

Title	Heterogeneity of Hanganutziu-Deicher Antigen Glycoproteins in Different Species Animal Sera
Author(s)	王, 大慶
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37533
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	おん 王	だー 大	ちん 慶
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	9 3 7 6	号
学位授与の日付	平成 2 年 10 月 5 日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	Heterogeneity of Hanganutziu-Deicher Antigen Glycoproteins in Different Species Animal Sera (動物血清におけるハンガニツウ・ダイハー抗原糖蛋白の多 様性について)		
論文審査委員	(主査)	教授	栗村 敬
	(副査)	教授	羽倉 明 教授 上田 重晴

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

Hanganutziu と Deicher は、1920年代に血清療法を受けた患者の血清中に、ヒツジやウシの赤血球を凝集する抗体を見出した。この抗体はHanganutziu-Deicher (HD) 抗体と命名され、Forssman抗体、Paul-Bunnell 抗体とともに、異好性抗体の一つに数えられている。さらに近年本抗体の認識する抗原が、N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) を有する複合糖質であることが明らかになった。本抗原は、ヒト、ニワトリの正常個体に欠損しており、ヒトに強い免疫原性を有している。しかしながら、ヒト及びニワトリの細胞の腫瘍化に伴って、HD抗原が検出され、腫瘍関連抗原として注目を集めてきた。

本研究は、動物血清における糖蛋白型のHD抗原の検出、解析を行ない血清病に関連する本抗原を調べることを目的としたものである。

〔方 法〕

9種の動物血清(牛胎児、子牛、ウマ、ヤギ、サル、家兎、モルモット、ラット、マウス)及びヒト血清をLaemmliのSDS-サンプルバッファー(6.25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 3% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, 2 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.01% Bromophenol blue)で、20倍に希釈し、加熱処理後、4-15%の濃度勾配のポリアクリルアミドゲルにて数枚ずつSDS-PAGEを行った。そのうち一枚のスラブゲルを用いて、銀染色(銀染色キット11, 第一化学)を行った。又、別の2枚のゲルをそれぞれ Towbin の方法に準じて、ニトロセルロース膜へ電氣的に転写し

た。3%マリーム (味の素) TBS溶液 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 2mM MgCl₂, pH 7.5) にて、ニトロセルロース膜を、37°C 1時間反応させ、次に一次抗体として、アフィニティ精製ニワトリHD抗体 (0.6 μg/ml) または、対照として、正常ニワトリ血清 (1.4 μg/ml) を反応させた (室温, 1時間)。その後、二次抗体、ビオチン化抗ニワトリIgG抗体に反応をさせ (室温, 1時間) 洗浄後、Alkaline Phosphatase-Streptavidin Complex (ABC-AP) (BRL) に反応させた (室温, 15分間)。その後、基質として、Nitroblue tetrazolium chloride と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt (NBT-BCIP) を用いて、染色を行った。

シアリダーゼ処理: 10 μl の希釈した血清蛋白サンプル (1mg/ml) を 10 μl の streptococcal neuraminidase (生化学工業) (1m unit/μl) にて、37°C 2時間処理し、Laemmli の SDS-サンプルバッファーにて、希釈し、加熱処理後、SDS-PAGE に用いた。

レクチンカラムクロマトグラフィー: 各種レクチンを、アガロースに固定化した、ミニカラムを準備し [ConA-LA, LCA-LA, RCA120-LA, WGA-LA, (豊年レクチン)] PBS にて希釈した血清サンプル (1mg/ml) をアブライした。その後、カラムの10倍容のPBSで洗浄し、種々の糖を含む溶出バッファーにて溶出した。溶出した蛋白分画を、それぞれニトロセルロース膜ヘドットプロットし、その後、ABC-AP法にて、HD抗原の検出を試みた。さらに、それらの陽性画分を用いて、SDS-PAGE, immunoblotting を行ない、HD抗原蛋白を同定した。

〔成績〕

1. HD抗原糖蛋白は、血清蛋白中では、銀染色の感度限界以下の微量蛋白であり、表の如く、動物によって、その分子量に多様性が認められた。

動物血清中に検出されたHD抗原糖蛋白の分子量 (kd)

血 清 の 種 類								
牛胎児	子牛	ウマ	ヤギ	サル	家兎	モルモット	ラット	マウス
300	300	130	150	170	165	140	165	300
	170	72	110	140	145		140	170
		110		100				140
		45		70				60

牛胎児血清では、主なHD抗原はMW 300kd, 170kdであるが、子牛血清では、さらに110kd, 45kdが出現し、加齢による変化がみられた。又動物種においては、マウスではC3H/He, BALB/c, NZBなどで、同じパターンを示しさらに、同じstrainのマウス (C3H/He) では、10数匹の週齢の異なる個体を検討したが、個体差は、認められなかった。又、ヒト血清においては、予想した如く、HD抗原は検出されなかった。ヒトに近縁のアフリカミドリザルでは、170, 140, 100, 70kdのHD抗原を検出した。

2. シアリダーゼ処理にて、本蛋白におけるHD抗原性は消失した。

3. 牛胎児，マウス血清では，ConA，LCA，RCAレクチンカラムにより，HD抗原蛋白は溶出されたが，一方家兎血清では，ConA，RCA，WGAレクチンカラムにアフィニティがあり，それぞれのHD糖蛋白の糖鎖に差異が認められた。

〔総括〕

数種の動物血清において糖蛋白型のHD抗原の存在を認めた。これらの糖蛋白は，sialidaseにより，そのHD抗原性を喪失することにより，その非還元末端のN-グリコシルノイラミン酸に抗原性が担われていることが確認された。このように，動物血清においては，糖蛋白型HD抗原が糖脂質型とともに発現されるものがあり糖脂質同様“血清病”を惹起する可能性のあることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は(1)異好性抗原の一つであるHD抗原には糖脂質以外に糖蛋白も存在すること，(2)HD糖蛋白は分子量の面より多様性のあること，(3)分子量は加齢によっても変化すること(4)動物種間にも糖鎖の違いによる性状の差異があること，最後に(5)これらHD抗原は何れもシアリダーゼ処理で抗原性を失うことなどを明らかにしたものである。ヒトには正常には存在しないこの抗原は発癌，肝硬変などで発現されることが知られておりこの成果は今後のこの領域における学術水準の向上に貢献するとともに血清病の原因とされるHD抗原の性状を明らかにしたもので十分学位に値するものと判定した。