

# Con A-Sepharose Affinity Chromatography

## による種々の糖蛋白質の分離

木元幸一\* 那知上八重子\* 草間正夫\*\*

### Affinity Chromatography of Some Glycoproteins on Con A-Sepharose

Koichi Kimoto, Yaeko Nachigami, Masao Kusama

〔内容抄録〕 1. Concanavalin A (Con A) は、Blue dextran と定量的に反応し、その反応量は比色法によって簡便に求められた。

2. Con A は、 $\alpha$ -globulin, Egg albumin などの糖蛋白質と定量的に結合沈殿を形成した。
3. Con A-Sepharose 4B によって Affinity column を調製した。
4. Con A-Sepharose による Affinity chromatography により albumin を分離した。
5. Con A-Sepharose による Affinity chromatography により Lysosomal enzyme を分離した。
6. Con A-Sepharose による Affinity chromatography により Non sediment fraction の Acid phosphatase, Esterase の活性を分離した。

### 諸 言

Con A は、赤血球の凝集<sup>1),2)</sup>、リンパ球の幼若化<sup>3),4)</sup>、ある種の悪性細胞に対する凝集作用<sup>5)</sup>、多糖類や糖蛋白質との結合沈殿作用など種々の生化学的特性を有する Phytohemagglutinin である。

Gold Stein らは<sup>6),7)</sup>、Con A の糖結合能力に関して詳細に研究している。それによれば、Con A と糖との結合には、水酸基の立体配置が重要な役割を果たしている。即ち、D-glucopyranoside, D-mannopyranoside の C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> および C<sub>6</sub> などの水酸基はそれであって、さらに  $\beta$  型に較べて  $\alpha$  型の方がより強く結合する。

以上のように Con A の結合特性に関しては、はなはだ興味深い点が多いにも関わらずその研究は、細胞レベルあるいは単純糖類のレベルであるなど、どちらかにかたよって、近年、

重視されている生化学的活性を有したままの糖蛋白質、あるいは糖蛋白質酵素などについてはまだ充分とは言えない。赤血球膜やリンパ球膜の Con A リセプター<sup>8),9)</sup> などについて近年報告され又、Dopamin  $\beta$ -Hydroxylose<sup>10)</sup> など Con A-Sepharose による Affinity chromatography などの報告にとどまる。

近年、種々細胞の membrane glycoprotein, subcellular fraction の酵素の持つ糖鎖の意味などが多いに興味を持たれており、これらの酵素が Con A との complex により安定な活性発現と、構造維持において有効であるとすればその Interaction に関する詳細な検討がまず必要となる。そこで著者らは、刀豆より Con A を単離し、まずその糖蛋白質に対する結合活性、そして Affinity chromatography による豚肝 hydrolase の分離などを行ない、生体中に活性を有する糖蛋白質に対する Interaction の検討

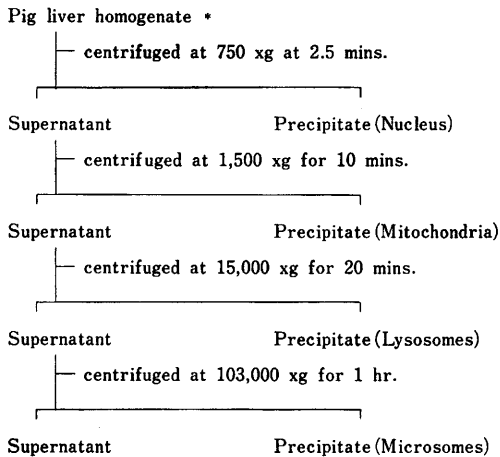
\* 栄養学第3研究室 \*\* 栄養学第4研究室

を行なった。

### 試料並びに実験方法

1. Con A の調製  
Agrawal<sup>11)</sup> らの方法に準じた
2. 豚肝 Lysosome 画分の調製  
豚肝ホモジネートを、1400 xg, 10分の遠心で heavy mitochondria 画分。15,000 xg 10分で Lysosome 画分。103,000 xg, 60分で micrasome 画分。得られた上澄を nonsediment 画分とした。各々の画分を0.25 M-Sucrose を含まない、0.01 M-Tris-HCl buffer 中で Teflon Pestler によりホモジナイズ後、透析する事により酵素抽出液を得た。Scheme 1 に示した。

Scheme 1. Preparation of Lysosomes from Pig liver



\* A homogenate is a tissue extract from pig liver with 0.25M sucrose in 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7.4, (50 g of pig liver per 400 ml of the buffer).

Schem 1. Partipation of Lysosomes from pig liver  
Scheml.

3. Blue dextran による Con A 活性の測定  
反応液は、Con A soln 1 ml, Blue dextran soln 1 ml, buffer 3 ml で25℃で 1 hr in-

cubation 後濾過する。濾液に 0.1 ml の 0.1 M Me- $\alpha$ -D-Mannoside ( $\alpha$ -MM) を加え、新たに沈殿が形成されるのを防いだ後 620 nm における吸光度を測定した。

4. Con A と糖蛋白質との反応  
Con A soln 1 ml, 糖蛋白質 soln 1 ml, 0.1 M Tris-HCl buffer 1 ml の反応液を 25℃ 1 hr 反応させ濾過した。この濾液の糖蛋白質と糖量を測定した。さらにこの濾液に、Blue dextran soln 1 ml を加え 1 hr 反応させた後濾過した。濾液の 620 nm 吸光度により残存する Con A 活性を測定した。
5. Con A-Sepharose の調製  
Sepharose 4 B を BrCN によるカップリ法<sup>12)</sup> により Con A-Sepharose を調製した。
6. Acid Phosphatase (AcPase) 活性の測定  
Allen<sup>13)</sup> らの方法によった。
7. Esterase 活性の測定  
Nachlas<sup>14)</sup> らの方法によった。

### 結果と考察

1. Con A は、多糖類と結合し沈殿を形成する。Phytohemagglutinin の凝集活性は、普通赤血球の凝集能によって測定される。又、Con A の多糖類に対する凝集活性は、デキストラン<sup>15)</sup>などによって調べられている。そこで我々は、簡便な比色法による測定法を考え、Blue dextran を用いる事にした。Con A 5 mg に対して0~3 mg の Blue dextran を25℃, 1 hr 反応させた後、濾過を行なった。Con Aと未反応の Blue dextran が濾液として得られ、620 nm における吸光度を Blank (Con A のない反応液を同様に処理する。) から引くと反応した Blue dextran 量が測定できた。結果は、Fig. 1 に示しており、ほぼ直線的に Blue dextran との反応量が求められた。レクチンの活性を測定するのに従来の赤血球凝集の観察や、Phenole-硫酸法による糖質の定量よりも正確に簡便に測定できるものと考えられる。但し、glucose に対して

Specific であるか, 又全体的に non-specific に結合活性を示すものに限られる。

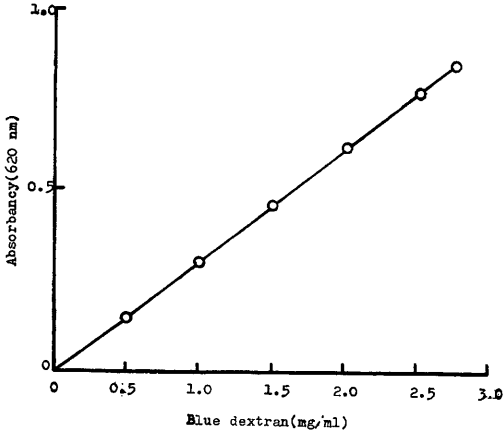


Fig. 1. Quantitative Precipitation Curve of Blue Dextran with Con A. Con A (5 mg/ml) was reacted with various concentrations of blue dextran for 60 mins. at 25°C as described in the methods. Absorbancy indicates the relative volume of precipitates (Con A-blue dextran complex).

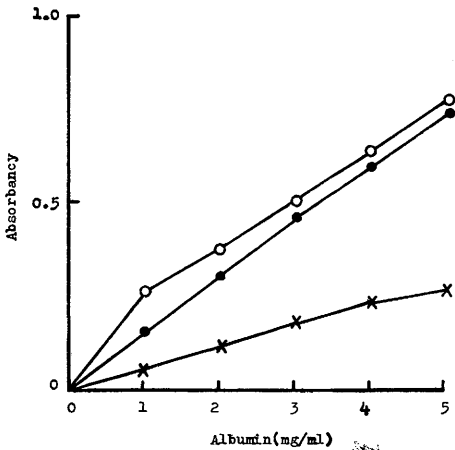


Fig. 2. Quantitative Precipitation Curves of Egg Albumin with Con A. Con A (5 mg) was reacted with various concentrations of albumin at 25°C for 60 mins. After filtration, the filtrates were incubated with 5 mg of blue dextran at 25°C for 60 mins. Each value of absorbancy indicates the relative value of precipitates. ○—○, absorbancy at 620 nm; ●—●, absorbancy at 28. nm; ×—×, absorbancy at 490 nm.

2. 次に Egg albumin との反応を行なった。Con A 5 mg に種々濃度の Egg albumin を加え 25°C 1 hr 反応後濾過し, 濾液中の未反応の Con A を Blue dextran によって定量した。Fig. 2 に示されるごとく一定範囲濃度の Albumin に対して Con A との反応量が直線的に得られた。市販の Crude な Egg albumin であるのでその中の糖蛋白質と反応したものと考えられる。又, ある物質が Con A と反応する事をこの方法によってほぼ定量的に観察できる。その場合, Con A と目的物質の和となって表われる—280 nm における蛋白質の定量や, Phenol 硫酸法による糖質の定量では, 精製前の試料の Con A に対する結合を調べる時, 不純物によって影響されやすい事も考えられるが, Blue dextran によって残存する未反応の Con A を定量していく方法が直接的で, Con A 反応性物質という形で追跡しやすいと思われる。

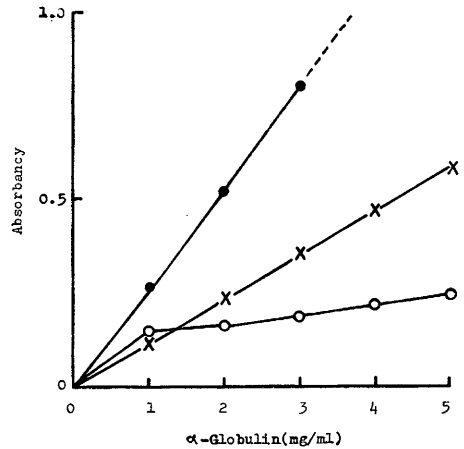


Fig. 3. Quantitative Precipitation Curves of  $\alpha$ -Globulin with Con A. Con A (5 mg) was reacted with 0 to 5 mg of  $\alpha$ -globulin at 25°C for 1 hr as described in Fig. 2. The total amounts of  $\alpha$ -globulin precipitates are also shown as absorbancy values of blue dextran (○—○, at 620 nm), proteins (●—●, at 280 nm) and sugars (×—×, at 490 nm).

3.  $\alpha$ -globulin は糖蛋白質として知られているもので, 明らかに Con A と結合し沈殿する事

が予測される。そこで我々は、Con A と  $\alpha$ -globulin を反応させ、その反応量を 280 nm の吸光度による蛋白量の測定、490 nm による糖濃度の測定、未反応の Con A を Blue dextran による測定法などにより、Con A と糖蛋白質の凝集反応を追跡した。Fig. 3 に示されるように、 $\alpha$ -globulin は Con A と定量的に沈殿を形成する事が観察された。以上 Blue dextran, Egg Albumin,  $\alpha$ -globulin いずれも Con A との定量的反応が追跡される事が解り、これからの糖質、糖蛋白質の定量・分離への広範な利用性が示唆された。

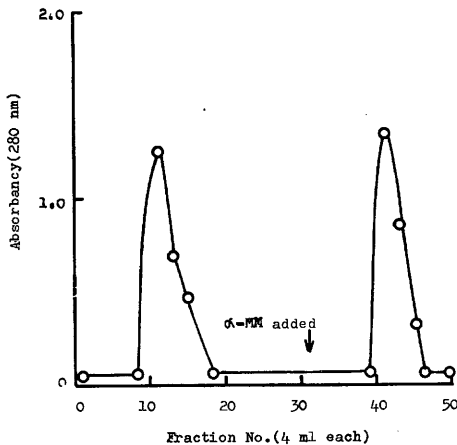


Fig. 4. Affinity Chromatography of Egg Albumin on Con A-Sepharose. Albumin (10 mg) was applied to a column (2×20 cm) of Con A-Sepharose equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$ , and 1 M NaCl. Elution was carried out with the same buffer and after 30 fractions, the retarded glycoprotein was eluted with the same buffer besides containing 0.5 M  $\alpha$ -MM. The flow rates was adjusted to approx. 8 ml/1 hr, and 4 ml fraction was collected.

4. 次に我々は、種々特性を持つ物質を安定な状態で単離するのに多く利用されている Affinity chromatography への可能性を検討した。精製単離した Con A を Sepharose 4 B と CNBr によるカップリング反応を行ない、Con A-Sepharose 単体を得た。Con A を活性

化、安定化させるために、1 mM の  $\text{CaCl}_2$  と  $\text{MgCl}_2$ 、そして 1 M の NaCl を含む pH 7.2 の Tris-HCl buffer に懸濁し、2×20 cm のカラムに充典し、同様の buffer により活性化した。次に同様の buffer に溶解した Egg Albumin をカラムに乗せて Affinity chromatography を行なった。最初に、Fig. 4 に示されるように単純蛋白質と思われるものが溶出した。次に、緩衝液に 0.1 M の  $\alpha$ -MM を加えて溶出を行なった所、新たに蛋白質のピークが得られた。 $\alpha$ -MM により Con A と結合していた糖蛋白質が解離溶出してきたものである事が示唆された。この事により (Affinity chromatography により) 溶液中の糖蛋白質を Con A-Sepharose に吸着させたのち、 $\alpha$ -MM によって溶出することによって安定な形で糖蛋白質を得る事が示唆された。

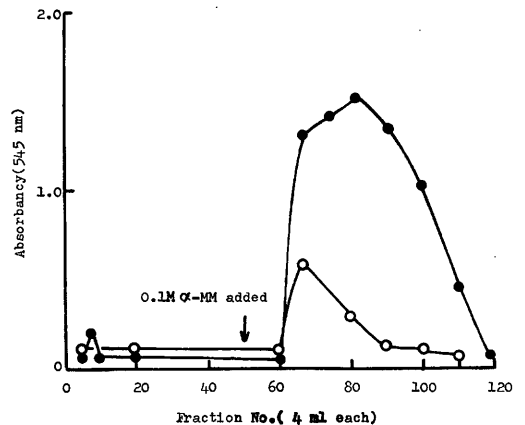


Fig. 5. Affinity Chromatography of Lysosomal AcPase and Esterase on Con A-Sepharose. The lysosomal enzyme soln. was applied to a column (2×20 cm) of Con A-Sepharose 4 B equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2 containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$ , and 1 M NaCl. Elution was carried out with the same buffer and after 50 fractions, the elution buffer contained 0.5 M  $\alpha$ -MM. Other steps were done as described in Fig. 4. Each fraction was measured AcPase activity (○—○) and Esterase activity (●—●) indicated as the absorbancy at 545 nm.

5. 近年種々の酵素が糖蛋白質である事が報告されている。しかしこれら糖蛋白質酵素の確実な characterization とか purification は、まだ不完全である。それは主として糖蛋白質を他の蛋白質と purification の早い段階で除いたりする事の不可能な事に基因する。近年、脳のライソソーム中の酵素が糖蛋白質である事が報告された。そこで我々は、豚の肝臓より Lysosome を分画し、その酵素抽出液を得た。この Lysosomal Enzyme soln を Con A-Sepharose により Affinity chromatography を行なった。抽出液を 1 mM の  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , 1 M の NaCl を含む 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2 で緩衝化した Con A-Sepharose の column に乗せ、まず同様の buffer で溶出した。次に、0.1 M の  $\alpha$ -MM を含む同様の buffer で糖蛋白質酵素を溶出した。Lysosome 中の AcPase, Esterase 共にカラムに吸着し、つまり Con A と結合し

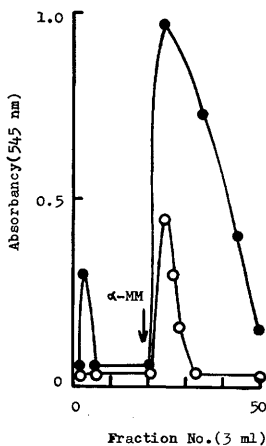


Fig. 6. Affinity Chromatography of Non-sediment Fraction on Con A-Sepharose. Enzyme extracts of non-sediment fraction was applied to a column (1×10 cm) of Con A-Sepharose equilibrated with the same buffer as described in Fig. 5. Elution was carried out with the same buffer and after 20 fractions, the retarded enzymes was eluted with the same buffer containing 0.5 M  $\alpha$ -MM. ○—○, AcPase activity indicated as the absorbance at 545 nm; ●—●, Esterase activity indicated as the absorbance at 545 nm.

0.1 M の  $\alpha$ -MM により始めてカラムより溶出した。この事より AcPase, Esterase は共に Con A-Sepharose により分離できる糖蛋白質である事が示唆され、又、ライソソーム中の糖蛋白質を他の物質から取り除く事ができるものと考えられる。

6. さらに、豚肝ホモジネートの分画遠心によって 106,000 xg 上澄として得られる。Non sediment 画分を、Con A-Sepharose により Affinity chromatography を行なった。操作は Lysosomal Enzyme の場合と同様にした。AcPase, Esterase 共に Con A-Sepharose column に吸着し、0.1 M の  $\alpha$ -MM により解離・溶出した。AcPase, Esterase 共に Con A 結合性の糖蛋白質である事が示唆された。

以上のように、Con A は、glucose, mannose を非還元末端に持つと思われる多糖類や糖蛋白質と結合し、又溶液内の反応においては、糖質と complex を形成し沈殿に至る。これらの事がほぼ定量的に確認されたので、Con A を始めとする他の Phytohemagglutinin によっても活性を持つ状態のまま安定な形で糖蛋白質酵素を検索するために応用できる可能性について今後さらに研究を進めていきたい。

終りに、終始懇切なる御指導ならびに御助言を賜った東京教育大学小笠原八十吉教授に深謝いたします。

## SUMMARY

Some glycoproteins were precipitated with concanavalin A and some enzymes were separated on Con A-Sepharose 4B.

1. Quantitative reaction curves of concanavalin A with blue dextran was obtained by the colorimetric method.

2. Concanavalin A also quantitatively precipitated with glycoproteins, globulin or egg albumin. The reaction was located by the measurements of protein concentration,

sugar contents or the residual precipitating activity with blue dextran.

3. Affinity column of Con A-Sepharose was prepared by the coupling method, using cyanogen bromide.

4. Egg albumin was chromatographed by the column of Con A-Sepharose.

5. The results of affinity chromatography of lysosomal enzymes on Con A-Sepharose suggested that both AcPase and esterase had glycoprotein structure.

6. Enzyme soln. of Noa-sediment fraction applied to the column of Con A-Sepharose and, AcPase and esterase were eluted with 0.5 M  $\alpha$ -MM. These enzymes seems to be Con A-binding glycoproteins.

#### REFERENCES

- 1) J. A. Gordon & M. D. Marqarot : *Biochim. Biophys. Acta.*, 332, 136 (1974)
- 2) J. P. Blanchet : *Exp. Cell Res.*, 84, 159 (1974)
- 3) E. Medrano, R. Piras & J. Mordoh : *Exp. Cell Res.*, 86, 295 (1974) 214
- 4) R. H. Wettenhall & D. R. London : *Biochim. Biophys. Acta.*, 349, 214 (1974)
- 5) M. M. Burger & K. D. Noonan : *Nature*, 228, 512 (1970)
- 6) B. B. L. Agrawall & I. J. Goldstein : *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 218 (1968)
- 7) L. L. So & I. J. Goldstein : *J. Biol. Chem.*, 242, 1617 (1967)
- 8) R. Kohnfeld & S. Kornfeld : *J. Biol. Chem.*, 245, 2536 (1970)
- 9) W. L. Adir & S. Kornfeld : *J. Biol. Chem.*, 249, 4696 (1974)
- 10) E. F. Wallace & W. Lovenberg : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 3217 (1974)
- 11) B. B. L. Agrawall & I. J. Goldstein : *Biochim. Biophys. Acta.*, 147, 262 (1967)
- 12) J. Porth : *Methods in Enzymol.*, 34, 13 (1974)
- 13) T. M. Allen : *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 616 (1964)
- 14) M. M. Nachlas : *J. Biol. Chem.*, 181, 343 (1949)
- 15) R. J. Doyle, E. D. Pittz & E. E. Woodside : *Carbohydr. Res.*, 8, 89 (1968)