

## ラット肺サーファクタント蛋白質 D(SP-D) の特性とその精製

白鳥正典

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

小笠原 由法 黒木 由夫

札幌医科大学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

### Characterization and Purification of Pulmonary Surfactant Protein D(SP-D) of Rat

Masanori SHIRATORI

*Department of Internal Medicine(Section 3), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. A. SUZUKI)*

Yoshinori OGASAWARA and Yoshio KUROKI

*Department of Biochemistry(Section 1), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. T. AKINO)*

**ABSTRACT** Native surfactant protein D(SP-D) was isolated from the supernatant of rat lung lavage fluids after overnight centrifugation at  $33,000 \times g_{av}$  by affinity column chromatography with mannose-Sepharose 6B.

Since SP-D possesses similarities to SP-A, which is the main component of surfactant proteins, in collagen-like structure and carbohydrate binding property, the effect of SP-D upon surfactant secretion from alveolar type II cells was investigated and compared with that of SP-A. SP-A inhibited surfactant secretion from type II cells, whereas native SP-D could inhibit neither the basal secretion nor the facilitated secretion. However, native SP-D reduced the inhibitory effect of SP-A on surfactant secretion in a dose dependent manner. Native SP-D competed with  $^{125}\text{I}$ -SP-A for high affinity binding to type II cells. The butanol-soluble materials extracted from native SP-D possessed the ability to reduce the activity of SP-A on surfactant secretion as much as native SP-D. On the other hand, butanol-extracted SP-D could neither inhibit the activity of SP-A on surfactant secretion from type II cells nor compete with  $^{125}\text{I}$ -SP-A for binding to type II cells.  $^{125}\text{I}$ -SP-A bound native SP-D, but not butanol-extracted SP-D. These data indicate that the butanol-soluble materials extracted from native SP-D are essential for the effect of native SP-D upon the activity of SP-A.

Analysis of SP-D by high-performance liquid chromatography demonstrated that materials extractable with butanol were associated with native SP-D. The butanol-soluble materials consisted of mainly phospholipids with phosphatidylcholine accounting for 84.8% of the phospholipids associated with SP-D.

The native SP-D was then further purified by adsorption with barium sulfate, elution with sodium citrate and removal of possible contamination of SP-A, followed by delipidation with 1-butanol.

The contents of SP-D and SP-A in lung lavage fluids and lung homogenates were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using anti-rat SP-D and anti-rat SP-A IgG. 99.1% of SP-A was

present in the 33,000×g pellet, whereas 71.1% of SP-D was in the 33,000×g supernatant. The total content of SP-D was 12.3% and 22.0% of that of SP-A in lavage fluids and lung homogenates, respectively.

The present study demonstrates that SP-D alters SP-A activity on type II cells through the interaction of SP-D with SP-A via SP-D-associated lipids and that SP-D is distributed differently from SP-A in the rat lung. (Received April 19, 1991 and accepted May 14, 1991)

**Key words:** Pulmonary surfactant, Surfactant protein D, Surfactant protein A, Surfactant secretion, Phospholipids

## 1 緒 言

肺サーファクタントは、肺胞II型細胞で合成され、肺胞腔へ分泌されて、その表面を覆い、気-液相界面の表面張力を低下させることにより、呼吸時の肺胞虚脱を防ぐ生理活性物質である<sup>1)</sup>。その約90%は脂質であるが<sup>2)</sup>、残りの約10%を4種類のサーファクタント蛋白質(surfactant protein, SP), SP-A, SP-B, SP-C及びSP-Dが占める。

主要サーファクタント蛋白質のSP-Aは親水性糖蛋白質であり、糖質結合能をもち<sup>3)</sup>、分子内にコラーゲン様構造を有する<sup>4,5)</sup>。SP-Aの機能として、肺胞II型細胞からのサーファクタントリン脂質分泌の抑制<sup>6-8)</sup>、及び肺胞II型細胞へのリン脂質リポソームの取り込みの促進<sup>9)</sup>などが報告されている。

最近4番目のサーファクタント蛋白質として報告されたSP-Dも親水性糖蛋白質であり<sup>10)</sup>、その分子内にコラーゲン様構造をもち<sup>10,11)</sup>、糖質、特に $\alpha$ -D-glucosyl残基を有する糖質に強く結合する<sup>12)</sup>。Persson *et al.*<sup>10,11)</sup>は肺胞II型細胞培養液中のSP-Dの存在を明らかにし、SP-Dが肺胞II型細胞で合成、分泌されることを示した。

本研究では、ラット肺洗浄液から糖質結合性を利用してnative SP-Dを分離し、これと、SP-Aの肺胞II型細胞におけるサーファクタント分泌及び受容体結合への影響を比較検討した。続いて、SP-Dをさらに精製し、これに対する抗体を作製して定量法を確立し、SP-Dの細胞内外における分布をSP-Aと比較した。これらの結果、SP-Dの存在様式及び機能についていくつかの新知見が得られたので報告する。

## 2 実験材料及び方法

### 2.1 ラット肺洗浄液及び肺ホモジネート画分の分離

Sprague-Dawley種雄ラット(体重200-250g)肺をbalanced salt solution(136mM NaCl, 5.3mM

KCl, 2.6mM sodium phosphate buffer, 1mg/ml グルコース, 10 $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを含む10mM Hepes buffer, pH 7.4)で灌流後、洗浄、細胞成分を除去し、肺洗浄液を得た。洗浄後の肺を摘出し、細切後、Polytron tissue homogenizer (Kriens/Lizern社)でホモジナイズし、Sonifier cell disrupter (Heat System Ultrasonics社)による超音波処理を行ない、肺ホモジネートを作製した。

### 2.2 SP-A及びSP-Dの分離、精製

#### 2.2.1 サーファクタント画分の分離及びSP-Aの精製

サーファクタント画分の分離はHawgood *et al.*<sup>13)</sup>の方法によった。Dethloff *et al.*<sup>14)</sup>の方法でラットの気道内に生理食塩水に懸濁した10mgのシリカを投与後、28日目に肺をlavaging buffer(154mM NaClを含む5mM Hepes buffer, pH 7.4)で洗浄し肺洗浄液を得た。150×g, 10分間遠心し、細胞成分を除去した後、5mMになるようにCaCl<sub>2</sub>を加え、33,000×g<sub>av</sub>で一晩遠心、この上清をSP-Dの分離に使用した。沈渣は1.64M NaBrを含むlavaging bufferに懸濁、氷冷下で1時間平衡化後、100,000×g<sub>av</sub>で一晩遠心した。ベリクルを同bufferで懸濁後、60,000×g<sub>av</sub>で2時間遠心し得られた沈渣をサーファクタント画分とした。SP-Aは、このサーファクタント画分より、Kuroki *et al.*<sup>15)</sup>の方法に従って精製した。

#### 2.2.2 Native SP-Dの分離

上記の33,000×g遠心上清を154mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>を含む5mM Tris-HCl(pH 7.4)で平衡化したmannose-Sepharose 6B affinity column<sup>16)</sup>に添加した。Mannose結合画分を154mM NaCl, 2mM EDTAを含む5mM Tris-HCl(pH 7.4)で溶出後、154mM NaClを含む5mM Tris-HCl(pH 7.4)で透析、EDTAを除去した。後述するように、この段階で電気泳動上検出される蛋白質はSP-Dのみであったので、この画分をnative SP-Dとした。

### 2・2・3 SP-Dの精製

Native SP-Dの懸濁液に2.5 mMになるようにクエン酸ナトリウムを加え、さらに、肺洗浄液の容積に対して2 mg/mlのBaSO<sub>4</sub>を添加後、室温で1時間攪拌した。10,000×g<sub>av</sub>, 20°Cで30分間遠心し、沈渣を154 mM NaCl, 2.5 mM クエン酸ナトリウムを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.4)に懸濁し、10,000×gで2回遠心洗浄し、BaSO<sub>4</sub>結合画分を200 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.4)で溶出した。次に、微量混在している可能性のあるSP-Aを除去する目的で、ラットSP-Aに対するモノクローナル抗体1D6<sup>6,15)</sup>をCNBr-activated Sepharose 4 B (Pharmacia社)にカップリングしたaffinity columnを通過させた。ついで、脱イオン水で透析後、その49倍容量の1-ブタノール内に注入、室温で1時間攪拌した。2,000×g, 30分間遠心後、不溶画分を窒素気流下に乾燥、154 mM NaClを含む5 mM Tris-HCl (pH 7.4)に懸濁し、同緩衝液で透析、SP-Dを精製した。

### 2・3 ラット肺胞II型細胞の分離及びphosphatidylcholine (PC)の分泌実験

肺胞II型細胞はDobbs and Mason<sup>17)</sup>の方法に準じ、エラストラーゼ(Worthington Biochemical社)処理後、非連続密度勾配遠心法により分離した。分離した細胞を10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Hazleton社)を含むDulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco社)に浮遊し、生存率及び細胞数を計測した。肺胞II型細胞2×10<sup>6</sup>個を0.5 μCi/mlの<sup>3</sup>H-choline (New England Nuclear Research社)と10% FCSを含むDMEM 2 mlに浮遊し、プラスチックディッシュ (直径3.5 cm, Falcon社)内で20時間、37°C, 5% CO<sub>2</sub>/airで培養後、1 mg/mlのbovine serum albumin (BSA, 生化学工業)を含むDMEM約10 mlで洗浄し、ディッシュに付着していない細胞と遊離<sup>3</sup>H-cholineを除去した。SP-A, SP-D, 及び12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA, Sigma社) (100 nM)存在下で、さらに3時間培養後、培養液上清及び細胞を採取した。ついで、Bligh and Dyer<sup>18)</sup>法で脂質抽出し、各々の抽出液中の放射活性を測定した。<sup>3</sup>H-PCの分泌は、% secretion (培養液の放射活性を、培養液及び細胞の放射活性の総和で割った値×100)として表した。

### 2・4 肺胞II型細胞受容体への<sup>125</sup>I-SP-Aのbinding assay

肺胞II型細胞2×10<sup>6</sup>個を10%FCSを含むDMEM中で20時間培養後、BSAを含むDMEMで洗浄した。

続いて、<sup>125</sup>I-SP-A 0.5または1.0 μg/ml及び非標識SP-A, またはSP-Dを加えた後、37°C, 5%CO<sub>2</sub>/airで5時間培養した。その後、氷冷 washing buffer (100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSAを含む50 mM Tris-HCl, pH 7.4)で3回洗浄、非結合<sup>125</sup>I-SP-Aを除去した。ついで0.1 N NaOH 1 mlを加え、室温で10分間放置後、溶解した細胞を採取し、細胞受容体へ結合した<sup>125</sup>I-SP-Aの放射活性を測定した。<sup>125</sup>I-SP-AはBolton and Hunter<sup>19)</sup>の方法で作製した。

### 2・5 SP-Dに対する<sup>125</sup>I-SP-Aのbinding assay

0.2~4.0 μgのSP-Dをスポットしたニトロセルロース膜 (1×1 cm)を、binding buffer (100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mg/ml BSAを含む50 mM Tris-HCl, pH 7.4)中で30分間、インキュベートした。<sup>125</sup>I-SP-A (2 μg/ml)を含むbinding bufferと共にさらに2時間インキュベート後、washing bufferで洗浄し、ニトロセルロース膜上のSP-Dに結合した<sup>125</sup>I-SP-Aの放射活性を測定した。

### 2・6 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)によるnative SP-Dの分析

脱脂前後のnative SP-DをHPLCにより分析した。逆相C1カラム (0.46×7.5 cm, 東ソー社)を装着した655 A-11 Liquid chromatograph (日立社製)を用いて、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0%から100%のアセトニトリル直線濃度勾配により、流速0.5 ml/minで溶出し、215 nmで溶出物質を検出した。

### 2・7 Native SP-Dのブタノール可溶性画分の分析

Native SP-Dのブタノール可溶性画分を、ヘキサン/エーテル/酢酸 (85:15:0.5, v/v)の溶媒系を用いた一次元薄層クロマトグラフィーで分析した。リン脂質は、Esko and Raetz<sup>20)</sup>による二次元薄層クロマトグラフィーで分析し、リンの量はBartlett<sup>21)</sup>法で測定した。

### 2・8 抗SP-Aまたは抗SP-D抗体の作製

精製ラットSP-DまたはSP-A 100 μgを、同容量のFreund's complete adjuvant (Difco社)と混合し、emulsionを作製し、White New Zealand種ウサギ大腿部の筋肉内に投与した。14日後に同量をFreund's incomplete adjuvantと共に筋肉内に投与した。28日後に同量のSP-DまたはSP-Aを筋肉内に投与した。その8日後に採血し抗血清を得た。各々の抗血清からProtein A-Sepharose CL 4 B (Pharmacia社) columnを用いてIgGを精製した。

## 2・9 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動法 (SDS-PAGE) 及び Western blotting

精製した各蛋白質の確認の目的で, Laemmli<sup>22)</sup>の方法による SDS-PAGE にて分析した. また, 上記抗血清の特異性を検討する目的で, Towbin *et al.*<sup>23)</sup>の方法に準じ Western blotting を行なった.

## 2・10 SP-D 及び SP-A の定量

Ogasawara *et al.*<sup>24)</sup>による抗ラット SP-D IgG を用いたサンドイッチ ELISA 法により, SP-D の定量を行なった. SP-A の定量は, Shimizu *et al.*<sup>25)</sup>の方法と同様に行なった.

## 2・11 その他の分析法

蛋白質の定量は Lowry 法<sup>26)</sup>により BSA を標準として行なった.

## 3 成 績

### 3・1 Native SP-D の分離

ラット肺洗浄液の 33,000×g 遠心上清から, Ca<sup>2+</sup>存在下で mannose affinity column に結合し EDTA で溶出された画分には, 電気泳動上, 43 kDa の蛋白質バンドのみが検出された (Fig. 1, lane D). この 43 kDa 蛋白質は, Persson *et al.*<sup>10)</sup>が報告した SP-D の電気泳動上の移動度と一致した. この 43 kDa 蛋白質画分を本論文では "native SP-D" と呼ぶことにする.

### 3・2 SP-A の生物活性に対する native SP-D の影響

肺胞 II 型細胞からの <sup>3</sup>H-PC 分泌に対する SP-A と native SP-D の影響を比較検討した (Table 1). 基礎

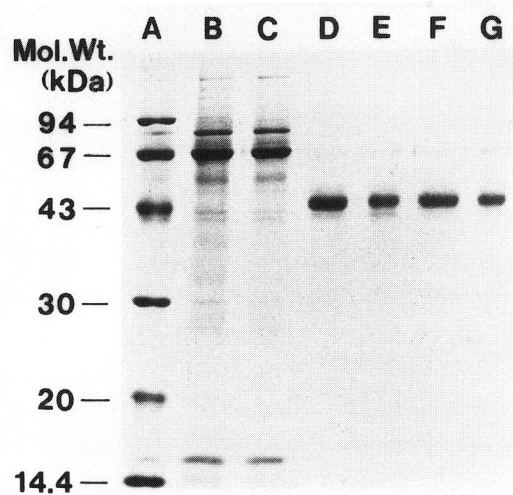


Fig. 1 Electrophoretic analysis showing purification of SP-D. Proteins were resolved by SDS-PAGE on 5%/13% gel under reducing conditions, and stained with Coomassie brilliant blue. Lane A; molecular weight standards, lane B; supernatant of lavage fluids after removal of cell debris, lane C; supernatant of lavage fluids centrifuged at 33,000×g<sub>av</sub>, lane D; proteins bound to mannose-Sepharose column and eluted with EDTA (=native SP-D), lane E; proteins eluted from BaSO<sub>4</sub> with sodium citrate buffer, lane F; proteins passed through 1D6-Sepharose column, lane G; final purified SP-D after delipidation with 1-butanol.

分泌値 (1.3±0.4%) 及び, TPA で促進された分泌 (15.0±3.0%) に対して, native SP-D の影響は認め

Table 1 Native SP-D reduces the inhibitory effect of SP-A on lipid secretion by alveolar type II cells in a dose dependent manner

Additions	% secretion of <sup>3</sup> H-phosphatidylcholine <sup>a</sup>	n
None	1.3±0.4	6
Native SP-D(3.0 µg/ml)	1.6±0.6	6
TPA(100 nM)	15.0±3.0	6
Native SP-D(3.0 µg/ml)+TPA	14.0±2.4	6
SP-A(1.0 µg/ml)+TPA	1.7±0.6	6
Native SP-D(0.1 µg/ml)+SP-A(1.0 µg/ml)+TPA	1.8±0.4	4
Native SP-D(1.0 µg/ml)+SP-A(1.0 µg/ml)+TPA	2.9±1.0 <sup>b</sup>	4
Native SP-D(3.0 µg/ml)+SP-A(1.0 µg/ml)+TPA	5.3±1.1 <sup>c</sup>	6
Native SP-D(6.0 µg/ml)+SP-A(1.0 µg/ml)+TPA	5.6±0.5 <sup>c</sup>	4

<sup>a</sup> Results are expressed as percentage of <sup>3</sup>H-phosphatidylcholine secreted(mean±S.D.) by alveolar type II cells

<sup>b</sup> p<0.05 when compared to SP-A+TPA

<sup>c</sup> p<0.001 when compared to SP-A+TPA

られなかった。SP-A はすでに報告されている<sup>6)</sup>ように、TPA で促進された <sup>3</sup>H-PC の分泌を  $1.7 \pm 0.6\%$  と強く抑制した。これに SP-D を  $3 \mu\text{g/ml}$  の濃度で添加すると、分泌は有意に増加 ( $5.3 \pm 1.1\%$ ) し、SP-A による PC 分泌抑制効果を減少させた。この native SP-D による抑制作用は、SP-D の濃度に依存して増強した。次に、<sup>125</sup>I-SP-A の肺胞 II 型細胞受容体への結合に対する native SP-D の影響を検討した。Native SP-D は、過剰の非標識 SP-A と同様に、<sup>125</sup>I-SP-A の肺胞 II 型細胞への結合を濃度依存性に抑制した (Fig. 2)。すなわち、native SP-D による SP-A の生物活性の抑制は、肺胞 II 型細胞受容体への SP-A の結合に対する阻害によって生ずると思われた。

### 3.3 Native SP-D と SP-A の相互作用

Native SP-D の SP-A 生物活性の抑制効果に影響する因子を検討した (Fig. 3)。SP-A+TPA 添加時における <sup>3</sup>H-PC 分泌の % secretion を 100% として比較検討した。Native SP-D の添加により、% secretion は約 2.3 倍に増加し (Fig. 3, B)、SP-A の生物活性を抑制した。同量の native SP-D を  $100^\circ\text{C}$  で 10 分間、加熱処理した時 (Fig. 3, C)、及び抗 SP-D IgG 添加時 (Fig. 3, D) には、% secretion が各々、control の 1.4 倍、及び control と同値となり、native SP-D による抑制は減弱した。ブタノール抽出後の SP-D は SP-A の生物活性を抑制せず (Fig. 3, F)、これに対し native

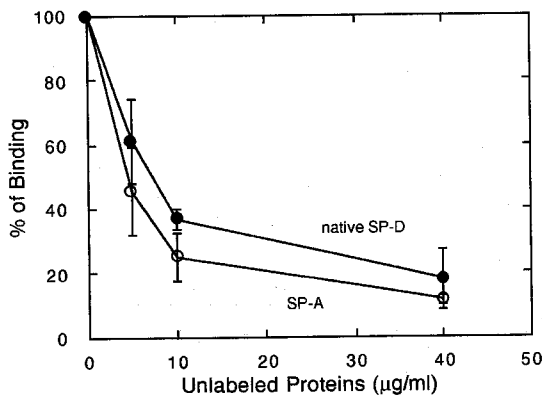


Fig. 2 The effect of SP-A and native SP-D upon high affinity binding of <sup>125</sup>I-SP-A to type II cells. Type II cells were incubated with  $1 \mu\text{g/ml}$  of <sup>125</sup>I-SP-A in the presence of 0 to  $40 \mu\text{g/ml}$  of unlabeled SP-A or SP-D, and the amount of <sup>125</sup>I-SP-A bound to cells was determined. Values are expressed as percentage of labeled SP-A in the absence of unlabeled proteins (mean  $\pm$  S. D.,  $n=4$ ). The bound SP-A was  $87.6 \pm 17.2 \text{ ng/dish}$ .

SP-D からのブタノール可溶性画分は、ブタノール抽出前の native SP-D と同程度に SP-A の生物活性を抑制した (Fig. 3, G)。このブタノール抽出後の SP-D は、非標識 SP-A 及び native SP-D と異なり、<sup>125</sup>I-SP-A の肺胞 II 型細胞受容体への結合を抑制しなかった (Fig. 4)。ニトロセルロース膜上での SP-A と SP-D の相互作用の検討では、<sup>125</sup>I-SP-A は非標識 SP-A 及びブタノール抽出後の SP-D に結合しなかったが、native SP-D には濃度依存性に結合した (Fig. 5)。以上の結果、native SP-D による SP-A の肺胞 II 型細胞受容体への結合の阻害は、native SP-D からブタノールで抽出される画分によって惹起されると考えられた。

### 3.4 Native SP-D のブタノール可溶性画分の分析

Native SP-D を C1 逆相カラムを用いた HPLC で分析した結果、Fig. 6-A に示すように 2 つの peak (a と b) が認められた。SDS-PAGE による分析で、peak b は  $43 \text{ kDa}$  の単一蛋白質バンドを示したが、peak a は明らかな蛋白質バンドを認めなかった。ブタノール抽

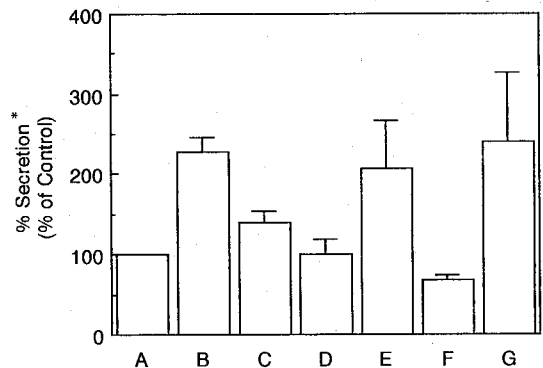


Fig. 3 Factors influencing the effect of native SP-D upon the inhibition of <sup>3</sup>H-PC secretion by SP-A.

\* The value of SP-A ( $1.0 \mu\text{g/ml}$ ) + TPA ( $100 \text{ nM}$ ) was taken as control (100%). % secretion of control was  $1.5 \pm 0.1\%$  (mean  $\pm$  S. D.,  $n=3$ ). Values are expressed as percentage of control.

A; control.

B; A. + native SP-D ( $3.0 \mu\text{g/ml}$ ).

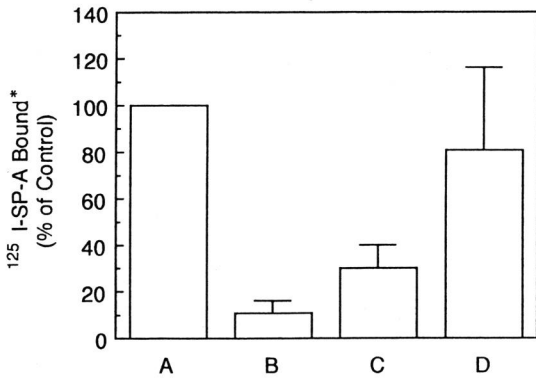
C; A. + heat-treated native SP-D ( $3.0 \mu\text{g/ml}$ ). Native SP-D was treated at  $100^\circ\text{C}$  for 10 min.

D; A. + anti-SP-D IgG ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) + native SP-D.

E; A. + control IgG + native SP-D.

F; A. + butanol-extracted SP-D ( $3.0 \mu\text{g/ml}$ ).

G; A. + butanol-soluble fraction from native SP-D.  $2.0 \text{ nmol/ml}$  of phospholipid was used.

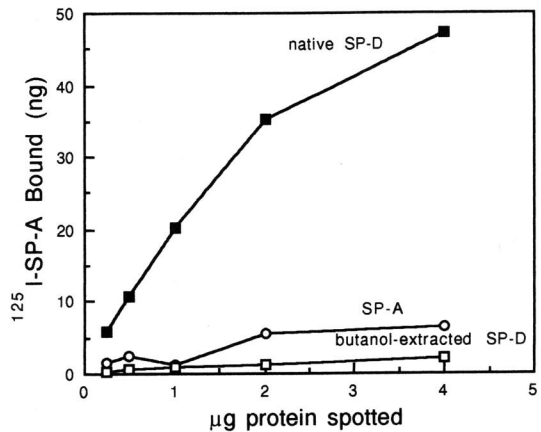


**Fig. 4** The effect of butanol extraction of native SP-D upon binding of <sup>125</sup>I-SP-A to type II cells. Type II cells were incubated with 0.5 μg/ml of <sup>125</sup>I-SP-A in the absence or presence of proteins.

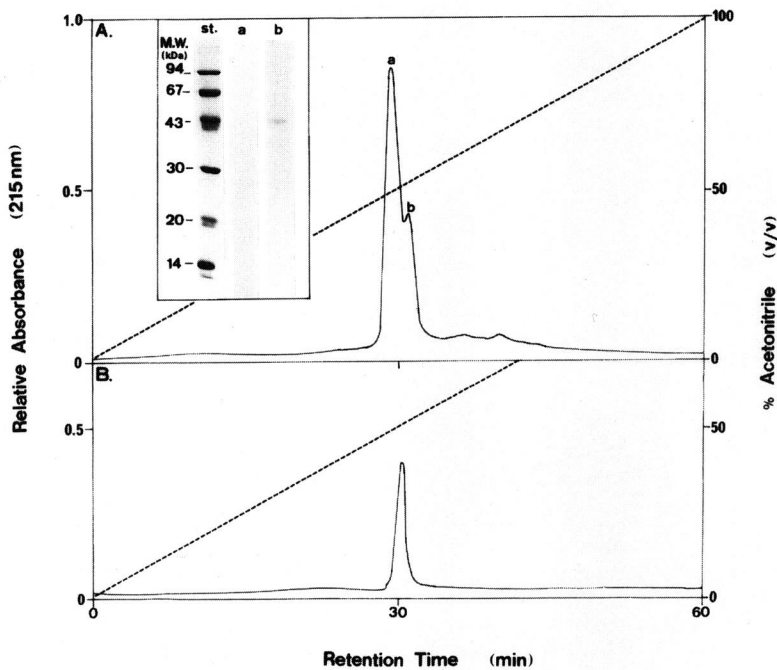
\* The value of <sup>125</sup>I-SP-A bound to type II cells without any addition was taken as control (100%). The bound SP-A of control was 55.4 ± 10.1 ng/dish (mean ± S.D., n=3).

Values are expressed as percentage of control. 20 μg/ml of each protein was used.

A : Control    B : Unlabeled SP-A  
 C : Native SP-D  
 D : Butanol-extracted SP-D



**Fig. 5** <sup>125</sup>I-SP-A binding to native SP-D. <sup>125</sup>I-SP-A (2 μg/ml) binding on nitrocellulose sheets, in which there was 0.2 to 4 μg of either native SP-D, butanol-extracted SP-D or SP-A, was performed, and the radioactivity bound to each nitrocellulose sheet was determined.



**Fig. 6** Analysis of native SP-D by high-performance liquid chromatography (HPLC). Native SP-D was isolated by column chromatography with mannose-Sepharose 6 B from the supernatant of the lavage fluids obtained by overnight centrifugation at 33,000 × g. Native SP-D was analyzed before (panel A) and after (panel B) butanol extraction by reverse-phase HPLC and eluted with a linear gradient of 0-100% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 0.5 ml/min. Absorbance at 215 nm is shown as a solid line. In panel A, the eluted fractions (peaks a and b) were further analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions (lanes a and b, respectively) and stained with Coomassie brilliant blue.

出後の SP-D は peak b に一致する単一 peak を示した (Fig. 6-B).

Peak a は蛋白質ではなく脂質と考えられた. Peak a の一次元薄層クロマトグラフィーによる脂質分析では, リン脂質が主要構成脂質であり, 他にコレステロール, コレステロールエステル, 遊離脂肪酸, トリグリセリドが認められた. Native SP-D には, SP-D 1 mg あたり  $745 \pm 186$  nmol (SP-D 1 mol 当たり  $32.0 \pm 8.0$  mol) (mean  $\pm$  S. D.,  $n=4$ ) のリン脂質が結合していた. そのリン脂質組成は肺サーファクタントと同じく phosphatidylcholine (PC) が主要成分であり, 約 85% を占めた (Table 2).

### 3.5 SP-D の精製

以上の結果, native SP-D には, 脂質の混在が認められたので, これをさらに精製した. すなわち, native SP-D の BaSO<sub>4</sub> への吸着及びクエン酸ナトリウムによる溶出を行ない, 続いて微量混在の可能性が否定できない SP-A を除去する目的で, SP-A に対するモノクローナル抗体をリガンドとした affinity column を通過せしめ, 1-ブタノールにより脱脂を行なった. 各精製段階の SDS-PAGE 分析では, いずれも 43 kDa の単一なバンドを示した (Fig. 1). 精製 SP-D を抗原として

**Table 2** Composition of phospholipids associated with native SP-D

Phospholipids	Composition (mol %)
Phosphatidylcholine	84.8
Phosphatidylinositol	7.3
Phosphatidylglycerol	1.6
Phosphatidylethanolamine	1.4
Sphingomyelin	1.3
Lysophosphatidylcholine	1.0
Phosphatidylserine	trace
Others	2.4

Values (% phosphorus) are means for two different preparations of native SP-D.

**Table 3** Contents of SP-D and SP-A in lavage fluids and homogenate of rat lung

	Lung lavage fluids ( $\mu$ g/rat)		Lung homogenate ( $\mu$ g/rat)
	Supernatant <sup>a</sup>	Pellet <sup>a</sup>	
SP-D	$8.45 \pm 0.69$ (71.1)	$2.86 \pm 0.74$ (28.9)	$46.13 \pm 1.64$
SP-A	$0.79 \pm 0.50$ (0.9)	$90.86 \pm 31.07$ (99.1)	$209.84 \pm 6.55$

Values are means  $\pm$  S. E. for three different preparations.

Values in parentheses represent % of content of each protein.

<sup>a</sup> Supernatant and pellet were obtained from lung lavage fluids by overnight centrifugation at  $33,000 \times g_{av}$ .

作製した抗血清は, SP-D と特異的に反応し, SP-A を含む他の蛋白質とは反応しなかった (data は示さない).

### 3.6 肺洗浄液中の SP-D, SP-A 量

肺洗浄液の  $33,000 \times g$  遠心上清と沈渣, それぞれの画分に含まれる SP-D と SP-A を定量した (Table 3). SP-A はラット一匹の肺洗浄液中に,  $91.65 \pm 31.15$   $\mu$ g (mean  $\pm$  S. E.,  $n=3$ ) 含まれており, その 99.1% が沈渣画分に存在した. 一方, 肺洗浄液中の SP-D 量は  $11.31 \pm 0.43$   $\mu$ g で, SP-A の約 1/8 であり, SP-A とは逆に上清画分に 71.1% が存在し, SP-D と SP-A の肺胞腔内存在様式の明らかな違いが認められた.

### 3.7 肺ホモジネート中の SP-D, SP-A 含量

ラット一匹の肺ホモジネート中の SP-D, SP-A 含量を測定した (Table 3). SP-A は  $209.84 \pm 6.55$   $\mu$ g であったのに対し, SP-D は  $46.13 \pm 1.64$   $\mu$ g と, SP-A の約 1/5 であり, 肺洗浄液における両蛋白質の量比とは異なっていた.

## 4 考 察

SP-D は肺胞 II 型細胞により合成, 分泌される親水性糖蛋白質であり, その分子内には Gly-X-Y の反復構造 (コラーゲン様構造) が存在する<sup>10,11</sup>. また, 糖質結合能を有し, Ca<sup>2+</sup> の存在下で特に  $\alpha$ -D-glucosyl 残基を有する糖質と強く結合する<sup>12</sup>. SP-D は以上の性状において, 主要サーファクタント蛋白質の SP-A と共通性をもつ<sup>3-5</sup>. SP-A は肺胞 II 型細胞からのサーファクタント分泌の抑制<sup>6-8</sup>) 及び肺胞 II 型細胞へのリン脂質取り込み促進<sup>9</sup>) 作用をもち, この両作用の発現には, コラーゲン様構造が必須と考えられている<sup>27</sup>. SP-A といくつかの共通性をもつ SP-D の生理的意義は現在全く不明である. 本研究は, native SP-D と SP-A の生物活性を比較検討することにより, SP-D の生理的意義を検索した.

ラット肺洗浄液の  $33,000 \times g$  遠心上清から, SP-D の糖質結合能を利用して mannose-Sepharose column

により native SP-D を分離した。Native SP-D は SP-A と異なり、肺胞 II 型細胞からの PC 分泌を抑制せず、逆に SP-A による PC 分泌の抑制作用を濃度依存性に抑制した。また、 $^{125}\text{I}$ -SP-A の肺胞 II 型細胞受容体<sup>28,29)</sup>への結合は、native SP-D の濃度に依存して抑制された。この結果から、肺胞 II 型細胞受容体への SP-A の結合が、native SP-D の存在により阻害され、SP-A 受容体を介する PC 分泌の抑制効果<sup>15)</sup>の発現が阻害されることが考えられる。以上の事実から、1) native SP-D は肺胞 II 型細胞上の SP-A 受容体、あるいはその近傍に結合することにより、SP-A と肺胞 II 型細胞との結合を阻害している、2) native SP-D は SP-A と結合し、SP-A 分子の受容体結合部位をブロックする、という二つの仮説が考えられた。これらの仮説を検証する目的で、native SP-D による SP-A 生物活性抑制の機構を検討した。肺胞 II 型細胞からの PC 分泌は、native SP-D からのブタノール可溶性画分を添加すると、native SP-D 存在時とほぼ同程度に SP-A の生物活性を抑制し、逆にブタノール抽出後の SP-D は、SP-A の生物活性に全く影響を及ぼさなかった。以上の結果は、native SP-D に含まれるブタノール可溶性画分が、SP-D の作用に重要な関連があることを示している。Native SP-D は $^{125}\text{I}$ -SP-A の肺胞 II 型細胞への結合を抑制し、 $^{125}\text{I}$ -SP-A と濃度依存性に結合した。この事実から、native SP-D による SP-A 生物活性の抑制は、native SP-D ブタノール可溶性画分と SP-A が結合することにより、SP-A の受容体結合部位がブロックされ、肺胞 II 型細胞への SP-A の結合が阻害されたために生じたものと考えられた。

SP-A の生物活性に影響を与えた native SP-D ブタノール可溶性画分を HPLC で分析すると、ブタノール可溶性画分とブタノール抽出後の SP-D は明らかに分離した。ブタノール可溶性画分は、リン脂質を主要構成成分とする脂質であった。そのリン脂質組成では PC が約 85% であり、サーファクタントのリン脂質同様、PC が主成分であった。また、phosphatidylinositol (PI) の比率が高く、phosphatidylglycerol (PG) は低かった (PG/PI 比は 0.22) が、これはシリカ処理による影響と考えられる<sup>30)</sup>。最近、Kuroki and Akino<sup>31)</sup> は SP-A が dipalmitoyl-PC と特異的に結合することを報告した。Native SP-D に結合する PC 中の飽和型分子種比率は分析できなかったが、native SP-D に結合している PC に SP-A が結合することにより、SP-A の肺胞 II 型細胞受容体への結合阻害が惹起されたと考えられる。

加熱処理により変性した native SP-D は部分的に SP-A の活性を抑制し、抗 SP-D IgG 存在下でこの SP-D の抑制能が阻害された。つまり、native SP-D の活性発現にペプチド領域も一部関与していることが考えられた。すなわち、加熱処理、あるいは IgG 添加により native SP-D に結合する脂質が立体的にブロックされた可能性も否定できない。しかしながら、native SP-D より抽出した脂質が、抽出前の native SP-D とほぼ同程度の活性があったことを考えると、SP-A の生物活性の抑制には SP-D 結合脂質の関与が主であろうと考えられる。すなわち、33,000×g 遠心後の上清画分に存在する native SP-D は、脂質を結合し、この脂質 (おそらくは PC) が、native SP-D の生物活性発現にきわめて重要な意義を持つことが示唆される。

ついで、native SP-D から、SP-D の精製を試みた。SP-D の精製に関しては、Persson *et al.*<sup>11,12)</sup> の方法、すなわち、肺洗浄液を 48,000×g<sub>av</sub> で 30 分間、遠心後の沈渣から、EDTA により SP-A 及び SP-D を抽出し、BaSO<sub>4</sub> への吸着、及びクエン酸ナトリウムによる溶出後、Bio-Gel A 15 m を用いたゲル濾過を行なう方法が報告されている。我々は、肺洗浄液の 33,000×g 遠心後の上清から、糖質結合能を利用し、mannose-Sepharose column により native SP-D を分離した。肺洗浄液中の SP-D、SP-A 各々の定量の結果から考えると、この 33,000×g 遠心後の上清を用いたことで、SP-D の収量を上げ、そして、SP-A の混在を最小限にすることができたと考えられる。続いて、BaSO<sub>4</sub> への吸着及びクエン酸ナトリウムによる溶出を行なった。その後、微量の混在が否定できない SP-A 除去の目的で、抗ラット SP-A モノクローナル抗体をリガンドとした affinity column を通過させ、SP-A を除去した。SP-A は 33,000×g 遠心後の上清に微量 (0.9%) 存在しており、SP-A を除去する必要があると考えられる。この方法で精製した SP-D に対するポリクローナル抗体は、immunoblotting で SP-A を認識しなかったため、この精製過程により SP-A は完全に除去されたと思われる。続いて、1-ブタノールによる脱脂を行ない精製 SP-D が得られた。Persson *et al.*<sup>11,12)</sup> も可溶性画分から SP-D を分離しているが、SP-D に結合している脂質に関する記載は認められず、本研究ではじめて指摘した。

抗 SP-D 抗体を用いた ELISA で SP-D 量を測定し、SP-A 量との比較を行なった。肺洗浄液 SP-D の大部分 (71.1%) は 33,000×g 遠心後の上清に認められた。この結果は、Persson *et al.*<sup>11)</sup> が報告した結果と一致した。一方、SP-A はその約 99.1% が 33,000×g 遠心後



の沈渣に存在しており、肺洗浄液の33,000×g遠心後の可溶性、不溶性各画分に含まれる両蛋白質量の割合の差が明らかになった。肺ホモジネート中のSP-AとSP-Dの比は約5:1であったが、肺洗浄液中の両蛋白質の比は約8:1であった。この結果は、両蛋白質の細胞内外における分布の差を示すものと考えられる。

可溶性画分に存在するSP-Dは脂質を結合しているが、このSP-Dの状態がnativeなSP-Dの存在形態と考えられる。SP-DとSP-Aとの結合にはこの脂質が必須であると思われた。SP-Dの生理的意義は現在全く不明であるが、本研究はSP-Dの分離精製の各段階における機能をSP-Aと比較することにより、はじめてSP-Dの生理的意義、つまり結合脂質の重要性を指摘した。またSP-DとSP-Aの肺内分布の違いを明らかにすることにより、両蛋白質の生理的役割の違いを示唆し得た。今後さらに、SP-Dの肺内分布を詳細に検討することが必要である。

## 5 結 論

Native SP-Dをラット肺洗浄液より分離し、肺胞II型細胞におけるサーファクタント分泌に及ぼす影響を検討し、次いでSP-Dを精製、その肺内分布を検討し、以下に示す結論を得た。

1. 糖質結合能を利用してnative SP-Dを分離し、肺胞II型細胞からのPC分泌に対する影響を検討した。Native SP-Dは、SP-AによるPC分泌の抑制作用を有意に抑制した。これは、native SP-DとSP-Aが結合した結果、SP-Aの肺胞II型細胞受容体への結合が抑制されたために発現したと考えられた。SP-Aとnative SP-Dの結合は、native SP-Dのブタノール可溶性画分、すなわち脂質を介した結合であることが示唆された。
2. Native SP-Dのブタノール抽出脂質は、リン脂質が主成分であった。また、SP-D 1 molにリン脂質は約32 mol結合しており、その約85%はPCであった。
3. Native SP-Dをさらに精製した。Native SP-Dを、BaSO<sub>4</sub>へ吸着せしめ、クエン酸ナトリウムで溶出し、SP-Aに対するモノクローナル抗体をリガンドとしたaffinity columnを通過せしめ、最後に1-ブタノールで脱脂、精製SP-Dを得た。この精製SP-Dに対する抗体は、SP-Dを特異的に認識した。
4. 肺洗浄液の33,000×g遠心上清と沈渣に含まれるSP-DとSP-Aの比率は明らかに異なっていた。肺洗浄液中のSP-DはSP-Aの約1/8であった。一方、肺ホモジネート中のSP-DはSP-Aの約1/5であり、細胞

内外におけるSP-A、SP-Dの分布は異なっていることが示唆された。

5. SP-Dは、脂質と結合した状態が生理的存在形態と考えられ、本研究で示したSP-Aの生物活性の抑制が、native SP-Dの機能の一つであることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきまして本学生化学第1講座秋野豊明教授ならびに同内科学第3講座鈴木明教授に深謝致します。また本研究に御協力いただきました本学生化学第1講座教室員各位に感謝致します。

## 文 献

1. King, R. J. and Clements, J. A.: Surface active materials from dog lung. I. Method of isolation. *Am. J. Physiol.* **223**, 707-714 (1972).
2. King, R. J. and Clements, J. A.: Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiol.* **223**, 715-726 (1972).
3. Haagsman, H. P., Hawgood, S., Sargeant, T., Buckley, D., White, R. T., Drickamer, K. and Benson, B. J.: The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 13877-13880 (1987).
4. White, R. T., Damm, D., Miller, J., Spratt, K., Schilling, J., Hawgood, S., Benson, B. and Cordell, B.: Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* **317**, 361-363 (1985).
5. Benson, B., Hawgood, S., Schilling, J., Clements, J., Damm, D., Cordell, B. and White, R. T.: Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6379-6383 (1985).
6. Kuroki, Y., Mason, R. J. and Voelker, D. R.: Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 3388-3394 (1988).
7. Rice, W. R., Ross, G. F., Singleton, F. M., Dingle, S. and Whitsett, J. A.: Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J. Appl. Physiol.* **63**, 692-698 (1987).
8. Dobbs, L. G., Wright, J. R., Hawgood, S., Gonzalez, R., Venstrom, K. and Nellenbogen, J.:

- Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**, 1010-1014 (1987).
9. Wright, J. R., Wager, R. E., Hawgood, S., Dobbs, L. and Clements, J. A.: Surfactant apoprotein  $M_r=26,000-36,000$  enhances uptake of liposomes by type II cells. **J. Biol. Chem.** **262**, 2888-2894 (1987).
  10. Persson, A., Rust, K., Chang, D., Moxley, M., Longmore, W. and Crouch, E.: CP4: A pneumocyte-derived collagenous surfactant-associated protein. Evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins. **Biochemistry** **27**, 8576-8584 (1988).
  11. Persson, A., Chang, D., Rust, K., Moxley, M., Longmore, W. and Crouch, E.: Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. **Biochemistry** **28**, 6361-6367 (1989).
  12. Persson, A., Chang, D. and Crouch, E.: Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. **J. Biol. Chem.** **265**, 5755-5760 (1990).
  13. Hawgood, S., Benson, B. J. and Hamilton, R. L., Jr.: Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. **Biochemistry** **24**, 184-190 (1985).
  14. Dethloff, L. A., Gilmore, L. B., Brody, A. R. and Hook, G. E. R.: Induction of intra- and extracellular phospholipids in the lungs of rats exposed to silica. **Biochem. J.** **233**, 111-118 (1986).
  15. Kuroki, Y., Mason, R. J. and Voelker, D. R.: Chemical modification of surfactant protein A alters high affinity binding to rat alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion. **J. Biol. Chem.** **263**, 17596-17602 (1988).
  16. Fornstedt, N. and Porath, J.: Characterization studies on a new lectin found in seeds of *VICIA ERVILIA*. **FEBS Lett.** **57**, 187-191 (1975).
  17. Dobbs, L. G. and Mason, R. J.: Pulmonary alveolar type II cells isolated from rats. **J. Clin. Invest.** **63**, 378-387 (1979).
  18. Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** **37**, 911-917 (1959).
  19. Bolton, A. E. and Hunter, W. M.: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$ -containing acylating agent. **Biochem. J.** **133**, 529-539 (1973).
  20. Esko, J. D. and Raetz, C. R. H.: Mutants of Chinese hamster ovary cells with altered membrane phospholipid composition. **J. Biol. Chem.** **255**, 4474-4480 (1980).
  21. Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.** **234**, 466-468 (1959).
  22. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685 (1970).
  23. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**, 4350-4354 (1979).
  24. Ogasawara, Y., Kuroki, Y., Shiratori, M., Shimizu, H., Miyamura, K. and Akino, T.: Ontogeny of surfactant apoprotein D, SP-D, in the rat lung. **Biochim. Biophys. Acta** **1083**, 252-256 (1991).
  25. Shimizu, H., Miyamura, K. and Kuroki, Y.: Appearance of surfactant proteins, SP-A and SP-B, in developing rat lung and the effects of in vivo dexamethasone treatment. **Biochim. Biophys. Acta** **1081**, 53-60 (1991).
  26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**, 265-275 (1951).
  27. Akino, T., Murata, Y., Miyamura, K. and Kuroki, Y.: Structural and functional diversity of non-collagenous domain of surfactant protein A (Abstract). **Am. Rev. Respir. Dis.** **141**, A698 (1990).
  28. Kuroki, Y., Mason, R. J. and Voelker, D. R.: Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 5566-5570 (1988).
  29. Wright, J. R., Borchelt, J. D. and Hawgood, S.: Lung surfactant apoprotein SP-A(26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 5410-5414 (1989).
  30. Adachi, H., Hayashi, H., Sato, H., Dempo, K. and Akino, T.: Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. **Biochem. J.** **262**, 781-786 (1989).
  31. Kuroki, Y. and Akino, T.: Pulmonary surfactant protein A(SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine.

**J. Biol. Chem.** 266, 3068-3073 (1991).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第3講座 白鳥正典