

レクチンを用いた新規 HbA_{1c} 測定方法の開発

J-オイルミルズ 小林 夕香

日大生産工(院) 加畑 真人
J-オイルミルズ 上野 泰日大生産工 長谷 英理菜
日大生産工 吉宗 一晃

1 緒言

糖尿病は血液中のグルコース濃度(血糖値)が高い状態が慢性的に続く疾患である。糖尿病患者数の増加は世界的な社会問題となっており、中国やインドを中心として2035年には約5億9,190万人まで達するといわれる^[1]。その中、我が国では予防医療に関わる環境整備が進み、一昨年から病院だけでなく薬局でも自己採血検査が実施できるようになった。今後も、かかりつけ医による往診の際や、患者自身が自宅で血液検査を実施するポイントオブケア診断(POCT)のニーズの高まりが予想される。これらのことから、従来よりも汎用性が高く安価に実施できる新規糖尿病診断方法の開発が求められている。

糖尿病診断のバイオマーカーとして、血液中のヘモグロビン A_{1c} (HbA_{1c}) 濃度が用いられる。HbA_{1c} は赤血球中のヘモグロビン (Hb) のβ鎖N末端バリン残基^[2]に血液中のグルコース1分子が結合した糖化ヘモグロビンの一種で、フルクトシル化して安定している。これは検査前の食生活の影響を受けず過去1~2か月の平均的な血糖レベルを反映する指標となる。現在HbA_{1c}はこれに特異的な抗体や酵素を用いて測定されているが、我々は抗体よりも安価で室温下における安定性が高いレクチンを血液中のHbA_{1c}と結合させ、その濃度を測定する方法の開発を試みている。

あらゆる生物種中に存在する糖結合性タンパク質であるレクチンは、これまでに約60種類が単離されている。そのうち30種のレクチンのHbA_{1c}との結合性をレクチンELISA法^[3]により調査したところ、ヒヨロチャワンタケ由来レクチン(AAL)がHbA_{1c}と結合し、他のHbとは結合しないことがわかった^[4](図1)。このことから、AALはHbA_{1c}のフルクトシルバリンを認識することが示唆された。本発表では、これを受けて確認した抗HbA_{1c}抗体や単糖による結合阻害の有無から、レク

チンとHbA_{1c}の結合様式について考察したので報告する。また、レクチンによるHbA_{1c}測定の温度との関係も併せて紹介する。

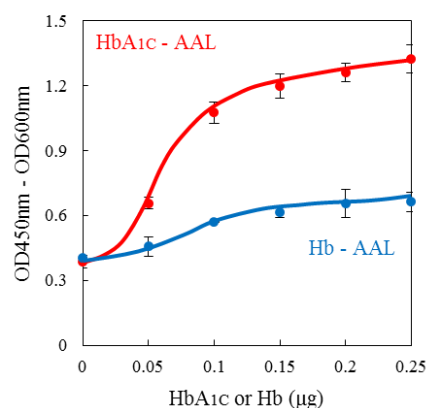


図1 AALとHbA_{1c}およびHbとの結合
〔縦軸は吸光度を表し結合の度合を示す〕
〔横軸はHbA_{1c}またはHbの濃度を表す〕

2 実験 (レクチンELISA法^[3])

HbA_{1c}中のグルコースとの結合部位を表出させるために、変性剤としてpH5.0-酢酸緩衝液で処理(30min)したHbA_{1c}をPBSで0~10μg/mLに希釈した。これをプレート上に固相化(90min)させ1%BSA/PBSでブロッキング(60min)した。つづいて、抗体による結合阻害を確認する際は10μg/mL抗HbA_{1c}モノクローナル抗体/PBSを吸着させた(60min)。さらに10mMの単糖と結合させた5μg/mLビオチン化レクチンAALを4℃下で吸着させた(30min)。この際、レクチンとHbA_{1c}の結合に対する温度による影響を調べるために25℃、37℃下でも同様の操作を行った。その後、5μg/mL High Sensitivity Streptavidin-HRPを加えてビオチン化レクチンと結合させ(30min)、TMB Peroxidase substrate systemにより基質を発色させた(3min)。最後に2M-硫酸を加え発色を停止し、吸光度(450nm測定値と600nm測定値の差)を測定した。

A novel method for measuring hemoglobin A_{1c} using lectin

Masato KABATA, Erina HASE,
Yuka KOBAYASHI, Yasushi UENO, and Kazuaki YOSHIMUNE

3 実験結果

3-1 温度との関係

レクチンと糖鎖との親和性は一般に室温よりも低温下で高い。そのため AAL と HbA1c との温度依存性を調べるために、レクチン ELISA の操作を 37℃、25℃、4℃で行ったところ、低温下であるほど標準偏差が小さくなり、特に 4℃下でより正確な測定が可能であることがわかった (表 1)。レクチンと糖鎖の結合には水分子が必要な場合が多く、水分子とレクチンの結合が安定な低温において糖鎖とレクチンとの親和性が高まると考えられた。

表 1 AAL と HbA1C の結合への温度の影響

Temp. (°C)	Average C.V. (%)
4	5.1
25	9.7
37	13.8

3-2 抗 HbA1c 抗体による結合阻害

HbA1c に存在する AAL と結合する部位を検討するために、モノクローナル抗体をあらかじめ HbA1c に結合させておき、AAL との結合の有無を確かめた。その結果、AAL と HbA1c の結合は抗体によって大きく阻害された (図 2)。この抗体は HbA1c の糖化した β 鎖 N 末端のグルコースに結合するため、AAL が抗体のエピトープと同様の領域を認識していることが示唆された。

3-3 糖による結合阻害

AAL に存在する HbA1c との結合部位を検討するために、AAL と糖鎖の結合を阻害するフコースや、他の単糖を添加した⁵⁾。AAL とフコースを含む糖鎖との結合は単糖のフコースを添加することで阻害されることが知られており、本実験でも 10mM フコースによる阻害を確認した。また、10mM のグルコース、D 及び L-フコースを添加した場合でも阻害が生じ、特に D-フルクトースを添加した場合に大きな阻害が見られた (図 3)。

Hb に結合したグルコースのほとんどはピラノース環であることが知られている。本実験で阻害を確認した糖は、いずれもそのグルコースと水酸基の位置が同じである。このことから、AAL と糖鎖の結合は類似した構造をもつ種々の単糖によって同様に阻害されることが示唆された。そして、AAL は L-フコースだけでなく、HbA1c の β 鎖 N 末端のフルクトシルバリンとも結合すると考えられた。

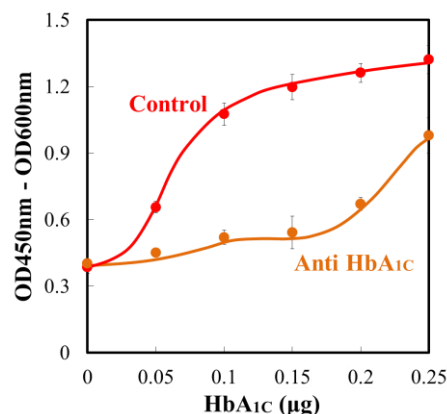


図 2 抗 HbA1C 抗体による結合阻害

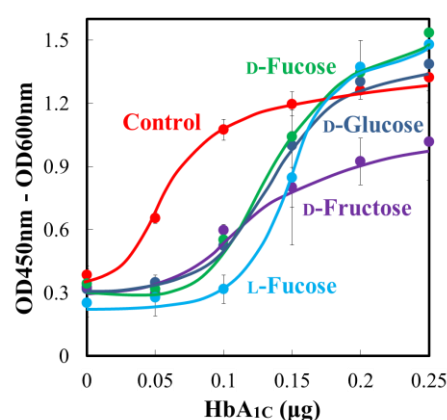


図 3 各種糖による結合阻害

4 まとめ

本測定法は、レクチンを HbA1c と結合させ、その濃度を測定する方法である。レクチン ELISA 法を用いた実験によって、AAL が HbA1c 濃度の測定に利用可能であることを示した。また、本測定時には低温 (4℃) を維持する必要があることが分かった。さらに、HbA1c に対する抗体と各種単糖による結合阻害の有無を調べた実験から、AAL が HbA1c の β 鎖 N 末端を認識して結合することが示唆された。

5 参考文献

- [1] International Diabetes Federation, *DIABETES ATLAS Sixth edition*, 11-12 (2014)
- [2] Akane Sakaguchi et al., *Biochem. Biophys. Res. commun.*, **336**(4), 1074-1080 (2005)
- [3] Shuxin Shang et al., *Discov Med*, **113**, 15-23 (2016)
- [4] 木村晃太, 日本大学生産工学部応用分子化学科 卒業論文, 24 (2014)
- [5] Koh Amano et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**(5), 967-970 (2012)