでは B 液 (methyl- $\alpha$ -mannoside ;  $\alpha$ -MM) の濃度勾配 (A → B : 20 分間) で溶出した。検出波長は 280 nm の走査で測定した。

(7) 酵素抗体染色法

泳動用試料 10  $\mu$ l を 4~14 % 濃度勾配 SDS-PAGE 後, NC 膜にウエスタンブロッティングした。その後,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein ( $\alpha_1$ -AG) の抗体 (抗ヒト  $\alpha_1$ -AG ウサギ IgG ; コスモバイオ社) および  $\alpha_1$ -MG の抗体 (抗ヒト  $\alpha_1$ -MG ウサギ IgG ; コスモバイオ社) を第 1 抗体としてアビジン-ビオチン複合法により染色した<sup>13)</sup>。まず, ブロッキング用ヤギ血清 180  $\mu$ l を溶解した 10 ml の 0.9 % NaCl 加 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) NC 膜を覆い, 20 分間反応させた。つぎに終濃度が 20  $\mu$ g/ml となるように各抗体を溶解した緩衝液で NC 膜を覆い, 室温で 1 時間反応させた。引き続き, 0.05 % Tween 20 含有 0.01 M PBS で 5 分間の緩徐な洗浄振盪を 2 回反復した。その後, ビオチン結合抗体 (ヤギ抗ウサギ IgG, Vector 社, USA) で NC 膜を覆い, 室温で 30 分間反応させた。そして, 5 分間の緩徐な振盪を反復して 2 回洗浄

した。この後, 90  $\mu$ l の ABC 試薬 (Avidin-biotin peroxidase complex ; Vector 社, USA) を溶解した 10 ml の 0.05 % Tween 20 含有 0.01 M PBS で NC 膜を覆い, 室温で 30 分間反応させた。同様に 5 分間の緩徐な振盪洗浄を 2 回反復した。ペルオキシダーゼ反応の基質に用いた 4-chloro-1-naphthol 溶液で NC 膜を覆い, 室温で 10 分間染色した。そして蒸留水で NC 膜を洗浄し, 反応を停止させた (Fig. 2)。

(8) 腎生検組織の分類

腎生検組織はびまん性病変の程度を Gellman et al. の基準<sup>14)</sup>に従って, PAS 染色標本で,

- 0 度 : 糸球体にほとんど変化がない,
  - I 度 : 糸球体の一部に PAS 陽性域の拡大を認め, このような変化をもつ糸球体が散在する,
  - II 度 : 糸球体全体に PAS 陽性域の拡大を認める,
  - III 度 : PAS 陽性域の拡大が強くなり, 血管腔に狭小がみられる,
  - IV 度 : III 度の変化がさらに高度となり, 一部硝子化したように見える,
- の 5 段階に分けた。

(9) 推計学的処理

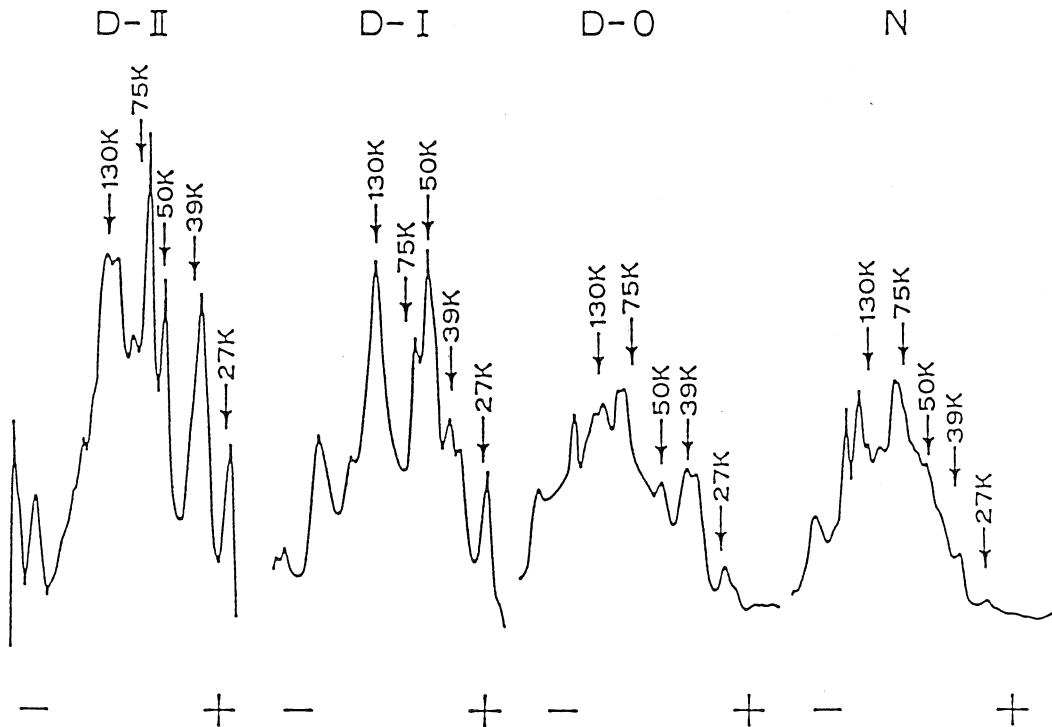


Fig. 4. Densitograms of western blot for urinary glycoproteins at 680 nm after staining with HRP-WGA. Each group is same as described in Fig. 3.

健常対照群と糖尿病群との群間比較は、Student の *t* 検定で有意水準を検討した。なお、本文中に記載した数値は、平均値 ±1 標準偏差を示す。

### 成 績

#### 1. 尿蛋白量

尿蛋白量は、健常対照群が 81 ± 16 mg/日、糖尿病群の 0 度が 122 ± 26 mg/日、I 度が 165 ± 118 mg/日、II 度が 198 ± 127 mg/日であり、各群間に差を示さなかった。

#### 2. レクチン染色

##### (1) WGA 染色

濃縮尿ではアルブミンを含む高分子域およびアルブミン以下の低分子域のいずれにも WGA 染色陽性のバンドが検出された。びまん性病変の進展とともに、分子量 50,000、38,000 および 26,000 に相当する 3 つのピークは増高した。対照血清では、WGA 染色陽性バンドは健常対照群および糖尿病群の両群でも分子量 50,000 以下の低分子領域には検出されなかった。今回使用した 4 種のレクチンのなかでは WGA が最も強い反応性を濃縮尿と示した (Fig. 3)。

Densitogram では、びまん性病変の進展とともに分子

量 66,000 から 26,000 の低分子域に、分子量 50,000、38,000 および 26,000 の 3 つの増加するピークが検出された (Fig. 4)。

##### (2) PHA-E<sub>4</sub> 染色

PHA-E<sub>4</sub> 染色陽性のバンドは、濃縮尿では、アルブミン以下の高分子域から低分子域まで広く存在し、今回検討した糖鎖結合特異性の異なるペルオキシダーゼ標識レクチンで WGA のつぎに濃染性を示した。対照血清の PHA-E<sub>4</sub> 染色陽性のバンドは、健常対照群および糖尿病群の両群で分子量 50,000 以下のバンドは検出されなかった (Fig. 5)。

Densitogram では、分子量 38,000 に相当する低分子糖蛋白のピーク高がびまん性病変の進展とともに増高する傾向を示した (Fig. 6)。

##### (3) DBA 染色

DBA 染色陽性のバンドは、健常対照群および糖尿病群の両群において濃縮尿および対照血清のいずれにも検出されなかった。

##### (4) LCA 染色

濃縮尿には 66,000 以下の低分子域に LCA 染色陽性バンドが存在しており、同バンドは糖尿病性腎症の進展

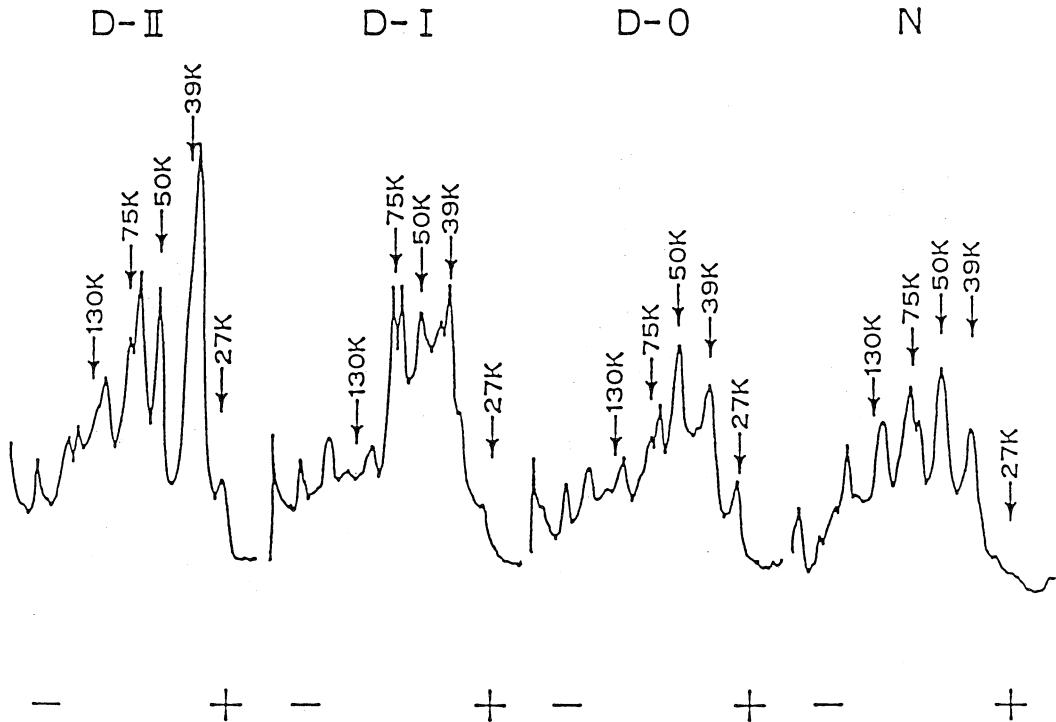


Fig. 6. Densitograms of western blot for urinary glycoproteins at 680 nm after staining with HRP-PHA-E<sub>4</sub>. Each group is same as described in Fig. 5.

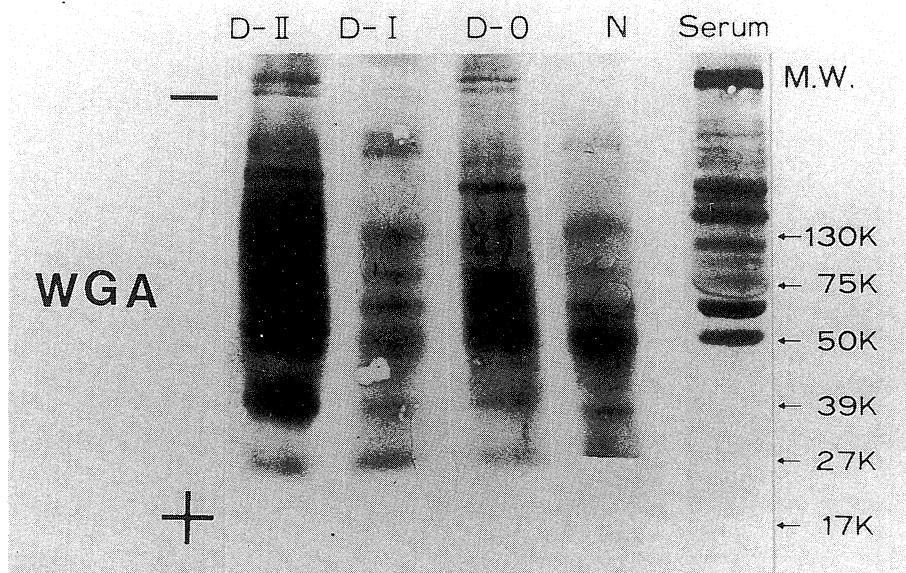


Fig. 3. Western blot analysis of urinary glycoproteins from diabetic patients. Each glycoprotein on SDS-polyacrylamide gels was electrophoretically transferred to a NC sheet and detected with HRP-WGA. D-II represents urine from grade II diabetic nephropathy; D-I, grade I; D-0, grade 0; N, normal control. Serum represents 20-fold diluted serum of normal control subjects. Molecular weight standards ( $M_r=130,000$ , 75,000, 50,000, 39,000, 27,000 and 17,000, in this order from the top).

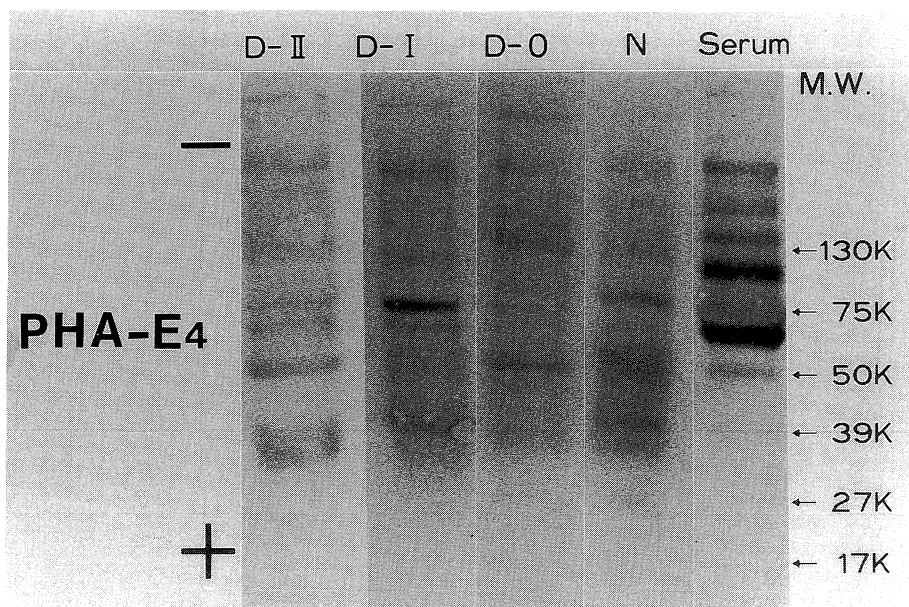


Fig. 5. Western blot analysis of urinary glycoproteins from diabetic patients. Each glycoprotein on SDS-polyacrylamide gels was electrophoretically transferred to a NC sheet and detected with HRP-PHA-E<sub>4</sub>. All conditions are same as Fig. 3.

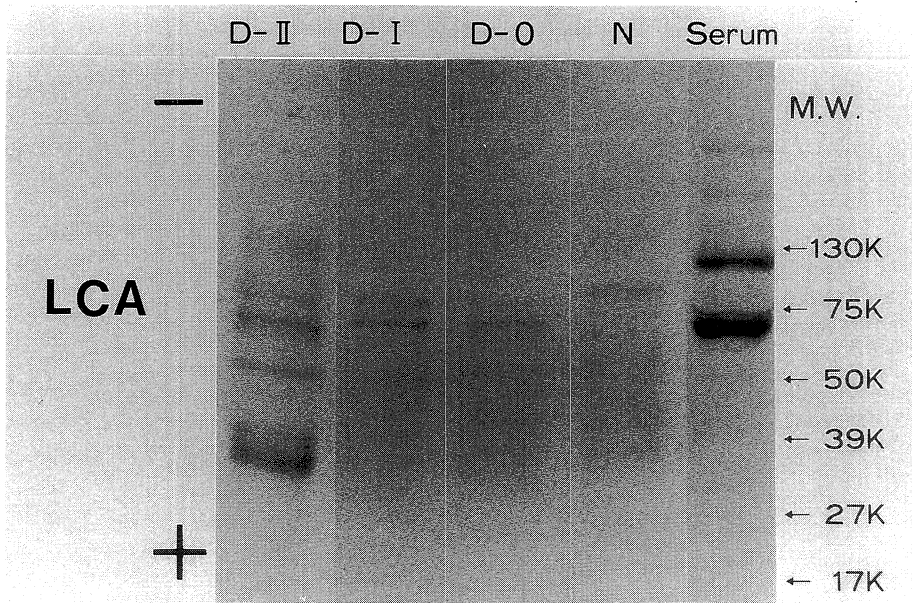


Fig. 7. Western blot analysis of urinary glycoproteins from diabetic patients. Each glycoprotein on SDS-polyacrylamide gels was electrophoretically transferred to a NC sheet and detected with HRP-LCA. All samples applied are same as Fig. 3.

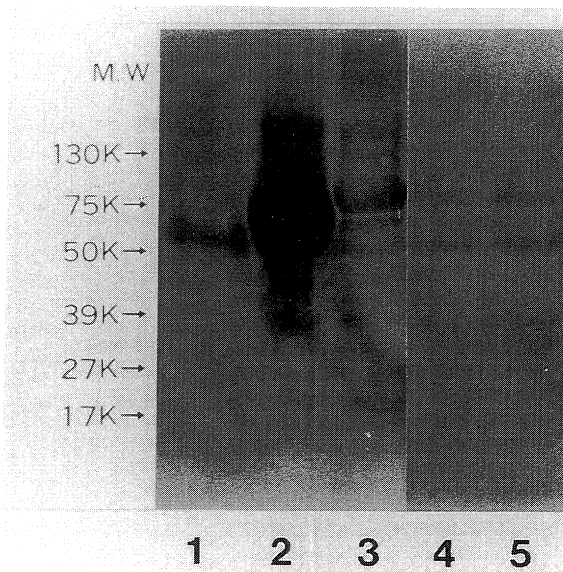


Fig. 10. Immuno-detection of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in urinary glycoproteins from diabetic patients. lane 1; urinary sulfosalicylic acid soluble mucoprotein, lane 2; control serum, lane 3; urinary glycoprotein from gradeII diabetic nephropathy, lane 4; fraction eluted at 7.5 min by WGA column, lane 5; fraction eluted at 6.5 min by LCA column.

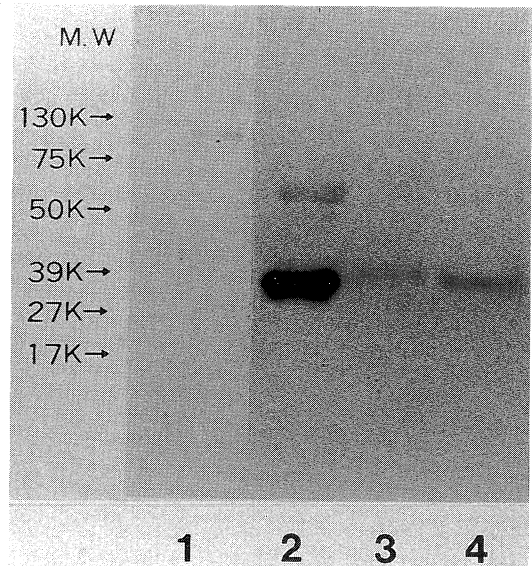


Fig. 11. Immuno-detection of  $\alpha_1$ -microglobulin in urinary glycoproteins from diabetic patients. All conditions are same as Fig. 10. lane 1; control serum, lane 2; urinary glycoprotein from gradeII diabetic nephropathy, lane 3; fraction eluted at 7.5 min by WGA column, lane 4; fraction eluted at 6.5 min by LCA column.

とともに濃染した。対照血清中には分子量 50,000 以下の LCA 染色陽性バンドは検出されなかったが、分子量 66,000 以上で検出された (Fig. 7)。

Densitogram では、50,000 と 38,000 の分子量に相当する糖蛋白のピーク高がびまん性病変の進展とともに増高した (Fig. 8)。

3. HPLAC による分離と同定

WGA に高親和性の糖蛋白は健常対照群の濃縮尿には検出されなかったが、糖尿病性腎症患者の濃縮尿では 7.5 分の溶出時間で分画された。また、LCA に高親和性の糖蛋白は健常対照群の濃縮尿には検出されなかったが、糖尿病性腎症患者の濃縮尿では 6.5 分の溶出時間で分画された (Fig. 9)。

4. 酵素抗体法

(1)  $\alpha_1$ -AG

$\alpha_1$ -AG 抗体で染色されるバンドは健常対照群および糖尿病群の尿では 80,000 および 50,000 に相当する分子量域に存在した (Fig. 10)。

(2)  $\alpha_1$ -MG

$\alpha_1$ -MG 抗体で抗体で染色されるバンドは健常対照群および糖尿病群の尿では 38,000 に相当する低分子量域に存在した (Fig. 11)。

考 察

従来から尿中蛋白のアルブミン<sup>2)</sup>、NAG 活性<sup>3)4)</sup>、 $\alpha_1$ -MG<sup>4)</sup>、シアル酸<sup>5)</sup>、ASP<sup>6)7)</sup>などが糖尿病性腎症の早期診断指標として用いられてきた。なかでも尿中アルブミンの測定は、腎症進展を予知する指標として広く認識されており、最近では一般臨床検査として応用されている。しかし、教室の金内ら<sup>15)</sup>の検討では、微量アルブミン尿を呈する症例はびまん性病変の軽微なものから Gellman 分類の II 度ないし III 度程度に進行したもので混在していたという。

糖尿病性腎症の進展とともに増加する尿中低分子糖蛋白の電気泳動分析が糖尿病性腎症の病期判定に有用であることを明らかにし、腎症の早期診断に応用した報告もあるが<sup>5)-8)</sup>、尿中糖蛋白の質的变化や糖鎖構造の変化は不明のままである。本研究は、糖尿病性腎症患者に認められる尿中糖蛋白を分子量および糖鎖の解析を目的に、糖蛋白糖鎖と特異的に結合する HRP 標識レクチンを用いた検討と 2 種類の酵素標識抗体を用いた分子量同定を実施した。

1. レクチン染色およびウエスタンブロッティング分析

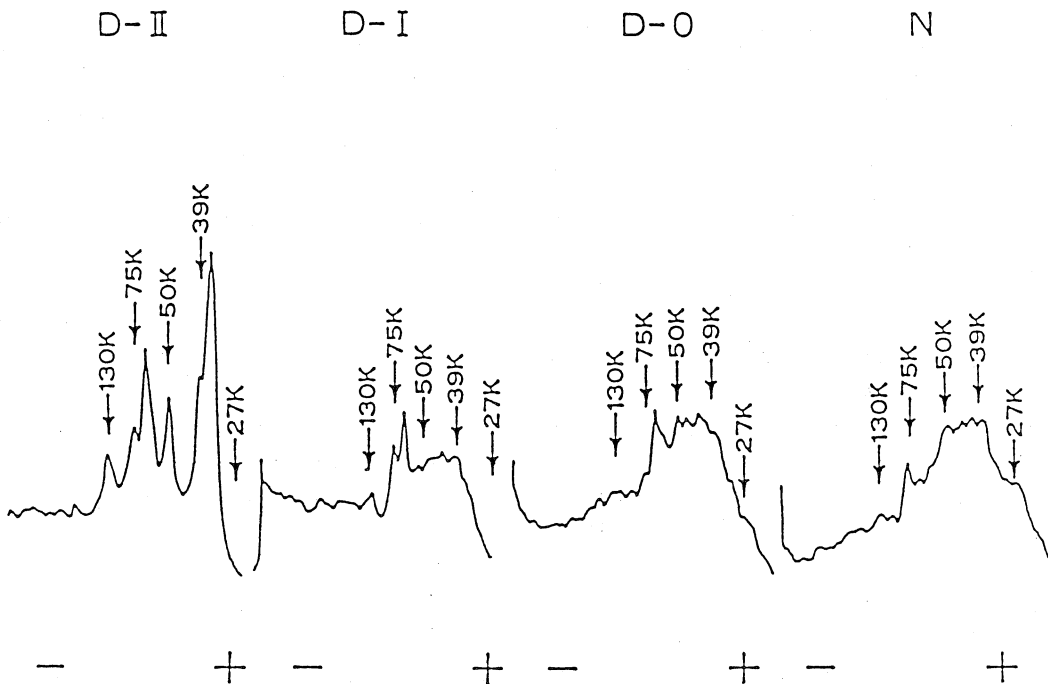


Fig. 8. Densitograms of western blot for urinary glycoproteins at 680 nm after staining with HRP-LCA. Each group is same as described in Fig. 6.



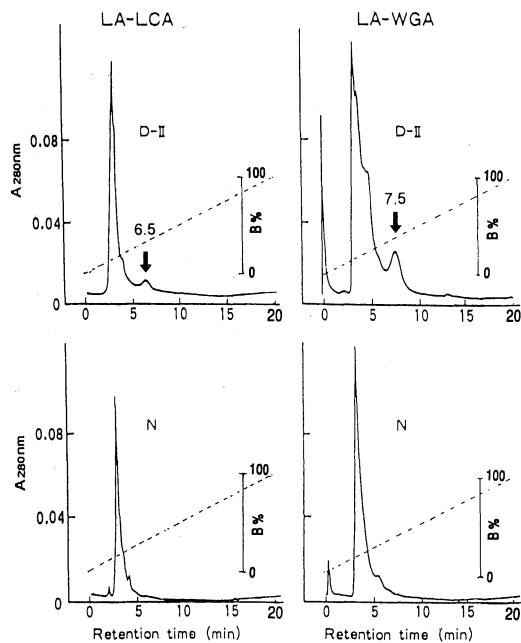


Fig. 9. Chromatograms of HPLAC for urinary glycoproteins from diabetic patients at 280 nm. D-II represents urine from grade II diabetic nephropathy; N, normal control. HPLAC was performed using two lectin conjugated columns, LA-WGA and LA-LCA, and glycoproteins were eluted with a linear gradient of 200 mM GluNAc or 200 mM  $\alpha$ -MM (B: dashed line) respectively, in 50 mM Tris- $H_2SO_4$  buffer (A). Arrows indicate the fraction eluted by LA-WGA at 7.5 min and by LA-LCA at 6.5 min, respectively.

従来より電気泳動後の蛋白染色には Coomassie brilliant blue (CBB) 染色や鍍銀染色, 糖の定性分析には Periodic acid-Schiff (PAS) 染色, Alcian blue 染色, Mucicarmine 染色などが用いられている<sup>16)</sup>, また, 血清糖蛋白の分析や組織糖蛋白の検出にはレクチン染色法が応用されている. 血清糖蛋白の分析について福島ら<sup>17)</sup>は, ヒマメレクチン (RCA) 用いる赤血球凝集阻止反応で肝細胞癌患者の血清中に Galactose (Gal) と N-Acetyl galactosamine (GalNAc) の 2 核の糖鎖を有する糖蛋白が増加していることを明らかにした. 遠藤<sup>18)</sup>は, 血清中の  $\alpha$ -fetoprotein をコンカナバリン A (ConA) 結合性分画と非結合性分画とに分けており, 肝細胞癌では結合性分画が増加することから肝細胞癌の早期診断に応用している. また, 菰田ら<sup>19)</sup>は alkaline phosphatase isozyme の糖鎖解析に WGA 染色法を応用しており, 血清糖蛋白の分析にはレクチン染色がきわめて有用と述べている. さ

Table 2. Low molecular proteins in human serum

Protein	M. W.	CHO (%)	mg%
post- $\gamma$ -globulin	11,500	0	trace
$\beta_2$ -microglobulin	11,800	0	0.15
lysozyme	14,600	0	1.0
retinol-binding protein	21,000	0	4.5
L-chain	22,000	0	trace
$\alpha_2$ -microglobulin	33,000	21.8	1.5
$\beta_2$ -glycoprotein III	35,000	10.0	10
$\beta_2$ -glycoprotein I	40,000	18.8	20
Zn- $\alpha_2$ -glycoprotein	41,000	18.2	5
Vitamin D-binding protein	41,000	4.2	40
$\alpha_1$ -acid glycoprotein	44,100	37.9	90
$\alpha_2$ HS-glycoprotein	49,000	13.4	60

らにレクチン染色法を用いた組織学的検索からピーナツレクチン (PNA) またはハリエンダレクチン-I (UEA-I) は大腸癌のマーカーとして有用であることが報告されている<sup>20)</sup>. しかし, 尿中糖蛋白の染色にレクチン結合性を応用した報告は見あたらない.

尿蛋白の電気泳動分析については, いくつかの報告がみられる<sup>21)-24)</sup>. Terabayashi<sup>21)</sup>は, 糖尿病患者では糸球硬化の出現とともに低分子蛋白成分の尿中排泄が増加することを報告しており, その低分子蛋白排泄量が糸球体硬化症の進展とともに増加するという. また, Virella et al.<sup>22)</sup>は, 低分子蛋白の尿中排泄増加が罹病期間 10 年未満の若年型糖尿病患者にも認められたことから, 尿細管障害が糸球体障害に先行する初期徴候であると述べている. 猪股ら<sup>23)</sup>は, 電気泳動法で低分子蛋白バンドが高分子蛋白バンドに比して優位に濃染される場合を tubular pattern と称している. さらに, 芝ら<sup>24)</sup>は, 尿中スルホサリチル酸可溶性  $\mu$  コ蛋白を SDS-PAGE で分画し, 健常対照群の尿には 3~10 本のバンドが認められ, 主要なバンドは分子量 94,000 の Tamm-Horsfall  $\mu$  コ蛋白であったという. 一方, 悪性腫瘍患者尿ではバンド数が 13 本に増加しており, しかも主要なバンドは分子量 45,000 の  $\alpha_1$ -AG であったという.

本研究は, SDS-PAGE 後のトランスブロットメンブレンを結合糖鎖特異性の異なるレクチンを用いて尿中糖蛋白の分子量分布を求め, 腎生検所見と対比したことに特徴がある. 今回の検討ではびまん性病変の進展とともに尿中糖蛋白の種類と排泄量の両者が増加していた. このうち, 主な低分子糖蛋白の分子量は 50,000 と 38,000 であった. 現在までに報告されている血清中の低分子蛋白には Table 2 に示すように多種類のものが存在するが<sup>25)</sup>, 糖含有量の多い低分子糖蛋白は分子量 49,000 から 33,000 の範囲にみられる.

尿中低分子糖蛋白は血清に由来する成分と腎尿路系の局所組織に由来する成分に大別される。まず、血清蛋白のうち分子量 60,000 以下の低分子蛋白は糸球体基底膜を容易に通過し、尿細管で再吸収・異化される。しかし、尿細管障害患者では蛋白質の再吸収は低下するが、すべての低分子糖蛋白が同程度に再吸収障害を受けることはないという<sup>26)</sup>。例えば、カドミウム中毒、感染後慢性間質性腎炎、アミノグリコシド投与による腎障害、上部尿路感染症、熱傷後腎障害などでは、血清クレアチニンに有意の上昇を示さない早期から非選択的尿細管性蛋白尿が認められる。しかし、急性腎炎回復期や骨髄腫における早期の腎障害では $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ -MG)や retinol-binding protein(RBP)はほとんど排泄されないが、 $\alpha_1$ -MG や  $\alpha_1$ -AG の尿細管性蛋白尿が認められるとされている<sup>27)</sup>。 $\beta_2$ -MG や RBP のように糖鎖をもたない低分子蛋白と  $\alpha_1$ -MG や  $\alpha_1$ -AG などの糖質を多量に含有する低分子蛋白では、尿中排泄動態の異なることが明らかにされている。これらの血清低分子糖蛋白のなかで  $\alpha_1$ -AG(分子量 44,000)と  $\alpha_1$ -MG(分子量 33,000)は尿細管障害の早期に排泄される選択的尿細管性蛋白尿と考えられている<sup>28)</sup>。今回検討した糖尿病性腎症患者の尿中にもこれらの血清糖蛋白が排泄されている可能性が考えられる。

他方、腎尿路系由来の糖蛋白の分泌・排泄についてもいくつかの報告がみられる<sup>3)-5)</sup>。

また、糖尿病性腎症の組織学的変化について糸球体病変としては、びまん性変化、結節性病変、滲出性病変のほか、糸球体毛細管係蹄の嚢胞状拡張や基底膜の肥厚が知られており、コラーゲン性蛋白質、非コラーゲン性糖蛋白やシアル酸などの化学構造に量的あるいは質的な異常がみられるという<sup>28)</sup>。糸球体基底膜中の非コラーゲン性糖蛋白には、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチン(ニドゲン)などが知られているが<sup>29)</sup>、他の糖蛋白成分はまだ同定されていない。今後の進歩が期待される。

## 2. HPLAC

HPLAC は各種生体成分の微量分析に用いられており、近年では尿蛋白分析への応用も試みられている<sup>30)</sup>。レクチン固相化カラムを用いた HPLAC は、固相化されたレクチンに親和性を示す糖鎖を有する一群の糖蛋白質を同時に分離することができる。そこで本研究は、WGA カラムおよび LCA カラムを用いて、ウエスタンブロッティング分析で検出させた尿中糖蛋白の分離を試みた。WGA カラムで分離された尿中糖蛋白は、WGA に特異性をもつ糖鎖、すなわち複数の GlcNAc が  $\beta(1, 4)$ -グリコシド結合したいわゆるキチンオリゴ糖の糖鎖構造をも

つことが示唆された。また、LCA カラムにより分離された尿中糖蛋白は LCA に特異性をもつ糖鎖、すなわち、 $\alpha$ -マンノース型の糖鎖を有することが示唆された<sup>31)</sup>。

## 3. 酵素抗体法

著者は今回のレクチン染色性電気泳動分析で分子量 50,000 および 38,000 の糖蛋白の存在を確認したので、選択的尿細管性蛋白尿と考えられている抗  $\alpha_1$ -AG 抗体ならびに抗  $\alpha_1$ -MG 抗体を用いて酵素抗体法を試みた。

$\alpha_1$ -AG は 181 個のアミノ酸からなる 1 本鎖ポリペプチドであり、アミノ酸配列のうち 21 個が別のアミノ酸と置換される可能性があるために分子量が 40,000 から 44,000 の間にある<sup>32)</sup>。 $\alpha_1$ -AG はヘキサースが 14.7%、アセチルヘキササミンが 13.9%、シアル酸が 12.1%、フコースが 0.7% の組成を示しており、成分の 41.4% が糖質を含有するが、脂質を含まない。また、 $\alpha_1$ -AG は血中に出現する ASP の 70% を占めており<sup>33)-34)</sup>、主たる合成部位は肝とされている。 $\alpha_1$ -AG は、プロゲステロンと結合して不活化するとされるが<sup>33)-34)</sup>、詳細な作用はまだ明らかにされていない。なお、尿中 ASP は糖尿病性腎症の早期腎機能障害の指標のひとつとされている<sup>7)</sup>。

今回の検討では、抗ヒト  $\alpha_1$ -AG 抗体で染色された尿中糖蛋白バンドは糖尿病群の尿では 80,000 および 50,000 に相当する分子域に存在しており、2 量体あるいは単量体で尿中に排泄されたものと推測される。また、WGA カラムおよび LCA カラムで分離された尿中糖蛋白も同位置で染色されたことから、 $\alpha$ -マンノース型の糖鎖および複数の GlcNAc が  $\beta(1, 4)$ -グリコシド結合したキチンオリゴ糖の糖鎖構造を有することが示唆された。

$\alpha_1$ -MG は分子量が 33,000、糖含量が 19.5% の血清蛋白である。その糖組成はグルコサミンが 5.6%、マンノースが 4.3%、ガラクトースが 3.8%、シアル酸が 5.8%、フコースが 0.7% である。アミノ酸配列は 167 個のアミノ酸残基から形成されており、N 末端がグリシン、C 末端がイソロイシンで、17 番目と 86 番目のアスパラギンに糖鎖が結合している<sup>35)</sup>。最近、 $\alpha_1$ -MG は補体 C8 の  $\gamma$  鎖の一次構造と高い相同性が示され<sup>36)</sup>、また  $\alpha$ -インターフェロンと相同性が一部に見出されており<sup>37)</sup>、今後の免疫関連物質として新たな研究の進展も期待されている。

今回の検討では、対照血清で分子量 115,000 の領域に  $\alpha_1$ -MG 染色陽性バンドが存在した。この染色バンドは  $\alpha_1$ -MG の一部が IgA と S-S 結合によって複合体を形成したものであると考えられている<sup>38)</sup>。また、糖尿病患者の濃縮尿では 38,000 に相当する低分子量域に  $\alpha_1$ -MG 染色陽性バンドが検出されたことから  $\alpha_1$ -MG は単量体

で排泄されている可能性が強い。WGA カラムおよび LCA カラムで分画された濃縮尿も同位置で染色されており、 $\alpha_1$ -AG と同様に  $\alpha$ -マンノース型の糖鎖および複数の GlcNAc が  $\beta(1, 4)$ -グリコシド結合したキチンオリゴ糖の糖鎖構造を有することが示唆された。

以上の成績は、レクチン染色電気泳動分析が尿中低分子糖蛋白の検出法として適しており、糖尿病性腎症の進行程度の評価に有効な指標となる可能性を示唆するものといえる。

## ま と め

糖尿病患者を対象として尿中糖蛋白の分子量分布ならびに糖鎖構造をレクチン染色を用いるウエスタンブロッティング法により分析し、以下の成績を得た。

1. 健常対照群および糖尿病患者の尿には、低分子領域に3種のレクチン(WGA, PHA-E<sub>4</sub>, LCA)と親和性を示す糖蛋白が検出された。

2. 糖尿病性腎症の進展とともに、分子量 50,000 と 38,000 に相当するレクチン染色バンドが泳動膜に濃染され、その両者は  $\alpha_1$ -acid glycoprotein と  $\alpha_1$ -microglobulin と推定される。

本論文の要旨は第 37 回日本糖尿病学会年次学術集会(1994年5月、徳島市)において報告した。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました土肥和紘教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、ご校閲、ご助言を賜りました本学病態検査学教室中野 博教授ならびに公衆衛生学教室米増國雄教授に深謝いたします。さらに直接のご指導、ご教示を賜りました公衆衛生学教室土肥祥子助教授に感謝いたします。また終始ご協力頂きました第 1 内科学糖尿病研究班の諸先生方に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Delia, J. A., Marble, A., Krall, L., Bradley, R. F., Christlieb, A. R. and Soeldner, J. S. : Diabetic nephropathy. *in* Joslin's Diabetes Mellitus. Philadelphia, Lea and Febiger, p635, 1985.
- 2) Mogensen, C. E. and Christensen, C. K. : Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N. Engl. J. Med.* **31** : 89, 1984.
- 3) 石本二見男, 宮原 正 : 尿中 N-acetyl- $\beta$ -D-glycosamidase の測定-その意義と臨床応用. *綜合臨牀* **33** : 1673, 1984.
- 4) 木村敬子 : 尿蛋白陰性の IDDM における尿中 NAG の臨床的意義- $\beta_2$ MG,  $\alpha_1$ -MG Alubumin との対比. *糖尿病* **28** : 246, 1985.
- 5) 西浦公章, 土肥和紘, 藤本 隆, 竹中義正, 藤本順一郎, 藤井謙裕, 花谷正和, 石川兵衛, 金内雅夫, 澤井冬樹, 濱口尚重, 土肥祥子, 森山忠重 : 糖尿病患者における尿中シアル酸および NAG 活性. *最新医学* **40** : 1265, 1985.
- 6) 金内雅夫, 澤井冬樹, 平山俊英, 湯村文敏, 濱口尚重, 西浦公章, 土肥和紘, 石川兵衛 : 糖尿病性腎症における尿中酸可溶性蛋白の臨床的意義. *日腎誌*. **28** : 1329, 1986.
- 7) 田中 彰, 福田正博, 島 健二, 熊原雄一 : 酸可溶性蛋白. *日本臨床* **44** : 215, 1986.
- 8) 西浦公章, 土肥和紘, 金内雅夫, 山野 繁, 中島靖夫, 竹中義正, 澤井冬樹, 濱口尚重, 石川兵衛, 杉本和夫, 土肥祥子, 森山忠重 : 糖尿病性腎症における尿中シアル酸含有糖蛋白分子量排泄パターン. *腎と透析* **24** : 287, 1988.
- 9) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150** : 76, 1985.
- 10) Leammli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227** : 680, 1970.
- 11) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 4350, 1979.
- 12) Kijimoto-Ochiai, S., Katagiri, Y. and Ochiai, H. : Analysis of N-linked oligo-saccharide chains of glycoproteins on nitrocellulose sheets using lectin-peroxidase reagents. *Anal. Biochem.* **147** : 222, 1985.
- 13) Hsu, S., Raine, L. and Fanger, H. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29** : 577, 1981.
- 14) Gellman, D. D., Pirani, C. L., Soothill, J. F., Muehrcke, R. C. and Kark, R. M. : Diabetic ne-

- phropathy; A chemical and pathologic study based on renal biopsies. *Medicine* **38**: 321, 1959.
- 15) 金内雅夫, 西浦公章, 竹中義正, 中島靖夫, 石井健司, 川野貴弘, 土肥和紘, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中アルブミン測定の意義. *奈医誌*. **39**: 551, 1988.
  - 16) 井上 勤: 色素によるタンパク質染色法. 電気泳動実験法(電気泳動学会編). 文光堂, 東京, p523, 1986.
  - 17) 福島正樹, 有馬暉勝, 諏訪文明, 渡辺淳一, 小出典男, 長島秀夫: 肝疾患患者血清中のヒマレクチン結合糖蛋白の検討. *肝臓* **24**: 704, 1983.
  - 18) 遠藤康夫: 肝疾患およびヨークサック腫瘍におけるAFPの意義-特にレクチン親和電気泳動法による分析. *生物物理化学* **30**: 165, 1986.
  - 19) 菰田二一, 小山岩雄, 三浦雅一, 坂岸良克, 松田武英: Lectin affinity 電気泳動法による腫瘍産生ヒトALPの性質. *医学のあゆみ* **10**: 785, 1986.
  - 20) 佐藤栄一: レクチンの組織化学およびその応用. *病理と臨床* **2**: 1418, 1981.
  - 21) Terabayashi, M.: Urinary protein analysis of diabetic patients: Appearance of low molecular weight protein component in the trace proteinuria. *Acta Med. Biol.* **26**: 123, 1979.
  - 22) Virella, M. F., Virella, G., Rosebrock, G., Sagel, J., Gonzalez, J. and Colwell, J.: Early diagnosis of renal malfunction in diabetics. *Diabetologia* **16**: 165, 1979.
  - 23) 猪股茂樹, 伊藤万寿雄, 大沢佳乏, 井上正則, 井上修一, 正宗 研: 糖尿病における尿蛋白分析の臨床的意義. *糖尿病* **27**: 591, 1984.
  - 24) 芝 紀代子, 金森きよ子, 原田東美子: 尿中スルホサリチル酸可溶性ムコ蛋白の性状. *臨床病理* **34**: 195, 1986.
  - 25) 河合 忠: 尿中低分子蛋白. *臨床検査* **32**: 830, 1988.
  - 26) Blan, E. B. and Haas, J. E.: Glomerular sialic acid and proteinuria in human renal disease. *Lab. Invest.* **28**: 477, 1973.
  - 27) Cooper, E. H., Forbes, M. A. and Crockson, R. A.: Proximal tubular function in myelomatosis. *J. Clin. Pathol.* **37**: 852, 1984.
  - 28) Spiro, R. G.: Search for biochemical basis of diabetic microangiopathy. *Diabetologia* **12**: 1, 1976.
  - 29) Timple, R.: Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. *Kidney Int.* **30**: 293, 1986.
  - 30) Suzuki, S., Okada, T., Hara, H., Miura, I. K., Naiki, K. and Sakuragawa, N.: Rapid differentiation between glomerular and tubular proteinurias by high performance liquid chromatography. *Clin. Nephrol.* **24**: 138, 1985.
  - 31) 佐藤栄一: レクチンの組織化学およびその応用. *病理と臨床* **2**: 1418, 1981.
  - 32) Cooper, R. and Papaconstantinou, J.: Evidence for the existence of multiple  $\alpha_1$ -acid glycoprotein genes in the mouse. *J. Biol. Chem.* **261**: 1849, 1982.
  - 33) 大島一洋: 血清酸可溶性蛋白(ASP)の病態解析への応用. *臨床病理* **32**: 584, 1984.
  - 34) Ekstrom, B., Peterson, P. A. and Berggard, I.: A urinary and plasma glycoprotein of low molecular weight. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 1427, 1975.
  - 35) Logdberg, L. and Akerstrom, B.: Immunosuppressive properties of alpha-1-microglobulin. *Scand. J. Immunol.* **13**: 383, 1981.
  - 36) Hunt, L. T., Elzanowski, A. and Barker, W. C.: The homology of complement factor C8 gamma chain and  $\alpha_1$ -microglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**: 282, 1987.
  - 37) Akerstrom, B. and Logdberg, L.: Alpha-1-microglobulin-glycopeptides inhibits antigen-specific stimulation of human peripheral blood leukocytes. *Scand. J. Immunol.* **20**: 559, 1984.