

〈特集：尿路結石〉

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法とウエスタン ブロッティング法による尿路結石中の蛋白成分分析

芝紀代子、川上 保子、横溝 佳代、下村 弘治、金森 きよこ

Analysis of proteins extracted from urinary calculus using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Kiyoko Shiba, Yasuko Kawakami, Kayo Yokomizo,
Hirozi Shimomura and Kiyoko Kanamori

Summary Approximately 80% of urinary calculi contain calcium. As calcium oxalate is the most frequently detected form, many studies have examined the proteins involved in the synthesis and inhibition of calcium oxalate.

The proteins involved in urinary calculus formation/inhibition were determined using various analytical procedures. We employed two study methods: in one method, urinary calculi are crushed and extracted to analyze the proteins contained within them; and in the other, a reagent such as sodium oxalate is added to urine samples collected from patients with urinary calculi for detecting crystal formation, and proteins contained in the crystals are analyzed.

When employing these methods, the proteins extracted depend on the type of sampling solution, the selection of which is especially important. In this article, we review previous studies using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting with respect to the sampling solution.

Key words: Urinary calculus, Protein, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting

I. はじめに

尿路結石症数は全人口の1~20%といわれ、毎年、1年あたり100万人の人が罹患していると報告されている。10年間での再発率は74%と高率であるところから、尿路結石のためのスクリーニングや検出のための診断技法の開発が望ま

れるところである¹⁾。日本でも食生活の変化から尿路結石患者が増加し、2005年日本尿路結石症学会が行った調査では40年前(1965年)と比べ約3倍と急激に増え、男性は7人に一人、女性は15人に一人の割合で、一生に一度は尿路結石症にかかる²⁾とされている。日本でも尿路結石症診療ガイドラインが2002年に出版され、その中

文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科
〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

Department of Clinical Laboratory Medicine,
Bunkyo Gakuin University,
2-4-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

に再発予防に関するガイドラインの章もある³⁾。

尿結石は尿に溶け込んだミネラル物質の濃度が何らかの原因で濃い状態となり、有機物質も巻き込んで生成される。ほとんどは腎臓で形成され、出来た結石の位置で腎臓結石、尿管結石、膀胱結石、尿道結石と呼ばれているが、腎臓結石、尿管結石が約95%を占め、膀胱結石、尿道結石は約5%である。結石の約8割がカルシウムを含んでおり、尿路結石の種類にはシュウ酸カルシウム、リン酸マグネシウム、リン酸マグネシウムアンモニウム、尿酸 シスチンであるが、圧倒的に多いのはシュウ酸カルシウムである⁴⁾。結石症の基礎的研究が今なお続けられているが、残念ながら結石症の原因解明、再発予防までには至っていないのが現状である。

尿路結石中の蛋白成分については、尿結石を粉砕し、蛋白を抽出し分析する方法と、尿にシュウ酸ナトリウムなどを加え人工的に結晶を生成させ、その中の蛋白成分を調べる方法と大きく2つの方法での研究がある。本稿ではこの2つの方法に分類し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた研究について概説する。

II. 尿結石中の蛋白成分分析

我々の行っている方法は以下のとおりである。
(尿路結石の前処理法)

① 尿路結石をシャーレに入れておよそ10倍量の

生理食塩水を加え、室温で一晩振とうしながら、洗浄する。

② 結石を瑪瑙乳鉢に0.3 g量り取り均一になるように細かく破砕する(簡単に粉砕できる)。

③ 破砕し均一化した結石砂、約0.03 gを栓付き試験管にいれ、約100倍量である300 μ Lの抽出液を加え、転倒混和が可能な振とう器を用いて、室温で2晩振とうしながら蛋白を抽出する。

④ 抽出後、10,000 rpm、10分遠心し、上澄みを分析に使用する。

(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)

5-20%のグラジエントゲル(アナテック)を用いて、銀染色(和光純薬工業)により蛋白染色を行う。

(ウエスタンブロットティング法)

ホライズブロット(アトー)を使用して2 mA/膜1 cm²の条件で60分転写する。

一次抗体、二次抗体と反応させた後、3,3'ジアミノベンチジジンを用いて発色する。

尿路結石中の蛋白抽出液に関してはいくつかの報告がある。抽出液に何を選擇するかによって、抽出してくる蛋白も異なってくる。

Yamateら⁵⁾の抽出法について図1に示した。Yamateらは、カルシウムを含む尿結石においてマトリックス蛋白として、オステオポンチンを検出している。オステオポンチンはリン蛋白であり、トロンピン消化を受けやすく、またStain-

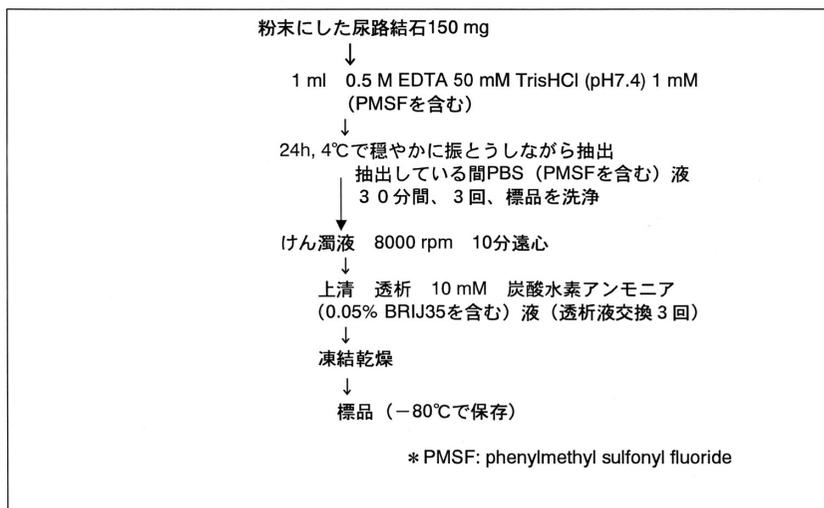


図1 Yamateらの尿路結石抽出法⁵⁾

All (ナカライテスク株) で特異的に染まる (オステオポンチンは高濃度にリン酸化された蛋白なので、通常用いられるCBBでは染まらない)。このことを利用して、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて検出した結果、オステオポンチンはシュウ酸カルシウム結石、リン酸カルシウム結石に存在するが、マグネシウムアンモニウム結石、尿酸結石には存在しないことが判明した。このことからオステオポンチンはカルシウムを含む尿結石の形成に関与していると報告している。

Kanekoら⁶⁾はYamateらの抽出法に準じてはいるが、EDTA液で抽出する前に4M グアニジン塩酸50 mMTris HCl (pH 7.4、1 mM PMSFを含む)液で抽出している。抽出後、2次元電気泳動や、LC-MSにより分析を行い、シュウ酸カルシウム結石において、オステオポンチン、プロトンピンとともに、初発の尿路結石中にはプロテインZを検出している。プロテインZはビタミンK依存性血漿蛋白である。

Sidduquiらは⁷⁾3種類の抽出液、0.06 M Tris HCl (pH 6.8、10% glycerol、5% β -mercaptoethanol、2% SDSを含む)、0.06 M Tris HCl (pH 6.8、10% glycerol、5% β -mercaptoethanol、1% TritonX100を含む)、0.06 M Tris HCl (pH 6.8、10% glycerol、5% β -mercaptoethanol、1 mM EDTA、8M 尿素を含む)について蛋白抽出効率を検討して結果、最も適した緩衝液は0.06 M Tris HCl (pH 6.8、10% glycerol、5% β -mercaptoethanol、2% SDSを含む)、

であると報告している。この緩衝液を用いて図2に示した操作法により、結石中の蛋白の分析を行った結果、 $\leq 12\sim 66$ kDa分子サイズを持つ蛋白が検出できたとしている。また、尿路結石抽出蛋白で作った抗体を用いて、健常人尿と尿路結石患者尿を泳動したのち、この抗体でプロットしたところ、尿路結石患者尿では結石の種類にかかわらず、数多くの蛋白バンドが検出され、しかも ≤ 12 kDaの蛋白バンドが濃染された。このバンドは健常人尿では検出されないことから、早期の結石形成に関与する蛋白であると報告している。

Dussolら⁸⁾は図3に示したように0.1 mM PMFS、1 mM DFP、1% thiodiglycolを含む05 M EDTA (pH8) 液で、攪拌しながら4℃で4日間蛋白抽出を行っている。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した結果、9つの蛋白(アルブミン、 α_1 -酸性糖蛋白、 α_1 -ミクログロブリン、イムノグロブリン、アポリポ蛋白A₁、トランスフェリン、 α_1 -アンチトリプシン、レチノール結合蛋白、リーナルリソスタチン)が全ての尿路結石に存在し、 β_2 -ミクログロブリンはカルシウム結石にのみ認められたとしている。一方セルロプラスミン、ハプトグロビン、Tamm-Horstall (THP) はどの結石にも存在しなかったと報告している。これらの蛋白のうち、アルブミンがマトリックスとなるいくつかの蛋白に対して重要な親和力であるとしている。THPに関しては結石中に存在するとの報告と、

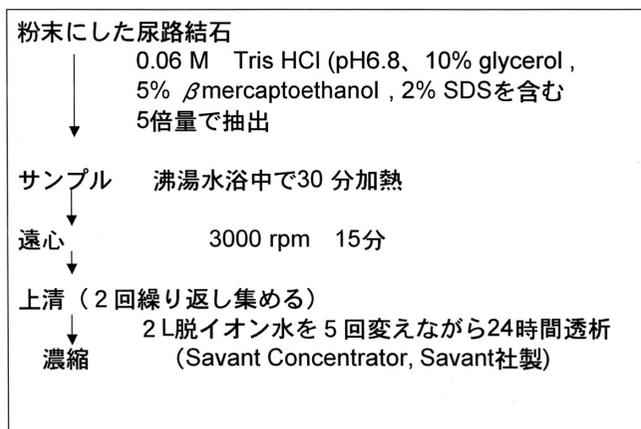


図2 Sidduquiらの尿路結石中蛋白の抽出法⁷⁾

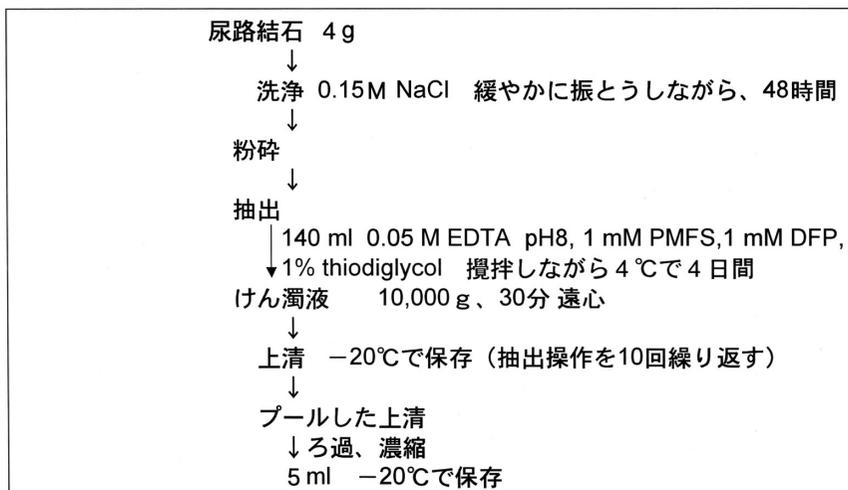


図3 Dussolらの尿路結石中の蛋白抽出法⁹⁾

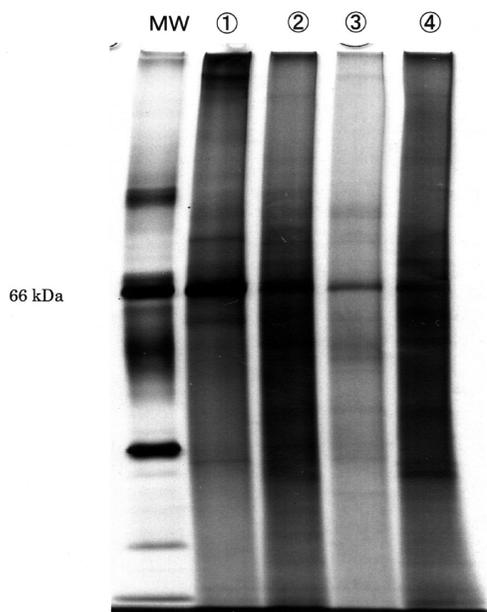


図4 抽出液の種類による尿路結石中の蛋白バンド抽出液は①～④を用いた。

- ①生食+2% SDS
 - ②0.06M Tris-HCl (pH 6.8)+2% SDS
 - ③生食+2% SDS+1mM EDTA
 - ④0.06M Tris-HCl (pH 6.8)+2% SDS+1mM EDTA
- ①の抽出液では66kDa位の蛋白がより抽出された。②と④は同程度の蛋白が抽出されていたが、④の方が低分子の蛋白がより多く抽出された。③は抽出された蛋白が最も少なかった。

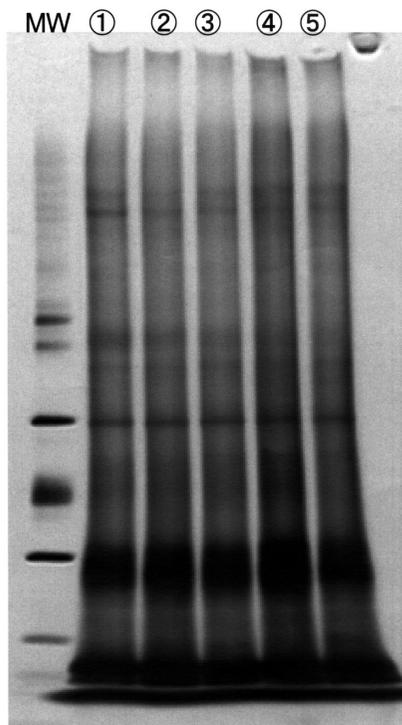


図5 尿路結石中の蛋白バンド
抽出液：50 mM トリス塩酸(pH 7.4)-4M グアニジン塩酸塩-5 mM EDTA液 (プロテアーゼカクテルを含む)
①～⑤とも同じ検体である。

存在しないと報告がある。THPにはpHが7以下で、イオン強度が弱い場合は凝集を阻害し、pHが7以上で、イオン強度が強い場合は凝集するという性質があるらしい。THPの有無は尿における異なった物性状態の違いによってと説明できるかもしれないとしている。

我々は研究の初期には、生理食塩水を用いて抽出していた⁹⁾。アルブミンとTHPに注目して行った実験だが、尿路結石患者検体では検体ごとに泳動像の違いが見られたものの、全体的に分子量約66kDaのアルブミンが最も多かった。

その後、抽出液の種類によって出現する蛋白の相違について、5%ゲルを用いて実験したことがある。その結果を図4に示した。4種類の抽出液で、それぞれ検出される蛋白が異なることがわかった。更に抽出液についていろいろ検討した結果、Kanekoら⁹⁾抽出液が一番蛋白バンドを検出できるとして、この抽出法を使って研究を進めている(図5)。結石蛋白の含有量は結石総重量の2~3%と報告されているが、結石を生理食塩液で洗浄後にグアニジン塩酸塩を含む抽出液を用いて抽出した結果、蛋白の含有量は5.8%であった。蛋白の測定は我々が開発した高感度なドットプロットと銀染色を組み合わせた方法で測定している¹⁰⁾。他の抽出液に比べ、グアニジン塩酸塩を含む抽出液は抽出効率が良好であると考えている。また、抽出過程における蛋白分解反応を除くために酵素阻害剤を添加している。結石中から様々な蛋白の存在を認めたと抽出液の種類によって出現する蛋白が異なってくることから、抽出液の選択は重要なキーポイントになる。

Ⅲ. 尿にシュウ酸ナトリウムなどを加え人工的に結晶を生成させ、その中の蛋白成分を調べる方法

Hondaらは¹¹⁾健常人尿に1M塩化カルシウムと0.1Mシュウ酸ナトリウムを含む液で6時間インクベートし結晶を取り出した後、10%EDTA(pH 8.0)で30分、結晶中の蛋白を抽出した。この蛋白を結晶表面結合物質(crystal surface binding substance, CSBS)と呼んでいるが、これをDEAE-SepharoseCL-6BカラムのNaClのグラジエント溶出とステップワイズ溶出で精製した

後、ハイドロオキシアパタイトカラムのリン酸ナトリウムのステップワイズ溶出を行った。得られた5つの分画について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、蛋白分析を行った。CSBS中にはアルブミン、 α_1 -酸性糖蛋白、 α_1 -ミクログロブリン、 α_2 -HS蛋白、レチノール結合蛋白、トランスフェリン、THP、プロトロンピンが含まれていた。 α_1 -アンチトリプシン、 β_2 -ミクログロブリンは検出されなかった。30mMリン酸ナトリウム液では α_1 -ミクログロブリン、60、125mM液では α_1 -酸性糖蛋白、60、125mM、250mMリン酸ナトリウム液で α_2 -HS蛋白、250、500mMリン酸ナトリウム液ではプロトロンピンが見出され、THPとアルブミンはリン酸ナトリウムの全ての溶出液で検出された。500mMリン酸ナトリウム液で溶出された分画液における30kDaの蛋白はプロトロンピン、60mMリン酸ナトリウム液で溶出された分画液における67kDaの蛋白はオステオポンチンであるとアミノ酸配列分析から同定された。

Hondaら¹²⁾はCSBSにおいて強力な阻害の役割を演じているオステオポンチンや結晶のマトリックス蛋白以外の蛋白が尿結石形成に直接的ではないが重要な役割を演じていると考えているとしている。

AtmaniとKhan¹³⁾は健常人尿と結石患者尿に対して、*in vitro*でシュウ酸ナトリウム(pH 5.9~6.5)および、リン酸ナトリウム液(pH 7.2)を加えシュウ酸カルシウム、リン酸カルシウム結晶を生成させ、その中に含まれている蛋白について研究している。結晶は0.25MEDTA(pH 8)液で抽出しているが、健常人尿からのシュウ酸カルシウム結晶ではプロトロンピン関連蛋白が一番多く、ついでアルブミン、オステオポンチンであり、リン酸カルシウム結晶ではTHPが主たる蛋白で、ついでアルブミン、プロトロンピン関連蛋白であった。一方尿路結石患者尿で生成したシュウ酸カルシウムとリン酸カルシウム結晶のいずれもアルブミンが主たる蛋白であった。この報告は電気泳動法を用いたデータではないが、尿路結石形成にはアルブミンが決定的な役割を演じていると推論している。

Nishioら¹⁴⁾は、健常人尿からリン酸カルシウム結晶を作り出すために、10mM NaOHを一滴ずつ滴下し、pHを7.4~8.0に調整したあと、2時

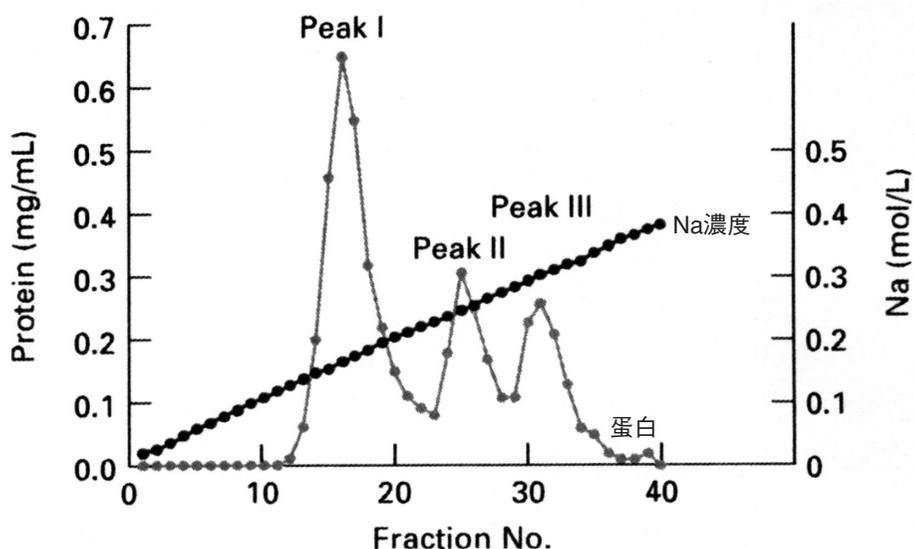


図6 陰イオン交換樹脂 (DE52) を用いたリン酸カルシウム中蛋白の溶出パターン¹⁴⁾
3つの蛋白ピーク(I-III)が検出された。

間室温で振盪した。生じた結晶を0.1 mol/L EDTA液で処理することにより、結晶中の蛋白を抽出し、陰イオン交換樹脂で0-0.5 mol/L NaCl グラジエント勾配で溶出を行ったところ、図6のごとく3つのピークが得られた。それらのピークについてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、ピーク1の蛋白は α_2 -HS-糖タンパク、ピーク2はプロトロンビン-F1、ピーク3はオステオポンチンであることが判明した。これらの蛋白がリン酸カルシウム結晶に選択的に関与しており、特にプロトロンビン-F1とオステオポンチンはシュウ酸カルシウム結晶を強く阻害していると報告している。

Okumura¹⁵⁾はビクリンがシュウ酸カルシウム結石の成長を阻害するとしている。ビクリンは35 kDaの分子サイズをもち、免疫組織染色によって、腎皮質にある近位尿細管に主に局在していることを明らかにしている。

Sidduqui⁷⁾らは $\leq 12\sim 66$ kDa分子サイズを持つ尿路結石抽出蛋白で作った抗体を用いて、健常人尿と尿結石患者尿を泳動したのち、この抗体でプロットしたところ、尿路結石患者尿では結石の種類にかかわらず、数多くの蛋白バンドが検出され、しかも、 ≤ 12 kDaの蛋白バンドが濃

染された。このバンドは健常人尿では検出されないことから、早期の結石形成に関与する蛋白であると報告している。

IV. おわりに

Merchant¹⁶⁾らは尿結石のプロテオミックス分析はカルシウム結石形成における炎症の過程で重要な役割を演じると報告している。MSと組織免疫化学を用いて、158の蛋白を同定し、そのうち28の蛋白は一般的な蛋白としている。尿路結石を持つ人が増加している今日、研究段階から更には尿路結石の早期発見のための検査法の開発が早急に望まれるところである。

文献

- 1) Lau Wai-Hoe Leong Wing-Seng Zhari Isomail Gam Lay-Harn: Proteomics and detection of uromodulin in first-time renal calculi patients and recurrent renal calculi patients. Appl. Biochem. Biotechnol., DOI, 10, 1007/s12010-008-8503-x
- 2) http://www.chemiphar.tv/healthcare/urine/index_02.html
- 3) 日本泌尿器科学会, 日本Endourology・ESWL学会, 日本尿路結石学会編: 尿路結石症診療ガイドライン, 金原出版, (2002)

- 4) http://uro.med.u-tokai.ac.jp/byoukuni/towa_kesse.html
- 5) Yamate T, Umehara T, Iguti M, Kurita T: Detection of osteopontin as matrix protein in calcium-containing urinary stones. *Acta Urol. Jpn.*, 43: 623-627, 1997
- 6) Kaneko K, Yamanobe T, Nakagomi K, Mawatari K, Onoda M, Fujimori S: Detection of protein Z in a renal calculus composed of calcium oxalate monohydrate with the use of liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry following two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis separation. *Anal. Biochem.*, 32: 4191-4196, 2004
- 7) Sidduqui AA, U Sultans T, Buchholz NP, Waqarol MA, Talati J: Protein in renal and urine of stone formers. *Urol. Res.*, 26: 383-388, 1998
- 8) Dussol B, Geider S, Lilova A, Leonetri F, Dupuy, Daudon M, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM: Analysis of the soluble organic matrix of five morphologically different kidney stones. *Urol. Res.*, 23: 5-51, 1995
- 9) 横溝 佳代, 中山 亜紀, 外園 栄作, 二ノ宮 明子, 三宅 瑠璃子, 平塚 信夫, 奥山 光彦, 加藤 裕司, 小林 静子, 伊藤 喜久, 芝 紀代子: 尿路結石患者の結石抽出液と尿の蛋白成分の分析. *臨床病理*, 53(12): 1109-1115, 2005
- 10) Matsuda K, Hiratsuka N, Kurihara Y, Shiba K: Semoquantitative analysis of urinary low protein levels using silver dot blot assay. *J.Clin. Lab.*, 15: 171-174, 2001
- 11) Hess B, Jordi S, Zipperle L, Ettinger E, Giovanoli R: Citrate determines calcium oxalate crystallization kinetics and crystal morphology-studies in the presence of Tamm-Horsfall protein of a healthy subject and a severely recurrent calcium stone former. *Nephrol. Dial. Transplant*, 15: 366- 374, 2000
- 12) Honda M, Yoshioka T, Yamaguchi S, Yoshimura K, Miyake O, Utsunomiya M, Koide T, Okuyama A: Characterization of protein components of human urinary crystal surface binding substance. *Urol. Res.*, 25: 355-360, 1997
- 13) Atmani F, Khan S R: Quantification of proteins extracted from calcium oxalate and calcium phosphate crystals induced in vitro in the urine of healthy controls and stone-forming patients. *Urol. Int.*, 68: 54-59, 2002
- 14) Nishio S, Iseda T, Takeda H, Iwata H, Yokoyama M: Inhibitory effect of calcium phosphate-associated proteins on calcium oxalate crystallization: α 2-HS-glycoprotein, prothrombin-F1 and osteopontin. *BJU. International*, 86: 543-548, 2000
- 15) Okumura M, Yamaguchi S, Yachiku S: Identification of bikurin isolated from human urine inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *International J. Urol.*, 10: 530-535, 2005
- 16) Merchant MI, Cummins TD, Wilkey DW, Salyer SA, Powell DW, Klein JB, Lederer ED: Proteomic analysis of renal calculi indicates an important role for inflammatory processes in calcium stone formation. *Am. J. Renal Physiol.*, F1254-F1258, 2008