

生物活性を有するトリペプチド(Gly-His-Lys)の銅錯体に対する抗体の作製とその性質

佐藤卓史, 原口知子, 齊藤睦弘, 千熊正彦
(大阪薬科大学・生体分析化学教室*)

Preparation and characterization of antibody against glycyl-L-histidyl-L-lysine-copper (II) complex

Takaji SATO, Tomoko HARAGUCHI, Yoshihiro SAITO and Masahiko CHIKUMA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki 569-1094, Japan.

Antiserum against gly-L-his-L-lys (GHK)-Cu²⁺ complex has been generated using BSA-GHK-Cu²⁺ conjugate as an immunogen, and an EIA for the determination of GHK-Cu²⁺ has been developed. The standard curve allows the determination of 8×10^{-7} M to 1×10^{-5} M of GHK-Cu²⁺. The EIA method was applied to the determination of GHK-Cu²⁺ spiked in rat plasma. Recoveries from *o*-phenanthroline treated rat plasma were satisfactory whereas they from untreated rat plasma were low. The antiserum can bind to not only GHK-Cu²⁺ but also GHK, though the affinity is higher for the former than for the latter.

Gly-His-Lys (GHK) は、当初、初代培養肝細胞の増殖を促進する因子としてヒト血漿中より単離された¹⁾。その後、種々の培養細胞に対しても同様の作用を有することが確認され²⁾、また、神経細胞の分化促進³⁾、血管新生の賦活^{4,5)}、創傷の治癒促進⁶⁻⁸⁾といった様々な生物活性が見出されている。さらに、それらの活性発現には銅(II)イオンの存在が必須であり、一般に活性種は銅(II)とGHKから形成された錯体であると考えられている。しかしながら、これらの活性が惹起される機構の詳細については不明点が多い。そこで著者らはGHK-Cu²⁺に対する抗体を調製し、その抗体をこれらのGHK-Cu²⁺の活性発現機構の解析に応用することを計画した。しかしながら、金属錯体の抗体を得るためには、錯体をその構造を維持したまま担体タンパク質に結合させたものを免疫原とする必要がある。そこで、本研究においては、まず、免疫原の調製法の検討を行い、次いで、得られた免疫原を用いてGHK-Cu²⁺に対する抗体の作製を試みた。さらにGHK-Cu²⁺を測定するためのEIAを確立し、得られた抗体についてGHK単独に対する認識や、血漿中のGHK-Cu²⁺に対する認識能等の性質の検討を行った。

実験方法

<免疫原の調製および抗血清の作製>

0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)中で、牛血清アルブミン(BSA) 0.2gに対し0.05gのS-アセチルメルカプト無水コハク酸を反応させ、セファデックスG-75を用いて精製後、凍結乾燥した。その10mgを0.1Mヒドロキシルアミン溶液0.2mlに溶解し、室温で30分間静置した。一方、0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.0)-テトラヒドロフラン混液中で7.15mgのGHK-Cu²⁺に1.08mgのN-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)を反応させた後、窒素ガスを通じてテトラヒドロフランを除き、さらに、ジエチルエーテル抽出により未反応のEMCSを取り除いた。これを先のメルカプト基の導入されたBSAの溶液に加え、室温で30分間反応させた。透析により未反応の試薬を取り除いたもの

*所在地：大阪府高槻市奈佐原4-20-1 (〒569-1094)

を免疫原とした。常法に従い、フロイトのアジュバンドを用い免疫原溶液をマウスおよび家兎に投与して抗血清を得た。

< EIA >

Robinsの方法を参考にしてゼラチンにGHK-Cu²⁺を結合させた⁹⁾。このGHK-Cu²⁺担持ゼラチンを1/15Mトリス緩衝化生理食塩水(pH 7.4) (TBS)に10 μg/mlの濃度で溶解し、96穴マイクロタイタープレートに100 μlずつ分注して室温で一晩放置した。プレートを洗浄後、3%スキムミルクを含むTBSを200 μlずつ分注し、室温で1時間放置した。再びプレートを洗浄し、TBSで100倍に希釈したウサギ血清と検量線作製用GHK-Cu²⁺溶液または試料溶液を同時に分注して室温で2時間反応させた。ただし、*o*-フェナンスロリン処理血漿を試料とする場合は検量線作成時の標準についても*o*-フェナンスロリンを添加した。その後プレートをポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20[®]) を0.5%含むTBSで洗浄し、3,000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGやギ抗体溶液を100 μlずつ分注して室温で2時間放置した。再度プレートをTween 20[®]を0.5%含むTBSで洗浄した後、基質として過酸化水素、および発色剤として20 mg/mlのTMBZを含む0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 4.2) 20 mlを分注し酵素反応を行った。硫酸 (1→50) で反応を停止し、マイクロプレートリーダーにより450 nmにおける吸光度を測定した。

結果と考察

カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法およびマレイミド法による免疫原の調製を試みたが、カルボジイミド法およびグルタルアルデヒド法においてはGHK-Cu²⁺に架橋試薬を加えるとGHK-Cu²⁺に認められる600 nm付近の可視吸収帯が消失した。さらに、グルタルアルデヒド法では原子吸光光度法による測定の結果、BSA 1分子あたり1個の銅原子しか存在していないことが明らかとなった。このように、これらの場合、架橋試薬を反応させるとGHK-Cu²⁺錯体の安定性が低下し、銅を保持した状態でGHK-Cu²⁺をBSAと結合させることはできないものと考えられた。一方、マレイミド法ではGHK-Cu²⁺にEMCSを反応させた場合、GHK-Cu²⁺の場合と同様に600 nm付近に極大吸収を有する可視吸収スペクトルが得られた (Fig. 1)。また、HPLCを用いて検討した結果、GHK-Cu²⁺はEMCSと反応し、さらに、この反応生成物はシステインの添加により別の化合物へと変化することが明らかとなった。このことから、この方法によってGHK-Cu²⁺にメルカプト基と反応できるマレイミド基が導入されたことが示唆された。実際にメルカプ

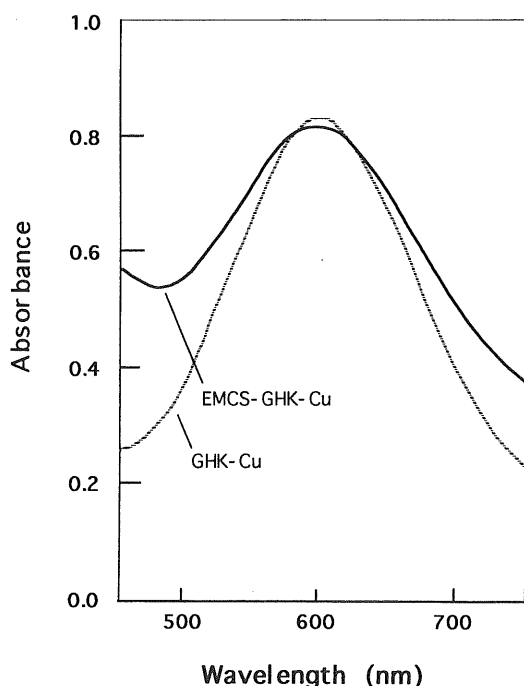


Fig. 1 Visible spectra of GHK-Cu²⁺ solution and the reaction mixture of EMCS and GHK-Cu²⁺. GHK-Cu²⁺ solution; 5.0 mg/ml in water; reaction mixture; EMCS (4.7 mg/ml) and GHK-Cu²⁺ (5.4 mg/ml) in reaction medium (0.1 M phosphate buffer, pH 6.0; tetrahydrofuran = 3 : 1) after 17 hours.

ト基を導入したアルブミンとの反応を試みたところ、その反応液はGHK-Cu²⁺に特徴的な600 nm付近の可視吸収帯を有しており、この複合体中においてもGHKは銅(II)イオンと結合していると考えられた。さらに、原子吸光度法により複合体中の銅含量の測定を行ったところBSA 1分子当たり約5個の銅原子が結合していた。また、アミノ酸分析による複合体中のGly, His, Lys数の測定を行ったところBSA上に約5分子のGHKが結合していた。以上の結果から、GHK-Cu²⁺が銅(II)イオンを保持したままBSAに結合していることがほぼ確認でき、マレイミド法においてのみ本研究に用いることのできる免疫原が得られるものと考えられた。

マウス4匹に免疫したところ3回目投与後、1匹のマウスでGHK-Cu²⁺を認識する抗体が産生されていることが確認された。同様にウサギについては10羽に免疫したところ2羽において同様の結果が得られた。マウスにおいてもウサギにおいても抗体の産生が認められたことから、BSA-GHK-Cu²⁺を免疫原とする本法はGHK-Cu²⁺に対する抗体を作製するための有効な手法であることが確認された。しかしながら、抗体産生の効率が高いとは言えず、抗原性決定基としてのGHK-Cu²⁺は長鎖のポリペプチド等と比べると免疫システムに認識されにくいと考えられた。これはGHKが短鎖ペプチドであり、また、GHK-Cu²⁺錯体は比較的安定な錯体を形成するものの、生体内においてペプチダーゼ等の様々な因子により分解することによるのではないかと考えられた¹⁰⁾。

EIAによるGHK-Cu²⁺に対する検量線、およびGHK、塩化第二銅を競合させた場合の吸光度変化をFig. 2に示した。GHK-Cu²⁺に対する検量線の測定可能な範囲は約 1×10^{-5} M ~ 8×10^{-7} Mであった。また、競合物質を含まない場合の吸光度を50%低下させる濃度についてはGHK-Cu²⁺、GHKではそれぞれ 3×10^{-6} M、 9×10^{-6} Mであり、塩化第二銅については、競合反応は見られなかった。また、得られた抗体はGHKをも認識するものの、その認識能はGHK-Cu²⁺に対してよりも低かった。

ラット血漿にGHK-Cu²⁺を添加した場合の結果をTable 1に示した。また、ラット血漿にGHKを添加した場合の結果をTable 2に示した。

血漿にGHK-Cu²⁺を添加した場合の検出量は添加量に対して11~24%と著しく低い値であった。また、GHKを添加した場合についてはより低い回収率しか得られなかった。一方、希釈血漿にGHK-Cu²⁺、GHKを添加した場合やo-フェナンスロリンで前処理した血漿にGHK-Cu²⁺を添加した場合、いずれも回収率が大きく改善された。このことから、血漿中でのGHK-Cu²⁺やGHKに対する認識が見かけ上低下したのは、抗体の性質によるものではなく、Endoらによって指摘されている血漿中メタロプロテアーゼによるGHKの分解によるものではないかと考えられた¹⁰⁾。つまり、希釈によるメタロプロテアーゼ濃度の低下やo-フェナンスロリンの前処理によるメタロプロテアーゼの活性の阻害に

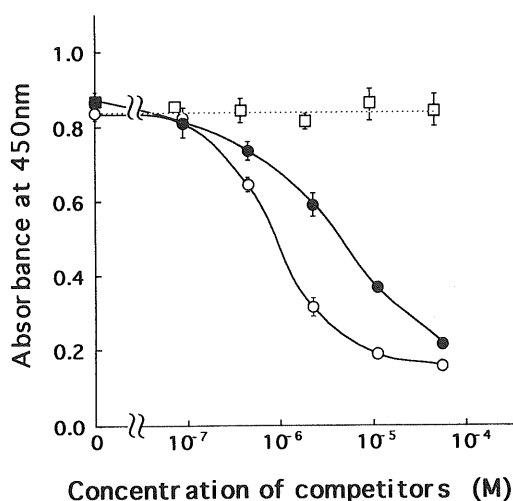


Fig. 2 Calibration curve for GHK-Cu²⁺ and effects of GHK and Cu²⁺ on EIA method. 0-10⁻⁴M of GHK-Cu²⁺ (○), GHK (●) and Cu²⁺ (□).

Table 1 Recoveries of GHK-Cu from rat plasma with or without treatment

Sample	Added ($\times 10^{-6}$ M)	Found ($\times 10^{-6}$ M)	Recovery (%)	C.V. (%)
Untreated plasma	20	2.2	11	—
	10	1.6	16	—
	5	1.2	24	—
	2.5	0.6	24	—
Diluted plasma	20	21.8 \pm 3.9	109	17.9
	5	5.8 \pm 1.5	116	25.6
	2.5	3.9 \pm 0.4	156	10.6
o-phenanthroline treated plasma	20	15.7 \pm 2.1	79	13.3
	10	10.0 \pm 1.0	100	10.0
	5	7.3 \pm 2.5	146	34.3
	2.5	3.0 \pm 1.0	120	33.3

Table 2 Recoveries of GHK from rat plasma with or without treatment

Sample	Added ($\times 10^{-6}$ M)	Found ($\times 10^{-6}$ M)	Recovery (%)	C.V. (%)
Untreated plasma	20	1.2	6	—
	10	0.5	5	—
	5	0.4	8	—
	2.5	0.2	8	—
Diluted plasma	20	20.2 \pm 2.9	101	14.6
	10	10.3 \pm 2.1	103	20.1
	5	5.1 \pm 0.6	102	10.8

より、試料中のGHKの分解が抑制され、比較的良好な回収率が得られたものと考えられた。また、血漿中においてはGHKよりもGHK-Cu²⁺の方が安定である可能性も示唆された。

これらの結果から、今回得られた抗体はGHK-Cu²⁺のみだけでなくGHKも認識する能力を持つこと、また、生体試料中のGHK-Cu²⁺も認識できることが明らかとなった。

参考文献

- 1) Pickart, L., and Thaler, M.M. (1973) *Nature. New Biol.* 243: 85.
- 2) Pickart L., Thaler M.M. (1980) *J Cell Physiol.* 102: 129.
- 3) Pickart L., Freedman J.H., Loker W.J., Peisach J., Perkins C.M., Stenkamp R.E., Weinstein B. (1980) *Nature* 288: 715.
- 4) Pickart L. (1981) *In Vitro* 17: 459.
- 5) Grosse G., Lindner G. (1980) *Folia Morphol. (Praha).* 28: 345.
- 6) Raju K.S., Alessandri G., Ziche M., Gullino P.M. (1982) *J. Natl. Cancer Inst.* 69: 1183.
- 7) Lane T.F., Iruela-Arispe M.L., Johnson R.S., Sage E.H. (1994) *J. Cell Biol.* 125: 929.
- 8) Maquart F.X., Bellon G., Chaqour B., Wegrowski J., Patt L.M., Trachy R.E., Monboisse J.C., Chastang F., Birembaut P., Gillery P. (1993) *J. Clin. Invest.* 92: 2368.
- 9) Robins S.P. (1982) *Biochem. J.* 207: 617.
- 10) Endo T., Miyagi M., Ujiie A. (1997) *J. Chromatogr. A* 692: 37.