



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	https://hdl.handle.net/11094/37766
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	柾 谷 誠 三
博士の専攻分野 の名稱	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 Antibodies to an N-linked Oligosaccharide (N-グリコシド型糖鎖に対する単クローニング抗体の作製とその解析)
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 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ニング抗体（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 μg 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とく行った。まず96穴のマイクロタイターピ

レートに50 μl のヒト asialoglycophorin (1 μg / ml) を37°C, 2 時間固相化し, 300 μl 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 μl 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 μl 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% 硫安塩析後, Sephacryl S-300 を用いたゲルfiltration 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 galatosidase, β -N-acetylhexosaminidase, α -mannosidase, β -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 β -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二種類の 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 β -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单クローリー抗体を初めて作製することに成功した。さらに ELISA 法を用いての单クローリー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单クローリー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。