4. 恒温ディスク電気泳動装置 コンカナバリン A の糖結合反応の熱力学的解析への応用*

竹尾和典 鈴野亮輔 藤本正憲 桑原 亮
中 村 和 行**

Tiselius の電気泳動法は支持体を用いない泳動法であるため、通電によるジュール熱の発生とそれによる対流を防ぐことがシャープな泳動像をうるための重要な条件になっている。そのため 4℃ に調整できる能率のよい恒温槽が使用され、この恒温槽に泳動装置を浸して操作するようになっている。これに対し、支持体を使用するゾーン電気泳動法は室温以下であれば温度変化による泳動像の変動は余り問題とはならず、しかも、Tiselius 法によって算出される（絶対）易動度ではなく、相対泳動速度が問題にされるために、ジュール熱による蒸発・乾燥と蛋白質の変性を防ぐために冷却することが考慮されるに停っている。

Affinity electrophoresis¹⁾（親和電気泳動法：AEP）は酵素反応・免疫反応等の生物特異反応の親和性を定量的に解析する方法である。反応速度、反応物質の親和性の強さは温度の関数である。したがって AEP の場合には泳動は一定温度で行う必要がある。さらに恒温泳動装置が利用できれば各温度での親和性の強さ（解離定数または結合定数）を求め、その値の温度変化からエンタルピー変化 (ΔH°)、エントロピー変化 (ΔS°) 等の熱力学的定数の算出が可能である。したがって AEP の発展のために泳動温度を任意に調節できる泳動装置を開発することが必須である。

ディスク泳動装置としては諸種のものが市販されているが、冷却装置を持つものとしては流水、あるいは冷却水を還流する方式のものが一般であって、泳動温度を任意の温度に調節できる泳動装置は市販されていない。

今回試作した恒温ディスク泳動装置は泳動ゲル全体が槽用緩衝液につかるように設計され、この緩衝液を蛇管

コンデンサーとスターラーで能率的に一定温度に保つように工夫してある。本装置を用いれば 0.1℃ 以内の誤差で任意の恒温で泳動することができる。本装置の構造とその恒温能率、ならびに本装置を用いてコンカナバリン A と糖質との反応を例に、その熱力学的解析の結果を報告する。

1. 恒温ディスク泳動装置

Fig. 1 に試作した恒温ディスク泳動装置の実物写真 (A) と断面図 (B) とを示した。径 14 cm、高さ 15 cm の有底円筒を下電極槽 (Ve) とし、径 13 cm、高さ 7 cm の有底円筒を上電極槽 (Vu) として重ねる。上電極槽中央には径 4 cm の円筒を通し、この円筒を通してジムロート型ガラス製コンデンサー (C) を挿入する。下電極槽底面中央に径 4 cm、高さ 2 cm の窓を持ったマグネチックスターラーの回転室 (M) を取り付け、その上面中央でコンデンサー (C) を固定する。上電極槽にはゲル管 (G) 12 本と温度計 (T) を装着する孔が作ってある。槽用緩衝液 (1.5 l) は上・下電極槽間に空気が残らないように注入し、コンデンサーに恒温水を通すと同時にマグネチックスターラーで緩衝液をよく攪拌する。泳動温度と室温との差が大きい場合には、あらかじめ槽用緩衝液を泳動温度に調整して用いれば、短時間で恒温にすることができる。

2. 通電量と泳動ゲルの温度

通電による泳動ゲルおよび槽用緩衝液の温度変化は銅コンスタンタン熱電対でモニターした。すなわち、2 組の銅コンスタンタン熱電対の一端をそれぞれ泳動ゲルお

* Thermostatic disc electrophoresis apparatus. Its application to the thermodynamic analysis of concanavaline A-carbohydrate interaction.

** Kazusuke Takeo, Ryosuke Suzuno, Masanori Fujimoto, Akira Kuwahara, and Kazuyuki Nakamura. 山口大学医学部第 1 生化学教室

Fig. 1. Photograph (A) and its diagram (B) of disc gel electrophoresis apparatus.
c : glass-made coiled condenser, E_l and E_u : lower and upper electorodes, G : electro-
phoresis glass tubes, M : magnetic stirrer, T : thermometer and V_l and V_u : lower and
upper electrode vessels.

Fig. 2. The temperature differences between gels and buffer solution during electrophoresis.
A : At the standard condition of electrophoresis in the use of the thermostatic electropho-
resis apparatus.
B : Temperature difference in the use of (A) the thermostatic electrophoresis apparatus, (B)
excluding stirring from the thermostatic apparatus, and (C) in the use of the ordinary appa-
ratus at constant room temperature of 20°C.

よび槽用緩衝液に固定し、他端を氷水中に固定し、発生する起電力値から温度を算出した。Fig. 2 に 12 本のゲルをセットして通電した場合のゲルと緩衝液との温度差とゲル管 1 管当りの通電量との関係を示した。Fig. 2 A に見られるように、上記のように、コンデンサーによる恒温水の還流とスターによる攪拌とによって恒温化した場合には 3 mA/管の通電でゲルの温度は緩衝液よりも 0.6°C 高くなったが、2.5 mA/管で 0.2°C、2.0 mA/管以下では 0.1°C 以下の温度差となった。すなわち、この装置を用い 2.0 mA/管以下の通電量で泳動した場合には緩衝液の温度を測定することによってゲルの温度を 0.1°C の誤差範囲内で正確に知ることができる。

Fig. 2 B に比較のために 20°C の恒温室で通電した場合と、コンデンサーのみによる恒温化の場合の温度変化を示した。前者の場合には 2.5 mA/管の通電によってゲルの温度は緩衝液のそれより 4°C 高くなるが、通電とともに緩衝液の温度も上昇し、1.5 時間の通電でその温度は 26~30°C にまで上昇した。したがって泳動ゲルの温度は 30°C 以上と室温より 10°C 以上高くなっていた。スターによる攪拌を止め、コンデンサーのみによる場合にも恒温化の能率は不十分で、2.0 mA/管の通電によってゲルの温度は緩衝液より 0.6°C 高く、正確な恒温を

うることは困難であった。

3. 親和泳動像に対する温度の影響

Fig. 3 に各種の温度におけるコンカナバリン-A (Con A) とデキストランとの反応の親和泳動像²⁾ (Affinity pattern) を示した。泳動は Reisfeld ら³⁾ の弱酸性緩衝液系を用い 5% のポリアクリルアミドゲルを用いて行った。泳動ゲルは 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 および 0.5% の 6 種の濃度のデキストランを含む 2 本ずつ計 12 本のゲルを用いて泳動した。得られた親和泳動像から判るように 11°C (A) の泳動の場合には 0.1% のデキストランを含むゲルで Con A の泳動速度はデキストランを含まない場合に比べ約 40% の減少をきたしているがデキストランの濃度を増すにつれて減少率は急激に大きくなり、0.5% デキストランを含む場合には 75% の減少に達した。

泳動温度が上昇するにつれ、泳動速度の減少率は漸次弱まり、59°C の泳動の場合 (F) では 0.1% のデキストランを含むゲルで泳動速度の減少率は 10% 弱であって、0.5% デキストランを含む場合にも減少率は 25% に停まっている。すなわち、Con A のデキストランに対する親和性は温度が上昇するにつれて減弱して行く。

Fig. 3. Affinity patterns of Con A dextran interaction at varying temperature.

Table 1. K_d values of Con A-dextran interaction at varying temperature.

Temp. (C°)	11	22	30	39	50	59
K_d (mM)	0.39	0.66	0.95	1.35	2.12	3.83

Table 1 に Fig. 3 のそれぞれの温度における親和泳動像から算出された解離定数 (K_d) を示した. K_d 値は 11°C の泳動で 0.39 mM, 59°C の泳動で 3.83 mM と約 10 倍大きくなっている. K_d 値の逆数が親和性の強さを表わすから, 59°C における Con A のデキストランに対する親和性は 11°C におけるものの 1/10 に低下しているといえる.

4. 親和電気泳動法による熱力学定数の算出

化学反応の熱力学定数はマイクロカロリーメーター等を利用して直接熱エネルギーの変化量を測定して求められるが, K_d 値の温度変化から間接的に求めることができる. すなわち, van't Hoff の式 (1) にしたがって:

$$\log \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H^0}{2,303 \cdot R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \dots\dots (1)$$

絶対温度の逆数 ($1/T$) に対して $\log K_d$ をプロットすれば直線がえられ, その直線の勾配からエンタルピー変化量 (ΔH^0) が求められる. 一方自由エネルギーの変化量 (ΔG^0) およびエントロピーの変化量 (ΔS^0) は, それぞれ (2) および (3) 式で与えられる:

$$\Delta G^0 = 2,303 \cdot R \cdot T \cdot \log K_d \dots\dots (2)$$

ここで $R = 1.986 \text{ cal/deg} \cdot \text{mol}$.

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T} \dots\dots (3)$$

Fig. 4 に Table 1 の K_d 値を van't Hoff の式にし

Fig. 4. Van't Hoff plots for Con A-dextran interaction.

たがってプロットしたものを示した. 図から明らかなように 11°C から 50°C までは van't Hoff の式を満足さす直線を与えたが, それ以上の温度では直線に乗らず, 50°C 以上では Con A のデキストランに対する結合性に変化が生じたことを示している. このプロットの直線部分から (1) 式を用いて ΔH^0 を算出すれば -6.2 kcal/mol となり, (2) および (3) 式から 20°C における ΔG^0 および ΔS^0 を算出すればそれぞれ -4.3 kcal/mol , -6.3 cal/mol/deg となった.

Table 2 に諸種の糖類に対する Con A の K_{d1} 値および熱力学的定数を示した. この熱力学的定数から Con A の糖結合反応の特性を推論すれば以下ようになる.

(1) ΔG^0 値はマルトース型小糖およびグリコゲンに対してはグリコシル残基数に関係せずほぼ一定である ($-4.1 \sim -4.3 \text{ kcal/mol}$). 一方, ΔH^0 値はグリコシル残基数が増加するにつれてわずかではあるが負に増加する. 例えばマルトース (残基数 2) で -6.1 kcal/mol , マルトヘプタオース (残基数 7) で -7.5 kcal/mol で

Table 2. Thermodynamic parameters of Con A-carbohydrate interactions.

Carbohydrates	K_d or K_i at 20°C (mM)	$-\Delta G^0$ (kcal/mol)	$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$-\Delta S^0$ (cal/mol·deg)
Dextran T-2000	0.55	4.3	6.2	6.3
Glycogen, s.f.	0.81	4.1	11.0	23.4
Maltose	0.69	4.2	6.1	6.4
	0.75*1	—	—	—
Maltotriose	0.77	4.2	6.8	8.9
Maltotetraose	0.89	4.1	7.5	11.4
Maltopentaose	0.94	4.1	7.2	10.8
Maltoheptaose	0.83	4.1	7.5	11.3
Me- α -D-Glc	0.32	4.7	6.2	5.2
	0.20*2	—	—	—
	0.50*3	—	—	—
Ph- α -D-Glc	0.23	4.9	6.7	6.3
Mannose	0.34	4.7	8.4	12.8
Me- α -D-Man	0.074	5.5	9.4	13.4
	0.150*4	5.18*4	9.07*4	13.37*4
p-NP- α -D-Man	0.057	5.7	8.9	10.9
	0.067*5	—	—	—

*1 : Bessler et al. (1974), pH 7.0 at 27°C⁴⁾.
*2 : So and Goldstein (1968), pH 6.2 at 2°C⁵⁾.
*3 : Gunther et al. (1973), pH 7.4 at 25°C⁶⁾.
*4 : Van Landschoot et al. (1980), pH 5.5 at 25.3°C⁷⁾.
*5 : Loontjens et al. (1973), pH 5.4 at 25°C⁸⁾.

あった。マルトース型結合の平均グリコシル残基数が9～11個のグリコーゲンではさらに負に大きく -11.0 kcal/mol となった。

(2) ΔS° 値はすべての糖に対して負の値となっているが、マルトース型糖に対してはグリコシル残基数が増加するとともに負に増加している。このようにマルトース型糖の場合には ΔH° と ΔS° は平行して増減しており、これが相殺し合う結果、 ΔG° および K_d 値が一定になっていると考えられる。

(3) エントロピーの変化は蛋白分子の構造の変化と関連している。蛋白分子がより規則的な構造 (ordered configuration) をとれば ΔS° 値は負に変化し、よりランダムな構造をとれば正に変化すると考えられる。マルトース型糖の場合にはエントロピーは負に変化するが、グリコシル残基数が増加するにつれてより大きく負に変化している。このことは親水性と考えられる糖と結合することによって、Con A の構造はより規則性の高いものとなり、その規則性はグリコシル残基数が多いほどより顕著になると推論できる。

(4) 疎水性アグリコンを持つグリコシッドの ΔG° は対応するマルトース型小糖のそれに比して負に大きい。一方、 ΔH° 値については両者の間に差がないが、 ΔS° 値は逆に小さくなっている。同じ傾向はマンノシッドとマンノーズとの間にも見られる。一般に疎水性結合反応においては分子の疎水基の表面に結合しているより高いエネルギーレベルにある水分子が除去されるために反応系の規則性は低下し、エントロピーは正に変化する。表に見られるように、グリコシッドあるいはマンノシッドの ΔG° は対応するマルトースあるいはマンノースに比して

負に大きく、親和性が高いが ΔS° 値はむしろ負に小さくなっている。これはグリコシッドおよびマンノシッドの疎水性アグリコンと Con A の疎水結合のためと推論できる。 ΔS° 値の小さいことが ΔH° 値にあまり差がないにもかかわらず ΔG° 値を負に大きくし、親和性を高める結果になったと考えられる。

以上、親和電気泳動法のために試作した簡便な恒温ディスク泳動装置について報告した。本装置を用いれば 2.0mA /管の通電によって 0.1°C 以下の精度をもって泳動ゲルの温度を任意の温度にコントロールできる。本装置を用いコンカナバリンAと糖類との反応の熱力学的定数を算出し、得られた値から、コンカナバリンAの糖結合特異性について検討した。

文 献

- 1) Takeo, K. and Nakamura, S. : Arch. Biochem. Biophys. **153** : 1, 1972., 竹尾和典他：生物物理化学, **22** : 139, 1978, 竹尾和典：蛋白質核酸酵素, 別冊, **22** : 125, 1980.
- 2) Takeo, K. et al. : Electrophoresis **81**, Charleston, SC., USA. April 6-9, 1981.
- 3) Reisfeld, R.A. et al. : Nature, **201** : 281, 1962.
- 4) Bressler, W. et al. : J. Biol. Chem., **249** : 2819, 1974.
- 5) So, L.L. and Goldstein, I.J. : Biochim. Biophys. Acta, **165** : 398, 1968.
- 6) Gunther, G.R. et al. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70** : 1012, 1973.
- 7) Van Landschoot, A. et al. : Eur. J. Biochem., **103** : 307, 1980.
- 8) Loontjens, F.G. et al. : Carbohydr. Res., **30** : 51, 1973.