

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3947551号  
(P3947551)

(45) 発行日 平成19年7月25日(2007.7.25)

(24) 登録日 平成19年4月20日(2007.4.20)

(51) Int. Cl.	F I
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 D
	GO 1 N 33/543 5 4 5 H

請求項の数 2 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2006-34688 (P2006-34688)</p> <p>(22) 出願日 平成18年2月13日(2006.2.13)</p> <p>(62) 分割の表示 特願平7-347939の分割 原出願日 平成7年12月14日(1995.12.14)</p> <p>(65) 公開番号 特開2006-145556 (P2006-145556A)</p> <p>(43) 公開日 平成18年6月8日(2006.6.8) 審査請求日 平成18年2月27日(2006.2.27)</p>	<p>(73) 特許権者 000228545 日本ケミカルリサーチ株式会社 兵庫県芦屋市春日町3番19号</p> <p>(74) 代理人 100062498 弁理士 竹内 卓</p> <p>(72) 発明者 小林 秀行 兵庫県神戸市東灘区御影中町2-8-15 ストウディオ御影</p> <p>(72) 発明者 小紫 嘉一 兵庫県三木市福井2084-9</p> <p>(72) 発明者 洪 卿秀 兵庫県神戸市灘区中原通3-5</p> <p>(72) 発明者 西室 悟司 兵庫県神戸市東灘区住吉本町3-10-2 6-103</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 タム-ホースフォール・グリコプロテインとウロモジュリンの識別法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

タム-ホースフォール・グリコプロテインであるかウロモジュリンであるか識別されない試料にヒトの免疫グロブリンのクラスIgMまたはIgGのサブクラスIgG3を作用させ、その作用量を酵素標識-プロテインGで測定するか、または直接酵素標識したIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片を作用させ、その作用量を測定をすることを特徴とするタム-ホースフォール・グリコプロテインとウロモジュリンを識別する方法。

【請求項2】

試料が人尿を低温放置又は凍結したのち融解して生成する沈澱分画もしくは人尿に安息香酸ナトリウムもしくはアンモニウムを溶解したのち溶液を安息香酸の析出する酸性にして生成する沈澱分画の精製物である請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はヒト尿由来のタム-ホースフォール・グリコプロテイン(Tamm-Horsfall Glycoprotein)(以後THGと略称する)およびウロモジュリン(Uromodulin)の精製物について免疫グロブリンを用いる両蛋白の識別法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

THGは当初、ウリナリ・ムコプロテイン(urinary mucoprotein)として発見され(Morner KAH, 1895 Skand. Arch. Physiol. 6:332)、ウイルスによる赤血球凝集反応を尿中で阻害する因子であると報告された(Tamm I and Horsfall FL, 1950 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74:108)。具体的な精製法としては、尿を集め、4 で一晚保存した後上清を一部廃棄し、その残部に0.58MになるようにNaClを加え攪拌する。その後遠心分離し沈澱を集め、水で溶かし再び遠心しその上清を集めて凍結乾燥したものがTHGであるとされている。以後多くの研究者によってTHGは部分的改良を施された様々な方法で精製されているが、基本的には上記の方法に沿って精製されている(Moonen P et al, 1988 FEBS Lett. 226:314、Toma G et al, 1994 Biochem. Biophys. Res. Commun. 200:275)。

#### 【0003】

一方、妊婦尿からTHGと同じアミノ酸配列を持つ糖タンパク質ウロモジュリン(Uromodulin)が精製された(Muchmore AV and Decker JM, 1985 Science 229:479)。ウロモジュリンは妊婦尿をレクチンカラム(Con A-Sepharose column)にかけた後、 $\alpha$ -メチルマンノースによって溶出した液を水に対し透析し凍結乾燥する。これをリン酸緩衝食塩水に再溶解しゲル濾過、等電点電気泳動によって再度分離し、限外濾過膜にて濃縮して精製される。当初、ウロモジュリンの糖鎖部位には多くの機能がありIL-1, IL-2, 腸瘍壊死因子(TNF)などのサイトカインの特異的なリガンドとされてきた(Hession C et al, 1987 Science 237:1497、Sherblom AP et al, 1989 J. Immunol. 143:939、Brown KM et al, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:9119、Winkelstein A et al, 1990 Immunopharmacology 20:201)。しかし最近では単に尿から塩析法によって精製されたものをTHG、妊婦尿を原料として塩析法によって精製されたものをウロモジュリンと呼んでいる。

#### 【0004】

THGには分子量の約30%の糖が含まれており、GluNa<sub>2</sub>Man(5-7)(GluNa:N-アセチルグルコサミン、Man:マンノース)で示されるマンノースを豊富に含む糖鎖構造を有している。そしてMan<sub>5</sub>, Man<sub>6</sub>の糖鎖残基がIL-1やIL-2、腫瘍壊死因子(TNF)を含むサイトカインと特異的に結合していることが判明している。これらのことはTHGが免疫調節機構に関与している可能性を示唆しているが、アミノ酸配列が同一であるウロモジュリンのほうが免疫抑制作用が10倍以上高いとされている。また、最近羊由来のTHGが羊IgGと結合し、ヒト由来THGも同様にヒトIgGと結合することが報告されている(Rhodes DCJ et al, 1993 Kidney Int. 44:1014)。したがって、THGはサイトカインを介した免疫調節機構以外にも、細尿管内での新しい免疫制御または免疫防衛に重要な役割をしているものと考えられる。しかし、現在THGとウロモジュリンの識別を正確に把握し、定量する方法は確立されていない。

【非特許文献1】Morner KAH, 1895 Skand. Arch. Physiol. 6:332

【非特許文献2】Tamm I and Horsfall FL, 1950 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74:108

【非特許文献3】Moonen P et al, 1988 FEBS Lett. 226:314、Toma G et al, 1994 Biochem. Biophys. Res. Commun. 200:275

【非特許文献4】Muchmore AV and Decker JM, 1985 Science 229:479

【非特許文献5】Hession C et al, 1987 Science 237:14

10

20

30

40

50

97、Sherblom AP et al, 1989 J. Immunol. 143: 93  
 9、Brown KM et al, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9119、Winkelstein A et al, 1990 Immunopharmacology 20: 201

【非特許文献6】Rhodes DC J et al, 1993 Kidney Int. 44: 1014

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

THG及びウロモジュリンの精製を行うに当たり多くの研究者は上記の塩析法を用いている。しかしこの方法では目的タンパク質は勿論のこと、それ以外にも多くの不純物を巻き込んで沈澱させる恐れがあり、後の精製過程において不純物を除く過程を多く取り入れなければならない。この問題点を克服するためにはもっと穏やかな方法でタンパク沈澱を得る必要がある。また、THG及びウロモジュリンは金属イオン( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ など)がその溶液中に存在すると容易にゲル化するため、凍結乾燥したTHGを生理的食塩水で溶解するのは容易ではない。このため、THGの精製過程において、凍結乾燥の過程を取り入れずに初めから生理的条件下において精製することが望ましい。更に、THGとウロモジュリンが正確に測定でき、その定量法が確立されれば、その生理的および臨床的意義がより有効に解明されるものと考えられる。

10

【課題を解決するための手段】

20

【0006】

本発明者らは一般尿、妊婦尿に関わらず尿を一度凍結し解凍したときに多くの沈澱物が生じており、その沈澱に多量のTHGが含まれていることを見だし、塩析法を用いずに凍結融解の1過程において、多量のTHGを沈澱させることに成功した。また、塩析法とは違って急激に沈澱を生じさせる方法ではないため不純物を巻き込みにくいという利点も持っていた。次に、多くの精製過程を簡素化した結果、高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLCと略称する)を用いてゲル濾過を行えば、効率よく不純物(主に色素)を取り除くことができ、また、集めたフラクションは凍結乾燥することなく、たとえば孔径約0.2 $\mu\text{m}$ のフィルターを通すことにより、4で保存できることを知った。ウロモジュリンは妊婦尿から上記の凍結融解沈澱法以外にも安息香酸沈澱法で精製できる方法を確立した。更に、精製THGはヒト免疫グロブリンのクラス(IgG、IgA、IgM)とIgGのサブクラスの全て(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、およびIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片と結合する。しかしウロモジュリンはヒト免疫グロブリンのクラス(IgG、IgA)およびIgGのサブクラス(IgG1、IgG2、IgG4)と結合するがIgM、IgGのサブクラスであるIgG3およびIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片とは結合しにくいことを見いだした。

30

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、THGおよびウロモジュリンの精製物の特性を利用して両者を識別することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明はこれらの新知見を基礎としてさらに発展させたもので、人尿を凍結したのち融解して生成する沈澱分画や人尿に安息香酸ナトリウムもしくはアンモニウムを溶解したのち溶液を安息香酸の析出する酸性にして生成する沈澱分画のような特定の性質を有するTHGもしくはウロモジュリンの精製物、およびそれらを含む試料にヒトIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片等のウロモジュリンが結合しにくい免疫グロブリンを作用させ、その作用量を測定することを特徴とするTHGとウロモジュリンを識別する方法に関する。

【0009】

人尿の凍結、融解は通常の方法で行うことができ、融解液中に生成している沈澱分画を

50

採取する。安息香酸ナトリウムもしくはアンモニウムは尿に約2% (W/V) 加えれば充分である。その溶液に、たとえば塩酸を加えてpH 3~4の酸性にすれば安息香酸は析出し、所望の糖タンパクを吸着して沈澱する。この沈澱分画にエタノールを添加、攪拌することにより沈澱中の安息香酸は溶解し除去した沈澱分画が得られる。

【0010】

上記で得られる沈澱分画を、たとえばリン酸緩衝食塩水に溶解してゲル濾過すれば色素などを含む不純物を除去してさらに精製することができる。

【0011】

かくして得られる精製物が精製THGの場合にはヒトの免疫グロブリンのクラスであるIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片、IgA(モノマー)とIgMおよびIgGのサブクラスであるIgG1、IgG2、IgG3とIgG4のすべてと結合する特性を有し、精製ウロモジュリンの場合は、ヒトの免疫グロブリンのクラスであるIgGとIgA(モノマー)およびIgGのサブクラスであるIgG1、IgG2とIgG4と結合するが、ヒトの免疫グロブリンのクラスであるIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片、IgM、およびIgGのサブクラスであるIgG3とは結合しにくい特性を有する。

10

【0012】

それで精製物を公知の手段によってそれぞれ固定化しておき、これにヒト免疫グロブリンのクラスIgMまたはIgGのサブクラスIgG3を作用させ、その作用量を酵素標識-プロテインGで測定するか、または直接酵素標識したIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片を作用させ、その作用量を測定することによりTHGとウロモジュリンを識別することができる。

20

【0013】

エンドトキシンショックや敗血症等炎症に関係するサイトカインIL-1やTNFによって引き起こされていると考えられており、ヒト尿由来のTHGまたはウロモジュリンはサイトカインIL-1に阻害作用があるからこれらの病気にたいする治療薬として有効であり、また、THGまたはウロモジュリンは免疫グロブリンと反応するから感染抵抗性増強作用も保持すると考えられる。更に、免疫グロブリンを用いたTHGとウロモジュリン識別法が確立されたので、これら蛋白の生理的および臨床的意義を開明するために有用である。

【0014】

以下に、参考例及び実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の参考例及び実施例に限定されるものではない。

30

【0015】

参考例1

健常人尿を集め-20にて凍結させた後4にて再解凍させることにより沈澱を得た。これを3,000×g、30min遠心分離し上清を捨て、沈澱をリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解させ同緩衝液で透析をした。この後遠心分離を行いその上清をアミコンにて濃縮し、HPLCを用い、移動相をPBSの条件でゲル濾過(TSK-3000SW:東ソー社)を行った(図1)。ボイド・ボリューム(void volume)に溶出されるフラクションをSDS-PAGEにかけTHGの分子量と純度を確認した(図2)。妊婦尿(妊娠2ヶ月半~6ヶ月)を用いた場合でも上記の方法でウロモジュリンを精製出来た。

40

【0016】

参考例2

妊婦尿(妊娠2ヶ月半~6ヶ月)に尿量の2%の安息香酸ナトリウムを添加し30分攪拌し溶解させた。その後16%塩酸にて溶液のpHを3.9に合わせ60分攪拌しタンパク質の沈澱を安息香酸の微粒子沈澱に効率よく吸着させた。これを濾過し、沈澱を集め沈澱の20倍量の安息香酸飽和冷水(0.3%(w/v))で洗浄した。これを圧搾濾過し沈澱を得た。沈澱の3倍量の冷エタノールを添加し22%アンモニア水でpHを5.5に合わせた後30分攪拌した。これを4で3時間放置し上清の2/3を廃棄した。残りの

50

沈澱液をセライトプレコート〔GEMLITE Super M (商標) 白山工業 (株) 製〕中に添加し濾過した。沈澱物を回収し、 $-30^{\circ}\text{C}$ にて保存した。このwet cakeを溶解し、PBSに対し透析をし、 $15,000\text{rpm}$ 、10分間遠心分離した後、HPLCを用いて移動相をPBSの条件でゲル濾過(TSK3000-SW:東ソー)を行った(図3)。ボイド・ボリューム(void volume)に溶出されるフラクションをSDS-PAGEにかけ分子量と純度を確認した(図4)。ウロモジュリンが主に含まれるフラクションを集め、 $0.22\mu\text{m}$ のフィルターを通して $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。健常人尿を用いた場合でも上記の方法でTHGを精製出来た。

#### 【実施例1】

##### 【0017】

参考例1および2で得られた精製THGまたはウロモジュリンを $50\text{mM}$ 炭酸ナトリウム緩衝液(以下、SCB:シグマ社)( $\text{pH}9.6$ )で希釈し、96穴プレート(ヌンク社)の各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ分注して $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。プレートをSCBで洗った後、 $1\%$ BSA-SCB溶液 $300\mu\text{l}$ を各穴に加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。これを $20\text{mM}$ Tris buffered saline +  $0.05\%$  Tween 20 (以下、TTBS)( $\text{pH}7.4$ )で洗い、 $1\%$ BSA-TTBSで $3\text{mg/ml}$ から2倍の段階希釈をしたヒトIgG(カッセル社)を $50\mu\text{l}$ ずつ加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置し反応させた。これをTTBSで洗った後、ペルオキシダーゼ標識EIA grade Protein G(バイオラッド社)を $1\%$ BSA-TTBSで $3000$ 倍に希釈したものを各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ加え $37^{\circ}\text{C}$ で2時間反応させた。これをTTBSで洗った後SCBですすぎ、TMBパーオキシダーゼEIAサブメトレート・キット(TMB Peroxidase EIA Substrate Kit; バイオラッド社)にて発色させ、プレートリーダーによって $450\text{nm}$ の吸光度を計測した。図5a)に示したように、THGとウロモジュリンはヒト免疫グロブリンIgGに対して用量依存的に反応するという結果を得た。

#### 【実施例2】

##### 【0018】

参考例1および2で得られた精製THGまたはウロモジュリンをMSCBで希釈し、96穴プレートの各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ分注して $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。プレートをSCBで洗った後、 $1\%$ BSA-SCB溶液 $300\mu\text{l}$ を各穴に加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。これをTTBSで洗い、 $1\%$ BSA-TTBSで $3\text{mg/ml}$ から2倍の段階希釈をしたペルオキシダーゼ標識ヒトIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片(ロックランド社)を $50\mu\text{l}$ ずつ加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置し反応させた。これをTTBSで洗った後SCBですすぎ、TMB peroxidase EIA Substrate Kitにて反応させ、プレートリーダーによつて $450\text{nm}$ の吸光度を計測した。図5b)に示したように、THGはヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>断片に対して用量依存的に反応するがウロモジュリンは反応しにくいという結果を得た。

#### 【実施例3】

##### 【0019】

人尿または妊婦尿を試料として $50\text{mM}$ SCBで希釈し、96穴プレートの各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ分注して $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。プレートをSCBで洗った後、 $1\%$ BSA-SCB溶液 $300\mu\text{l}$ を各穴に加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。これを $20\text{mM}$ TTBSで洗い、 $1\%$ BSA-TTBSで $3\text{mg/ml}$ から2倍の段階希釈をしたヒトIgGを $50\mu\text{l}$ ずつ加え $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置し反応させた。これをTTBSで洗った後、ペルオキシダーゼ標識EIA grade Protein Gを $1\%$ BSA-TTBSで $3000$ 倍に希釈したものを各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ加え $37^{\circ}\text{C}$ で2時間反応させた。これをTTBSで洗った後SCBですすぎ、TMB peroxidase EIA Substrate Kitにて発色させ、プレートリーダーによって $450\text{nm}$ の吸光度を測定したところ実施例1と同様の結果を得た。

#### 【実施例4】

##### 【0020】

10

20

30

40

50

人尿または妊婦尿を試料として50 mM SCBで希釈し、96穴プレートの各穴に50  $\mu$ lずつ分注して4℃で一晩静置した。プレートをSCBで洗った後、1% BSA - SCB溶液300  $\mu$ lを各穴に加え4℃で一晩静置した。これを20 mM TTBSで洗い、1% BSA - TTBSで3 mg/mlから2倍の段階希釈をしたペルオキシダーゼ標識ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>断片50  $\mu$ lずつ加え4℃で一晩静置し反応させた。これをTTBSで洗った後SCBですすぎ、TMB peroxidase EIA Substrate Kitにて発色させ、プレートリーダーによって450 nmの吸光度を計測してところ実施例2と同様の結果を得た。

【図面の簡単な説明】

【0021】

10

【図1】参考例1において、人尿を凍結、融解法により精製した試料をゲル濾過したときの溶出パターンである。

【図2】参考例1で精製されたタムーホースフォール・グリコプロテイン (THG) の還元および非還元条件下におけるSDS-PAGEの電気泳動写真である。

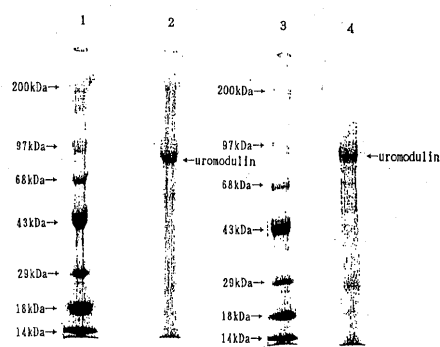
【図3】参考例2において、妊婦尿を安息香酸吸着沈殿法で精製した試料をゲル濾過したときの溶出パターンである。

【図4】参考例2で精製されたウロモジュリンの還元および非還元下におけるSDS-PAGEの電気泳動写真である。

【図5】実施例1および2において、マイクロプレート上に固定化したTHGおよびウロモジュリンにひと免疫グロブリンまたはIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片との反応を示すグラフである。a, b共に はTHGを示し、 はウロモジュリンを示す。本図によりTHGとウロモジュリンはヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>断片との親和性により識別が可能であることが示されている。

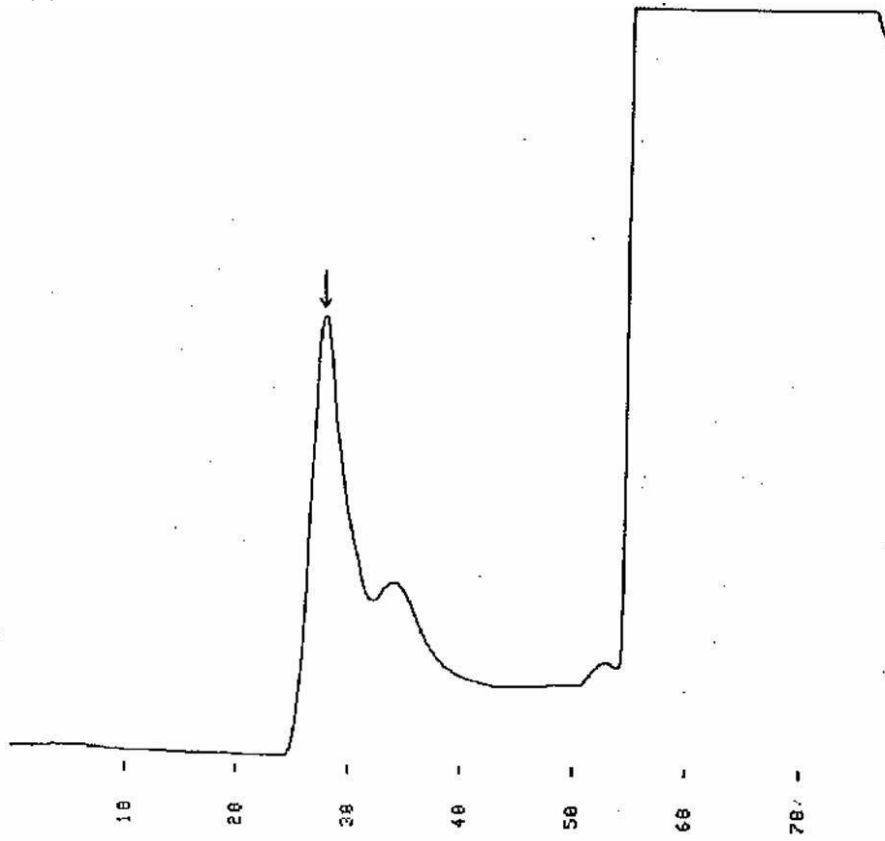
20

【図4】



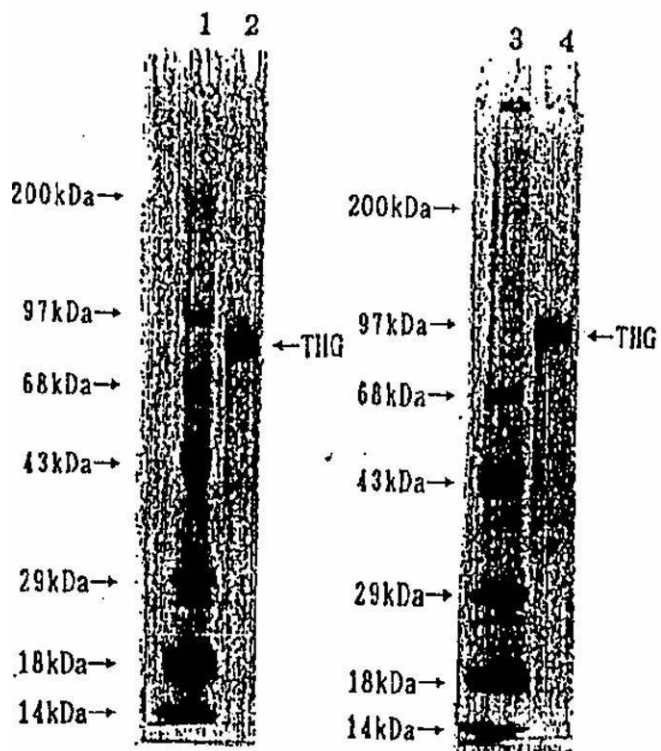
uromodulin画分を非還元条件 (lane 1,2) と還元条件 (lane 3,4) でSDS-PAGEした泳動パターン。  
lane 1,3 : M.W. Marker  
lane 2,4 : uromodulin sample

【 図 1 】



HPLCを用いて男子尿由来サンプルを  
ゲルろ過したときの溶出パターン。  
矢白しはTHG画分を示している。

【 図 2 】

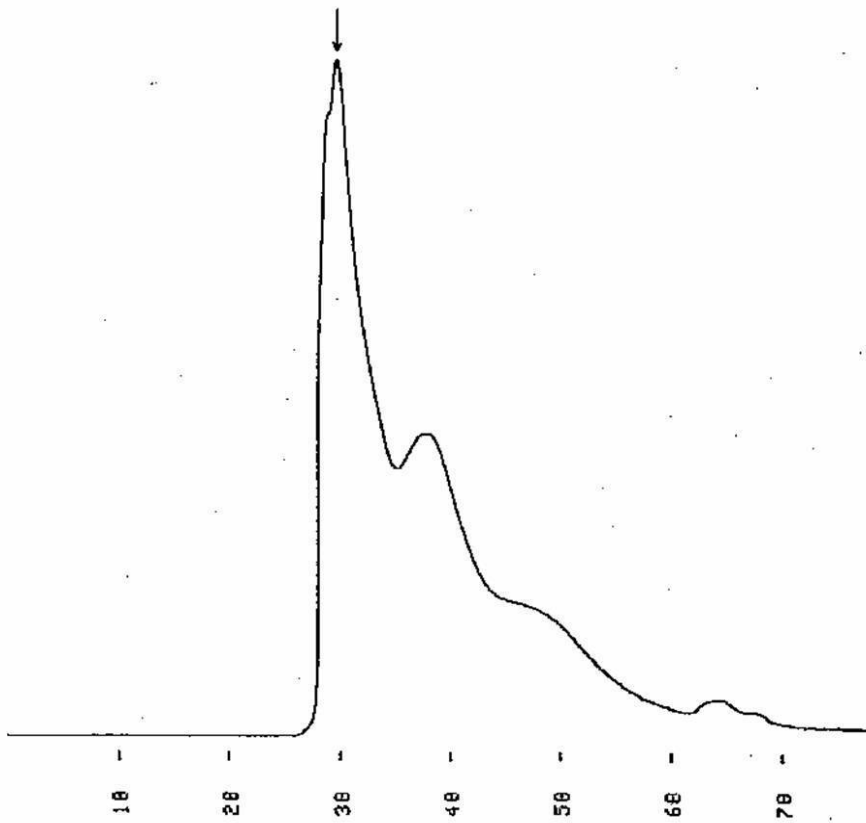


THG画分を非還元条件 (lane 1, 2) と還元条件 (lane 3, 4) でSDS-PAGEした泳動パターン。

lane 1, 3 : M.W. Marker

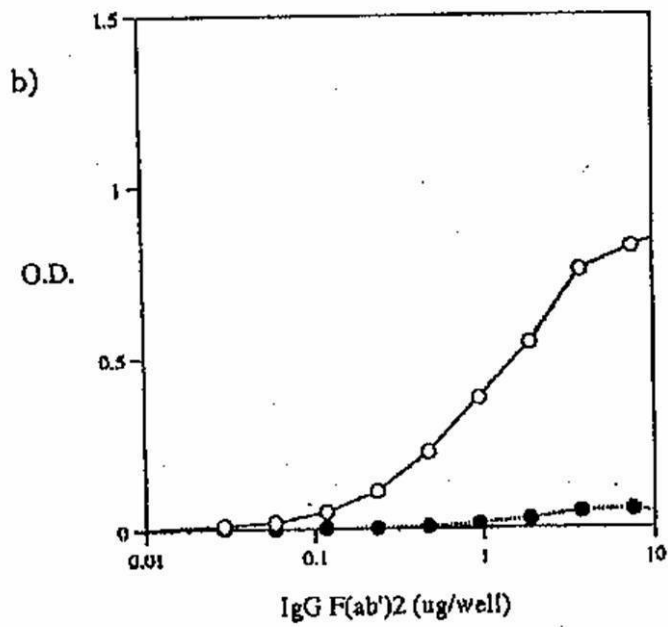
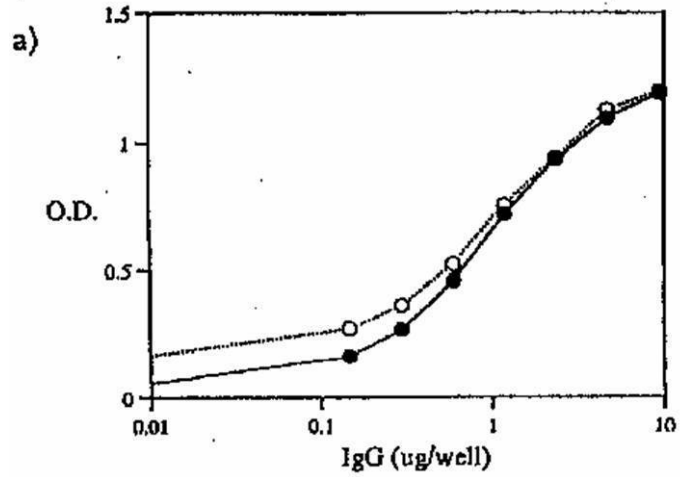
lane 2, 4 : THG. sample

【 図 3 】



HPLCを用いて妊婦尿由来サンプルを  
ゲルろ過したときの溶出パターン。  
矢印はuromodulin画分を示している。

【 図 5 】



a) THGとuromodulinのhuman IgG に対する親和性。  
 b) THGとuromodulinのhuman IgG F(ab')<sub>2</sub> に対する親和性。  
 共に○はTHGを示し、●はuromodulinを示している。

---

フロントページの続き

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特表平 5 - 5 0 5 1 9 1 ( J P , A )

バイオサイエンスとインダストリー, 日本, 1 9 8 9 年, vol.47, p.44-47

American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology, 1 9 8 8 年, vol.17, p.134  
-140

Kidney international, 1 9 9 3 年, vol.44, p.1014-1021

Biochem.J., 1 9 8 5 年, vol.227, p.957-963

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3

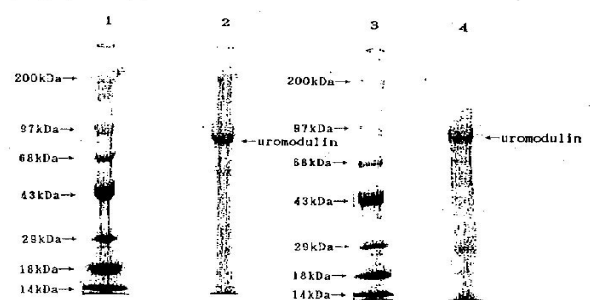
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3

专利名称(译)	如何区分tom - hosefall-糖蛋白和尿调节素		
公开(公告)号	<a href="#">JP3947551B2</a>	公开(公告)日	2007-07-25
申请号	JP2006034688	申请日	2006-02-13
申请(专利权)人(译)	日本化学研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	日本化学研究有限公司		
[标]发明人	小林秀行 小紫嘉一 洪卿秀 西室悟司		
发明人	小林 秀行 小紫 嘉一 洪 卿秀 西室 悟司		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.D G01N33/543.545.H		
代理人(译)	竹内大洁		
审查员(译)	宫泽浩		
其他公开文献	JP2006145556A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种区分tom-horsfol糖蛋白 ( THG ) 和尿调节素的方法。 解决方案：tom-horsfol糖蛋白 ( THG ) 或尿调节素的纯化产物显示出与人免疫球蛋白类和亚类相互不同的结合特性，以及利用其结合特性区分它们的方法。 工业实用性根据本发明，可以使用tom-horsfol糖蛋白 ( THG ) 和尿调节素的纯化产物的特征来区分它们。

【 図 4 】



uromodulin画分を非還元条件 (lane 1,2) と還元条件 (lane 3,4) でSDS-PAGEした泳動パターン。  
lane 1,3 : M.W.Marker  
lane 2,4 : uromodulin sample