九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

リゾチームの糖ペプチドによる修飾とラット肝細胞膜への結合について

池田，益啓
九州大学農学部蚕糸化学教室

下田，忠久
九州大学農学部蚕糸化学教室

古賀，克己
九州大学農学部蚕糸化学教室

林，勝哉
九州大学農学部蚕糸化学教室

https://doi.org/10.15017/23245

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 32 (1), pp.29-33, 1977-08. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第32巻 第1号 29-33 (1977)

リゾチームの糖ペプチドによる修飾とラット肝細胞膜への結合について

池田益啓・下田忠久*
古賀克己・林勝哉
九州大学農学部蚕糸化学教室
(1977年5月12日受理)

Modification of Lysozyme with Glycopeptide and its Binding to Hepatic Membrane of Rat

MASUHIRO IKEDA, TADAHISA SHIMODA, KATSUMI KOGA and KATSUYA HAYASHI
Laboratory of Sericultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-03, Fukuoka 812

緒言

タンパク質あるいは薬剤に糖ペプチドを結合させることによつて，肝臓への取り込みを上昇させようという試みが行われている (Kranz *et al.*, 1976 ; Rogers and Kornfeld, 1971)．これは，肝臓の細胞膜上に血清糖タンパク質のレセプターが存在することと関連が深い (Pricer and Ashwell, 1971)．糖ペプチド鎖の末端にシアル酸が結合している場合には，レセプターとの反応が低いと報告されている (Morell *et al.*, 1968, 1971 ; Van den Hamer *et al.*, 1970)．本実験では，シアル酸含量が比較的少なく，ヘキソース含量の多い卵白オボムコイドから糖ペプチドを調製し，それをリゾチームに結合させることを試みた．得られた修飾リゾチームの肝臓膜画分への結合を，native リゾチームのそれと比較した．

本研究に対し御援助いただいたエーザイ株式会社研究開発本部付理事・小西藤治博士に深謝の意を表する．

材料と方法

材料と分析法 リゾチーム (Lot No. E 5201, 6回再結) は生化学工業株式会社，ノイラミニダーゼ (*Clostridium perfringens* 由来，No. N-2876, U型) はシグマ社，BioRex 70 (3.3 meq/ml bed, 100～200 メッシュ) はビオラド社，コロジオンバッグはザートリウスメンブラン社，グラスファイバーフィルター (GF/C, 2.5 cm 径) はワットマン社よりそれぞれ入手した．糖ペプチド中のヘキソースの定量にはフェノール硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956)，シアル酸の定量にはノイラミニダーゼ処理で遊離してくるシアル酸をチオバルビツール酸によつて測定する方法 (Cassidy *et al.*, 1965 ; Warren, 1954) を用いた．

リゾチームの活性測定 溶菌法 (Litwack, 1955) によつた．すなわち *Micrococcus lysodeikticus* 菌体 (生化学工業社製) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し，濁度 (540 nm) が 0.9～1.0 になるように調製した．30°C に加温した試料 (3 ml) をセルにとり，10～100 μl の酵素液を加え，ダブルビーム分光光度計 (日立製，124 型) により，その濁度の減少を経時的に記録した．この条件下で菌体懸濁液の濁度を3分間に 0.1 だけ減少させる酵素量を，酵素の1単位と定義した．

糖ペプチドの調製 まず，卵白から酸処理・硫安分画などによりオボムコイドを調製 (Kanamori and Kawabata, 1964) し，それより糖ペプチドを分離した．そのためには，Kanamori and Kawabata (1969) の方法を若干変更して適用した．すなわち，

* 九州大学農学部生物化学教室

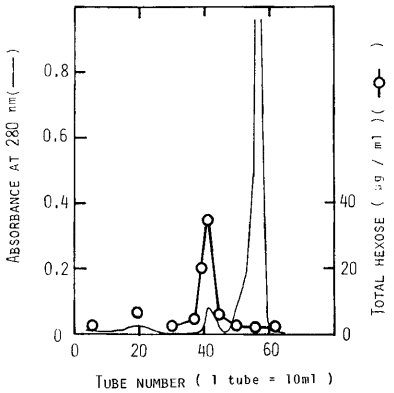

Fig. 1. Gel-filtration of glycopeptide on a Sephadex G-50 column (2.7×96 cm). Gel was equilibrated and the sample was eluted with water.

精製オボムコイド 1 g を 0.01 M 酢酸カルシウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）50 ml に溶解し，100°C で 1 時間加熱した．氷冷後プロナーゼ P による消化を行つた（37°C, 24 時間）．このとき 0.1 N カセイソーダを加えて溶液の pH を 8 付近に保つた．1N 酢酸で pH を 4.5 に下げて反応を止めたのち，減圧下で 10 ml に濃縮した．この溶液に 10 倍容の 99 %エタノールを加え，生じた沈殿を遠心分離（2000× g，20 分）して集めた．沈殿を同緩衝液に溶解し，上記のプロナーゼ処理をさらに 3 回行つた．加水分解溶液を減圧下で 10 ml に濃縮したのち，等容の 10 % TCA を加え，沈殿を遠心分離（2000× g，20 分）して除いた．上清についてセファデックス G-50 によるゲル濾過を行つた（Fig. 1）．この操作により試料は 3 つの画分にわかれた．糖反応を呈した第 2 画分を集め，凍結乾燥した．これを精製糖ペプチドとして以下の実験に用いた．精製オボムコイド 1 g から糖ペプチド約 200 mg が得られた．この標品は，ヘキソースとシアル酸をそれぞれ 17 %，1.2 %含有していた．

糖ペプチドによるリゾチームの修飾　反応試薬としてトルエンジイソシアネートを用いる方法（Rogers and Kornfeld, 1971; Schick and Singer, 1961）により，10 mg の糖ペプチドを 10 mg のリゾチームと反応させた．

アフィニティクロマトグラフィー　*Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体（生化学工業社製）から既報の方法（Ogata *et al.*, 1974）により調製した細胞壁のリゾチームライセートをリガンドとしてファルマシア社製の CNBr-セファロース 4 B に結合させた．以上の操作は Yoshimoto and Tsuru (1974) によるものと同様であるが，本実験では酵素を吸着する時 0.5 M 食塩の代りに 0.05 M 食塩を含む緩衝液を用いた．

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動　Segrest *et al.* (1971) の方法に従つた．ゲル中のタンパク質はクマジーブリリアントブルーによつて，糖は過ヨウ素酸・シッフ試薬によつて染色した．

リゾチームの ^{125}I によるラベル　修飾リゾチームと native リゾチームを，クロラミン-T 法（Greenwood and Hunter, 1963）により $Na^{125}I$ (17 Ci/mg, NEN 社製）で標識した．25 μg のリゾチームに対し 1 mCi の同位元素を用いた．反応液は全量 0.2 ml とした．

ラット肝臓などの細胞膜画分の調製　Pricer and Ashwell (1971) の方法を若干変更して適用した．雄ラット（ドンリュウ，体重 170 g）を断頭し，肝臓・心臓・腎臓を摘出した．それぞれを，0.5 mM 塩化カルシウムを含む 1 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中で摩砕し，遠心分離（2000× g，30 分）をくり返したのち，ペレットを 5～10 ml の同緩衝液に懸濁した．各組織からの懸濁液は，Lowry *et al.* (1951) の方法によるタンパク質濃度の測定にもとづき，同じ濃度（3 mg/ml）になるように同緩衝液で希釈して以下の実験に用いた．

結　　果

修飾リゾチームの分離

リゾチームを，方法の項で述べたようにして修飾したのち，0.1 N 塩酸で pH を 6.5 に調製し，BioRex 70 によるカラムクロマトグラフィーを行つた．Fig. 2 に示すように，未反応リゾチームは遅れて溶出された．素通り画分を集め，コロジオンバッグにより濃縮・透析したのち，凍結乾燥した．この標品は，修飾反応の進行程度の差異によつて生じた種々の修飾リゾチームおよび糖ペプチドなどを含むと考えられる．したがつて，さらにアフィニティクロマトグラフィーによる修飾リゾチームの分離を行つた．結果を Fig. 3 に示す．吸着画分を集め，コロジオンバッグで濃縮・透析したのち，凍結乾燥した．得られた標品を「修飾リゾチーム」として以下の実験に供した．

修飾リゾチームの性質

修飾リゾチームの糖含量を測定した結果，糖ペプチド 1 モルに対してリゾチームが 1.2 モル結合していることがわかつた．修飾リゾチームは native リゾチー

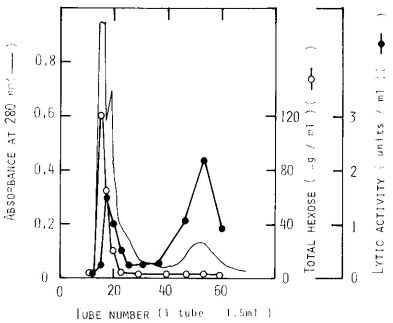

Fig. 2. Chromatography of modified lysozyme on a BioRex 70 column (1.5×30 cm). The equilibration and elution buffer used was 0.2 M phosphate buffer-0.25 M NaCl, pH 6.5.

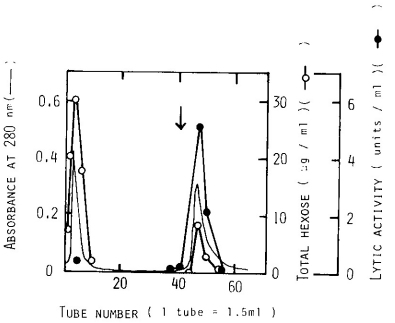

Fig. 3. Affinity chromatography of modified lysozyme. Column size: 1.4×4.5 cm. Equilibration of the column and application of the sample were made with 0.01 M phosphate buffer-0.05 M NaCl, pH 7.0. Elution was begun at the arrow with 0.1 M glycine-NaOH buffer-2 M NaCl, pH 10.0.

ムに対して，約34％の相対活性（溶菌法による）を有していた．修飾リゾチームは280 nm付近に吸収極大，260 nmに吸収極小を示した（Fig. 4）．Nativeリゾチームにくらべると，吸収極小を示す位置が長波長側に10 nm移動していた．また，吸収極大値と吸収極小値の比が減少していた．SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による検定において，修飾リゾチームは，タンパク質と糖の両者についてそれぞれ2本のバンドを示した．それらの位置は互いに一致していた（Fig. 5）．

修飾リゾチームの肝臓細胞膜画分への結合

トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）25 μ moles, BSA 0.5 mg，塩化カルシウム 5 μ moles と肝臓細胞膜画分（300 μg）の懸濁液を混合し（全量 0.5 ml），振とうしながらインキュベート（37°C, 15分）した．^{125}I で標識した native リゾチームあるいは修飾リゾチーム（20～40 mCi/mg, 15～20 μg）を加えて，更にインキュベート（37°C, 30分）した．0.1％ BSA, 0.01 M 塩化カルシウムを含む氷冷した 0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）5 ml を加え反応を止め，グラスファイバーフィルターに吸着させた．5 ml ずつの同緩衝液で4回洗浄したのち，赤外線ランプの下で乾燥させ，トルエン-PPO 存在下で液体シンチレーションカウンターにより放射線量を測定した．肝臓だけでなく，心臓，腎臓の膜画分についても同様の操作を行つた．

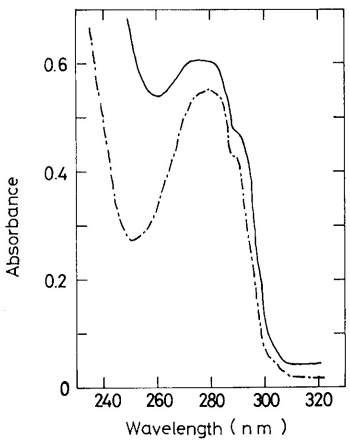

Fig. 4. Absorption spectra of lysozyme and modified lysozyme.
—•—, native lysozyme ; ——, modified lysozyme.

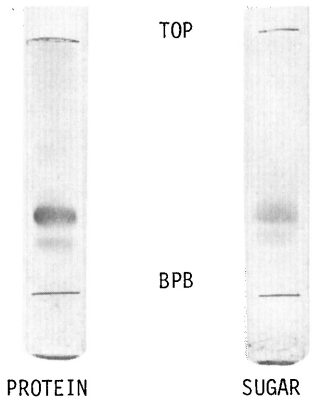

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of modified lysozyme. 100 μg of the sample was applied. Protein was stained with Coomassie brilliant blue and sugar was stained with periodate-Schiff's reagent.

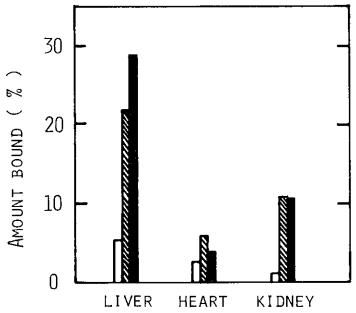

Fig. 6. Binding of ^{125}I-labeled, native or derived lysozyme preparation (25 μg) by membrane fractions (300 μg) of rat tissues. □, native lysozyme; ▒, modified lysozyme; ■, modified lysozyme treated with neuraminidase.

なお，この実験において，糖ペプチドの末端に付いている可能性のあるシアル酸を除く目的でノイラミニダーゼ処理を施した修飾リゾチームをも同時に用いた．このものの調製のためにノイラミニダーゼ 0.1 単位を修飾リゾチーム 1 mg（2 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液，pH 5.0 に溶かしたもの）に 37°C で 5 時間作用させた．これを透析後上記の方法でアフィニティークロマトグラフィーにかけて分画した．この標品を「脱シアル化修飾リゾチーム」と称することにする．

Fig. 6 に native と上記 2 種の修飾リゾチームの膜分画への結合能を示す．縦軸には次式によつて求めた値を表示している．

$$\text{結合度}(\%)=\frac{\text{フィルター上の残存放射活性}-\text{対照値}}{\text{(修飾)リゾチームの放射活性}}$$

なお，対照値というのは，インキュベーション時間が 0 のときの値である．図示しているように，肝臓の膜分画には native リゾチーム 6 %，修飾リゾチーム 24 %，脱シアル化修飾リゾチーム 29 %が結合した．また心臓の膜分画ではそれぞれ，3 %，6 %，4 %，腎臓の場合はそれぞれ，2 %，12 %，11 %であつた．

考　　察

リゾチームは，酵素製剤として肝硬変などの治療に広く用いられている．そこで，リゾチームに糖ペプチドを結合させて，肝臓への取り込みを増加させれば，その薬理作用を強めることができるのではないかと期待される．今回は，リゾチームをオボムコイドの糖ペプチドで修飾して，いくつかの性質を調べた上，肝臓膜画分との結合能を調べた．その結果，native リゾチームに比べて，修飾リゾチームは約 4 ～ 5 倍高い結合値を示すことがわかつた．対照として用いた心臓ではみるべき結果が得られなかつた．腎臓では，修飾によつてリゾチームの結合能が増大したが，結合量そのものが肝臓の場合と比較してかなり小さかつた．これらのことは，本実験で観察された修飾リゾチームの反応が，肝臓のレセプターへの特異的な結合にもとづくことを示唆する．

ところで，肝臓のレセプターとの反応のためには，糖ペプチドの末端がガラクトースであることが必要であり，これがシアル酸でふさがれていると阻害がおこるといわれている（Van den Hamer *et al.*, 1970）．シアル酸は，そもそも，哺乳類の血清糖タンパク質の肝臓による除去を調節するシグナルの役目をもつという考えがある（Morell *et al.*, 1968, 1971 ; Van den Hamer *et al.*, 1970）．本実験で用いたオボムコイド由来の糖ペプチドは，シアル酸含量が比較的少ないので，Fig. 6 に示すように，脱シアル化による取り込み増加があまり劇的でないことは，当然考えられることである．これに対し，他の種類の糖ペプチド，たとえばフェトゥインで修飾したリゾチームの場合，ノイラミニダーゼ処理をしなければ取り込みは上昇しない（Rogers and Kornfeld., 1971）．肝臓への取り込みの増大という目的からすれば，シアル酸の少ないオボムコイドの糖ペプチドによる修飾は，シアル酸をはずすステップを必要としないという意味で便利な方法であるといえよう．もつとも，今回用いた糖ペプチドにおいても，はじめは糖鎖の末端にシアル酸が付いていて修飾あるいは標識操作中にはずれた，という可能性を否定できない．よく知られているように，ガラクトースとシアル酸残基間の α-ケトシド結合は切断され易い．さらに異る条件下での実験が必要である．今回用いた *in vitro* の系の結果が，*in vivo* にどの程度適用できるかという点と，実際に肝臓に入つた場合の修飾リゾチームの挙動については，ともに今後の問題として残される．いずれにしろ，ここに報告したような試みは，ドラッグデザインの方法のひとつとして，有力な手がかりとなり得るであろう．

要　　約

オボムコイドからとつた糖ペプチドをリゾチームに結合させ，得られた修飾リゾチームをアフィニティークロマトグラフィーなどにより分離した．修飾リゾチームは，native のそれに比べて 34 %の相対活性を有していた．糖ペプチドとリゾチームの結合比（モル）は 1 : 1.2 であつた．Native と修飾リゾチームをそ

れぞれ ^{125}I でラベルし，ラット肝臓の膜画分と *in vitro* でインキュベートした結果，同画分へのリゾチームの結合能は，修飾したものが約4倍高いことがわかつた．ノイラミニダーゼ処理でシアル酸を除いた修飾リゾチームでは，結合値はさらに大きくなつた．ラットの心臓や腎臓の膜画分ではさほど著しい結果が見られなかつたことは，上記の結果が肝臓の特異的なレセプターによることを示唆する．

文　　献

Cassidy, J. T., G. W. Jourdian and S. Roseman 1965 The sialic acids. IV. Purification and propaties of sialidase from *Clostridium perfringens*. *J. Biol. Chem.*, **240** : 3501–3506

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton and P. A. Robers 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28** : 350–356

Greenwood, F. C. and W. M. Hunter 1963 The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, **89** : 114–123

Kanamori, M. and M. Kawabata 1964 Studies on egg white proteins. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **38** : 367–371

Kanamori, M. and M. Kawabata 1969 Studies on egg white proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **33** : 220–224

Krantz, M. J., N. A. Holtzman, C. P. Stowell and Y. C. Lee 1976 Attachment of thioglycosides to proteins : Enhancement of liver membrane binding. *Biochemistry*, **15** : 3963–3968

Litwack, G. 1955 Photometric determination of lysozyme activity. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **89** : 401–403

Lowry, O. H., N. J. Farr and R. J. Randall 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, **193** : 265–275

Morell, A. G., R. A. Irvin, I. Steinlieb, I. H. Scheinberg and G. Ashwell 1968 Physical and chemical studies on ceruloplasmine. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmine *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **243** : 155–159

Morell, A. G., G. Gregoriadis and I. H. Scheinberg 1971 The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.*, **246** : 1461–1467

Ogata, S., Y. Tahara and M. Hongo 1974 Mode of action of *Clostridium* phage HM7-induced lytic enzyme on *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* cell wall peptidoglycan. *Agric. Biol. Chem.*, **38** : 763–768

Pricer, W. E. and G. Ashwell 1971 The binding of desialylated glycoproteins by plasma membrane of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **246** : 4825–4833

Rogers, J. C. and S. Kornfeld 1971 Hepatic uptake of proteins coupled to fetuin glycopeptide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45** : 622–629

Schick, A. F. and S. J. Singer 1961 On the formation of covalent linkages between two protein molecules. *J. Biol. Chem.*, **236** : 2477–2485

Segrest, J. P., R. L. Jackson, E. P. Andrew and V. T. Marchesi 1971 Human erythrocyte membrane glycoprotein : A re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **44** : 390–395

Van den Hamer, C. J. A., A. G. Morell and I. H. Scheinberg 1970 Physical and chemical studies on ceruloplasmine. IX. The role of galactosyl residues in the clearance of ceruloplasmine from the circulation. *J. Biol. Chem.*, **245** : 4397–4402

Warren, L. 1954 The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, **234** : 1971–1975

Yoshimoto, T. and D. Tsuru 1974 Affinity chromatography of lysozyme on a Sepharose derivative coupled with lysozyme lysate of bacterial cell wall. *J. Biochem.*, **76** : 887–889

Summary

Lysozyme was linked to a glycopeptide of ovomucoid and the modified enzyme was purified by affinity chromatography. The modified lysozyme showed a relative activity of 34% compared to the native enzyme. The molecular ratio of the glycopeptide to the enzyme was 1.2. When the native and the modified lysozyme preparations were labeled with ^{125}I and incubated with a rat liver membrane fraction *in vitro*, the modified enzyme showed a 4-fold higher affinity for the liver than the native lysozyme. Removal of sialic acid by neuraminidase enhanced further the binding. Experiments with the heart and the kidney gave less significant results, suggesting the specificity of the hepatic uptake of the modified lysozyme.