

Title	Glycosylation at the Fab Portion of Myeloma Immunoglobulin G and Increased Fucosylated Biantennary Sugar Chains : Structural Analysis by High-Performance Liquid Chromatography and Antibody-Lectin Enzyme Immunoassay Using Lens culinaris Agglutinin
Author(s)	李, 憲明
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38518
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	李憲明
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 1 1 0 1 3 号
学位授与年月日	平成 5 年 12 月 15 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	Glycosylation at the Fab Portion of Myeloma Immunoglobulin G and Increased Fucosylated Biantennary Sugar Chains: Structural Analysis by High-Performance Liquid Chromatography and Antibody-Lectin Enzyme Immunoassay Using <i>Lens culinaris</i> Agglutinin (骨髄腫免疫グロブリン G の Fab 部分の糖化とフコシル化二本鎖糖鎖の増加: 高速液体クロマトグラフィーとレンズ豆レクチンを用いた抗体-レクチン酵素免疫測定法による構造分析)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 中村 敏一 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

【目的】

癌化や種々の病態時に糖タンパクや糖脂質などの糖鎖構造が変化するため、これを診断に利用する試みは多い。従来の方法としては、レクチンカラムによるものや、レクチンを用いた交差免疫電気泳動法などが用いられているが、操作が繁雑であること、多数試料の処理に不向きであるなど、多くの問題点がある。本研究では、これら問題点を解決すべく、特異抗体とレクチンとを用いた酵素免疫測定法 (Antibody-Lectin EIA) による新しい分析方法を確立し、臨床診断への応用として、骨髄腫患者血清中免疫グロブリン G (IgG) の糖鎖構造変化の分析を目的とした。

【方法】

マイクロタイタープレートにヒト IgG に対する特異抗体の F (ab')₂ 分画をコーティングし、血清中の IgG と反応させ、ついでパーオキシダーゼ (POD) で標識したレクチンでサンドイッチして定量した (Antibody-Lectin ELA)。標識レクチンとして、反応特異性の比較的明らかなインゲン豆レクチン (EPHA)、小麦胚レクチン (WGA)、ヒマレクチン (RCA)、タチナタ豆レクチン (ConA)、レンズ豆レクチン (LCA) を用いた。本方法では、反応後の測定値の絶対値を求めることは難解なので、各レクチンでの POD の反応の度合を比で求めることにより糖鎖の構造を解析した。すなわち、WGA/ConA 比はシリアル化を、RCA/ConA 比はガラクトシル化を、EPHA/ConA 比はバイセクテイング N-アセチルグルコサミンの有無を、LCA/ConA 比はフコシル化をそれぞれ反映できる。試料としてステージの異なる骨髄腫患者血清 9 例、健常人血清 6 例および骨髄腫患者でない患者血清 177 例を用いた。

IgG 糖鎖構造の解析は、まず血清中ヒト IgG を硫酸分画および DEAE-cellulose により精製後、ヒドラジン分解し、アセチル化後、2-アミノピリジンで蛍光標識 (ピリジリアミノ化) し、ついで逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分画した。この方法による得られる各ピークの構造はすでに明らかにされている。

【成績】

Antibody-Lectin ELA による分析により 9 例の骨髄腫患者血清のうち 4 例で著しく LCA/ConA 比の高い例に遭遇した。健常人や骨髄腫以外の患者血清で認められない LCA の反応性が特に高いことより、フコシル化された糖

鎖の異常な増加が考えられた。ステージ別での変化は認められなかった。これらの例をピリジルアミノ化法と HPLC により糖鎖構造の分析を行うと、予想通りフコシル化された、しかもバイセクテイング N-アセチルグルコサミンを有する二鎖糖鎖が主体を占めていた。一方、これらの IgG をパパイン分解後、SDS 電気泳動を行いニトロセルロース膜に転写し、POD 標識/RCA レクチンで染色すると、45kD 以外にも55kD にもバンドを認めた。このことにより、本 IgG の糖鎖が Fc 部分の他に Fab 部分にも有していることが明らかになった。各部分の糖鎖構造の分析に行ったところ、Fc 部分には一部フコシル化された糖鎖構造を認めるものの、フコシル化されていない糖鎖構造が主体を占めており、一方 Fab 部分は、ほとんどがフコシル化されており、しかもバイセクテイング N-アセチルグルコサミンおよびシアル酸を有する二本鎖糖鎖の出現も認められた。したがって、LCA との反応が高く見られたのは、Fab 部分の糖鎖構造が強く反応したためと考えられた。

【総括】

ヒト IgG 特異抗体と標識レクチンとを用いた酵素免疫測定法 (Antibody-Lectin ELA) を確立し、骨髄腫患者血清中 IgG の糖鎖構造の分析に応用した。特に Fab 部分に糖鎖を有する IgG の分析に LCA レクチンの使用が有効であり、糖鎖構造解析よりフコシル化された二本鎖糖鎖の存在によることを確認した。

本法は、IgG タンパクばかりでなく、他の糖タンパクや糖脂質の糖鎖構造を簡便に分析定量できる可能性を有する。

論文審査の結果の要旨

癌化や種々の病態時に糖タンパクや糖脂質などの糖鎖構造が変化するため、これを診断に利用する試みは多い。従来の分析方法である、レクチンを用いたカラム法や親和交差免疫電気泳動法などは、操作が繁雑であること、多数試料の処理に不向きであるなど多くの問題点がある。本研究では、これら問題点を解決すべく、特異抗体と標識レクチンとを用いた酵素免疫測定法 (以下本法) による新しい分析方法を確立し、臨床診断への応用として、骨髄腫患者血清中免疫グロブリン G (IgG) の糖鎖構造変化の分析を目的としている。

反応特異性の比較的明らかな 5 種のパーオキシダーゼ (POD) 標識したレクチンを用い、各レクチンでの POD の反応の度合を比で求めることにより糖鎖の構造を解析している。試料として用いた骨髄腫患者血清 9 例、健常人血清 6 例および骨髄腫患者でない患者血清 177 例の本法による分析により、9 例の骨髄腫患者血清のうち 4 例で著しく LCA/ConA レクチン比の高い例に遭遇しており、健常人や骨髄腫以外の患者血清では認められない LCA の反応性が特に高いことより、フコシル化された糖鎖の異常な増加が考えられた。

本 IgG の糖鎖は、Fc 部分の他に Fab 部分にも存在していることが明らかにされ、精製各部分の蛍光標識による高速液体クロマトグラフィー糖鎖構造の解析により、Fab 部分の糖鎖構造はフコシル化され、しかもバイセクテイング N-アセチルグルコサミン構造を有する二本鎖糖鎖が主体を占めていることが確認された。この糖鎖構造の存在は、本法により得られた結果と良く一致しその特異性および信頼性が確認されている。

本法は、他の糖タンパクや糖脂質などの糖鎖構造を簡便に分析定量でき、今後の臨床診断上での応用が期待できる点で非常に興味深く、学位の授与に値するものと認める。