



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies to an N-linked Oligosaccharide                                                        |
| Author(s)    | 榎谷, 誠三                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1991, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37766">https://hdl.handle.net/11094/37766</a>                                                             |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|                  |                                                                                                                                |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名              | 榊 谷 誠 三                                                                                                                        |
| 博士の専攻分野<br>の 名 称 | 博 士 (医 学)                                                                                                                      |
| 学 位 記 番 号        | 第 9 8 8 4 号                                                                                                                    |
| 学位授与年月日          | 平 成 3 年 8 月 8 日                                                                                                                |
| 学位授与の要件          | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                               |
| 学 位 論 文 名        | Preparation and Characterization of Monoclonal<br>Antibodies to an N-linked Oligosaccharide<br>(N-グリコシド型糖鎖に対する単クローン抗体の作製とその解析) |
| 論 文 審 査 委 員      | (主査)<br>教 授 森 武 貞<br>(副査)<br>教 授 平 野 俊 夫 教 授 谷 口 直 之                                                                           |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

細胞の癌化や癌の転移にともない糖脂質や糖タンパク質の糖鎖に異常が出現することはよく知られている。ある種の糖脂質やムチン型の糖タンパク質に対する単クローン抗体 (MoAb) はすでに作製され、臨床上有用な腫瘍マーカーとなっている。しかし、N-グリコシド型糖タンパク質の糖鎖に対する MoAb の作製は非常に困難であり、また作製されたものとしてもそのエピトープの解析は容易ではない。

本研究は、ヒト免疫グロブリン (IgG) より bisecting N-acetylglucosamine (bisecting-GlcNAc) 構造を持つフコシル化 2 本鎖糖鎖を精製し、これを BALB /c マウスに免疫して N-グリコシド型糖鎖に対する二種類の MoAb を作製することに成功し、さらにこれらの MoAb に対応するエピトープの解析を行ったものである。

### 〔方法と結果〕

- 1) 糖鎖の精製：ヒト IgG よりヒドラジン分解、ゲル濾過にて糖鎖を分離した後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行い、高速液体クロマトグラフィーを用いて bisecting-GlcNAc 構造をもつフコシル化 2 本鎖糖鎖を精製した。
- 2) MoAb の作製と精製：精製した糖鎖 5  $\mu$ g を Freund の完全、または不完全アジュバントとともに BALB /c マウス腹腔内に週 1 回、計 5 回免疫し、免疫マウス脾細胞をマウスミエローマ細胞 P3U1 と常法通り細胞融合した。スクリーニングは以下のごとく行った。まず 96 穴のマイクロタイターブ

レートに50  $\mu$ l のヒト asialoglycophorin (1  $\mu$ g/ml) を37°C, 2時間固相化し, 300  $\mu$ l の1%牛血清アルブミンにて37°C, 1時間blockingした後, hybridoma培養上清50  $\mu$ l を37°C, 1時間インキュベートした。次いで二次抗体として2000倍希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG + IgM抗体50  $\mu$ l を37°C, 1時間反応させた後, 発色基質としてo-phenylenediamineを用いて490 nmの吸光度を測定した。これによりMT-5, MT-9の2種のMoAbを得た。また精製は腹水化MoAbを30-50%硫酸塩析後, Sephacryl S-300を用いたゲル濾過により行った。

- 3) MoAbの特性とそのエピトープ: 2種類のMoAb: MT-5, MT-9はdot blot法によりasialoglycophorinと, またwestern blot法によりIgG-Fc fragment及びヒトtransferrinとそれぞれ反応することが確認された。次に, 固相化したヒトasialoglycophorinをgalactosidase,  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -mannosidaseにより逐次消化した後, ELISA法にてMoAbとの反応性の変化を比較検討し, MoAbのエピトープを推定した。その結果, MT-5のエピトープはbisecting-GlcNAcを含むマンノースコア構造(Gn-M-M(-Gn)-M-Gn)であり, MT-9のそれはfucoseを含む $\beta$ -mannose, chitobiose(M-Gn-Gn-F)であると考えられた。

#### 〔総括〕

ヒトIgGから精製したピリジルアミノ化糖鎖を免疫原に用いる方法により, アスパラギン結合型糖鎖に対する2種類のMoAbを作製することに成功した。また種々のglycosidase消化したasialoglycophorinとの反応性をELISA, western blot法にて検討し, MoAbのエピトープはそれぞれbisecting-GlcNAcを含むマンノースコア構造およびfucoseを含む $\beta$ -mannose, chitobioseと推定した。

### 論文審査の結果の要旨

細胞の癌化や癌の転移にともない糖脂質や糖タンパク質の糖鎖に異常が出現することはよく知られている。本研究は, ヒトIgGから2-アミノピリジンによる蛍光標識により精製したbisected N-acetylglucosamine構造を持つフコシル化2本鎖糖鎖を免疫原とすることにより, N-グリコシド型糖鎖に対する単クローン抗体を初めて作製することに成功した。さらにELISA法を用いての単クローン抗体のエピトープの推定も行い, 今後あらゆる種類のN-グリコシド型糖鎖に対する単クローン抗体の作製を理論上可能にしたという点できわめて興味深いものである。学位論文に値する研究と考える。