

豚肝ライソソーム画分から得られる酵素と コンカナバリン A との interaction

木元 幸一*, 小笠原八十吉, 草間正夫*
(東京教育大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 8 月 26 日 受理

Interaction of Concanavalin A with the Enzymes Obtained from Pig Liver Lysosomal Fraction

Koichi KIMOTO*, Yasokichi OGASAWARA and Masao KUSAMA*
*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Education, Meguro-ku, Tokyo*

The addition of concanavalin A (ConA) to lysosomal enzyme solution, obtained from pig liver, led to the formation of an insoluble Enzyme-ConA complex. Acid phosphatase (AcPase) and β -D-glucuronidase (β -GlcUAase) were maximally precipitated at pH 5.0 and esterase at pH 7.0. On the other hand, AcPase and esterase couldn't be precipitated with wheat germ agglutinin (WGA).

The precipitates of Enzyme-ConA complexes were collected and dissociated with Me- α -D-mannoside (α -MM). However, recoveries of dissociated enzymes were very low. In contrast, the formation of an insoluble Enzyme-ConA complex was strongly inhibited with α -MM. The pH optima of the dissociation were at pH 5.0, particularly for AcPase and β -GlcUAase. Their isoenzymic patterns on disc electrophoresis varied markedly according to their dissociation conditions. Wide over-lapping bands of enzyme activities appeared.

Pig liver microsomal esterase couldn't form the precipitates but interact with ConA, judging from the results of disc electrophoresis in which wide over-lapping bands appeared. The reaction mixture containing ConA and microsomal enzymes was applied to a Sephadex G-200 column and esterase activity was assayed. As a newly-appeared peak I which was eluted faster than the peak of native enzyme showed wide over-lapping bands of esterase activity on disc electrophoresis, it was suggested that the peak I might be a high molecular complex between ConA and esterase.

(Received August 26, 1977)

* Present address: Department of Nutrition, Tokyo Kasei University, Itabashi-ku, Tokyo

緒 言

コンカナバリン A (ConA) は、赤血球やリンパ球の細胞表面の解析に大きな役割を果たした⁽¹⁻³⁾。また、糖結合蛋白質として、糖蛋白質の分離精製^(4,5)や糖分析^(6,7)に利用されており、さらに糖蛋白質化学的にも糖結合における蛋白質構造と機能の相関性について多くの研究が行なわれている^(8,9)。しかしながら、活性を持つ糖蛋白質酵素との反応の詳細については未だ充分とは言えない。

われわれの研究室では、豚肝より得られるライソソーム

画分に含まれる酵素について報告してきた^(10,11)。近年種々のライソソーム酵素が糖蛋白質であると報告され⁽¹²⁾、ConA-Sepharose による affinity chromatography も試みられている⁽¹³⁾。豚肝ライソソーム画分の酵素も糖蛋白質であることが予測され、またその糖蛋白質の性状を調べるのに ConA を用いることは有効であると思われる。本報では、ConA との結合、解離反応を感度の高い酵素活性測定により追跡し、さらにそれぞれをディスク電気泳動により詳細に検討することより、酵素の糖蛋白質の性状、ならびに ConA と酵素との間の蛋白質化学的相関性について明らかにしようと試み、若干の知見

* 現在、東京家政大学栄養科。

を得たので報告する。

実験方法および材料

1. 実験材料 ConA は, Agrawal ら⁽¹⁴⁾ の方法によって調製した。小麦胚芽凝集素(WGA)は, Bloch ら⁽¹⁵⁾ の方法に従って調製した。ライソソーム画分は, 品川の食肉市場より, と殺直後の豚より肝臓を取り出し, 1 時間以内に細片とし, その 50 g を, 0.25 M シュクロースを含む, pH 7.2 の 0.01 M トリス-塩酸緩衝液中で, 25 秒間ミキサー中で粉砕し, 3 枚のガーゼで濾過を行ない, これを肝ホモジネートとした。次に, この肝ホモジネートの分画遠心を行なった。700×g, 10 分の遠心分離によって除核, 1400×g, 10 分の遠心分離によって重いミトコンドリア画分, 15,000×g, 10 分の遠心分離によってライソソームに富む画分, さらに 103,000×g, 60 分の遠心分離によってマイクロソーム画分をそれぞれ得た。さらにおのおの画分をシュクロースを含まない緩衝液中で Teflon Pestler を用いてホモジナイズを行ない, 100,000×g, 30 分の遠心分離によって得られた上澄液を同様の緩衝液に対して透析を行ない酵素抽出液とした。

2. 酵素活性測定法 酸性ホスファターゼ(AcPase)は, Allen ら⁽¹⁶⁾ の方法によって行なった。エステラーゼは, Nachlas ら⁽¹⁷⁾ の方法によって測定した。β-D-グルクロニダーゼ(β-GlcUAase)は, Fishman⁽¹⁸⁾ の方法によって行なった。ディスク電気泳動は, Ornstein ら⁽¹⁹⁾ の方法によって行なった。AcPase 活性は, pH 4.3 ゲルで泳動後 Barka ら⁽²⁰⁾ の方法, エステラーゼは, pH 8.9 ゲルで泳動後 Gomori⁽²¹⁾ の方法, β-GlcUAase は, pH 4.3 ゲルで泳動後 Hayashi⁽²²⁾ の方法によって, それぞれ染色した。

3. 蛋白質の定量 Lowry法⁽²³⁾ によって行なった。

4. ConA と酵素との沈殿反応 酵素抽出液 1 ml, ConA 溶液 1 ml, 0.5 M の塩化ナトリウム, 1 mM の塩化カルシウムと塩化マグネシウムを含む pH 7.2 の 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 1 ml の計 3 ml の反応混液を, 1 時間 25°C でインキュベーションを行なった。反応後, 3000×g で 30 分間遠心分離を行ない上澄に残存する酵素活性を測定した。ConA の代わりに蒸留水を用いた反応液を同様に行ない。この場合の酵素活性を 100 とした。種々の pH 域においての反応はトリス-酢酸緩衝液を用いた。

5. Enzyme-ConA complex の解離 不溶性の Enzyme-ConA complex を上記の方法で得, これを解離した。一定量の不溶性 Enzyme-ConA complex を種濃度の Me-α-D-マンノシド(α-MM)を含む pH 4~9 の 0.05 M トリス-酢酸緩衝液に懸濁し, 25°C, 1 時間解離反応を行なった。反応後, 3000×g, 30 分間遠心分離を行ない上澄に解離してくる酵素活性を測定した。解離の%は次の式によって求めた。(上澄の酵素活性)÷(沈殿部の酵素活性+上澄の酵素活性)=解離した酵素(%).

結 果

1. ConA と酵素の沈殿反応

豚肝ライソソーム画分から得られた酵素抽出液に ConA を加え沈殿反応を行なった。ConA の濃度は, 0~150 r の範囲で行なった。ConA を含まない反応液を 100 とし上澄に残存する酵素活性を測定した結果が Fig.1 である。AcPase および β-GlcUAase の 95%, エステラーゼの 87% の活性が沈殿へ移行した。これらは, いずれも ConA 結合性の糖蛋白質酵素であると考えられる。さらに結果には示さなかったが, DEAE-セファデックス A-50 で部分精製した AcPase 画分とエステラーゼ画分を, 同様に ConA と反応させたところ, 沈殿部の形成は認められなかった。しかしそのディスク電気泳動を調べ

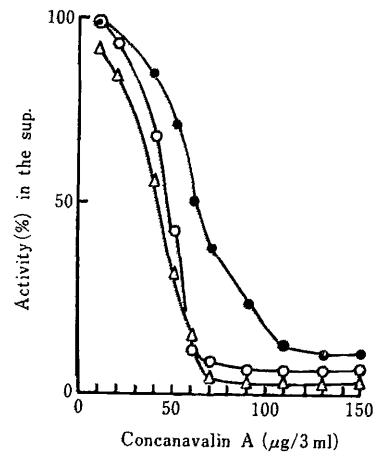


Fig. 1. Effect of ConA concentration on the formation of the insoluble Enzyme-ConA complex. Reaction mixture (1 ml of enzyme solution, 1 ml of ConA soln., 1 ml of Tris-HCl buffer, pH 7.2) was incubated for 1 hr at 30°C. The enzyme activities in the supernatant in the absence of ConA were taken as 100. ○—○, AcPase; △—△, β-GlcUAase; ●—●, esterase.

ると, エステラーゼの場合, 移動度(Rm.) 0 から始まる幅広いオーバーラップした活性バンド, AcPase 活性の場合, 濃縮ゲルの先端に移動せずに活性バンドが検出された. このことは, 酵素が部分精製された状態にある反応液中では沈殿を形成するには至らないが, ConA と結

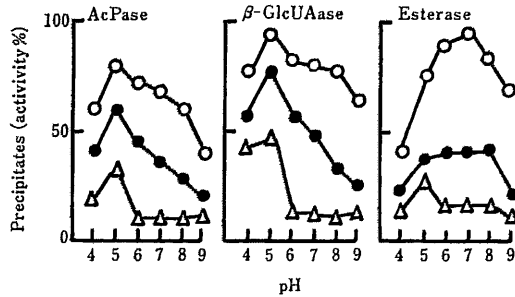


Fig. 2. The pH Optima for the Precipitation of Enzymes with ConA. The reaction mixture and the incubation systems were the same as described in Fig. 1, except 0.1M Tris-Acetate buffers, pH 4~9 were used. ○—○, 60μg ConA added; ●—●, 40 μg ConA added; △—△, 20 μg ConA added.

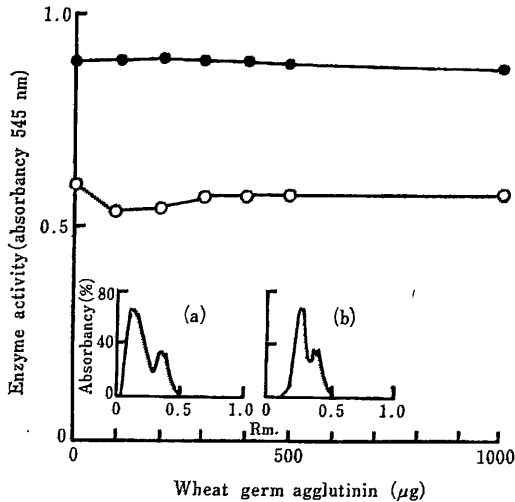


Fig. 3. Quantitative Precipitation Curves of Enzymes with WGA. Reaction was carried out in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 100 μg of enzyme protein in a total volume of 2 ml, and then, incubated for 1 hr at 30°C and centrifuged. The enzyme activity in the supernatant was measured. ○—○, AcPase; ●—●, esterase activity. Disc electrophoretic patterns of enzyme activities on the precipitation studies; AcPase activity (a) and esterase activity (b) on the precipitation with 1000 μg of WGA.

合はしているものと推測できる.

2. 酵素と ConA との沈殿反応に及ぼす pH の影響
pH 4~9 の範囲において形成される Enzyme-ConA complex の % を調べたのが Fig.2 である. AcPase および β-GlcUAase は, pH 5 において最も多く沈殿した. エステラーゼの場合, ConA の濃度によってかなりバラツキがあるが, pH 7 が適当であると思われる. 多糖類との反応では, pH 6~7 という報告がある⁽²⁴⁾.

3. 小麦胚芽凝集素 (Wheat germ agglutinin, WGA) との反応

小麦胚芽より得られた WGA を同様に反応させたが, Fig. 3 に示されたように, AcPase およびエステラーゼ共に沈殿を形成しなかった. また (a) は AcPase, (b) はエステラーゼのディスク電気泳動パターンである. それぞれ native な活性パターンと全く同じで WGA の影響は全く認められなかった. このことより小麦胚芽よりの WGA との結合活性はないものと判断した.

4. Enzyme-ConA complex の解離

形成された Enzyme-ConA complex の沈殿を α-MM により解離させた. 一定量の Enzyme-ConA complex に α-MM を加え, 1 時間, 25°C で解離反応を行なった. 反応終了後, 遠心分離を行ない沈殿と, 上澄に解離して

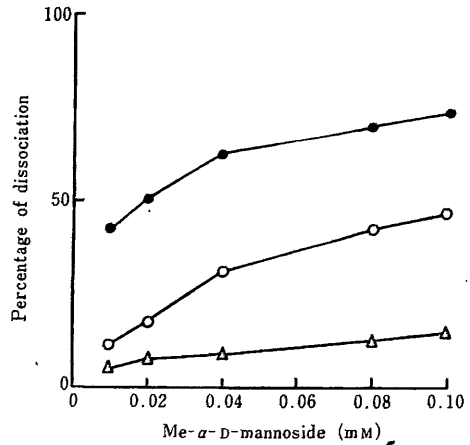


Fig. 4. Dissociation of the Enzyme-ConA Complex by Different Concentration of α-MM. The insoluble complex was formed as described before. The fixed amount of Enzyme-ConA complex was incubated with 0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing different concentrations of α-MM, for 1 hr at 30°C, and then, centrifuged. Percentage is expressed as in the methods. ○—○, AcPase; △—△, β-GlcUAase; ●—●, esterase.

くる酵素活性を測定し、解離の % として表わしたのが Fig. 4 である。いずれも α -MM の量に比例して、酵素の解離が増加することが観察された。しかし、 β -GlcUAase は 20% しか解離しなかった。

5. 解離反応に及ぼす pH の影響

pH 4~9 の範囲で解離してくる酵素活性を測定したのが Fig. 5 である。AcPase は、pH 5 において最も多く解離した。エステラーゼは、率としては、pH 4 において最大のものであるが、インキュベーション中にエステラーゼ活性自体が減少するので適当な条件とは言えない。他の pH 5~9 の範囲においてはそれほど大きな差はなかった。 β -GlcUAase も pH 4 でのインキュベーション中に失活してしまった。また解離してくる蛋白量としては、Lowry 法の測定範囲では非常に小さな差しか見出すことができなかった。このことから鋭敏な酵素活性を測定することは、反応の微妙な傾向を見るのに都合がよいと言える。

6. 解離してくる酵素のディスク電気泳動

解離反応後、反応液を遠心分離し、その上澄をディスク電気泳動にかけると、解離した酵素の活性バンドが観察された。AcPase は、pH 5 において 100 μ g の Me-

α -D-マンノシド(α -MM)によって Enzyme-ConA complex を解離させた場合、エステラーゼは、pH 7 において 100~1000 μ g の Me- α -D-マンノシドによって Enzyme-ConA complex を解離させた場合、それぞれ解離してくる酵素のディスク電気泳動の結果はシャープな活性バンドとして得られた。これは ConA との反応前の native なバンドと同じである。Fig. 6 の中でシャープなバンドのあらわれていない所は、その pH 域、あるいは、その濃度の α -MM による解離では条件として適当ではないと考えられる。一度 complex を形成したものを解離させる場合、単に α -MM の濃度を多くすればよいといった単純なものではなく、一部 Enzyme-ConA complex が可溶化したり、解離に際し酵素の変性また会合などが生じて、全く native な酵素が回収されるにはいろいろと酵素個々の条件の選定が必要である。単に解離量を酵素活性として知るだけではなく、さらにディスク電気泳動パターンを比較検討することによりその結合→解離における酵素の変化を追跡することができた。

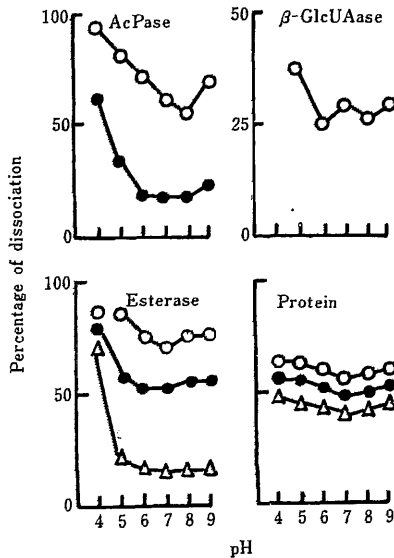


Fig. 5. Effect of pH on the α -MM Dependent Dissociation of the Enzyme-ConA Complex. The experiments were done as described in Fig. 5, except 0.1M Tris-Acetate buffer, pH 4~9, were used. Dissociated with 0.1 mM (○—○); 0.02 mM (Δ — Δ); 0.01 mM (●—●); α -MM.

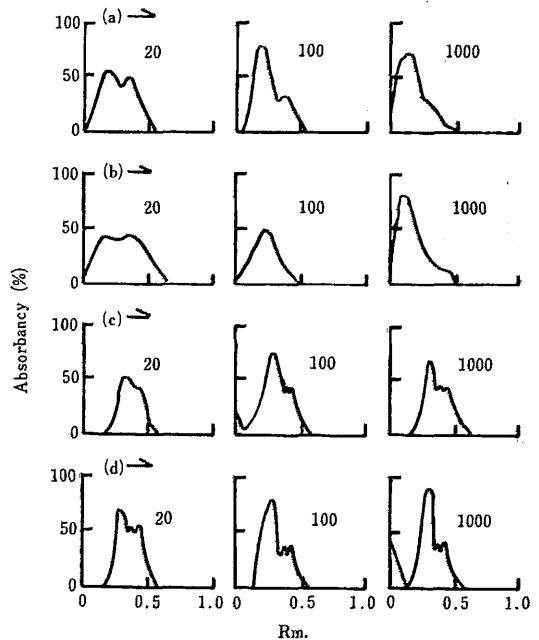


Fig. 6. Electrophoretic Patterns of Enzyme Activities in the Supernatant of the Dissociation Mixture. Dissociation systems were conducted as before. AcPase was dissociated at pH 5.0(a) and pH 7.0(b); Esterase was dissociated at pH 5.0(c) and pH 7.0(d). The numbers (20, 100, 1000) in the figures indicate the amount of α -MM (μ g/ml) in the dissociation systems.

7. Enzyme-ConA complex の分離

今までの実験の中であらわれた移動度 0 からの幅広い活性バンドが何であるかを確かめるために, ミクロゾーム画分から得られた酵素抽出液を用いて ConA との反応を試みた. ミクロゾーム画分から得られる酵素抽出液は, ConA と反応後遠心分離を行なってもエステラーゼ活性は沈殿部へ移行しない. しかしそのディスク電気泳動には, 移動度 (Rm.) 0 からの幅広いオーバーラップし

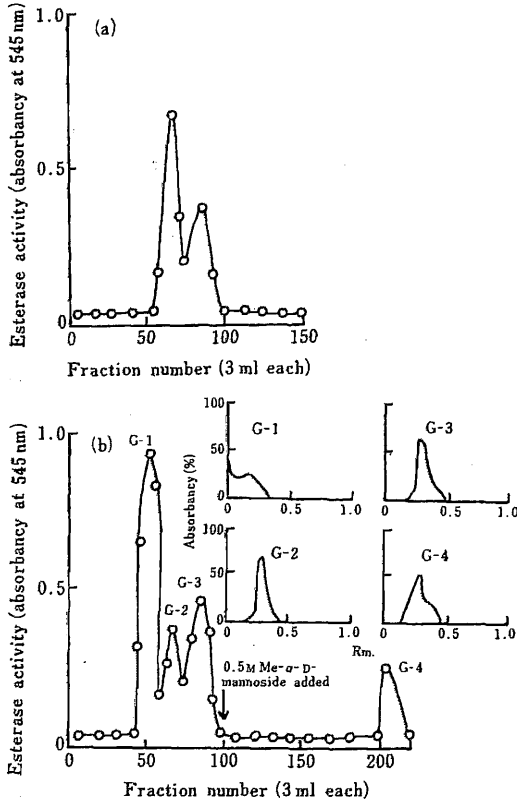


Fig. 7. Column Chromatography of Esterase on Sephadex G-200. (a). The microsomal enzyme soln. was applied on a column of Sephadex G-200 (2.5 \times 90cm) equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.2, and eluted with the same buffer. Three ml fractions were collected and esterase activity was measured. (b). The reaction mixture of microsomal enzyme soln. with ConA was also applied on a column of Sephadex G-200 as described above. Moreover, each peak of esterase activity was subjected to the disc electrophoresis. The electrophoretic patterns of esterase activity were shown in the same figure.

た活性バンドがあらわれる. そこでこのミクロゾーム画分からの酵素抽出液と ConA との反応液を遠心分離後その上澄をセファデックス G-200 によりエステラーゼ活性を分離したのが Fig.7 である. 未処理のミクロゾーム酵素抽出液には見出されなかった ((a) 図) G-1 のピークが ConA 処理ミクロゾーム酵素抽出液の場合 ((b) 図) 見出された. G-2, G-3, よりも速い位置に溶出していることから分子量の大きくなった形のものと考えられる. (b) 図の右肩に示したそれぞれのピークのディスク電気泳動の結果においても G-1 のピークは, Rm.=0 からの幅広い活性バンドを示した. 沈殿を形成するにはいたらないが, 明らかに ConA と結合しているエステラーゼであることが示唆された.

8. α -MM による Enzyme-ConA complex の形成の阻害

まず, ConA と α -MM をプレインキュベーション後酵素液を加えて沈殿の形成を調べた. Fig.8 のように, α -MM の充分量においては, Enzyme-ConA complex 形成は観察されなかった. また Fig.9 のディスク電気泳動によるおのおのの活性バンドパターンもほぼ native なものと同じであった. このことは, ConA が α -MM

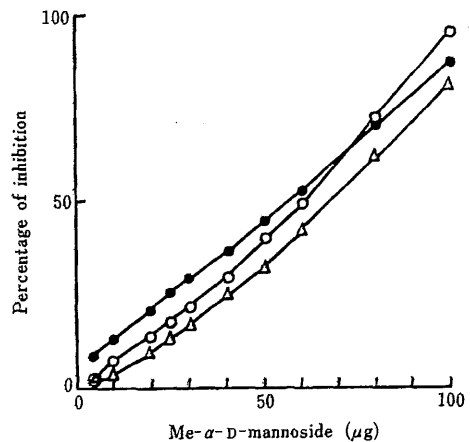


Fig. 8. Effect of the Concentration of α -MM on the Inhibition of the Formation of Enzyme-ConA complex. ConA solution was preincubated with α -MM for 30min at 25 $^{\circ}$ C and then, enzyme solution was added. The reaction mixture was incubated for 1 hr at 25 $^{\circ}$ C, and then, centrifuged. Enzyme activities in the supernatant were measured. The reaction mixture without ConA was taken as 100. \circ — \circ , AcPase; Δ — Δ , β -GlcUAase; \bullet — \bullet , esterase.

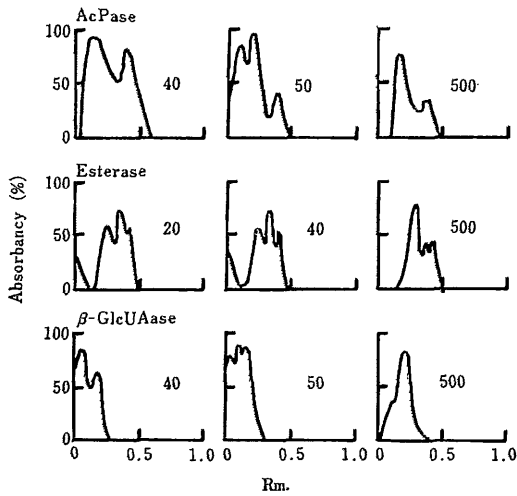


Fig. 9. Disc Electrophoretic Patterns of Enzymic Activities on the Inhibition Studies. Enzyme activities in the supernatant of the reaction mixture were detected on polyacrylamide gels. The numbers in the figures indicate the amount of α -MM ($\mu\text{g/ml}$) on the inhibition systems.

と結合したことにより、ライソソーム酵素に何の影響も示さなかったと考えられる。ConA と酵素は、ConA が α -MM と結合する部位と同じ位置で結合することを示している。

考 察

豚肝ライソソーム画分から得られる酵素抽出液を用いてその中に含まれる酵素と ConA との反応性を検討した。AcPase, β -GlcUAase およびエステラーゼは共に ConA と結合し沈殿を形成した。しかし、部分精製した AcPase およびエステラーゼ各分画を用いて ConA との反応を試みたところ沈殿は形成されなかったが、ディスク電気泳動による活性バンドの検出において明らかに ConA の影響とみられる移動度 0, あるいは幅広くオーバーラップした活性バンドが出現した。小麦胚芽凝集素 (WGA) との反応ではこれらは全く観察されず、これら 3つの酵素は、ConA 結合性の糖蛋白であることが示唆された。ConA と多糖類との反応においては、pH 6~7 の範囲で条件の選択が行なわれているが⁽²⁴⁾, AcPase および β -GlcUAase は、pH 5 において最も多く沈殿を形成した。形成された Enzyme-ConA complex は、 α -MM により解離された。酵素によって解離の程度に

違いがあらわれ、 β -GlcUAase は 20% にとどまった。さらに解離によって酵素を回収するという考え、解離後の酵素のディスク電気泳動パターンを検討した結果、解離反応における pH および α -MM の濃度により解離してくる酵素の状態に変化が見られた。結合したまま可溶化される。あるいは、結合 \leftrightarrow 解離の過程においての変性が推測された。

豚肝より得られるマイクロゾーム画分からの酵素抽出液を ConA との反応に用いた場合、エステラーゼ活性は沈殿部へ移行しないが、ディスク電気泳動では明らかに ConA による影響を示す幅広いオーバーラップした活性バンドが観察された。この反応液のセファデックス G-200 カラムによるエステラーゼ活性の分画により分子量の大きくなった新たな活性ピークを分離した。多分 ConA と結合しているエステラーゼであると推測される。このことは、ライソソームエステラーゼとマイクロゾームエステラーゼの違いを示唆するものであるが興味深いところである。しかしながら、ライソソームエステラーゼを部分精製した場合も、やはり沈殿を形成し得ないという結果も得られていることから、沈殿を形成する、しないは、必ずしも決定的な両酵素独自の差異であるとは言い難いとも考えられる。

ConA を α -MM とプレインキュベーションすると、Enzyme-ConA complex の形成は見出せなかったことから、これらの酵素は α -MM と同じ型で ConA と結合しているようである。しかしこの事実に基づくならば、形成された Enzyme-ConA complex の解離を行ない、酵素を native な形で回収する場合、 α -MM によって容易にできそうであるが、解離の収量は、阻害の結果から得られる期待値よりも、特に β -GlcUAase は悪く、また AcPase およびエステラーゼ活性のディスク電気泳動パターンは、解離反応の pH および α -MM の濃度によってなかなか native な活性バンドが得られにくいことを示しており、結合 \leftrightarrow 解離における酵素と ConA の挙動はなお興味深いことである。

数種の酵素が糖蛋白質であることが報告されており⁽¹²⁾, また、細胞内酵素の糖鎖の示す役割がいろいろな方面から指摘されている折、糖結合性を有するそれぞれ特異性のあるレクチンがこれらの研究に有効な手段として利用できる可能性について若干の見解が得られたが、今後、多種のレクチンに対して酵素の種類を多くしてさらに検討を加えてき行いたいと思う。

要 約

1. 豚肝ライソソーム画分から得られる酵素抽出液と ConA を反応させたところ, AcPase, β -GlcUAase およびエステラーゼ活性は, 沈殿部へ移行した. 沈殿の形成は, pH 5 において最も多くみられた. 部分精製した AcPase およびエステラーゼは沈殿を形成しなかったが, ディスク電気泳動の結果から ConA と結合していることが観察された.

2. ライソソーム画からの酵素抽出液は, 小麦胚芽凝集素とは沈殿を形成せず, 結合も観察されなかった.

3. 形成された Enzyme-ConA complex は, α -MM によって解離されたが回収率は悪かった. 一方, ConA を α -MM とプレインキュベーションすることにより, ConA-Enzyme complex の形成はほぼ 100% 近く阻害された. 解離反応において, ディスク電気泳動の結果より, AcPase は pH 4~5, エステラーゼは, pH 7 の適当な濃度の α -MM による解離が好ましいと判断された.

4. ミクロゾーム画からの酵素抽出液と ConA との反応ではエステラーゼ活性は沈殿部へ移行しないが, この反応液をセファデックス G-200 カラムにより, エステラーゼ活性を分離すると, ディスク電気泳動的には, 幅広くオーバーラップした活性バンドを示す. native なエステラーゼより分子量の大きくなった ConA 結合エステラーゼと思われるピークが得られた.

終りに, 実験において多大な助力をしてくださった加藤和己, 諸星正義両氏に深謝いたします.

本研究の一部は, 昭和51年度日本農芸化学会大会(京都)で報告した.

- (1) H. Lis and N. Sharon : *Ann. Rev. Biochem.*, 541 (1973).
- (2) K. O. Lloyd : *Arch. Biochem. Biophys.*, 137, 460 (1970).
- (3) B. Ozanne and J. Sambrook : *Nature New*

- Biology*, 232, 155 (1971).
- (4) M. A. Leon : *Science*, 158, 1325 (1967).
- (5) D. Allan, J. Auger and M. J. Crumpton : *Nature New Biology*, 236, 23 (1972).
- (6) R. D. Poretz and I. J. Goldstein : *Biochemistry*, 9, 2890 (1970).
- (7) J. Duke, I. J. Goldstein and A. Misaki : *Biochim. Biophys. Acta*, 271, 237 (1972).
- (8) G. M. Edelman, B. A. Cunningham, G. N. Reek, Jr., J. W. Becker, M. J. Waxdel and J. L. Wang : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 2580 (1972).
- (9) S. K. Podder : *Eur. J. Biochem.*, 44, 151 (1974).
- (10) 小笠原八十吉, 東島正典 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1974, p. 66.
- (11) 小笠原八十吉, 木元幸一 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1976, p. 56.
- (12) A. Goldstone and H. Koenig : *Life Science*, 9, 1341 (1970).
- (13) S. Bishayee and B. K. Bachhawat : *Neurobiology*, 4, 48 (1974).
- (14) G. L. Agrawal and I. J. Goldstein : *Biochim. Biophys. Acta*, 147, 262 (1967).
- (15) R. Bloch and M. M. Burger : *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 58, 13 (1974).
- (16) J. M. Allen and J. Gockerman : *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 615 (1964).
- (17) M. M. Nachlas : *J. Biol. Chem.*, 181, 343 (1949).
- (18) W. H. Fishman : *Methods Biochem. Anal.*, 15, 77 (1967).
- (19) L. Ornstein : *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964).
- (20) T. Barka : *J. Histochem. Cytochem.*, 9, 542 (1961).
- (21) G. Gomori and R. S. Holmes : *Biochim. Biophys. Acta*, 132, 379 (1967).
- (22) M. Hayashi : *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 659 (1964).
- (23) O. H. Lowry and N. J. Rosbrough : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- (24) L. L. So and I. J. Goldstein : *Biochim. Biophys. Acta*, 165, 398 (1968).