

報 文

小麦胚芽レクチン-オリゴ糖間結合の
ボルタンメトリーによる評価神谷 直人¹, 高柳 智之¹, 平林 譲司¹, 菅原 一晴^{®1}

小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, WGA) と選択的に結合するオリゴ糖との結合をボルタンメトリーにより評価した。電極活性物質であるダウノマイシンでラベル化したオリゴ糖をプローブとして用い、WGA によるラベルの被覆に基づいた電極応答の変化からその結合定数を見積もることができる。セロトリオースとキトトリオースにおいて、WGA との結合力は疎水性の高いアセチルアミド基を有するキトトリオースのほうがより強いことが明らかとなった。

1 緒 言

生体内の細胞間において様々な情報を伝達する場合、細胞表面上での生体分子間の電子移動や結合が深く関与している。細胞膜表面上には種々の糖質や糖鎖が存在し、特定のタンパク質はこの糖鎖構造や配列を認識する。レクチンは、動植物、微生物、ウイルスに至るまで広く存在しており、特定の糖質の構造を認識して結合する糖タンパク質である。レクチンの性質としては、細胞を凝集させたり、多糖類や糖タンパク質を沈降させたりする¹⁾。植物レクチンは、1888年にヒマの実から見いだされ、マンノース残基を認識するタチナタ豆由来のレクチン (concanavalin A, Con A)、ガラクトサミン残基と結合する大豆由来レクチン (soybean agglutinin, SBA)、小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, WGA) など1000以上の植物レクチンが報告され、研究が進められてきている²⁾。一方、動物由来のレクチンであるS型レクチンはガラクトース残基に対し親和性が高く、C型レクチンであるセレクチンは白血球と結合することで免疫機能を活性化させる³⁾。このようにレクチンは様々な生理学的プロセスに関与している。

これらのレクチンは生体内の細胞表面に存在する糖鎖構造を解析する上で有用であり、医学的、薬学的分野において注目を集めている。このためレクチンの構造の解析が行われ、糖質との結合サイトの形状、更には結合部位が断定されるようになった。レクチンと糖質との結合の要因としては、水素結合や疎水性相互作用、更に幾何学的構造認識が挙げられる。レクチン-糖質間結合をモニタリングするためには、質量分析法⁴⁾や核磁気共鳴法⁵⁾、そして蛍光物質でレクチンあるいは糖質修飾した方法^{6)~8)}が広く用い

られている。加えて、糖質や糖鎖を修飾したカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによるレクチンの精製も行われている⁹⁾¹⁰⁾。

一方、電気化学的方法においてもレクチンと糖質との結合を評価できる。著者らは以前の研究において次のような研究を行ってきた。自己集積膜法によりガラクトサミンを修飾した金電極における $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ の電極応答の変化からSBAとの結合についての考察を行った¹¹⁾。また、電極活性物質であるチオニンでマンノースを修飾したラベル化マンノースとCon Aとの結合をボルタンメトリーにより検討した¹²⁾。加えて、電極活性物質でラベル化した糖質とレクチンとの結合をモニタリングしてきた¹³⁾。この電気化学的手法はレクチンと結合している糖質と結合していないものとを分離する必要性がないという利点をもっている。また、高感度な検出が可能でありレクチンと糖質との結合を評価するための優れた手法である。この手法を用いてレクチン-糖質間結合の評価法を生体試料に応用するには、多糖類との結合についての考察が必要とされる。一般的に、生体内に存在するほとんどの糖質は、単糖ではなく様々な構造を持った糖鎖として存在しており、タンパク質と糖鎖との結合により多くの生理学的反応が引き起こされる。例えば、神経伝達物質やホルモンの分泌の切っ掛けや調節に関与しており、細菌やウイルスも細胞表面の糖鎖を認識し宿主に感染することが知られている。したがって、タンパク質-糖鎖間結合を評価することは非常に重要である。それゆえ、これまでに等温滴定熱量測定法¹⁴⁾や蛍光分光法¹⁵⁾によるレクチンとオリゴ糖との結合についての評価法が報告されている。

本研究では、電気化学的手法によりレクチンとオリゴ糖との結合についての検討を行った。プローブは、電極活性物質でラベル化したオリゴ糖であり、先に述べた利点を持

¹ 群馬大学教育学部理科教育講座: 371-8510 群馬県前橋市荒牧町 4-2

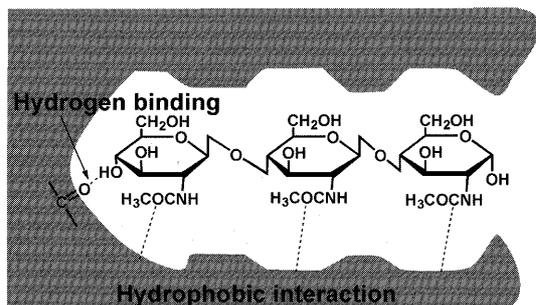


Fig. 1 Binding between WGA and chitotriose

っている¹³⁾. このプローブを用いて、レクチンに対する結合定数を見積もり糖鎖の長さや構造の影響を評価することが、この研究のねらいである。対象としたレクチンは、WGAである。WGAはレクチンの中でも分子量が18000と他のレクチンに比べ小さく、通常2つのサブユニットから成りN-アセチルグルコサミンに対してそれぞれ2つの結合サイトをもっている。その結合定数はN-アセチルグルコサミンをベースとする二糖、三糖、四糖と増加する特徴をもつ¹⁴⁾. これはWGAとオリゴ糖との結合が糖鎖の長さに依存することを示す。すなわち、WGA-オリゴ糖間の結合には疎水的相互作用が大きく関与している。Fig. 1はWGAとキトトリオースとの結合を表したものである。また、WGAはN-アセチルグルコサミンよりも結合力は小さいが末端にグルコサミン及びグルコース残基をもつオリゴ糖とも結合することも知られている。更には、WGAは、シアル酸残基¹⁵⁾、キチン¹⁶⁾、細菌の細胞壁のペプチドグリカン¹⁷⁾を認識し、インシュリン受容体の精製¹⁸⁾やニューロンのトレーシング¹⁹⁾に関する有用なレクチンである。電極活性物質として用いたダウノマイシンは抗がん剤であり、環境からの汚染の可能性は低く、シッフ塩基反応によって容易に糖質に結合する¹³⁾。また、電極への吸着性が高く高感度な検出が期待される。したがって、WGAとダウノマイシンでラベル化したキトオリゴ糖あるいはセロオリゴ糖の結合をボルタンメトリーにより評価した。

2 実験

2.1 試薬

電極活性物質であるダウノマイシンは和光純薬から、糖質は生化学工業から購入した。WGA, Con A と SBA は、Sigma-Aldrich 製のものである。0.1 M KH_2PO_4 と 0.1 M NaOH によるリン酸緩衝溶液は、反応溶液と電気化学的測定をするための支持電解質溶液として使用した。また、測定する前に溶液は高純度窒素ガスにより脱気した。用いたすべての試薬は、分析グレードである。

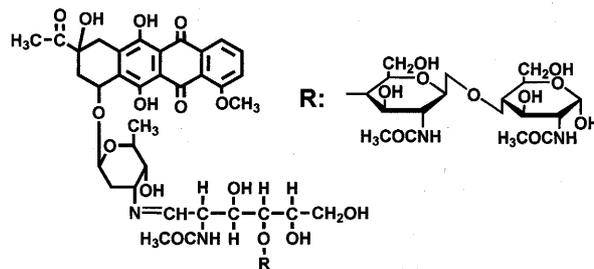


Fig. 2 Structure of labeled chitotriose

2.2 装置

電気化学的測定には、CV-50 W アナライザーを使用した {Bioanalytical Systems Inc. (BAS) 製}。作用電極は、グラッシーカーボン電極 (Model No. 11-2012, BAS 製) である。測定前に、電極を粒径が 1.0, 0.3, 0.05 μm アルミナ (Baikoski International Corp., Charlotte, NC) でそれぞれ研磨した。対極は白金線であり、参照電極は Ag/AgCl (Model No. 11-2210, BAS 製) であった。すべての電位は、Ag/AgCl 電極に対するものである。溶液の pH は堀場 D-21 pH メーターを用いた。また、UV 1240 mini 分光光度計 (Shimadzu 製) でダウノマイシンとラベル化糖質の吸光度を測定した。

2.3 ラベル化糖質の調製

すべてのラベル化糖質は、シッフ塩基反応を用いダウノマイシンと糖質とを 0.1 M リン酸緩衝溶液中 (pH 8.5) で 1 昼夜 4°C で反応させ調製した。次にラベル化糖質の溶液を薄層クロマトグラフィー用シート (Silica gel alumina sheet, MERCK 製) にスポットした後、展開溶媒 1-プロパノール:アンモニア水 = 40:10 (v/v)% により展開することで原料と目的物とを分離した。更に、目的部分をシートからはがし、エタノールに溶解し遠心分離することで、シリカゲルを除去した。ラベル化糖質の濃度は、電極活性物質であるダウノマイシンのモル吸光係数 (11000) を基に決定した。調製したラベル化キトトリオースの構造を Fig. 2 に示した。

2.4 測定操作

ラベル化糖質と WGA を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、1 時間混合する。電極を溶液に浸し、かくはんしながら -1.0 V の電位を 5 分間印加する。15 秒の静止時間の後、ラベル化糖質の酸化波を微分パルスボルタンメトリーによって -1.0 から 0.0 V の範囲で電位を掃引する (掃引速度: 5 mV s^{-1} , パルスアンプリチュード: 50 mV, サンプル幅: 2 ms, パルス幅: 50 ms, パルス時間: 200 ms)。

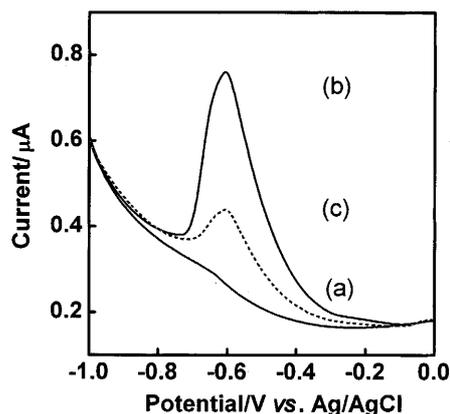


Fig. 3 Voltammograms of labeled chitotriose and the WGA-labeled chitotriose complex

(a) Blank; (b) 4×10^{-7} M Labeled chitotriose; (c) 4×10^{-7} M Labeled chitotriose + 5×10^{-7} M WGA; For (c), labeled chitotriose and WGA were mixed for 1 hour in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). After a potential at -1.0 V for 5 min was applied to the electrode, measurements were carried out with differential pulse voltammetry.

3 結果と討論

3.1 WGA-ラベル化オリゴ糖間結合の評価

電極活性物質であるダウノマイシンでラベル化したキトトリオース (4×10^{-7} M) を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) において測定を行ったところ, -0.60 V 付近にダウノマイシン部位に起因した酸化ピークが観察された (Fig. 3)²⁰. このピーク電流値は, 4×10^{-7} M ダウノマイシン単独の電流値に比べ若干増加した. グラッシーカーボン電極表面は疎水的な性質を持っているため, ラベル化糖質の電極への吸着性は疎水性の高い糖質部位の導入によりダウノマイシンより強くなったものと考えられる.

次に, ラベル化キトトリオースを含む 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 中に WGA を加え 1 時間混合した後, ボルタモグラムを測定した. WGA を添加した場合のピーク電流値は添加する前の電流値に比べ大きく減少している. 一方, 電極活性物質であるダウノマイシン単独と WGA との結合について検討した. 4×10^{-7} M ダウノマイシンが含まれるリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に 5×10^{-7} M WGA を加え反応させた場合, ダウノマイシンのピーク電流値の減少はほとんど見られなかった. このことから, 糖質をラベル化する際にダウノマイシンを用いても WGA との結合を評価する上で影響がほとんどないことが分かる. したがって, ラベル化オリゴ糖のピーク電流値の減少は WGA とオリゴ糖の結合に伴いラベル化剤であるダウノマイシン部位も WGA の結合サイトに取り込まれたことによるものと考えられる. また, Fig. 3 のラベル化キトトリオースの電流

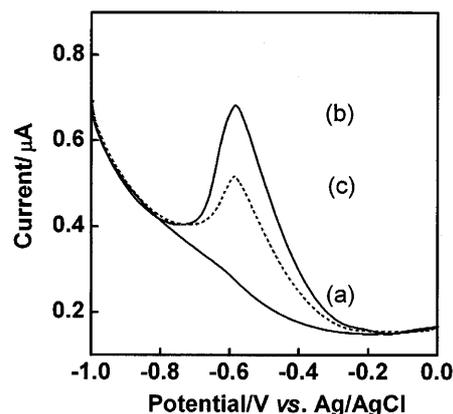


Fig. 4 Voltammograms of labeled cellotriose and the WGA-labeled cellotriose complex

(a) Blank; (b) 4×10^{-7} M labeled cellotriose; (c) 4×10^{-7} M Labeled cellotriose + 5×10^{-7} M WGA; For (c), labeled cellotriose and WGA were mixed for 1 hour in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). After a potential at -1.0 V for 5 min was applied to the electrode, measurements were carried out with differential pulse voltammetry.

値と Fig. 4 のラベル化セロトリオースの電流値を比較すると, ラベル化セロトリオースの電流値はラベル化キトトリオースのものよりも小さく, 電極への吸着性が弱くなっていることが分かる. 更に, WGA の共存における電流値の減少率も低くなっているため, WGA との結合力も弱いことが示唆される. これは, WGA のオリゴ糖に対する結合部位が疎水的な性質をもつことが原因である. すなわち, アセチルアミド基をもつキトトリオースのほうがセロトリオースよりも, 電極への吸着性そして WGA に対する結合力も強くなっている.

3.2 WGA とラベル化キトトリオースとのインキュベーション時間

WGA とラベル化キトトリオースとを反応させるインキュベーション時間とラベル化キトトリオースの電流値との関係を Fig. 5 に示した. まず, 4×10^{-7} M のラベル化キトトリオースを含む 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に -1.0 V の電位を 5 分間印加した後に測定を行った. 次に, 4×10^{-7} M ラベル化キトトリオースに 5×10^{-7} M WGA を加え一定の時間, 溶液はかくはんしてからボルタモグラムを記録した. インキュベーション時間が増加するとともにラベル化キトトリオースの電流値の減少が見られた. また, WGA とキトトリオースとの反応時間が 60 分以降の電流値はほぼ一定となった. これは WGA とラベル化キトトリオースとの結合が平衡状態になったためであると考えられる.

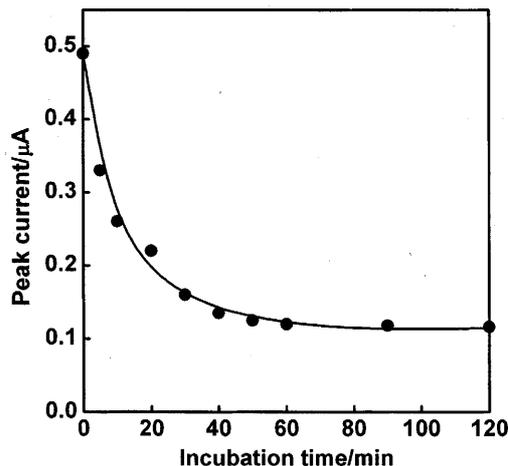


Fig. 5 Dependence of the incubation time on the peak current

Labeled chitotriose of 4×10^{-7} M and WGA of 5×10^{-7} M were mixed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). After a potential at -1.0 V for 5 min was applied to the electrode, measurements were carried out with differential pulse voltammetry.

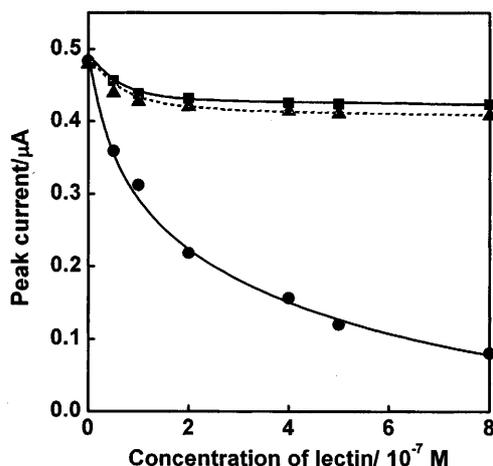


Fig. 6 Interaction of labeled chitotriose to lectin

■: SBA; ▲: Con A; ●: WGA; Labeled chitotriose of 4×10^{-7} M and lectin of 5×10^{-7} M were mixed for 1 hour in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). After a potential at -1.0 V for 5 min was applied to the electrode, measurements were carried out with differential pulse voltammetry.

3.3 ラベル化キトトリオースとレクチンとの結合

幾つかのレクチンとラベル化キトトリオースとの結合について考察した。 4×10^{-7} Mのラベル化キトトリオースを含む0.1 Mリン酸緩衝溶液 (pH 7.0) にWGAを加え60分間反応させボルタンメトリーによる測定を行った (Fig. 6)。また、キトオリゴ糖と相互作用をもたないSBAやCon Aについても同様に測定した。ラベル化キトトリ

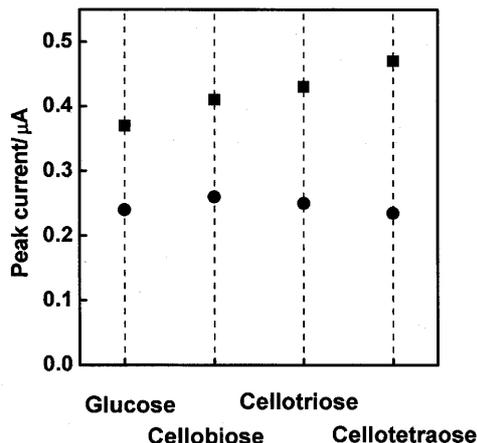


Fig. 7 Effect of the length of sugar chain to formation of the WGA-labeled sugar complexes

■: 4×10^{-7} M Labeled sugar; ●: 4×10^{-7} M Labeled sugar + 5×10^{-7} M WGA; Labeled sugar and WGA were mixed for 1 hour in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). After a potential at -1.0 V for 5 min was applied to the electrode, measurements were carried out with differential pulse voltammetry.

オースにWGAを添加し反応させ測定した溶液では、WGAの濃度に依存して電流値の減少が見られた。一方、SBA又はCon Aを加えた溶液については、 8×10^{-7} Mの濃度を加えてもラベル化キトトリオースの電流値の減少はあまり見られなかった。この結果からもラベル化糖質がSBAやCon Aに結合していないことが分かる。また、 4×10^{-7} Mダウノマイシンと 4×10^{-7} M WGAとを60分間混合してもダウノマイシンの電流値の減少は観察されなかった。電流値が変化しないことは、WGAが電極表面に吸着してダウノマイシンの電極応答を阻害したり、ダウノマイシンがWGA表面に非特異的に吸着したりしないことを示す。したがって、WGA共存におけるラベル化オリゴ糖の電流値の減少は、WGAとの選択的結合によるものである。

3.4 WGAとラベル化オリゴ糖との結合に対する糖鎖の長さの影響

グルコース残基構造をもつセロオリゴ糖をラベル化し、WGAとラベル化オリゴ糖との結合に対する糖鎖の長さの影響について検討した。ラベル化グルコースからラベル化セロテトラオースについての測定を行った。その結果、検討した糖鎖の中で一番長いラベル化セロテトラオースが最も大きな電流値を示した (Fig. 7)。この理由は、ラベル化セロテトラオースは分子量が大きく疎水的性質が最も高くなるため、電極に対する吸着性が強いことに起因すると考えられる。また、WGAとラベル化セロオリゴ糖を加え60分間反応させた場合、ラベル化セロテトラオースにお

いて電流値はWGAなしの場合に比較して, 電流値の減少の割合が約50%となり一番大きくなっている. この結合には, WGAのオリゴ糖に対しての結合部位の疎水的相互作用が関与しているため, このラベル化オリゴ糖自体の疎水性の高さが結合に影響を及ぼす. また, 糖鎖とWGAの結合サイト間の水素結合やイオン結合の効果も増加するため結合定数が大きくなるものと考えられる. すなわち, ラベル化セロテトラオースの疎水的性質は電極への吸着性を高め, WGAに対しての結合力を強める.

3.5 WGA-ラベル化オリゴ糖間の結合定数

WGAとラベル化オリゴ糖との結合定数をボルタンメトリーにより見積もった. その方法は次のとおりである. WGAと結合したオリゴ糖と結合していないオリゴ糖との濃度比 ($A_{\text{bound/free}}$) を結合していないものの電流値から計算した. また, WGAと結合したラベル化糖質の電極応答はゼロと仮定した. その濃度比は, WGAと結合しているオリゴ糖量に対してプロットした (Scachard・プロット). ラベル化したグルコース, セロビオース, セロトリオース, セロテトラオースの結合定数は, それぞれ $0.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $0.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ である. 糖鎖の長さに依存して結合力が強くなっている. 一方, WGAとキトトリオースとの結合定数を測定したところ, $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ となり Bains らの結果と同程度であった¹⁴⁾. ラベル化セロトリオースとラベル化キトトリオースの結合定数からも, オリゴ糖の構造がWGAとの結合に大きく寄与していることが分かる. このように電気化学的手法を用いてもWGAとオリゴ糖との結合定数を測定することができる.

4 結 論

官能基の構造が一部異なるキトトリオースとセロトリオースを電極活性物質でラベル化し, WGAとの結合への構造の影響をダウノマイシンのピーク電流値の減少から明らかにすることができた. また, セロオリゴ糖を用いてWGA

との結合定数を電気化学的手法により見積もった. この手法は, 生体内におけるレクチンと糖質との結合を評価するための非常に有効な手段となる. 更に, 本手法は細胞表面上の複雑な糖鎖構造を解析するプローブとなることが期待される.

文 献

- 1) C. L. Nilsson: *Anal. Chem.*, **75**, 348 (2003).
- 2) N. Sharon, H. Lis: "Lectins", (2003), (Kluwer Academic).
- 3) J. B. Lowe: *Biochem. Soc. Symp.*, **69**, 33 (2002).
- 4) J. L. Bundy, C. Fenselau: *Anal. Chem.*, **73**, 751 (2001).
- 5) Y. Cheong, G. Shim, D. Kang, Y. Kim: *J. Molecul. Struct.*, **475**, 219 (1999).
- 6) A. P. Wei, D. K. Blumenthal, J. N. Herron: *Anal. Chem.*, **66**, 1500 (1994).
- 7) O. W. Reif, R. Lausch, T. Scheper, R. Freitag: *Anal. Chem.*, **66**, 4027 (1994).
- 8) R. J. Russell, M. V. Pishko, C. C. Gefrides, M. J. McShane, G. L. Cote: *Anal. Chem.*, **71**, 3126 (1999).
- 9) R. Qiu, F. E. Regnier: *Anal. Chem.*, **77**, 2802 (2005).
- 10) M. Wuhler, C. A. Koeleman, C. H. Hokke, A. M. Deelder: *Anal. Chem.*, **77**, 886 (2005).
- 11) K. Sugawara, K. Ueda, H. Kuramitz, S. Hoshi, K. Akatsuka, S. Tanaka: *Chem. Lett.*, **29**, 214 (2000).
- 12) K. Sugawara, T. Shirotori, G. Hirabayashi, H. Kuramitz, S. Tanaka: *J. Electroanal. Chem.*, **568**, 7 (2004).
- 13) K. Sugawara, T. Shirotori, G. Hirabayashi, H. Kuramitz, T. Kaneko, S. Hoshi, K. Akatsuka, S. Tanaka: *Anal. Sci.*, **17**, 21 (2001).
- 14) G. Bains, R. T. Lee, Y. C. Lee, E. Freire: *Biochem.*, **31**, 12624 (1992).
- 15) M. Monsigny, A-C. Roche, C. Sene, R. Maget-Dana, F. Delmotte: *Eur. J. Biochem.*, **104**, 147 (1980).
- 16) A. Kristiansen, Å. Nysæter, H. Grasdalen, K. M. Vårum: *Carbohydr. Polym.*, **38**, 23 (1999).
- 17) C. S. Wright: *J. Biol. Chem.*, **267**, 14345 (1992).
- 18) W. M. Pardridge, J. Eisenberg, J. Yang: *J. Neurochem.*, **44**, 1771 (1985).
- 19) V. G. Vanderhorst, E. Terasawa, H. J. 3rd Ralston: *J. Comp. Neurol.*, **454**, 82 (2002).
- 20) J. M. Kauffmann, O. Chastel, G. Quarin, J. Partriarche: *J. Bioelectrochem. Bioenerg.*, **23**, 167 (1990).

Voltammetric Evaluation of Wheat Germ Agglutinin - Oligosaccharide Binding

Naoto KAMIYA¹, Tomoyuki TAKAYANAGI¹, George HIRABAYASHI¹ and Kazuharu SUGAWARA¹

¹ Faculty of Education, Gunma University, 4-2, Aramaki, Maebashi-shi, Gunma 371-8510

(Received 14 April 2006, Accepted 20 July 2006)

The voltammetric behavior of oligosaccharides, which combine with wheat germ agglutinin (WGA), was investigated. The binding was evaluated from the change in the electrode response of an oligosaccharide labeled with an electroactive compound. When the measurement of the labeled oligosaccharide was carried out in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) with WGA, the peak current decreased based on the WGA-labeled oligosaccharide binding. In the presence of WGA, the peak current of labeled chitotriose was lower than that of labeled celotriose. This is because the hydrophobic acetylamide group of chitotriose relates to the binding. Furthermore, the binding constant between WGA and oligosaccharide was estimated.

Keywords : oligosaccharide ; wheat germ agglutinin ; electroactive compound ; voltammetry.