

原 著

ヒト SMP30 (senescence marker protein-30) の  
組換え蛋白とその発現

東京女子医科大学 第四内科学教室 (主任: 二瓶 宏教授)

ナル サワ キミ エ  
成 澤 公 恵

(受付 平成6年11月15日)

## Preparation of Human Recombinant Senescence Marker Protein-30 and Its Expression

Kimie NARUSAWA

Department of Medicine (Director: Prof. Hiroshi NIHEI), Kidney Center,  
Tokyo Women's Medical College

Senescence marker protein-30 (SMP30) was detected and isolated as a novel rat protein, whose concentration decreases androgen-independently with age. Its molecular mass is 30 kDa, and its *pI* value is 4.9. Using pET22b vector inserted with human SMP30 cDNA (pHSMP6) fragment, we prepared recombinant protein in *E. coli*. This protein had a molecular weight of 24 kDa estimated by SDS-PAGE. We confirmed the antigenicity of this recombinant protein by Western hybridization using anti-rat SMP30 antibody, and prepared rabbit anti-recombinant human SMP30 antibody. This antibody was allowed to react with solubilized SMP30 protein extracted from human liver and kidney tissue. Immunohistochemical staining for SMP30 protein, in the liver was positive in hepatic sinusoids. In the kidney, immunoreactivity to SMP30 was marked in the distal tubular epithelium. The antibody specificity of anti-recombinant human SMP30 antibody was different from that of anti-native rat SMP30. The antibody prepared to recombinant human SMP30 is useful for Western hybridization.

## 緒 言

SMP30 (senescence marker protein-30) は、電気泳動法によりラットの肝臓の可溶性分画に発見された分子量30kDa, *pI*4.9の蛋白である<sup>1)</sup>。この蛋白の発現量は、アンドロジェン非依存性で加齢に伴い減少する。その発現部位は検索した限りでは、肝臓の実質細胞と腎臓の近位尿管上皮細胞の細胞質内であり、他の臓器や血液中には検出できなかった。Fujitaらは、ラット肝臓から精製したSMP30の部分的アミノ酸配列を基に、オリゴDNAプライマーを作製しPCR法によりそのcDNAを得た。さらにそのcDNAをプローブに用い、1,588bpの完全長のcDNAを得た。次にその得られたcDNA ( $\lambda$ SMP8)の塩基配列を決定し

た<sup>2)</sup>。その結果、推定されたSMP30蛋白は299個のアミノ酸よりなり、既知の蛋白とのホモロジーはなく、新しく発見された蛋白質であることがわかった。構造上の特徴としては、3'非翻訳領域にmRNA崩壊シグナルと考えられているATTTA配列を三つ持ち、蛋白質の崩壊シグナルといわれているREST配列の中等度 (REST scor, -2.5)のもの一つと、非常に弱いもの四つを持っていた。これらのシグナルを持つ蛋白質は短命で、迅速で厳密な発現制御を受けていると考えられていることから、SMP30もそれ自身の迅速な濃度変化を反映することによって細胞内機構の制御に関与していることが推定される。さらに、SMP30にはN末端およびC末端にそれぞれ五つずつシステイン

残基が存在しており、SMP30は一本鎖ペプチドであることから、それらのシステイン残基は分子内S-S結合に関わり、その生理機能上での高次構造の変化に関与していることが考えられた。また、Southern hybridization法により、イースト菌を除くサル、マウス、イヌ、ウシ、ニワトリなどの高等動物のゲノミックDNA中にSMP30遺伝子の存在が確認され、遺伝的に保存されていることがわかった。その後、Fujitaらは、ラットSMP30 cDNAをプローブとしてヒトのSMP30 cDNAのクローニングを行いその塩基配列を決定した。推定されたアミノ酸配列のヒトとラットSMP30間の類似性は89%であり、非常に良く保存されていることが明らかとなった(Fujita et al 投稿中)。また、ヒト肝臓および腎臓のNorthern hybridization法においてもラット肝臓と同様に強い発現が認められ、前述の結果と考え合わせると、SMP30は高い相同性を持って高等動物に広く存在していることが予想され、その生物における機能の重要性が強く示唆された。

発見当初、SMP30の機能は不明であったが、最近、Yamaguchiらによってラットの肝臓から発見されたカルシウム結合蛋白であるレギュカルチン(regucalcin)のcDNAがSMP30と一致し同一の蛋白質であることが明らかとなった<sup>3)</sup>。肝細胞内においてレギュカルチンはCa<sup>2+</sup>による酵素活性化を制御しており、レギュカルチンによる肝細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナリングの制御機構も存在していると報告している<sup>4)</sup>。

一方、腎臓においても肝臓と同様に種々の細胞内情報伝達系が存在することが明らかになりつつあるが、それらの細胞機能調節に対しても、SMP30が重要な役割を担っていることが容易に考えられる。また、腎臓の尿細管は糸球体濾液から必要なイオン、水を再吸収し、不要なイオン、物質を分泌することにより生体の体液の恒常性を維持している。イオンの輸送に関しては、細胞膜に組み込まれたイオンチャンネルの数、チャンネルの活性化等により制御がなされているが、特にCa<sup>2+</sup>の動向に関しては、未だ解明されていない部分が多々ある。Yamaguchiらが、肝細胞に対して

カルシウムを投与することにより、SMP30の発現が増強することを報告していることから<sup>5)6)</sup>、SMP30は、腎臓の尿細管においてもカルシウムの代謝に関与していることが考えられる。さらに、regional mappingにより、SMP30遺伝子はX染色体上に存在していることが明らかにされ、SMP30欠損に伴う腎臓の伴性遺伝疾患の存在も予想されている(Fujita et al 投稿中)。

このような背景より、ヒトでのSMP30の機能や腎疾患での意義を解析する必要があると考えられる。今回ヒトSMP30 cDNA (pHSMP6)を用いて、組換え蛋白を作製した。その後この組換え蛋白に対するポリクローナル抗体を作製しヒトの肝臓、腎臓におけるSMP30の局在性を調べた。また、ラット肝臓より精製したSMP30に対する抗体と比較し、その抗原性についても検討した。

### 対象と方法

#### 1. DNA断片のベクターへの挿入

大腸菌内での組換え蛋白を誘導するために、ヒト肝臓cDNAライブラリーより得たヒトSMP30 cDNA (pHSMP6)を制限酵素 *Bam*HI, *Sac*I切断部位で切り出し、610bpのDNA断片(核酸番号414~1024)を得た。このDNA断片を、すでに *Bam*HI, *Sac*Iで処理した全長5,493bpの蛋白発現ベクターpET22b (Novagen, USA)へ挿入した。

#### 2. 組換え蛋白の誘導と精製

作製したプラスミドベクター (pET22BHSM-BS)を大腸菌株BL21 (DE3) pLysEに形質導入しIPTG(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside, Sigma Chemical Co.)を投与して組換え蛋白を誘導した<sup>7)</sup>。次に蛋白の発現が誘導された宿主細胞を50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2mM EDTAに調製した。このベクターは *pelB* signal sequenceを持つため、発現した蛋白はperiplasmic spaceに存在すると考えられるので、遠心した後、沈殿した大腸菌を超音波処理し、SMP30蛋白を可溶化した。

#### 3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

誘導した蛋白を確認するためにSDS(ラウリル硫酸ナトリウム)ポリアクリルアミドゲル電気泳

動 (SDS-PAGE) を行った<sup>9)</sup>。誘導した蛋白とサイズマーカー (BRL) を同時に泳動した。電気泳動後、一方は、Coomassie brilliant blue で染色し、脱色した。他方は Western hybridization 法を行うために、ニトロセルロース膜 (Immobilon-P 膜) に転写させた。

#### 4. Western hybridization 法<sup>9)</sup>

Western hybridization 法により組換えヒト SMP30 蛋白の発現の確認を行った。転写ニトロセルロース膜をブロッキング液 (5% スキムミルク) で処理し、1 次抗体溶液 (ウサギ抗ラット SMP30 抗体 40 $\mu$ l + ブロッキング液 4ml) と室温で 1 時間、37°C で 30 分間反応させた後、洗浄液 (0.05% Tween 20/PBS) で 3 回処理した。陰性対照としては、正常ウサギ血清を使用した。次に 2 次抗体溶液 (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギーブタ血清 40 $\mu$ l + ブロッキング液 4ml) と室温で 1 時間反応させ、洗浄液で 3 回処理した。最後に発色試薬溶液 (DAB (3-3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride) 2mg + 0.05M Tris) と 31% 過酸化水素溶液 2 $\mu$ l (最終濃度 0.02%) により発色させた。

#### 5. 組換え蛋白に対する抗体の作製

作製した組換え蛋白 SMP30 を含む蛋白溶液とフロイントの完全アジュヴァント (Miles Laboratories, Inc) を等量で混合して乳化し、家兎の皮下に注射した。2 週間後、同様に家兎に注射して追加免疫を行った。その 1 週間後に家兎より採血して血清を得た。採取した血清を BL21 (DE3) のアセトンパウダーで吸収操作を行い非特異的反応を除去した後、さらに、グロブリン分画に精製するために、33% 硫酸アンモニウムと混合し、10,000 $\times$ g で 10 分間遠心した。その沈殿物を回収し PBS で透析し、抗体として用いた。このようにして得た抗体の特異性を確認するために作製した組換え蛋白および、ヒト肝、腎臓組織から抽出した蛋白を使用して SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動と Western hybridization 法を行った。1 次抗体として、作製した抗ヒト SMP30 抗体を用い、2 次抗体としてはペルオキシダーゼ標識抗ウサギーブタ血清を用い、DAB を発色試薬として酵素抗体法を行った。組織からの蛋白の抽出は、

後述のごとく行った。Protease inhibitor を含んだ 9 倍量の 10mM Tris-HCl (pH 7.6) で組織片をホモジネートし、15,000 $\times$ g で 20 分間遠心し、その上清を蛋白試料として使用した。

#### 6. 免疫組織化学染色 (蛍光抗体法)

組織片はヒト正常肝、腎臓組織 (移植の際のドナーの肝臓、腎臓より生検した各 3 症例) の凍結切片を用いた。無蛍光スライドガラスに組織片を貼付し、その切片上に 1 次抗体として、作製した抗ヒト SMP30 抗体 (20 倍希釈)、または抗ラット SMP30 抗体 (20 倍希釈) を滴下する。1 時間反応させた後、PBS で洗浄した。次に 2 次抗体として FITC で標識した抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (ヘキスト) を用いた。同様に 1 時間反応させた後、PBS で洗浄し、封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

### 結 果

#### 1. 組換え蛋白の作製

cDNA クローン pHSM6 の全長は 1,356bp で、その蛋白翻訳領域を含めて *Bam*HI および *Sac*I 部位で切断した (610bp の) DNA 断片を組換え蛋白の作製に使用した。この DNA 断片の塩基配列とアミノ酸配列を図 1 に示した。この断片を *Bam*HI, *Sac*I で処理した pET22b に挿入しプラスミド DNA (pET22BHSMP-BS) を得た (図 2)。これはベクター自身が持つ open reading frame も含めて 221 個のアミノ酸を規定しており、その予想分子量は 24kDa であった。次に pET22 BHSMP-BS を大腸菌株 BL21 (DE3) pLysE に形質導入した。形質導入を確認の後、組換え蛋白の誘導を試みた。組換え蛋白の誘導の有無を SDS-PAGE により検討した (図 3)。形質導入を行い IPTG を投与した菌体から得た蛋白試料 (lane 3) では予想された分子量約 24kDa の明瞭なバンドが確認できた。このバンドは形質導入を行っていない菌体から得た蛋白試料 (lane 1) および形質導入はしたが IPTG 処理していない菌体から得た蛋白試料 (lane 2) ではわずかしら認められなかった。

#### 2. 組換え蛋白の抗原性の確認

次に、作製した組換え蛋白の抗原性の確認を

```

atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct gcc cag ccg gcg 60
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Glv Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala 20
  pelB leader
atg gcc atg gat atc gga att aat tct GAT CCG GCC GGG AGG TAC TTT GCT GGC ACC ATG 120
Met Ala Met Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro Ala Gly Arg Tyr Phe Ala Gly Thr Met 40

GCT GAG GAA ACA GCT CCA GCA GTT CTT GAG CGG CAC CAG GGG GCC CTG TAC TCC CTC TTT 180
Ala Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu Arg His Gln Gly Ala Leu Tyr Ser Leu Phe 60

CCT GAT CAC CAC GTG AAA AAG TAC TTT GAC CAG GTG GAC ATT TCC AAT GGT TTG GAT TGG 240
Pro Asp His His Val Lys Lys Tyr Phe Asp Gln Val Asp Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp 80

TCG CTA GAC CAC AAA ATC TTC TAT TAC ATT GAC AGC CTG TCC TAC TCC GTG GAT GCC TTT 300
Ser Leu Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Ser Val Asp Ala Phe 100

GAC TAT GAC CTG CAG ACA GGA CAG ATC TCC AAC CGC AGA AGT GTT TAC AAG CTA GAA AAG 360
Asp Tyr Asp Leu Gln Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Ser Val Tyr Lys Leu Glu Lys 120

GAA GAA CAA ATC CCA GAT GGA ATG TGT ATT GAT GCT GAG GGG AAG CTC TGG GTG GCC TGT 420
Glu Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile Asp Ala Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys 140

TAC AAT GGA GGA AGA GTG ATT CGT TTA GAT CCT GTG ACA GGG AAA AGA CTT CAA ACT GTG 480
Tyr Asn Gly Gly Arg Val Ile Arg Leu Asp Pro Val Thr Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val 160

AAG TTG CCT GTT GAT AAA ACA ACT TCA TGC TGC TTT GGA GGG AAG AAT TAC TCT GAA ATG 540
Lys Leu Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asn Tyr Ser Glu Met 180

TAT GTG ACC TGC GCC CGG GAT GGG ATG GAC CCC GAG GGT CTT TTG AGG CAA CCT GAA GCT 600
Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Met Asp Pro Glu Gly Leu Leu Arg Gln Pro Glu Ala 200

GGT GGA ATT TTC AAG ATA ACT GGT CTG GGG GTC AAA GGA ATT GCT CCC TAC TCC TAT GCG 660
Gly Gly Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala 220

GGA TGA GGACAGGTCT TCTTTCCTGC CAGAGGGAGC TC
                                     SacI
Gly ***
  
```

図1 ヒトSMP30 cDNA (pHSMP6) の塩基配列とアミノ酸配列 (部分)  
 塩基配列中、小文字 (nt 1~87) は pET22b 由来であり、31個のアミノ酸を規定する。  
 アミノ酸番号 2~21は pelB leader 配列である。pHSMP6由来の塩基配列は大文字で  
 表わされている (nt 88~663)。□ はそれぞれ BamHI 切断部位, SacI 切断部位。

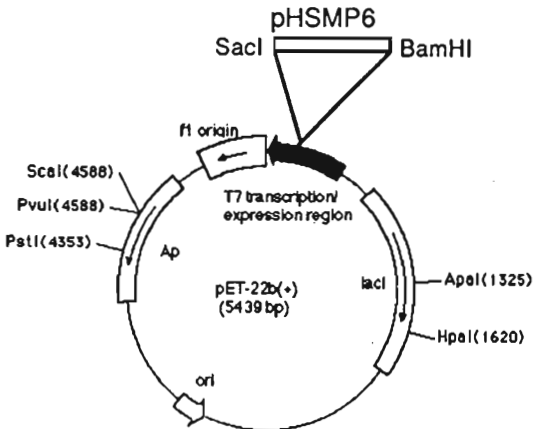


図2 BamHI, SacI 部位で切断した pHSMP6の DNA 断片を蛋白発現ベクター, pET22b に挿入して得たプラスミド DNA (pET22BHSMP-BS)  
 Ap: アンピシリン耐性遺伝子, lacI: lac repressor, Ori: プラスミドの複製開始点。

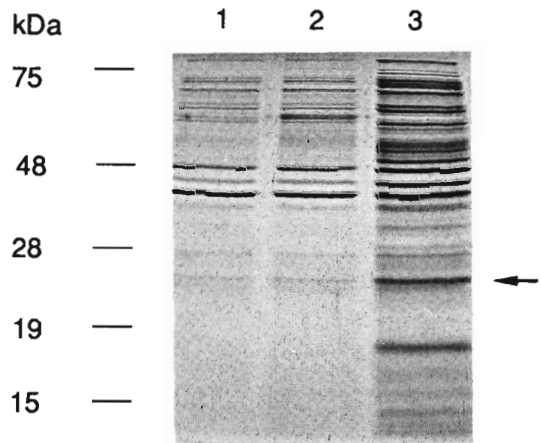


図3 SDS-PAGE (Coomassie brilliant blue 染色)  
 lane 1: 形質導入を行っていない菌体から得た蛋白試料, lane 2: 形質導入は行ったが IPTG 処理していない菌体から得た蛋白試料, lane 3: 形質導入, IPTG 処理を行った菌体から得た蛋白試料, 24kDa (←)。

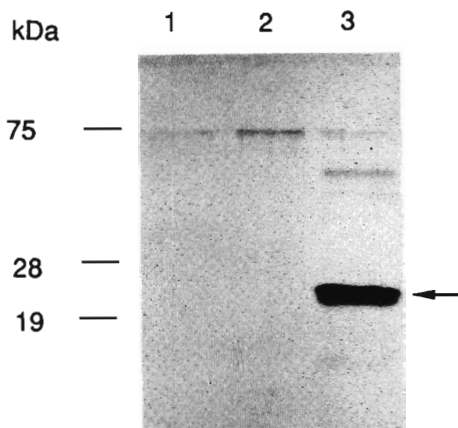


図4 Western hybridization法による組換えヒト SMP30蛋白の確認 (DAB 染色法)

1次抗体はウサギ抗ラット SMP30抗体, 2次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ウサギーブタ血清を用いた。lane 1: 形質導入を行っていない菌体から得た蛋白試料, lane 2: 形質導入は行ったが IPTG 処理していない菌体から得た蛋白試料, lane 3: 形質導入, IPTG 処理を行った菌体から得た蛋白試料, 24 kDa (←)。

行った。他にも, lane 1, 2に認められないが lane 3に認められたバンドがあることから, 組換え蛋白の発現の確認のため交差反応性を利用して Western hybridization を行い, 1次抗体として抗ウサギ抗ラット SMP30抗体血清を用いた (図4)。その結果, 形質導入を行い, さらに IPTG を投与した菌体から調製した蛋白試料 (lane 3) には SDS-PAGE で認められたバンドに相当する分子量 24 kDa の組換え蛋白が明瞭に確認された。この分子量に相当するバンドは形質導入を行っていない菌体 (lane 1) および形質導入は行ったが IPTG 処理していない菌体 (lane 2) から調製した蛋白には存在していなかった。分子量 75 kDa 付近には非特異的なバンドが認められるが, これは全ての lane で存在しており菌体蛋白と考えられる。この結果から, 分子量 24 kDa のバンドが, ヒト SMP30 の組換え蛋白であると考えられた。その他, 形質導入を行い, さらに IPTG を投与した菌体から調製した蛋白試料 (lane 3) にのみ分子量 48 kDa のバンドが認められるが, これはヒト SMP30 組換え蛋白のダイマーであると考えられた。なお, 1次抗

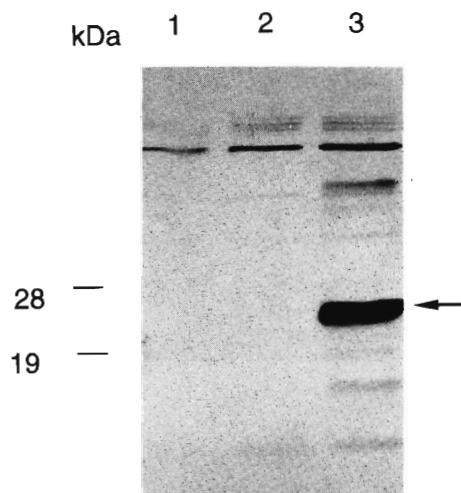


図5 Western hybridization法による抗組換えヒト SMP30抗体の特異性の検討 (DAB 染色法)

1次抗体は作製した抗ヒト SMP30抗体, 2次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ウサギーブタ血清を用いた。lane 1: 形質導入を行っていない菌体から得た蛋白試料, lane 2: 形質導入は行ったが IPTG 処理していない菌体から得た蛋白試料, lane 3: 形質導入, IPTG 処理を行った菌体から得た蛋白試料, 24 kDa (←)。

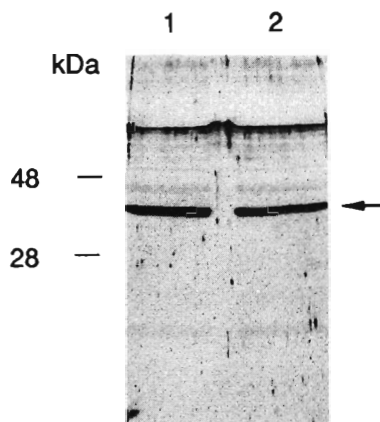
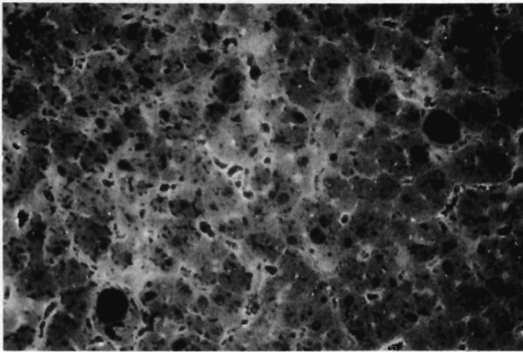


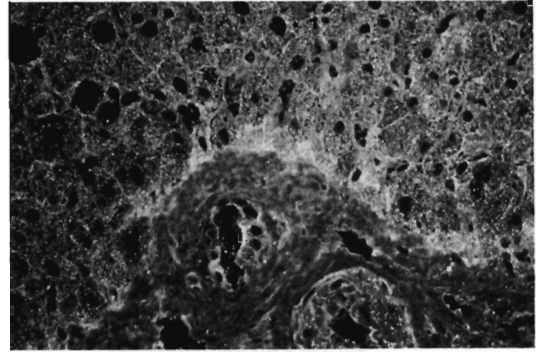
図6 ヒト組織から可溶化した SMP30 に対する抗組換えヒト SMP30抗体の反応 (DAB 染色法)

1次抗体は作製した抗ヒト SMP30抗体, 2次抗体はペルオキシダーゼ標識抗ウサギーブタ血清, lane 1: 正常肝臓組織から可溶化した蛋白, lane 2: 正常腎臓組織から可溶化した蛋白, 30 kDa (←)。

体として正常ウサギ血清を使用した immunoblotting では, IPTG を投与した菌体から得た蛋白試料でも組換え蛋白は認められなかった (デー



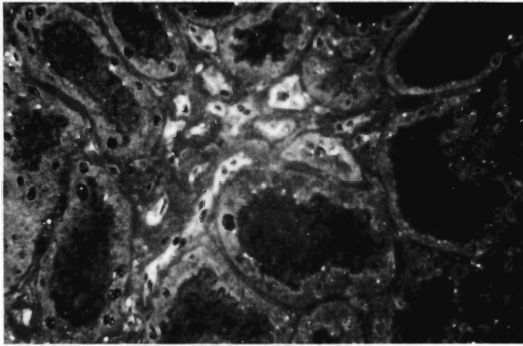
(A)



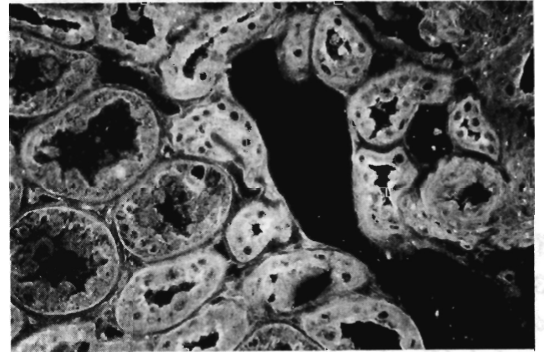
(B)

図7 正常ヒト肝臓組織における SMP30の免疫組織化学染色像 (蛍光抗体法)

A: 1次抗体は作製した抗ヒト SMP30抗体, B: 1次抗体は抗ラット抗体, 2次抗体は FITC で標識した抗ウサギ免疫グロブリン抗体を用いた.



(A)



(B)

図8 正常ヒト腎臓組織における SMP30の免疫組織化学染色像 (蛍光抗体法)

A: 1次抗体は作製した抗ヒト SMP30抗体, B: 1次抗体は抗ラット抗体, 2次抗体は FITC で標識した抗ウサギ免疫グロブリン抗体を用いた.

タは示さず).

### 3. 抗ヒト SMP30抗体の作製

家兎を組換えヒト SMP30蛋白で免疫し, 抗ヒト SMP30抗体を作製した. この抗体を1次抗体とし, 組換え蛋白に対して, Western hybridization法を行った. その結果は図4で得られたものと同様に分子量24kDaのバンドが検出された(図5). 次にヒトの正常肝, 腎臓組織から抽出した蛋白に対して Western hybridization法を行った. その結果, 肝臓 (lane 1) と腎臓 (lane 2) 共に分子量約30kDaのバンドが認められた(図6).

### 4. 免疫組織化学染色

作製した抗ヒト SMP30抗体と抗ラット

SMP30抗体を用いて免疫組織化学染色を行い, ヒトの肝臓, 腎臓における SMP30の組織内分布を調べた. 正常肝臓組織においては, 抗ヒト SMP30抗体を1次抗体とした場合, 類洞壁が染色された(図7A). 抗ラット SMP30抗体を用いたものでは, 肝実質細胞が染色された(図7B). 正常腎臓組織においては, 抗ヒト SMP30抗体では遠位尿細管上皮細胞が染色され(図8A), 抗ラット SMP30抗体を用いたものでも遠位尿細管上皮細胞が染色された(図8B). なお, ラット肝臓組織においては, 抗ヒト SMP30抗体では類洞壁が染色され, 抗ラット SMP30抗体では実質細胞が染色された. ラット腎臓組織においては, 抗ヒト

SMP30抗体では遠位尿管上皮細胞が染色され、抗ラット SMP30抗体では近位尿管上皮細胞が染色された（データは示さず）。

### 考 察

近年の分子生物学の進歩によって、天然にある蛋白質を遺伝子的に修飾して組換え蛋白質を得ることが可能となった。望みの機能に近い蛋白質を生産する情報を持った遺伝子 DNA を天然の生物から単離し、取扱いに便利な発現ベクターに挿入する。次にこれを培養が簡便な大腸菌などの細胞に導入し、増殖させる。その遺伝子増幅効果によって、挿入した発現ベクターの情報で細胞内で発現して、目的の蛋白質が生産される。このような組換え蛋白質の作製法は、通常、組織中に少量しか存在していない蛋白質を大量に生産することを容易とした。さらに、作製した組換え蛋白質を用いて、種々の疾患や生理活性についての解析が可能となった。今回の実験で著者は、図 1, 2 のごとく、ヒト SMP30 cDNA の一部を蛋白発現ベクターに挿入し、これを大腸菌株 BL21 (DE3) pLysE に形質導入した後、IPTG によって誘導してヒト組換え蛋白質を得た。一般に大腸菌を用いた組換え蛋白質の作製では、本来可溶性の蛋白質を大量に生産させた場合、細胞内で不溶性顆粒として生産されることが多く、その可溶化が困難である。今回は、リーダー配列として pel B シグナル配列を含むようにベクターを用いた。pel B リーダーは発現した目的の組換え蛋白質を periplasm space へ運搬するようにデザインされており、蛋白質が封入体として生産させることを防いでいるため、可溶化が可能となった。このことは、組換え蛋白質の精製に極めて有用であると考えられる。

発現した組換え蛋白質の有無を確認するために SDS-PAGE を行った(図 3)。IPTG 処理を行った菌体からの蛋白試料 (lane 3) には、形質導入を行っていない菌体から得た蛋白試料 (lane 1) や形質導入は行ったが IPTG 処理していない菌体から得た蛋白試料 (lane 2) にはない複数のバンドが存在していた。cDNA の塩基配列より推定されたアミノ酸配列からは分子量 24kDa の組換え蛋白質の発現が期待された。実際に、lane 3 には明瞭な 24

kDa のバンドが存在していた。lane 1, 2 にも同様の分子量のバンドが認められたが、lane 3 と比べごくわずかであり、24kDa に近い分子量を持つ菌体成分の可能性が考えられた。その他のバンドも IPTG の誘導によって発現した菌体成分であると考えられた。

さらに、この組換え蛋白質の抗原性を検討するために、Western hybridization を行った (図 4)。ラット SMP30 に対する抗体はヒトの組換え蛋白質に反応し、IPTG 処理を行った菌体からの蛋白試料 (lane 3) では、分子量 24kDa のバンドが明瞭に認められ、ヒト SMP30 の組換え蛋白質と同定した。これは、ラットとヒトの SMP30 はアミノ酸レベルで 89% の相同性があるため強い交差反応性を示したためと考えられた。形質導入を行っていない菌体から得た蛋白試料 (lane 1) や形質導入は行ったが IPTG 処理していない菌体から得た蛋白試料 (lane 2) には、SDS-PAGE でわずかに確認された分子量 24kDa のバンドは認められなかった。以上より、SDS-PAGE の lane 1, 2 (図 3) に存在する分子量 24kDa のバンドは lane 3 の分子量 24kDa のバンドとは異なり、組換え蛋白質と同様の分子量を持つ菌体成分であると考えられた。

組織中の SMP30 の予想分子量は、30kDa である。今回作製したヒト SMP30 の組換え蛋白質に対する抗体を用いて Western hybridization を行った結果、正常肝、腎臓組織から抽出した蛋白質を試料とした lane 1, 2 共に分子量約 30kDa のバンドが認められた(図 6)。作製した組換え蛋白質の分子量は 24kDa であり、実際の組織中の SMP30 蛋白質の分子量と差が認められるのは、組換え蛋白質では完全長の cDNA を用いていないことや大腸菌を宿主細胞としたために糖鎖が付加されていないこと等が考えられた。ヒト組織内の SMP30 蛋白質の分子量は 30kDa とラットの SMP30 蛋白質と同様であった。これはヒトとラットのアミノ酸の数と同じで、強い相同性があることを示した。以上の結果より、作製した抗体は抗ヒト SMP30 抗体であると考えられた。この抗体と抗ラット SMP30 抗体を用いて、ヒトの正常肝臓、腎臓における

SMP30の組織内分布を調べた。正常ヒト肝臓組織では、抗ヒトSMP30抗体を用いた場合、類洞壁が染色され(図7A)、抗ラットSMP30抗体を用いた場合、実質細胞が染色された(図7B)。抗ヒトSMP30抗体を使用した際に、類洞壁が染色されたことは類洞に浸出した物質が染色されたのか、あるいは、非特異的な反応であることが考えられた。

正常ヒト腎臓組織では、抗ヒトSMP30抗体を用いた場合、遠位尿管上皮細胞が染色され(図8A)、抗ラットSMP30抗体を用いた場合も同様に、遠位尿管上皮細胞が染色された(図8B)。Western hybridizationにおいては、抗ヒト、ラットSMP30抗体共に同様の結果が得られたが、実際のヒト、ラットの組織においては前述のように抗体によって染色される部位に差が認められた。SMP30は構造上の特徴として、システイン残基が存在していることがわかっており、その生理機能上での高次構造の変化に関与していることが考えられる。今回の実験においては、完全長のcDNAを使用していないためにシステイン残基の変化が起こったことが推察される。あるいは、cDNAの切断部位である*Bam*HIよりN末端側に、抗原性を発現するために重要な遺伝子コドンが存在している可能性も否定はできない。また、大腸菌を宿主として合成した組換え蛋白には糖側鎖が付加されていないことから、Western hybridizationにおいては抗ヒト、ラットSMP30抗体の抗原として同一のものを認識しているが、実際の組織においては高次構造の差異によって認識している抗原が異なっていることが推察され、これが大腸菌を宿主とした組換え蛋白を用いて作製した抗体の臨床応用への限界であるということが考えられる。また、同組織であっても種によってSMP30の発現部位が異なっているということも推察される。今回作製した組換え蛋白に対する抗体は、Western hybridizationには応用可能である。しかし微量な蛋白の検出においては留意する必要がある。mRNAのin situ hybridizationなどによるさらなる解析が必要である。また、現在、この問題点のために、ELISA法、Western hybridization法、免疫組織化学染色法に共通して使用可能なモノク

ローナル抗体を作製している。その完成によって、今回作製した組換え蛋白の応用範囲の拡大が期待できる。

腎臓は、機能的に細分化した種々の細胞より構築されており、それらの機能の統合によって生体の体液恒常性を維持することが主要な役割の一つである。各々の細胞機能の調節は多様な生理活性物質によって行われているが、特にイノシトールリン脂質代謝を介する情報伝達機構の関与がしだいに解明されつつある。そのうち、細胞内カルシウムイオンがそのシグナルの中心的なものの一つとして考えられている<sup>9)10)</sup>。細胞内のカルシウムイオン濃度上昇を感知して、カルシウム情報を伝達し、作用を発現してゆくのがカルシウム結合蛋白質である。現在、腎臓のカルシウム結合蛋白質はカルモデュリンなどのEFのハンド蛋白質とアネキシンファミリーの存在が明らかにされているが<sup>11)12)</sup>、肝細胞内で示したように、SMP30もそれらの概知の蛋白と同様、腎臓において何らかの重要な細胞機能調節に関与していることが考えられる。

今後、本実験を基礎としたモノクローナル抗体の作製やその測定系の確立、またそれらを用いた各種腎疾患や肝腎に共通する疾患におけるSMP30の発現動態についての解析などの研究に期待がもたれる。

## 結 論

ヒト肝臓cDNAライブラリーより得たヒトSMP30 cDNA (pHSMP6)を*Bam*HI, *Sac*I切断部位で切り出し、そのDNA断片を蛋白発現ベクターpET22bへ挿入してプラスミドベクター(pET22BHSM-BS)を得た。これを大腸菌BL21 (DE3) *plysE*に形質導入し、IPTGを投与して組換え蛋白を誘導した。この蛋白を抗原として用いて、抗ヒトSMP30のポリクローナル抗体を作製した。作製した抗ヒトSMP30抗体と抗ラットSMP30抗体を用いて正常ヒト肝臓、腎臓組織におけるSMP30の分布を検索した。肝臓においては、抗ヒトSMP30抗体では類洞壁、抗ラットSMP30抗体では実質細胞が染色された。腎臓においては、抗ヒトSMP30抗体では遠位尿管



上皮細胞, 抗ラット抗体でも遠位尿管上皮細胞が染色された。

Western hybridizationにおいては, ヒトSMP30の組換え蛋白に対する抗体は抗ラットSMP30抗体と同--の抗原を認識していると考えられたが, 実際の組織において染色の部位の差が認められたのは, 組換え蛋白が, 完全長のcDNAを用いていないことや大腸菌を宿主細胞としているために糖側鎖が付加されていないこと等の問題点を持っているため, このような蛋白質の高次構造の変化によって認識しうる抗原が異なっていることが推察された。また, 種によってSMP30の発現部位が異なっているということも考えられた。

今後, 今回の実験を基礎として, 各種腎疾患や肝疾患におけるSMP30の発現動態についての解析に期待が持たれる。

本稿を終えるにあたり, ご指導, ご校閲を賜わりました東京女子医科大学第四内科二瓶 宏教授に心よりの深甚の謝意を表します。また, 直接ご指導くださいました東京都老人医療研究所分子病理部門丸山直記室長に厚く御礼申し上げるとともに, 終始ご助言くださった分子生物部門藤田敬子博士, 東京女子医科大学第四内科湯村和子講師, 本研究にご協力いただいた東京女子医科大学腎センター病理検査室堀田 茂技師に深く感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Fujita T, Uchida K, Maruyama N: Purification of senescence maker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1116: 122-128, 1992
- 2) Fujita T, Uchida K, Maruyama N: Isolation of cDNA clone encoding rat senescence maker

- protein-30 (SMP30) and its tissue distribution. *Biophys Acta* 1132: 297-305, 1992
- 3) Shimokawa N, Yamaguchi M: Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a calcium-binding protein from rat liver. *FEBS Lett* 327: 251-255, 1993
- 4) Yamaguchi M: Effect of calcium-binding protein regucalcin on  $Ca^{2+}$  transport system in rat liver nuclei: Stimulation of  $Ca^{2+}$  release. *Mol Cell Biochem* 113: 63-70, 1992
- 5) Shimokawa N, Yamaguchi M: Calcium administration stimulates the expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in rat liver. *FEBS Lett* 305: 151-154, 1992
- 6) Shimokawa N, Yamaguchi M: Expression of hepatic calcium-binding protein regucalcin mRNA is mediated through  $Ca^{2+}$ /calmodulin in rat liver. *FEBS Lett* 316: 79-84, 1993
- 7) Studier FW, Rosenberg A, Dunn J et al: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60, 1990
- 8) Towin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
- 9) Heizmann CW: Intracellular calcium-binding proteins: More sites than insights. *Trends Biochem Sci* 16: 98-103, 1991
- 10) Carafoli E: Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 56: 395-433, 1987
- 11) Tanaka T: Calmodulin-dependent calcium signal transduction. *Jpn J Pharmacol* 46: 101-106, 1988
- 12) Ohta H: Molecular cloning and expression of the cDNA coding for a new member of S100 protein family from porcine cardiac muscle. *FEBS Lett* 295: 93-96, 1991