

ヒトの尿カリクレインのドナジオ反応陽性物質に関する研究

河野 節子

Studies on Donaggio Positive Reaction of Human Urinary Kallikrein

Setsuko KAWANO

緒 言

ドナジオ反応は疲労の判定法として広く用いられており、村上等は¹⁾²⁾ 合宿練習などで安静時血圧の低下する疲憊期と目される時期に、尿ドナジオ反応陽性物質の分泌が増加すると報告している。また運動時には尿アルコール沈澱物質の分泌が増加し、したがって疲憊期にもその分泌が増加していると思われる。³⁾ ドナジオ反応陽性物質は尿アルコール沈澱分画に存在し、一方尿カリクレインは尿にアルコールを加えて沈澱させる操作で採取しているため、両者には共通点が推定される。またその後の研究より、⁴⁾ 尿アルコール沈澱分画に存在する血圧下降物質は、カリクレイン様物質に負う所が大であることが明らかにされており、さらにカリクレインは等電点が約 pH 4 で glycoprotein であることが報告されている。⁵⁾⁶⁾ また一方ドナジオ反応陽性物質は mucoprotein であると報告しているが、⁷⁾ ドナジオ反応陽性物質中には glycoprotein も含まれていると推定される。しかし尿カリクレインは単一物質で構成されているものではないので、そこで Sephadex G-75 を用いてゲル濾過し、各分画のドナジオ反応値とカリクレインとの相互関係について検討した。

カリクレインは普通、不活性なカリクレイノーゲンとして存在しているが、ハーゲンマン因子などにより活性化しカリクレインになる。さらにカリクレインは生体内では、不活性な形でしか存在しないキニノーゲンに働いてキニンにする。このキニンが血管の拡張作用により血圧が降下して循環状態を変化させ、疲労状態を招来させると考えられる。このカリクレイン-キニン系は炎症、抗原抗体反応、アレルギー反応、その他血液凝固は勿論のこと、腫瘍の生成、癌にも深い関係があるとされている。⁸⁾ また近年血圧調節作用への関与が注目され、⁹⁾⁻¹²⁾ 生体にとって生理的、病理的に重要な意義をもっている。

実 験 方 法

1. 尿カリクレイン作製法

ヒトの尿に3倍量の冷エタノールを加え、攪拌したのち2,000×gで10分間遠心分離して、沈澱物に充分量のアセトンを加え、1時間放置後2,000×gで10分間遠心分離し、さらにエーテルで洗い乾燥後、5 mlの生理的食塩水で溶解して、0.01 Mリン酸緩衝液を用いて0°-4°Cで18時間透析したものを試料とした。pHは実験の都度必要なpHに調製した。

2. 尿ドナジオ反応陽性物質の測定法

先に述べた資料1 mlに1,000倍希釈のメチレンブルー溶液1 mlを加え、さらに4%モリブデン酸アンモン溶液1 mlを加え、室温で12時間放置後1)と同様に透析し、透析内液を試料とし

た。ドナジオ反応値は 40,000 倍メチレンブルー溶液を標準として 620 m μ で算定した。

3. ゲル濾過法

尿カリクレイン，市販の Bayer のカリクレイン（豚・豚カリクレイン，等電点 pH 4.2）および尿カリクレインにドナジオ反応を実施した試料は，SF-100 P 型フラクションコレクターを用いて，前二者は Sephadex G-75 を用い，ドナジオ反応実施試料は Sephadex G-200 でゲル濾過し分画を行なった。カラムは Sephadex G-75 でのゲル濾過の場合は 3.0 \times 100.0 cm，Sephadex G-200 の場合は 1.0 \times 30.0 cm を用いて行なった。各分画の蛋白濃度は Lowry 法で測定し，ドナジオ反応陽性度は日立分光光度計 124 型を用い 620 m μ で測定した。

実験結果

ヒトの尿カリクレイン（アルコール沈澱分画）を分画したのが図 1 である。この場合前に大きく一つのピークと後に小さい二つのピークがあらわれた。血圧下降剤として知られる市販の Bayer 製カリクレインも尿蛋白発現作用をもつことが判明しているが¹³⁾このカリクレインが，尿カリクレインとどのような関係にあるかを知るために行なった実験が図 2 である。このカリクレインも完全に精製されたものでなく，やはり前に大きな一つのピークと後に小さい二つのピークがあらわれた。図 3 は pH の影響をみたものであるが，pH の差によってはほとんど差はなく，しいて言うならば，アルカリ側になると多少ピークが前にあらわれる傾向がある。

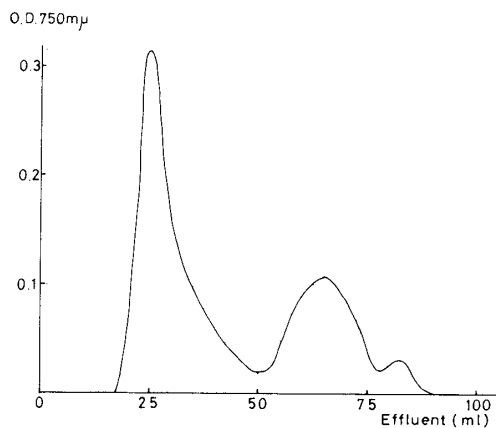


図 1 尿カリクレイン分画の分布 (pH 7.2)

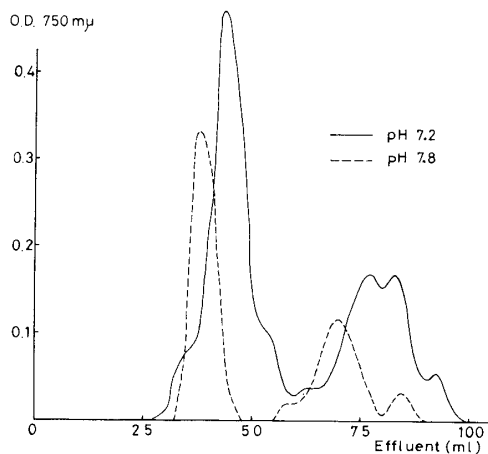


図 2 市販の Bayer 製カリクレイン分画の分布

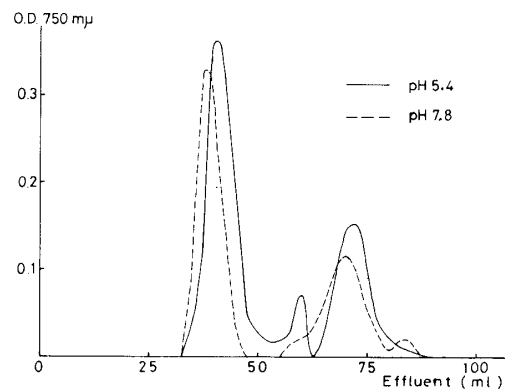


図 3 市販の Bayer 製カリクレイン分画の分布

また従来より疲労の判定法にはドナジオ反応が用いられているので，そこで上の尿カリクレインと，ドナジオ反応との関係について調べたのが図 4 (pH 5.4 の場合)，図 5 (pH 7.8 の場合) である。実線はヒトの尿カリクレイン，点線はドナジオ反応陽性物質の吸光度を示している。尿カリクレインおよびこれとドナジオ反応を行なったもの両者を Sephadex G-200 でゲル濾過すると，分子量の重い群では全く同じパターンを示したが，分子量の軽い群では一部が

重複するに過ぎなかった。図4，図5より，ドナジオ反応陽性物質は尿カリクレインの分子量の重い群と反応していることが判明した。

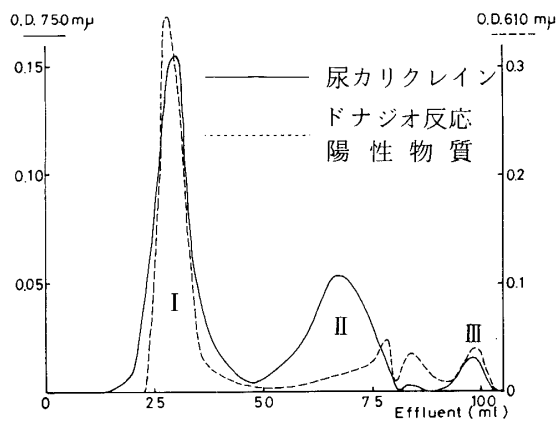


図4 尿カリクレイン分画におけるドナジオ反応陽性物質の分布 (pH 5.4)

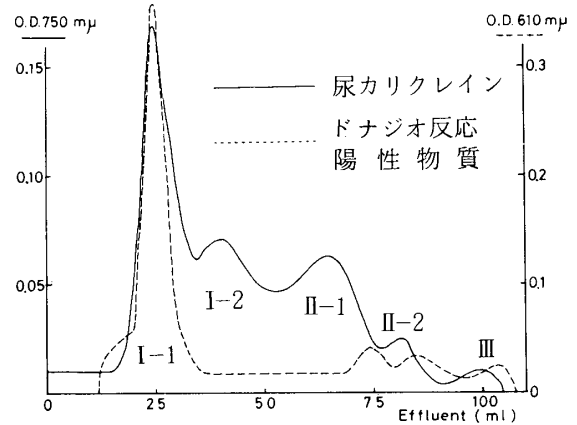


図5 尿カリクレイン分画におけるドナジオ反応陽性物質の分布 (pH 7.8)

考 察

図1より明らかなように，尿カリクレインは **Sephadex G-75** を用いたゲル濾過法による分析より，少なくとも三つの異なる蛋白質よりなることがわかる。**Sephadex G-200**を用いたゲル濾過でもその事が確認された(図4，5)。その分子量は大きい分子は約40,000，小さい分子は29,000および27,000の二つのピークであると推定され，^{4) 6) 14)}その量は分子量40,000の蛋白質が多く，次いで分子量29,000で分子量27,000の蛋白質は最も含有量が少ない。これらの三つの分画はそれぞれキニノーゲンと incubate してキニンを生成させるとモルモットの腸管の収縮作用および家兎の血圧下降作用があり，しかも両者の作用が平行することより三分画ともにカリクレイン活性をもつことが知られている。⁴⁾しかし，その活性には違いがあるので，それぞれのカリクレインは異なるものであると推定されている。一方 pH 7.8 にすると少し早くゲル濾過された。ゲル濾過法では分子量の大きい蛋白質ほど早くゲル濾過されるが，その速度は pH が変化したことより蛋白質の荷電状態が変わり，吸着等に変化を生じその早さが変わったものと考えられる。

市販の **Bayer** 製のカリクレインを同様の方法でゲル濾過すると，三つのピークがみられ，分子量の異なる三つの蛋白質を含み，pH 5.4 の場合分子量の大きい蛋白質の含有量が最も多く，分子量最小の蛋白質がついで多く，分子量が中間の蛋白質は最小量含まれている。

ヒトの尿カリクレインと **Bayer** のカリクレインを pH 7.2，**Sephadex G-75** でゲル濾過した結果を(図1，図2)比較してみると(図6)三つの分画ではいずれもヒトの尿カリクレインの分子量が **Bayer** のカリクレインの分子量より大きい。すなわちヒトの尿カリクレインおよび市販の **Bayer** のカリクレインも三つの分画よりなるが，両者のカリクレインは異なることがわかる。

尿カリクレイン標品は，エタノールを加えて沈澱させて作成している。¹³⁾一方，ドナジオ反応陽性物質もメタノールを加えて作成している。¹⁵⁾両者とも疲労時に尿への分泌量が増加し，^{13) 15)}その組成は多くの物質よりなることが知られている。したがって尿カリクレインとドナジオ反応陽性物質は同一のものか，または一部共通した物質を含むことが考えられる。

そこで尿カリクレインを pH 5.4 でメチレンブルー，モリブデン酸アンモンを加えてドナジオ反応を行なわせた後，透析したものを **Sephadex G-200** でゲル濾過して蛋白質を分画して，

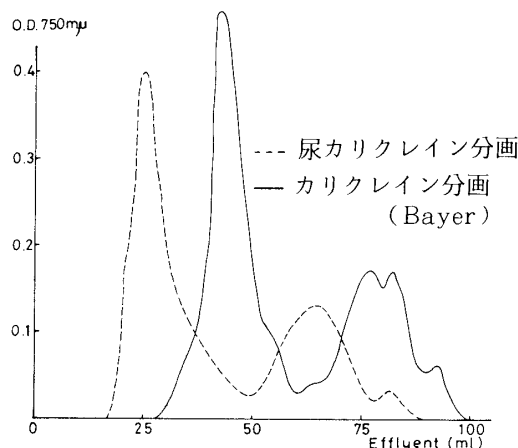


図6 尿カリクレイン分画の分布
および市販の Bayer 製カリ
クレイン分画の分布(pH 7.2)

その蛋白質量と色素量を測定したものを比較した。図4でみると蛋白質とメチレンブルー量とは必ずしも一致せず、絶対値では蛋白質、メチレンブルーともに分子量の最大のものが最も多く含まれ(I),分子量が小さい分画では(III)蛋白質量が最小にかかわらずメチレンブルーは比較的多く、分子量の中間程度のものが(II)メチレンブルーがほとんどない。すなわち蛋白質当りのメチレンブルー量は、分子量の小さい(III)が最大で(I)がついで(II)はない。ヒトの尿カリクレインのメチレンブルー結合能は三つの分画で著しく異なっていた。

ドナジオ反応の本態は、主としてモリブデン酸アンモンとメチレンブルーの反応によるメチレンブルーの凝集沈澱を、ドナジオ反応陽性物質がモリブデン酸アンモンと結合して抑制するものとされている。

またドナジオ反応陽性物質がメチレンブルーと結合することも知られており、もしドナジオ反応陽性物質がメチレンブルーと結合すると、溶解しているメチレンブルーが減少し、メチレンブルーの凝集が少なくなり、ドナジオ反応が陽性になるメカニズムも存在しうる。図5に示したように pH 7.8 にすると **Sephadex G-200** のゲル濾過による蛋白質の分画で、(I)がメチレンブルーを結合する分画とメチレンブルーを結合しない分画にわかれる。分子量の大きい分画が pH 7.8 で二つに分れる理由は、pH の変化によりこの分画に異なる蛋白質が少なくとも二つ含まれており荷電状態の変化がおこって、ゲル濾過で二つの分画に分れたものと思われる。

(II) の分画も pH 7.8 では二つに分れる。(II) の分画は pH 7.8 では大きい分子ではメチレンブルーが結合せず、小さい分子でメチレンブルーが結合しやすいものと思われる。pH 5.4 と pH 7.8 では蛋白質量とメチレンブルー量には大きな差はない。pH 5.4 ではドナジオ反応陽性物質とモリブデン酸アンモンの結合が促進して、メチレンブルーの凝集を抑制するドナジオ反応がおこるが、pH 7.8 ではこの反応がおこらないとされている。¹⁵⁾

本研究では、pH 5.4, pH 7.8 でいずれも尿カリクレインの大部分にメチレンブルーが同様に結合することを認めた。pH 5.4 でのドナジオ反応を陽性にするメカニズムは、従来村上が¹⁵⁾主張する事よりして、ドナジオ反応陽性物質とモリブデン酸アンモンの結合が主たる機構であろう。しかし尿カリクレインではメチレンブルーと結合する蛋白質が多く含まれ、しかも蛋白質の種類によりメチレンブルーとの結合の度合が著しく異なることは注目に値する。今後この結合がドナジオ反応にどの程度関係しているか、あるいは結合の状態について解明をしていきたいと考えている。

要 約

1) 尿カリクレインも市販の Bayer のカリクレイン製剤も、用いられた緩衝液の pH により多少のずれはあるが、分子量の異なる三つの蛋白質群に分画される。しかし両者を比較すると溶出位置より分子量にかなりの相違があり、この点については更に検討を要する。

2) 尿カリクレインにメチレンブルー、モリブデン酸アンモンを pH 5.4 および pH 7.8 で反応させた場合、いずれも分子量の大きい分画と小さい分画にメチレンブルーが結合し、中間の

分画には結合しなかった。

参 考 文 献

- 1) 村上長雄他：日本生理学雑誌，**14**，412（1952）
- 2) 勝田穰他：日本生理学雑誌，**14**，481（1952）
- 3) 藤岡博他：防衛衛生，**6**，177～182（1959）
- 4) Kawabe, M.: *Mie Med. J.* **18**, 123-138 (1968)
- 5) Kutzbach, C. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1099-1106 (1972)
- 6) Pisano, J.J.: *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, **2**, 199-222 (1978)
- 7) 荒木俊一：日本衛生学雑誌，**2**，No 3，1（1948）
- 8) 第12回日本医学会シンポジウム：日本医師会雑誌，**63**，911～969（1970）
- 9) Keiser, H. R., et al.: *Federation Proc.* **35**, 199-206 (1976)
- 10) Lechi, A., et al.: *Clinical Science and Molecular Medicine*, **55**, 51-55 (1978)
- 11) Margolius, H.S., et al.: *Circ. Res.*, **35**, 812-819 (1974)
- 12) 阿部圭志他：診断と治療，**64**，1091～1095（1976）
- 13) Murakami, N., et al.: *Nature*, **218**, 481-483 (1968)
- 14) Moriya, H., et al.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **104**, 172-185 (1963)
- 15) 村上長雄：体力科学，**6**，123（1956）