

間質性腎炎惹起性抗原の分離・精製および mRNA

宮里 裕典

近畿大学医学部小児科学教室

Isolation and molecular characterization of the tubular basement membrane antigen associated with tubulo-interstitial nephritis

Hirofumi Miyazato

Department of Pediatrics, Kinki University
School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

The target antigen, 54 kD glycoprotein (gp54), involved in the anti-tubular basement membrane (anti-TBM) antibody-mediated tubulo-interstitial nephritis, and localized dominantly to the basement membrane of proximal tubules was characterized. gp54 was isolated from collagenase-digested (CD) bovine TBM by column chromatography and further elution from blotted membranes. Amino acid analysis showed that the gp54 was non-collagenous in nature.

The NH₂-terminal amino acid sequencing of gp54 revealed that the gp54 was a unique basement membrane component. The nephritogenicity of gp54 was demonstrated by immunizing guinea pigs (strain XIII) with purified gp54, and producing anti-gp54 antibody and tubulo-interstitial nephritis. Anti-gp54 antibody, affinity-purified from sera of patients with anti-TBM nephritis, anti-gp54 peptide antibody, and antibody eluted from guinea pigs immunized with gp54 bound to 54 kD and 48 kD components of human CD-TBM. mRNA was prepared from rabbit kidneys and concentrated by the sucrose density gradient centrifugation method. ³⁵S-Methionine-labeled proteins translated from the rabbit renal mRNA were incubated and immunoprecipitated with anti-gp54 antibody, revealing mainly 54 kD and 48 kD components. A competition test using purified gp54 showed that anti-gp54 antibody was cross-reactive with 48 kD component. Dot blot hybridization with an oligonucleotide probe for gp54 revealed a positive signal in cDNA libraries made from adult and fetal kidneys. These findings indicate that 54 kD and 48 kD have similar antigenicity, but are encoded by different mRNA.

Key words : tubulo-interstitial nephritis, anti-tubular basement membrane antibody, mRNA

緒 言

ヒトの間質性腎炎は1860年、Biermer¹ が猩紅熱にみられる腎障害の特殊型として報告し、1866年、Zollinger² がその概念を提唱して以来、種々の原因によって起こる腎尿細管・間質の炎症性障害として知られている。その原因としては細菌感染、薬剤、代謝異常、放射線障害、遺伝性疾患、ならびに原因不明の特発性などが知られているが³、その発症機序は未だ解明されておらず、その発症はこれらの腎への直接的影響または免疫を介した機序により生ずるものとの考えが主流をなしている。その中で、抗原抗体反応による間質性腎炎については、1971年に Steblay & Rudofsky⁴ が初めて抗基底膜型間質性腎炎の存在を提唱した。彼らはウサギの尿細管基底膜 (tubular basement membrane: TBM) をモルモットに免疫し、IgG が TBM に沿って線上に沈着した間質性腎炎 (tubulo-interstitial nephritis: TIN) の発症と TBM に対する自己抗体 (抗 TBM 抗体) の存在を報告した。その後、多くの研究者たちによって、抗 TBM 抗体によって引き起こされる間質性腎炎の存在がラット、マウスなどの動物実験モデルで報告された。しかし、それらは動物の種や系統によって違いがあり、TIN を惹起する TBM 抗原は、ウサギ、モルモットや Brown-Norway ラットの腎臓には存在するが、Lewis, Maxx, Wister-Furth などの系統のラットには欠損していることが知られている⁵。

ヒト間質性腎炎患者においても TIN の発症と抗 TBM 抗体の関係が指摘されている^{6,7}。TIN を発症し、抗 TBM 抗体を有した患者の報告では、メチシリンなどの薬剤によると考えられるもの、腎移植後に TIN を発症していたもの、また、原因が明らかでない特発性のものなどがこれまでに知られている。これらの患者の血中に存在する抗 TBM 抗体はヒトのみならず、ウシ、ウサギ、モルモット、Brown-Norway ラットの腎組織で、特に近位尿細管基底膜と結合しうる。我々は以前に、ヒトの抗 TBM 型腎炎

での標的抗原が、collagenase 消化でヒト TBM から可溶化されること、また、免疫沈降法の結果から 54 kD と 48 kD の component が標的抗原と考えられること⁸、さらに、この抗原物質が galactose に親和性をもつレクチンである RCA-I に吸着されること⁹ を明らかにしている。

今回の研究では、さらに、間質性腎炎惹起性の抗原蛋白である 54 kD の糖蛋白 (以下 gp54 と呼ぶ) をウシ TBM より分離精製し、その性状を明らかにした。また、この蛋白を code する mRNA についても検討を行った。

方 法

1. 動物および組織

動物および組織については以下のものを使用した。すなわち、Brown-Norway ラットおよび Lewis ラット (生後約 8 週のもの、クレアジャパン)、モルモット Strain XIII (生後約 4-6 週のもの、ジャパン SLC)、ウシ腎臓 (和光純薬)、ウサギ (生後約 12 週のもの、北摂産業)、ヒト腎組織 (事故死体腎、および腎結石や腎外傷で摘出された腎の正常部分、近畿大学医学部法医学教室吉村昌雄教授、泌尿器科学教室栗田孝教授の御好意による) である。

2. 抗 TBM 抗体

抗 TBM 抗体としては、3名の抗 TBM 型間質性腎炎患者血清⁸ を用いた。これらの血清はいずれも collagenase 消化のヒト TBM との immunoprecipitation で 54 kD、48 kD のバンドを確認していた⁸。この血清を後述のごとく polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜を用いて精製し、ヒト抗 gp54 抗体とした。また、精製した gp54 で免疫したモルモットの血清、gp54 に対するマウスモノクローナル抗体 (H-79)⁹ も使用した。

3. TBM の分離と可溶化

既報⁸のごとく、ヒト、ウシの腎組織の皮質部分を細切した後、homogenize し、種々のサイズのメッシュ (#50, 80, 100, 120, 125, 150, 200, 250, 325, 400) を連続的に通して

尿細管を採取した。これを前報⁸に従って protease inhibitor を含む 1.0 M NaCl に溶解し、超音波で破碎して TBM を得、collagenase (type VII, Sigma, St Louis, MO) による消化で可溶化した。

4. クロマトグラフィー

collagenase 消化 (CD)-TBM をイオン交換カラム (Mono Q, 0.5×5.0 cm, Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) にかけた。カラムは 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化し、0-1.0 M NaCl の塩濃度勾配を用いて分画溶出した。得られた分画は、ヒト抗 TBM 抗体を用いた blotting 法で抗原を含む分画 (ピーク III) を同定した。こうして得たピーク III 分画を 0.1% Nonidet P-40/phosphate buffer saline (PBS) 溶液で透析後、RCA-I アガロースカラム (生化学工業) で分画した。すなわち、このカラムを同 buffer で十分に洗浄した後、ピーク III 分画を apply し、0.2 M D-galactose/0.1% Nonidet P-40/PBS 溶液で溶出し、この分画に目的とする抗原物質が含まれることを前記と同様に blotting で確認した。その後、蒸留水で透析し、凍結乾燥した。

5. SDS 電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は 4-20% gradient ゲル (MULTIGEL 4/20, 第一化学薬品) を用いて、Laemmli¹⁰の方法に基づいて行った。また、以下のような分子量の standard marker (Pharmacia) を用いた。thyroglobulin (330 kD), ferritin (220 kD), phosphorylase B (94 kD), bovine serum albumin (67 kD), catalase (60 kD), carbonic anhydrase (30 kD), trypsin inhibitor (20.1 kD), lactalbumin (14.4 kD)。

6. blotting

blotting は Burnette¹¹の方法に基づいて行った。SDS-PAGE ゲルをセミドライプロット装置 (日本泳動) を用いて PVDF 膜に 170 mA で 30 分間転写した。その後、転写膜は金コロイドによる蛋白染色 (Goldblot, ISS-enprotech, Hyde Park, MA, USA), もしくは一次抗体 (ヒト抗 TBM 抗体) および二次抗体 (alkaline phos-

phatase 標識ヤギ抗ヒト IgG, Cappel, Malvern, PA, USA) との反応後、基質 (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate と nitroblue tetrazolium) を用いて免疫染色した。

7. gp54 蛋白の精製

blotting 後、PVDF 膜の両端の lane をカットし、これをヒト抗 TBM 抗体を用いて免疫染色した。残りの中央部分は amide black 染色し、両端の lane の抗原物質に相当する蛋白バンドをカットし、1% Triton/20% acetonitrile/50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) で蛋白を溶出し¹²、溶出液を蒸留水で透析し、その後、凍結乾燥した。なお、逆相カラム (HPLC) を用いて分離精製を試みたが、適切な条件を見出すことができなかったので、上記方法によって gp54 を分離した。

8. 生化学的分析

アミノ酸組成の分析は転写膜を用いた Applied Biosystems Derivatizer 420 で行った。N 末端アミノ酸 sequence はエドマン法に基づく自動シーケンサーである Applied Biosystem Sequenator を用いた。すなわち、blotting 後に転写された PVDF 膜を 0.25% coomassie brilliant blue R-250 で染色し、54 kD 部分をカットした後、超純水で十分に洗浄し、自動シーケンサーで分析した¹³。

9. 抗gp54抗体の精製

抗gp54抗体の精製は Robinson ら¹⁴の方法に従って行った。ウシ gp54 を転写した PVDF 膜から gp54 に相当する部分のみを切り出し、抗 TBM 型間質性腎炎患者血清と室温で 3 時間反応させた。十分に洗浄後、結合した抗体 (抗 gp54 抗体) を 0.1 M glycine HCl -0.1% BSA buffer (pH 2.5) で溶出した。溶出液を 1N NaOH で中和し、PBS で透析した後、透析液を濃縮し、ヒト抗gp54抗体とした。

10. 間質性腎炎の惹起

6匹のモルモット (strain XIII, 雌) を用いた。Freund's complete adjuvant (FCA) とともに精製したウシ gp54 を 50 µg (n=2, A 群), 20 µg (n=2, B 群), コントロールとして

FCAのみ(n=2, C群)をそれぞれに数カ所に分けて皮下注射した。3週間後に ether 麻酔の上、屠殺し腎臓を摘出し、組織の観察を行った。摘出した腎組織の一部から、McPhaulとDixonの方法¹⁵に従ってIgG分画を溶出した。また、同時に血液と尿を採取した。尿は還元状態でのSDS-PAGEにより低分子(尿細管性)蛋白の有無を検討した。

11. 合成ペプチドによる免疫

先のアミノ酸 sequence で得られたウシ gp54 のN末端から17個のアミノ酸に相当するペプチドを Fmoc 固相法により合成し(ペプチド研究所), carrier protein として BSA を maleimide 法にて結合させ、その 50 µg, 200 µg を FCA とともにモルモット (strain XIII, 雌) に免疫した。3週間後に同量を Freund's incomplete adjuvant (FICA) とともに booster として免疫し、その3週間後に血液を採取し、合成ペプチドおよび gp54 と反応する抗体の産生の有無を ELISA法でチェックした。また、同時に腎臓を摘出し、組織の観察を行った。

12. 免疫蛍光抗体法

直接および間接的免疫蛍光抗体法は既報のごとく行った^{16,17}。

13. mRNAの抽出と蛋白の合成

ウサギを ether 麻酔下で屠殺して腎臓を摘出し、即時に液体窒素で凍結した。凍結した腎臓を物理的に破碎後、guanidine-thiocyanate 法にて RNA を抽出した。その後、oligo-dT カカムで mRNA を分離溶出した。得られた mRNA を 5-30% 蔗糖密度勾配遠心法により分画濃縮した¹⁸。蛋白の合成は Reticulocyte Lysate L-[³⁵S] Methionine Translation キット (Du Pont) を用いて、各分画の mRNA から翻訳された ³⁵S-Methionine ラベルの蛋白を合成した。

また、この mRNA から cDNA 合成キット (Pharmacia) と λ DNA in vitro パッケージングキット (Amersham) を用いて cDNA ライブラリーを作成した。ライブラリーのスクリーニングは抗gp54抗体(ヒト, モルモット, マウス

モノクローナル抗体), および後述の³²P 標識 oligonucleotide probe (YY0325-1) で行った。

14. Immunoprecipitation

前記のごとく合成した蛋白の 25 µl を solubilizing buffer (10 mM Tris-HCl/0.15 M NaCl/0.1% BSA/0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)/2 mM benzimidazole/1 % Triton X-100) 100 µl 中で preimmune serum (正常同種血清および同種の IgG を使用) 5 µl と 4°C で 1 時間反応させ、protein A-cellulofine (生化学工業) 50 µl と室温 1 時間で沈降させて非特異反応を取り除いた。その後、合成蛋白を各種の抗gp54抗体 5 µl と 4°C, overnight で反応させて、protein A-cellulofine に吸着させた。十分に洗浄した後に遠心し、2% SDS 溶液 100 µl 中に 54°C で 45 分静置し、protein A-cellulofine に結合している抗体-蛋白複合物から蛋白を溶出した。

次に、SDS-PAGE (4-20% gradient ゲルを使用) を行い、ゲルを Amplify (Amersham) で蛍光発色し、十分に乾燥させた後、-80°C, overnight でフィルムに感光させた。

また、competition test として、前述のごとく非特異反応を取り除いた後の合成蛋白溶液を二分し、一方にはモルモット抗 gp54 抗体 5 µl のみを、他方にはモルモット抗 gp54 抗体 5 µl とともに精製した gp54 10 µl (約 30 µg) を同時に加えて 4°C, overnight で反応させた。以後は前記と同様に吸着、沈降、溶出させてフィルムに感光させた。

15. Dot blot hybridization

gp 54 の N 末端アミノ酸配列から想定した 21 mer の oligonucleotide probe (YY0325-1, NGGR TCNGGYTGNCCTCRAA) を作製し、その 5' 末端を γ-³²P-ATP (NEN, Du Pont) と Oligonucleotide 5'-end ラベリングシステム (NEN, Du Pont) を用いてラベルした。

ヒト成人および胎児の腎 cDNA (λ gt 11) ライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA, USA) より、λ gt 11 をプレートライゼーション法および塩

化セシウム密度勾配遠心法で調製した¹⁸, これらとともに, ライブラリー中にベクターとして用いられていた λ DNA と, ベクターとして使用されることの高い pBR322DNA の 2 つをコントロール DNA として用いた. また, コントロールプローブとしては β -actin プローブを使用した. これら 4 種類の DNA をナイロン・メンブレン (Amersham) 上にスポットして風乾させ, プレハイブリダイズの後, 各プローブと 45°C, overnight でハイブリダイズさせた. ナイロン・メンブレンを十分に洗浄後, 濾紙上で風乾し, フルオログラフィー (-80°C, overnight) を行った.

成 績

1. ウシ TBM からの 54 kD 抗原蛋白 (gp54) の分離精製

ウシ CD-TBM から gp54 を精製する各過程での蛋白染色および抗ヒト gp54 抗体との blotting を Fig. 1 に示した. ウシ TBM を collagenase で可溶化し (Fig. 1, lane a), Mono Q カラムで 3 つのピークを得た (Fig. 2). 各ピークのうち, 抗原が含まれていたピーク III (Fig. 1, lane b) を採取し, RCA-I アガロースカラムの吸着部分を得た (Fig. 1, lane c). これを SDS-PAGE の後, 最終的に PVDF 膜から 54 kD に相当するバンドを切り出し, 蛋白を溶出して精製した. 精製した 54 kD は SDS-PAGE で単一バンドとして観察された (Fig. 1, lane d).

2. gp54 の生化学的特徴

gp54 のアミノ酸分析の結果を Table 1 に示す. その組成中には, hydroxyproline と hydroxylysine を含まず, aspartic acid と glutamic acid を多く含有していた. また glycine がコラーゲン性蛋白¹⁹ に比較して相対的に低含有であった. これにより, gp54 は non-collagenous な蛋白であると考えられた.

gp54 の N 末端 sequence は, Ala-Leu-Phe-Glu-Gly-Gln-Pro-Asp-Pro-Gly-Phe-Gly-Phe-Thr-Ala-Asp-Ile であった. このペプチドはコンピューター (蛋白質データベース SWISS-

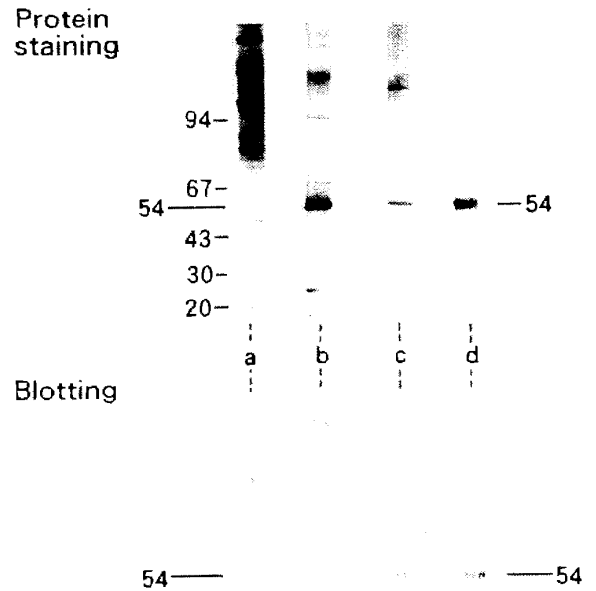


Fig. 1 Electrophoresis and immunoblot analysis of collagenase-digested bovine tubular basement membrane (TBM) and materials fractionated by column chromatographies. Specimens were applied to 4-20% gradient SDS-PAGE under non-reducing conditions. After electrophoresis, the gels were used for blotting, followed by protein staining with gold (upper panel), or by immunodetection with human anti-TBM antiserum (lower panel). Molecular weights are shown by numerals on the left side.

Lane a : collagenase-digested bovine TBM. Lane b : peak III fractionated by anion-exchange chromatography on a Mono Q column. Lane c : material eluted from RCA-I agarose column by 0.2M D-galactose/0.1% Nonidet P-40/PBS. Lane d : gp54 purified by elution of 54kD band from blotted polyvinylidene difluoride membrane.

PROT, release 22) の検索で既知の蛋白と homology を認めなかった.

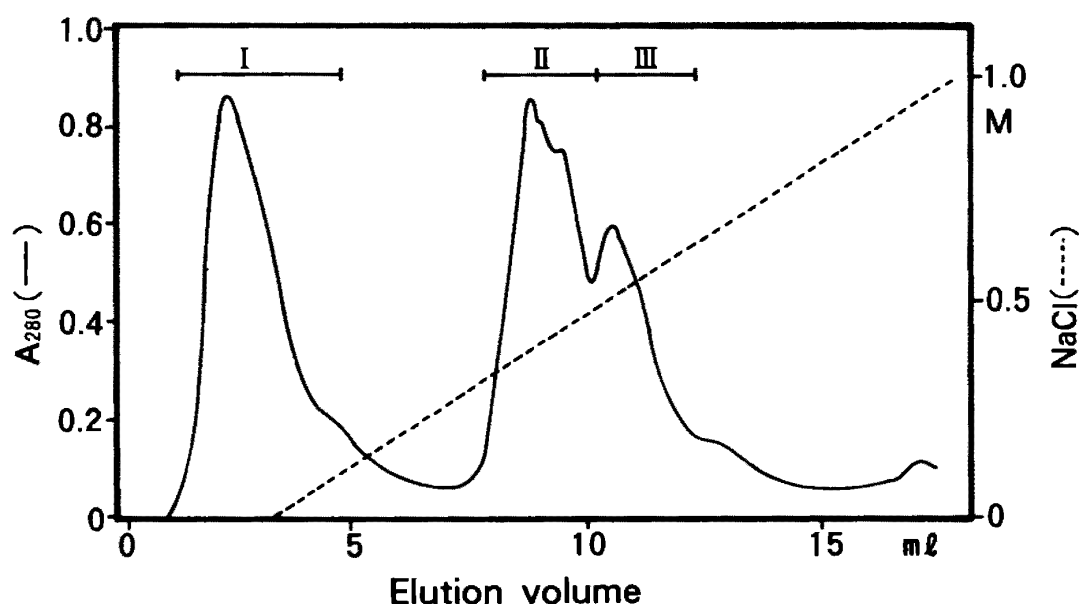


Fig. 2 Anion-exchange chromatography in 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, on a Mono Q column of collagenase-digested bovine tubular basement membrane (TBM). A gradient of 0-1.0M NaCl in the buffer was used for elution. The fractions were analyzed for protein content by measuring absorbance at 280nm and for 54kD TBM antigen by immunoblotting. The antigen was detected in the last peak (peak III).

Amino Acid Composition of Purified Bovine gp54

Amino acids	Residues per 1,000
Aspartic acid	128.9
Glutamic acid	152.8
Hydroxyproline	0.0
Serine	92.9
Glycine	117.6
Histidine	24.8
Arginine	58.8
Threonine	63.0
Alanine	55.0
Proline	51.1
Tyrosine	34.6
Valine	24.8
Methionine	14.9
Half cystin	13.2
Isoleucine	25.2
Leucine	45.7
Hydroxylysine	0.0
Phenylalanine	34.6
Lysine	62.1

Results are an average of three determinations.

3. gp54 の腎炎惹起性の検討

50 μ g の gp54 を注射した A 群のモルモットでは、間質への著明な炎症細胞の浸潤と尿細管の拡張や破壊が認められた (Fig. 3). これらの病変は腎皮質の特に腎皮膜に近い部分で著明であった。糸球体には特記すべき変化はなかった。B 群では尿細管間質の変化は A 群に比して軽度であり、C 群では病理学的な異常は認められなかった。また、SDS-PAGE blotting で、A 群モルモットの尿から 20-30 kD の低分子 (尿細管性) 蛋白を認めた。

4. 抗 gp 54 抗体と TBM との反応性

Brown-Norway ラットの腎組織切片を用いた蛍光抗体間接法では、モルモット抗 gp54 抗体 (A 群のモルモット血清、およびその腎から溶出した IgG) とヒト抗 gp54 抗体 (抗 TBM 型腎炎患者血清から精製したものは、TBM (主に近位尿細管) と一部 Bowman 嚢基底膜とに反応し、糸球体基底膜とは反応しなかった (Fig. 4). また、これらの抗体は、正常ヒト、ウシ、ウサギ、モルモットの腎組織とも同様に反応したが、Lewis ラットの腎組織とは全く反応しなかった (Fig. 4).

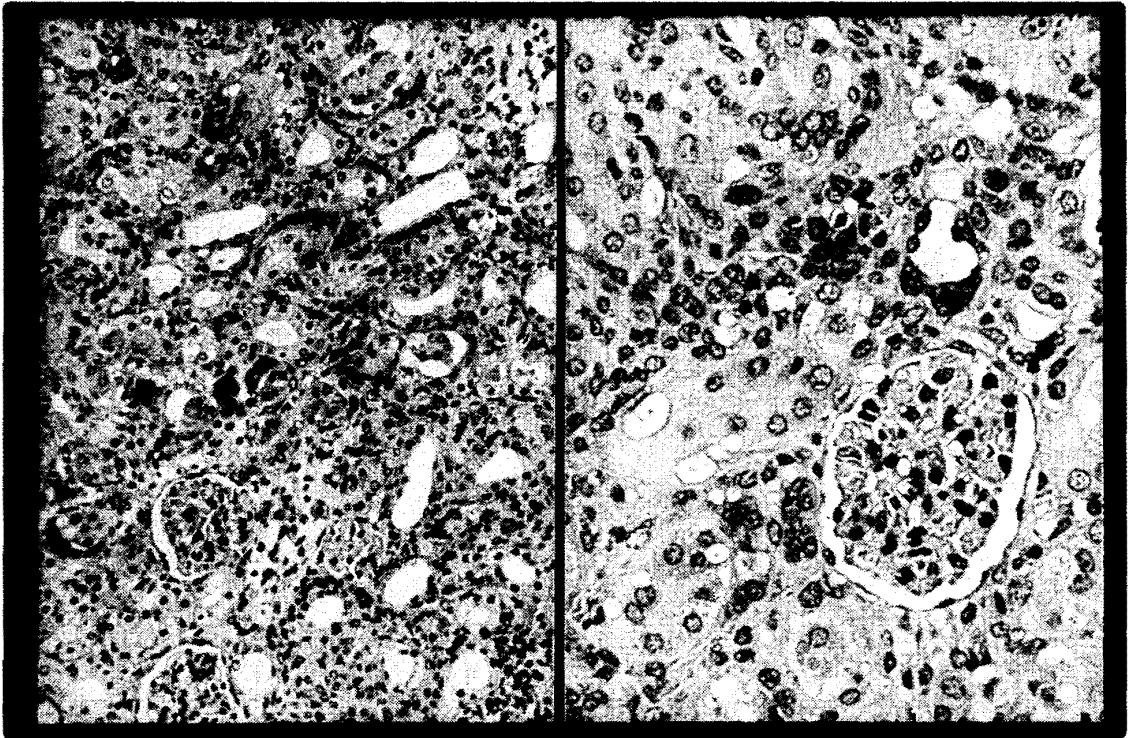


Fig. 3 Tubulo-interstitial nephritis in a guinea pig (strain XIII) immunized with purified gp54 (50 μ g). Moderate infiltration of mononuclear cells and tubular destruction are evident. The glomerular changes are minimal. (HE stain, $\times 100$ Left, $\times 200$ Right)

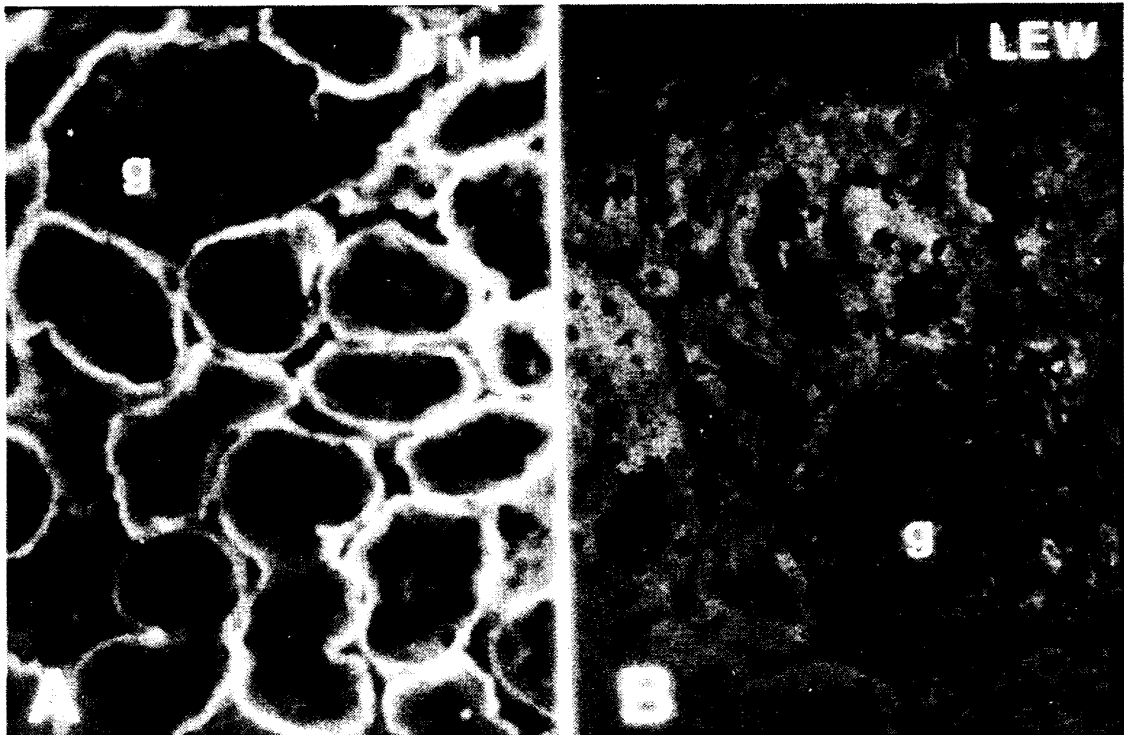


Fig. 4 Indirect immunofluorescence using serum from a guinea pig immunized with purified gp54 (50 μ g) on a Brown-Norway rat (A) and a Lewis rat (B) kidney section. Staining is linearly positive along the basement membrane of the proximal tubules and a part of Bowman's capsule in a glomerulus of the Brown-Norway rat kidney. There was no staining in the Lewis rat. (A, B, $\times 200$) g : glomerulus.

5. 抗ペプチド抗体と TBM との反応性

gp54 の N 末端に相当する 17 個のアミノ酸から成るペプチドを合成し、モルモットに投与して抗ペプチド抗体を得た。摘出した腎臓には病理学的な変化はなく、腎炎惹起性は認められなかったが、得られた抗ペプチド抗体とウシ CD-TBM およびヒト CD-TBM との反応を blotting で観察したところ、抗ペプチド抗体はヒト抗 gp54 抗体と同様の反応であった (Fig. 5)。

6. mRNA についての検討

ウサギ腎から抽出した mRNA を分画濃縮し (Fig. 6, A), 各 mRNA から Reticulocyte Ly-

sate を用いて ^{35}S -Methionine ラベルの蛋白を合成し、モルモット抗 gp54 抗体との immunoprecipitation を施行した。その結果、fraction No. 11-15 の mRNA で合成された蛋白で 54 kD, 48 kD のバンドを認めた。このうち、最もバンドが明らかであった fraction No. 14 の mRNA での competition test では、54 kD, 48 kD とともに明らかなバンドの減弱を認めた (Fig. 6, B, lane a and b)。抗 TBM 型腎炎患者血清、抗ウシ gp54 抗体、ヒト抗 gp54 抗体、抗ペプチド抗体、抗 gp54 モノクローナル抗体と合成蛋白との immunoprecipitation で

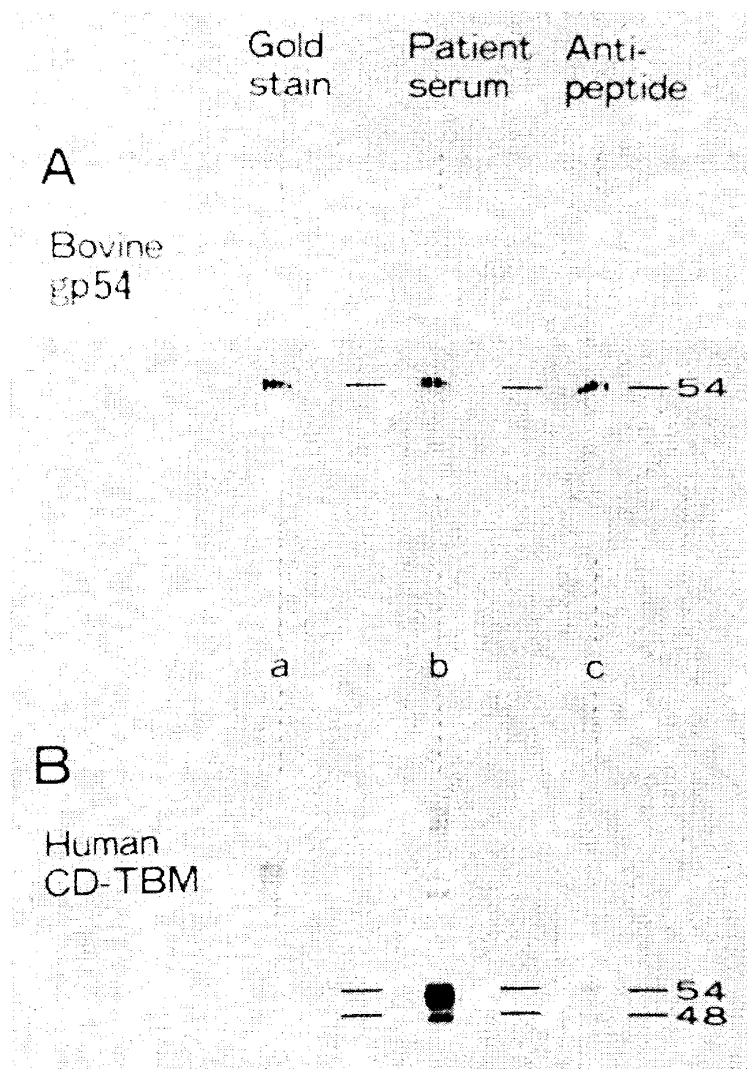


Fig. 5 4-20% gradient SDS-PAGE and immunoblot analysis of purified bovine gp54 and human CD-TBM with human anti-gp54 antibody (lane b) and anti-peptide serum (lane c). After electrophoresis under non-reducing conditions, the gels were used for blotting, followed by protein staining with gold (lane a) or immuno-blotted with antibodies (lane b and c).

Rabbit mRNA Fraction
(5~30% Sucrose Density Gradient Centrifugation)

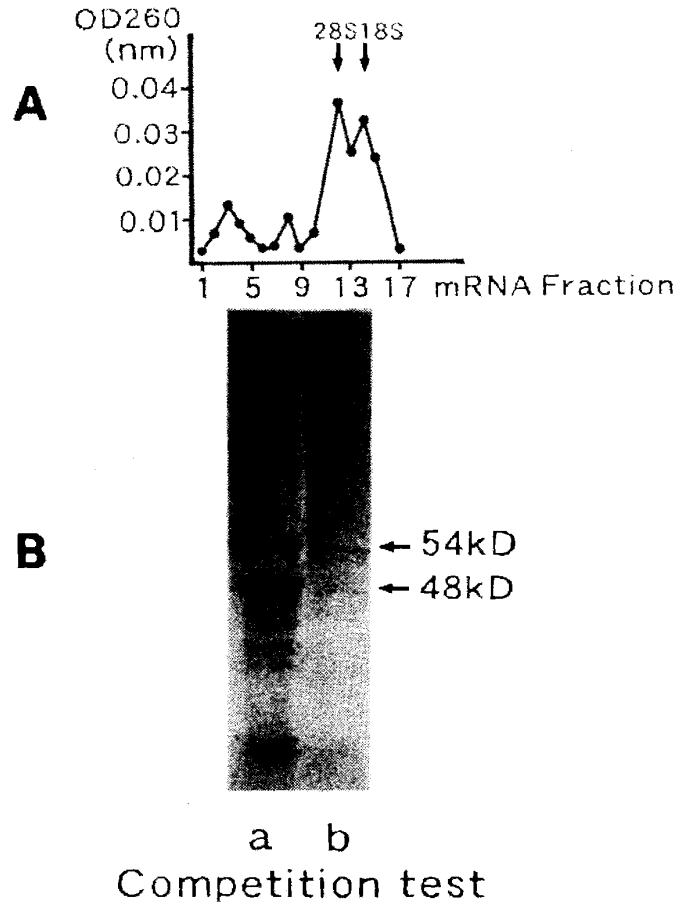


Fig. 6 A : Rabbit mRNA fractionated by 5-30% sucrose density gradient centrifugation. Arrows designate the fraction corresponding to 18S and 28S rRNA.
 B : Fluorography of immunoprecipitated proteins and competition test.
 Lane a : Protein products (54kD and 48kD) translated by mRNA from fraction No. 14, and immunoprecipitated with guinea pig anti-gp54 antibody (lane a).
 Lane b : 54 kD and 48kD proteins were inhibited by competition test using purified bovine gp54 (see Method).

は、いずれの抗体でも 54 kD, 48 kD のバンドを認めたが、それらよりも低分子のものや、高分子のものも観察された (Fig. 7).

7. dot blot hybridization

oligonucleotide プローブ (YY0325-1) と成人および胎児ヒト腎 cDNA ライブラリーより調製した DNA との間での dot blot hybridization で、成人および胎児ヒト腎 cDNA に明らかな hybridization シグナルを認めた。このプローブはコントロール DNA の 1 つである λ

DNA とも弱く反応したが、pBR322 とは反応しなかった (Fig. 8).

考 察

今回我々は、抗 TBM 型腎炎患者血清と反応する TBM 抗原をウシ腎組織から分離精製した。これまでの研究で、この TBM 抗原はヒト TBM 中では 54 kD, 48 kD の component であることが明らかになっていたが、ウシ CD-TBM 中では 54 kD が主な抗原蛋白であった。

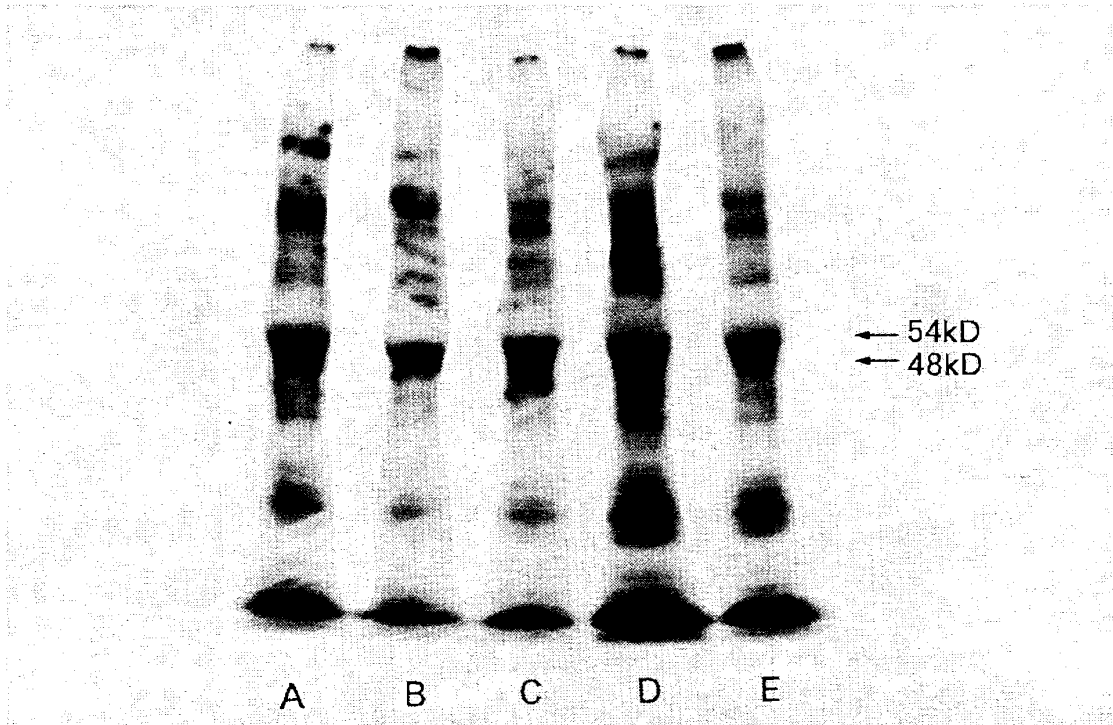


Fig. 7 Fluorography of protein products, immunoprecipitated with anti-gp54 antibodies. Radiolabeled proteins were translated from mRNA (fraction No. 14), and then immunoprecipitated with serum of patient with anti-TBM nephritis (lane A), guinea pig anti-bovine gp54 antibody (lane B), human anti-gp54 antibody (lane C), rabbit anti-peptide antibody (lane D), and mouse monoclonal anti-gp54 antibody (lane E). In addition to 54kD and 48kD components, high and low molecular weight components are also seen.

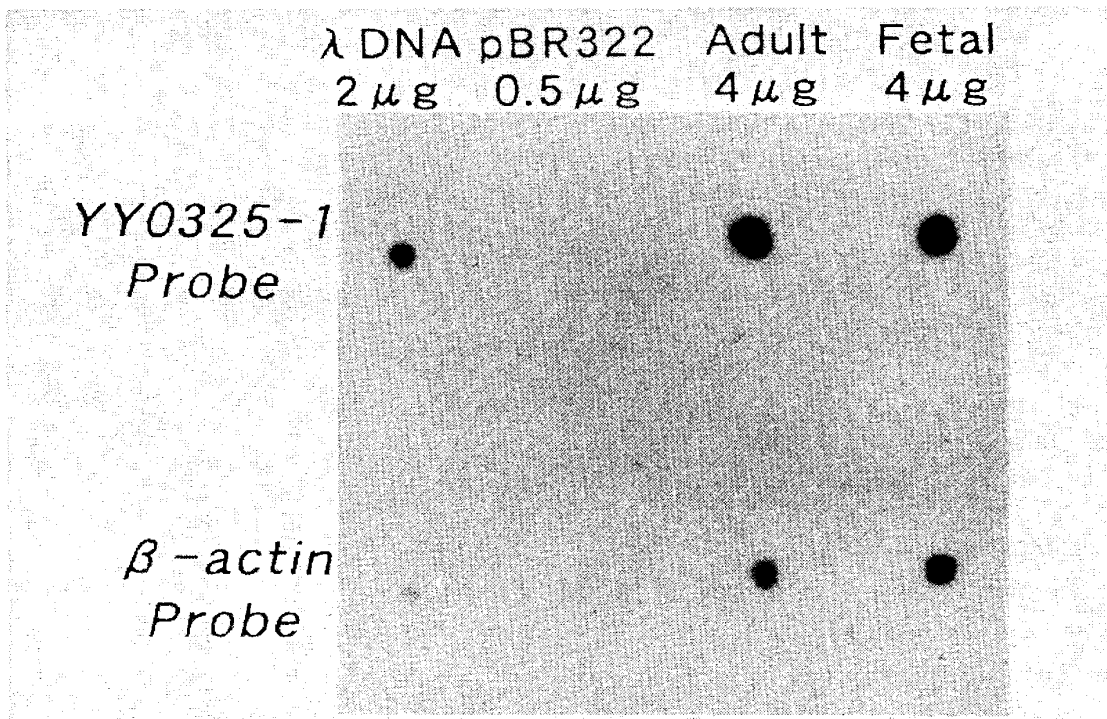


Fig. 8 Dot blot hybridization with oligonucleotide probe for gp54 (YY0325-1) and β -actin probe (control). Hybridization signals were intense for cDNA libraries made from adult and fetal kidneys, weak in λ DNA, and negative in pBR322.

精製したウシ gp54 の分析から、これは non-collagenous な糖蛋白であった。また、この抗原 (gp54) の間質性腎炎惹起性をモルモットで証明することができた。

これまでに、他の研究者たちも抗 TBM 型腎炎の責任抗原の分離精製を試みている。1978年に Graindorge & Mahieu²⁰ が、膜性腎症、抗糸球体基底膜型腎炎、ループス腎炎などの糸球体性疾患に伴った抗 TBM 型間質性腎炎の症例での責任抗原が 70 kD の糖蛋白であることを報告し、さらに、Clayman ら^{21,22} は、collagenase で可溶化したウサギおよびヒト TBM から、分子量 48 kD の糖蛋白をモノクロナール抗体を用いたカラムクロマトグラフィーで精製している。この物質を彼らは 3M-1 と呼んでいるが、3M-1 は我々が用いたのと同じ抗 TBM 型間質性腎炎患者血清と免疫沈降法で反応し、動物での間質性腎炎の惹起性も証明されているが、我々の gp54 とは異なり SDS-PAGE blotting では抗 TBM 抗体とは反応しない。一方、Butkowski ら^{23,24} は Clayman と我々が使用したのと同じヒト抗 TBM 抗体を用いて、ウサギ腎から guanidine 処理により標的抗原 (彼らは TIN 抗原と呼んでいる) を分離精製し、その特徴を報告している。彼らによると TIN 抗原の 90% が 58 kD からなり、残りの 10% は 50 kD から構成されており、58 kD と 50 kD は同一の N 末端アミノ酸 sequence を有し、よく似た peptide map を示す。すなわち、両者は同一蛋白に由来するものであろうと彼らは述べている。3M-1, TIN 抗原と我々の 54 kD, 48 kD の component は、その分離精製方法の違いと分子量に若干の差異があるが、いずれも non-collagenous なアミノ酸組成を示し、同一のヒト抗 TBM 抗体と反応することから、おそらくは同一ないしは極めて類似した物質であると推測される。Butkowski らの示したウサギの 58 kD と 50 kD は、我々がこれまでに報告したヒトの 54 kD と 48 kD に相当すると考えられる。しかし、今回我々が示したウシ gp54 のアミノ酸 sequence では、彼らの 58 kD, 50 kD

との間に homology を認めなかった。gp54 あるいは TIN 抗原から得られたアミノ酸 sequence はいずれも既知の物質との homology はなく、全く新しい基底膜蛋白と考えられる。

ヒト CD-TBM 中の 48 kD は blotting で抗 gp 54 抗体や抗ペプチド抗体と反応したことから、54 kD と 48 kD の component は同一の抗原性を示し、同一起源の物質と考えられた。わずかな蛋白構造の違いによって両者は分子量に差を有すると考えられた。過去の我々の研究で、粗精製したヒト 54 kD と 48 kD を還元状態で SDS-PAGE を行うと、54 kD バンドが減弱して 48 kD が増強する結果を得た。これにより、48 kD は 54 kD 中の一部分 (S-S 結合部分) が欠落したものと推測される。

mRNA を用いた今回の検討では、54 kD と 48 kD は mRNA レベルで別々に code されており、蛋白に翻訳された後の modification ではないことが明らかになった。これまでに述べた 3M-1, TIN 抗原のいずれもがその遺伝子レベルでの解析は進んでいない。今回我々は、ウサギとヒトの腎に gp54 を code する mRNA の存在を確認することができた。しかし、抗 gp54 抗体、および oligonucleotide を用いての cDNA ライブラリーのスクリーニングでは、これまで陽性クローンは得られておらず、今後の cDNA, ゲノム DNA の解析が期待される。

結 語

我々は、抗 TBM 抗体によって発症する間質性腎炎の責任抗原の研究において以下のような結果を得た。①ウシ TBM から抗尿細管基底膜型間質性腎炎の責任抗原物質 (gp54) を精製した。アミノ酸組成と N 末端 sequence から、この物質は non-collagenous な性状をもつ新しい基底膜蛋白であると考えられた。②ウシ gp54 をモルモットに皮下注射し、抗 TBM 型間質性腎炎の惹起性を組織学的に確認した。③ gp54 の N 末端から 17 個のアミノ酸に相当するペプチドを合成し、モルモットに皮下注射し

た。このペプチド部分には腎炎惹起性はなかったが、得られた抗ペプチド抗体は blotting で抗 gp54 抗体と同一反応を示した。④ウサギ腎 mRNA から合成された蛋白と抗 gp54 抗体との immunoprecipitation で、54 kD と 48 kD の蛋白が明らかになり、gp54 による competition test で 54 kD, 48 kD とも減弱し、両者は別々の mRNA に code され、かつ共通の抗原性をもつ物質と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました牧淳教授、篠原兵庫教授に深謝いたします。また、直接のご指導と助言を賜りました吉岡加寿夫講師、鈴木淳夫講師、ならびに各医局員に心から感謝申し上げます。

文 献

1. Biermer A: Ein ungewöhnlicher Fall von Scharlach. Virchows Arch Pathol Anat 1860; 19: 537.
2. Zollinger HU, Williams & Wilkins, Baltimore. The Kidney (ed. by Mostofi, F.P. & Smith, D. E.): interstitial nephritis. 1866: 269.
3. 小林 収. 小児腎臓病学 下巻. 東京: 金原出版, 1974: 1068.
4. Steblay RW, Rudofsky U. Renal tubular disease and autoantibodies against tubular basement membrane induced in guinea pigs. J Immunol 1971; 107: 589-94.
5. Lehman DH, Wilson CB, Dixon FJ. Interstitial nephritis in rats immunized with heterologous tubular basement membrane. Kidney Int 1974; 5: 187-85.
6. McCluskey RT. Immunologically mediated tubulo-interstitial nephritis. In: Contan RS, Brenner BM, Stein JH, eds. Tubulo-interstitial nephropathies. New York: Churchill Livingstone, 1983: 121-49.
7. Brentjenes JR, Matsuo S, Fukatsu A et al. Immunologic studies in two patients with antitubular basement membrane nephritis. Am J Med 1989; 86: 603-8.
8. Yoshioka K, Miyamoto Y, Iseki T, Maki S. Characterization of tubular basement membrane antigens in kidney. J Immunol 1986; 136: 1654-60.
9. 日野 聡, 吉岡加寿夫, 宮里裕典, 牧 淳, 松尾清一, 鈴木則彦. 間質性腎炎惹起抗原(gp54): 抗ペプチド抗体と単クローン抗体による検討. 第35回日本腎臓学会プログラム予稿集 1992: 387.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5.
11. Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate-polycrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein A. Anal Biochem 1981; 112: 195-203.
12. Szewczyk B, Summers D. Preparative elution of proteins blotted to Immobilon membranes. Anal Biochem 1988; 168: 48-53.
13. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem 1987; 262: 10035-8.
14. Robinson PA, Anderton BH, Loviny TLF. Nitrocellulose-bound antigen repeatedly used for the affinity purification of specific polyclonal antibodies for screening DNA expression libraries. J Immunol Methods 1988; 108: 115-22.
15. McPhall JJ, Dixon FJ. Characterization of human antiglomerular basement membrane antibodies eluted from glomerulonephritic kidneys. J Clin Invest 1970; 49: 308-17.
16. Yoshioka K, Michael AF, Velosa J, Fish AJ. Detection of hidden nephritogenic antigen determinants in human renal and nonrenal basement membranes. Am J Pathol 1985; 121: 156-65.
17. Yoshioka K, Takemura T, Tohda M, Akano N, Miyamoto H, Ooshima A, Maki S. Glomerular localization of type collagen III in human kidney disease. Kidney Int 1989; 35: 1203-11.
18. 村松正實. ラボマニュアル遺伝子工学増補版. 東京: 丸善株式会社, 1991: 86-7.
19. Timpl R, Bruckner P, Fietzer P. Characterization of pepsin fragments of basement membrane collagen obtained from a mouse tumor. Eur J Biochem 1979; 95: 255-263.
20. Granindorge PP, Mahieu PR. Radioimmunologic method for detection of anti-tubular basement membrane antibodies. Kidney Int 1978; 14: 594-606.
21. Clayman MD, Maetinez-Hernandez A, Michaud L, Alper R, Mann R, Kefalides NA, Neilson EG.

- Isolation and characterization of the nephritogenic antigen of anti-tubular basement membrane disease. *J Exp Med* 1985 ; 161 : 290-305.
22. Clayman MD, Michaud L, Brentjen J, Andres GA, Kefalides NK, Neilson EG. Isolation of the target antigen of human anti-tubular basement membrane antibody-associated interstitial nephritis. *J Clin Invest* 1986 ; 77 : 1143-7.
23. Butkowski RJ, Langeveld JPM, Wieslander J, Brentjens JR, Andres GA. Characterization of a tubular basement membrane component reactive with autoantibodies associated with tubulointerstitial nephritis. *J Biol Chem* 1990;266: 21091-8.
24. Butkowski RJ, Klepple MM, Katz A, Michael AF, Fish AJ. Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen and evidence for multiple forms. *Kidney Int* 1991 ; 40 : 838-46.