

# Concanavalin A の調製とその物理化学的 性状に関する研究

那知上八重子\* 木元幸一\* 早川幸子\*

Isolation and Comparative Physico-Chemical Studies of Concanavalin A  
Yaeko Nachigami, Koichi Kimoto, Sachiko Hayakawa

〔内容抄録〕 刀豆より Concanavalin A (Con A) を調製し、各々を Disc 電気泳動により同定し、凝集活性を測定した。

1. Con A は、収量は少ないが硫安分画により調製された。
2. Disc 電気泳動の結果は、少量の contaminat の存在を示した。  
硫安分画しない方により多くそれが見られた。
3. 赤血球に対する凝集活性は、硫安分画から得た試料の方が幾分強かった。
4. PolySaccharide に対する凝集活性は、Blue Dextran により測定され、硫安分画で得た Con A の方が強い PHA 活性を示した。
5. 硫安分画によって得た Con A の方が、収量は少ないが純度の高い事が示唆された。

## 結 言

刀豆より得られる Concanavalin A (Con A) は、種々の興味ある性質を有する事が知られ注目を浴びている。すでに、1936年に Con A は Summer により単離されており<sup>1)</sup>以降、糖を持たない Phytohemagglutinin (PHA) の一種として多くの研究がなされてきた<sup>2), 3), 4)</sup>。Con A は、他の PHA が、ほとんど糖蛋白質であるのとは異なり  $\text{Ca}^{++}$  や  $\text{Mn}^{++}$  を含む金属蛋白質である。そして赤血球凝集作用<sup>5)</sup>、リンパ球の幼若化<sup>6)</sup>、ガン性胞の凝集化<sup>7)</sup>、多糖類や糖蛋白質の結合・沈殿作用<sup>8)</sup>などの多くの生化学的特性を具備している。これらの作用には、ある種の糖鎖を持つものとの Interaction が関与して

いるものと考えられている<sup>9)</sup>。Con A は弱酸性の水溶液中では、分子量27,000のサブユニット2個から成る2量体、中性溶液中では、これが2個集まった4量体として挙動するものと考えられている。しかし、最近の Abe らの報告<sup>10)</sup>でも明らかにされているように、 $\beta_1$  (16,000) と  $\beta_2$  (13,000) のサブユニットも見出された。

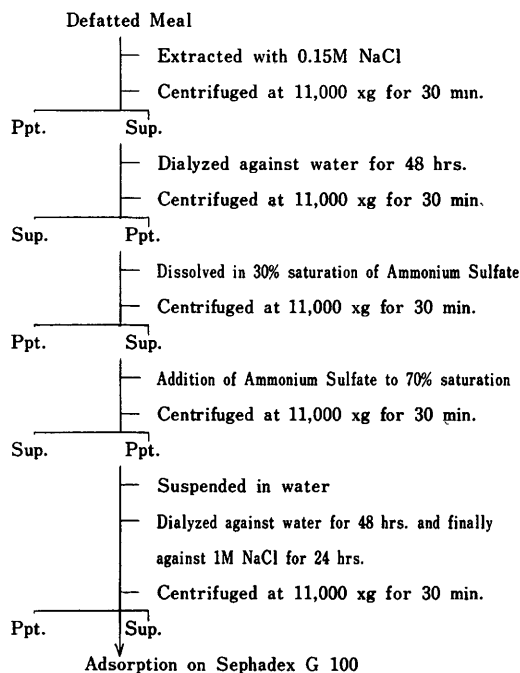
著者らは、Con A の種々の生化学的特性を明らかにするために、まず Sephadex に対する結合性を利用して、硫安分画による調製法、硫安分画しないで直接 Sephadex に対する結合性を利用して得た Con A の凝集活性・Disc 電気泳動などの比較検討を行なった。

\* 栄養学第3研究室

## 試料並びに実験方法

## 1. Con A の調製

Scheme 1. に示した。



Scheme 1. preparation of Concanavalin A

2. Sephadex G-50 による Con A の Affinity chromatography.  $5 \times 30$  cm のカラムに Sephadex G-50 を詰め 1 mM の  $\text{CaCl}_2$  と  $\text{MgCl}_2$  を含む 1 M-NaCl 溶液で活性化した後、試料液を流す。同様の 1 M-NaCl 溶液 2 l で Con A 以外の蛋白質を流し去った後、カラムをフラクションコレクターに接続した。0.1 M glucose を含む 1 M の食塩水で Sephadex G-50 に結合した Con A を溶出し、10 ml ずつフラクションコレクターで 25 ml/h の速さで分取し、各々のフラクションの 280 nm の吸収を測定した。
3. Blue dextran による Con A 活性の測定  
Blue dextran は 620 nm にその吸収極大

を示すので、620 nm の吸光度を測定する事により Blue dextran 量とした。Fig. 1 には Phenol 硫酸法による糖濃度も示した

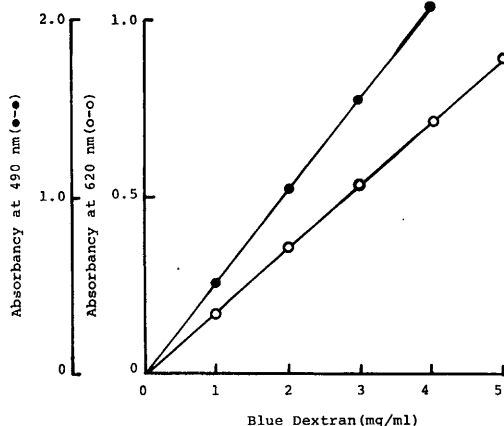


Fig. 1. Calibration Curves of Blue Dextran

4. 赤血球による Con A 活性の測定  
4 % 人赤血球 0.2 ml, Con A 0.5 ml で 37°C 1 hr の incubation を行なった。
5. 蛋白量の測定  
280 nm における吸光度を測定した。
6. Disc 電気泳動  
Orstein と Davis らの方法<sup>11)</sup>に従った。
7. SDS-電気泳動  
Webber らの方法<sup>12)</sup>に従った。

## 結果並びに考察

Con A は、Sephadex と結合する性質により他の物質と分離できる。そこで、Con A の粗抽出液を Sephadex G-50 のカラムに通す事により他の物質を溶出し、カラムに残存する。Con A を 0.1 M-glucose により解離溶出した。試料にはかなりの Con A 以外の物質が存在すると思われるので、試料をカラムに乗せた後 2 l の 1 M-NaCl で不純物を流し去り、その後、0.1 M-glucose を含む 1 M-NaCl 溶液で Con A を溶出し、10 ml ずつ fraction した。Fig. 2 は、不純物を流し去ったあと、0.1 M-glucose を含む 1 M の NaCl 溶液によって、蛋白質の

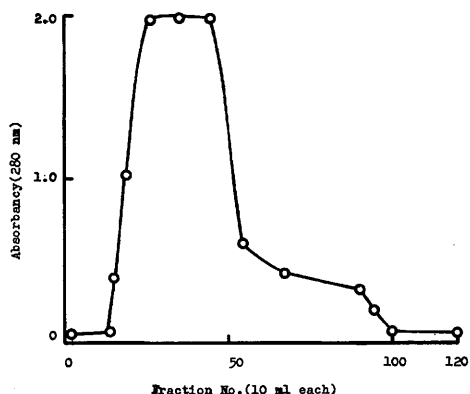


Fig. 2. Affinity Chromatography of Con A on Sephadex G 50. The extracts with 1 M NaCl was applied to a column (5×30 cm) of Sephadex G 50 equilibrated with 1 M NaCl containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>. At first, the column had been washed with 21 of the same soln, and then, after connected to a fraction collector, eluted with 0.1 M glucose. The flow rates was adjusted to approx. 25 ml/1 hr. and 10 ml fraction were collected.

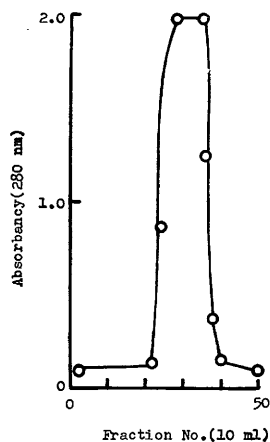


Fig. 3. Affinity Chromatography of Con A Fractionated with Ammonium Sulfate on Sephadex G 50. The extracts fractionated with ammonium sulfate was chromatographed with a column of Sephadex G 50 as described in Fig. 2.

溶出を 280 nm の吸光度で示したものである。fraction No. 25~60 にかけて, 0.1 M-glucose

によって解離溶出した Con A と思われるピークが得られた。このピークのフラクションを集めて, 透析の後凍結乾燥を行なった。

Fig. 3 は, 硫安分画して得られた Con A 抽出液を上記と同様にして Sephadex G-50 による Affinity chromatography を行なったものである。硫安分画によって, Con A のピークとして得られた量は, Fig. 2 にくらべてかなり少ないものであった。硫安分画によって, かなりの Con A の損失が予測された。

収量は, 硫安分画したもの 110 mg, 硫安分画なしで得られたもの 1.258 mg であった。

さらに, 得られた Con A を, Disc 電気泳動により比較検討した。

Fig. 4 は, pH 4.3 ゲル, pH 8.9 ゲル, SDS ゲル電気泳動の結果である。

硫安分画したもの(A), 硫安分画しないもの(B)として表わしてある。以下(A), (B)で述べる事とする。収量に著るしい違いがあったにもかかわらず, Disc 電気泳動の結果はほぼ同じパターンを示している。pH 4.3, pH 8.9 共に大きな Band が一本強く表われており Con A を示している。他の薄いバンドについては, 不明である。糖質の染色をしていないので, 何とも言えないが, すでに糖と結合した Con A か, 又は不純物かもしれない。さらに SDS 電気泳動により, そのサブユニット構造を調べた。何れも,  $\alpha$ -サブユニット (MW 27,000),  $\beta_1$  (MW 16,000),  $\beta_2$  (13,000) が大きく見出された。さらに,  $\gamma$  成分が検出されている。しかし,  $\alpha$  サブユニットより分子量の大きい位置に, 不純物と思われるバンドが薄く見出された。しかし, con A は  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  のサブユニットからなり,  $\beta_1$  と  $\beta_2$  により 2 量体を構成し  $\alpha$  成分となり,  $\alpha$  成分が 2 つ集まり 4 量体を構成しているの, SDS によるサブユニット構造の解離には単純には予測できないものがある。只, (B)のゲルには少量ながら不純物と思われるものが見出されている。しかし, 何れも収量の結果から予想されるほどの強い差異は(A), (B)に関する 3 種の Disc 電気

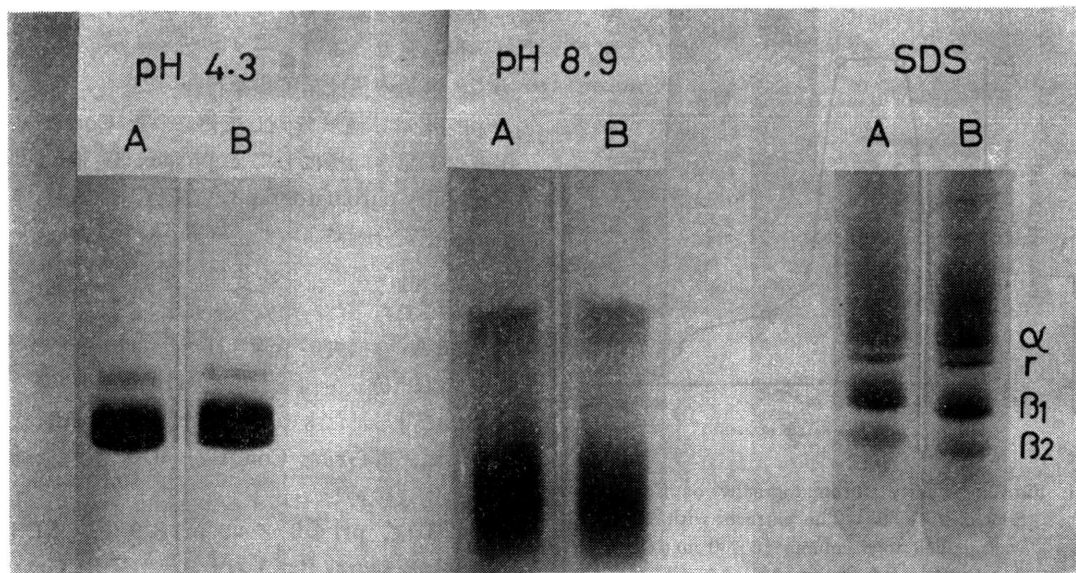


Fig. 4. Disc Electrophoresis of Con A Obtained by Two Types of Preparation Procedures on Polyacrylamide Gels.

Electrophoreses in polyacrylamide at pH 4.3 and 8.9, and in SDS polyacrylamide gels were carried out with Con A at 20°C, stained with amido black. (A) Con A obtained by ammonium sulfate fractionation; (B) Con A obtained by the procedure without ammonium sulfate fractionation.

泳動 Pattern からは見出されず、これらの結果からは両調製法で得られた Con A の純度にさほど大きな違いはないと思われる。

次に、調製された Con A の比活性ともいうべき活性の強さの検討を行なった。Phytohemagglutinin に対する活性力の測定には、普通赤血球に対する凝集能を持って表わせられる。他に、伊藤<sup>13)</sup>らが開発したブルーデキストランによる方法がある。まず赤血球に対する凝集能を調べた。

Phytohemagglutinin の溶液 0.5 ml に、生理食塩水 0.5 ml を加え、さらにその 0.5 ml を別の試験管に取り、又生理食塩水 0.5 ml を加え、次々と 2 倍、4 倍、……と希釈した PHA 液を作製し、各々に 0.2 ml の 4% 赤血球を加え、37°C 1 hr 反応を行ない赤血球の凝集がどの希釈の所まで生じているか調べられた。蛋白量 1 mg 含量の所から数えて何倍の所まで凝集活性を示すかを titer/mg protein として表記すると、(A)は 64 titer/mg protein、(B)は 32 titer/

mg protein で、わずかな違いが観察された。

この結果は、(B)がより不純物を含んでいる事を示唆している。つまり、酵素反応における比活性のデーターと同じ意味を持ち精製度の目安となる。

Disc 電気泳動でわずかな contaminant の存在が観察された結果と矛盾しない事になる。

硫安分画によって得られた Con A と、硫安分画なしで得られた Con A との活性の違いがあるかどうかを、Blue dextran によって調べた。もし精製度に違いがあれば、蛋白質あたりの活性つまり酵素で言えば比活性に違いがでてくるはずである。

5 mg/ml 濃度の Blue dextran に種々濃度の Con A を反応させ、蛋白質に対する反応量を求めたのが Fig. 5 である。A、B 共にそれほど蛋白質あたりの反応量に違いはなく、比活性はほぼ同じ程度と考えられる。

電気泳動の結果と考えてみて、これら 2 つの方法で得られた Con A の純度は、ほぼ同じで

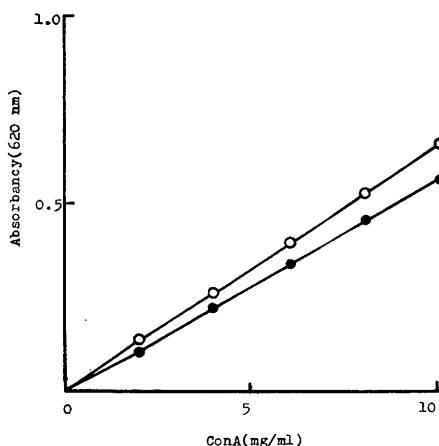


Fig. 5. Activity Measurements of Con A with Blue Dextran.

Reaction mixture (1 ml of Con A, 1 ml of blue dextran (5 mg/ml) and 3 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$ , and 1 M NaCl) incubated at 30°C for 1 hr. The precipitating activity was measured by the colorimetric method at 620 nm (blank-sample). ○—○, Con A fractionated with ammonium sulfate; ●—●, Con A extracted with 1 M NaCl without ammonium sulfate fractionation.

ある事が示唆された。よって Con A を迅速に、簡便に得る方法として、硫酸分画の過程を省略し 1 M の NaCl で抽出・透析の後、Sephadex G-50 による Affinity chromatography によって、かなりの精製が可能であると考えられる。又、収量の面から言っても硫酸分画による loss を防ぐ事ができる。さらに、我々は、今回のデータには示さなかったが、Con A-Sepharose のカラム作製においても、良好な結果を得る事ができた。

Con A を始めとして、他の多くの Phytohemagglutinin は、糖質との特異的な結合性を示す事が発見されており、これら Phytohemagglutinin の生化学的性質は、まだ未確定の部分が多いが、その糖に対する特異的性質は、多いに利用すべきものがあり、近年、種々の糖蛋白質酵素の糖鎖の持つ役割が各方面で注目されて

いる折、それらの解明に一助となる事が期待でき、今後さらに種々 Phytohemagglutinin の持つ性質を明らかにしていくと共に、糖蛋白質研究への応用域を深めて行きなと思う。

## SUMMARY

Concanavalin A, obtained from jack beans, was identified by the method of disc electrophoresis and the agglutinating activity was measured.

1. Concanavalin A was obtained in low yield by ammonium sulfate fractionation.

2. The results of disc electrophoresis showed a little contaminant. The preparation procedure without ammonium sulfate fractionation produced in more impurity.

3. Agglutinating activity with human erythrocytes was measured. Concanavalin A which obtained by ammonium sulfate fractionation had higher activity to human erythrocytes.

4. Precipitating activity with polysaccharide was measured by the use of blue dextran. Concanavalin A which obtained by ammonium sulfate fractionation formed more precipitates with blue dextran.

5. These results shows that concanavalin A which prepared by the procedure of ammonium sulfate fractionation was low yield but higher purified.

## REFERENCES

- 1) J.B. Sumner & S.F. Howell: J. Bacteriol., 32, 227 (1936)
- 2) M. Imber & L. Sachs: Proc. Nat. Acad. Sci., 63, 1396 (1969)
- 3) S.D. Douglas, R.H. Kamin & H.H. Fundenbaerg: J. Immunol., 103, 1185 (1969)
- 4) J.B. Sumner & S.F. Howell: J. Biol. Chem., 115, 583 (1936)

東京家政大学研究紀要第18集

- |  |   |
|--|---|
| 5) J. A. Goden : Biochim. Biophys. Acta., 332, 136 (1974)                          | 500 (1973)  |
| 6) G. Edelman : J. Cell Biol., 62, 366 (1974)                                      | 10) Y. Abe, M. Iwabuchi & S. Ishii : Biochim. Biophys. Acta., 45, 1271 (1971) |
| 7) M. M. Burger & K. D. Noonan : Nature, 228, 512 (1970)                           | 11) L. Ornstein : Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321 (1964)                      |
| 8) J. Duke, I. J. Goldstein & A. Misaki : Biochim. Biophys. Acta., 271, 237 (1972) | 12) K. Webber & M. Osborn : J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969)                  |
| 9) I. J. Goldstein : Biochim. Biophys. Acta., 317,                                 | 13) I. Ito : Not published  |