

製品コード MK412

研究用

TAKARA

**Heparan Degrading Enzyme
Assay Kit**

説明書

v201708Da

ヘパラン硫酸（ヘパラチン硫酸とも呼ばれる）は、D- グルコサミン、D- グルクロン酸、L- イズロン酸を構成糖とする多糖の *N*- アセチル、*N*- 硫酸および *O*- 硫酸置換体から成り立っています。¹⁾ヘパリンと類似していますが、それより硫酸基、L-イズロン酸、*N*-スルホグルコサミンの含量が低く、構成糖の量比や分子量がかなり異なった混合物として分離されることがあります。哺乳類に普遍的に存在する多糖で、肺、肝、腎、脾、脳、大動脈などから、タンパク質と結合したプロテオグリカンの形で細胞膜成分として分布しています。主な機能としては、毛細血管内皮細胞表面におけるリポタンパク質リパーゼのアンカーの役割や、細胞の特異性発現、増殖の調節、相互認識、細胞浸潤の防護、細胞間接着などへの関与があげられますが、ヘパリンと異なり抗血液凝固活性はありません。

ヘパラン硫酸の持つ浸潤性および炎症性細胞の侵入に対する防護的役割はたいへん重要です。浸潤度の高いガン細胞の持つヘパラン硫酸分解酵素活性は浸潤度の低い細胞に比べ、かなり高いという報告があります。²⁾一般に“ヘパラーゼ”と称しているヘパラン硫酸分解酵素は、ヘパラン硫酸の β -D-glucuronosyl-*N*-acetylglucosaminyl 結合を特異的に切断するエンド β -D- グルクロニダーゼで、哺乳類の肝、脾、皮膚、胎盤、や血小板でその活性が認められています。また、メラノーマ、リンパ腫、サルコーマ、線維肉腫、結腸癌、といったような腫瘍組織でその活性が報告されており、ガン細胞の悪性度との相関について研究なされてきています。^{3,4)}

従来、バクテリア (*Flavobacterium Heparinum*) 由来のヘパラン硫酸分解酵素として、ヘパリチナーゼが知られていますが、ヘパリチナーゼはヘパラン硫酸の α -*N*- アセチル/スルフォ -D- グルコサミニド結合をあずかるウロン酸のアルコール基を脱離反応的に切断するため、哺乳類のヘパラーゼとは区別されています。⁵⁾

1998 年、オーストラリアの Freeman らはヒト血小板から酵素を単離精製し、⁶⁾ その翌 1999 年、彼らや他の 3 グループによって、ほぼ同時期に独立してヒトをはじめ、マウス、ラットのヘパラーゼのクローニングがなされ、全アミノ酸配列が解明されました。⁷⁻¹⁰⁾

ヘパラーゼは 65 kDa の前駆体として産生され、*N* 末端より 157 番目と 158 番目の間でプロセッシングをうけて 50 kDa の分子となると、その活性はもとの約 100 倍に上昇するとの報告⁹⁾ もあり、また *N* 末端から 157 番目までの分子と 50 kDa 分子とのヘテロダイマー構造が活性に必要なとする報告もあります。¹¹⁾

転移性の高いガンと非転移性のガンをそれぞれ移植されたラットでは血清中のヘパラーゼの活性量が移植後の日数がたつにつれて、転移性ガンを移植されたラット血清で著しく増加したという報告もあります。¹²⁾ mRNA レベルでみた場合でも、転移・浸潤性の高いガン細胞にヘパラーゼの過剰発現の傾向がみられるといえます。しかし、ヘパラーゼの活性発現が、プロセッシングを受けることで増加するため、mRNA 量と活性量との相関は必ずしも一致するとは限らないようです。

ヘパラン硫酸分解酵素活性の活性測定法として、これまで次のような方法が用いられてきました。

- (1) [³⁵S] ラベルしたヘパラン硫酸を基質として反応後、Sephacryl S- 200 でゲルろ過し、低分子画分の放射能を調べる方法。⁴⁾
- (2) [³H] ラベルしたヘパラン硫酸を基質として反応後、未分解のヘパラン硫酸が HRG (ヒスチジンリッチグリコプロテイン) に結合し、分解物は結合しない性質を利用して、分解物に由来する放射能のみ測定する方法。¹³⁾

いずれの方法もラジオアイソトープを使用するという制限があることや大量のサンプルを処理できないこと、あるいは HRG を使用する系では、血清中のウシ HRG の妨害があるため細胞の血清培養上清をサンプルとできないなど、いくつかの不都合があります。

一方、酵素活性とは別な分野で、ヘパリン様分子が bFGF (塩基性繊維芽細胞増殖因子) とが結合するという特性を利用して、ヘパラン硫酸やヘパリン様分子と FGF の相互作用を数値化する測定系が報告されました。¹⁴⁾ヘパラン硫酸がヘパラン硫酸分解酵素によって分解されると、bFGF との結合性が失われます。したがって、ヘパラン硫酸を基質として、サンプル添加と無添加 (対照) の 2 つの条件で反応を行った後、bFGF に結合した未分解ヘパラン硫酸の量を比較定量すれば、サンプル中のヘパラン硫酸分解酵素の活性を測定することができます。

本キットは、この原理を利用してヘパラン硫酸分解酵素の活性を non-RI で、大量スクリーニング可能な測定系として構築しました。特徴として、独自に構築した CBD-FGF によるドメイン指向性固定法 (Domain Oriented Capture : DOC 法) を使用していることがあげられます。CBD-FGF はヒトフィブロネクチン細胞結合ドメインタンパク質とヒト繊維芽細胞増殖因子の融合タンパク質です¹⁵⁾ (特許登録番号第 2829405 号)。この CBD-FGF タンパク質を CBD 部分にエピトープを有する抗フィブロネクチン抗体¹⁶⁾ によって捕捉し、固相プレートに結合させています。DOC 法は、bFGF がヘパラン硫酸と結合する上で最も自然な立体構造を保持することを可能にした固相法です。さらに、ヘパラン硫酸のビオチン化物を酵素の基質として使用し、未分解のビオチン化ヘパラン硫酸のみ CBD-FGF に結合できることから、残存ビオチン化ヘパラン硫酸をアビジン化ペルオキシダーゼで検出することで高感度、non-RI 測定を実現しました。

一連の測定にかかる時間は酵素分解反応を 45 分実施した場合、約 100 分となります。微弱な活性は程度に応じて酵素分解反応の時間を延長することで検出可能となります。

がんの浸潤性とヘパラン硫酸分解酵素の相関性が注目されていることから、そのインヒビタースクリーニングにも本キットは有用です。

I. 測定原理

- A. 抗体を介して CBD-FGF タンパク質が 96 ウェルマイクロタイタープレートに固定されている。
 - B. 別の容器 (96 ウェルプレート) でビオチン化したヘパラン硫酸と酵素活性を測定するサンプルを反応緩衝液中で反応させる。反応後、上記 CBD-FGF 固定化 96 ウェルマイクロタイタープレートに反応液を投入する。
 - C. 洗浄後、CBD-FGF に結合し残存している未分解のビオチン化ヘパラン硫酸に、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させる。
 - D. 洗浄後、基質 TMBZ を反応させ、吸光度の減少で活性を可視化する。
- ※ 使用する反応緩衝液中にはプロテアーゼインヒビターやグルクロニダーゼのインヒビターが含まれており、非特異的な分解は抑えられている。また、酵素が働きやすい最適条件に設定している。

II. キットの内容

(1) CBD-FGF 固相化 96 ウェル分離型マイクロタイタープレート CBD-FGF immobilized microtiterplate (96 well: 8 well × 12 strips)	1 plate
(2) ビオチン化ヘパラン硫酸 (ラベル化基質) (凍結乾燥品) biotinylated heparan sulfate in reaction buffer	5.5 ml 用
(3) 希釈用反応緩衝液 reaction buffer for dilution	11 ml
(4) 細胞抽出用緩衝液 extraction buffer	11 ml
(5) 活性標準品 standard (活性はロットごとに記載)	250 µl 用
(6) ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン avidin POD conjugate	11 ml 用
(7) 発色基質 POD substrate	12 ml

III. 保存

4℃

IV. キット以外に必要な試薬や器具 (主なもの)

- Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
洗浄液成分 (10 × PBS; 50 ml × 5 本, Tween 20; 3 ml) と反応停止液 (60 ml) * のセットです。
* : 本品は、1N 硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液です。
- 反応停止液として 1N 硫酸も使用できます。
1N 硫酸の取扱いには充分にご注意ください。
<ご注意> 1N 硫酸は腐食性があり、皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。手や粘膜についた場合は、ただちに多量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
- ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- マイクロプレートリーダー (450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの)

V. 使用目的

培養細胞および組織中、または血液中のヘパラン硫酸分解酵素活性を DOC 法により測定します。また DOC 法により、bFGF とヘパリン様物質の結合反応を利用した測定原理ですので、bFGF とヘパリン様物質やその他の親和性物質の相互作用の研究に応用できます。96 ウェルプレートを用いるため、多数の検体処理に適しています。活性測定キットであるため、酵素の由来動物は問わず、どんな動物組織、細胞、血清でも使用できます。

VI. 使用方法

1. 試薬の調製

- CBD-FGF 固相化プレート (1)、希釈用反応緩衝液 (3)、細胞抽出用緩衝液 (4)、発色基質 (7) そのまま使用する。
- ビオチン化ヘパラン硫酸 (ラベル化基質) (2)
1 バイアル全量を 5.5 ml の蒸留水に溶解する。1 バイアルは 96 ウェル分に相当する。
1 ウェルあたり 50 μ l 使用する。
溶解液は - 80°C で 3 週間は保存可能である。
- 活性標準品 (5)
1 バイアル全量を 250 μ l の蒸留水で溶解する。溶解液を希釈用反応緩衝液 (3) で 2 倍希釈物を最高濃度として段階希釈系列を作製する。標準品の活性はロットごとに異なるので、測定ごとに検量線を作成する。0 濃度は反応緩衝液を用いる。希釈した標準品は保存できないが、希釈前の溶解液のままであれば、- 80°C で 3 週間は保存可能である。
注意：必ず活性の定義および標準品内容について P.9 を参照してください。
- ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (6)
1 バイアル全量を 11 ml の蒸留水で溶解する。一度に使いきらない場合は - 20°C 以下に凍結保存する。この状態で 3 週間は安定である。凍結融解の繰り返しは避けること。
- 発色基質 (7)
使用前に室温に戻してそのまま使用する。使用前にすでに濃い青色に変色していないことを確認する。金属イオンと接触すると呈色するおそれがあるので注意する。
数回に分けて使用する場合は予め必要量を取り分けて使用する。
- 反応停止液 (Stop Solution) *
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の Stop Solution をそのまま用いる。
*：粘度の高い溶液であるため、投入後プレートミキサー等で十分に攪拌してください。
- 洗浄用 0.1% Tween 20 含有 PBS
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の 10 \times PBS 1 本 (50 ml) を蒸留水で 500 ml に希釈し、さらに Tween 20 を 500 μ l 添加する。十分に混合後、洗浄用バッファー (0.1% Tween 20/PBS) として使用する。

2. サンプルの調製方法

- 浮遊細胞の場合
1 \sim 5 \times 10⁶ 細胞を PBS で洗浄後、ペレットとして細胞を回収する。この細胞ペレットに 1 ml の細胞抽出用緩衝液 (4) を加え、軽くボルテックスミキサーにかけ懸濁する。14,500 rpm (10,000 \times g) で 4°C 5 分間遠心分離し、上清をサンプルとする。
- 接着培養細胞の場合
直径 9 cm の培養シャーレで培養した細胞 (1 \sim 5 \times 10⁶) から培養上清を取り除き、PBS で一度細胞が接着しているシャーレを洗浄後、1 ml の細胞抽出用緩衝液 (4) を加え、ラバーポリスマンを使って細胞をマイクロチューブに回収する。14,500 rpm (10,000 \times g) で 4°C 5 分間遠心分離し、上清をサンプルとする。
- 96 ウェル培養プレートの場合
96 ウェル培養プレートからの細胞の回収は、培養上清を除いた後に、細胞抽出用緩衝液 (4) を 50 \sim 100 μ l を加え、ピペッティングにより細胞をはがし、可能であれば遠心を行う。(14,500 rpm) 大量サンプル処理で遠心が不可能であれば、懸濁状態のままでもよい。

・血小板の場合

血小板を遠心で沈査として集め、適当量の細胞抽出用緩衝液(4)で懸濁する。14,500 rpm (10,000 × g) で4℃ 5分間遠心分離し、上清をサンプルとする。血小板を含む血漿の場合は等量の細胞抽出用緩衝液と混合、懸濁し、不溶物があれば遠心除去する。

抽出したサンプルを反応緩衝液(3)と1:1に混合し(2倍希釈物となる)測定する。いずれの場合も調製後はすみやかに測定することが望ましいが、やむを得ず保存する場合は-80℃で2週間を限度とする。

注意：調製された測定用サンプル中にFGFとヘパラン硫酸の結合を妨害する物質が含まれる場合、酵素活性と結合阻害活性との区別がつきにくい場合があります。

3. 操作方法

1. 各濃度に希釈した活性標準品と上記のように調製した測定サンプル(いずれも反応緩衝液で2倍されたものになっているが必要な場合はさらに希釈する)をあらかじめ別の96ウェルプレートか、もしくはマイクロチューブに50 μl/wellずつ加える。
2. 蒸留水5.5 mlで溶解したビオチン化ヘパラン硫酸(ラベル化基質)(2)を、8連ピペット等を用いて、活性標準品や測定サンプルを加えてある96ウェルプレート、もしくはマイクロチューブに50 μl/wellずつ添加し、37℃で45分インキュベートする。(活性標準品は反応時間45分用に濃度設定している。測定サンプルの活性が微弱と予想される場合は、定性的には数時間に延長して検出してもよい。)

ヘパラン硫酸分解反応

3. インキュベートを終えたビオチン化ヘパラン硫酸(ラベル化基質)と測定サンプルの混合物をキットに梱包されているCBD-FGF固定化プレートに8連ピペット等を用いて、90 μl/wellずつ加える。(液の移し換えなどで液量が不足している場合はすべてのサンプル・標準品の投入液量を統一することで問題はない。)37℃で15分インキュベートする。

未分解ヘパラン硫酸結合反応

4. 反応液を捨て、各ウェルを洗浄用緩衝液(0.1% Tween 20/PBS)で3回洗浄する。8連ピペット等を用いて、溶解したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(6)を100 μlずつ加え、37℃で30分インキュベートする。

ビオチン・アビジン結合反応

5. 反応液を捨て、各ウェルを洗浄用緩衝液(0.1% Tween 20/PBS)で3回洗浄する。8連ピペット等を用いて、基質液(7)を100 μlずつ加え、室温で5~15分間発色させる。反応は室温の影響を受けるので、発色が過剰にならないように、時間に注意する。

ペルオキシダーゼ呈色反応

6. 基質液を加えた順番で、各ウェルに反応停止液*を100 μlずつ加え反応を停止させ、よく混和する。
*：反応停止液は、粘度の高い溶液であるため、添加後プレートミキサー等で充分混合してください。
7. 蒸留水を対照としてマイクロプレートリーダーのゼロ調節を行った後、波長450 nmで各ウェルの吸光度を測定する。発色は反応停止後、1時間まで安定である。
8. 活性標準品を用いて検量線を作成する場合は、グラフ用紙の横軸に各酵素活性単位を、縦軸にそれに対応する吸光度をプロットする。この検量線を利用して、サンプルの吸光度から対応する酵素活性単位を算出する。

VII. 性能

1. 検出感度

0.1 U/ml 以上

2. 測定範囲

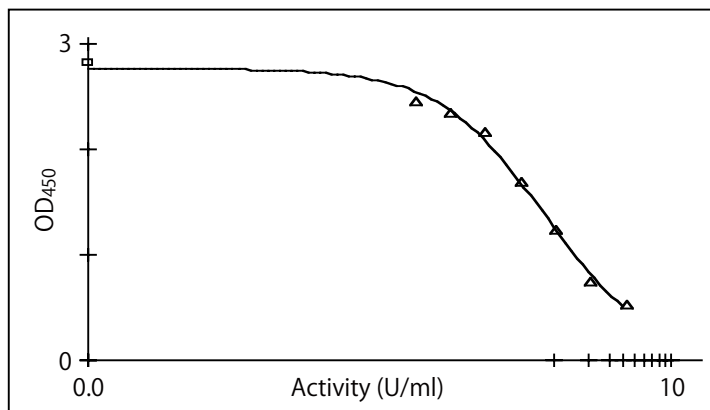
典型的な検量線の例を以下に示す。しかし、検量線は測定ごとに作成しなければならない。

Curve Fit : 4-Parameter

Corr. Coeff : 0.997

$$y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

$$A = 2.77 \quad B = 0.965 \quad C = 0.827 \quad D = 0.0241$$



Activity (U/ml)	4.20	2.10	1.05	0.525	0.262	0.131	0.065	0.00
OD ₄₅₀	0.542	0.748	1.242	1.702	2.173	2.360	2.459	2.822

3. 再現性

同時再現性

3種類の細胞抽出物を用いて同時再現性試験を実施した。

検体 (n=8)	Average (U/ml)	SD	CV (%)
Sample A	0.764	0.044	5.8
Sample B	1.158	0.041	3.5
Sample C	1.708	0.052	3.1

VIII. 測定に関する基本資料

1. CBD-FGF 固定化プレート (DOC 法)

CBD (フィブロネクチン細胞結合ドメイン) に対するモノクローナル抗体で CBD 部分を保持し、FGF 部分を自由度の高い状態で固相プレートに存在させているため、FGF を直接プレートに結合させるより高感度に未分解のヘパラン硫酸を捕捉・検出できます。

2. ビオチン化ヘパラン硫酸

ウシ腎臓より高純度に精製されたヘパラン硫酸を *N*-hydroxysuccinimidobiotin によりビオチン化したもので、ヘパラン硫酸分解酵素の基質として用いています。反応緩衝液で反応に最適用量を凍結乾燥しています。

3. 活性標準品

本来、活性標準品には精製酵素もしくは細胞抽出粗酵素を用いるべきですが、本酵素活性は非常に不安定で長期間の保存に耐えられません。そのため、本キットでは血小板由来ヘパラン分解酵素活性画分による 37°C 45 分間の分解反応を実施した時に示される酵素活性とほぼ等しい検量線になるように、未標識のヘパラン硫酸を代替標準品として調製しています。

キット中の活性標準品を指標に異なる日に、複数回測定され、その結果を比較される時は、必ず反応温度 37°C、分解反応時間 45 分で実施してください。

1 Unit は pH5.8、37°C で 1 分間に 0.063 ng のビオチン化ヘパラン硫酸を分解できる活性量をあらわします。

4. 共存物質の影響

本キットは DOC 法による CBD-FGF とヘパラン硫酸との結合親和性を利用した測定法であるため、系の中に FGF と強い親和性のある物質が存在すると、未消化のビオチン化ヘパラン硫酸が結合できず全く発色しません。インヒビタースクリーニング等で、添加因子を系に加える場合はあらかじめ妨害がないかを確かめてください。

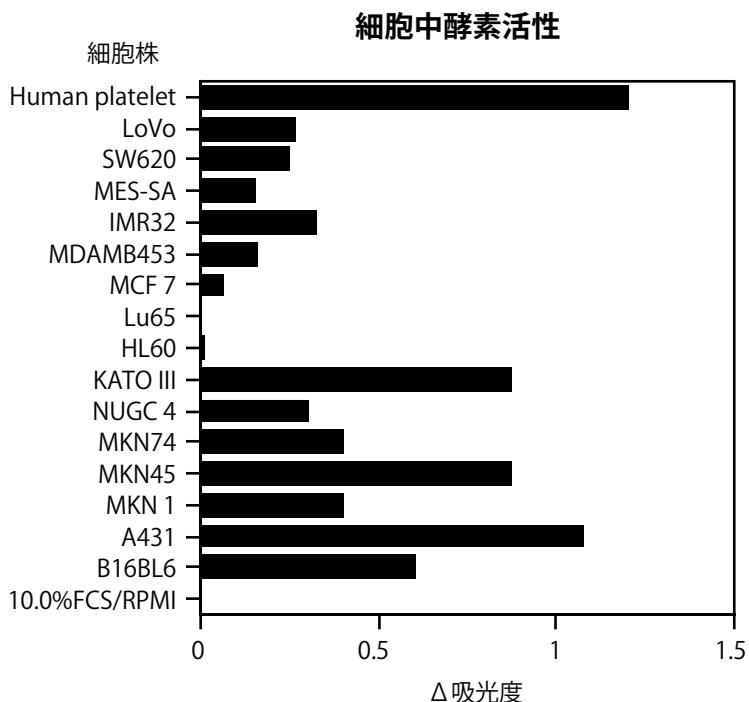
方法は、測定サンプルの代わりに添加因子だけをビオチン化ヘパラン硫酸とインキュベートし、CBD-FGF 固定化プレートに投入して、無添加と変わらないことを調べることでわかります。一方、この妨害作用を逆に利用して、FGF との親和性物質のスクリーニングおよびその相互作用の研究にも本キットは利用できます。

これまでに本キット用いて検討した共存物質の影響を以下に示します。

FGF と相互作用するもの	FGF と相互作用しないもの
デキストラン硫酸 コンドロイチン硫酸 B カラギナン Iota、κ、λ	コンドロイチン硫酸 A コンドロイチン硫酸 C コンドロイチン硫酸 D ケラタン硫酸 プルラン ガラクトン Suramin ¹⁷⁾

IX. 測定使用例

各種培養細胞抽出液中のヘパラン硫酸分解酵素活性を本キットで測定した。各細胞 (5×10^6 cell) を 1 ml の細胞抽出用緩衝液で処理し、そのうち 1 ウェルあたり 50 μ l を測定に使用した。活性は吸光度の減少量で表している。



LoVo	ヒト結腸線癌
SW620	ヒト結腸線癌
MES-SA	ヒト子宮癌
IMR32	ヒト神経芽腫
MDAMB453	ヒト乳癌
MCF7	ヒト乳癌
Lu65	ヒト肺癌
HL60	ヒト白血病細胞
KATOIII	ヒト胃癌 (印環細胞癌)
NUGC4	ヒト胃癌 (印環細胞癌)
MKN74	ヒト胃癌 (中分化型管状腺癌)
MKN45	ヒト胃癌 (低分化型充実型腺癌)
MKN1	ヒト胃癌 (扁平上皮型腺癌)
A431	ヒト類表皮癌
B16BL6	マウス黒色腫

X. 参考文献

- 1) Dietrich C. P., *et al. Biochem Biophys Res Comm.* (1983) **111**: 865-871.
- 2) Nakajima M., *et al. Nature.* (1983) **220**: 611-613.
- 3) Nakajima M., *et al. J Biol Chem.* (1984) **259**: 2283-2290.
- 4) Ricoveri W., *et al. Cancer Res.* (1986) **46**: 3855-3861.
- 5) Nakajima M., *et al. J Cell Biol.* (1988) **36**: 157-167.
- 6) Freeman C., *et al. Biochem J.* (1998) **330**: 1341-1350.
- 7) Freeman C., *et al. Nature Medicine.* (1999) **5**: 803-809.
- 8) Vlodavsky I., *et al. Nature Medicine.* (1999) **5**: 793-802.
- 9) Nakajima M., *et al. J Biol Chem.* (1999) **274**: 24153-24160.
- 10) Kussie P. H., *et al. Biochem Biophys Res Comm.* (1999) **261**: 183- 187.
- 11) Fairbanks M. B., *et al. J Biol Chem.* (1999) **274**: 29587-29590.
- 12) Nicolson G. H., *et al. Advan Enzyme Regul.* (1998) **38**: 19-32.
- 13) Freeman C., *et al. Biochem J.* (1997) **325**: 229-237.
- 14) Foxall C., *et al. Anal Biochem.* (1995) **231**: 366-373.
- 15) Hashi H., *et al. Cell Struct Funct.* (1994) **19**: 37-47.
- 16) Katayama M., *et al. Exp Cell Res.* (1989) **185**: 229-236.
- 17) Nakajima M., *et al. J Biol Chem.* (1991) **266**: 9661-9666.

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社