

肺サーファクタント関連糖蛋白質 (SP 36) の細胞内局在

高橋 弘毅

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

黒木 由夫*

札幌医科大学学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

Intracellular Localization of Pulmonary Surfactant- Associated Glycoproteins (SP 36)

Hiroki TAKAHASHI

Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. Suzuki)

Yoshio KUROKI*

Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Akino)

The 36 kDa glycoproteins (SP 36) are the main apoprotein components in pulmonary surfactant and are known to have structural heterogeneity due to their different carbohydrate chains. The present study was performed to elucidate the relationship between structure and metabolism of the SP 36.

Human lung tissues were fractionated into six subfractions by discontinuous sucrose density gradient centrifugation. The fractions of human lung, in order of increasing density, consisted of lamellar bodies (Fr. I and II), extracellular surfactant and intracellular small vesicles (Fr. III and IV) and endoplasmic reticulum (Fr. V) as shown by electron microscopy, lipid analysis and marker enzyme assays.

Electrophoresis of the proteins in the fractions revealed that the lamellar bodies and endoplasmic reticulum distinctly differed in their protein components of SP 36. The former contained 34 kDa protein, while the latter contained 37 kDa proteins as the major SP 36. Fr. III and IV contained both proteins with more 34 kDa protein than 37 kDa. By two-dimensional electrophoresis, they were separated to 6-8 iso-proteins. The 37 kDa proteins consisted of more acidic proteins and the 34 kDa proteins were more basic proteins. These 34 kDa proteins in all the fractions were stained by the immunoblot method using a monoclonal antibody (PE 10) to human SP 36. When both 34 kDa and 37 kDa proteins were treated by N-glycosidase F, the reaction product was 30 kDa protein which could also be stained by the immunoblot method.

These results suggest that the 37 kDa glycoprotein may be primarily synthesized from the 30 kDa core protein in the endoplasmic reticulum of alveolar Type II cells and may be processed to the 34 kDa glycoprotein during the transfer from endoplasmic reticulum to lamellar bodies.

(Received September 14, 1987 and accepted September 27, 1987)

Key words: Pulmonary surfactant, Surfactant apoprotein, Glycoprotein, Lamellar bodies, Human lung

* 現所属. Present address: Pulmonary Division, Department of Medicine, National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, U. S. A. (Chief: Prof. R. J. Mason)

1 緒 言

成熟動物の肺胞には肺表面活性物質（肺サーファクタント）が存在する。この物質は、肺胞表面の気-液界面に配列することによって、呼吸相に生じる強い表面張力に抗し、肺胞虚脱を防止する生理作用をもつ¹⁾。肺サーファクタントの約90%はジパルミトイル・ホスファチジルコリン(DPPC)、ホスファチジルグリセロール(PG)を主成分とする脂質であり²⁾、これらが表面張力低下作用における中心的役割を担っていることは疑いがない。

一方、肺サーファクタントには固有の蛋白質が含まれており^{3,4)}、この蛋白質は、肺サーファクタント関連蛋白質あるいは肺サーファクタント・アポ蛋白質(SP)と呼ばれている。SPは肺サーファクタントの約10%を占め¹⁾、肺サーファクタントの代謝機構、生理活性発現並びに層状封入体(肺サーファクタントの細胞内形態)の構造保持に、何らかの役割を担っていると考えられる。特に、表面張力の低下作用の主役はリン脂質であるが、アポ蛋白も表面張力低下作用の発現に必須の補助因子であることが示されている^{5,6)}。最近SPは、幾つかの蛋白質から成ることが示されてきた。主たるSPは、報告者により、また動物種によって分子量に若干の差はあるが、約30-40 kDaの範囲に幅広く分布するいわゆる36 kDa糖蛋白質(SP 36)である^{3,4,7-9)}。この他に、SP 36と同一の抗原性を有する62 kDa蛋白質⁷⁾や、15 kDa¹⁰⁾、10 kDa^{4,11)}、5-6 kDa¹²⁻¹⁴⁾といった低分子量のSPが報告されているが、これらのアポ蛋白とSP 36との構造的、代謝的関係は明らかではない。また、どのアポ蛋白が、表面張力低下作用の発現に必須であるのかについても、議論の一致をみていない。

ヒト¹⁵⁾及びイヌ¹⁶⁾におけるSP 36のペプチド部分(30-32 kDa)の一次構造は、相当するcDNAの塩基配列から決定された。そのペプチドのC末側のアスパラギン残基に糖鎖がN-グリコシド結合しているため、SP 36は糖鎖長の違いにより幅広い分子量を示すものと思われる。著者ら¹⁷⁾は、肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)からSP 36を分離し、その単クローン抗体(PE 10, PC 6)を作製した。この抗SP 36単クローン抗体を用いた免疫組織学的検討¹⁸⁾で、SP 36は肺胞II型細胞と肺胞表面に局在することを示した。また免疫電顕でSP 36は肺胞II型細胞の粗面小胞体に存在し、ラメラ封入体周辺が染色されている像がみられた。

本研究は、SP 36の肺胞II型細胞内の局在と代謝過

程を解明する目的で遂行された。すなわち、ヒト肺組織を非連続シヨ糖密度勾配遠心法で6つの画分に分離し、各画分の形態学的、生化学的特徴を検討、ついで各画分に含まれるSP 36を抗SP 36単クローン抗体を用いて解析した。その結果、SP 36糖鎖の細胞内代謝について興味ある知見を得たので報告する。

2 実験材料と実験方法

2.1 実験材料

腫瘍摘出の目的で切除された肺癌患者の手術肺(n=9)から、肉眼所見において明らかに腫瘍未侵襲で、かつ炎症所見が見られない部位の一部を検体として用いた。

Phospholipase C (Type I, *C. perfringens*, 8.1 U/mg 蛋白, Type III, *Bacillus cereus*, 13.0 U/mg 蛋白)はSigma社から購入した。3, 5-Dinitrobenzoyl chloride (DNBC)は、片山化学より購入した。

免疫染色には、我々が開発した抗ヒトSP 36単クローン抗体(PE 10)¹⁷⁾を使用した。N-glycosidase Fは、Genzyme社製(280 U/ml)を使用した。

2.2 ヒト肺画分の分離

肺組織(湿重量20-40 g)を摘出後、すみやかにGil and Reiss¹⁹⁾の方法に従って6画分に分離した。ヒト肺

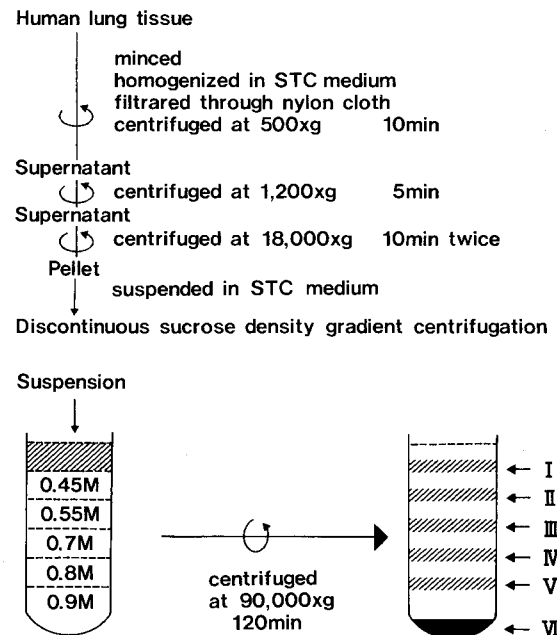


Fig. 1 Isolation procedure of subfractions from human lung tissue. STC medium: 0.32 M sucrose/10 mM Tris-HCl, pH 7.4/1 mM CaCl₂ Triton buffer: 1% Triton X-100/3 mM EDTA/1 mM PMSF/5 mM Tris-HCl, pH 7.8

画分の分離操作を Fig. 1 に示す。組織切片を細切し、STC 溶媒 (0.32 M ショ糖, 0.001 M CaCl_2 を含む 0.01 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4) 中で氷冷下でホモゲナイズした。つぎに、このホモジネートのナイロンメッシュ濾過液を $500\times g$, 10 分間遠心し、この上清を $1,200\times g$, 5 分間遠心した。さらに上清を $18,000\times g$, 10 分間遠心、このペレットを肺湿重量 3-4 g 当たり 5 ml となる様に STC 溶媒に懸濁した。つぎに、日立 RPS-27 ローター用の各チューブに、この懸濁液 5 ml を入れ、0.45 M ショ糖 6 ml, 0.55 M 6 ml, 0.7 M 6 ml, 0.8 M 7 ml, 0.9 M 4 ml を順に重層後、 $90,000\times g$, 120 分間、非連続ショ糖密度勾配遠心法を行い、各層間に出現する 5 つのバンド (画分 I-V) と 1 つのペレット (画分 VI) を得た。このうち、I から V までの 5 画分をそれぞれ集め、ショ糖密度を下げる為に 0.16 M NaCl を加えた後、日立 RP45T ローターを使い $90,000\times g$, 40 分間遠心した。そのペレットを STC 溶媒によく懸濁し、同一条件下で再び、非連続ショ糖密度勾配遠心法を行った。以上の操作によって得られた各画分を、それぞれ 2 本の遠心チューブに小分けし、 $90,000\times g$, 40 分間遠心した。各々 1 本のチューブ内の上清を捨て、ペレットを壊さないように静かに電頭用固定液を加えた。他のチューブのペレットは、Triton 緩衝液 (1% Triton X-100, 3 mM EDTA, 1 mM PMSF を含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.8) に溶解、 -40°C に保存した。

2.3 電子顕微鏡的検索

固定液には、1% グルタルアルデヒド、4% パラフォルムアルデヒド混合液 (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) を用い、 4°C , 24 時間以上固定した。つぎに 0.1 M カコジル酸緩衝液で 12 時間洗浄後ペレットを剝離し、0.1% オスミウム酸液で 1 時間、後固定した。その後、アルコール脱水しエポンに包埋した。この材料について超薄切片を作製し、鉛-ウラニルで二重染色を施し、電子顕微鏡 (日本電子製, 100 C) で鏡検した。

2.4 リン脂質の分析

2.4.1 リン脂質組成の分析

各画分の一定量を取り、Bligh and Dyer²⁰⁾ の方法で総脂質を抽出した。リン脂質組成を分析するために、総脂質抽出後の一部を用いて二次元薄層クロマトグラフィ (TLC) を行った。シリカゲル 60 TLC プレート (20×20 cm, Merck) にリン脂質 0.4 μmole をスポットし、一次元方向へクロロホルム/メタノール/ジイソブチルケトン/酢酸/0.4 M ホウ酸水 (45:15:30:10:4, v/v), 二次元方向へクロロホルム/メタノール/

ジイソブチルケトン/ピリジン/水 (30:25:25:35:8, v/v) の溶媒系で展開後、さらに一次元方向へアセトンで 2 回展開し、ヨウ素蒸気により各脂質を検出、薄層板から各スポット部分のシリカゲルをかきだした。このゲルに 70% 過塩素酸を加えて酸化し、脂質リンを定量した。

2.4.2 リン脂質分子種組成の分析

シリカゲル G (Merck)/0.4 M ホウ酸 (25 g/50 ml) を用いて作製した厚さ 0.25 mm の薄層板に、総脂質抽出液の一部 (リン脂質 2 μmole) を、スポットした。ついで一次元方向へ、クロロホルム/メタノール/水/アンモニア (70:30:3:2, v/v), 二次元方向へ、クロロホルム/メタノール/水 (70:30:5, v/v) の溶媒系²¹⁾ で展開後、0.2% ジクロロフロロレクセン・エタノール液を噴霧し紫外線下で脂質を検出した。PC, PG 部分をかきとって、クロロホルム/メタノール (2:1) を用いゲルからリン脂質を抽出した。回収した PC, PG を Okano *et al.*²²⁾ の方法により、Phospholipase C (PC には Type I, PG には Type III を使用) で加水分解し、1, 2-ジアシルグリセロール (1, 2-DG) とした後、シリカゲル G (Merck) を用いて作製した薄層板を用い、ヘキサン/エーテル/酢酸 (50:50:1, v/v) の溶媒で展開し、1, 2-DG を精製した。つぎに Kito *et al.*²³⁾ の方法に準じ、1, 2-DG に 3, 5-dinitrobenzoyl chloride (DNBC) を反応させることによって 1, 2-DG のジニトロベンゾイル誘導体 (DNB-DG) を調製し、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により分離した。すなわち、日立 650 型液体クロマトグラフ装置に、溶媒脱気装置 (エルマ光学, ERC-3310 型) を併用し、カラムは内径 6 mm \times 長さ 10 cm (エルマ光学, ERC-ODS-1161 型) 2 本に、5.5 cm のリードカラム (エルマ光学, ERC-ODS-1642 型) を接続し、室温で使用した。溶媒は、アセトニトリル/イソプロパノール (80:20, v/v) を用い、流速は 1 ml/min とした。検出器は紫外線検出器 (日本分光, UVIDEC-100-III 型) を用いた。これに島津クロマトパック E1A を接続、ピーク面積を算定した。

2.5 マーカーエンザイムの測定

2.5.1 Acid phosphatase 活性

Acid phosphatase は、各画分の一部 (50 μg 蛋白) を Triton 緩衝液に溶解し、0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて、超音波処理 (80 W, 10 分間) した後、基質の p-nitrophenyl phosphate (Sigma) を加えて、 37°C でインキュベーション、遊離する p-nitrophenol の吸光度 (A405nm) を測定した²⁴⁾。

2・5・2 Con A非親和性 acid α -glucosidase 活性

de Vries *et al.*²⁴⁾の方法に準じ施行した。上記のように Triton 緩衝液に溶解し、0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.5) を加えて超音波処理した。各画分 (40 μ g 蛋白) に、0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.5)/Con A-Sepharose 4B (Pharmacia) (1:1) 懸濁液を加え、37°C でインキュベーションした後、2,000 \times g, 3 分間遠心し、Con A 親和性 α -glucosidase を除去した。この上清に基質として 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside を加え、遊離蛍光物質 (4-methylumbelliferone) を測定した。

2・5・3 NADPH cytochrome C reductase 活性

各画分の一部 (50 μ g 蛋白) を Triton 緩衝液に溶解し、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を加えて、超音波処理した。これに 1 mM KCN, 0.1% cytochrome C, 0.6 mM NADPH を加え 37°C でインキュベーションし、吸光度 (A550nm) を測定した²⁵⁾。

2・6 電気泳動法

2・6・1 Sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) は、Laemmli²⁶⁾の方法によった。蛋白質試料を SDS と β -mercaptoethanol で処理してから、13% ポリアクリルアミド スラブゲル上で泳動させ、Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した。また一部はシッフ試薬で染色した。泳動用緩衝液には、0.1% SDS, 192 mM グリシンを含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液を使用した。CBB で染色された蛋白質濃度を、デンストメーター (MODEL OZ-802, Asuka MFG) で測定した。

2・6・2 二次元電気泳動法

二次元電気泳動法は、O'Farrell²⁷⁾の方法に準じて施行した。蛋白質試料に、4% β -mercaptoethanol, 7.6 M 尿素, 1.6% Pharmalyte (1.28% pH 4-6.5 キット, 0.32% pH 3-10 キット), 4% グリセロールを加えた後、微量の bromophenol blue (BPB) を加え蛋白質を染色した。ついで、8.0 M 尿素, 5% Pharmalyte (4% pH 4-6.5 キット, 1% pH 3-10 キット), 2% Nonidet P-40 を含む 4% ポリアクリルアミド ロッドゲル (直径 0.27 cm \times ゲル長 10 cm) を作製し、これを等電点電気泳動装置 (Gel Electrophoresis Apparatus GE-2/4LS, Pharmacia) で前泳動 (250 V 定電圧, 1 時間) させた後、ゲルの上端 (陰極端) に蛋白質試料を添加し、500 V 定電圧, 15 時間, 通電した。電極液は、陽極液に 0.01 M (DL) グルタミン酸, pH 3.3 を、陰極液に 0.01 M ヒスチジン, pH 7.8 を用

いた。等電点電気泳動後、ガラスチューブより抜去されたロッドゲルを SDS 平衡緩衝液 (2.2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% グリセロール, 微量の BPB を含む 0.12 M Tris-HCl 緩衝液, pH 6.8) と共にインキュベーション (室温, 30 分間) したのち、二次元目として、13% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を施行した。

2・7 Western blotting 法

抗ヒト SP 36 単クローン抗体 (PE 10) を用い、Townbin *et al.*²⁸⁾の方法に準じて Western blotting 法を行った。すなわち SDS-PAGE 後、抗原蛋白質をニトロセルロースシート (東洋濾紙) へ転写した。転写後のシートは、一部アミドブラックで蛋白質染色を行い、残りは免疫染色に使用した。このシートを 1% skim milk / 1% Triton X-100 / 50 mM phosphate buffered saline, pH 7.4 (SM/TX/PBS) で 15 分間振盪しながらブロッキングした。ついで、PE 10 溶液 (5 μ g/ml SM/TX/PBS) をマウントし、37°C, 90 分間インキュベーションした後、SM/TX/PBS で 3 分間ずつ 3 回洗浄, 15 分間ブロッキングした。ついで horseradish peroxidase-Avidin D (Vector) 溶液 (1 μ g/ml SM/TX/PBS) をマウントし、室温で 15 分間インキュベーション後、SM/TX/PBS で 3 分間ずつ 4 回洗浄, シートを基質溶液 (0.05% diaminobenzidine, 0.03% H₂O₂ を含む 90 mM PBS, pH 7.4) 中へ入れ、発色させた。

2・8 N-glycosidase F による酵素処理

各画分の一部を 1% SDS と 1% β -mercaptoethanol の存在下で 3 分間沸騰した後、50 mM iodoacetamide を加えアルキル化し、10 mM EDTA / 50 mM PBS, pH 8.6 で 2 日間透析した。次に N-glycosidase F を 20 U 濃度となるように加え、37°C, 24 時間反応した。

2・9 その他の分析法

脂質リンは Bartlett 法³⁰⁾、蛋白質は牛血清アルブミン (Sigma) を標準として Lowry 法³¹⁾ で測定した。

3 成 績

3・1 肺画分の電子顕微鏡所見

非連続シヨ糖密度勾配遠心法により分離されたヒト肺の 5 つの画分の電子顕微鏡像を Fig. 2 に示す。画分 I (Fig. 2A) には大型で成熟したラメラ封入体が多数みられ、画分 II (Fig. 2B) はそれよりも小型のラメラ封入体に富み、リボソームも散見された。画分 III (Fig. 2C, Fig. 2F) には、細胞外へ分泌された肺サーファクタントに特徴的な tubular myelin 様構造が見られると共に、無定形な小ベジクルが多数みられた。この小ベ

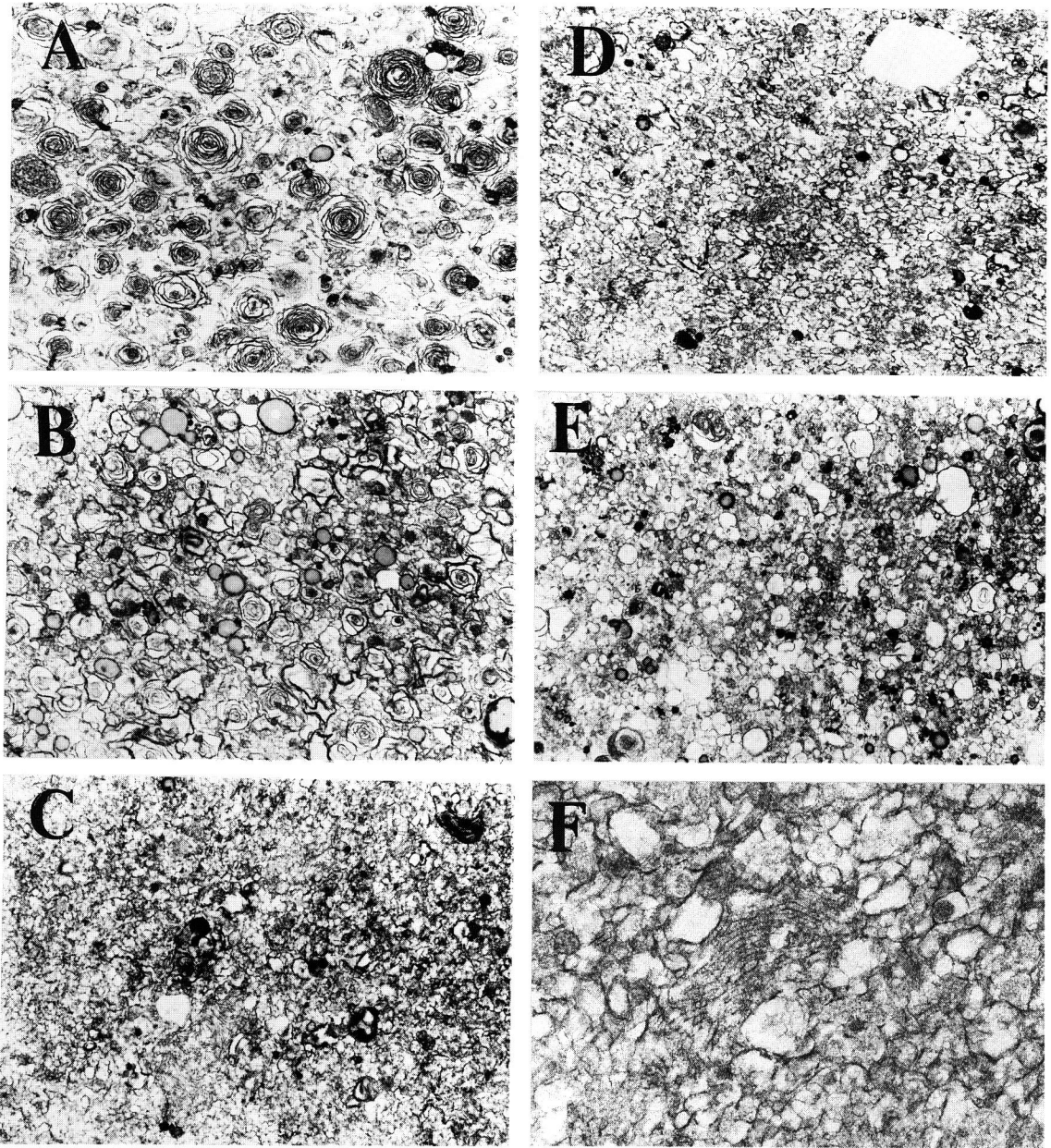


Fig. 2 Electron microscopic features of human lung fraction isolated by the method of Gil and Reiss¹⁹⁾.

A : Fraction I mainly consists of matured lamellar bodies ($\times 5,400$).

B : Fraction II contains immature lamellar bodies and liposomes ($\times 5,400$).

C : Fraction III contains tubular myelins, small liposomes and amorphous small vesicles ($\times 9,000$).

D : Fraction IV is almost similar to Fraction III, but there are much more small vesicles and liposomes, and endoplasmic reticulum ($\times 9,000$).

E : Fraction V is mainly constituted of endoplasmic reticulum and liposomes ($\times 5,400$).

F : Tubular myelin figure ($\times 30,000$) in Fraction III.

ジクルは、細胞外へ分泌されたサーファクタント構造の崩壊産物か、または小胞体での生成成分からラメラ封入体へ成長する過程のベジクルを示すと思われる。画分IV (Fig. 2D) においても画分IIIと同様の所見が得られたが、一部に小胞体の混入を伴っていた。画分V (Fig. 2E)には小胞体が多数見られ、またライソゾームと小型のリボソームも少数ながら見られた。

従って電子顕微鏡所見上、画分I, IIはラメラ封入体を主として含み、画分III, IVは細胞外サーファクタント成分及び細胞内の小ベジクルに富み、画分Vは主に小胞体を多く含んだ画分と言える。

3・2 肺画分の蛋白質、総リン脂質含量

分離されたIからVまでの画分に含まれる蛋白質、およびリン脂質量の結果をTable 1に示す。

肺湿重量1g当たりの蛋白質は、画分I 8.1 μ g, II 17.8 μ g, III 66.2 μ g, IV 150 μ g, V 106 μ gであった。すなわち、これら5画分における蛋白質の分布は、画

分IとIIが他の画分に比べ著しく低かった。リン脂質含量は、蛋白質の場合と同様に、画分IとIIで低く、IIIとIVで高かった。蛋白質に対するリン脂質量比は、画分I (7.5)とII (6.2)が最も高く、ついで画分III (3.3)であったが、画分IVとVの値はほぼ同じであった。すなわち画分I, IIのリン脂質/蛋白質比の値は、従来報告^{32,33)}されている精製ラメラ封入体における値とほぼ同じであった。

3・3 各画分のリン脂質組成及び主要リン脂質分子組成

3・3・1 リン脂質組成

各画分のリン脂質組成をTable 2に示す。画分I, II, III, IVでは、PCが約70%, PGが約10%を占め、これまでに報告^{34,35)}されてきた肺サーファクタント・リン脂質組成とよく一致している。一方、画分Vでは他の画分に比べ、PC (43.9%)とPG (3.3%)が低値であるのに対し、ホスファチジルエタノールアミン(PE)

Table 1 Contents of protein and phospholipid in the subcellular fractions isolated from human lung tissue.

Fraction	Protein (μ g/wet g tissue)	Phospholipid (μ g/wet g tissue)	Phospholipid/Protein
I	8.1 (2.3)	60.7 (7.6)	7.53
II	17.8 (5.1)	109.5 (13.8)	6.17
III	66.2 (19.1)	218.9 (27.5)	3.31
IV	149.8 (43.1)	274.2 (34.5)	1.83
V	105.8 (30.4)	132.0 (16.6)	1.25

The values in parenthesis represent percentage distribution.

Fractions I, II, III, IV, and V were isolated by the method of Gil and Reiss¹⁹⁾.

Table 2 Phospholipid composition of human lung fractions.

	Phospholipid composition (mole %)				
	I	II	III	IV	V
Phosphatidylcholine	71.3	76.2	73.3	67.8	43.9
Phosphatidylglycerol	9.4	8.4	11.4	7.5	3.3
Phosphatidylethanolamine	2.5	4.2	3.9	4.6	17.6
Sphingomyelin	3.1	1.8	1.9	3.9	14.3
Phosphatidylserine	2.4	2.0	1.8	5.1	7.7
Phosphatidylinositol	4.4	5.1	3.0	5.9	5.7
Lysophosphatidylcholine	0.7	0.3	N.D.	0.2	0.6
Lysophosphatidylethanolamine	0.2	N.D.	1.8	2.8	3.6
Phosphatidic acid	4.3	2.0	2.5	2.1	1.5
Others	1.7	N.D.	0.4	0.1	1.8

The values are means of two separate experiments.

N.D.: not detected.

I, II, III, IV and V represent fractions isolated from human lung tissue by the method of Gil and Reiss¹⁹⁾.

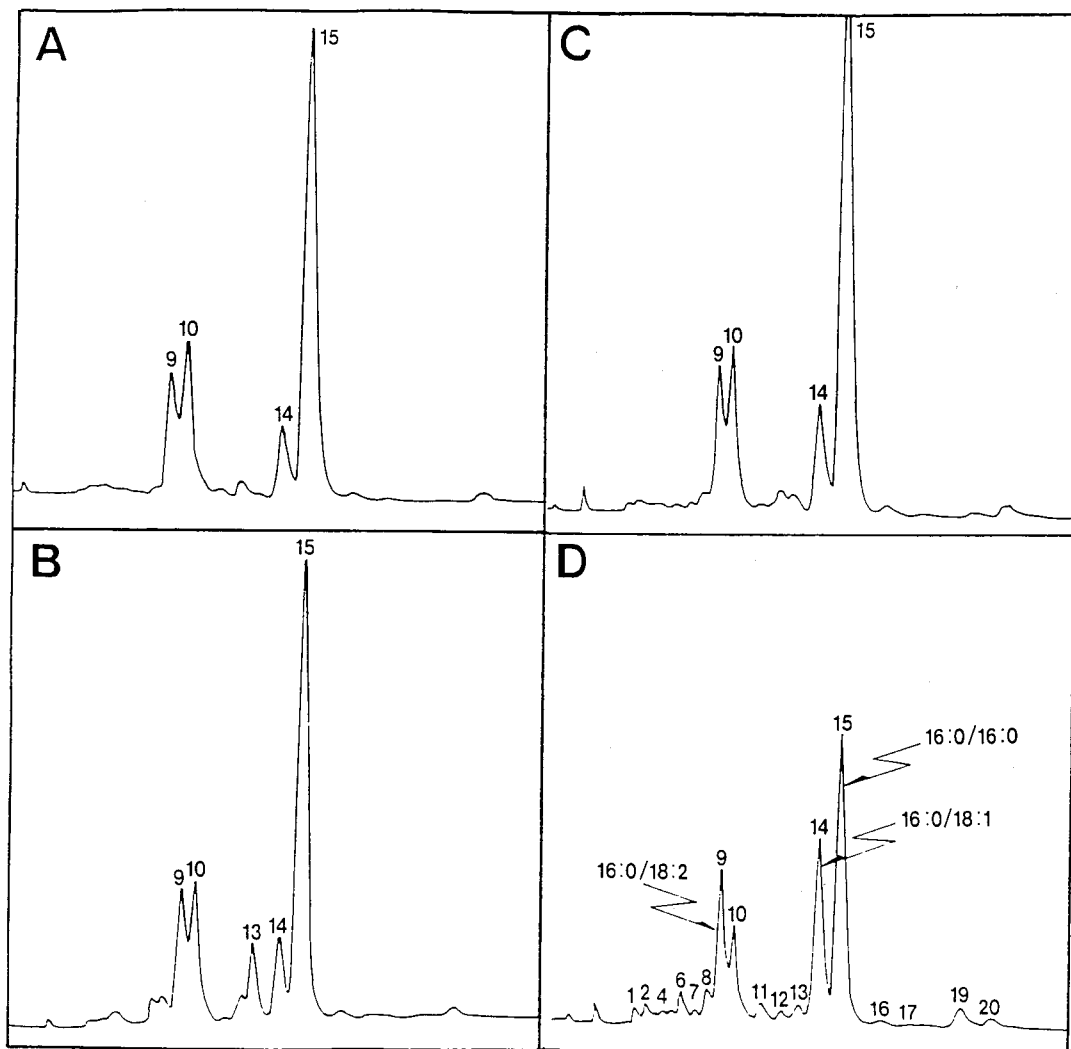


Fig. 3 High-performance liquid chromatographic separation of molecular species of phosphatidylcholine in human lung fractions.

DNB-diacylglycerols were prepared from phosphatidylcholine. They were separated by high-performance liquid chromatography with acetonitrile/isopropanol (80:20) and detected at 254 nm according to the method of Kito *et al.*²³⁾ Peaks are numbered in D. Main molecular species contained in main peaks are listed in Table 3.

A : Fraction I B : Fraction II
C : Fraction III D : Fraction V

が17.6%, スフィンゴミエリン (SM) が14.3%と高値を示した。画分Vにみられるこのリン脂質組成は、従来報告されてきた膜成分のリン脂質組成に一致している。従って画分Vのみが、他の画分と異なったリン脂質組成をもち、膜画分と考えられた。

3・3・2 分子種組成

各画分のPCとPGの分子種を、Kito *et al.*²³⁾の方法に従ってHPLCにより分析した。PC分子種の

HPLCによる分離パターンをFig. 3に、主分子種組成をTable 3に示す。ジパルミトイル (16:0/16:0) 分子種*が、肺サーファクタントPCの主成分であることは、よく知られている³⁶⁾。PC分子種では、ジパルミトイル (16:0/16:0) 分子種が、電子顕微鏡所見上、ラ

* 分子種を脂肪酸の組合せで表記した。脂肪酸は炭素数:二重結合数で表記し、脂肪酸の位置の違いは区別していない。

Table 3 Molecular species composition of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol of human lung fractions.

Peak number	Main molecular species	Molecular species composition (%)									
		Phosphatidylcholine					Phosphatidylglycerol				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
4	16:0/20:5	2.0	0.6	0.9	0.8	0.7	0.1	1.4	tr	1.3	1.8
7	16:0/20:4	0.2	1.0	1.0	0.6	0.8	4.1	3.2	5.4	5.9	2.9
8	18:1/18:2	0.5	2.6	2.9	1.5	3.4	8.1	10.0	11.8	7.5	8.1
9	16:0/18:2	11.2	9.5	16.3	10.1	14.2	7.2	7.5	tr	2.6	6.8
10	16:0/16:1	19.1	12.4	13.3	15.3	9.8	tr	2.9	tr	tr	1.9
12	18:0/20:4	1.6	1.9	1.2	1.7	1.3	0.5	tr	3.0	0.2	0.6
13	18:1/18:1	tr	6.1	2.7	1.4	2.1	8.0	9.0	9.3	11.1	10.7
14	16:0/18:1	0.8	7.0	11.9	10.4	19.8	28.9	30.0	32.8	32.5	30.7
15	16:0/16:0	55.5	54.3	41.6	49.3	31.9	26.4	10.9	18.2	12.4	10.7
19	18:0/18:1	0.5	0.3	1.0	1.3	3.1	9.4	14.5	11.3	15.3	13.5
20	16:0/18:0	1.9	1.9	1.4	2.5	1.9	4.7	3.6	3.9	3.9	3.1

tr: less than 0.05%

Peak numbers are shown in Fig. 3

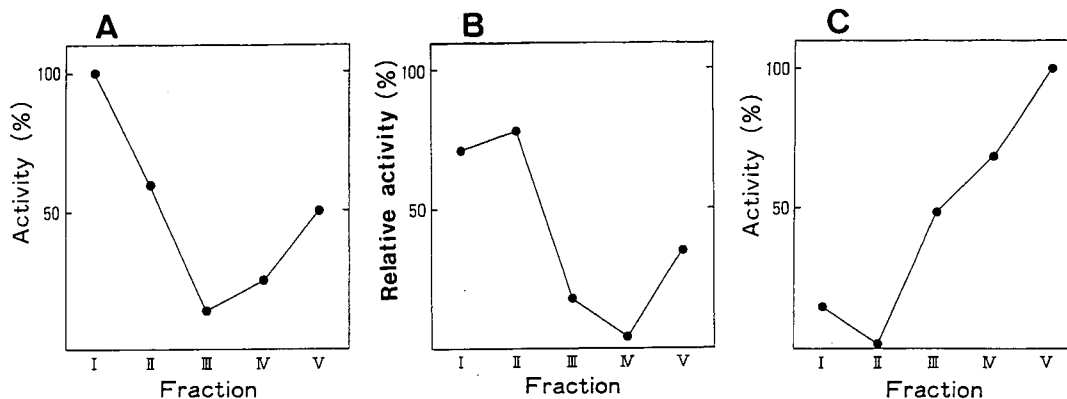
メラ封入体に富む画分 I (56%) と II (54%) において過半数を占め、また画分 III (42%) と IV (49%) においても半数近くを占めた。これに対し、画分 V ではジバルミトイル型 PC が、僅かに 32% を占めるに過ぎなかった。

PG 分子種の最大のピークは、16:0/18:1 分子種であった。しかし、各画分間で変動が最も顕著な分子種は 16:0/16:0 分子種であり、画分 I では 26% であるが、画分 III と V では 18%、11% であった。すなわち、非

連続シヨ糖密度勾配遠心法で、より比重の低い画分ほど、PC、PG ともにジバルミトイル分子種の割合が高いことが示された。

3.4 ラメラ封入体画分及びミクロソーム画分のマーカーエンザイムの測定

メラ封入体画分のマーカーエンザイムとして acid phosphatase 活性が繁用されているが、この酵素はライソゾーム内に豊富に含まれる酵素であるので、各画分中へのライソゾームの混入の程度によっては、メラ

**Fig. 4** Distribution of marker enzyme activities in human lung fractions.

A: Acid phosphatase activity. The specific activity in Fraction I (126 nmol/min/mg protein) is taken as 100%.

B: α -Glucosidase activity without binding affinity for concanavalin A. The relative activity of α -glucosidase activity without binding affinity for concanavalin A to total α -glucosidase activity is shown in each fraction.

C: NADPH cytochrome C reductase activity. The specific activity in Fraction V (0.13 nmol/min/mg protein) is taken as 100%.

封入体画分のマーカーエンザイムとするには、問題があると思われる。最近、de Vries *et al.*²⁴⁾ は、ラメラ封入体画分、ライソゾーム画分及びミクロソーム画分中の acid α -glucosidase のうち、Con A 非親和性のアイソザイムが、ラメラ封入体画分にも存在し、この画分中の acid α -glucosidase 活性の30%を占めることを見出した。すなわち Con A 非親和性 α -glucosidase が、ラメラ封入体の特異マーカーとして有用であることが報告された。そこで各画分の純度を酵素学的見地から検討するために、ラメラ封入体のマーカーエンザイムとして acid phosphatase と Con A 非親和性 acid α -glucosidase 活性を、ミクロソームのマーカーエンザイムとしては、NADPH cytochrome C reductase 活性を測定した。Fig. 4 に各肺画分におけるこれら3者の酵素活性の分布を示す。

画分 I の acid phosphatase の specific activity を100として各画分の活性値を比較すると(Fig. 4A)、画分 II は59%で、画分 III, IV は25%以下であった。すなわち電顕所見上、ラメラ封入体を含む画分 I, II では、acid phosphatase 活性が高いことが示された。また画分 V で acid phosphatase が高かった(50%)が、この画分は電顕所見上、ミクロソームにライソゾームが混入している画分であり、ライソゾーム由来の acid phosphatase 活性と考えられる。

総 α -glucosidase に対する Con A 非親和性 α -glucosidase 活性の比(Fig. 4B)は、画分 I, II では約75%と高値であり、両画分はラメラ封入体に極めて富むことが示された。

NADPH cytochrome C reductase 活性 (Fig. 4C) は、画分 V で最も高く、画分 I, II では、画分 V の活性の10%以下であった。しかし画分 IV の活性は比較的高く、かなりのミクロソームの混入があることが示された。

3.5 各画分における肺サーファクタント関連糖蛋白質 (SP 36) の分布

3.5.1 一次元 SDS-PAGE による検討

各画分の一次元 SDS-PAGE の結果を Fig. 5 に示す。SP 36 に相当する部分に着目すると、蛋白質バンドの CBB による染色 (Fig. 5A) では、すべての画分において、SP 36 は 34 kDa, 37 kDa に分離した。両蛋白質は、シッフ染色で明らかに染色されるので、糖蛋白質であることが明らかとなった。画分 I, II は 34 kDa 蛋白質バンドが主であるが、画分 V では 37 kDa 蛋白質バンドが 34 kDa 蛋白質バンドよりも強く染色された。34 kDa, 37 kDa 両蛋白質の比率をデントメーターで測定した結果を、Fig. 6 と Table. 4 に示す。画分 I, II において、34 kDa 蛋白質は 37 kDa 蛋白質の約3倍多く、画分 III, IV でも約2倍であった。これに対して画

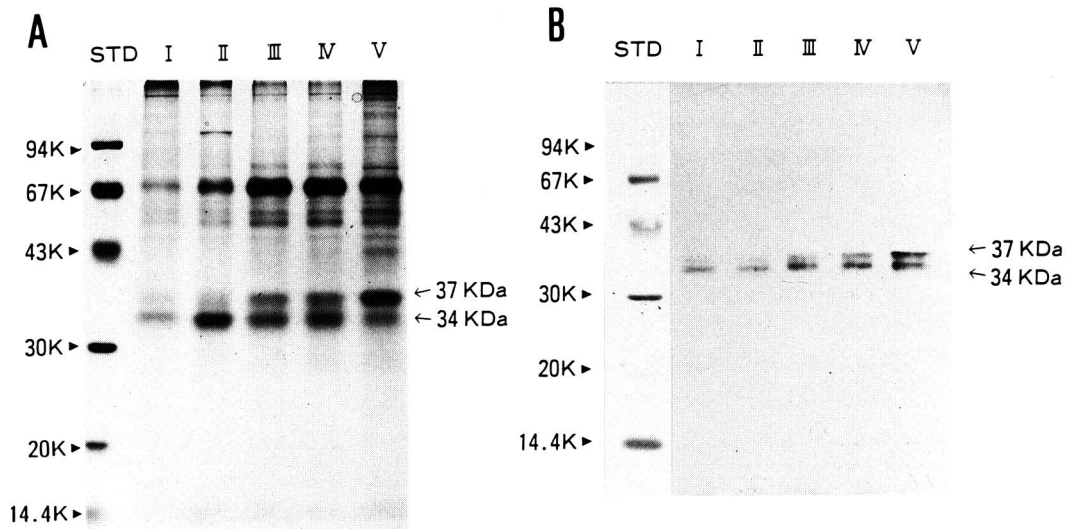


Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the proteins contained in human lung fractions.

A : The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

B : Western blotting of A. The gel was transferred to nitrocellulose sheet and stained with anti-human SP 36 monoclonal antibody (PE 10).

STD : standard proteins. STD in B were stained with Amidoblack.

I, II, III, IV and V are fractions isolated from human lung tissue by the method of Gil and Reiss¹⁹⁾.

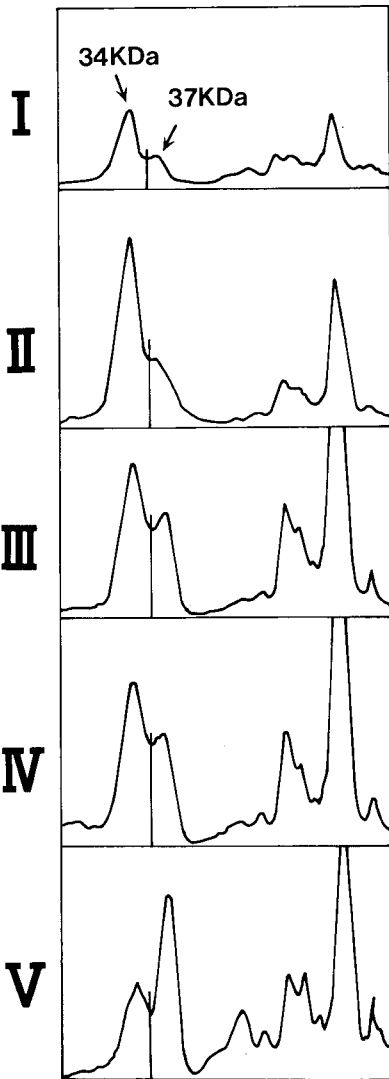


Fig. 6 Densitometric scanning profiles of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Coomassie Brilliant Blue staining. The densitometric scan was measured at 570 nm. I, II, III, IV and V represent fractions isolated from human lung tissue.

分Vでは、37 kDa 蛋白質が34 kDa 蛋白質よりも多いことが示された。すなわちラメラ封入体に富む画分(画分 I, II)では、34 kDa 糖蛋白質が主であるが、ラメラ封入体構成成分の前駆体を含む小胞体画分(画分V)では37 kDa 糖蛋白質が主であった。また細胞内及び細胞外サーファクタントを含む画分(画分III, IV)ではラメラ封入体に近いけれども両糖蛋白質を含んでいることが示された。

ついで、一次元 SDS-PAGE 後、抗ヒト SP 36 単クローン抗体 (PE 10) を用いて Western blotting 法により蛋白質バンドを免疫染色した。結果を Fig. 5B に示す。各画分に含まれる全蛋白質バンド中、PE 10 と反応した主蛋白質は、34 kDa, 37 kDa 両蛋白質バンドであり、この他に僅かに 30 kDa 蛋白質が PE 10 で免疫染色された。PE 10 認識抗原は、画分 I, II で 34 kDa 蛋白質に、画分 V で 37 kDa 蛋白質に強い集積を示すことが示された。この各画分における両蛋白質バンドの免疫染色像は、CBB 染色所見とよく一致した。この結果は、各画分中の 34 kDa, 37 kDa 糖蛋白質が SP 36 と共通の抗原性を持ち、しかも PE 10 に対する抗原数は、各画分共に各バンドの蛋白質にほぼ比例して存在していることを示している。

3・5・2 二次元電気泳動法による検討

一次元 SDS-PAGE で分離した 34 kDa, 37 kDa 糖蛋白質の性状をさらに明らかにする目的で二次元電気泳動法を行った。画分 II, III, V を二次元電気泳動させ、これをニトロセルロース膜へ転写後、アミドブラック染色及び PE 10 による免疫染色を施行した (Fig. 7)。

各画分とも 34—37 kDa 蛋白質群は、アミドブラック染色で主に pH 4.6—6.75 の範囲に、6—8 個のスポットの集合体として認識され、また PE 10 に対する抗原決定基もこの部位に一致してみられた。従って各画分中に含まれる PE 10 認識蛋白質は、ほぼ同一と見なしてよいと思われる。すなわち一次元 SDS-PAGE で、34 kDa, 37 kDa 両蛋白質バンドに分離する糖蛋白質は、二次元電気泳動では等電点の異なる 6—8 個の isoform

Table 4 Percent distribution of 34 kDa and 37 kDa glycoproteins in human lung fractions.

	Percent distribution (%)				
	I	II	III	IV	V
37 kDa glycoprotein (A)	23.3	24.0	34.5	34.5	61.3
34 kDa glycoprotein (B)	76.7	76.0	65.3	65.3	38.7
B/A	3.29	3.17	1.90	1.90	0.63

The values of percent distribution were calculated from peak areas obtained by densitometric scan of SDS-PAGE followed CBB staining. I, II, III, IV and V represent fractions isolated from human lung tissue by the method of Gil and Reiss¹⁹⁾.

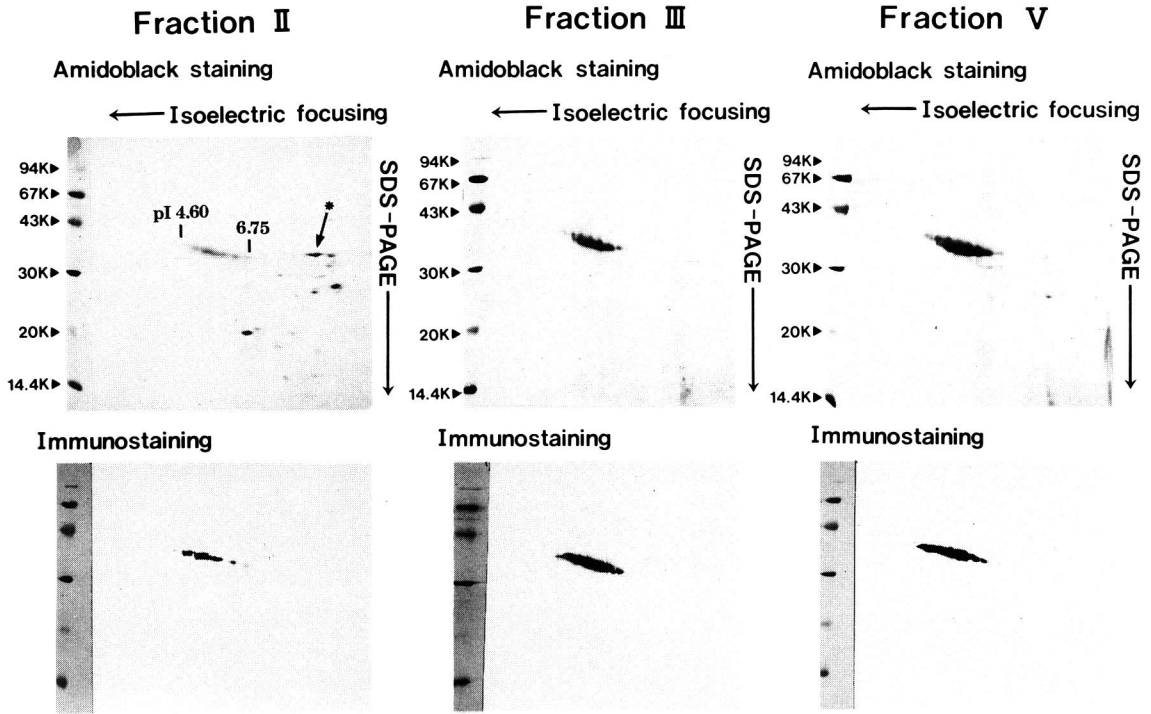


Fig. 7 Two-dimensional electrophoresis of the proteins contained in human lung fractions. Figures of Amidoblack staining and immunoblot with anti-human SP 36 monoclonal antibody (PE 10) are shown. Standard proteins were stained with Amidoblack. Basic spots(*) distinctly different from SP 36 appeared in Fraction II and V.

に分離した。34 kDa 蛋白質は、より酸性の isoform を含み、37 kDa 蛋白質は、より塩基性の isoform を含むことが示された。SP 36 の等電点電気泳動法及び二次元電気泳動法の結果は、他の研究者^{8,37,38)}の結果ともよく一致した。

またラメラ封入体 (画分II) において一連のスポットとは別に極めて塩基性の高い 34 kDa のスポットを認めた。PE 10 はこのスポットに対して反応せず、SP 36 とは異なる蛋白質と考えられる。また同様のスポットはミクロソーム (画分V) でも僅かに認められた。一方これはヒト気管支肺胞洗浄液や血清には現れず、細胞内 (おそらく II 型肺胞上皮細胞) にもみ存在する蛋白質成分と思われた。

3・5・3 N-glycosidase F 処理による検討

つぎに各画分を、N-glycosidase F で処理して、SP 36 の糖鎖を切断し、各画分中に含まれる PE 10 認識糖蛋白質 (34-37 kDa 蛋白質) が、どの様に変化するのかを検討した (Fig. 8, Fig. 9)。画分 II, III, V における酵素処理後の一次元 SDS-PAGE の CBB 染色所見 (Fig. 8) では、全ての画分において、酵素処理前

には認められない 30 kDa 蛋白質が、新たに出現した。さらにこの蛋白質は PE 10 による免疫染色で陽性であった (Fig. 9)。このことは、同一のコア蛋白質 (30 kDa 蛋白質) を有する 34-37 kDa 糖蛋白質群が、各画分中に共通に含まれていることを示している。なお、各画分ともに酵素処理後も、34-37 kDa 蛋白質が相当量残存した。これは、ラメラ封入体、小胞体などに酵素を直接作用させる時、酵素と糖蛋白質との接触が充分得られないために生じた現象と考えられる。とくにラメラ封入体中の SP 36 は、リン脂質と複合体を形成して存在するために、脂質ミセル中にあり、酵素の接触が妨げられたと思われる。

4 考 察

著者ら¹⁷⁾は、ヒト気管支肺胞洗浄液から SP 36 を分離し、抗ヒト SP 36 単クローン抗体を作製した。また、この抗体を用いた免疫組織学的検討¹⁸⁾で、ヒト SP 36 の肺組織内における局在を明らかにした。その結果、光顕では、この抗体は、肺胞 II 型上皮細胞と極めて強く反応し、細胞質内が顆粒状に染色された。また一部の

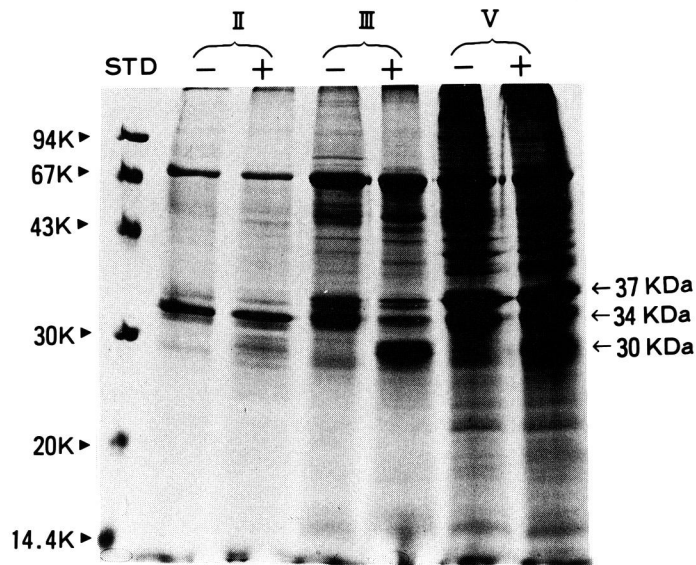


Fig. 8 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis after N-glycosidase F treatment of human lung fractions.

- : before treatment

+ : after treatment

STD : standard proteins

The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

II, III and V represent fractions isolated from human lung tissue.

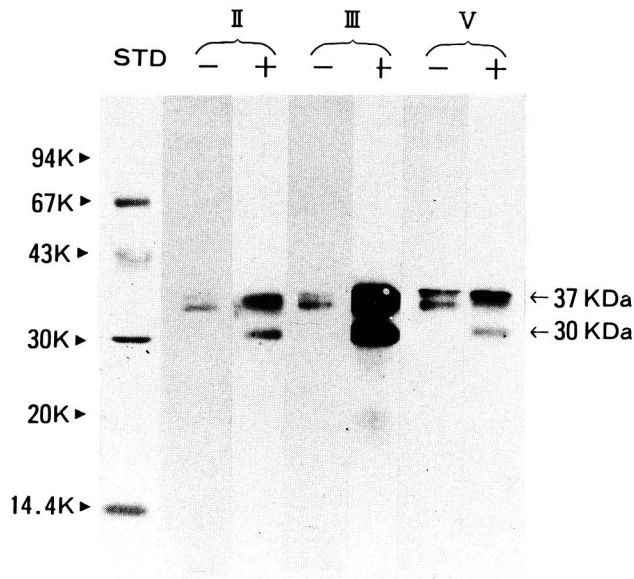


Fig. 9 Analysis of the antigens with anti-human SP 36 monoclonal antibody (PE10) after N-glycosidase F treatment of human lung fractions.

- : before treatment

+ : after treatment

STD : standard proteins.

II, III and V represent fractions isolated from human lung tissue. Each fraction was stained with PE 10. STD were stained with Amidoblack.

肺胞表面にも、弱いながら陽性反応を認めた。さらに免疫電顕で、SP 36 は肺胞II型上皮細胞の粗面小胞体に存在していることがわかった。ラメラ封入体については、その周辺に陽性反応を認めたが、封入体内部の染色性に関する所見は得られなかった。これは、preembedding法を用いたために、抗体の浸透に限界があったためと考えられる。したがってラメラ封入体中におけるSP 36の存在については明らかにできなかったが、Walker *et al.*³⁹⁾ は、SP 36 に対するポリクローナル抗体と金コロイド標識抗体を用いたpostembedding法により、ラメラ封入体におけるSP 36の存在を証明している。以上の知見から、ヒト肺組織から蛋白質成分を分離した場合、抗ヒトSP 36単クローン抗体と反応性を有する蛋白質は、II型上皮細胞内に存在する成分もしくはII型上皮細胞から分泌された細胞外成分と解釈してよいと思われる。したがって本研究では、正常ヒト肺組織から分離した種々の画分の蛋白質を抗SP 36単クローン抗体を用いた免疫生化学的手法で検討し、SP 36のII型上皮細胞内における動態を分析した。

本研究ではまずGil and Reiss¹⁹⁾の方法に準じて、ヒト肺組織から6つの画分を分離した。そのうち5画分の電子顕微鏡像を検討し、さらにリン脂質分析とマーカーエンザイム活性を測定することによって、これらの画分の特徴を明らかにした。すなわち画分I, IIはラメラ封入体に富む画分であり、画分III, IVは細胞外サーファクタント成分と恐らくは細胞内小ベジクルが混在する画分(画分IVには小胞体も混在する)、また画分Vは小胞体に富む画分であった。ついで、これらの画分におけるSP 36の細胞内動態を知る手がかりを得るために、単クローン抗体を用い、各画分中に含まれるII型上皮細胞内もしくは由来蛋白質に関する検討を進めた。

一次元SDS-PAGEのCBB染色(Fig. 5A)では、34-37 kDaバンドが画分IからVまでのすべての画分中に認められた。二次元電気泳動のCBB染色で、II, III, Vの各画分における34-37 kDa蛋白質の等電点(pI 4.6-6.75に連なるスポット群)は、画分IIの中の34 kDa蛋白質の一部を除いてほとんど一致した。しかし、これは蛋白質染色なので、一次元及び二次元電気泳動で認められたこれら34-37 kDa蛋白質群が、SP 36に相応するものか否かを確認する必要があるが、これらの蛋白質は、抗ヒトSP 36単クローン抗体に対して明らかな陽性反応を示した。以上の結果から、各画分中の34-37 kDa蛋白質群のうち大部分は、SP 36と同一のものと考えてよいと思われた。

一次元SDS-PAGEのCBB染色所見(Fig. 5A)において、各画分の34 kDaと37 kDa蛋白質との量比に、明らかな違いがあった。すなわち、小胞体画分(V)では37 kDa蛋白質が主であるが、ラメラ封入体画分(I, II)では34 kDa蛋白質が主であった。画分III, IVでは、比較的34 kDa蛋白質が多いことが認められた。単クローン抗体(PE 10)を用いたWestern blotting法(Fig. 5B)でも同様の結果が得られた。すなわち、SP 36のうち37 kDa糖蛋白質はミクロソームに主として局在するが、ラメラ封入体では、分子量の少ない34 kDa糖蛋白質が主として含まれていることが明らかとなった。そして、37 kDa糖蛋白質はより酸性の等電点を持つが、34 kDa糖蛋白質はより塩基性の等電点を持つことも明らかになった。これらの結果は、ラメラ封入体とその前駆体である小胞体におけるSP 36の糖鎖構造が異なっていることを強く示唆する所見である。

水本ら⁴⁰⁾は、肺胞蛋白症患者のBALFからSP 36を分離し、これをN-glycosidase Fで処理し、糖鎖を解離した。その結果、一次元SDS-PAGEで、34-37 kDaに幅広くみられるSP 36は、酵素処理後に幅の狭い30 kDaバンドになること、この30 kDa蛋白質は抗ヒトSP 36単クローン抗体と陽性反応を示すことを見いだした。さらに水本ら⁴⁰⁾は、抗ヒトSP 36単クローン抗体に対するSP 36分子上の抗原決定部位は糖鎖ではなく、COOH基側のペプチド部分に存在することを明らかにしている。今回分離したラメラ封入体画分(II)、画分III、小胞体画分(V)に、N-glycosidase F処理を加え、34-37 kDa糖蛋白質群から糖鎖を解離したところ、いずれの画分においても、新たに30 kDa蛋白質が出現し(Fig. 8)、このバンドは、PE 10に対して陽性反応を示した(Fig. 9)。この結果は、各画分中のSP 36が、その分子構造内に30 kDa蛋白質を、同一のコア蛋白質としてもつことを示している。

一方、Floros *et al.*⁴¹⁾は、ヒト肺切片をトニカマイシンで処理後、³⁵Sメチオニンを取り込ませ、抗ヒトSP 36抗体で免疫沈降する蛋白質が30 kDa蛋白質であることを示した。また、ヒト肺から分離したmRNA、³⁵Sメチオニンとreticulocyte lysateを反応させたとき合成される蛋白質を、抗ヒトSP 36抗体で免疫沈降すると、29-31 kDa蛋白質が得られた。ついで、このヒトSP 36蛋白質合成系に、イヌ臍ミクロソームを加えて反応させると、34-37 kDa糖蛋白質が生成されることを示した⁴²⁾。同様の所見は、Whitsett *et al.*^{43,44)}も報告している。すなわち、これらの結果は、ヒト肺リボソームでmRNAから最初に合成される初期産

物は、30 kDa 蛋白質であり、ミクロソームでこれに糖鎖が結合して、SP 36 となることを示している。本研究で、ヒト SP 36 の糖鎖を切断したコア蛋白質は 30 kDa 蛋白質であったが、これは Floros *et al.*⁴⁾ の示した初期産物と同一の蛋白質と思われる。ヒト SP 36 のコアペプチドの一次構造は、その cDNA の塩基配列から決定された¹⁵⁾ が、糖鎖結合部位 (Asn-X-Thr) は 1 カ所 (187 番目の Asn) であることが明らかとなっている。本研究の結果は、この 30 kDa 蛋白質の初期産物に対する糖鎖の結合と、その糖蛋白質の細胞内代謝に重要な示唆を与えるものであった。すなわちミクロソームで、30 kDa 蛋白質に 7 kDa の糖鎖が N-グリコシド結合し、37 kDa 蛋白質がまず合成されると思われる。ついで、この 37 kDa 蛋白質が、ミクロソームからラメラ封入体へ移送される過程で加工されて、34 kDa 糖蛋白質が主たる糖蛋白質 (画分 III, IV) となり、特異リン脂質とともにラメラ封入体へ組み込まれると思われる。

細胞外サーファクタントがすべてラメラ封入体由来とするならば、34 kDa, 37 kDa 蛋白質の割合はラメラ封入体と同じであるはずであるが、画分 III, IV における 34 kDa と 37 kDa 蛋白質の割合は、ラメラ封入体画分よりも 34 kDa 蛋白質が少なく、37 kDa 蛋白質が多かった。つまり、この画分には細胞外サーファクタント以外に、細胞内小ベジクル (おそらくはミクロソームからラメラ封入体への移送小ベジクル) あるいはミクロソームが混在するために、細胞外サーファクタントと同じ SP 36 分布を示さなかったと考えられる。

ラメラ封入体画分のアミドブラック染色において、SP 36 とは明らかに等電点の異なる塩基性の高いスポットが認められた。このスポットは PE 10 に反応せず、また細胞外肺サーファクタント成分を多く含む画分 III 及び血清には存在せず、他には、ミクロソーム画分 V で僅かに認められるにすぎない。したがってこの蛋白質は、ラメラ封入体に存在し、細胞外には分泌されない非分泌性蛋白質であると思われる。その本態に関しては不明であり、肺サーファクタント・アポ蛋白の範疇にはいるか否かもはっきりしないが、ラメラ封入体の構造保持に、この蛋白質が、なんらかの役割を担っている可能性が考えられる。

5 結 論

肺サーファクタントの主要なアポ蛋白は、いわゆる 36 kDa 糖蛋白質 (SP 36) である。この糖蛋白質は、糖鎖の違いにより種々の分子種が存在することが知られ

ている。本研究は、種々の糖鎖をもつ SP 36 構造と、代謝との関係を解明する目的で行われ、次の結果を得た。

ヒト肺組織を非連続シヨ糖密度勾配遠心法で 6 つの画分に分離した。その電顕像、リン脂質分析及びマーカーエンザイムの測定により、画分 I, II はラメラ封入体画分、画分 V は小胞体画分と同定され、画分 III と IV は細胞外サーファクタント画分に細胞内小ベジクルが混在した画分と思われた。

ラメラ封入体画分の主たる SP 36 は、34 kDa 糖蛋白質であったが、小胞体画分では 37 kDa 糖蛋白質が主であり、両画分は明らかに異なる SP 36 を含んでいた。画分 III と IV は 37 kDa よりも 34 kDa 蛋白質を多く含んでいたが、ラメラ封入体画分にみられた程の両蛋白質の差はなかった。二次元電気泳動法で両糖蛋白質は、6—8 個の isoform に分離し、37 kDa 蛋白質はより酸性の糖蛋白質、34 kDa 蛋白質はより塩基性の糖蛋白質からなっていた。これらの SP 36 蛋白質スポットのほとんどは、抗ヒト SP 36 単クローン抗体 (PE 10) によるイムノプロットで陽性であった。34 kDa, 37 kDa 両糖蛋白質ともに N-glycosidase F 処理で 30 kDa 蛋白質となった。抗ヒト SP 36 単クローン抗体は肺胞 II 型上皮細胞由来の蛋白質のみと反応するので、本研究の結果は、肺胞 II 型上皮細胞における SP 36 の細胞内局在を明らかにし、SP 36 の細胞内代謝経路を示唆する結果であった。すなわち、まず小胞体において 30 kDa コア蛋白質に 7 kDa の糖鎖が結合して 37 kDa 糖蛋白質が合成され、ついで小胞体からラメラ封入体への移送の過程で、37 kDa 糖蛋白質が加工され 34 kDa 糖蛋白質となる代謝経路をもつことが示唆された。

本研究の要旨は、第 29 回日本脂質生化学研究会で発表された。本研究の遂行にあたり、電子顕微鏡像について御指導頂いた札幌医科大学病理学第 2 講座伝法公磨助教授、ヒト手術肺を御提供頂いた札幌医科大学外科学第 2 講座草島勝之講師に感謝申し上げます。

文 献

1. Goerke, J.: Lung surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **344**, 241-261 (1974).
2. Fisher, A. E., Chander, A.: Introduction: lung surfactant—phospholipids and apoproteins. *Exp. Lung Res.* **6**, 171-174 (1984).
3. 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).

4. King, R. J., Klass, D. J., Gikas, E. G. and Clements, J. A.: Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am. J. Physiol.* **224**, 788-795 (1973).
5. Benson, B. J., Hawgood, S. and Williams, M. C.: Role of apoprotein and calcium ion surfatant function. *Exp. Lung Res.* **6**, 223-236 (1984).
6. King, R. J.: Lipid-apoprotein-apolipoprotein interactions in surfactant studied by reassembly. *Exp. Lung Res.* **6**, 237-253 (1984).
7. Bhattacharyya, S. N., Passero, M. A., DiAugustine, R. P. and Lynn, W. S.: Isolation and characterization of two hydroxyproline-containing glycoproteins from normal animal lung lavage and lamellar bodies. *J. Clin. Invest.* **55**, 914-920 (1975).
8. Sueishi, K. and Benson, B. J.: Isolation of a major apolipoprotein of canine and murine pulmonary surfactant. Biochemical and immunochemical characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 442-453 (1981).
9. Katyal, S. L. and Singh, G.: Analysis of pulmonary surfactant apoproteins by electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **670**, 323-331 (1981).
10. Suzuki, Y., Nakai, E. and Ohkawa, K.: Experimental studies on the pulmonary surfactant reconstitution of surface-active material. *J. Lipid Res.* **23**, 53-61 (1982).
11. King, R. J.: Pulmonary surfactant. *J. Appl. Physiol.* **53**, 1-8 (1982).
12. Yu, S. H. and Possmayer, F.: Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem. J.* **236**, 85-89 (1986).
13. Takahashi, A. and Fujiwara, T.: Proteolipid in bovine lung surfactant. Its role in surfactant function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 527-532 (1986).
14. Hawgood, S., Benson, B. J., Schilling, J., Damm, D., Clements, J. A. and White, R. T.: Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 66-70 (1987).
15. White, R. T., Damm, D., Miller, J., Spratt, K., Schilling, J., Howgood, S., Benson, B. and Cordell, B.: Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* **317**, 361-363 (1985).
16. 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).
17. Kuroki, Y., Fukada, Y., Takahashi, H. and Akino, T.: Monoclonal antibodies against human pulmonary surfactant apoproteins: specificity and application in immunoassay. *Biochim. Biophys. Acta* **836**, 201-209 (1985).
18. Kuroki, Y., Dempo, K. and Akino, T.: Immunohistochemical study of human pulmonary surfactant apoproteins with monoclonal antibodies. Pathologic application for hyaline membrane disease. *Am. J. Pathol.* **124**, 25-33 (1986).
19. Gil, J. and Reiss, O. K.: Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates. *J. Cell Biol.* **58**, 152-171 (1973).
20. Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
21. Poorthuis, B. J. H. M., Yazaki, P. J. and Hostetler, K. Y.: An improved two dimensional thin-layer chromatography system for the separation of phosphatidylglycerol and its derivatives. *J. Lipid Res.* **17**, 433-437 (1976).
22. Okano, G., Kawamoto, T. and Akino, T.: Comparison of molecular structure of glycerolipids in rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* **528**, 385-393 (1978).
23. Kito, M., Takamura, H., Narita, H. and Urade, R.: A sensitive method for quantitative analysis of phospholipid molecular species by high-performance liquid chromatography. *J. Biochem.* **98**, 327-331 (1985).
24. de Vries, A. C. J., Schram, A. W., Tager, J. M., Batenburg, J. J. and van Golde, L. M. G.: A specific acid α -glucosidase in lamellar bodies of the human lung. *Biochim. Biophys. Acta* **837**, 230-238 (1985).
25. Phillips, A. H. and Langdon, R. G.: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome C reductase: Isolation, characterization and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **237**, 2652-2660 (1962).
26. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
27. O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021 (1975).
28. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.:

- Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354 (1979).
29. Tarentino, A. L., Gomez, C. M. and Plummer, T. H., Jr.: Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**, 4665-4671 (1985).
 30. Bartlett, G. H.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959).
 31. Lowry, O. H., Rosebrough, M. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 32. Chander, A., Dodia, C. R., Gil, J. and Fisher, A. B.: Isolation of lamellar bodies from rat granular pneumocytes in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* **753**, 119-129 (1983).
 33. Satoh, T. and Akino, T.: Source of lung surfactant phospholipids. Comparison of palmitate and acetate as precursors. *Lipids* **17**, 884-892 (1982).
 34. Honda, Y. and Nakamura, M.: A comparative study on the phospholipid profiles of subcellular fractions isolate from human primary lung carcinoma and normal lung tissues. *Sapporo Med. J.* **52**, 613-626 (1983).
 35. Mason, R. J. and William, M. C.: Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 36-50 (1980).
 36. Akino, T. and Ohono, K.: Phospholipids of the lung in normal, toxic and diseased states. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **9**, 204-274 (1981).
 37. Katyal, S. L. and Singh, G.: Analysis of pulmonary surfactant apoproteins by isoelectric focusing. *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 411-418 (1984).
 38. Weaver, T. E., Hull, W. M., Ross, G. F. and Whitsett, J. A.: Intracellular and oligometric form of surfactant-associated apolipoproteins(s) A in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **827**, 260-267 (1985).
 39. Walker, S. R., Williams, M. C. and Benson, B. J.: Immunocytochemical localization of the major surfactant apoproteins in type II cells, clara cells, alveolar macrophages of rat lung. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1137-1148 (1986).
 40. 水本雅彦, 足立英明, 黒木由夫, 秋野豊明: 肺に特異なリン脂質-蛋白質複合体(肺サーファクタント)アポタンパク(SP36)の抗原決定部位. *生化学* **59**, 836 (1987).
 41. Floros, J., Phelps, D. S. and Taeusch, H. W.: Biosynthesis and in vitro translation of the major surfactant-associated protein from human lung. *J. Biol. Chem.* **260**, 495-500 (1985).
 42. Phelps, D. S., Floros, J. and Taeusch, H. W.: Post-translational modification of the major human surfactant-associated proteins. *Biochem. J.* **237**, 373-377 (1986).
 43. Whitsett, J. A., Ross, G., Weaver, T., Rice, W., Dion, C. and Hull, W.: Glycosylation and secretion of surfactant-associated glycoprotein(s) A. *J. Biol. Chem.* **260**, 15273-15279 (1985).
 44. Whitsett, J. A., Weaver, T., Hull, W., Ross, G. and Dion, C.: Synthesis of surfactant-associated glycoprotein(s) A by rat Type II epithelial cells. Primary translation products and post-translational modification. *Biochim. Biophys. Acta* **828**, 162-171 (1985).

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 高橋弘毅