

ヒト α 2HS糖蛋白の精製,物理化学的性状ならびに細胞性免疫への影響

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: 松島, 綱治 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8970

ヒト α_2 HS 糖蛋白の精製, 物理化学的性状ならびに 細胞性免疫への影響

金沢大学癌研究所分子免疫部

松 島 綱 治

(昭和57年1月28日受付)

本論文の要旨は日本免疫学会第10回(昭和55年)総会において報告された。

ヒト α_2 HS 糖蛋白の正常プール血清よりの大量精製方法を報告した。21の正常血清より 130 mg の α_2 HS 糖蛋白を得た。収量は 13.6%であった。 α_2 HS 糖蛋白の等電点電気泳動上の charge heterogeneity は、主にシアル酸によるものと考えられる。circular dichroism スペクトラムの検索により、 α_2 HS 糖蛋白の二次構造は、 α -helix 11%、 β -構造 21-33%と判明した。 α_2 HS 糖蛋白は、分子量 49,000 で単鎖のポリペプチドからなり、単一の N 末端アミノ酸アラニンを有する。N 末端配列 31 残基中 19 残基疎水性のアミノ酸を有する。また、アミノ酸組成上も、多くの疎水性のアミノ酸(プロリン、アラニン、ロイシン)を含む。正常血清中の α_2 HS 糖蛋白の濃度は、臍帯血中で最も高く、加齢とともに減少し、また癌患者血清中で特に減少することより、 α_2 HS 糖蛋白が宿主妨衛機構において非特異的免疫増強因子(特に細胞性免疫の)と考えられる。この研究では、 α_2 HS 糖蛋白はオプソニン効果のみならず、活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果増強作用があることを明らかにした。 α_2 HS 糖蛋白は、正常非刺激マクロファージを活性化しなかった。また、直接、腫瘍細胞の増殖には影響を与えなかった。活性化マクロファージもしくは、腫瘍細胞の一方との preincubation 実験により、 α_2 HS 糖蛋白が両細胞に結合性を有することが判った。 α_2 HS 糖蛋白は、リンパ球幼若化反応、リンパ球混合培養ならびに natural killer 細胞活性には影響を与えなかった。

Key words human α_2 HS-glycoprotein, purification, secondary structure, N-terminal sequence, cellular immunology

α_2 HS 糖蛋白は 1960 年 Heremans により高濃度の Zn^{++} イオンにより沈澱しない蛋白として単離された(α_2 -Z グロブリンと命名)¹⁾。一方 Schmid と Bürgi は、1961 年エタノール分画(Cohn fraction VI)より Ba^{++} イオン存在下で沈澱する蛋白として単離するとともに(Ba - α_2 糖蛋白と命名)、種々の溶媒における溶解性、アミノ酸組成を報告した²⁾。1962 年 Shultze は、両蛋白が同一であることを Ouchterlony 法にて確認し、発見者両名の頭文字をとり α_2 HS 糖蛋白と命名した³⁾。

α_2 HS 糖蛋白の機能については、まだほとんど不明だが、1974 年 Van Oss らは、 α_2 HS 糖蛋白がヒト好中球

の in vitro における Escherichia coli, Staphylococcus aureus の貪食能を高めるオプソニン効果を有することを報告した⁴⁾。また、1980 年に Lewis らは、ヒト α_2 HS 糖蛋白が、マウスマクロファージの letex beads 取り込みをも増加させることを報告した⁵⁾。一方、1978 年 Triffitt らは、ウサギ α_2 HS 糖蛋白が肝臓で生成され、骨基質に多く集積することを報告している⁶⁾⁷⁾。

α_2 HS 糖蛋白の精製方法については幾つかの報告があり、Van Oss らは、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー、カーテン電気泳動法、ゲルろ過法と硫酸分画法による精製方法を発表している⁸⁾。Lebreton らは、

Purification and Physicochemical Characterization of Human α_2 HS-glycoprotein and its Effects on Cellular Immunology. Kouji Matsushima, Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, Kanazawa University.

免疫吸着カラムクロマトグラフィー⁹⁾ならびに金属キレート(亜鉛イオン)アフィニティークロマトグラフィー法¹⁰⁾による精製方法について発表している。しかし、これらの方法はいずれも少量のみを取り扱う場合でしかも収量が悪い欠点をもつ。

当教室の右田らは、これまでに3,000検体を超えるヒト血清を一元放射状免疫拡散法にて測定を行ない、 α_2 HS糖蛋白の濃度が臍帯血中で最も高く、加齢とともに減少し¹¹⁾、しかも悪性腫瘍のとき有意な低下を来たすことを見いだした。

今回、著者は、 α_2 HS糖蛋白の大量精製方法を開発するとともに、物理化学的性状として新たに二次構造とN末端配列を決定した。また、 α_2 HS糖蛋白の年齢ならびに疾患時の変動より、 α_2 HS糖蛋白が生体内における細胞性免疫能の非特異的増強因子の一つと考え実験を行った結果、オプソニン効果のみならず、マクロファージの抗腫瘍性を増強させることを見いだしたのでここに報告する。

材料と方法

材料

硫酸(和光純薬、特級); DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-200, Blue Sepharose 4B, pharmalyte pH 3-10, pH 2.5-5 (Pharmacia Fine Chemicals); DEAE-cellulose (Brown Company); Hydroxyapatite (Bio-Rad Laboratories); dithiothreitol, carbodiimide(半井化学); 等電点電気泳動用アガロース(Litex, type No. HSIF); ウサギ-抗-ヒト α_2 HS糖蛋白, QS血清(Lot. OF-9, α_2 HS糖蛋白54 mg/dl 含), neuraminidase(ヘキスト, ジャパン); complete Freund's adjuvant (DIFCO); Lymphoprep (Nyegaard Co. A/S); phytohemagglutinin (PHA) (GIBCO); concanavalin A (Con A) (MILES-YEDA Ltd.); poke weed mitogen (PWN) (E. Y. Laboratories); [methyl-³H] Thymidine (³H-TdR) 48 Ci/mmol (RCC Amersham); ³H-tyramine 5-10 Ci/mmol (New England Nuclear); RPMI 1640 (日水製薬); ウシ胎児血清 (MICRO-CIOLOGICAL ASSOCIATE); OK 432 (ピシパニール, 中外製薬); ヒトプール血清(金沢大学ならびに金沢医科大学輸血部)

硫酸塩析法

ヒトプール血清21に、蒸留水0.81加え、pH 7.0に調製した。硫酸粉末588 g (37%飽和に相当)を攪拌しながら少量ずつ加え、全部加え終ったあと30分間攪拌した。以上の操作はすべて氷溶にて行い、その後6,000 rpm, 30分, 4°Cにて遠心し、沈澱物を得た。

DEAE-Sephadex, DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

ともにカラムサイズは $\phi 4 \times 40$ cm, 流量は150 ml/hrで、15.4 ml/tubeに採取した。出発緩衝液として0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.5, 0.07 M NaClを用い、溶出はNaClの濃度のみを変え、0.3 Mまで上げるlinear gradient法によった。

Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー

カラムサイズは、 $\phi 4 \times 120$ cm, 平衡化緩衝液は0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.5, 0.15 M NaCl, 流量は25 ml/hr, 7.2 ml/tube採取した。

Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー

カラムサイズは $\phi 2.7 \times 7.5$ cm, 出発緩衝液はNa-Kリン酸緩衝液 pH 7.3 電気伝導度 5×10^{-3} mmho/cmでlinear gradient法により 25×10^{-3} mmho/cmまで上げ溶出した。

Blue Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィー

カラムサイズは $\phi 2.8 \times 12$ cm, 平衡化緩衝液は0.02 M トリス・塩酸緩衝液 pH 7.0, 0.1 M KCl, α_2 HS糖蛋白は、この条件ではカラムを通過し、アルブミンは、マトリックスに吸着した。

Sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Weberらの方法により行った¹²⁾。ゲル濃度は7.5%, 泳動用緩衝液は0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2, 0.1% SDSであった。試料の還元は、2% SDS, 20 mM dithiothreitolで2分間煮沸することにより行った。ゲルの染色にはCoomassie Brilliant Blue G-250を用いた。

等電点電気泳動

0.8%アガロースにPharmalyte pH 3-10, pH 2.5-5を2:1の割合で混合し、最終的にPharmalyte 2%とした¹³⁾。8 V/cm, 1 hr, 引続いて16 V/cm, 6.5 hr電気泳動を行った。

免疫学的手法

ゲル内拡散法はOuchterlony法¹⁴⁾により、免疫電気泳動はScheideggerの方法¹⁵⁾の改良法¹⁶⁾によった。一元放射状免疫拡散法¹⁷⁾にて α_2 HS糖蛋白の定量を行った。このとき標準試料としてQS血清を用いた。

抗血清

ヒト α_2 HS糖蛋白に対する抗血清をヘキスト・ジャパンより購入した。一方、著者精製 α_2 HS糖蛋白に対する抗血清をウサギに免疫することにより作製した。方法は、免疫第1日目にウサギの足蹠皮下と背部筋肉にcomplete Freund's adjuvantにて α_2 HS糖蛋白0.5 mg注射し、2週間後に第2回目、その後1週間間隔でさらに2回、同抗原、等量をウサギの背部筋肉、頸部

皮下に注射した。最終免疫の1週間後に耳静脈より採血した。

neuraminidase 処理

精製 α_2 HS 糖蛋白 3 mg/dl (0.05 M 酢酸緩衝液 pH 5.5 に透析) に等量の neuraminidase 液 (*Vibrio cholerae*, 1 U/ml) を加え, 2, 5, 30 min, 8, 24 hr 37°C にて加温した。

紫外吸収スペクトラムと吸光係数

精製 α_2 HS 糖蛋白を 0.02 M トリス・塩酸緩衝液 pH 7.0, 0.1 M KCl に十分透析し, 紫外吸収スペクトラムを分光光度計 (Shimadzu Double Beam Spectrophotometer UV-210 A) にて波長 220 - 350 nm の間測定した。吸光係数は, 280 nm の吸光度を測定後十分蒸留水に透析し, その乾燥重量より計算した。

Circular dichroism (CD) スペクトラム

0.02 M トリス・塩酸緩衝液 pH 7.0, 0.15 M NaCl に溶解された精製 α_2 HS 糖蛋白の CD スペクトラムを J-20 Automatic Recording Spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd.) にて室温で測定した。CD magnitude を平均残基楕円率 (mean residue ellipticities) として表わし, このときの平均残基分子量を 110 とした。 α -helix 含量は, 224 nm (この波長では, β , random 構造は isodichroic である。)の楕円率より計算した¹⁹⁾。 β -構造含量は, 231, 216 nm の両波長で計算した¹⁹⁾。

アミノ酸組成分析

アミノ酸分析は ATTO autoanalyzer MLC 703 (ATTO Co., Ltd.) を用いて行った。試料の加水分解は 6 M 塩酸, 真空封入下 110°C にて, 24 hr と 72 hr 行った。半システインの定量には, 過硫酸酸化によりシステイン酸として¹⁹⁾, トリプトファン²⁰⁾の定量は, Edelhoch の方法²⁰⁾により行った。

N 末端配列分析

N 末端アミノ酸配列決定には, JAS-47 K Automatic Sequence Analyzer (JEOL Co., Ltd.) を用いた。phenylthiohydantoin (PTH) アミノ酸の同定には, 高速液体クロマトグラフィー²¹⁾, ガラスクロマトグラフィー²²⁾, ポリアミド薄層クロマトグラフィー²³⁾を用いた。

ヒト末梢リンパ球の幼若化反応ならびに混合培養

健康正常ヒト末梢血から Lymphoprep (比重 = 1.077) を用いて 400 G, 30 min 遠心しリンパ球を分離した。リンパ球幼若化反応は, 2×10^5 細胞/0.2 ml RPMI 1640, 5% ウシ胎児血清/well の細胞数で phytohemagglutinin (PHA) 7.5 μ g/ml または concanavalin A (Con A) 2.5 μ g/ml または poke weed mitogen (PWM) 0.1 μ g/ml (いずれも suboptimal な濃度) を添加して, 37°C, 5% CO₂ にて 72 hr 培養した。終了

6 hr 前に ^3H -TdR を 0.5 μ Ci 添加した。リンパ球混合培養は, HLA の異なる健康成人 2 名より得た末梢リンパ球それぞれの細胞数を 1×10^5 細胞/0.2 ml RPMI 1640, 5% ウシ胎児血清/well とし, two way で行った。培養期間は 5 日と 7 日で, 終了 24 hr 前に ^3H -TdR を 0.5 μ Ci 添加した。培養終了後 semiautomatic cell harvester を用いガラスフィルター上に細胞を集め, ^3H -TdR の取り込みを液体シンチレーションカウンター (Beckman) で測定した。全ての実験は triplicate で行い結果は, 平均値 \pm S. E. (standard error) で示した。

Natural Killer 細胞活性の測定

Effector 細胞として健康正常ヒト末梢リンパ球を用い, 標的細胞としては ^{51}Cr -標識腫瘍細胞 MOLT 4F (ヒト T 細胞型白血病細胞株) (1×10^4 細胞/0.2 ml RPMI 1640, 10% ウシ胎児血清/well) を用いた。37°C, 5% CO₂ にて 4 hr 培養し, 培養終了後 100 G, 5 min 遠心し, その上清液 100 μ l の放射活性を auto gamma counter (Packard) により測定した。 ^{51}Cr の特異的放出度は以下の計算式によった。

Specific ^{51}Cr - release

$$= \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

結果は triplicate の実験の平均値で示した。

Phagocytosis の測定

カルボキシル化した latex beads (ϕ 0.36 μ m) と ^3H -tyramine を carbodiimide で結合させた²⁴⁾ (220 cpm/ 10^6 個) 貧食細胞としてマウスマクロファージ培養株 CAMU-3²⁵⁾ を用い, 2×10^4 細胞/0.2 ml RPMI 1640, 0.5% BSA/well で, 37°C, 5% CO₂ にて 3 hr 培養し, ^3H -latex beads の取り込みを調べた。培養終了後細胞を 3 回洗浄し, 一夜, 1 M NaOH, 0.5% NP 40 で細胞を可溶化し, その放射活性を測定した。結果は triplicate の実験の平均値 \pm S.E. で示した。

マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果の測定

C3H/HeN (H-2^k), BALB/c (H-2^d), specific pathogen free (SPF) マウス 6-8 週齢 (静岡実験動物) を用いた。活性化マクロファージは, OK 432 2 KE を 5 日前に i.p. 接種したマウス腹腔浸出細胞のうち, プラスチック吸着細胞として得た。この場合非特異的エステラーゼ染色²⁶⁾で 95% 以上マクロファージであった。正常非刺激マクロファージは, SPF マウスの RPMI 1640 培養液での腹腔洗浄により得た。標的細胞としては, マウス乳癌 MM 2 細胞 (H-2^k), 形質細胞腫 X 5563 (H-2^k) ならびに MPC 11 (H-2^d) を用いた。マクロファージ 5×10^4 , 1×10^5 ならびに 2×10^5 細胞と標的細胞 1×10^4 細胞/0.2 ml RPMI 1640, 5% ウシ胎児血清/well

Table 1. Purification of human α_2 HS glycoprotein

Fraction	$E_{280}^{1\text{cm}} \times \text{volume}$	α_2 HS(mg) ^a	Yield(%)
Normal human serum	99,000	890	100
Ammonium sulfate ppt. (0-37%)	31,020	268	30.1
DEAE Sephadex A-50	3,655	257	28.9
DEAE-cellulose	763	195	21.9
Sephadex G-200	281	180	20.2
Hydroxyapatite	116	136	15.3
Blue Sepharose 4B	53.3	130	14.6

a. Determined by the single radial immunodiffusion method

をマイクロプレートにて 24 hr 培養し、終了 6 hr 前に ^3H -TdR を $0.5 \mu\text{Ci}$ 添加した。培養終了後 semi-automatic cell harvester で細胞をグラスフィルター上に集めた。なおこの測定方法では、マクロファージ単独の ^3H -TdR の取り込み量 (500 cpm 以下) は低く無視できた。実験は triplicate で行ない結果は、平均値 \pm S. E. で示した。

成 績

α_2 HS 糖蛋白の精製

表 1 に示すごとく、正常ヒトプール血清 2 l を出発材料とし、DEAE-Sephadex, DEAE-cellulose, Sephadex G-200, Hydroxyapatite, Blue Sepharose 4 B カラムクロマトグラフィーにより α_2 HS 糖蛋白を精製した。出発材料中の α_2 HS 糖蛋白の総量は 890 mg で、最終的に精製された量は 130 mg であった。収量は 14.6% であり、精製されたものは、免疫電気泳動で単一の沈降線を示した。SDS ポリアクリルアミド電気泳動では還元、非還元下ともに分子量 49,000 の単一のバンドを示した (図 1)。また著者の精製した α_2 HS 糖蛋白をウサギに免疫して得た抗血清は、ヒト血清と単一の沈降線を作り、市販の抗血清のヒト血清と作る沈降線と完全に融合した。以上のことより、精製した α_2 HS 糖蛋白は、純度が高いと考えられる。

等電点

精製された α_2 HS 糖蛋白は、Anderson²⁷⁾²⁸⁾らが報告するように等電点電気泳動上 p I 4.5-5.0 と charge heterogeneity を示した (図 2.)。しかし、neuraminidase 処理にて charge heterogeneity は著しく減少し、p I 5.5 に移動した。

紫外吸収と CD スペクトラム

最大紫外吸収波長は 276 nm で、290 nm に肩がみられた。E_{1cm, 280nm}^{1%} は 5.4 であった。CD スペクトラム

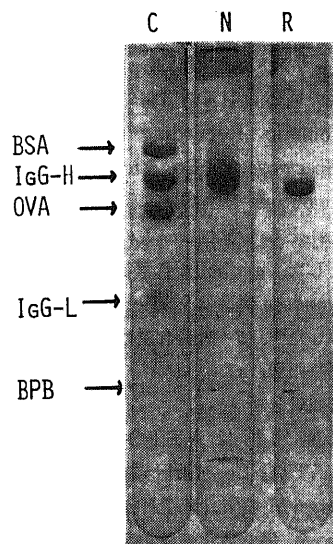


Fig. 1. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were applied to 7.5% polyacrylamide gels under reducing and non-reducing conditions and electrophoresis was carried out as described by Weber and Osborn. After electrophoresis the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. Reduction was achieved by dithiothreitol. BSA (bovine serum albumin, M. W. 66,120), IgG-H (heavy chain, M. W. 50,000), OVA (ovalbumin, M. W. 43,000), IgG-L (light chain, 25,000). C, control; N, non-reduced; R, reduced.

の検索で、 α -helix の含量は 11%、 β -構造の含量は 21-33% と計算された。残りの構造は random 構造と考えられる。

アミノ酸組成

糖鎖を除いたポリペプチド部分の分子量 39,140²⁹⁾ に対するアミノ酸組成 (residues/mol) を表 2 に示す。

特徴として、プロリンの含量が非常に多く、また疎水性のアミノ酸（アラニン、バリン、ロイシン）が多く含まれている。一方、トリプトファンの含量は少ない。

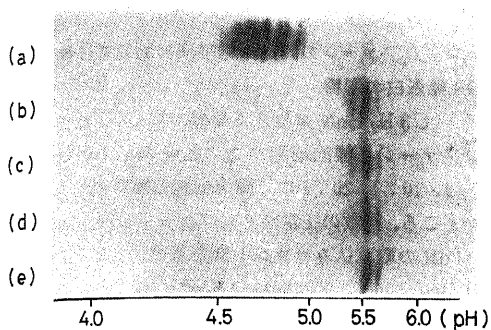


Fig. 2. Agarose isoelectrofocusing. (a), native α_2 HS glycoprotein; (b) to (e), α_2 HS glycoprotein treated with neuraminidase for 2, 5, 30 min and 8 hr, respectively, at 37°C. Two bands observed after 8 hr digestion were unchanged even after 24 hr digestion. Neuraminidase added in these specimens was not detected as a stained band (data not shown).

以上の結果は, Schmid²⁹⁾ならびに Heimbürger²⁹⁾の報告と一致した。

N 末端アミノ酸配列

100 n mol の精製 α_2 HS 糖蛋白の Edman 分解を 31 サイクル行った。その結果を図 3. に示す。1-20 サイクルまでの PTH アミノ酸の同定には、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーならびにポリアミド薄層クロマトグラフィーを用いた。21-31 サイクルの PTH アミノ酸の同定には、高速液体クロマトグラフィーとポリアミド薄層クロマトグラフィーを用いた。

ヒト末梢リンパ球幼若化反応、混合培養に対する α_2 HS 糖蛋白の影響

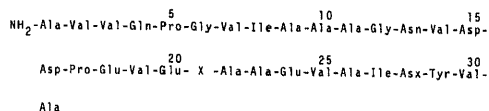


Fig. 3. N - terminal amino acid sequence of α_2 HS glycoprotein. X; not concluded definitely, but this 21st amino acid is either arginine or histidine on thin layer chromatography.

Table 2. Amino acid composition of human α_2 HS glycoprotein

	Residues per mol		
	This paper	Ref. 2	Ref. 29
Asp	31.6	30	32
Thr	23.9 ^a	19	20
Ser	22.4 ^a	18	20
Glu	34.1	40	42
Pro	43.7	39	41
Gly	26.1	21	23
Ala	33.8	36	38
1/2 Cys	11.0	7	11
Val	41.5 ^b	33	35
Met	2.9	1, 2	1
Ile	8.4 ^b	6	8
Leu	33.8	28	30
Tyr	4.8	6	7
Phe	11.4	12	10
Lys	15.4	16	16
His	12.8	11	12
Arg	9.5	7	11
Trp	2.8	3	2

a. Extrapolated to zero time hydrolysis
 b. 72 hr hydrolysis

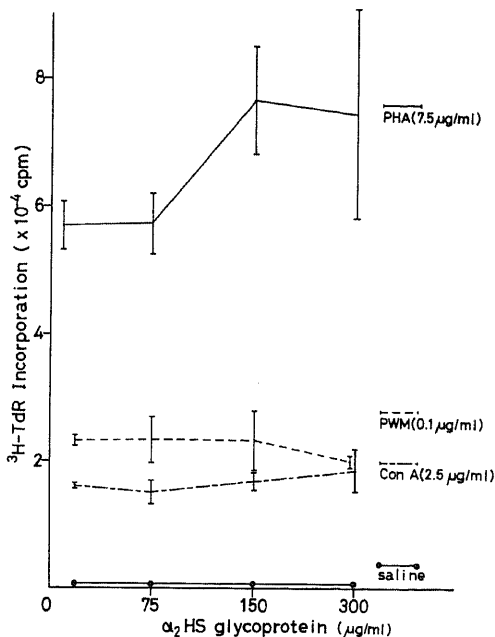


Fig. 4. Effect of α_2 HS glycoprotein on the mitogenic response of normal human peripheral blood lymphocytes to PHA (7.5 μ g/ml), Con A (2.5 μ g/ml) and PWM (0.1 μ g/ml), as measured by ³H - TdR incorporation.

生理的食塩水で十分透析した精製 α_2 HS 糖蛋白を、リンパ球幼若化反応ならびに混合培養の培養開始時に最終濃度 75, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えて ^3H -TdR の取り込みを測定した。PHA, Con A, PWM によるリンパ球幼若化反応 (図 4) ならびにリンパ球混合培養 (著者の行った条件では、5 日目には有意な反応が出現し、7 日目に peak をもつ反応がみられた) に対して、 α_2 HS 糖蛋白は有意な影響を与えなかった。

ヒト末梢 natural killer 細胞活性に対する α_2 HS 糖蛋白の影響

ヒト末梢リンパ球の、MOLT 4F 細胞に対する natural killer 細胞活性測定において、 α_2 HS 糖蛋白を最終濃度にして 600 $\mu\text{g/ml}$ (ヒトの生理的な量)、培養開始時に添加したが有意な影響を与えなかった (図 5.)。

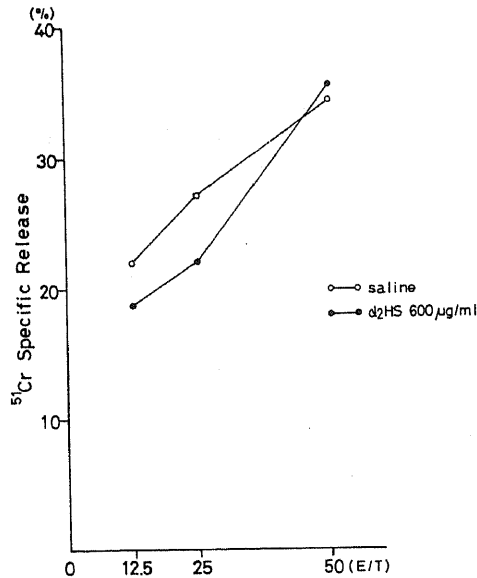


Fig. 5. Lack of α_2 HS glycoprotein on natural killer cell activity. Normal human peripheral blood lymphocytes as effector cells (E) and MOLT 4F as target cells (T) were incubated for 4 hr. E/T ratio was 12.5, 25 and 50.

Phagocytosis への影響

マウスマクロファージ培養株 CAMU-3 の ^3H -latex beads 取り込みに対する α_2 HS 糖蛋白の影響を調べた結果、 α_2 HS 糖蛋白は、対照群としての生理的リン酸緩衝液ならびにヒトアルブミン添加時よりも約 1.25-2 倍増加させた (表 3.)。

マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果に対する α_2 HS 糖蛋白の影響

i) C3H/HeN マウスより得た OK 432 活性化マクロファージと標的細胞マウス乳癌 MM2 細胞の比を 5:1, 10:1, 20:1 にて腫瘍細胞増殖抑制効果を調べたところ、同数の正常マクロファージと標的細胞の ^3H -TdR の取り込みカウント数を基準にすると、それぞれ 50%, 55%, 90% 抑制であった。それゆえに以後の実験は、マクロファージと標的細胞の比を 5:1, 10:1 の 2 点に行った。

ii) 上記の条件において著者の精製した α_2 HS 糖蛋白ならびに富士臓器より得た α_2 HS 糖蛋白を最終濃度 80 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えると、マクロファージと標的細胞の比が 5:1, 10:1 のいずれにおいても α_2 HS 糖蛋白は活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を増強した (図 6.)。 α_2 HS 糖蛋白は、腫瘍細胞単独の増殖には影響を与えなかった。

iii) 同様の実験にて、 α_2 HS 糖蛋白の濃度をヒトの生理的な量である 600 $\mu\text{g/ml}$ まで変化させ、正常マクロファージならびに活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果に対する影響をみた。活性化マクロファージに対しては、dose dependent に (600 $\mu\text{g/ml}$ で 57% の増強) 腫瘍細胞増殖抑制効果を増強した (図 7.)。一方、正常マクロファージに対しては、有意な影響を与えなかった。同様の結果は、C3H/HeN マウスマクロファージと形質細胞腫 X 5563, BALB/c マウスマクロファージと形質細胞腫 MPC 11 (図 8.) の組合せにて得られた。 α_2 HS 糖蛋白は、腫瘍細胞の増殖には、全く抑制的には働かなかった。また、正常ヒト血清を希釈して、ヒト血清の最終濃度が 600 $\mu\text{g/ml}$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 280 = 10.0$ として計算した) になるように添加して同様の実

Table 3. Effect of human α_2 HS glycoprotein on the uptake of ^3H -latex beads by mouse macrophage cell line CAMU-3

	PBS (-)	PBS (+)	Alb (600ug/ml)	α_2 HS(66ug/ml)
Exp. 1.	245.5 \pm 9.4*	720.7 \pm 41.4	783.5 \pm 32.3	1404.5 \pm 44.6
Exp. 2.	405.0 \pm 32.6	633.3 \pm 46.5	700.0 \pm 32.4	1216.3 \pm 75.4
Exp. 3.	587.5 \pm 0.6	1300.0 \pm 61.3	1350.0 \pm 85.3	1625.0 \pm 23.9

a. Counts per five min.

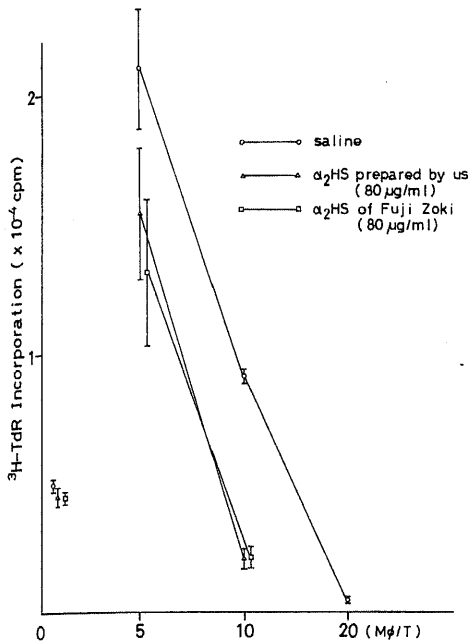


Fig. 6. Influence of human α_2 HS - glycoprotein (80 μ g/ml, both our and Fuji - Zoki's preparations) on the cytostatic effect of OK 432 activated macrophages ($M\phi$). The effect was estimated using MM2 mouse mammary carcinoma cells as target cells (T). $M\phi/T$ ratio was 5, 10 and 20.

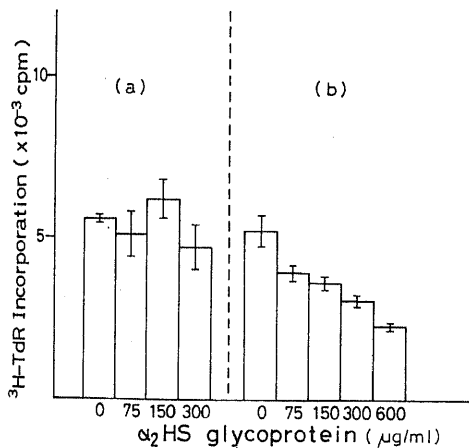


Fig. 7. Influence of serially diluted human α_2 HS - glycoprotein on the macrophage cytostatic effect. The effect was estimated using MM2 mouse mammary carcinoma cells (1×10^4 cells/0.2 ml/well). (a) Effector cells were C3H/HeN normal resident macrophages (5×10^4 cells/0.2 ml/well). (b) Effector cells were C3H/HeN macrophages activated by OK 432 (5×10^4 cells/0.2 ml/well).

験を行ったが、正常マクロファージならびに活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果には、全く抑制的には働かなかった。

iv) α_2 HS 糖蛋白 600 μ g/ml の濃度にて OK 432 活性化マウスマクロファージ (5×10^4 細胞/0.2 ml RPMI 1640, 5% ウシ胎児血清もしくは、マウス乳癌 MM 2 細胞 (1×10^6 細胞/ml, RPMI 1640, 5% ウシ胎児血清) の一方と 37°C, 5% CO₂ にて 1 hr preincubation を行い、血清の入らない RPMI 1640 培養液で 2 度洗浄後、free な α_2 HS 糖蛋白が存在しない状態で腫瘍細胞増殖抑制効果を調べた。いずれの場合にも対照群と比べ、 α_2 HS 糖蛋白との preincubation により腫瘍細胞増殖抑制効果の増強を認めた(図 9.)、 α_2 HS 糖蛋白が、活性化マクロファージならびに腫瘍細胞と結合性を有することを示唆する。

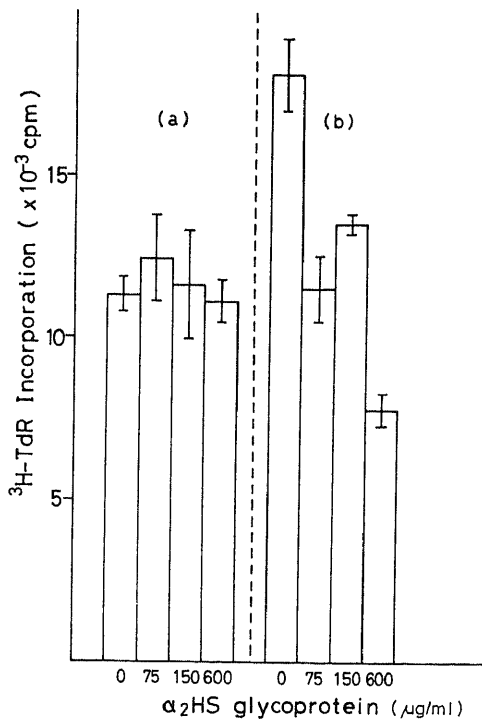


Fig. 8. Influence of serially diluted human α_2 HS - glycoprotein on the macrophage cytostatic effect. The effect was estimated using MPC 11 mouse myeloma cells (1×10^4 cells/0.2 ml/well). (a) Effector cells were BALB/c normal resident macrophages (1×10^5 cells/0.2 ml/well). (b) Effector cells were BALB/c macrophages activated by OK 432 (1×10^5 cells/0.2 ml/well).

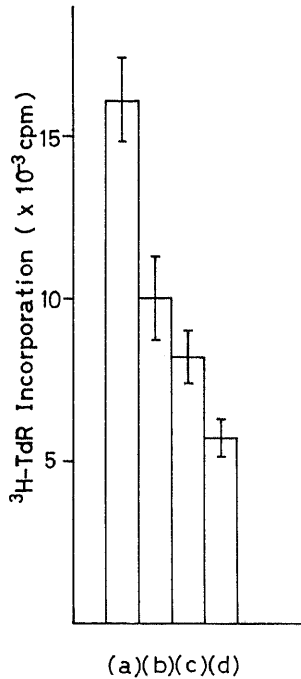


Fig. 9. Macrophage cytotostatic effects after preincubation of MM2 mouse mammary carcinoma cells (1×10^4 cells/0.2 ml/well) or C3H/HeN macrophages activated by OK 432 (5×10^4 cells/0.2 ml/well) with human α_2 HS-glycoprotein (600 μ g/ml).

(a) MM2 and activated macrophages (b) MM2 and activated macrophages preincubated with α_2 HS-glycoprotein (c) MM2 preincubated with α_2 HS-glycoprotein and activated macrophages (d) MM2 and activated macrophages cultured with α_2 HS-glycoprotein (600 μ g/ml).

考 察

ヒト α_2 HS 糖蛋白をブール血清より大量に精製する方法を報告した。2 l のヒト正常血清より 130 mg の α_2 HS 糖蛋白を精製した(収量, 14.6%)。Lebreton⁹⁾が報告している精製中の α_2 HS 糖蛋白の分解物は出現しなかった。著者は、精製した α_2 HS 糖蛋白を後に培養細胞に加えるために、精製のどの段階でも、抗菌剤や蛋白分解酵素阻害剤は使用しなかった。

最近 Gejyo と Schmid³⁰⁾は、 α_2 HS 糖蛋白は pI 4.1、分子量 56,000 ならびに pI 4.7、分子量 51,000 の 2 群の蛋白から構成されており、それぞれの蛋白が同一の 2 つの N 末端アミノ酸(アラニンとスレオニン)と 2 つの C 末端アミノ酸(スレオニンとロイシン)を有し、2 つのポリペプチド鎖から構成されていると報告した。し

かし、著者の精製した α_2 HS 糖蛋白は SDS ポリアクリルアミド電気泳動上、還元、非還元下ともに分子量 49,000 と変わらず(図 1.)、また N 末端アミノ酸配列の結果(図 3.)においても単一の N 末端を有することより、著者は α_2 HS 糖蛋白は単一のポリペプチド鎖より構成されていると考える。この結果は、Lebreton⁹⁾の報告と一致している。Gejyo と Schmid の結果は、 α_2 HS 糖蛋白のアロタイプの存在を意味するのかもしれないが、精製中の分解による可能性がある。等電点上の heterogeneity (pI 4.5-5.0) は、neuraminidase 処理にて著しく減少した(図 2.)。 α_2 HS 糖蛋白の charge heterogeneity は、ポリペプチド部分の多形によるよりも、シアル酸を含む糖鎖によるものと考えられる。

α_2 HS 糖蛋白の二次構造上、 α -helix 含量は 11% と計算された。 α -helix 含量が比較的少ないこととアミノ酸組成上プロリンの含量が非常に多いことはよく一致している。 β -構造は、21-33% と計算され、おそらくこれがこの蛋白の骨組を構成していると考えられる。

α_2 HS 糖蛋白の機能については、まだほとんど不明だが、従来よりオプソニン効果を有することが報告されている⁴⁰⁾。著者の精製した α_2 HS 糖蛋白もマウスマクロファージ培養株 CAMU-3 の ³H-latex beads 取り込みを増加させた(表 3.)。著者は α_2 HS 糖蛋白のアミノ酸組成上非常に疎水性のアミノ酸(プロリン、アラニン、バリン、ロイシンなど)が多い(表 2.)ことや、疎水性の強い N 末端(31 残基中 7 つのバリン、2 つのイソロイシン、8 つのアラニン、2 つのプロリン)を有することから α_2 HS 糖蛋白のオプソニン効果は、この蛋白の疎水性に起因していると考えている。

さらに著者は、 α_2 HS 糖蛋白の年齢ならびに疾患時の変動により、 α_2 HS 糖蛋白が生体内における細胞性免疫能の非特異的増強因子の一つと考え検索を行った結果、 α_2 HS 糖蛋白が活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を増強させる働きがあることが判明した(図 6, 7, 8)。正常非刺激マクロファージと腫瘍細胞ならびに腫瘍細胞単独の増殖には、影響を与えなかった。なお、著者の今回の実験は、ヒトの α_2 HS 糖蛋白をマウスのマクロファージとマウスの腫瘍細胞に加えて行っているわけだが、今回みられたような α_2 HS 糖蛋白の活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果増強作用は、異種蛋白共通の作用ではないと考えられる。というのは、 α_2 HS 糖蛋白の生理的な量 600 μ g/ml と同量の希釈ヒト正常血清を同じ実験系に添加しても活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を全く増強させないからである。

α_2 HS 糖蛋白とマクロファージならびに腫瘍細胞との preincubation の実験により、 α_2 HS 糖蛋白が両細胞に

対して結合性を有することが判った。 α_2 HS 糖蛋白のマクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果増強作用は、正常非刺激マクロファージを活性化マクロファージに転換することによるのではなく、マクロファージと腫瘍細胞の接合を強めることによると考えられる。

α_2 HS 糖蛋白は、他の細胞性免疫能の指標であるリンパ球幼若化反応、混合培養ならびに natural killer 細胞活性に対しては増強作用を有しない。

従来より血清蛋白（特異抗体をのぞく）による免疫抑制作用については多くの報告がある。代表的には担癌状態ならびに炎症時に増加する α_1 -antitrypsin³¹⁾, α_1 -acidglycoprotein³²⁾ α_2 -macroglobulin³³⁾, C-reactive protein³⁴⁾, C 3³⁵⁾, serum amyloid A³⁶⁾ や、癌胎児性蛋白である α -feto protein³⁷⁾³⁸⁾ ならびに正常血清中の immuno regulatory α globulin³⁹⁾ などである。一方、血清蛋白による免疫増強作用に関する報告は、fibronectin⁴⁰⁾ のオプソニン効果や、千原、前田らの報告した lentinan 投与動物血清中の増加因子⁴¹⁾ LA (haptoglobin⁴²⁾), LB (hemopexin⁴³⁾), LC (ceruloplasmin⁴⁴⁾) など少ない。今回著者は、正常ヒト血清中に存在し、加齢、担癌時に減少する α_2 HS 糖蛋白に、オプソニン効果ならびに活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果増強作用があることを報告した。担癌宿主の癌に対する抵抗性は、いろいろな物質により修飾されている。最近、宿主の腫瘍に対する応答力を変動させ治療効果をも期待する物質が Biological Response Modifiers (BRM) とよばれるようになった。thymic hormone, interferon, interleukin (lymphokine, monokine) などとともに血清蛋白の諸成分も BRM の 1 つと考えられている。これらは細胞の活性化を介して、さらに解明がすすめば将来、腫瘍の治療に役立つものと期待される。

結 論

ヒト α_2 HS 糖蛋白の精製と物理化学的性状ならびに細胞性免疫への影響について報告した。

1. 正常ヒトプール血清より α_2 HS 糖蛋白を大量精製する方法を開発した。

2. ヒト α_2 HS 糖蛋白の物理化学的性状として、a) pI 4.5-5.0 の charge heterogeneity を有するが、neuraminidase 処理にて charge heterogeneity は減少し、pI は 5.5 に移動する。b) 分子量 49,000 の単鎖で、N 末端アミノ酸は、アラニンである。c) 疎水性の強い N 末端を有し、アミノ酸組成としても疎水性のアミノ酸を多く含む。d) 二次構造上 α -helix 含量は 11%、 β -構造含量は、21-33% である。

3. ヒト α_2 HS 糖蛋白は、マウスマクロファージの

貧食能ならびに活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を充める。

4. α_2 HS 糖蛋白は、リンパ球幼若化反応、リンパ球混合培養ならびに natural killer 細胞活性には影響を与えない。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った右田俊介教授ならびに御助言をいただいた研究室の各位に深く感謝いたします。また、当研究に多大の御協力をいただいた愛知医科大学細菌学教室の野竹邦弘教授ならびに大園修身先生、北京生物製品研究所の程明先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Heremans, J.: Les Globulines Sériques du Système Gamma (Heremans, J. ed.), 93-105, Bruxelles, Editions Arscia S. A., 1960
- 2) Schmid, K. and Bürgi, W.: Purification and properties of the human plasma Ba- α_2 -glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **47**, 440-453 (1961).
- 3) Schultze, H. E., Heide, K. and Haupt, H.: Charakterisierung eines niedermolekularen α_2 -Mucoides aus Humanserum. *Naturwiss.*, **49**, 15 (1962).
- 4) Van Oss, C. J., Gillman, C. F., Bronson, P. M. and Border, J. R.: Opsonic properties of human alpha-2 HS glycoprotein. *Immunol. Commun.*, **3**, 329-335 (1974).
- 5) Lewis, J. G. and Andre, C. M.: Effect of human α_2 HS glycoprotein on mouse macrophage function. *Immunology*, **39**, 317-322 (1980).
- 6) Triffitt, J. T., Gebauer, U., Ashton, B. A. and Owen, M. E.: Origin of plasma α_2 HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature*, **262**, 226-227 (1976).
- 7) Triffitt, J. T., Owen, M. E., Ashton, B. A. and Wilson, J. M.: Plasma disappearance of rabbit α_2 HS-glycoprotein and its uptake by bone tissue. *Calcif. Tiss. Res.*, **26**, 155-161 (1978).
- 8) Van Oss, C. J. and Bronson, P. M.: Isolation of human serum alpha-2 HS glycoprotein. *Prep. Biochem.*, **4**, 127-139 (1974).
- 9) Lebreton, J. P., Joise, F., Raault, J. P., Lannuzel, B., Rogez, J. P. and Humbert, G.: Serum concentration of human alpha2 HS glycoprotein during the inflammatory process. *J. Clin.*

- Invest., **64**, 1118 - 1129 (1979).
- 10) **Lebreton, J. P.**: Purification of the human plasma α_2 -SH glycoprotein by zinc chelate affinity chromatography. *FEBS Lett.*, **80**, 351 - 354 (1977).
- 11) 右田俊介: 血漿タンパク質 (平山・右田編), 242 頁, 東京, 医歯薬出版, 1979.
- 12) **Weber, K. and Osborn, M.**: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 - 4412 (1969).
- 13) **Rosen, A., Ek, K. and Aman, P.**: Agarose isoelectric focusing of native human immunoglobulin M and α_2 -macroglobulin. *J. Immunol. Methods*, **28**, 1 - 11 (1979).
- 14) **Ouchterlony, O.**: Diffusion - in - gel methods for immunological analysis. *Progress in allergy*. S. Karger, Basel, 5: 1 (1958).
- 15) **Scheidegger, J. J.**: Une micro - méthode l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. allergy Appl. Immunol.*, **7**, 103 - 110 (1955).
- 16) 富永喜久雄, 右田俊介: 血漿タンパク質 (平山・右田編), 54 - 66 頁, 東京, 医歯薬出版, 1979.
- 17) **Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F.**: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, **2**, 235 - 254 (1959).
- 18) **Chen, Y. H., Yang, J. T. and Chau, K. H.**: Determination of the helix and β form of the proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*, **13**, 3350 - 3359 (1974).
- 19) **Moore, S.**: On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 235 - 237 (1963).
- 20) **Edelhoc, H.**: Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**, 1948 - 1954 (1967).
- 21) **Bhown, A. S., Mole, J. E., Weissinger, A. and Bennett, J. C.**: Methanol solvent system for rapid analysis of phenylthiohydantoin amino acids by high - pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **148**, 532 - 535 (1978).
- 22) **Pisano, J. J. and Bronzert, T. J.**: Analysis of amino acid phenylthiohydantoin. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5597 - 5607 (1969).
- 23) **Summers, M. R., Smythers, G. W. and Oroszlan, S.**: Thin - layer chromatography of sub - nanomole amounts of phenylthiohydantoin (PTH) amino acids on polyamide sheets. *Anal. Biochem.*, **624** - 628 (1973).
- 24) **Ito, M., Ralph, P. and Moore, M. A. S.**: In vitro stimulation of phagocytosis in a macrophage cell line measured by a convenient radiolabeled latex bead assay. *Cell. Immunol.*, **46**, 48 - 56 (1979).
- 25) 横坪毅, 野竹邦弘, 吉川和宏, 大圓修身: マクロファージ培養株 [C - AMU - 3 (M ϕ : C₃H/He)] の樹立. *愛知医科大学医学会雑誌*, **8**, 225 - 233 (1980).
- 26) **Yam, L. T., Li, C. Y. and Crosby, W. H.**: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **55**, 283 - 290 (1971).
- 27) **Anderson, L. and Anderson, N. G.**: High resolution two - dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5421 - 5425 (1977).
- 28) **Anderson, N. L. and Anderson, N. G.**: Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and α_2 HS glycoprotein examined by high resolution two - dimensional electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 258 - 265 (1979).
- 29) **Heimbürger, N., Heide, K., Haupt, H. und Shultze, H. E.**: Bausteinanalysen von Humanserumproteinen. *Clin. Chim. Acta.*, **10**, 293 - 307 (1964).
- 30) **Gejyo, F. and Schmid, K.**: Purification and characterization of the two forms of human plasma α_2 HS - glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **671**, 78 - 84 (1981).
- 31) **Arora, P. K., Miller, H. C. and Aronson, L. D.**: α_1 -antitrypsin is an effector of immunological stasis. *Nature*, **274**, 589 - 590 (1978).
- 32) **Chiu, K. M., Mortensen, R. F., Osmand, A. P. and Gewurz, H.**: Interactions of alpha 1 - acid glycoprotein with the immunesystem. *Immunology*, **32**, 997 - 1005 (1977).
- 33) **Hubbard, W. J., Hess, A. D., Hsia, S. and Amose, D. B.**: The effects of electrophoretically slow and fast α - 2 macroglobulin on mixed lymphocyte cultures. *J. Immunol.*, **126**, 292 - 299 (1981).
- 34) **Mortensen, R. F., Osmand, A. P. and Gewurz, H.**: Effects of C - reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus - dependent lymphocytes and alteration of their functions. *J. Exp. Med.*, **141**, 821 - 839 (1975).
- 35) **Needleman, B. W., Weiler, J. M. and Feld-**

- bush, T. L. : The third component of complement inhibits human lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.*, **126**, 1586 - 1591 (1981).
- 36) Benson, M. D. and Aldo - Benson, M. : Effect of purified protein SAA on immune response in vitro : mechanism of suppression. *J. Immunol.*, **122**, 2077 - 2082 (1979).
- 37) Murgita, R. A. and Tomasi, T. B. Jr. : Suppression of the immune response by α - fetoprotein. I. The effect of mouse α - fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *J. Exp. Med.*, **141**, 269 - 286 (1975).
- 38) Murgita, R. A. and Tomasi, T. B. Jr. : Suppression of the immune response by α - fetoprotein. II. The effect of mouse α - fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen - induced lymphocyte transformation. *J. Exp. Med.*, **141**, 440 - 452 (1975).
- 39) Cooperband, S. R., Badger, A. M., Davis, R. C., Schmid, K. and Mannick, J. A. : The effect of immunoregulatory α globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* **109**, 154 - 163 (1972).
- 40) Molnar, J., Gelder, F. B., Lai, M. Z., Siefeling, G. E. Jr. Credo, R. B. and Lorand, L. : Purification of opsonically active human and rat cold - insoluble globulin (plasma fibronectin). *Biochemistry* **18**, 3909 - 3916 (1979).
- 41) Maeda, Y. Y., Chihara, G. and Ishimura, K. : Unique increase of serum proteins and action of antitumor polysaccharides. *Nature*, **252**, 250 - 252 (1974).
- 42) Itho, O., Torikai, T., Satoh, M. and Osawa, T. : Purification and characterization of a mouse serum glycoprotein increased in level by administration of an antitumor polysaccharide, lentinan. *Gann*, **71**, 644 - 650 (1980).
- 43) 鳥飼尚之, 伊藤理, 佐藤元信, 大沢利昭 : 宿主介在性抗腫瘍物質により増量する血清成分 (抄録) 第39回日本癌学会総会記事, 105頁(1980).
- 44) 満野徹, 大沢利昭 : 抗腫瘍多糖体投与により増量する血清成分 LC について (抄録) 第40回日本癌学会総会記事, 109頁(1981).

Purification and Physicochemical Characterization of Human α_2 HS-glycoprotein and its Effects on Cellular Immunology Kouji Matsushima, Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. J. J. J. Med. Soc., 91, 219-230 (1982)

Key words: human α_2 HS-glycoprotein, purification, secondary structure, N-terminal sequence, cellular immunology.

Abstract

A large-scale purification method for α_2 HS-glycoprotein from normal human pooled serum is presented. 130 mg of α_2 HS-glycoprotein was obtained from 21 of normal human serum and the yield was 13.6 %. Charge heterogeneity on isoelectrofocusing of this protein is mainly due to sialic acid. By the measurement of the circular dichroism spectrum, the α -helix content was calculated as 11 % and β -structure was calculated as 21 to 33 %. α_2 HS-glycoprotein consists of a single polypeptide chain (M.W. 49,000) of which the N-terminal amino acid is alanine. The N-terminal sequence of 31 amino acids contains 19 hydrophobic residues, and this protein also contains high amounts of hydrophobic amino acids (proline, alanine, valine and leucine). The concentration of this protein in normal serum was the highest in cord blood and decreased according to age and particularly decreased in the serum of cancer patients. This protein seemed to be one of non-specific immunopotenciators in host defense mechanism, particularly in cellular immunology. The present study disclosed that α_2 HS-glycoprotein augmented the cytostatic effects by activated macrophages on tumor cells as well as the opsonic activity. α_2 HS-glycoprotein did not activate normal resident macrophages and showed no direct influence on the growth of tumor cells. It was also elucidated that α_2 HS-glycoprotein bound both activated macrophages and tumor cells after preincubation of these cells with this protein and that α_2 HS-glycoprotein exhibited no influence on lymphocyte blastogenesis, mixed lymphocyte reaction, or natural killer cell activity.