

ストレプトゾトシン糖尿病ラットの腎糸球体基底膜における 糖蛋白組成の分析：レクチンによる解析

奈良県立医科大学第1内科学教室

真井久夫

ANALYSIS OF GLYCOPROTEINS IN THE GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE OF STREPTOZOTOCIN DIABETIC RATS : USE OF LECTINS FOR DETECTION OF ELECTROPHORETICALLY SEPARATED GLYCOPROTEINS

HISAO SANAI

The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received September 30, 1991

Summary: This study was performed to clarify the composition of glycoproteins in the glomerular basement membrane (GBM) isolated from streptozotocin (STZ) diabetic rats. Four kinds of lectin were used for detection of the glycoproteins which were electrophoretically separated from the purified GBM.

STZ diabetic rats were induced by a single intravenous injection of STZ 65mg/kg body weight. GBM was obtained by sonication of glomeruli isolated through the sieving method. Glycoproteins solubilized with 8M urea from the GBM were separated by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate and transferred onto nitrocellulose sheets and polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The glycoproteins were then stained immunochemically with four lectins.

Staining patterns of *Ricinus communis* agglutinin and *Phaseolus vulgaris* agglutinin of STZ diabetic rats were similar to those of normal rats. However, unlike in normal rats, in STZ diabetic rats one major band was identified by wheat germ agglutinin and *Concanavalin A*. This band was detected at an apparent molecular weight of 60,000. The amino acid composition of this glycoprotein, electroblotted onto PVDF membrane, was analysed by HPLC after hydrolysis. This glycoprotein did not contain hydroxyproline or hydroxylysine, which are abundant in the type IV collagen. Furthermore, the amino acid composition of this glycoprotein was different from that of known components of the GBM.

Index Terms

diabetic rat, glomerular basement membrane, lectin, Western blotting, SDS-PAGE

緒 言

糖尿病性腎症は、網膜症とともに糖尿病性細小血管病変(diabetic microangiopathy)に起因する障害として知られており、糖尿病患者の予後を左右する重要な合併症である。その腎病変としては、糸球体硬化、細動脈硬化、

尿細管上皮細胞の空胞変性および乳頭壊死などが報告されており、その初期病変として糸球体硬化に先行する糸球体基底膜(GBM)肥厚が指摘されてきた。しかも腎糸球体以外の網膜、皮膚、筋肉など全身の諸臓器における毛細血管も基底膜肥厚を示すことから、基底膜肥厚は糖尿病性細小血管病変の初期変化と考えられている。

Krakower & Greenspon¹⁾によるGBM精製の成功以降、各種のGBMが生化学的に分析されており、実験糖尿病動物およびヒト糖尿病のGBMについてもその組成が検討されてきた。ヒト糖尿病性腎症について、Lazarow & Speidel²⁾は、ヒト糖尿病性糸球体硬化症におけるGBMのアミノ酸および糖組成が健常人と差を示さないことから、GBM肥厚の発生機序を正常構成成分の絶対的增加によると最初に報告した。Beisswenger & Spiro³⁾は、ヒト糖尿病性腎症ではヒドロキシリジン、グルコースおよびガラクトース濃度の上昇が認められたという。Kefalides⁴⁾は、シスチンとシアル酸の構成比率に低下を認めたが、グルコースとガラクトース濃度には変化がなかったと報告している。同様に、実験糖尿病ラットのGBMも報告によって大きく異なっている⁵⁾⁻⁸⁾。つまり、糖尿病性糸球体硬化症にみられるGBM肥厚の生化学的組成変化については、まだ統一した見解が得られていないといえる。

レクチンは、特定の糖鎖構造に対して特異的に結合する蛋白質である。現在までに植物、動物および微生物から多種類のものが単離されており、それらの糖結合特異性が細胞分化や癌化に伴う細胞表面複合糖質の変化の解析および細胞機能の検索などに広く利用されている⁹⁾¹⁰⁾。

そこで今回著者は、ストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットを作製してGBMを精製し、その糖蛋白組成をレクチン染色による電気泳動法で解析することにより糖尿病性腎症にみられるGBM肥厚の成因を検討した。

方 法

1. STZ糖尿病ラットの作製

糖尿病ラットは、予め12時間絶食させておいた8週齢(体重220-250g)のWistar系雄ラットに、全量で65mg/kgになるよう5mMクエン酸緩衝液(pH4.2)0.5mlに溶解したSTZ(streptozotocin, 和光純薬工業)を頸静脈内に単回注入して作製した。STZ注入ラット中、24時間後の血糖値が350mg/dl以上を示したラットを選んで以下の実験に供し、対照には0.5mlのクエン酸緩衝液のみを頸静脈内に注入した同週齢のWistar系雄ラットを用いた。STZ投与群および対照群ラットはオリエンタルMF固形飼料(オリエンタル酵母工業社製)と水道水を自由に摂取させた。

2. 検査項目

2週毎に体重、尿量、血糖、尿糖および尿蛋白を測定した。血糖および尿糖はグルコースオキシダーゼ法、尿蛋白はBCA蛋白定量用試薬(Pierce Chemical社製)を用いて測定した。さらに、1カ月毎にBUN、血清クレア

チニン、総蛋白、血清アルブミン、総コレステロールおよびトリグリセライドを生化学自動分析器(TBA60S, 東芝社製)で測定した。尿検体は24時間蓄尿、血液検体は随時に採血したものをを用いた。

3. GBMの精製と可溶性

(1) GBMの精製

STZ糖尿病ラットおよび対照ラットは、それぞれ3カ月および6カ月後に10匹ずつ屠殺した。腹部大動脈にカテーテルを挿入して血液を採取し、生理食塩水で腎を灌流したのちに両腎を摘出した。摘出した腎から腎皮質を分離して約1mm角に細切したのち、Spiroの方法¹¹⁾に準じsieving methodで腎糸球体を単離した。sieving methodに使用したふるい(飯田製作所社製)は、投与3カ月後(20週齢)のラットには60、100および200メッシュ、6カ月後(32週齢)のラットには60、83および166メッシュのものである。200あるいは166メッシュのふるい上に残った糸球体を生理食塩水で十分に洗浄した後、1.0M NaClを滴下してシャーレ上に集めた。つぎに位相差顕微鏡で糸球体以外の混在物がないことを確認してから、超音波ホモジナイザー(Model US-50, 出力50W, 日本精機製作所製)による超音波処理を10分間実施してGBMを精製した。再び位相差顕微鏡で基底膜以外の細胞成分が完全に除去されたのを確認してから、得られたGBMを蒸留水で洗浄したのち、凍結乾燥して保存した(Fig. 1)。

なお、摘出した腎の一部は、10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋後に4 μ mに薄切し、Periodic acid-Schiff(PAS)染色を行なった。また摘出腎の残る一部と精製したGBMの一部は、2.5%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで固定後、エポキシ包埋して超薄切片を作成し、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による二重染色後に透過型電子顕微鏡(JEM-1200EX, 日本電子製)で観察した。さらに精製したGBMの一部はイオンスポットで金をコーティングした後、走査型電子顕微鏡(S-800, 日立製作所製)で観察した。

(2) GBMの可溶性

STZ投与群および対照群ラットのGBMに、蛋白分解酵素阻害薬(25mM EDTA, 10mM N-エチルマレイミド, 1mM ベンズアミジン塩酸塩, 1mM フッ化フェニルメチルスルフォニル)を含む8M尿素, 50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.6)を1mlずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで24時間混和して可溶性させた。つぎにその懸濁液を18,000rpmで15分遠心後、上清を採取してGBM溶解液とした。STZ投与群および対照群から得られたGBM溶解液を蛋白濃度が1mg/mlになるように8M尿素, 50mM トリス塩酸緩

衝液(pH8.6)を加えて調製し、以後の実験に供した。

4. 糖蛋白成分の分析

(1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(sodium dodesylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

蛋白濃度を1 mg/mlに調製したGBM溶解液は、8 M尿素, 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノールを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.2)を等量加え、100℃で3分加熱して泳動用試料に用いた。SDS-PAGEは、支持体にSDS-ポリアクリルアミドゲルプレート(10%均一ゲル, 厚さ1 mm, 第一化学社製), 泳動用緩衝液に0.1% SDS, 0.192 Mグリシン含有5mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.4)を用いて、各ウェルあたり7μlの試料をSDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、室温で60 mAを120分通電して実施した。なお分子量マーカーは分子量17,000, 27,000, 39,000, 50,000, 75,000および130,000の6種のPre-stained SDS-PAGE standards(Bio-Rad社製)を用いた。

(2)糖蛋白のニトロセルロース(NC)膜への転写(Western blotting)

Towbin et al.¹²⁾の方法に準じてSDS-PAGE後のゲルをNC膜(膜孔0.45μm, Advantec社製)に密着させ、トランスブロッティング装置(AE3280型, Atto社製)を用い、4℃, 35 Vで180分通電し、Western blottingを実施した。転写用緩衝液には0.192 Mグリシン, 20%メタノール含有25mM トリス塩酸緩衝液(pH8.3)を用いた。

(3) レクチン染色

NC膜の染色に使用した4種類のレクチンは、小麦胚芽・レクチン(WGA), タチナタマメ・レクチン(ConA), ヒママメ・レクチン(RCA-120)およびアカインゲンマメ・レクチン(PHA-E₄)のペルオキシターゼ標識レクチン(豊年製油社製)である。各レクチンの特徴をTable 1に示す。各レクチンは予めそれぞれの濃度が5μg/mlとなるように、1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.9% NaCl含有50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で希釈し、以下の手順でNC膜を染色した。

Western blotting終了後、SDSを除去するためにNC膜を0.9% NaCl, 0.05% Tween 20含有10mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で1回10分, 3回振盪洗浄した。つぎにレクチン溶液でNC膜を覆い、室温で30分反応後、0.05% Tween 20含有10mM リン酸緩衝液(pH 7.4)で1回5分, 6回振盪洗浄した。ついで基質にDAB溶液(0.5 mg/ml 3,3'-diaminobezidine tetrahydrochloride, 0.005% H₂O₂含有リン酸緩衝液, pH 7.2)を用いて室温、

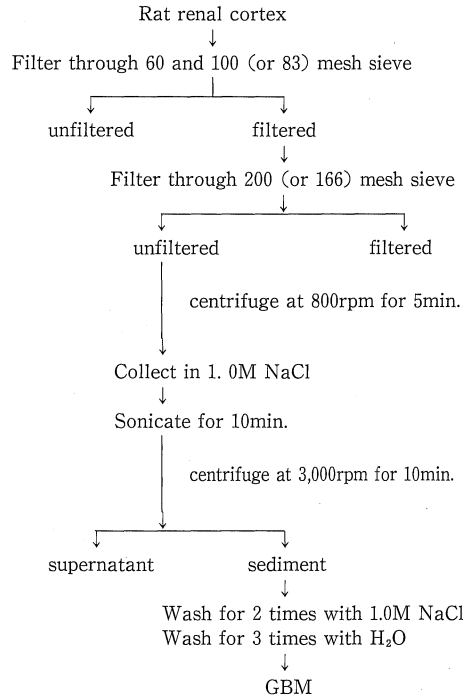


Fig. 1. Method of preparation of the GBM.

Table 1. Lectins used for the staining of transferred glycoproteins

Lectin	abbreviation	sugar specificity
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	GlcNAcβ1→4GlcNAc
<i>Concanavalia ensiformis</i>	ConA	α-D-Man, α-D-Glc
<i>Ricinus communis</i>	RCA-120	β-D-Gal
<i>Phaseolus vulgaris</i> E	PHA-E ₄	GalNAc

GlcNAc: N-acetyl-D-Glucosamine, Man: Mannose, Glc: Glucose, GalNAc: N-acetyl-D-Galactosamine, Gal: Galactose.

5分ペルオキシターゼ反応を実施後、蒸留水で洗浄して反応を停止させた。

染色した糖蛋白の分子量および濃度分布は、二波長クロマトスキャナー(Model CS-920, 島津製作所製)を用いて波長370nm, スリット幅0.04 mmの走査で測定した。

5. 糖蛋白バンドのアミノ酸分析

(1) SDS-PAGE

支持体には1ウェルのSDS-ポリアクリルアミドゲルプレート(10%均一ゲル, 厚さ1 mm), 泳動用緩衝液には0.1% SDS含有0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.2)を用い、泳動用試料にはSTZ投与群(投与6ヵ月後)のGBM溶解液100μlに8 M尿素, 1% SDS, 1% 2-メルカプトエ

タノールを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)を等量加えて、100°C、3分間加熱処理をして作製したものを用いた。SDS-PAGEは泳動用試料の全量をウェルに添加し、室温で60 mAを120分通電して実施した。

(2) 糖蛋白のPVDF(polyvinylidene difluoride)膜へのWestern blotting

Western blottingはMatsudaira¹³⁾の方法に準じて、SDS-PAGE終了後のゲルをPVDF膜(膜孔0.45 μ m, Applied Biosystem社製)に密着させ、4°C、35 Vで180分通電して実施した。なお転写用緩衝液には10%メタノール含有10mM CAPS緩衝液(3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, pH 11)を用いた。

(3) WGAレクチン染色

Western blotting後のPVDF膜はFig. 2のように5分割した。2片は蒸留水で60分洗浄後、2枚の濾紙(ワットマン3MM)にはさんで乾燥させ、次項で示すアミノ酸分析に供した。残りの3片はBartlesら¹⁴⁾の方法に準じて以下の手順でレクチン染色した。

PVDF膜を2% PVP-360(polyvinylpyrrolidone-360, 和光純薬社製)含有0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)に45分浸したのち、WGA溶液で覆い、室温で30分反応させた。つぎにPVDF膜を0.1% Triton X-100含有25mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で1回10分、3回洗浄後、室温で5分DAB溶液中に浸して発色させ、蒸留水で反応を停止させた。

(4) アミノ酸分析

非蛍光プレラベル法のフェニルチオカルバモイルアミノ酸法(PTC-アミノ酸法)により、PVDF膜に転写した糖蛋白のアミノ酸を分析した。プレラベル装置にはPICO-TAGワークステーション(Waters社製)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にはPICO-TAG分析装置(Waters社製)を用いた。

Fig. 2に示すようにレクチン染色を施行したPVDF膜の3片(Fig. 2の①, ②, ③)とアミノ酸分析用に乾燥させた2片(Fig. 2の④, ⑤)を復元し、後者の2片から目的とするバンドを注意深く切り出した。切り出したPVDF膜を加水分解用試験管に入れて1%フェノールを含む6N HClを加え、減圧下に110°C、24時間、加水分解した。つぎに0.1N HClを含む20%メタノール溶液でアミノ酸を抽出し、PTC試薬(和光純薬社製)を加えてPTC誘導体とした後、試料を減圧乾固させた。ついで乾固させた試料を波長254nm、温度40°Cの条件下にHPLCを実施し、糖蛋白のアミノ酸組成を決定した。なおHPLCのカラムにはPICO-TAGアミノ酸分析用カラム(カラム長150mm、直径3.9mm, Waters社製)、移

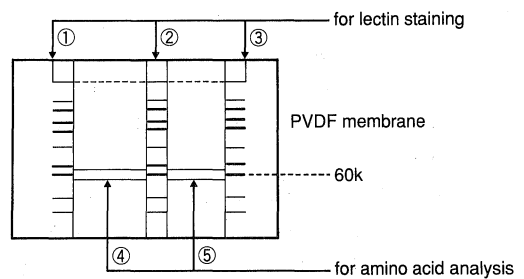


Fig. 2. Diagram showing how the PVDF membrane was cut into 5 pieces.

Three pieces of the cut PVDF membrane were used for lectin staining (①, ②, ③), and the other two pieces were used for amino acid analysis of glycoproteins (④, ⑤).

動相には酢酸ナトリウム・トリエチルアミン緩衝液(pH 6.4)およびアセトニトリル・水溶液(pH 7.4)を用いた。

成 績

1. 糖尿病ラット

STZ投与群における死亡率は1ヵ月後40例中5例(12.5%)、3ヵ月後40例中7例(17.5%)、6ヵ月後40例中8例(20%)であった。STZ糖尿病ラットと対照群の体重、腎重量、尿および血液所見の推移をTable 2に示す。

(1) 体重

STZ投与群の体重は3ヵ月後280 \pm 50.3g、6ヵ月後267 \pm 39.8gであり、対照群のそれぞれ521 \pm 76.5g、582 \pm 72.0gに比して有意に軽かった。つまり、STZ投与群は対照群に比して体重増加が有意に抑制されていたことになる。

(2) 腎重量

屠殺時におけるSTZ投与群の腎重量は3ヵ月後4.0 \pm 0.26g、6ヵ月後4.4 \pm 0.32gであり、対照群のそれぞれ3.8 \pm 0.23g、4.0 \pm 0.30gに比して有意に増加していた。

(3) 尿所見

STZ投与群の尿量は投与3ヵ月後153 \pm 21.4 ml/日、6ヵ月後178 \pm 36.5 ml/日であり、対照群では実験期間を通して20 ml/日以下であったのと比べて有意に増加していた。STZ投与群の尿糖も、全期間を通して3g/日以上であり、1g/日以下であった対照群に比して有意に増加していた。さらにSTZ投与群の尿蛋白は投与3ヵ月後16.5 \pm 3.2 mg/日、6ヵ月後23.5 \pm 6.7 mg/日であり、対照群がそれぞれ10.2 \pm 1.9 mg/日、11.3 \pm 3.1 mg/日であったのと比べて有意に増加していた。

(4) 血液所見

Table 2. Laboratory data in normal and STZ diabetic rats

Item		before	3 months		6 months	
		(n=20)	control (n=10)	STZ (n=10)	control (n=10)	STZ (n=10)
Body weight	(g)	235±28.4	512±76.5	280±52.3**	580±72.0	267±39.8**
Kidney weight	(g)	3.0±0.18	3.8±0.23	4.0±0.26*	4.0±0.30	4.4±0.32*
Urine						
Volume	(ml/day)	12±2.5	12±1.7	153±21.4**	14±3.3	178±36.5**
Protein	(mg/day)	10.5±2.3	10.2±1.9	16.5±3.2 **	11.3±3.1	23.5±6.7 **
Sugar	(g/day)	0.2±0.05	0.1±0.05	3.1±0.8 **	0.2±0.08	4.8±1.2 **
Blood chemistry						
Sugar	(mg/dl)	162±25.4	190±30.6	574±95.5**	220±36.5	623±106 **
Total protein	(g/dl)	6.5±0.19	6.4±0.21	5.7±0.30**	6.5±0.20	5.6±0.57**
Albumin	(g/dl)	3.5±0.22	3.5±0.19	3.3±0.41*	3.6±0.22	3.1±0.45**
Serum creatinine	(mg/dl)	0.34±0.07	0.31±0.06	0.33±0.05	0.40±0.09	0.25±0.10
BUN	(mg/dl)	25.4±2.52	24.3±2.09	30.8±6.20*	25.3±2.22	32.8±7.43**
Cholesterol	(mg/dl)	48.5±5.38	51.2±6.07	67.3±17.5*	48.6±5.79	76.9±14.0*
Triglyceride	(mg/dl)	68.5±21.9	54.3±18.2	201±36.2**	69.4±15.3	167±37.5**

mean±S.D., *p<0.01, ** p<0.001, compared with the control rats.

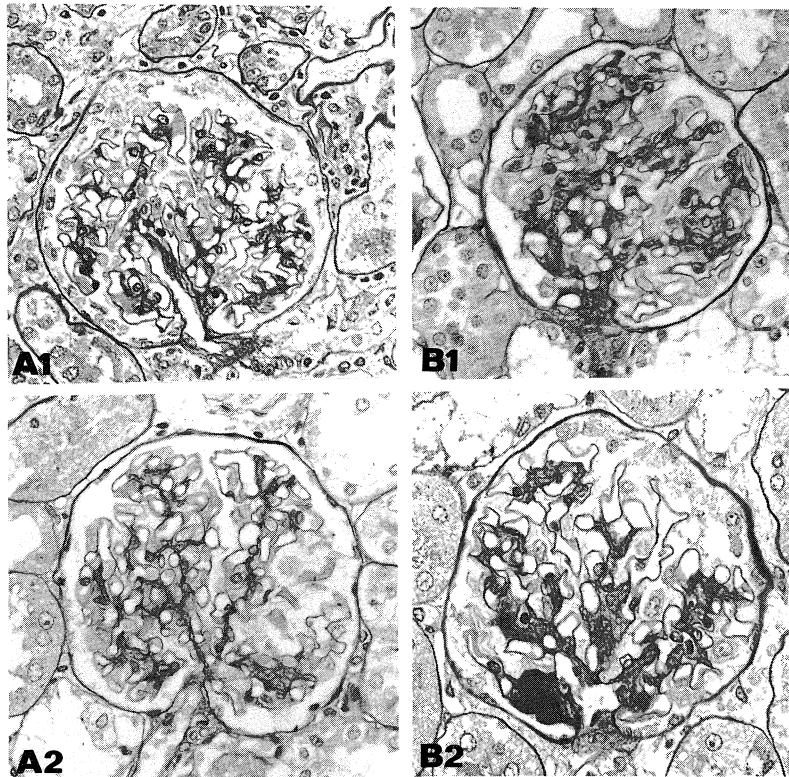


Fig. 3. Light microscopic findings of glomeruli.

There are no remarkable changes in the glomerulus of control rats (A1; 3 months, A2; 6 months). Three months after having received STZ, mild mesangial enlargement is found in the glomerulus of STZ diabetic rat(B1). Further, 6 months after having received STZ, mild mesangial enlargement, thickening of basement membrane and hyaline arteriosclerosis are found in the glomerulus of STZ diabetic rat(B2). PAS, X 200.

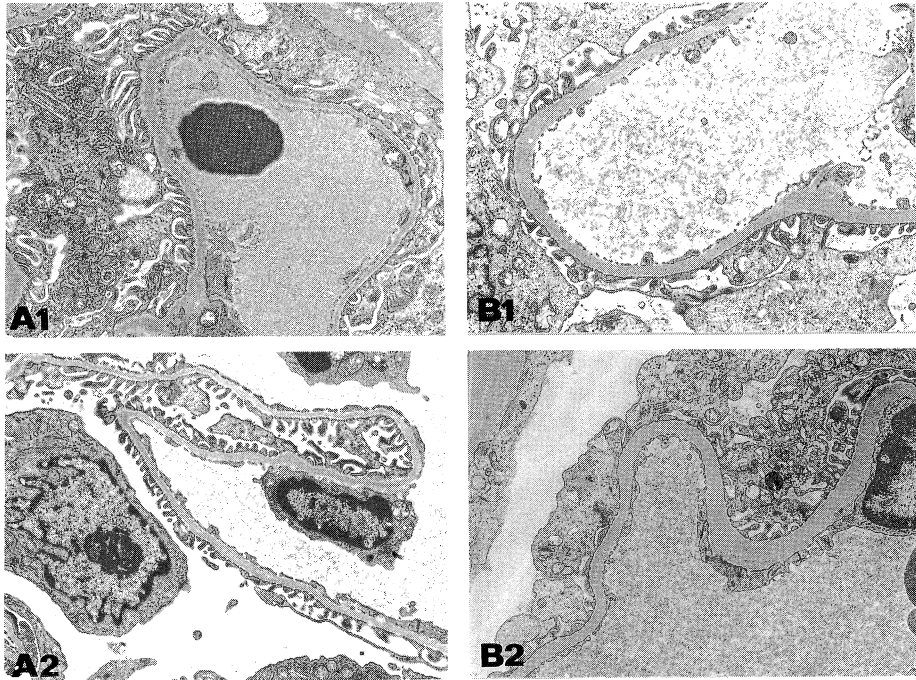


Fig. 4. Electron micrograph of the GBM in STZ diabetic rat and in control rat.

Note the thickening of the GBM in STZ diabetic rats, both 3 and 6 months after having received STZ (B1 and B2). The epithelial cell covering thickened GBM shows foot process effacement (B2). (A1; 3 months' control rat, A2; 6 months' control rat) X 4,500.

対照群における血糖値は全期間を通して 300 mg/dl 以下であった。一方、STZ 投与群は全例(40 匹)が 24 時間後に 350 mg/dl 以上(460±28.3 mg/dl)の血糖値を示していた。以後の血糖値は 3 カ月後が 574±95.5 mg/dl、6 カ月後が 623±106 mg/dl であり、高値を継続していた。STZ 投与群の BUN は 3 カ月後 30.8±6.2 mg/dl、6 カ月後 32.8±7.43 mg/dl であり、対照群のそれぞれ 24.3±2.09 mg/dl、25.3±2.22 mg/dl と比べて有意の高値を示した。一方、血清クレアチニン値は両群間に差がなかった。また血清総蛋白および血清アルブミン値は、STZ 投与群において週齢とともに低下する傾向を示した。STZ 投与群の総コレステロール値は、3 カ月後 67.3±17.5 mg/dl、6 カ月後 76.9±14.0 mg/dl であり、対照群のそれぞれ 51.2±6.07 mg/dl、48.6±5.79 mg/dl に比して有意に増加していた。STZ 投与群のトリグリセライドも、STZ 投与 3 カ月後 201±36.2 mg/dl、6 カ月後 167±37.5 mg/dl であり、対照群のそれぞれ 54.3±18.2 mg/dl、69.4±15.3 mg/dl に比して有意の高値を示した。

(5) 腎組織所見

STZ 投与 3 カ月後：腎糸球体光顕像は、対照群と比較してメサンギウム域がごく軽度拡大しているにとどまっており、メサンギウム細胞の増生や GBM 肥厚を示さなかった。しかし電顕では、STZ 投与群において GBM の一部に明らかな肥厚が観察された。

STZ 投与 6 カ月後：光顕像では、対照群とは異なり中等度のメサンギウム拡大と GBM 肥厚が認められ、さらに血管極を中心とした係蹄壁およびメサンギウム域に硝子様物質の沈着が観察された。STZ 投与 6 カ月後の電顕像では、投与 3 カ月後に比して GBM 肥厚は顕著になり、その厚さは対照群のおよそ 1.4—2.0 倍に達していた。また、一部の足突起は癒合していた(Fig. 3, 4)。

2. GBM の精製

sieving method は、10 匹のラットを 1 群として屠殺し、得られた腎皮質を 4 分割して GBM の精製を行なった。したがって、今回の実験では、3 カ月後と 6 カ月後の両時期に各 10 匹計 4 群の屠殺を行なっているため、sieving method を計 16 回実施したことになる。しかし、この 16 回の操作中、不純物の混入を位相差顕微鏡による観察で認められたのはわずか 2 回であった。この 2 回以

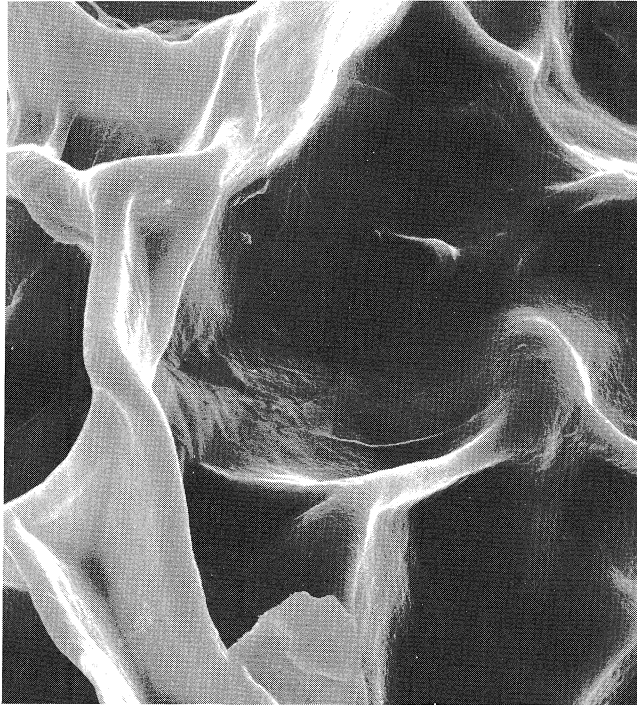


Fig. 5. Scanning electron micrograph showing isolated GBM of STZ diabetic rats (6 months after having received STZ). Epithelial cells are removed by sonication. X 7,500.

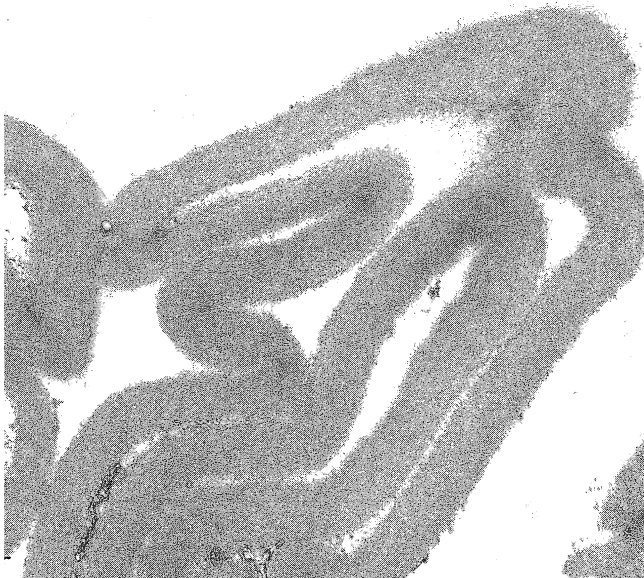


Fig. 6. Electron micrograph showing isolated GBM of STZ diabetic rats (6 months after having received STZ). Cell components do not exist. X 7,500.

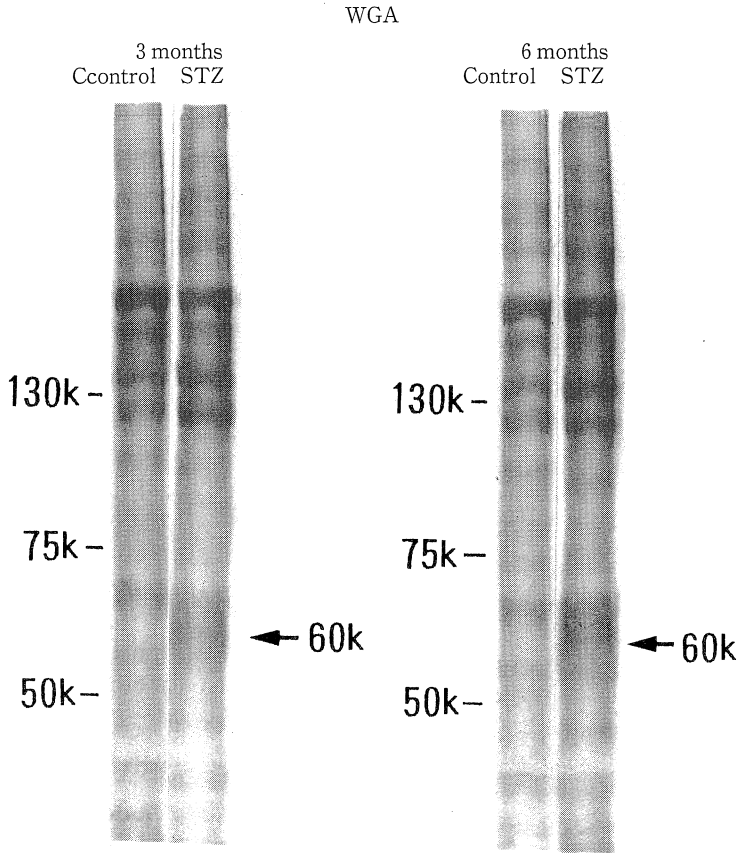


Fig. 7. WGA-binding patterns of glycoproteins purified from the GBM. Glycoproteins separated by SDS-PAGE were blotted onto a nitrocellulose sheet and were stained with WGA. One band which is not present in control rats, is observed at an apparent molecular weight of 60,000 in STZ diabetic rats, both 3 and 6 months after having received STZ (arrow).

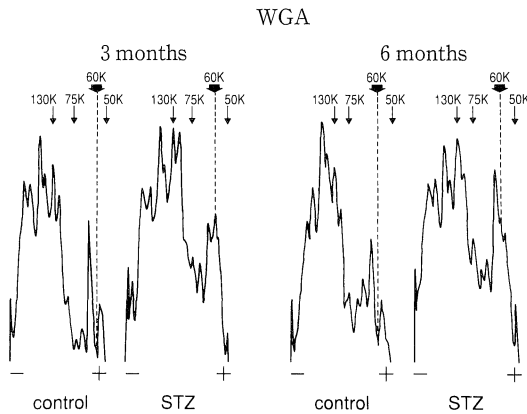


Fig. 8. Densitograms of WGA-binding patterns. One peak which is not present in control rats, is identified at a molecular weight of 60,000 in STZ diabetic rats, both 3 and 6 months after having received STZ.

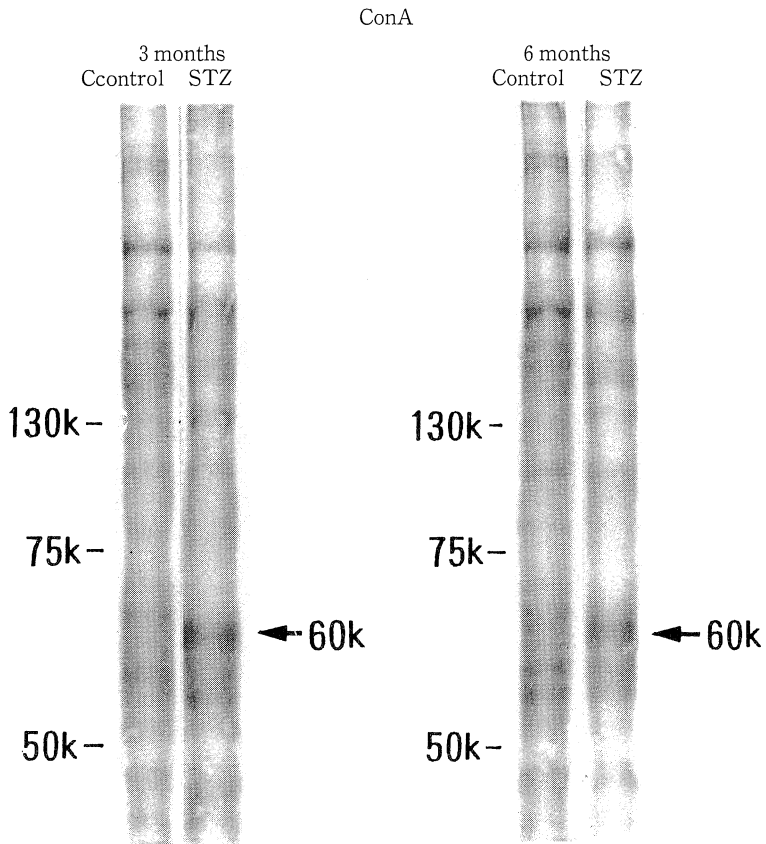


Fig. 9. ConA-binding patterns of glycoproteins purified from the GBM. One band which is not present in control rats, is observed at an apparent molecular weight of 60,000 in STZ diabetic rats, both 3 and 6 months after having received STZ (arrow).

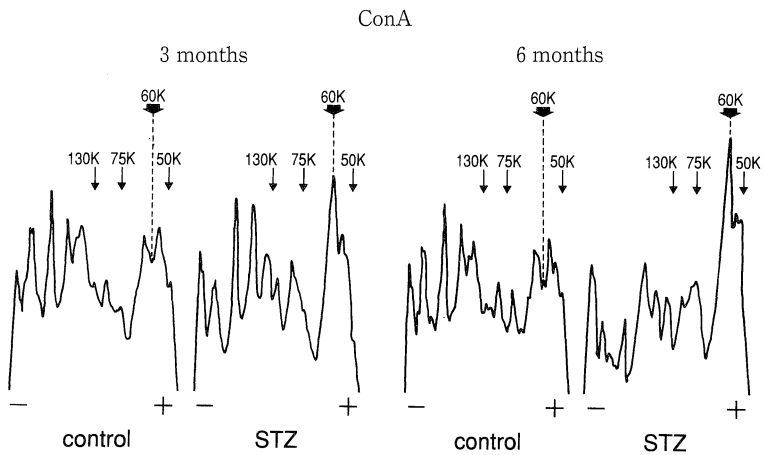


Fig. 10. Densitograms of ConA-binding patterns. One peak which is not present in control rats, is identified at a molecular weight of 60,000 in STZ diabetic rats, both 3 and 6 months after having received STZ.

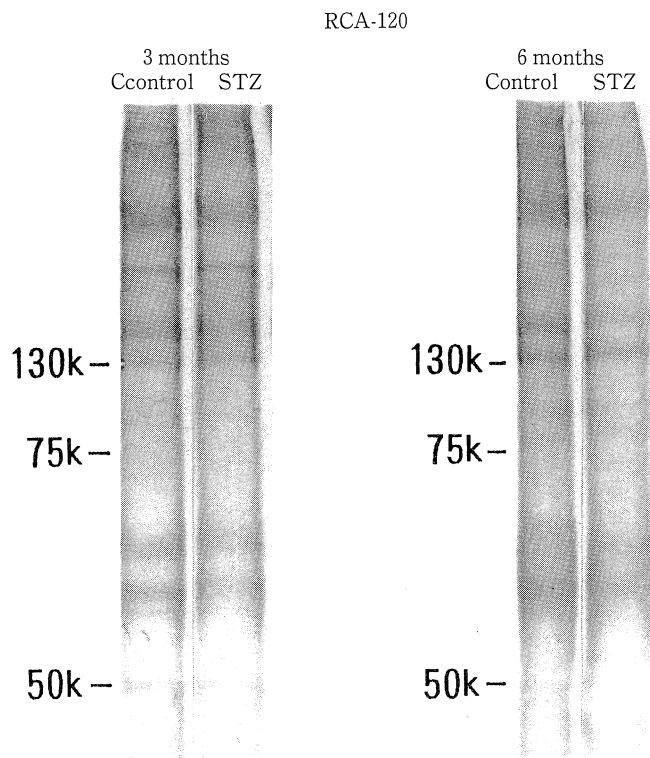


Fig. 11. RCA-120-binding patterns of glycoproteins purified from the GBM.

There are no differences in staining patterns between STZ diabetic rats and control rats during the period of this study.

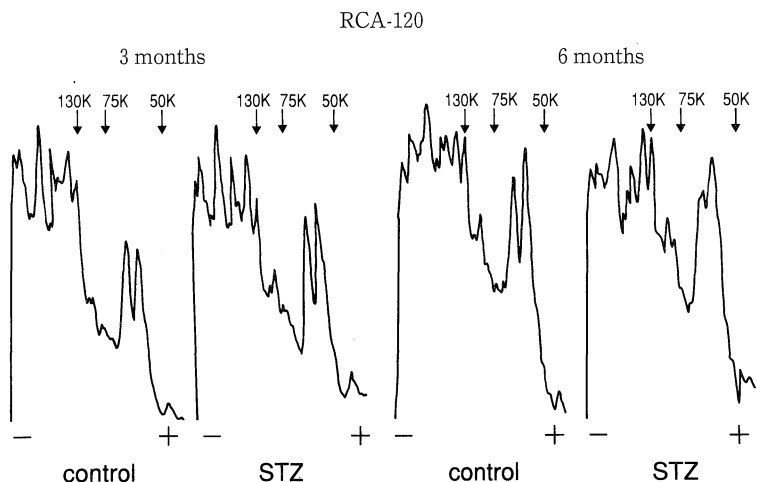


Fig. 12. Densitograms of RCA-120-binding patterns.

There are no differences between STZ diabetic rats and control rats during the period of this study.

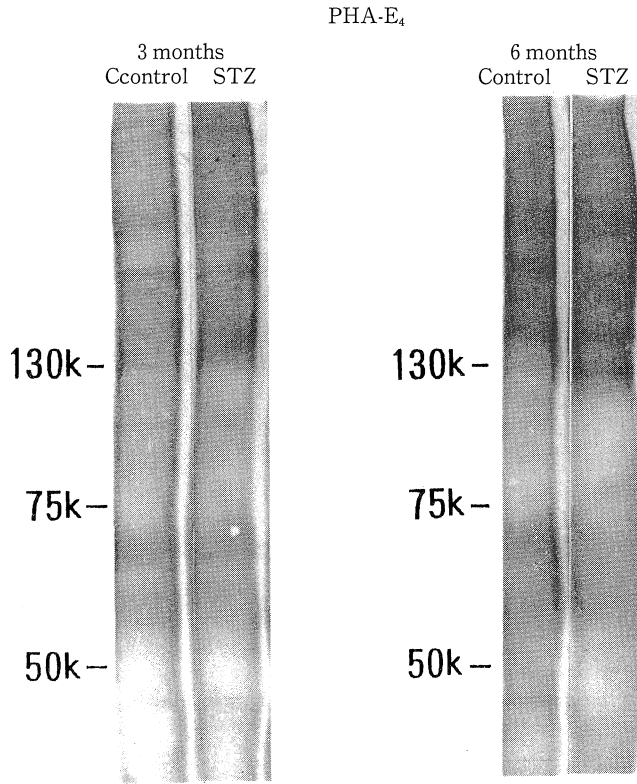


Fig. 13. PHA-E₄-binding patterns of glycoproteins purified from the GBM.

There are no differences in staining patterns between STZ diabetic rats and control rats during the period of this study.

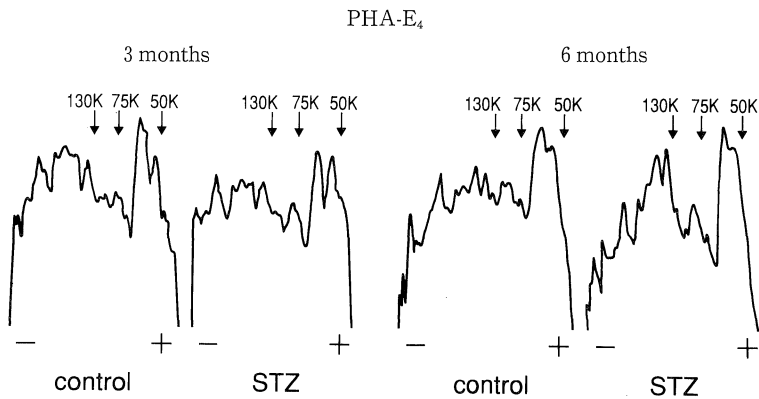


Fig. 14. Densitograms of PHA-E₄-binding patterns.

There are no differences in staining patterns between STZ diabetic rats and control rats during the period of this study. No peak is observed at a molecular weight of 60,000 in either STZ diabetic or control rats.

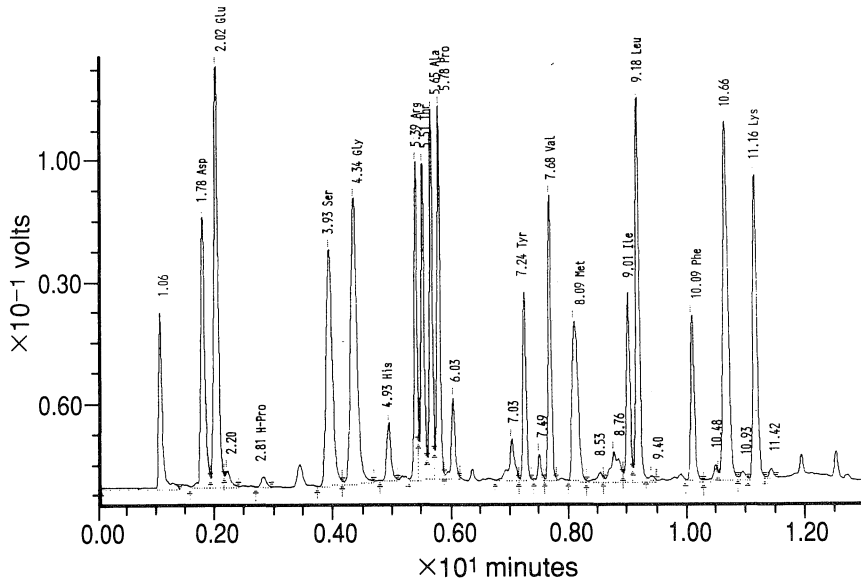


Fig. 15. Amino acid chromatogram of the glycoprotein, which was extracted from the band of the molecular weight of 60,000 in STZ diabetic rats (6 months after having received STZ).

Amino acids were eluted with a linear acetonitrile gradient in 50 mM acetate buffer at a flow rate of 1.0 ml/min at 40°C with HPLC and monitored at A_{254nm} .

Table 3. Amino acid composition of the glycoprotein, which was extracted from the band of the molecular weight of 60,000 in STZ diabetic rats (6 months after having received STZ)

Amino acid	mol. %
Aspartic acid	7.11
Glutamic acid	11.71
Hydroxyproline	0.33
Serine	9.22
Glycine	10.28
Histidine	1.66
Arginine	5.44
Threonine	6.30
Alanine	6.43
Proline	11.73
Tyrosine	3.16
Valine	5.06
Methionine	4.60
Isoleucine	3.66
Leucine	7.75
Phenylalanine	1.85
Hydroxylysine	n. d.
Lysine	3.74

n. d.: not detectable.

外の操作で得られた材料をGBMの精製に供した。

精製したGBMの走査電顕像および透過電顕像をFig. 5と6に示す。走査電顕像では上皮細胞の剝奪した単離糸球体が観察されており、透過電顕像では細胞成分は基底膜上に観察されなかった。

3. レクチン染色

(1) WGA

GBMの尿素可溶性糖蛋白成分に対するWGA染色では、対照群およびSTZ投与群の両群において多数のバンドが検出された。対照群の染色像は3カ月および6カ月の両者間に差を示さなかった。WGAで濃染されたバンドは、マーカーからの概算では、分子量68,000, 120,000, 150,000, 180,000および220,000の5つが主要なものであった。一方、STZ投与群では上記のバンドは対照群と差異を示さなかったが、投与3カ月後には分子量60,000に相当するバンド(矢印)が出現しており、投与6カ月後には分子量60,000のバンドはさらに濃染されていた(Fig. 7)。WGA染色のデンストグラムではSTZ投与3カ月および6カ月の両時期において、対照群には認められない分子量60,000の部位にピークが出現していた(Fig. 8)。

(2) ConA

ConA 染色においても WGA と同様に多数のバンドが検出された。対照群および STZ 投与群の両群において分子量 70,000 以上の濃染バンド数は、3 カ月および 6 カ月ともに差がなかった。分子量 70,000 以下の染色像では、対照群は分子量 68,000 に相当する濃染バンドを示した。一方、STZ 投与群では、3 カ月および 6 カ月の両時期において分子量 60,000 のバンドが優位に濃染されており、分子量 68,000 のバンドは不明瞭になっていた (Fig. 9)。またデンストグラムでは、対照群に認められない分子量 60,000 のピークが STZ 投与群において新たに出現しており、逆に対照群で認められた分子量 68,000 のピークは STZ 投与群ではノッチを形成するにとどまっていた (Fig. 10)。

(3) RCA-120

Fig. 11 に RCA-120 染色像を示す。対照群では分子量 57,000, 68,000, 130,000, 150,000, 180,000 および 250,000 の位置に濃染されたバンドが 3 カ月および 6 カ月の両時期に認められた。STZ 投与群で観察されたバンドは対照群と同様であり、WGA および ConA 染色で認められた分子量 60,000 のバンドは消失していた。またデンストグラムでも 3 カ月および 6 カ月の両時期に検出されたピークは両群で一致していた (Fig. 12)。

(4) PHA-E₄

PHA-E₄ 染色像で確認された対照群および STZ 投与群の両群におけるバンドは、他のレクチン染色でのバンドに比して不明瞭であった。デンストメトリーで検出されたピーク高は両群間において 3 カ月および 6 カ月とも差を示さなかった。加えて WGA および ConA 染色で認められた分子量 60,000 のピークも PHA-E₄ 染色では存在しなかった (Fig. 13, 14)。

以上の 4 種類のレクチン染色像から、STZ 投与群における GBM の糖蛋白組成は、WGA および ConA で認識される糖鎖をもつ分子量 60,000 の糖蛋白を認めた点で対照群と異なったことになる。

なお著者は、SDS-PAGE とレクチン染色を同一条件で 4 回実施しており、いずれの成績も上記と相違のないことを確認している。

4. 糖蛋白のアミノ酸分析

STZ 投与 6 カ月後の糖尿病ラットから精製した GBM から、WGA および ConA 染色で濃染される分子量 60,000 の糖蛋白を抽出してアミノ酸組成を分析した。そのクロマトグラムを Fig. 15 に示す。アミノ酸組成は、モル%で検討すると、プロリン(11.73 モル%)、グルタミン酸(11.71 モル%)およびグリシン(10.28 モル%)の 3 者が主要構成成分であった。一方、ヒドロキシプロリ

ンは 0.33 モル%の低比率、ヒドロキシリジンは測定感度以下の微量であった (Table 3)。

考 察

1. 糖尿病性細小血管病変と糖尿病性腎症について

糖尿病性細小血管病変：前述のように、糖尿病性細小血管病変は従来から網膜の毛細血管瘤と糖尿病性糸球体硬化症が特徴とされてきた。しかし、現在では糖尿病性細小血管病変が網膜と腎に限らず皮膚、筋肉など全身諸臓器の細小血管にも認められることが判明しており、糖尿病性細小血管病変に共通した形態学的変化は毛細血管における基底膜肥厚であるとされている¹⁵⁾¹⁶⁾。

糖尿病性腎症：これは糖尿病の病態に随伴して出現する腎障害の総称である。とくに糖尿病性糸球体硬化症は、腎機能低下の原因であり、生命予後を決定する重要な病変と考えられている。糖尿病性糸球体硬化症は通常、次の 3 型に分類される、メサンギウム域の拡大と基底膜肥厚を呈するびまん性病変(diffuse lesion)、一部のメサンギウム域が分葉状に拡大して結節を形成する結節性病変(nodular lesion)、輸出入動脈、Bowman 嚢あるいは糸球体係蹄内に硝子様物質の沈着を認める硝子様病変(exudative lesion)である。しかし、糖尿病性糸球体硬化症の基本となる初期病変は糖尿病性細小血管病変に基づく GBM 肥厚と考えられており、GBM 肥厚は糖尿病性糸球体硬化症のいずれの病型においても観察される。

糖尿病における GBM 肥厚の成因：この問題について検討した従来の報告では、GBM の生化学的組成の変化について結論が一致しておらず、さらに発生機序も依然として不明のままである。

そこで本研究では、糖尿病における GBM 肥厚の成因を、STZ 糖尿病ラットと正常対照ラットの GBM における糖蛋白組成の相違から検討することにした。

2. STZ 糖尿病ラット

実験的糖尿病モデルの作製：糖尿病ラットの作製には、膵島 B 細胞を選択的に破壊して高血糖状態を惹起するアロキサンまたはストレプトゾトシン(STZ)が使用される¹⁷⁾¹⁸⁾。特に STZ は、膵島 B 細胞に対する特異性が強いこと、肝および腎に対する毒性がきわめて少ないこと、さらに投与量に比例した高血糖状態を作り出せることから、実験的糖尿病動物の作成に頻用されている。

著者は、ラットの頸静脈内に 65 mg/kg の STZ を単回注入する方法を用いて STZ 糖尿病ラットを作製したが、STZ 投与 24 時間後にはラット全例(40 匹)が高血糖状態を呈しており、死亡例を除き実験終了時点の 6 カ月後まで高血糖を持続し得た。また今回の STZ 投与ラット

は、血中コレステロールの増加と著明なトリグリセライドの増加を呈していた。したがって著者は、ラットについてはSTZの単回静注でヒト糖尿病に類似の病態を示す糖尿病モデルの作成が可能と考える。

STZ糖尿病ラットの糸球体病変：これまでに報告された多数の知見^{19)~21)}をまとめてみると、STZ糖尿病ラットに共通の糸球体病変はGBM肥厚とメサンギウム内PAS陽性物質の沈着といえる。さらに糸球体毛細血管内に硝子様物質の沈着が加わるとする報告もみられる²²⁾。

本研究におけるラット腎糸球体の電顕像はSTZ投与3カ月後には対照群に認められないGBM肥厚を示しており、6カ月後にはその肥厚が対照群の約1.4—2.0倍に達していた。またSTZ投与6カ月後の光顕像ではGBM肥厚とメサンギウム域の拡大が認められ、さらには血管極を中心に係蹄内およびメサンギウム域に硝子様物質の沈着、すなわち硝子様病変も観察された。これらの病変は先人の報告と一致しており、本法が糖尿病性腎症のモデルとして有用なことを裏づけている。

3. GBMの精製について

糸球体の単離方法：sieving methodはKrakower & Greenspon¹⁾によって考案され、Spiro¹¹⁾が発展させたものであり、腎皮質をメッシュサイズの異なるふるいを通して単離糸球体を得る手段である。また、sieving methodは、メッシュサイズを変更することにより種の異なる動物から糸球体を単離することが可能であり、生体材料から単離糸球体を多量に採取する方法として今日では一般に用いられている。

しかし、実験動物の発育過程で糸球体を採取する場合には、週齢とともに糸球体が増大することに留意しなければならない。著者は本研究において、実験開始3カ月後(20週齢)と6カ月後(32週齢)とでメッシュサイズを変更するように工夫した。その結果16回のsievingで得られた糸球体上に糸球体以外の混在を認めたのはわずか2回にすぎなかった。

GBMの精製方法：糸球体からGBMを精製する方法として水酸化ナトリウム処理と超音波処理の2法があるが、化学組成の分析には一般に後者が用いられている。著者は10分の超音波処理法を用いたが、位相差顕微鏡による観察範囲では細胞成分の除去は完全であり、高純度のGBMを得ることができた。

4. 糖尿病性腎症におけるGBMの生化学的組成について

(1) ヒト糖尿病性腎症におけるGBMの生化学的組成
ヒト糖尿病性腎症におけるGBMの生化学的組成は報告によって大きく相異しており、統一した見解が得られ

ていないのが現状である。前述したように、Lazarow & Speidel²³⁾はヒト糖尿病性腎症におけるGBMのアミノ酸組成および糖組成が健康人における組成と異ならないと最初に報告している。以後、Beisswenger & Spiro³⁾は健康人に比して糖尿病性腎症ではヒドロキシリジン、グルコースおよびガラクトース含量の増加が認められたという。またKefalides⁴⁾は、シスチンとシアル酸含量の減少を認めたが、グルコースとガラクトース含量には変化がみられなかったとしている。

(2) STZ糖尿病ラットにおけるGBMの生化学的組成

アミノ酸組成について、Beisswenger⁵⁾は、正常ラットに比してSTZ糖尿病ラットのGBMではプロリンとアルギニン含量が減少していると報告している。小出⁶⁾は、ヒドロキシプロリン、プロリンおよびグリシン含量の減少が認められたが、それ以外のアミノ酸含量がすべて増加していたという。Roman et al.⁸⁾は、STZ糖尿病ラットのGBMではヒドロキシプロリン/プロリン比が低下をしていたと述べている。

糖組成に関して、小出⁶⁾はSTZ糖尿病ラットGBMでは正常ラットに比してグルコースとガラクトース含量の増加、Beisswenger⁵⁾はガラクトース含量のみの増加を報告している。一方、冠木⁷⁾は、グルコースおよびガラクトース含量に変化がみられなかったという。

つまり、STZ糖尿病ラットのGBMについても、アミノ酸および糖組成に関してヒト糖尿病性腎症と同様に一定した結論がみられない。このような報告による不一致は、種、週齢、糖尿病状態の程度、GBMの分離および抽出方法の相異に起因するものと思われる。また不一致を生じる最大の要因は、分析試料が微量であることに加え、GBMの構成成分を糖蛋白レベルより以下の最小単位であるアミノ酸や単糖まで分解して検討するためであると推測される。

(3) 糖尿病性腎症におけるGBMのコラーゲンおよび非コラーゲン成分の変化

GBMはコラーゲン成分と非コラーゲン成分から構成されていることは周知のことであり、その両者はすべて糖蛋白から成る。コラーゲン成分はIV型コラーゲン、非コラーゲン成分はラミニン、プロテオグリカン、ファイブロン、エンタクチンとニドゲンが主要構成成分である。

1) コラーゲン成分

¹⁴Cあるいは³HでラベルしたプロリンあるいはリジンをSTZ糖尿病ラットに投与してGBMのヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンへの摂取率から糖

尿病におけるIV型コラーゲンの生合成を検討した報告^{229)~251)}がすでにみられる。これらの報告によると、STZ投与後6週間以内の糖尿病ラットではIV型コラーゲンの生合成は亢進しているが、長期罹病のSTZ糖尿病ラットでは亢進がみられなかったという。

2) 非コラーゲン成分

非コラーゲン成分について、Kanwar et al.²⁶¹⁾はSTZ糖尿病ラットのGBMにおけるプロテオグリカン生合成は低下していたと報告している。また、Rohrbach et al.²⁷¹⁾は、基底膜成分を産生するマウスEHS(Engelbath Horn, Swarm)肉腫²⁸¹⁾を自然発症糖尿病マウスの筋肉内に移植させた実験から、EHS肉腫の産生する基底膜ではヘパラン硫酸プロテオグリカン含量の減少とラミニン含量の増加が認められたとしている。

3) コラーゲンと非コラーゲン成分の糖化(glycation)

一方、糖尿病ではヘモグロビンA_{1c}に代表されるように、種々の蛋白は糖化を受けることが知られている。近年、GBMについてもコラーゲンおよび非コラーゲン成分の糖化がGBM肥厚やアルブミン尿の出現に関与しているとの報告^{291)~311)}も散見される。

以上の事柄から、糖尿病におけるGBM肥厚の成因には、既存の基底膜成分の量的変化のみならず、高血糖状態において修飾された成分の蓄積、すなわち質的变化の関与も示唆される。

(4) 本研究におけるSTZ糖尿病ラットのGBM糖蛋白組成

本研究では、以上の点を踏まえてSTZ糖尿病ラットのGBMを尿素で可溶化したのち、尿素可溶化成分をSDS-PAGEで糖蛋白として分離し、糖蛋白結合物質であるレクチンを用いて糖蛋白レベルで組成変化を検討した。なおGBMの糖蛋白組成をレクチン染色によるSDS-PAGEで検討した報告は従来にはみられない。

1) レクチン染色像

レクチン染色での主要バンドは、STZ糖尿病ラットと対照ラット間でほぼ一致しており、とくにRCA-120およびPHA-E₄の糖蛋白染色ではSTZ糖尿病ラットと対照ラットの両者間に差がなかった。この所見は、別の機会に4回検討したが、一致した結果が得られた。つまり、今回の成績は、GBMの精製方法に再現性があることを明らかにしている。なお、今回の実験から判明した唯一の事項は、WGAおよびConAで染色される分子量60,000の糖蛋白がSTZ糖尿病ラットに存在していたことである。

糖蛋白は、そのポリペプチド鎖と糖鎖間の結合様式か

ら、N-結合型糖蛋白とO-結合型糖蛋白の2種類に分類される。さらにN-結合型糖蛋白は、その結合している糖鎖の種類から複合(complex)型、混成(hybrid)型および高マンノース(high-mannose)型の3型に分類されている。WGAが認識する糖は、複数のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が $\beta(1.4)$ -グリコンド結合したいわゆるキチンオリゴ糖である。またWGAは分岐したGlcNAc(bisecting GlcNAc)を有する混成型の糖鎖のN-結合型糖蛋白に親和性が強く、N-アセチルノイラミン酸(NeuNAc)がクラスターを形成しているO-結合型糖蛋白にも親和性を示す³²¹⁾。ConAは、単糖に対しては α -D-マンノース(Man)あるいは α -D-グルコース(Glc)に親和性が強く、糖蛋白については高マンノース型の糖鎖を有するN-結合型蛋白に親和性が強い、しかしConAはbisecting GlcNAcの存在するもの、3本側鎖あるいは4本側鎖の複合型糖鎖をもつN-結合型糖蛋白には親和性を示さない³³¹⁾。RCA-120は糖鎖の非還元末端に β -D-ガラクトース(Gal)残基を含む糖蛋白を認識する³⁴¹⁾。PHA-E₄は、単糖のN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)とbisecting GlcNAcの存在する複合型糖鎖を有するN-結合型糖蛋白に親和性を示す³⁵¹⁾。

したがって、本研究においてWGAおよびConAで染色された分子量60,000の糖蛋白は、糖鎖にGlcNAcと α -D-Glcあるいは α -D-Manを高率に含有していることが示唆された。加えて、混成型、bisecting GlcNAcが存在しない複合型および高マンノース型の糖鎖を有するN-結合型糖蛋白あるいはNeuNAcを多く結合するO-結合型糖蛋白であることが推測される。

つぎにこの分子量60,000の糖蛋白のアミノ酸組成について考察する。

2) 分子量60,000の糖蛋白のアミノ酸組成

IV型コラーゲンのヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジン組成比率はそれぞれ約11モル%、3.7モル%である。今回の分子量60,000の糖蛋白は、ヒドロキシプロリンが0.33モル%の低比率、ヒドロキシリジンが検出感度以下の低濃度であった。すなわち、この糖蛋白は少なくともIV型コラーゲン分子の変性あるいは分解したものの一部ではないことも推測される。また、既知のGBM構成成分^{361)~391)}は、分子量が80,000以上であり、著者が分離した糖蛋白と分子量が異なっている。さらに、この糖蛋白のアミノ酸組成は既知のGBM構成成分とも一致しない。したがって、この分子量60,000の糖蛋白は、未知の物質であり、正常ラットの非コラーゲン成分が糖尿病状態によって変化したものか、正常のGBMに極微量存在する未知の成分が糖尿病状態によって増加し

たものか、あるいはGBMの構成成分以外の糖化された物質またはその一部がGBMに捕獲されたもののいずれかと考えられる。すなわち、この分子量60,000の糖蛋白は、GBM糖蛋白組成の質的变化に伴って出現する物質と考えられ、STZ糖尿病ラットにおけるGBM肥厚の成因に関与しているものと判断してよいようである。

生体における蛋白生成にはメッセンジャーRNAが鋳型として介在している。一方、糖鎖は、生成に対する鋳型が介在せず、蛋白生成後、多数の糖転移酵素による基質特異性反応の連係によって生成される。加えて糖鎖は過酸化物質、活性酸素、糖化などによって修飾を受ける。つまり、糖蛋白の糖鎖はペプチド部分に比して性状変化を受け易いものと判断される。したがって、本研究で確認された分子量60,000の糖蛋白が、正常のGBMにも存在する成分が性状変化を受けた物質であるとすれば、蛋白部分よりも糖鎖部分に修飾を受けている可能性が高い。

結 語

ストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットモデルをWistar系ラットで作製し、そのGBMの糖蛋白組成をレクチン染色による電気泳動法で解析して以下の結論を得た。

1. STZ糖尿病ラットのGBMには、正常対照ラットに認められないWGAおよびConAで染色される分子量60,000の糖蛋白が存在していた。
2. 分子量60,000の糖蛋白の糖鎖にはGlcNAc, α -D-Glcおよび α -D-Manが存在していた。
3. この糖蛋白のアミノ酸組成の10モル%以上を占めるアミノ酸はプロリン(11.73モル%)、グルタミン酸(11.71モル%)およびグリシン(10.28モル%)であった。一方、ヒドロキシプロリンは0.33モル%の低組成比率、ヒドロキシリジンは検出感度以下の低組成比率であった。

以上、本研究により、STZ糖尿病ラットのGBM構成成分として、正常対照ラットに認められない分子量60,000の糖蛋白が存在し、STZ糖尿病ラットのGBMに組成変化があることが確認された。

本論文の要旨は第32回日本腎臓学会総会(1989年、浜松)および第11回国際腎臓学会(1990年、東京)において報告した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました石川兵衛教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました本学生化学教室神谷知彌教授ならび

に公衆衛生学教室森山忠重教授に深謝いたします。さらに直接の御指導、御教示を賜りました土肥和紘講師に感謝いたします。また本研究を行なうにあたり多大な御助言を頂い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内科腎研究班の諸先生方に感謝いたします。

最後に走査電子顕微鏡写真を撮影して頂いた浜松医科大学中央電子顕微鏡室室長村中祥悟博士に感謝いたします。

文 献

- 1) **Krakower, C. A. and Greenspon, S. A.** : Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Arch. Pathol.* **51**: 629, 1951.
- 2) **Lazarow, A. and Speidel, E.** : The chemical composition of the glomerular basement membrane and its relationship to the production of diabetic complications. *in* Small blood vessel involvement in diabetes mellitus (Siperstein, M. D., Colwell, A. R. and Meyer, K., eds.). American Institute of Biological Sciences, Washington D. C. p 127, 1964.
- 3) **Beisswenger, P. J. and Spiro, R. G.** : Studies on the human glomerular basement membrane. Composition, nature of the carbohydrate units and chemical changes in diabetes mellitus. *Diabetes* **22**: 180, 1973.
- 4) **Kefalides, N. A.** : Biochemical properties of human glomerular basement membrane in normal and diabetic kidneys. *J. Clin. Invest.* **53**: 403, 1974.
- 5) **Beisswenger, P. J.** : Glomerular basement membrane. Biosynthesis and chemical composition in the streptozotocin diabetic rat. *J. Clin. Invest.* **58**: 844, 1976.
- 6) 小出 輝 : 糸球体基底膜の化学構造. *日医会誌.* **84**: 412, 1980.
- 7) 冠木敬一郎 : ストレプトゾトシン糖尿病ラット腎糸球体基底膜の化学組成. *日腎誌.* **27**: 789, 1985.
- 8) **Romen, W., Lange, H.-W., Hempel, K. and Heck, Th.** : Studies on collagen metabolism in rats. II. Turnover and amino acid composition of the collagen of glomerular basement membrane in diabetes mellitus. *Virchows Arch. [Cell*

- Pathol.] 36: 313, 1981.
- 9) **Goldstein, I. J. and Hayes, C. E.** : The lectins: Carbohydrate-binding protein of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35: 127, 1978.
 - 10) 大沢利昭, 森 良一編: レクチン. 講談社サイエンティフィク, 東京, 1976.
 - 11) **Spiro, R. G.** : Studies on the renal glomerular basement membrane. Preparation and chemical composition. *J. Biol. Chem.* 242: 1915, 1967.
 - 12) **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.
 - 13) **Matsudaira, P.** : Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035, 1987.
 - 14) **Bartles, J. R. and Hubbard, A. L.** : ¹²⁵I-wheat germ agglutinin blotting: Increased sensitivity with polyvinylpyrrolidone quenching and periodate oxidation/reductive phenylation. *Anal. Biochem.* 140: 284, 1984.
 - 15) **Pirart, J.** : Diabetes mellitus and its degenerative complications: A prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care* 1: 252, 1978.
 - 16) **Williamson, J. R., Vogler, N. J. and Kilo, C.** : Muscle capillary basement membrane changes in diabetes mellitus. *Diabetes* 19(supp): 356, 1970.
 - 17) **Dunn, J. S. and McLetchie, N. G. B.** : Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* 2: 384, 1943.
 - 18) **Rakieten, N., Rakieten, M. L. and Nadkarni, M. V.** : Studies on the diabetogenic action of streptozotocin(NSC-37917)^{1,2}. *Cancer Chemother. Rep.* 29: 91, 1963.
 - 19) **Rasch, R.** : Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. : Glomerular basement membrane thickness. *Diabetologia* 16: 319, 1979.
 - 20) **Rasch, R.** : Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. : The mesangial regions. *Diabetologia* 17: 243, 1979.
 - 21) **Bleasel, A. F. and Yong, L. C. J.** : Streptozotocin induced diabetic nephropathy and renal tumors in the rat. *Experientia* 38: 129, 1982.
 - 22) **Wehner, H., Kösters, W., Strauch, M. and Staudenmeir, M.** : Effect of islet transplantation on the glomerular changes in streptozotocin-diabetic rats. *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* 388: 137, 1980.
 - 23) **Cohen, M. P. and Khalifa, A.** : Renal glomerular collagen synthesis in streptozotocin diabetes. Reversal of increased basement membrane synthesis with insulin therapy. *Biochem. Biophys. Res. Acta* 500: 395, 1977.
 - 24) **Brownlee, M. and Spiro, R. G.** : Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rat. In vivo studies. *Diabetes* 28: 121, 1979.
 - 25) **Hasslacher, Ch. and Wahl, P.** : Influence of diabetes control on synthesis of protein and basement membrane collagen in isolated glomeruli of diabetic rats. *Res. Exp. Med.* 176: 247, 1980.
 - 26) **Kanwar, Y. S., Rosenzweig, L. J., Linker, A. and Jakubowski, M. L.** : Decreased *de novo* synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes : Biochemical and autoradiographic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2272, 1983.
 - 27) **Rohrbach, D. H., Wagner, C. W., Star, V. L., Martin, G. R., Brown, K. S. and Yoon, J. -W.** : Reduced synthesis of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Biol. Chem.* 258: 11672, 1983.
 - 28) **Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T. and Swarm, R.** : A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J. Exp. Med.* 145: 204, 1977.
 - 29) **Cohen, M. P., Urdanivia, E., Surma, M. and Wu, V. -Y.** : Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95: 765, 1980.
 - 30) **Copeland, K. R., Yatscoff, R. W., Thliveris, J. A., Mehta, A. and Penner, B.** : Non-enzymatic glycation and altered renal structure and function in the diabetic rat. *Kidney Int.* 32: 664, 1987.
 - 31) **Garlick, R. L., Bunn, H. F. and Spiro, R. G.** :

- Nonenzymatic glycation of basement membranes from human glomeruli and bovine sources. Effect of diabetes and age. *Diabetes* **37**: 1144, 1988.
- 32) **Yamamoto, K., Tsujii, T., Matsumoto, I and Osawa, T.** : Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin. *Biochemistry* **20**: 5894, 1981.
- 33) **Baenziger, J. U. and Fiete, D.** : Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **254**: 2400, 1979.
- 34) **Baenziger, J. U. and Fiete, D.** : Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **254**: 9795, 1979.
- 35) **Yamashita, K., Hitoi, A. and Kobata, A.** : Structural determinants of *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinating lectin for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **258**: 14753, 1983.
- 36) **Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J.-M. and Martin, G. R.** : Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254**: 9933, 1979.
- 37) **Kato, M., Oike, Y., Suzuki, S. and Kimata, K.** : Selective removal of heparan sulfate chains from proteoheparan sulfate with a commercial preparation of heparitinase. *Anal. Biochem.* **148**: 479, 1985.
- 38) **Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H. and Wick, G.** : Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur. J. Biochem.* **137**: 455, 1983.
- 39) **Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B. and Chung, A. E.** : Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **256**: 5209, 1981.