

肺サーファクタント蛋白Cの分子構造と生理学的機能
の関係：
ブタおよび胞蛋白症患者由来の蛋白を用いた再構築
物質による検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9472

肺サーファクタント蛋白Cの分子構造と生理学的機能の関係

—ブタおよび肺胞蛋白症患者由来の蛋白を用いた

再構築物質による検討—

金沢大学医学部医学科麻酔・蘇生学教室 (主任: 小林 勉教授)

太 田 圭 亮

サーファクタント蛋白C (surfactant protein C, SP-C) は、肺サーファクタントがリン脂質の膜を形成し、肺胞の収縮力を弱めるために不可欠な因子であると考えられている。SP-Cは2個の疎水性構造、すなわち26個のアミノ酸からなる α ヘリックス構造とパルミトイル基を有しているが、その作用機序については不明な点が多い。現在、呼吸窮迫症候群の成因究明や治療用サーファクタントを開発するうえで、SP-Cの作用機序を解明することが急務になっている。近年、肺胞蛋白症患者の肺内貯留物には、パルミトイル基を欠いた単体のSP-C (mSP-C) やmSP-Cが重合した多量体のSP-C (pSP-C) の存在することが見い出された。今回著者は、SP-Cの構造と生理機能の関係を検索する目的で、上記のmSP-C、pSP-Cおよび通常のSP-C (nSP-C、ブタ由来) を用いて再構築サーファクタントを作製し、呼吸窮迫症候を呈しているウサギ未熟胎仔に投与して、それらの薬効を比較した。なお、SP-C分画以外の成分としては、ブタのサーファクタント蛋白Bと合成リン脂質の混合物を用いた。最大吸気圧を25 cmH₂Oに設定した人工呼吸下では、SP-C分画が存在しないものを投与した動物の換気量は、7.3 ± 1.0 ml/kg (\bar{x} ± SEM) であった。また、mSP-Cを添加してもその効果は見られなかった。一方、nSP-CまたはpSP-Cを2%含む再構築サーファクタントはそれぞれ14.3 ± 0.7 ml/kgおよび18.4 ± 4.1 ml/kgと、前2者に比べ有意に大きい換気量を発現させた。以上の結果から、SP-Cの生理作用にはパルミトイル基が重要な働きをしていると結論された。またパルミトイル基が欠損していても、 α ヘリックス構造が2個存在すれば生理作用を示すと結論された。したがって、SP-Cは、サーファクタントの主成分であるリン脂質の二重膜の間に2つの疎水性構造で橋わたしを作り、表面活性を有する膜の形成を促進させる働きをしているものと推察された。

Key words pulmonary alveolar proteinosis, surfactant protein C, polymeric form, monomeric form, palmitoyl residues

肺サーファクタントは、肺胞の表面張力を減少させて換気力学を正常に保つ物質であり¹⁾、主としてリン脂質²⁾³⁾とサーファクタント蛋白 (surfactant protein, SP) から成り立っている⁴⁾⁵⁾。またSPには、親水性のAおよびD (SP-AおよびSP-D) と疎水性のBおよびC (SP-BおよびSP-C) の存在することが明らかになっている⁶⁾。現在のところ、表面張力を減少させる作用に対してSP-AとSP-Dの関与は少ないが⁷⁾、疎水性のSP-BとSP-Cは不可欠であると考えられている⁸⁾¹⁰⁾。しかし、これら疎水性SPの作用機序、とくにSP-Cとリン脂質の相互作用については、不明な点が少なくない。

一方、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) の治療には大量の人工肺サーファクタントが必要であり、治療費は高額となる。そのため、SP-Cまたはその相似物質の人工合成は、ARDSの治療に大きく貢献するであろう。SP-Cは、26個のアミノ酸よりなる疎水性の α ヘリックス構造に9個の親水性アミノ酸がつながった構造をしてい

る¹²⁾¹³⁾。また親水性部分の5番目と6番目に存在するシステインには、パルミトイル基がチオエステル結合している¹⁴⁾¹⁵⁾。現在、このパルミトイル側鎖が機能発現に必要なものか否かは不明である。したがって、パルミトイル側鎖を欠いた場合の機能は、人工肺サーファクタントの開発に対して多くの示唆を提供するものと考えられる。

近年、肺胞蛋白症 (pulmonary alveolar proteinosis, PAP)¹⁶⁾患者の肺内貯留物には、パルミトイル側鎖を欠いた単体のSP-C (monomeric form SP-C, mSP-C) や同じくパルミトイル側鎖を欠いた多量体のSP-C (polymeric form SP-C, pSP-C) の含まれていることが明らかになってきた¹⁷⁾¹⁸⁾。今回著者は上記の所見に注目し、SP-Cの構造と作用の関係を解明する目的で、正常なSP-C (normal SP-C, nSP-C) を用いて作成した再構築サーファクタント (reconstituted surfactant, RS) とPAP患者のmSP-CやpSP-Cを用いて作成したRSの生理的機能をウサギ未熟胎仔を用いて検討した。

平成12年1月6日受付, 平成12年3月6日受理

Abbreviations: ARDS, acute respiratory distress syndrome; DOPC, dioleoyl-L- α -phosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine; Lyso-PC, lysophosphatidylcholine; MNS, modified natural surfactant; mSP-C,

材料および方法

I. 試料の調製

1. 加工天然サーファクタント (modified natural surfactant, MNS)

新鮮なブタ摘出肺を生理食塩水で洗浄し、回収された洗浄液から、遠心 (150×g, 10分) で細胞成分を除去した。次いで、上清を2000×g, 4℃で1時間遠心して沈渣 (白濁層) を採取した。この遠心操作を再度繰り返して精製した白濁層にクロロホルムとメタノール (2:1, v:v) の混合液を加え、その中の親水性蛋白質 (主としてSP-AとSP-D) を除去した¹⁹⁾。その後、アセトン沈殿法により中性脂肪やコレステロールを除去し、凍結乾燥したものをMNSとした。

2. SP-BおよびnSP-C

まず、凍結乾燥したMNSをクロロホルムとメタノール (1:1, v:v) の混合液に5%の割合で0.1N塩酸を加えた溶媒に溶解した。次いで、セファデックスLH-60カラム (2.5×80 cm, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden) を用いたカラムクロマトグラフィーにより、4.2 mlずつ70本の試験管に分割抽出した²⁰⁾。その際の移動相にはMNSを溶解するのに用いた混合液をそのまま使用し、流速を40 ml/時間に設定した。分光光度計U-2000 (日立, 東京) で測定した紫外線 (280 nm) の吸光度により、試験管番号19~23番の試料をSP-B, 31~38番の試料をnSP-Cとした。なお、各試験管内の試料の一部についてはSwankらの方法²¹⁾により非還元状態でSDS-PAGEを行ない純度を判定した。アクリルアミドの濃度は12.5%で、1レーンあたりの蛋白量は10 μgとした。また、脂質の含有量をBartlettの方法²²⁾で測定した。その後、試験管内の試料を各SPごとに一括し、蛋白質濃度をmicro-Kjeldahl法²³⁾で測定したうえで、実験に使用するまで上記の溶媒に溶かしたまま-75℃で保存した。

3. mSP-CおよびpSP-C

mSP-CとpSP-Cは、2名のPAP患者 (50才男性および46才女性) の肺洗浄液から分離した。なお、肺洗浄は、治療を目的として生理食塩水を用いて行われたものである²⁴⁾。各患者の洗浄液を2000×g, 4℃で1時間遠心し、得られた沈渣を-75℃で保存した。まず、両患者の沈渣を一括し、約5倍量のクロロホルムとメタノール (2:1, v:v) の混合液を加えて疎水性分画を採取した。次いで、前項と同じ方法 (カラムクロマトグラフィーと紫外線吸光度測定) を用いて上記の疎水性分画を67本の試験管に分割抽出し、試験管番号18~23番のものを肺胞蛋白由来のSP-B (papSP-B), 26~29番のものをpSP-C, 32~40番のものをmSP-Cとした。各SPの純度の判定や濃度の測定も、MNS由来のSPの場合と同様の方法で行った。その際、mSP-CとpSP-Cの分離度についても判定するため、SDS-PAGEは非還元状態とメルカトルエタノールを用いた還元状態の両方で行った。各SPは、それぞれを一まとめにし実験に使用するまで、カラムクロマトグラフィーの溶媒に溶かしたまま-75℃で保存した。

4. パルミトイル基の測定

nSP-C, mSP-CおよびpSP-Cに結合しているパルミトイル基

の含有量は、Morrisonの方法²⁵⁾に基づき各試料を0.1 Mの水酸化カリウムで加水分解した後、三フッ化ほう素でメチル化しガスクロマトグラフィーで測定した。

5. RS

本実験では、脂質構成とSP-Bの含有量を全て同一にした9種類のRSを作成した。すなわち、脂質成分としては、合成ジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmytoyl-L- α -phosphatidylcholine, DPPC) (Sigma Chemical, St. Louis, MO), 合成ジオレオイルホスファチジルコリン (dioleoyl-L- α -phosphatidylcholine, DOPC) (Sigma Chemical), および卵黄由来のホスファチジルグリセロール (L- α -phosphatidyl-DL-glycerol, PG) (Sigma Chemical) の3種類のリン脂質を用いた。まず、これらをクロロホルムに溶解し、DPPC:DOPC:PGの重量比が60:20:20になるように混合した。次いで、このリン脂質の混合液にMNS由来のSP-B (カラムクロマトグラフィーの溶媒に溶かしたものを) を0.7% (w/w) 添加し、SP-C成分を欠いたRS (oRS) とした。

oRSに、nSP-C (カラムクロマトグラフィーの溶媒に溶かしたものを) を1%, 2%および3%あて添加し、それぞれをnRS-1, nRS-2およびnRS-3とした。同様にoRSに1%, 2%および3%あてmSP-Cを添加し、mRS-1, mRS-2およびmRS-3とした。またpRS-1およびpRS-2を同様の方法で作成した。しかし、pSP-Cの量が不足したためpRS-3は用意することができなかった。これらのRSは、窒素を吹送して溶媒を除去した後、凍結乾燥して保存し、実験に使用する際には生理食塩水中に50 mg/mlの濃度で分散した。なお、この分散液のpHは、2.5以下の酸性を示すため0.1 Nの水酸化ナトリウムを加えてMNSの分散液と同じpH (5.5~6.5) に調整した。

II. 換気力学の改善効果判定 (ウサギ胎仔を用いた実験)

1. 実験1 (MNSによる検討: 方法の妥当性に関する検討)

実験1では、合計20羽のウサギ未熟胎仔を用いた。交配27日目 (26日22時から27日5時間) の妊娠ウサギ (日本白色種, 満期妊娠日数は31日) 3羽をペントバルビタール50 mg/kgの静注で麻酔した後、帝王切開で未熟胎仔を娩出した。胎仔の体重を測定後、腹腔内に0.5 mgのペントバルビタールを投与し、気管に18 Gの金属カニューレを挿入した。その後、同腹の胎仔 (3~10羽) を無作為にMNS群と対照群の2群に分けた。MNS群 (n=10) には、MNSの分散液 (濃度, 50 mg/ml) を100 μlあて気管内に注入し、対照群 (n=10) の気管内には何も投与しなかった。これらの処置が終了した胎仔は、37℃に保った換気量測定装置²⁶⁾の気密室に順次収容し持続的気道陽圧下に待機させた。

すべての胎仔の準備が出来た段階でパンクロニウム0.02 mgを腹腔内に投与して胎仔を非動化し、純酸素による従圧式の間歇的陽圧換気を開始した。人工呼吸器にはサーボ900B (Simens-Elema, Solna, Sweden) を用い、最大吸気圧 (peak inspiratory pressure, PIP) は作動圧を変えることで調節した。呼吸数は1分間40回、吸気と呼気の時間比は1:1に設定した。人工呼吸開始後、最初の1分間は、気管内に投与した試料が肺胞にまで到達するように、PIPを30 cmH₂Oに設定した。その後の15分間はPIPを25 cmH₂Oに、次いで5分毎に20 cmH₂O,

monomeric form SP-C; nSP-C, normal SP-C; PAP, pulmonary alveolar proteinosis; PG, L- α -phosphatidyl-DL-glycerol; PIP, peak inspiratory pressure; pSP-C, polymeric form SP-C; RS, reconstituted surfactant; SP, surfactant protein

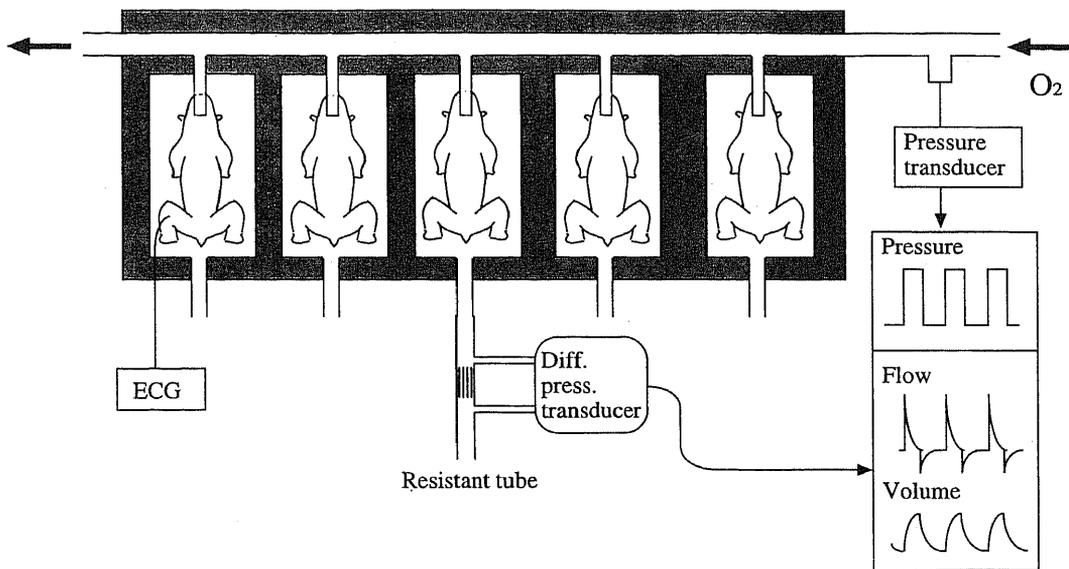


Fig. 1. Recording system for tidal volume of immature newborn rabbits. The animals were tracheotomized, treated with various surfactants, and kept in multiple plethysmographs (capacity = 10 animals). They were connected in parallel to the respirator which are set at a mode of pressure-controlled ventilation. The tidal volume was calculated by integration of pressure difference across the resistant tube attached to the plethysmograph. Diff. press., differential pressure; O₂, oxygen; ECG, electrocardiograph.

15 cmH₂O と低下させ、最後に再び25 cmH₂O に上昇させた。その間、5分毎に各PIPでの換気量を測定した。換気量は、各気密室に接続した気流抵抗管前後の圧差を差圧検出器 (TR-602, 日本光電, 東京) で検出し、その出力を積分器 (AR-601G, 日本光電) に導いて求めた²⁷⁾ (図1)。なお、実験中は人工呼吸器の回路内圧を常時監視し、設定した換気条件が保たれていることを確認した。

換気量測定後、各胎仔の心電図を記録して心拍数が120/分以上のものを生存動物と判定した (ウサギ未熟胎仔の心拍数の正常値は240~320/分)。その後、過量のベントバルビタールを腹腔内に投与して胎仔を屠殺し、経横隔膜的に気胸の有無を確認した。なお、気胸を認めた胎仔は、統計処理から除外した。

2. 実験2 (RSによるSP-Cの種類と機能の関係の検討)

1) nRSシリーズ

nSP-Cの機能を調べるために交配27日目の5羽の妊娠ウサギから合計31羽の未熟胎仔を娩出し、nRS-1群 (n=7)、nRS-2群 (n=10)、nRS-3群 (n=7) とoRS群 (n=7) の4群に無作為にわけ、各群に対応するRSの分散液 (濃度, 50 mg/ml) を100 μlあて気管内に注入した。換気量測定は前項の実験1と同様に行ったが、PIPを25 cmH₂Oに設定した際の換気量は、換気開始後30分目の値を採用した。なお前項と同様、気胸を認めた胎仔の所見は統計処理から除外した。

2) mRSシリーズ

mSP-Cの機能の調査には、5羽の妊娠ウサギから娩出された合計32羽の未熟胎仔を用いた。それらをmRS-1群 (n=7)、mRS-2群 (n=9)、mRS-3群 (n=7) とoRS群 (n=7) の4群に無作為にわけ、各々に対応するRSを投与した。投与量、換気量の測定法、各データの処理法などは、nRSシリーズと同一の方法で行った。

3) pRSシリーズ

pSP-Cの機能を調べるため、4羽の妊娠ウサギより合計24羽

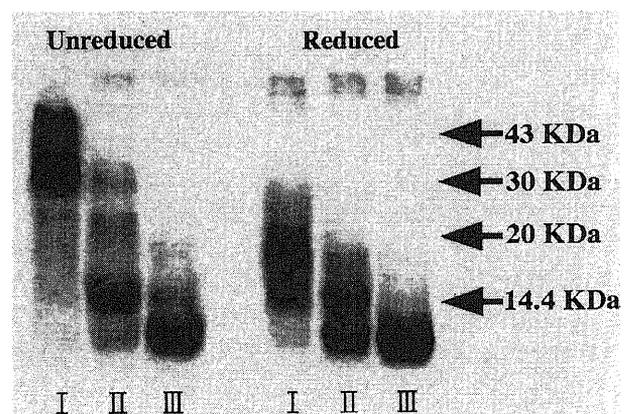


Fig. 2. SDS-PAGE (12.5%) profile of unreduced and reduced stages of surfactant proteins. I, surfactant protein B isolated from patients with pulmonary alveolar proteinosis (papSP-B); II, polymeric form surfactant protein C (pSP-C); III, monomeric form surfactant protein C (mSP-C).

の未熟胎仔を娩出し、pRS-1群 (n=7)、pRS-2群 (n=10) およびoRS群 (n=7) の3群に無作為にわけ、各々に対応するRSを投与した。なお、RSの種類以外の実験条件は、nRSシリーズやmRSシリーズと同一にした。

Ⅲ. 統計処理

体重および換気量の測定結果は、平均値±標準誤差で表わし、それらの群間の比較は、分散分析を行ったうえ Bonferroni の多重比較テストで判定した。危険率 (p) が0.05未満をもって有意差とした。

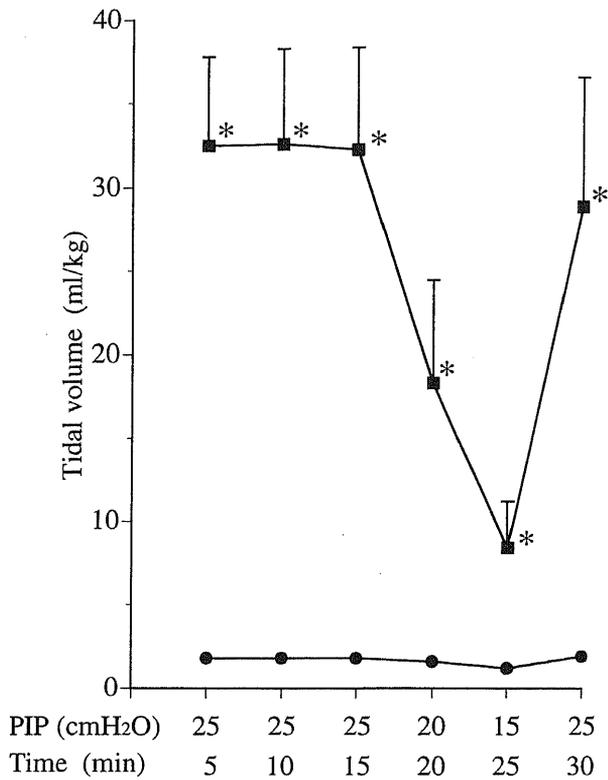


Fig. 3. Tidal volumes at various peak inspiratory pressures in animal experiment 1. ■, animals receiving modified natural surfactant (n = 8); ●, animals receiving no surfactant as the control (n = 10). PIP, peak inspiratory pressure. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs control.

成 績

I. SPの組成

MNSよりカラムクロマトグラフィーで分離したSP-BおよびSP-Cの各試料をSDS-PAGEで検定した結果、目的とする各蛋白はほぼ純粋に分離されていることが確認された。PAP患者より分離したpapSP-B, pSP-CおよびmSP-C各分画のSDS-PAGEの結果を図2に示す。非還元状態の結果より、pSP-CとmSP-Cの各分画はほぼ純粋なものであると確認された。またpSP-C分画は、非還元状態ではmSP-Cより遅く泳動されたのに対し、還元状態ではmSP-Cとほぼ同じ位置に泳動されるものが認められた。またpapSP-Bは、還元状態の方が非還元状態よりも早く泳動された。なお、MNSにはSP-Bが0.36% (w/w)、SP-Cが0.73%含まれており両者の比はほぼ1:2であった。一方、PAP患者由来のpapSP-B, pSP-C, mSP-Cの重量比は27:23:50であり、SP-C分画の比がMNSより若干高かった。同一重量の各SPに含まれるパルミトイル基の量は、nSP-Cの値を1.0とした場合、pSP-Cで0.42、mSP-Cで0.38であった。

II. 換気力学の改善効果

1. 実験1

対照群では気胸を認めなかったが、MNS群では2羽 (2/10) 認められた。対照群では10羽中3羽が実験の終了時点で死亡していた。胎仔の体重は、MNS群で 34.2 ± 1.2 g (n = 8, 気胸が生じた2羽を除外)、対照群で 33.0 ± 1.1 g (n = 10) であり、群間に有意差は認められなかった。

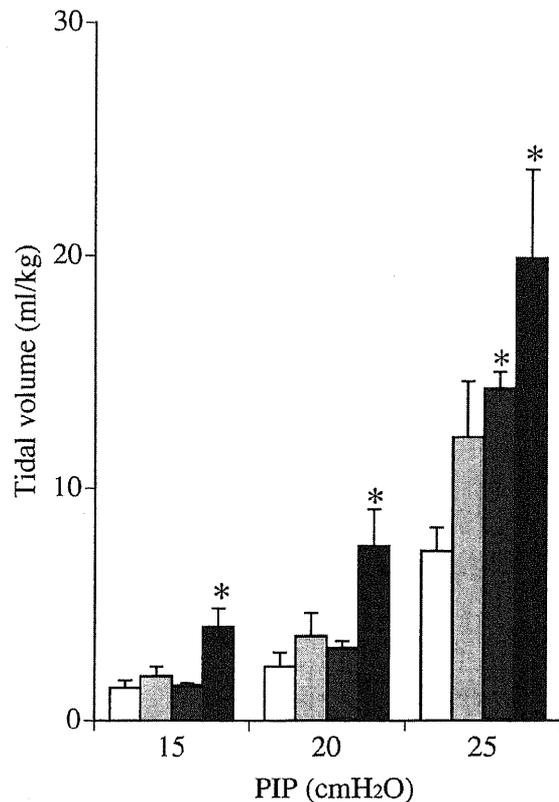


Fig. 4. Tidal volumes at various peak inspiratory pressures in series 1) of experiment 2. The animals were given reconstituted surfactants (RS) which contain normal surfactant protein C (nSP-C) at various concentrations. □, 0% (n = 7); ▨, 1% (n = 7); ■, 2% (n = 10); ■, 3% (n = 7). PIP, peak inspiratory pressure. The constituents of RS other than nSP-C are a mixture of synthetic phospholipids and porcine surfactant protein B. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs RS without SP-C fraction (oRS).

一方、PIPを25 cmH₂Oに設定した際の平均換気量は、MNS群が30 ml/kg以上を呈したのに対し、対照群では2.0 ml/kg以下であった ($p < 0.05$)。またPIPを20および15 cmH₂Oに低下させても、両群の換気量には有意差が認められた (図3)。

2. 実験2

1) nRSシリーズ

oRS群, nRS-1群, nRS-2群およびnRS-3群の胎仔の体重は、それぞれ 31.1 ± 1.1 g (n = 7), 28.2 ± 1.3 g (n = 7), 31.4 ± 1.4 g (n = 10), 31.8 ± 1.2 g (n = 7)であり、群間に有意差は認められなかった。各群ともに、気胸を認めた胎仔や死亡した胎仔はいなかった。

PIPが25 cmH₂Oの場合、換気量はnSP-Cの濃度に依存して増加し、nRS-2およびnRS-3群では、nSP-Cを含まないoRSより有意に大きな値を示した。PIPが15および20 cmH₂Oの場合、nRS-3群のみ、oRS群より有意に大きな換気量を示した (図4)。

2) mRSシリーズ

oRS群, mRS-1群, mRS-2群およびmRS-3群の体重は、それぞれ 29.8 ± 1.2 g (n = 7), 30.6 ± 1.7 g (n = 7), 32.1 ± 1.4 g (n = 9, 気胸が生じた1羽を除外), 28.8 ± 1.4 g (n = 7)であり、群間に

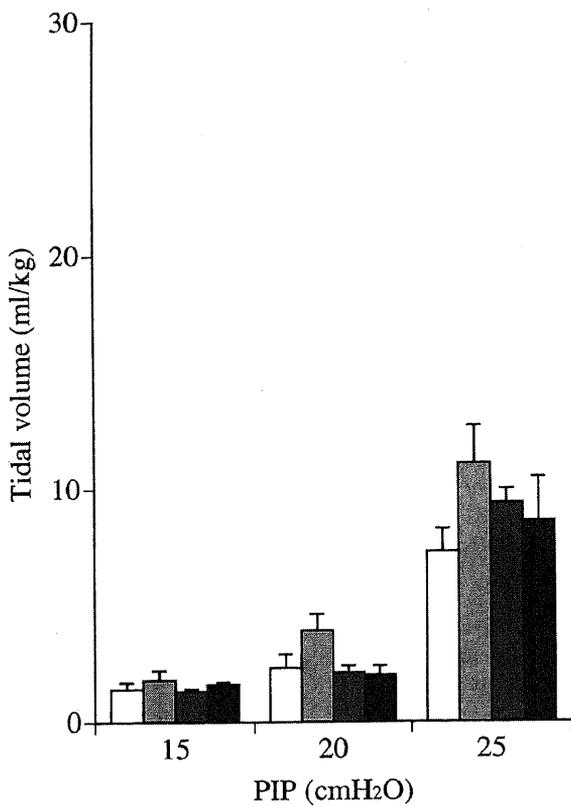


Fig. 5. Tidal volumes at various peak inspiratory pressures in series 2) of experiment 2. The animals were given reconstituted surfactants (RS) which contain monomeric form surfactant protein C (mSP-C) at various concentrations. □, 0% (n = 7); ▨, 1% (n = 7); ▩, 2% (n = 9); ■, 3% (n = 7). PIP, peak inspiratory pressure. The constituents of RS other than mSP-C are a mixture of synthetic phospholipids and porcine surfactant protein B. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

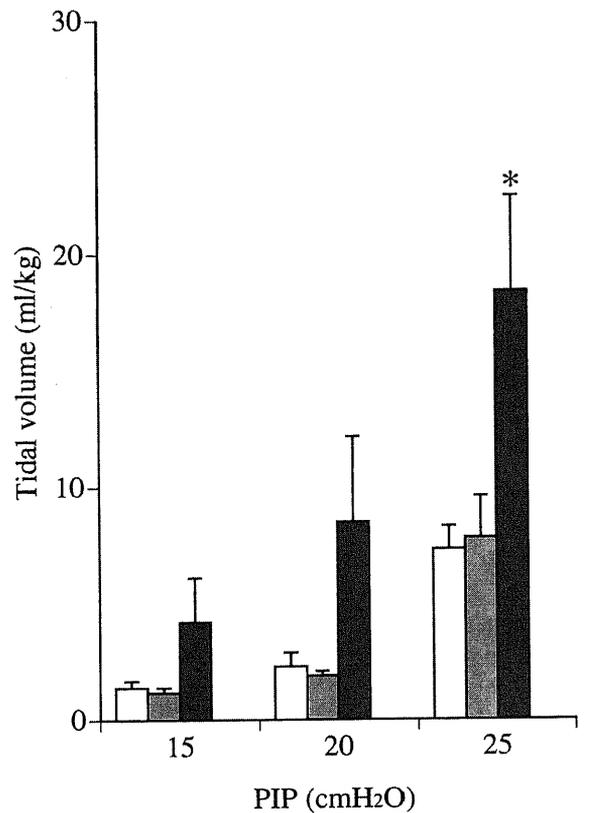


Fig. 6. Tidal volumes at various peak inspiratory pressures in series 3) of experiment 2. The animals were given reconstituted surfactants (RS) which contain polymeric form surfactant protein C (pSP-C) at various concentrations. □, 0% (n = 7); ▨, 1% (n = 7); ▩, 2% (n = 10). PIP, peak inspiratory pressure. The constituents of RS other than pSP-C are a mixture of synthetic phospholipids and porcine surfactant protein B. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs RS without SP-C fraction (oRS).

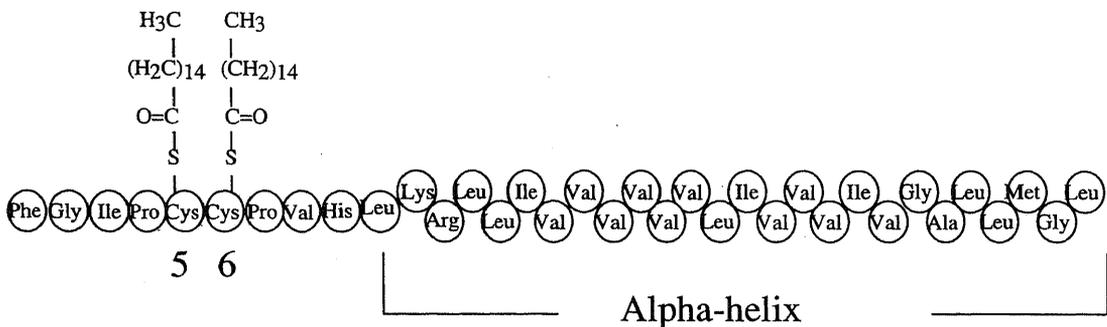


Fig. 7. Structure of normal human surfactant protein C. This protein has a bis-cysteinyll-5, 6-palmitoylated structure. Sulfurs (S) implicit in cysteins are shown in order to emphasize the thioester nature of the linkages (Curstedt et al, reference 14).

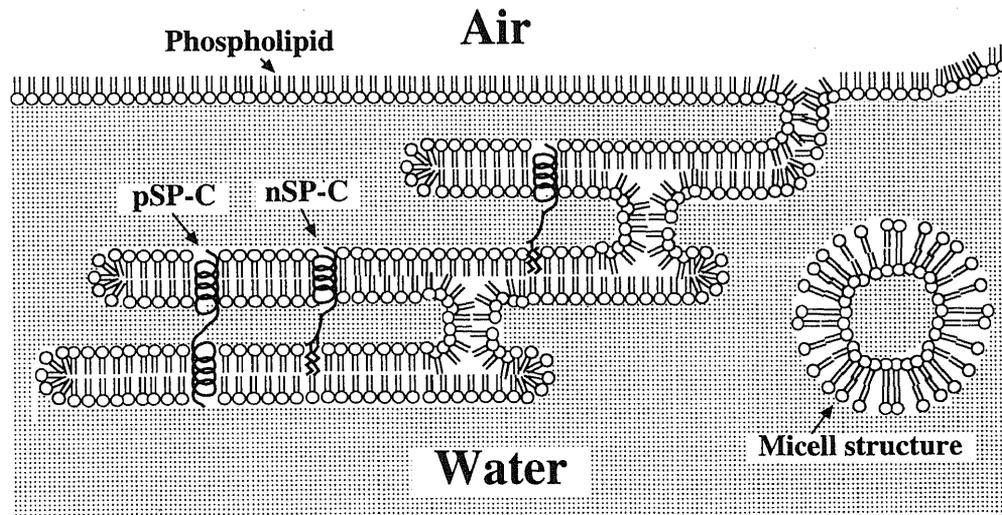


Fig. 8. Schematic illustration for arrangement of surfactant phospholipids in alveolar lining layer. nSP-C, normal surfactant protein C (SP-C); pSP-C, polymeric form SP-C.

有意差は認められなかった。mRS-2群の1羽に気胸を認めたが、全胎仔は換気量の測定が終了するまで生存した。

PIPが25 cmH₂Oの場合、各群の換気量はmSP-Cの量に関係なく約10 mL/kg前後にすぎなかった。またPIPが15および20 cmH₂Oの場合も4群間に有意差は認められなかった(図5)。

3) pRS シリーズ

oRS群、pRS-1群およびpRS-2群の体重は、それぞれ30.1 ± 1.2g (n=7), 30.4 ± 2.1g (n=7), 30.2 ± 1.7g (n=10)であり、群間に有意差は認められなかった。各群とも、気胸を認めた胎仔および死亡した胎仔はいなかった。

PIPが25 cmH₂Oの場合、pRS-1群の換気量はoRS群とほぼ同値であった。しかし、pRS-2群の換気量は、oRS群と較べて有意に大きく2倍以上の値を示した。またPIPが15および20 cmH₂Oの場合でも、pRS-2群の換気量はoRS群より大きい傾向が認められた(図6)。

考 察

在胎27日未満のウサギ未熟胎仔は、サーファクタントが欠如しており、PIPを25 cmH₂Oに高めた人工呼吸によっても5 ml/kg以上の換気量を得られないが、外部よりサーファクタントを補充することで、その活性に見合った換気量の得られることが知られている²⁹⁻³²。今回の実験1の対照群のウサギ未熟胎仔も、すべてのPIPで4 ml/kg以下の換気量しか得られなかった。このことより、今回使用したウサギ未熟胎仔も自己のサーファクタントが欠如していたと言える。またMNSを投与した胎仔の換気量は、PIPを25 cmH₂Oにした場合、平均値で30 ml/kg以上の換気量を得ることができた。したがって、今回使用した動物および方法は、サーファクタントの活性を測定するものとして、適切であると考えられた。

PAP患者の肺内貯留物には、リゾフォスファチジルコリン(lysophosphatidylcholine, Lyso-PC)が多いと報告されている¹⁹。またLyso-PCは、サーファクタントの活性を強く阻害することが知られている³³。このような理由から、本実験では人工的に調製した混合リン脂質を用いて再構築サーファクタントを作製

し、PAP患者のpSP-CおよびmSP-Cの機能を調査した。なお、正常なヒト由来のSP-Cの入手が困難なため、対照にはブタ由来のSP-Cを使用した。ヒトとブタのSP-Cの構造は、アミノ酸の数や種類に若干の違いはあるものの、その機能はほぼ同様であると報告されており³⁴、今回の検討には問題がないと考えられる。

人工サーファクタントの脂質構成として、高橋³⁵はDPPC, DOPC, PGを60:20:20に調整したものが最も高い活性を示すと報告している。したがって、今回の実験で用いたRSの脂質構成は、高橋のものと同じにした。SPに関しては、SP-B分画もSP-C分画もMNSに含まれる量(それぞれ0.36%と0.73%)より多く含有するRS(oRS以外)を作製した。しかし、ウサギ胎仔の換気量で判定した活性は、nRS-3でもMNSより若干劣るものであった。これは、現時点における再構築法の限界であり¹¹、やむを得ないことと考えられた。

PAP患者のSP-Cには、前述したように単量体のmSP-Cと重合体のpSP-Cが存在する¹⁸。本実験で用いたPAP患者由来のpapSP-B, pSP-C, mSP-Cの重量比は、27:23:50であった。ヒトの正常なSP-Cは、図7の様に疎水性の強いアミノ酸で構成される α ヘリックスに、同じ疎水性の強いパルミトイル基の側鎖が5番目と6番目のシステイン残基に結合した構造を有している^{14,15}。mSP-Cは、正常SP-Cの2個のシステイン残基に存在するパルミトイル基が、1個または2個とも欠如したものであると報告されている¹⁷。またpSP-Cはパルミトイル基を欠いたmSP-Cが、システイン残基を介して重合したものであると報告されている^{17,36}。今回のSDS-PAGEでは、非還元状態でpSP-CがmSP-Cより遅く泳動され、還元後にはmSP-Cとほぼ同じ位置に泳動されるものが出現した。したがって、今回使用したpSP-Cは、mSP-Cの重合体であると判断される。またmSP-CおよびpSP-Cに含まれるパルミトイル基の量は、それぞれnSP-Cの約40%であった。このことより今回使用したmSP-CおよびpSP-Cは鈴木らの報告¹⁸と同様、パルミトイル側鎖が一部欠損したものであると考えられる。なお、papSP-BのSDS-PAGEで非還元状態と還元状態で異なる所見が得られたことか

ら, papSP-Bも多量体である可能性が示唆されたが, 本実験ではそれ以上の検討を割愛した。

今回の換気量の測定結果をまとめると, nSP-Cをそれぞれ2%および3%含むnRS-2群, nRS-3群は, SP-Cを含まないoRS群に対し有意に大きな換気量を示した。またpSP-Cを2%含むpRS-2群もoRS群に対し有意に大きな換気量を示した。しかし, mRS群の換気量は, mSP-Cの含有量を3%に高めてもoRS群との間に有意差を示さなかった。すなわち, mSP-Cには換気量を増加させる作用がほとんど存在しないと判定された。一方, mSP-Cの重合体であるpSP-Cには, 換気量を改善する作用があると考えられた。

今回の実験結果を分析する際には, mSP-CやpSP-Cなどのアミノ酸組成に関する検討も必要であろう。しかし, 今回の実験結果は, SP-Cに結合したパルミトイル側鎖が換気量発現に大きく関与していることを強く示唆するものであった。気泡型表面張力計やWilhelmy balanceを用いたWangら³⁰⁾やCreuwelsら³⁰⁾の物理化学的測定では, パルミトイル側鎖が存在すると表面活性が著明に増強すると報告されている。しかし, これらは試験管内の実験結果にすぎない。一方, Hawgoodら³⁰⁾は, 再構築SP-Cを用いた実験でパルミトイル基を付加しても未熟ウサギ胎仔の換気量が増大しなかったと報告している。今回の実験は, パルミトイル側鎖に表面活性を増強する作用があるとするWangらの見解を生体内で始めて確認したのも言い得る。

さらに, pSP-Cは, mSP-Cと同様にパルミトイル側鎖が欠損しているにもかかわらず, 大きな換気量を発現させた。このことは, パルミトイル側鎖の代わりに, 第5, 第6のシステインに疎水性の α ヘリックス構造が存在すれば換気量増加作用が発揮されることを示唆している。すなわち, 本実験結果は, SP-Cの換気量増加作用にはシステイン側鎖として, パルミトイル基や疎水性のアミノ酸による α ヘリックス構造などが結合する必要があることを新しく示唆したものである。

サーファクタントは, リン脂質が界面膜を形成することで肺胞の虚脱を防いでいる。しかし, リン脂質のみでは図8のようなミセルを形成し界面膜を形成し難い。事実, SP-C分画を含まないoRSは換気量をほとんど発現させなかった。肺胞の拡張時(吸気時)に界面膜を形成したサーファクタントのリン脂質は, 収縮時(呼気時)には面積の減少とともに二重膜になると考えられている。その際, SP-Cの α ヘリックス構造部分とパルミトイル基は, 図8に示すように二重膜の中に入り込み橋わたしを作り, ミセルの形成を阻止しているものと想定される。SP-Cの α ヘリックス構造は, 疎水性が強く, リン脂質の二重膜の厚さにほぼ等しい長さを有している³⁰⁾。上記の想定をさらに進めれば, α ヘリックス構造を2個有するpSP-Cも同様の機序で二重膜の異なる部分に橋わたしを作り, ミセル形成を阻止するのではないかと推定される。

以上の実験結果と考察は, 人工サーファクタントを開発する際に有益な参考になるであろう。すなわち, SP-Cを合成する際には, パルミトイル基の付加が重要であると結論された。またSP-Cの重合体にも生理的活性が認められた。SP-Cの重合体は肺胞内でマクロファージにより代謝されにくいと報告されており³⁰⁾, SP-Cの重合体を使用すれば長時間作用性の人工サーファクタントを開発できる可能性も考えられる。SP-Cの構造と機能の関係は上述の人工サーファクタントの開発以外にも,

ARDSでのサーファクタントの不活化やPAPの病因にも関与していると考えられ, さらに検討すべき課題であろう。

結 論

SP-Cの作用機序に関して, パルミトイル側鎖の必要性を検討するため, まずPAP患者の肺貯留物からパルミトイル側鎖が欠損したmSP-C, およびmSP-Cが重合したpSP-Cを抽出した。次いで, これらを用い, 再構築サーファクタントを作製し, それぞれの生理活性をウサギ未熟胎仔を使用して検討した。

1. パルミトイル側鎖が欠損したPAP患者由来のmSP-Cには, 生理学的活性が認められなかった。一方, mSP-Cが重合したpSP-Cには生理活性が認められた。
2. SP-Cが活性を有するためには, 第5および第6番目のアミノ酸であるシステインの側鎖として, パルミトイル基もしくは α ヘリックスなどの疎水性構造が必要である。
3. SP-C内の2個の疎水性側鎖は, サーファクタントの主成分であるリン脂質の二重膜の間に橋渡しを作り, ミセル形成を阻止して, 表面活性を有する膜の形成を促進させる役割を果たしていると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 直接御指導と御校閲をいただいた小林勉教授に深く感謝いたします。また本研究遂行にあたり御協力いただいた麻酔・蘇生学教室の諸先生方, 実験助手の方々ならびに京都大学鈴木康弘教授に対し, 厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Notter RH, Jacob NF. Pulmonary surfactant: an interdisciplinary approach. *J Appl Physiol* 57: 1613-1624, 1984
- 2) Notter RH, Tabak SA, Mavis RD. Surfactant properties of binary mixtures of some pulmonary surfactant components. *J Lipid Res* 21: 10-22, 1980
- 3) Fisher AB, Chander A. Lung surfactant-phospholipids and apoproteins. *Exp Lung Res* 6: 171-174, 1984
- 4) Yu SH, Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem J* 236: 85-89, 1986
- 5) Takahashi A, Fujiwara T. Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 527-532, 1986
- 6) Hall SB, Venkitaraman AR, Whitsett J, Hokm BA, Notter RH. Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants. *Am Rev Respir Dis* 145: 24-30, 1992
- 7) Rider ED, Ikegami M, Whitsett JA, Hull W, Absolom D, Jobe AH. Treatment responses to surfactants containing natural surfactant proteins in preterm rabbits. *Am Rev Respir Dis* 147: 669-676, 1993
- 8) Suzuki Y, Curstedt T, Grossmann G, Kobayashi T, Nilsson R, Nohata K, Robertson B. The role of the low-molecular weight (< 15000 daltons) apoproteins of pulmonary surfactant. *Eur J Respir Dis* 69: 336-345, 1986
- 9) Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 138: 990-998, 1988

- 10) Suzuki Y. Effect of protein, cholesterol, and phosphatidylglycerol on the surface activity of the lipid-protein complex reconstituted from pig pulmonary surfactant. *J Lipid Res* 23: 62-69, 1982
- 11) 早稲田祐子. 換気量増加に必要なサーファクタント関連蛋白の種類および量. *金沢大学十全医会誌* 104: 311-321, 1995
- 12) Johansson J, Szyperski T, Curstedt T, Wuthrich K. The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich alpha-helix. *Biochemistry* 33: 6015-6023, 1994
- 13) Warr RG, Hawgood S, Buckley DI, Crisp TM, Schilling J, Benson BJ, Ballard PL, Clements JA, White RT. Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7915-7919, 1987
- 14) Curstedt T, Johansson J, Persson P, Eklund A, Robertson B, Löwenadler B, Jöwenvall H. Hydrophobic surfactant-associated polypeptides; SP-C as a lipopeptide with two palmitoylated cysteine residues whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2985-2989, 1990
- 15) Stults J, Griffin PT, Lesikar DD, Naidu A, Moffat B, Benson BJ. Lung surfactant protein SP-C from human, bovine and canine sources contains palmityl cysteine thioester linkages. *Am J Physiol* 5: L118-L125, 1991
- 16) Rosen SH, Castleman B, Liebow AA, Enzinger FM, Hunt RT. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 258: 1123-1142, 1958
- 17) Voss T, Schäfer KP, Nielsen PF, Schäfer A, Maier C, Hannappel E, Maaßen J, Landis B, Klemm K, Przybylski M. Primary structure differences of human surfactant-associated proteins isolated from normal and proteinosis lung. *Biochim Biophys Acta* 1138: 261-267, 1992
- 18) 鈴木康弘, 沈 惠卿, 佐藤敦夫, 藤田葉子. 肺蛋白症患者肺洗浄液中の肺表面活性物質アポ蛋白の特徴. *日界面医会誌* 24: 93-98, 1993
- 19) Folch J, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957
- 20) Curstedt T, Jönvall H, Robertson B, Bergman T, Berggren P. Two hydrophobic low-molecular mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity. *Eur J Biochem* 168: 255-262, 1987
- 21) Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 39: 462-477, 1971
- 22) Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234: 466-468, 1959
- 23) Thompson JF, Morrison GR. Determination of organic nitrogen. Control of variables in the use of Nessler's reagent. *Anal Chem* 23: 1153-1157, 1951
- 24) 小林 勉, 中西拓郎, 岸槌進次郎, 村上誠一. 肺蛋白症—肺胞洗浄による血液ガスの変化. *麻酔* 25: 43-47, 1976
- 25) 早稲田祐子, 小林 勉, 田代克己, 松本 豊, 山田圭輔, 鈴木康弘. 換気量に必要なサーファクタント・アポ蛋白の種類. *日界面医会誌* 27: 93-98, 1996
- 26) Morrison WR, Smith M. Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5: 600-608, 1964
- 27) Lachmann B, Grossmann G, Freyse J, Robertson B. Lung-thorax compliance in the artificially ventilated premature rabbit neonate in relation to variations in inspiration: expiration ratio. *Pediatr Res* 15: 833-838, 1981
- 28) Enhöning G, Robertson B. Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 50: 58-66, 1972
- 29) Robertson B, Lachmann B. Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp Lung Res* 14: 279-310, 1988
- 30) Robertson B, Curstedt T, Grossman G, Kobayashi T, Kokubu M, Suzuki Y. Prolonged ventilation of the premature newborn rabbit after treatment with natural or apoprotein-based artificial surfactant. *Eur J Pediatr* 147: 168-173, 1988
- 31) Kobayashi T, Grossman G, Robertson B, Ueda T. Effects of artificial and natural surfactant supplementation in immature newborn rabbits. *日本界面医会誌* 15: 53-59, 1984
- 32) 小林 勉, 泉 恵子, 元塚雅也, 村上誠一, 小久保雅之. 人工肺サーファクタントの界面特性と生理学的機能との相関. *日界面医会誌* 16: 51-57, 1985
- 33) 松本 豊, 田代勝己, 西塚一男, 小林 勉, 鈴木康弘, Robertson B. リゾフォスファチジルコリンの気管内投与による成熟ウサギ胎仔の急性肺障害. *日界面医会誌* 27: 87-92, 1996
- 34) Johansson J, Nilsson G, Strömberg R, Robertson B, Jönvall H, Curstedt T. Secondary structure and biophysical activity of synthetic analogues of the pulmonary surfactant polypeptide SP-C. *Biochem J* 307: 535-541, 1995
- 35) 高橋麗子. サーファクタントの生理活性に必要な脂質の種類を検討. *金沢大学十全医会誌* 105: 71-80, 1995
- 36) Suzuki Y, Shen H, Sato A, Nagai S. Analysis of fused-membrane structures in bronchoalveolar lavage fluid from patients with alveolar proteinosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 238-249, 1995
- 37) Wang Z, Gurel O, Baatz JE, Notter RH. Acylation of pulmonary surfactant protein-C is required for its optimal surface active interactions with phospholipids. *J Biol Chem* 271: 19104-19109, 1996
- 38) Creuwels LA, Deme RA, van LM, Benson BJ, Haagsman HP. Effect of acylation on structure and function of surfactant protein C at the air-liquid interface. *J Biol Chem* 268: 26752-26758, 1993
- 39) Hawgood S, Ogawa A, Yuki take K, Schlueter M, Brown C, White T, Buckley D, Lesikar D, Benson B. Lung function in premature rabbits treated with recombinant human surfactant protein-C. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 484-490, 1996

Relation Between Molecular Structure and Physiological Function of Surfactant Protein C — Analysis of Surfactants Reconstituted with the Proteins Isolated from Pigs and Pulmonary Alveolar Proteinosis Patients —
Keisuke Ohta, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **109**, 116 — 124 (2000)

Key words pulmonary alveolar proteinosis, surfactant protein C, polymeric form, monomeric form, palmitoyl residues.

Abstract

Surfactant protein C (SP-C) is an indispensable constituent of lung surfactant which reduces the alveolar contractile force by forming a surface active film of phospholipids at the air-liquid interface. SP-C has two hydrophobic structures, to wit palmitoyl residues and an alpha-helix consisted of 26 amino-acids, but the mechanisms by which surface activity is promoted are not clearly known. Elucidation of these mechanisms is needed to clarify the etiology of respiratory distress syndrome, and may be useful to develop an artificial surfactant for treatment of some pulmonary disorders. Recently, two types of abnormal SP-C, monomeric form SP-C (mSP-C) which lacks the palmitoyl residues and polymeric form SP-C (pSP-C) which is formed from two mSP-Cs, were found in the alveolar lavage fluid of patients with pulmonary alveolar proteinosis. This study, therefore, was designed to investigate the surface activation mechanisms by comparing the potencies of the abnormal SP-Cs to that of normal form SP-C (nSP-C, prepared from porcine lungs). For this purpose, several reconstituted surfactants (RS) were made by adding these normal and abnormal SP-Cs to a base mixture of synthetic phospholipids and porcine surfactant protein B, and the possible therapeutic effects on respiratory distress were studied in immature newborn rabbits. Under mechanical ventilation with a peak inspiratory pressure of 25 cmH₂O, the animals receiving the base mixture alone exhibited a tidal volume of 7.3 ± 1.0 ml/kg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). No significant improvement in the tidal volume was observed by addition of mSP-C to the mixture. By contrast, those animals receiving a RS containing nSP-C at 2% or pSP-C at 2% exhibited significantly ($p < 0.05$) larger tidal volumes of 14.3 ± 0.7 ml/kg and 18.4 ± 4.1 ml/kg, respectively. These results indicate that the palmitoyl residues play an important role in improving the physiological activity of lung surfactant, but that molecules having a couplet alpha-helix structure can also improve the surface activity, even if the palmitoyl residues are absent. These findings suggest that the mechanism by which SP-C improves the activity of lung surfactant is to promote the formation of a surface active film by bridging the gap between the double layers of phospholipids with the two hydrophobic structures.