〔紹 介〕

エンザイム・レクチンアッセイ

原田 宏*・小山文裕**

はじめに

生体における糖鎖の役割や重要性が近年注目を集めている。というも、細胞間相互作用において糖鎖が重要な役割を果たしていたり、ガンあるいは疾病患者に特異的に存在する糖鎖が発見されるなど、糖鎖に係る興味ある報告が数多く出されるようになったからである¹⁾。この為、生体成分の糖鎖に関する研究が勢力的に行なわれているが、この分野の研究では、糖鎖と特異的に結合するレクチンをうまく利用して研究を進める場合が数多くある^{2,3)}。しかしながら、レクチンは試薬になっているものだけでも20種以上あるため、効率よく研究を進めるにはどのレクチンを利用すればよいのか困る場合がある。その点に関し我々は、EIAを応用した ELA (Enzyme lectin assay) と呼ぶべき方法を用いると、試料がどのレクチンと相互作用を持ち、その相互作用の強さがどの程度なのかを簡単に知ることができる事を見いだしたので、応用例を含めて以下に紹介する。

材料および方法

1. 材料: α_1 -酸性糖蛋白, BSA, オボアルブミン, フェツイン, チログロブリンはシグマ社の製品を使用した。ニトロセルロース膜 (NC 膜, $0.45\mu\text{m}$) は東洋濾紙㈱の製品を使用した。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) を標識したレクチン (Con A: コンカナバリン A, WGA: 小麦胚芽レクチン, SBA: 大豆レク

チン, PNA: ピーナツレクチンの4種) および SBA は豊年製油㈱の製品を使用した。またノイラミニダーゼは生化学工業㈱の製品を使用した。

2. ノイラミニダーゼ処理: 0.15M NaCl を含む10mM 酢酸バッファー (pH6.0) に試料を溶解し、ノイラミニダーゼを最終濃度が0.1U/ml になるように添加後、37℃で1時間酵素反応を行った。

3. ELA: PBS (0.15M NaCl を含む10mM リン酸バッファー, pH7.4) で試料の2倍濃度の希釈系列を作り、Bio-Rad 社の Bio-Dot 微量濾過装置を用いて NC 膜に吸着させた。その後、Ochiai ら⁴⁾の方法に従って NC 膜上の糖蛋白の検出を行った。つまり、NC 膜を装置からはずし、0.9% NaCl と0.05% Tween 20を含む10 mM トリス塩酸バッファー (pH7.4, 以後 A 液と略す) 中で数回液を交換しながら40分間振とうした。その後 A 液で1~5 $\mu\text{g/ml}$ に調製した HRP-レクチンで NC 膜をおおい、1時間静置した後、NC 膜を A 液中で、数回液を交換しながら1時間振とうして未反応の HRP-レクチンを除去した。酵素による発色は、0.03% ジアミノベンチジン, 0.003% H_2O_2 を含む PBS 中で行った。NC 膜上の発色ドットは、必要に応じ、600 nm の反射吸収の強さを、島津クロマトスキャナー CS-930を用いて測定し、発色度の比較を行った。尚今回は、測定値の発色度を3段階 (0~0.4, 0.4~0.8, 0.8以上) にわけた。

4. イオン交換クロマトグラフィー: ファルマシア社の Mono S カラムによるイオン交換クロマトグラフィー

Enzyme lectin assay

Hiroshi Harada and Fumihiro Koyama

*豊年製油㈱

** (財) 杉山産業化学研究所

Correspondence address: Hiroshi Harada, Hohnen Oil Co., LTD., Chiyoda-ku Tokyo 100, Japan

略号: NANA, N-アセチルノイラミン酸; Gal, ガラクトース; GalNAc, N-アセチルガラクトサミン

(受付 1986年12月22日, 受理 1987年1月25日)

を, FPLC システムを用いて行った. 液出は, 50mM β -アラニン-酢酸バッファー (pH5.0) を用いる 0 ~ 0.5M NaCl の直線グラジェントで行った. また流速は 1 ml/分で行い, 溶出した液を 1 ml ずつ分画した.

結果と考察

5 種類の蛋白質を試料とし, 標識した 3 種類のレクチン (Con A, WGA, SBA) を用いた ELA を行ったのが Fig. 1 である. SBA は Con A にだけ, α_1 -酸性糖蛋白では WGA だけ, オボアルブミンは Con A と WGA に発色が見られる. またチログロブリンでは 3 種類のレクチンすべてに発色が見られる. しかし糖鎖を持たない BSA はどのレクチンでも発色が見られない事がわかる. この様に, ELA を用いれば, 試料中の糖鎖がどのレクチンと相互作用を持つのか簡単に知ることができる. (Fig. 1)

また標識レクチンによる発色は, レクチンと強い相互作用を持つ糖蛋白質ほど微量で発色するので, 発色のはじまる量を比較する事により, 試料に対するレクチンの相互作用の強さを知ることができる. 例えば, Con A に対してはオボアルブミン < SBA < チログロブリンの順に微量の蛋白量でも発色が見られ, Con A に対する相互作用がこの順で強くなっていると思われる. またチログロブリンの場合, 0.4 μ g の微量の蛋白量でも発色が見られ, 検出感度が高いことがわかる (Fig 1).

さて生体には, 糖鎖の末端がシアル酸である糖蛋白

が数多く存在し, 糖蛋白質を研究する場合, シアル酸を除去するノイラミナーゼ処理を利用する場合がよくある. そこで, ノイラミナーゼ処理と ELA を組合せて実験を行った. 末端が NANA-Gal-GalNAc である糖鎖を有する α_1 -酸性糖蛋白やフェツインの場合, Gal-GalNAc を認識する PNA との結合を NANA が阻害するため, ノイラミナーゼ無処理の場合, PNA ではほとんど発色しない. しかし Fig. 2 に示したように, ノイラミナーゼ処理すると PNA で発色するようになる. 一方, NANA-Gal-GalNAc の糖鎖構造がないオボアルブミンでは, ノイラミナーゼ処理の有無にかかわらず PNA で発色しない. (Fig. 2)

このように, 精製された糖蛋白質の場合, ノイラミナーゼ処理を組合せた ELA を行うことにより, 試料中の糖鎖が, ①どのレクチンと相互作用を持ち, ②その相互作用の強さがどの程度なのかを既知の糖蛋白質と比較でき, さらに, ③末端に NANA-Gal-GalNAc 構造があるのか否かを簡単に知ることができる.

また ELA は蛋白の精製に対しても有効な手段となりうる. 例えば多成分系からなる血清を起源とする蛋白質の精製を行う場合, 非常に分離能の良いイオン交換カラムである Mono S カラム (ファルマシア製) を用いても, すべての成分を一回で分離する事はできない (Fig. 3). そのため, 異なった種類のクロマトグラフィーを組合せて精製を行っていかなければならないが, ELA を行う事により, 次の精製工程にレクチンアフィニティーを効率よく導入する事ができる. Mono

Fig. 1 Interaction of samples and lectins was detected by the method of Enzyme lectin assay (ELA).

Used lectins were Con A, WGA and SBA. Applied samples were thyroglobulin, SBA, ovalbumin, BSA and α_1 -acid glycoprotein. Amount of samples were lane 1, 50 μ g; lane 2, 25 μ g; lane 3, 12.5 μ g; lane 4, 6.3 μ g; lane 5, 3.1 μ g; lane 6, 1.6 μ g; lane 7, 0.8 μ g; lane 8, 0.4 μ g.

Fig. 2 Effect of neuraminidase treatment on interaction of samples and lectins.

Glycoproteins were treated (+) or nontreated (-) with neuraminidase and interaction of samples and lectins was detected by the method of ELA using PNA.

Applied samples were ovalbumin, α_1 -Acid glycoprotein and fetuin. And amount of samples were lane 1, 50 μg ; lane 2, 25 μg ; lane 3, 12.5 μg ; lane 4 6.3 μg ; lane 5, 3.1 μg ; lane 6, 1.6 μg ; lane 7, 0.8 μg ; lane 8, 0.4 μg .

Fig. 3 Fractionation of fetal calf serum by FPLC using Mono S column and detection of glycoproteins by ELA.

Fifty μl of fetal calf serum was injected into Mono S column. A linear gradient of 0-0.5M NaCl was used, and 1ml fractions were collected. Glycoproteins of each fraction were detected by ELA using Con A, WGA and SBA. Reflective absorbance of coloring dots were measured at 600nm (for detail, see Material and Method).

S カラムを用いたイオン交換で得られた画分に対して ELA を行ってみると、Fig. 3 に示すように、WGA はほとんどすべての画分と反応しているが、Con A では高塩濃度で溶出する画分に、SBA では17番目の画分に特異的に反応していることがわかる。このことから、Con A のアフィニティークロマトを用いれば、Mono S カラムの低塩濃度溶出画分と高塩濃度溶出画分の糖蛋白質を簡単に分離できると思われる。また SBA のアフィニティークロマトを用いれば、血清から一段階のクロマトで、17番目の溶出画分に含まれる糖蛋白質を精製することが可能になるとと思われる。

このように ELA をうまく利用する事により、糖蛋白質の糖鎖に関する研究や蛋白質の精製が効率よく進むと思われる。

ま と め

糖蛋白質の簡便な検出方法として、ELA を応用した ELA を紹介する。ELA を用いると、①試料の数が多くても（一回に最大96の試料を処理できる）②0.1～

10 μ g の微量の試料で、③短時間（3 時間程度）のうちに、試料とレクチンの相互作用を知ることができるので、その結果から、試料の糖鎖構造に関する情報やレクチンアフィニティークロマトへの適応性を知る事ができる。

謝 辞

技術的助言を賜りました北海道大学、免疫科学研究所の落合滋子・片桐洋子 両先生に深謝いたします。

文 献

- 1) R.B. Parekh, T. Mizuochi et al., Nature, **316**, 452 (1985)
- 2) R.D. Cummings, S. Kornfeld, J. Biol. Chem., **257**, 11235 (1982)
- 3) A. Hitoi, K. Yamashita et al., Gann, **75**, 301 (1984)
- 4) S.K. Ochiai, Y.U. Katagiri et al., Anal. Biochem. **147**, 222 (1985)