Lectinofixation 法による allo A 親和性糖蛋白質の検出

梅津和夫・鈴木庸夫**

SUMMARY

The method for protein fixation using lectin in place of antibody, designated as lectinofixation, was developed. By this method, allo A lectin-binding human serum proteins following two-dimensional electrophoresis and isoelectric focusing were detected. By the lectinofixation with allo A, the main components of allo A-binding proteins such as orosomucoid, α_1 -antitrypsin, transferrin and haptoglobin were detected, while albumin was not detected. This technique is easier to perform in a shorter period of time and has been found to be a useful tool in detection of allo A lectin-binding glycoproteins.

Key words: lectinofixation, allo A lectin, human serum proteins.

はじめに

lectin は複合糖質に含まれる糖鎖に特異的に結合する。この性質は電気泳動後の糖蛋白質成分を染色することにも応用されているが、lectin と糖鎖との結合力は一般に弱いので、lectin を酵素¹⁾、蛍光物質²⁾あるいはアイソトープ³⁾で標識することによって染色性を増強している。しかし、いずれの方法もかなり長時間を要し、しかも説得力のある像を得ることは容易でない。

我々は先に β -D-galactose に特異的な allo A lectin (カプトムシ) を精製した^{4,5)}。この lectin はヒト血清の一部と明瞭な沈降反応を起こし⁴⁾、また allo A-Sepharose による affinity chromatography により、ヒト血清を親和性、非親和性蛋白質に区別できること⁶⁾ を明らかにした。

この結果に基づいて、ヒト血清中の allo A 親和性糖蛋白質の検出を、血清の 2 次元電気泳動および等電点

電気泳動後、allo A を用いる lectinofixation 法 (immunofixation における抗体に代えて lectin を用いる方法) を用いて行った。

実験材料および方法

1. 2 次元電気泳動

正常ヒト血清 2 μ l を試料として、ミクロ 2 次元電気泳動 (50×70×1 mm) を行った。1 次元目の等電点電気泳動は真鍋ら⁹⁾の方法に準じて行い、2 次元目の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 7.5% 濃度ゲルを用いた。

2. 等電点電気泳動

Separax-EF (11×10cm, 富士フィルム) を支持体として等電点電気泳動を行った。5% ショ糖液で 3% 濃度になるように希釈した Servalyt 3~10 (Serva) を膜に浸み込ませ、正常ヒト血清 1 μ l を塗布し、8℃の冷却下で 300V・30分、400V・30分、600V・30分定電圧

* Detection of allo A-binding glycoproteins by lectinofixation

** Kazuo Umetsu and Tsuneo Suzuki, 山形大学医学部法医学

Correspondence address: Kazuo Umetsu Department of Forensic Medicine, Yamagata University School of Medicine, Zao Iida, Yamagata 990-23, Japan

(受付 1985年7月11日, 受理 1985年9月7日)

で泳動した。なお、電極液として、陽極側には0.1M L-アスパラギン酸とL-グルタミン酸の溶液(30%ショ糖を含む)、陰極側には1 M エチレンジアミン、0.01 M L-アルギニンと L-リジンの溶液を用いた。

3. lectinofixation 法

lectinofixation 法は2次元電気泳動後のゲルを10 mlのallo A 溶液(0.3mg/ml)に一晩浸すことによって行い、未反応の蛋白質は生理的食塩水で2日間洗浄した。また print lectinofixation 法は Separax-EF による等電点電気泳動後、allo A (1 mg/ml)を浸み込ませた Separax 膜(富士フィルム)を密着させ、1時間行った。次いで、Separax 膜を生理的食塩水で3時間洗浄し、未反応の蛋白質を除去した。

沈降反応物は acid violet 49 (C.I.42640)による蛋白染色を行った。また対照として電気泳動後、allo A を作用させず、そのまま蛋白染色を行った。

実験成績

2次元電気泳動後、lectinofixation 法を用いた結果を Fig.1A に示した。これを対照の蛋白染色の泳動像(Fig.1B)と比較すると大部分のスポットが対比可能であった。対照にみられたが、lectinofixation 像に欠けていたものとしては、A1b, HDL の apoprotein が代表的なものであった。なお IgG の被染色性はかなり減少した。逆に lectinofixation 法によって被染色性が増加した蛋白質として、orosomucoid (ORM), α_1 -anti-

trypsin (PI), haptoglobin (HP)があった。transferrin (TF) は両者においてほとんど変化が認められなかった。

等電点電気泳動後の print lectinofixation 法で検出できたバンドを Fig.2A に、対照の蛋白染色の泳動像を Fig.2B に示した。lectinofixation 法では3カ所に明白なバンドが認められた。これらのバンドは陽極側から、ORM, PI, それに TF を中心としたバンドと考えられた。特に ORM は蛋白染色ではほとんど検出されないにもかかわらず、lectinofixation 法では強く染色された。しかし、A1b や IgG のバンドは検出されなかった。

考察および総括

lectin は電気泳動法にとって染色(検出)の面で重要な試薬の一つであり、affinity electrophoresis にも応用されている。この中には交差電気泳動法への利用として、crossing electrophoresis¹⁰⁾, crossed immuno-affinoelectrophoresis¹¹⁾などが知られている。また affinity electrophoresis により蛋白と lectin の相互作用の解離定数の算出¹²⁾もなされている。しかし、一般に結合力の弱い lectin は異なった物質間の親和性の差の観察あるいは解離定数算出の手段としては優れているが、immunofixation 法のように直接的な親和性物質の検出には不適當である。あえて実施するとすれば、lectin を酵素などで標識することによる発色

Fig.1. Two-dimensional gel electrophoretic patterns of human serum proteins.

A: lectinofixation, B: protein staining.

Fig.2. Separax-EF membrane isoelectric focusing patterns of human serum proteins.

A: print lectinofixation, B: protein staining.

の増幅が必須である¹⁻³⁾。ところが本実験により, allo A を標識することなしに lectinofixation 法に用い, 親和性糖蛋白質の検出を容易に行うことができることが明らかになった。このことは, 動物 lectin である allo A は植物 lectin と比較して, かなり結合力が強いことを示唆している。また, lectinofixation 法による反応は, allo A-Sepharose による affinity chromatography の結果⁶⁾とよく一致した。例えば affinity chromatography で親和性を示した ORM や PI は本実験でも明瞭に検出でき, また, 12%のみが反応性を示した IgG の被染色性はかなり低下し, 非親和性蛋白質であった Alb は検出できなかった。このようなことから, 本法は affinity chromatography の結果の予測, 条件設定などに役立つものと考えられる。

ところで, 親和性蛋白質の中でも, ORM や PI のように被染色性の増加するものと, TF のように変化が少ないものが見られた。これは allo A の親和性蛋白質に対する結合力の差を反映しているものと推定される。なお ORM は約40%の糖質を含む糖蛋白質であるにもかかわらず, RCA¹³⁾とは反応せず, con A¹⁴⁾にも

一部の成分が弱く反応するのみである。また, allo A と同じような糖特異性を示す tridacnin¹⁵⁾や肝 lectin¹⁶⁾は共に脱シアル化 ORM にも親和性を示す。これは糖鎖末端にあるシアル酸が, lectin と ORM の結合を阻止しているものとも考えられる。しかし, allo A は無処理の ORM に対しても強く反応することから, シアル酸より内部の β -D-galactose 構造を認識する新しいタイプの lectin の一つと考えられる。なお本法は多型性の知られる ORM¹⁷⁾や PI¹⁸⁾の型判定への応用も期待される。

本実験では, 2次元電気泳動と等電点電気泳動で, allo A とヒト血清蛋白質との反応を分析した。前者は分離能に優れていたが, 操作に長時間を要し, 高分子量蛋白質については除蛋白に不安が残る欠点があった。一方, 後者は簡便さにおいて優れていたものの, 検出されたバンド数はかなり少なかった。これは前者では2倍量用いた試料の大部分の親和性蛋白質が反応に関与したものと考えられたが, 後者では Separax 膜に転写された一部の蛋白質の中で, 量的に多く, しかも親和性の高い糖蛋白質のみが検出されたためと推定された。全操作が8時間以内で終了する Separax-EF あるいはその他の除蛋白の容易な支持体による電気泳動法と lectinofixation 法の組み合わせが最も実用的であると考えられる。

以上より, allo A を用いる lectinofixation 法は血清糖蛋白質の分析に極めて有用であることが明らかである。従って, 本法は新しい糖蛋白質検出法としての活用が期待される。なお, この allo A 以外にも既知の lectin としては tridacnin¹⁵⁾などは本法を適用できる可能性を有している。

要 旨

我々は, 免疫固定法における抗体に代えて, lectin を用いる方法を lectinofixation 法と命名した。allo A lectin を用いた本法により, ヒト血清中の親和性蛋白質の直接的な検出を試みた。2次元電気泳動および等電点電気泳動後に lectinofixation 法を適用したところ, 親和性蛋白質は鮮明な像として染色された。親和性蛋白質として, orosomucoid, α_1 -antitrypsin, transferrin などが検出されたが, albumin などは親和性を有せず検出されなかった。

本法は鋭敏でしかも簡便であるので, 糖蛋白質の優れた検出法の一つになるものとして期待される。

本論文の要旨は第34回電気泳動学会春季大会で報告した。

文 献

- 1) Parish, R.W. et al. : FEBS letters, **95** : 366, 1978.
- 2) Furlan, M. et al. : Anal. Biochem., **96** : 208, 1979.
- 3) Gard, J.W. and Evans, W.H. : Can. J. Biochem., **54** : 477, 1976.
- 4) 梅津和夫 : 山形医学, **1** : 247, 1983.
- 5) Umetsu, K. et al. : J. Biochem., **95** : 239, 1984.
- 6) Umetsu, K. et al. : Biochem. Int., **10** : 549, 1985.
- 7) Alper, C.A. and Johnson, A.M. : Vox Sang., **17** : 445, 1969.
- 8) Constans, J. et al. : Hum. Genet., **41** : 53, 1978.
- 9) 真鍋 敬他 : 生物物理化学, **25** : 161, 1981.
- 10) Nakamura, S. et al. : Nature, **188** : 144, 1960.
- 11) Børg-Hansen, T.C. : Anal. Biochem., **56** : 480, 1973.
- 12) Børg-Hansen, T.C. and Takeo, K. : Electrophoresis, **1** : 67, 1980.
- 13) Harboe, M. et al. : Scand. J. Immunol. **4**, Suppl., **2** : 125, 1975.
- 14) Wells, C. et al. : Clin. Chim. Acta, **109** : 59, 1981.
- 15) Uhlenbruck, G. and Steinhausen, G. : J. Chem. Clin. Biochem., **15** : 21, 1977.
- 16) Baenziger, J. U. and Fiete, D. : Cell, **22** : 611, 1980.
- 17) Tokita, K. and Schmid, K. : Nature, **200** : 266, 1963.
- 18) Fagerhol, M.K. and Braend, M. : Science, **141** : 986, 1965.