

糸球体基底膜解析の現状

柴田 整 一

国立病院医療センター、臨床研究部

序 言

糸球体基底膜構成成分の化学的解析は近年急速に進展した。殊にEHS肉腫を用いての基底膜構成成分の研究が詳細に行われ、これから多くの新知見がもたらされた。そして、これら新知見を用いての応用研究も既に始まっている¹⁾。例えば癌の血管性転移に際して、癌細胞が血管内に入るまでにその血管壁基底膜構成化学成分に次々に変化が現れることが見出されてきたし、また肝硬変症に際して、正常の場合にはdetect出来ない位であるラミニンなど基底膜構成成分が著明にチェック出来るようになりこれが肝硬変の進展を促進する原因の一つになるという知見などが明らかにされた。これらの知見は、当然、次のステップとして癌の血管転移を防ぐ方法、あるいは肝硬変症の進展を防ぐ方法などを全く新して角度から開拓しようという試みにつながることになるわけである。従って、このような化学的観点の導入は今後新しい領域の展開期待させるわけである。

ところが、ここに一つの盲点が存在する。それは、基底膜を構成する成分はこのようなEHS肉腫などを用いる生物学的立場にたつての分析・研究を通してもれなく抽出され、網羅されるものであると過信されてしまったという点である。その一例として、次に述べる「病気を惹き起こす因子」などはこのような生物学的立場からの研究を通しては発見されなかったわけである。我々は、正常動物の糸球体基底膜そのものを集め、これについての分析・抽出を通して、「不可逆的に進行して終着点に到る病気を惹き起こす因子」を見出し、腎炎惹起物質(Nephri

togenoside)と命名した。本報では、これに関する研究の現状を概説する。

Nephritogenoside についての概観

腎炎惹起物質Nephritogenosideは正常腎糸球体に含まれる超微量成分であり1200匹の正常ラットからの収量は5-6mgである。すなわち、ラミニン、ファイブロネクチンなど既知の基底膜構成化学成分に比して著しく収量の少ない微量成分であるということになる。この物質は腎のみでなく肺、大動脈、肝などの他の臓器にも、含量の差こそあれ、見出される²⁾。

動物から抽出した物質を唯一回、同種動物に注射すると腎炎が惹起される。そして、この病変は着実に進行して6-8ヶ月後には終着像である慢性腎炎・萎縮腎にまで至る^{3,4)}。追試実験の成績でも96%の発現率を報告している⁵⁾。

この物質は化学的には糖ペプチドであり、腎炎をおこす生物活性はこの内の糖鎖部分のほうに存在する。本物質で異種動物を免疫すると抗血清を作りうるが、この抗血清をもとの動物に

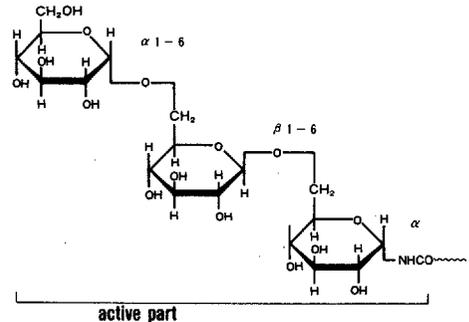
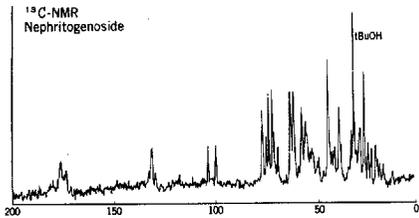


図 1



¹³C-NMR spectrum of the Synthesized Compound:
Glc(α1-6) Glc(β1-6) α-NHCO-Asn

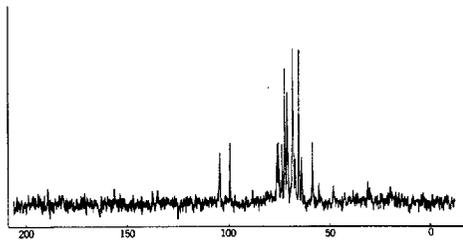


図 2

Localization of three glycopeptides
in or on the GBM

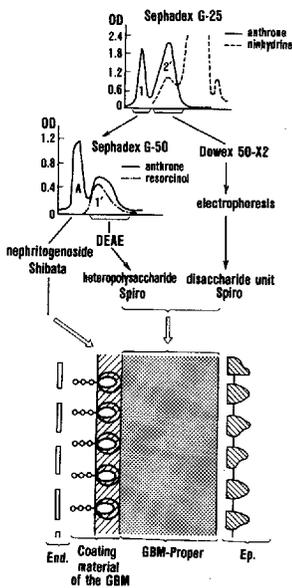


図 3

注射することによっては腎炎は作りえない。即ち抗腎血清を作る力はない。この糖鎖部分は3個の glucose からなり図 1 のごとき結合状態を

MOLECULAR WEIGHT AND AMINO ACID COMPOSITION

1. Weight: glycopeptide: sugar residue=4:1
 2. Ultra-centrifugal Analysis: ca. 6600
 3. NMR Spectral Analysis: sugar residue=486
glucose: glycine=3:6
etd.
- Molecular Weight=ca. 2200
The Number of Amino Acids=(18±1)

| Amino Acid | Mole ratio |
|------------|------------|
| Glycine | 6 |
| Glutamine | 2 |
| Asparagine | 2 |
| Proline | 1~2 |
| Leucine | 1 |
| Isoleucine | 1~2 |
| Alanine | 1 |
| Valine | 1 |
| Threonine | 1 |
| Serine | 1 |
| Arginine | 1 |

図 4

示すことは Nephritogenoside の ¹³C-NMR パターンと合成品 (即ち、3 糖部分にアミノ酸 1 個を付けた合成品) のそれと比較することによって裏付けられた (図 2)。

本物質は糸球体基底膜の内皮側の表面に薄膜として存在しており、一方 Spiro のいわゆる di-saccharide unit や heteropolysaccharide unit⁶⁾ は糸球体基底膜固有層に存在するので明らかに別の物質である。後者には腎炎を惹き起こす能力は見出されない。これらの相互関係は図 3 に示した通りである。

一方、活性と直接関係のないペプチド部分は図 4 にみるように構成アミノ酸の種類と数とは明らかになり、分子量も 2,200 と計算されるが、自然状態では最低 3 量体の形で存在しており、6,600 と測定されるが、条件によっては最高 100,000 以上の価を示すことが明らかにされた。即ち著しく凝集し易い物質である。

超遠心パターンや高速液体クロマトグラフィーのパターンからこのことが示されている。そのため N 末端は 5 年以上決定に至らず、アミノ酸シーケンスの検討が進行しなかった。糖とペプチド間の結合が α-N-グリコシド結合を示すという著しく特異な構造であるために、当然これの酵素即ち、α-N-グリコシダーゼがまだ見出されていない点もその原因の一つと言えよう。ところが最近我々はこの α-N-グリコシド結合のみを選択的に切断する方法を見出した。

この方法が、前述の Nephritogenoside 合成品の場合に、その糖・ペプチド間の結合を切る

織に含まれるものであり、しかも糸球体基底膜の内皮側表面に並んで存在しているばかりでなく、糖鎖は血流中に露出して存在していることを我々は既に明らかにしているので、この糖鎖構造とは全く異なる種類の化学物質の中で上記活性決定基に対して、強い affinity (活性ブロック又は活性拮抗) を示すものを選び出すことが出来ればそれはとりも直さず治療薬の開発につながることになるわけである。

しかも、この場合、繰り返し論じてきたように Nephritogenoside が正常動物組織から抽出された物質であるという点は重要である。なぜなら、活性決定基を有する糖鎖部分と α -N-グリコシド結合しているペプチド部分の産生を抑制するように遺伝子的にコントロールすることも十分に可能であると考えられるからである。

我々は、以上のごとき幾つかの角度から腎炎の抜本的な治療薬の開発を急ぎつつある。

結 論

我々は、正常腎糸球体基底膜の中に含まれる腎炎惹起活性を有する糖ペプチド Nephritogenoside を抽出し、その化学構造の全貌をほぼ明らかにすることが出来た。さらにその化学全合成もほぼ完成した。そこで、我々はこの腎炎を惹き起こす化学物質の構造の一部置換による治療薬の開発に着手している。

この治療薬開発の試みはまだ緒のついたばかりであるが、簡便なスクリーニング法の開発に最近成功しているので、この研究は今後かなりスピードアップされることになるであろう。

更に、Nephritogenoside が腎糸球体基底膜のみでなく各種臓器に広く分布しているという事実は今後多くの示唆を与えると考える。

文 献

- 1) 柴田整一：基底膜の新しい研究の動向, 医学のあゆみ 133(7):415-421, 1985.
- 2) 柴田整一：腎炎惹起物質 Nephritogenoside について, 蛋白質 核酸 酵素 26(1)1-15, 1981.
- 3) Shidata, S., Sakaguchi, H. and Nagasawa, T.: Induction of chronic progressive glomerulonephritis with immunofluorescent mesangial pattern in rats. *Nephron* 16:241-255, 1976.
- 4) 柴田整一：慢性糸球体腎炎—nephritogenoside の 1 回注射による—, 難治疾患のモデルと動物実験 (京極方久編). ソフトサイエンス社 pp.462-478, 1984.
- 5) Nishii, Y., Ono, M., Fukushima, M., Shimizu, T., Niki, R., Ohkawa, H., Takagaki, Y., Okano, K. and Suda, T.: Osseous changes and abnormalities of mineral metabolism in rats with glycopeptide-induced nephritis, *Endocrinology* 107(1):319-327, 1980.
- 6) Spiro, R.G.: Studies on the renal glomerular basement membrane. Nature of the carbohydrate unit and their attachment to the peptide portion. *J. Biol. Chem.* 242:1923-1932, 1967.
- 7) Shibata, S., Natori, Y. and Takeda, T.: Characterization of nephritogenoside, a basement membrane glycopeptide with disease-inducing activity. *Basement Membranes* (edited by S. Shibata) Elsevier, Amsterdam pp.25-37, 1985.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結論

我々は、正常腎糸球体基底膜の中に含まれる腎炎惹起活性を有する糖ペプチド Nephritogenoside を抽出し、その化学構造の全貌をほぼ明らかにすることが出来た。さらにその化学全合成もほぼ完成した。そこで、我々はこの腎炎を惹き起こす化学物質の構造の一部置換による治療薬の開発に着手している。

この治療薬開発の試みはまだ緒のついたばかりであるが、簡便なスクリーニング法の開発に最近成功しているので、この研究は今後かなりスピードアップされることになるであろう。更に、Nephritogenoside が腎糸球体基底膜のみでなく各種臓器に広く分布しているという事実は今後多くの示唆を与えると考える。