〔原 著〕

Allo A 親和性糖蛋白質カラムによる不必要な抗体の除去

梅津和夫*・湯浅 勲**・鈴木庸夫*

SUMMARY

A method for removing of unnecessary antibodies was developed. Allo A lectin-Sepharose 4B and its binding serum glycoproteins were crosslinked by the dimethyl suberimidate. The antibodies on the market were purified by affinity chromatography on glycoproteins-allo A-Sepharose. By the method, anti- α_1 -antitrypsin, anti-hemopexin and anti-transferrin were obtained from the eluted fraction, and anti-retinol binding protein was obtained from the nonretarded fraction. On the other hand, anti-factor I and anti-Gc-globulin were obtained from both fractions. The method proved to be excellent for removing unnecessary antibodies from *so called* monospecific antibody on the market.

Key words: antibody, allo A lectin, immobilized glycoprotein, affinity chromatography.

はじめに

最近の分析技術の向上は目覚ましいものがある。これに伴って市販されているポリクローナルの特異的抗血清には別の抗原に対する抗体も同時に検出されることが多くなり、誤った結果を導き出している報告例も少なくない。実際にはいろいろのメーカーの抗血清を比較して目的にあうロットを選びだしたり、抗血清をさらに精製せざるをえないことも多い。抗体中の不必要な抗体の吸収除去操作は主として不溶化した抗原で行うが、この抗原の調整はなかなか容易ではない。

そこで、allo A レクチンの選択的糖蛋白質との結合性に着目し、これを抗血清の精製の目的に応用するため、固定化 allo A レクチンゲルに親和性糖蛋白質を結合させた後、架橋剤で両者を共有結合させたゲルを用いたアフィニティクロマトグラフィーで、市販の抗血清を非吸着分画と溶出分画とに分離し、両分画における抗体の特異性を検討した。

実験材料および方法

1. 抗血清

次の抗血清を使用した。和光純薬の抗 factor I (IF) 血清; Lot No. PEK 9751, Dako 社の抗 retinol binding protein (RBP) 血清; Lot No. 019D, 抗 Gc-globulin (GC) 血清; Lot No. 039F, および抗 α_1 -antitrypsin (PI) 血清; Lot No. 032F.

2. Allo A-Sepharose ゲル

Allo A レクチン¹⁾ (コスモ・バイオ社) を BrCN 活性化 Sepharose 4B (Pharmacia 社) にゲル 1 ml 当り 5 mg 結合させ、allo A-Sepharose²⁾ を作製した。

3. Allo A 親和性糖蛋白質を固定化したゲルの作製

1.5 ml の allo A-Sepharose を小カラムに詰め、2 倍に希釈した 3 人分の混合ヒト正常血清 3 ml を加えて親和性糖蛋白質を反応させ、20 ml の PBS で洗浄した。このゲルを試験管に移し、0.1 M ホウ酸 buffer, pH 8.0 で一度遠心洗浄を行い、同 buffer 2 ml に 10 mg のジ

Removing of unnecessary antibodies by affinity chromatography on immobilized allo A lectin-binding glycoproteins.

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

** Isao Yuasa; 鳥取大学医学部法医学

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

(受付 1989年8月11日, 受理 1990年2月19日)

メチルスベルイミノ酸 (和光純薬) を加えたものと混合して, allo A と親和性蛋白質の共有結合を, 振とうしながら室温で 30 分間行った. ついで, 1 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸 buffer, pH 4.0 と 0.1 M ホウ酸 buffer, pH 8.0 で交互に 2 回ずつ洗浄して, 不完全結合の蛋白質を除去後に PBS で平衡化した.

4. 抗血清のアフィニティクロマトグラフィ

a. 抗 IF 血清

0.5 ml の 0.1 M lactose を含む PBS で 50 倍に希釈した抗 IF 血清を注射筒に詰めた 1 ml の吸着体に対して自然落下で 3 度循環させ, 最後に 1.5 ml の PBS で洗浄した液を非吸着分画とした. ついで 8 ml の PBS で洗浄後, 2 ml の 0.1 M グリシン-HCl buffer, pH 2.6 を加えて, 吸着成分を解離させ, ただちに 0.5 M トリス-HCl buffer, pH 9.0 を少量加え pH を中性に戻した. これを溶出分画とした.

b. 混合抗血清

0.5 ml の 0.1 M lactose を含む PBS に抗 RPB 血清および抗 GC 血清は 50 倍, 抗 PI 血清は 200 倍になるように希釈したものを混合抗血清とし, 1 ml の吸着体に対して抗 IF 血清と同様の操作により, 非吸着分画と溶出分画の抗体を得た.

5. Immunoblotting 法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法³⁾ で 10% ゲルを調整した. SDS-PAGE は還元剤非存在下で, 1 レーン当り 0.5 μ l のヒト血清を含むように泳動を行った. 泳動終了後, Immobilone-P (Millipore 社) に電氣的に転写を行った. 一部のレーンは CBB-R 250 で染色した. 残りは 2.0% のスキムミルクでブロックした. ついで上記の非吸着, 溶出分画を希釈せずそのまま室温で 30 分間反応させ, 洗浄後, 500 倍に希釈した Dako 社のペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリン血清を 30 分反応させた. 洗浄後, ジアミノベンチジン染色を行った. なお対照として, 未処理の個々の抗血清との反応も行った.

結果および考察

抗 IF 血清の immunoblotting による分析パターンを Fig. 1 に示した. 抗 IF 血清中には抗 IF 以外にも少なくとも抗 transferrin (TF) および抗 hemopexin (HX) の抗体が含まれていることがわかった. この抗血清は allo A 親和性蛋白質を固定化したゲルでの吸着操作により, 非吸着分画ではほぼ抗 IF 血清のみを含む画分となり, 吸着溶出分画にはじめの抗血清と同様の抗体

が検出された. これまで TF や HX は allo A 親和性血清蛋白質であるとされている²⁾が, IF についてはデータがなかった. しかし, 吸着溶出分画中の抗血清にも抗 IF 抗体が含まれていたことは, IF もまた allo A 親和性糖蛋白質であることを示している. これは正常血清中の IF 量は 0.034 mg/ml とかなり低濃度である⁴⁾ので吸着体に固定化された IF 量はきわめて微量であるため, 抗 IF 血清中の抗 IF 抗体を完全に吸収しきれなかったためと考えられる. なお allo A 親和性蛋白質として血清中に高濃度に存在する TF や HX は, 吸着体に多く固定され, また抗 IF 血清中でこれらの抗体の力価が低かったものと考えられることから, この二つの抗体は容易に吸収されたのであろう.

つぎに, allo A 非親和性蛋白質である RBP および GC, 親和性蛋白質である PI²⁾ に対する混合抗体を用いて, 今回作製した吸着体を検定した. その結果を Fig. 2 に示した. 対照として行ったこれら三種の市販のすべての抗血清中にも, 表示している特異的抗体以外のものによるものと見られるバンドが検出されたが, とくに抗 RBP 血清においては高分子量蛋白質に対する多くの抗体の存在が示された. これらの反応は蛋白質のポリマー化や分解, 変性あるいは共通抗原によるものではなく, 大部分は目的外の抗体の混在によると考えられた. これら 3 種類の混合抗血清を allo A 親和性蛋白質を固定化した吸着体でアフィニティクロマトグラフィを行った. 非吸着分画には BRP および GC, それにわずかに PI の付近のバンドを染色する抗体が含まれていた. この分画には目的外の抗体と考えられた高分子量に対する抗体はほとんど検出されなかった. 一方, 吸着溶出分画にはおもに PI と高分子領域の蛋白に対する目的外の抗体と, 弱いながら GC に対する抗体が検出された.

GC には糖鎖末端にシアル酸をまったくもたない GC 2 型と, 一部の分子にシアル酸をもつ GC 1 型に分類される⁵⁾. 一方, allo A レクチンは Gal β 1-4GlcNAc グループに特異性をもち, とくに Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc に強い親和性をもつことが知られている⁶⁾. したがって, 以前の報告²⁾で GC は allo A 非親和性蛋白質に分類したが, GC の一部はこのシアル酸を有する糖鎖をもつことから, allo A は GC 1 型の一部に強い親和性を示すことが推定され, 今回のような結果となったものと思われる. GC 2 型の血清のみを選んで作製した吸着体を用いれば, 抗 GC は非吸着分画に検出されるものと推定される. 市販の各血清成分に対する抗血清中にはとくに表示以外の抗体として抗 GC 抗体が検出さ

Fig. 1. Lanes 1 and 2, immunoblotting patterns of human serum proteins with anti-IF serum treated with the glycoproteins-allo A-Sepharose column (lane 1, column drop-through; lane 2, column eluate); lane 3, those with starting anti-IF serum, 1/200; lane 4, human serum protein patterns stained with CBB-R 250. About 0.5 μ l of each human serum was loaded.

れることが多いが、この抗 GC 抗体の除去には本法が有効であることが示唆された。

なお、市販の抗血清を高感度の検出方法にて用いる場合は、抗血清を高倍率に希釈することなどにより目的外の反応を押えることが多いが、この方法は微量成分に対する抗体の場合は適用がむずかしい。あらかじめ少なくとも SDS-PAGE 等で目的外の抗体の有無および性質の確認がデータの信頼性を向上させるための必須条件と考えられる。今回、レクチンを利用して親和性糖蛋白質を固定化した吸着体を用いる方法は特異抗血清中の不必要な抗体の除去のために有効であることが示された。なお血清蛋白質の大部分を占める albumin と 90% 程度の IgG が allo A 非親和性蛋白質である²⁾ ことに加えて、その他の蛋白質もレクチン親和性の有無によって分別され効率よくゲルに固定化できる本法は、抗血清の精製のためには簡便な方法と考えられる。またこの方法は血清蛋白質に対する抗体以外にも単純蛋白質と糖蛋白質に対する抗体を分別する際にも有効であろう。

Fig. 2. Lanes 1 and 2, Immunoblotting patterns of human serum proteins with mixed antibodies (anti-RBP, anti-GC, and anti-PI) treated with the glycoproteins-allo A-Sepharose column (lane 1, column drop-through; lane 2, column eluate); lane 3, those with starting mixed antibodies; lane 4-6, control (lane 4, human serum protein patterns stained with anti-RBP serum, 1/200; lane 5, those stained with anti-GC serum, 1/200; lane 6, those stained with anti-PI serum, 1/800). About 0.5 μ l of each human serum was loaded.

本法では allo A レクチンと親和性糖蛋白質を共有結合させたが、完全に結合していない糖蛋白質を酸とアルカリ溶液により洗浄除去する際に少なからずの蛋白質の脱落が認められた。これは、レクチンと糖蛋白質との特異的結合はレクチンの蛋白質と糖蛋白質の糖鎖の結合であるが、架橋剤で反応させてもこの両者はこの部位では架橋されず、レクチンの蛋白質と糖蛋白質の蛋白質部分との結合となるために効率がやや悪くなるためと推定された。なお allo A-Sepharose カラムで allo A レクチンに親和性を有するヒト血清中の糖蛋白質を分離し、この蛋白質を BrCN 活性化 Sepharose に固定化したゲルを作製し、同様の抗体を用いてアフィニティクロマトグラフィを行ったところ、上記とまったく同じ結果を得ることができた。この方法は操作がやや複雑であるが、

(210) 生物物理化学

長所としてはより多量の糖蛋白質の固定化が可能ことや、抗体希釈液に lactose の添加が不必要であることなどである。

以上のように, allo A 親和性糖蛋白質を固定化したゲルを用いる本法は市販の特異的抗血清から不必要な目的外の抗体の除去等に有効な方法であることが示された。今回は allo A レクチンの有用性を示したが, 種々のレクチンを用いても抗体の純化や免疫抗原の調整等への活用が期待される。

ま と め

分析技術の向上に伴って市販の特異的抗血清の中には目的外の抗体が検出されることが多い。不必要な抗体除去の一方法としてレクチンを利用する方法を検討した。Allo A-Sepharose に親和性糖蛋白質を反応させ, ついで架橋剤で両者を共有結合させた吸着体を作製し, このゲルを用いてヒト血清成分に対する特異的抗血清をアフィニティクロマトグラフィで分析したところ, 基本的にはレクチン親和性糖蛋白質に対する抗体はこのゲルに吸着され, また非親和性糖蛋白質に対する抗体は吸収されなかった。よって本法は, 目的外の抗体の除去等における有力な方法となりうることが判明した。

本論文の要旨は第 38 回電気泳動学会総会 (1987 年

10 月, 盛岡) において発表した。

文 献

- 1) Umetsu, K. et al.: J. Biochem., **95**: 239, 1984.
- 2) Umetsu, K. et al.: Biochem. Int., **10**: 549, 1985.
- 3) Laemmli, U. K.: Nature, **227**: 680, 1970.
- 4) Pungburn, M. K. et al.: J. Exp. Med., **146**: 257, 1977.
- 5) Cleve, H. and Patutschnick, W.: Hum. Genet., **47**: 193, 1979.
- 6) Yamashita, K. et al.: J. Biol. Chem., **263**: 17482, 1988.

要 旨

数多くの高感度の蛋白検出法の開発に伴って市販の特異的抗血清のなかには目的外の抗体が検出されることが多い。この解決法の一つとして allo A レクチンを用いる方法を検討した。つまり, allo A-Sepharose に血清中の親和性糖蛋白質を反応させ, 架橋剤で両者を共有結合させた。この吸着体を用いて, 市販のヒト血清成分に対する特異的抗血清をアフィニティクロマトグラフィで分析したところ, ほぼ親和性糖蛋白質に対する抗体はこのゲルに吸着され, また非親和性蛋白質に対する抗体は吸収されなかった。以上より, 本法は特異的抗血清の調整における有力な方法となりうることが判明した。