

平成 23 年度 修士論文

糖鎖認識による IgA 腎症診断法の開発と
その認識機構に関する研究

三重大学 大学院工学研究科

博士前期課程 分子素材工学専攻

加藤 真司

目次

1.緒言	1
1-1.腎不全とIgA 腎症	1
1-1-1.IgA 腎症のメカニズム	2
1-1-2.IgA 腎症の診断法	2
1-1-3.IgA 腎症の治療法	3
1-1-4.新規の IgA 腎症診断法	3
1-2.IgA の構造	4
1-2-1.特徴	4
1-2-2.IgA1 と糖鎖不全 IgA1	4
1-2-3.O-結合型糖鎖構造	6
1-2-4.IgA1 の O-結合型糖鎖	6
1-2-5.IgA 含有免疫複合(IgA-IC: Immunoglobulin A immune complexes)	8
1-3.IgA1 特異結合性レクチン	9
1-3-1.レクチン	9
1-3-2.IgA1 糖鎖認識レクチン	9
1-3-3.Jacalin	10
1-3-3-1.Jackfruit	10
1-3-3-2.Jacalin の構造	11
1-3-3-3.Jacalin の糖鎖認識	13
1-4.本研究の目的	14
2.方法	15
2-1.Jackfruit からの Jacalin の抽出、精製	15
2-1-1.Jacalin の抽出	15
2-1-2.Jacalin の精製	15
2-2.糖鎖固定化カラムを用いた Jacalin の精製	17
2-2-1.T 構造糖鎖固定化カラムの作製	17
2-2-2.ST 構造糖鎖固定化カラムの作製	17
2-2-2-1.T 構造糖鎖の ST 構造糖鎖への変換	18
2-2-3.dST 構造糖鎖固定化カラムの作製	19

2-2-3-1 糖転移酵素作製(ST6GalNAc- I)	19
2-2-3-2.ST 構造糖鎖の dST 構造糖鎖への変換	20
2-2-4.Tn 構造糖鎖固定化カラムの作製	21
2-2-4-1.T 構造糖鎖の Tn 構造糖鎖への変換	21
2-2-5.STn 構造糖鎖固定化カラムの作製	22
2-2-5-1.Tn 構造糖鎖の STn 構造糖鎖への変換	22
2-2-6.T、ST、dST、Tn、STn-pNP のアミノ化	23
2-2-7.T、ST、dST、Tn、STn 構造糖鎖のカラムへの固定化	23
2-2-8.T、ST、dST、Tn、STn 認識 Jacalin の精製	24
2-3.精製 Jacalin と糖とのアフィニティー測定	26
2-3-1.蛍光強度測定 of 原理	26
2-3-2.精製 Jacalin – Gal 混合溶液の蛍光測定	27
2-3-2-1.Jacalin – Gal 混合溶液	27
2-3-2-2.ST-Jacalin – Gal 混合溶液	27
2-3-2-3.T-Jacalin – Gal 混合溶液	28
2-3-2-4.Tn-Jacalin – Gal 混合溶液	28
2-3-2-5.STn-Jacalin – Gal 混合溶液	29
2-3-2-6.dST-Jacalin – Gal 混合溶液	29
2-3-3. 精製 Jacalin – GalNAc 混合溶液の蛍光測定	30
2-3-3-1.Jacalin – GalNAc 混合溶液	30
2-3-3-2.ST-Jacalin – GalNAc 混合溶液	30
2-3-3-3.T-Jacalin – GalNAc 混合溶液	31
2-3-3-4.Tn-Jacalin – GalNAc 混合溶液	31
2-3-3-5.STn-Jacalin – GalNAc 混合溶液	32
2-3-3-6.dST-Jacalin – GalNAc 混合溶液	32
2-3-4.精製 Jacalin – シアル酸混合溶液の蛍光測定	33
2-3-4-1.Jacalin – シアル酸混合溶液	33
2-3-4-2.ST-Jacalin – シアル酸混合溶液	34
2-3-4-3.T-Jacalin – シアル酸混合溶液	34
2-3-4-4.Tn-Jacalin – シアル酸混合溶液	35
2-3-4-5.STn-Jacalin – シアル酸混合溶液	35
2-3-4-6.dST-Jacalin – シアル酸混合溶液	36
2-3-5.アフィニティーの算出	37
2-4.精製 Jacalin 固定化カラムを用いた IgA1 の精製	38
2-4-1.精製 Jacalin 固定化カラムの作製	38

2-4-2.T、ST、dST、Tn、STn 糖鎖を持つ IgA1 の精製	39
2-5.糖鎖不全 IgA1 濃度測定	41
2-5-1.レクチン結合 ELISA 法について	41
2-5-2.精製 Jacalin のラベル化	41
2-5-3.測定方法	42
2-6.統計分析	43
3.結果	44
3-1.Jacalin のアフィニティー測定	44
3-1-1.精製 Jacalin と Gal とのアフィニティー	44
3-1-1-1.Jacalin – Gal	44
3-1-1-2.ST-Jacalin – Gal	46
3-1-1-3.T-Jacalin – Gal	48
3-1-1-4.Tn-Jacalin – Gal	50
3-1-1-5.STn-Jacalin – Gal	52
3-1-1-6.dST-Jacalin – Gal	54
3-1-2.精製 Jacalin と GalNAc とのアフィニティー	57
3-1-2-1.Jacalin – GalNAc	57
3-1-2-2.ST-Jacalin – GalNAc	59
3-1-2-3.T-Jacalin – GalNAc	61
3-1-2-4.Tn-Jacalin – GalNAc	63
3-1-2-5.STn-Jacalin – GalNAc	65
3-1-2-6.dST-Jacalin – GalNAc	67
3-1-3.精製 Jacalin とシアル酸とのアフィニティー	70
3-1-3-1.Jacalin – シアル酸	70
3-1-3-2.ST-Jacalin – シアル酸	72
3-1-3-3.T-Jacalin – シアル酸	74
3-1-3-4.Tn-Jacalin – シアル酸	76
3-1-3-5.STn-Jacalin – シアル酸	78
3-1-3-6.dST-Jacalin – シアル酸	80
3-1-4.Jacalin のアフィニティーまとめ	83
3-2.IgA 糖鎖濃度測定	86
3-2-1.Total-IgA 濃度の比較	86
3-2-2.IgA 糖鎖濃度の比較	87

3-2-3.IgA 糖鎖濃度を割合で比較	87
3-2-4.IgAN 患者の IgA 糖鎖傾向	88
3-2-5.IgAN 患者における治療と IgA 糖鎖の関連	89
4.考察	91
4-1.Jacalin の糖鎖認識	91
4-2.IgA 腎症診断法の検証	95
4-3.IgA1O-結合型糖鎖と扁桃摘出	97
5.結論	98
6.謝辞	99
7.参考文献	100
8.付録	102
8-1.糖鎖固定化カラムを用いた Jacalin の精製	102
8-1-1.T 構造糖鎖の ST 構造糖鎖への変換	102
8-1-2.ST 構造糖鎖の dST 構造糖鎖への変換	102
8-1-3.T 構造糖鎖の Tn 構造糖鎖への変換	103
8-1-4Tn 構造糖鎖の STn 構造糖鎖への変換	103
8-1-5.T、ST、dST、Tn、STn-pNP のアミノ化	104
8-1-6.T、ST、dST、Tn、STn 構造糖鎖のカラムへの固定化	104
8-1-7.T、ST、dST、Tn、STn 認識 Jacalin の精製	106
8-2.精製 Jacalin 固定化カラムを用いた IgA1 の精製	107
8-2-1.精製 Jacalin 固定化カラムの作製	107
8-2-2.T、ST、dST、Tn、STn 糖鎖をもつ IgA1 の精製	108
8-3.タンパク質の定量(BCA 法)	110
8-4.IgA 濃度測定(ELISA 法)	112
8-5.糖鎖不全 IgA1 濃度測定(レクチン結合 ELISA 法)	114

1. 緒言

1-1. 腎不全と IgA 腎症

腎臓が尿を作る機能を失った状態を腎不全と呼ぶ。腎不全は内科的腎疾患を代表する病気である。腎不全へと至る主な原因疾患の一つに腎臓の炎症、いわゆる腎炎によるものがある。腎炎は 17 世紀に発見されたのが始まりで、現在までに様々な腎炎の症状が確認されている。腎炎を放置しておくと体内の毒を排出できなくなる尿毒症へと進行し、最終的に腎不全へと至る。

現在では透析患者が国内で毎年 1 万人以上増加して全体で 30 万人以上になっており、腎不全の原因疾患として最も多いのは糖尿病、次に腎炎となっている。その腎炎の中に IgA 腎症 (IgA Nephropathy: IgAN) があり、この病気は我が国の慢性腎炎の中で最も多い病気である。また全腎不全患者の中で IgA 腎症から腎不全へと進行した患者は約 3 割をも占めている。国内での腎不全患者は毎年 2～3 万人にのぼり、本症の国内での患者数は男女ほぼ同じで、年齢分布は 15～24 歳と 40～49 歳をピークとしているが、患者層は全ての年齢に渡っている。

また本症は慢性腎炎が多く、初期段階は無症状のために、症状が悪化するまで気が付かないことも多い。そのため、本症の約 40% の患者が末期腎不全に陥ると報告されている。この病気の原因は未だ不明で、現在炎症の原因・メカニズムが解明されつつあるものの、それに対する有効かつ安全な治療法が確立されていない。従って、IgAN 患者に対して、より発症確認の確実性の高い診断法、および有効かつ簡易で安価な治療法の確立が望まれている。

1-1-1. IgA 腎症のメカニズム

IgAN は 1968 年 J.Berger と N.Hinglais によって提唱された一次糸球体疾患で、血液中の IgA もしくは糖鎖不全 IgA1 と細胞外マトリックスの複合体がメサンギウム領域へ沈着すると、その複合体を処理しようと糸球体メサンギウム細胞が増殖する。メサンギウム領域への IgA と細胞外マトリックスの有意な沈着によるメサンギウム領域の拡大により、糸球体内の毛細血管が圧迫されて腎臓のろ過機能の低下が起こり、炎症が認められたものをいう⁽¹⁾。

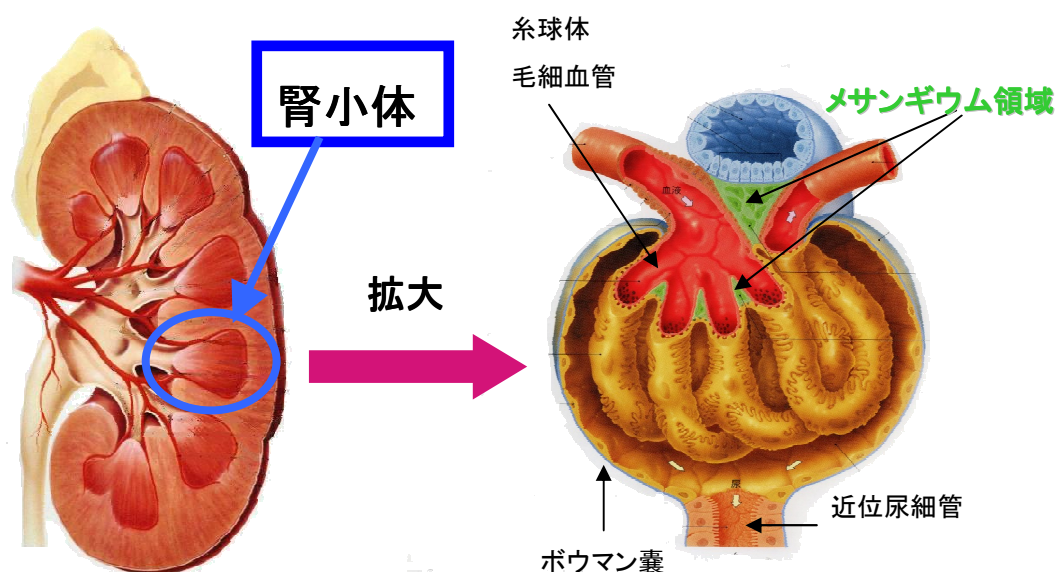


Fig.1-1. 腎臓と腎小体の図⁽²⁾

1-1-2. IgA 腎症の診断方法

現在の主流な診断方法にはいくつかあり、簡易的な方法では検尿と血液による検査がある。この診断方法では、健康診断などで発見される尿タンパクが一日 1.0g 以上であることと、血液検査で成人の場合、血清 IgA 値 315mg/dl 以上であることで IgAN の確率が高いと判断される。この方法はあくまで簡易的であり、さらに確実に発見するには腎生検による組織診断を行う。腎生検は trucut 針や silverman 針修飾型などを用いた針生検が主流で、この針によって直接腎臓から組織を採取して腎糸球体を蛍光ラベルし、電子顕微鏡でメサンギウム領域を観察し症状を診断する。腎生検では、生検後の針を刺した傷口の圧迫止血、長時間の絶対安静や捕液による尿量の保持といったものにより、1～2 日間は厳重な経過観察が必要であり、患者への身体的負担が非常に大きい⁽¹⁾。

1-1-3. IgA 腎症の治療法

現時点では IgAN に対する根本的な治療法はなく、本症の進展、憎悪を抑えるのみに留まっている。具体的には、食事療法(減塩、蛋白質制限)、運動制限による治療、薬物療法がある。薬物療法には主にステロイド薬とアンギオテンシン変換酵素阻害薬(ACE 阻害薬)を用いたものが主流である。ステロイド薬の効果としては抗炎症性作用、IgA 産生の免疫抑制、糸球体基底膜への直接作用などが考えられている。ACE 阻害剤は抗蛋白尿効果がある。ただ、全ての患者に薬物療法が有効なわけではない⁽¹⁾。さらに薬物ではないが、Fish oil(魚油)を投与することによって短期的のみならず、長期的にも腎機能保持に有効であるという報告がなされている⁽³⁾。

また新たな治療法として扁桃摘出とステロイドパルス療法を組み合わせた療法が行われている。扁桃は体外から侵入する病原と最初に接触する部位で、ここでは IgA が大量に産生されており、扁桃を摘出することによって血液中の IgA を減少させることができる。さらにステロイド薬を短期間、大量に点滴することで糸球体の炎症を劇的に抑えることができる。

1-1-4. 新規の IgA 腎症診断法

IgA 腎症は腎臓のメサンギウム領域に血液中の IgA が沈着することによって定義されており、この沈着している IgA に関しても研究されている。沈着している IgA は IgA1 が多く、その IgA1 のヒンジ部位における O-結合型糖鎖に特徴があり、ガラクトース欠損した糖鎖(糖鎖不全)を持っているという報告が増えている。⁽⁴⁾⁽⁵⁾このことから糖鎖を特異的に認識することができるタンパク質、レクチンを用いて血液中の糖鎖不全 IgA1 の量を測定するという診断方法が研究されている。このレクチンアッセイによる診断方法は腎生検と比較すると簡易で、患者への負担もかなり減らすことができるが、正確性がやや低いために診断方法としてあまり優れておらず現在、実用化には至っていない。⁽⁶⁾

1-2. IgA の構造

1-2-1. 特徴

IgA は皮膚の存在しない口腔内や消化管などの粘膜上に多量に存在する。外部から侵入する異物、ウイルスや細菌を認識して感染を防ぐのに重要な働きを果たす。単量体は約 160kDa であり、粘膜上に存在する IgA は主に分泌型と呼ばれるもので、secretory component(SC)とともに重合して 2 分子が会合する二量体である。外気に直接触れる場所の分泌液、涙・唾液・鼻汁などに多量に含まれ、胎児の免疫機能をつけるために初乳中にも IgA が多く含まれている。分泌液中だけでなく血液中にも存在し、濃度は 1.4~4mg/ml で血清中での割合は免疫グロブリン全体の約 30%を占める。

免疫グロブリンは同程度の分子量 23kDa の軽鎖(L 鎖)2 つと分子量 53~75kDa の重鎖(H 鎖)2 つから成る。この 4 つのサブユニットはジスルフィド結合(S-S 結合)と非共有結合で集まって Y 字型の対照的な二量体構造をとる。この Y 字型の二つの先端部分には抗原認識部位がある。Y 字型の根幹部分には柔軟な構造を有するヒンジ部位と呼ばれる部分があり、Y 字の下部分は 20kDa 程度の J 鎖と呼ばれる部位がある。IgA は J 鎖でジスルフィド結合を介して単量体~3 量体の構造を形成する。また IgA の重鎖は α 鎖、軽鎖は κ 鎖、もしくは λ 鎖であるので、サブユニット構造は $(\alpha_2\kappa_2)_nJ$ または $(\alpha_2\lambda_2)_nJ$ 。ただし n は 1~3 である。⁽⁷⁾

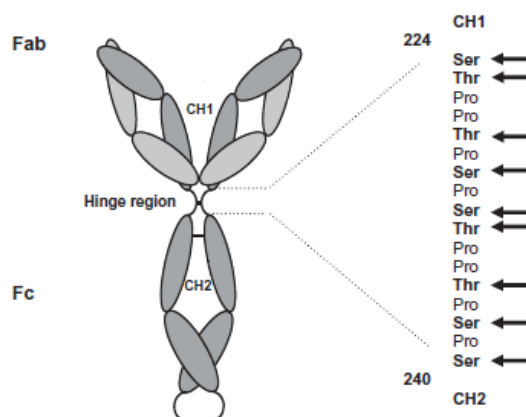
1-2-2. IgA1 と糖鎖不全 IgA1

Human IgA には IgA1 と IgA2 の 2 つのサブクラスが存在している(IgA2 はアロタイプが 2 つある)。一般にアミノ酸と糖鎖の結合様式は N-グリコシド結合であるが、IgA1 の場合は O-グリコシド結合でも結合している。IgA1 のヒンジ部位の糖ペプチド部位はプロリン 9 残基、セリン 5 残基、トレオニン 4 残基から構成されており、セリンもしくはトレオニンに O-グリコシド結合で糖鎖が結合しており⁽⁸⁾、IgA1 一分子あたり 4~5 本の糖鎖が結合しているという報告がある⁽⁸⁾。結合している糖鎖の基本骨格は次項で具体的に述べる。

IgAN 患者は健常者と比べたとき、より不完全な糖鎖を持っていることが報告されている⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。しかし、何が原因で IgA1 の糖鎖が欠落し、糖鎖不全になるかは未だ不明である。また、IgAN 患者のメサングウム領域には糖鎖不全 IgA1 が堆積しており、メサングウム細胞に対する糖鎖不全 IgA1 の結合能力は通常 IgA1 と比べて著しく高いということも報告されている⁽¹²⁾⁽¹³⁾。さらに、糖鎖不全 IgA1 は多量体を形成しやすいという性質も報告されており、その性質がメサングウム領域への IgA 沈着を助長している。

Table.1-2-2. IgA1 と IgA2 のアミノ酸配列⁽⁹⁾

	Position	IgA1	IgA2	
			A2m(1) ^c	A2m(2) ^d
C _H 1 domein	133	Cys	Asp	Asp
	136	Gln	Pro	Pro
	137	Pro	Gln	Gln
	143	Ile	Val	Val
	166	Gly	Asn GlcN	Asn GlcN
	197	Leu	Pro	Pro
	198	Ala	Asp	Asp
	211	Asn	Asn	Asn GlcN
	212	Pro	Pro	Ser
	221	Pro	Pro	Arg
Hinge region	223	Pro		
	224	Ser GalN		
	225	Thr		
	226	Pro		
	227	Pro		
	228	Thr		
	229	Pro	Deletion	
	230	Ser GalN		
	231	Pro		
	232	Ser GalN		
	233	Thr		
	234	Pro		
	235	Pro		
	236	Thr	Pro	Pro
	238	Ser GalN	Pro	Pro
	240	Ser GalN	Pro	Pro
C _H 2	277	Val	Ala	Ala
	319	Lys	Glu	Glu
	327	Tyr	His	His
	330	Ser	Leu	Leu
	337	Thr	Asn GlcN	Asn GlcN
	338	Leu	Ile	Ile
	339	Ser	Thr	Thr
C _H 3	411	Phe	Phe	Tyr
	428	Asp	Asp	Gln
	458	Val	Val	Ile
	467	Val	Val	Ala

Fig.1-2-2. IgA1 の構造とヒンジ部位アミノ酸配列⁽¹⁴⁾

1-2-3. O-結合型糖鎖構造

タンパク質には糖鎖と結合しているものが自然界に多く存在しており、アスパラギン(Asn)に糖鎖が結合しているものを N-結合型糖鎖と呼び、セリン(Ser)またはトレオニン(Thr)に糖鎖が結合しているものを O-結合型糖鎖と呼ぶ。タンパク質自体は粗面小胞体で作られ、糖鎖の合成はゴルジ装置へ運ばれてから行われる。

O-結合型糖鎖は Ser または Thr に N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が α 位で結合し、その後 GalNAc の 3 位にガラクトース(Gal)が β 位で結合する。これが O-結合型糖鎖の基本骨格の一つで Core1 構造(T 構造)と呼ぶ。また GalNAc の 3 位に N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 位で結合したものを、O-結合型糖鎖のもう一つの基本骨格の Core3 構造と呼ぶ。

糖鎖の生合成はまず、ポリペプチド GalNAc トランスフェラーゼ(UDP-GalNAc)から対応する糖転移酵素によって Ser または Thr へ GalNAc が結合される。その後、糖-ヌクレオチドからそれぞれの糖転移酵素により糖が結合していく⁽¹⁵⁾。

1-2-4.IgA1 の O-結合型糖鎖

IgA1 O-結合型糖鎖として知られる糖鎖構造を Fig.1-2-3a.に示した。IgA1 のヒンジ部位における O-結合糖鎖は T、Tn、ST、STn、dST の 5 種類があり、Jacalin はこの 5 種類全てを認識する。Jacalin については後で詳しく述べる。

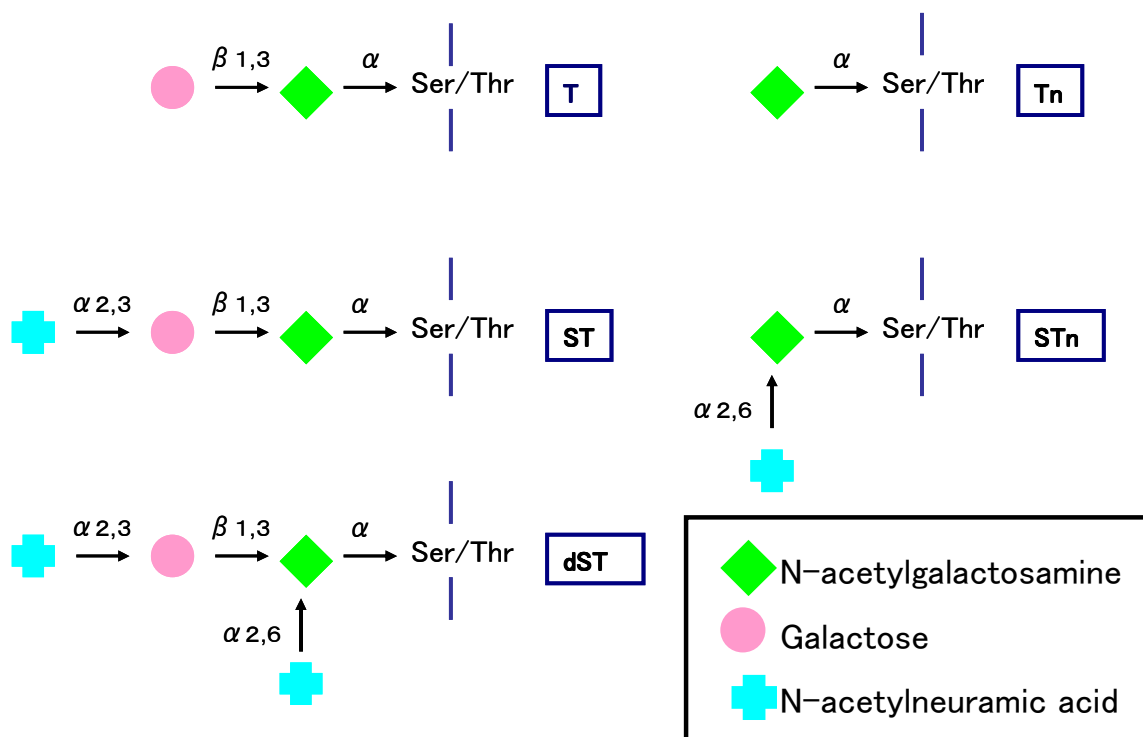


Fig.1-2-4a. IgA1 ヒンジ部位糖鎖抗原

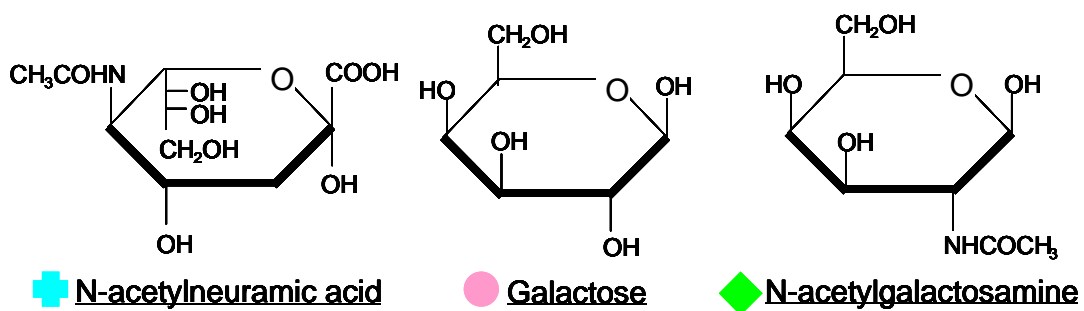


Fig.1-2-4b. IgA1 ヒンジ部位糖鎖を構成する糖

これらの構造のうち、ST、dST 構造が正常糖鎖 IgA1 構造とされており、残りの T、Tn、STn 構造が糖鎖不全 IgA1 構造とされる。即ち、正常な IgA1 糖鎖から $\alpha 2,3$ シアル酸が欠損したものが糖鎖不全 IgA1 糖鎖と考えることができる。

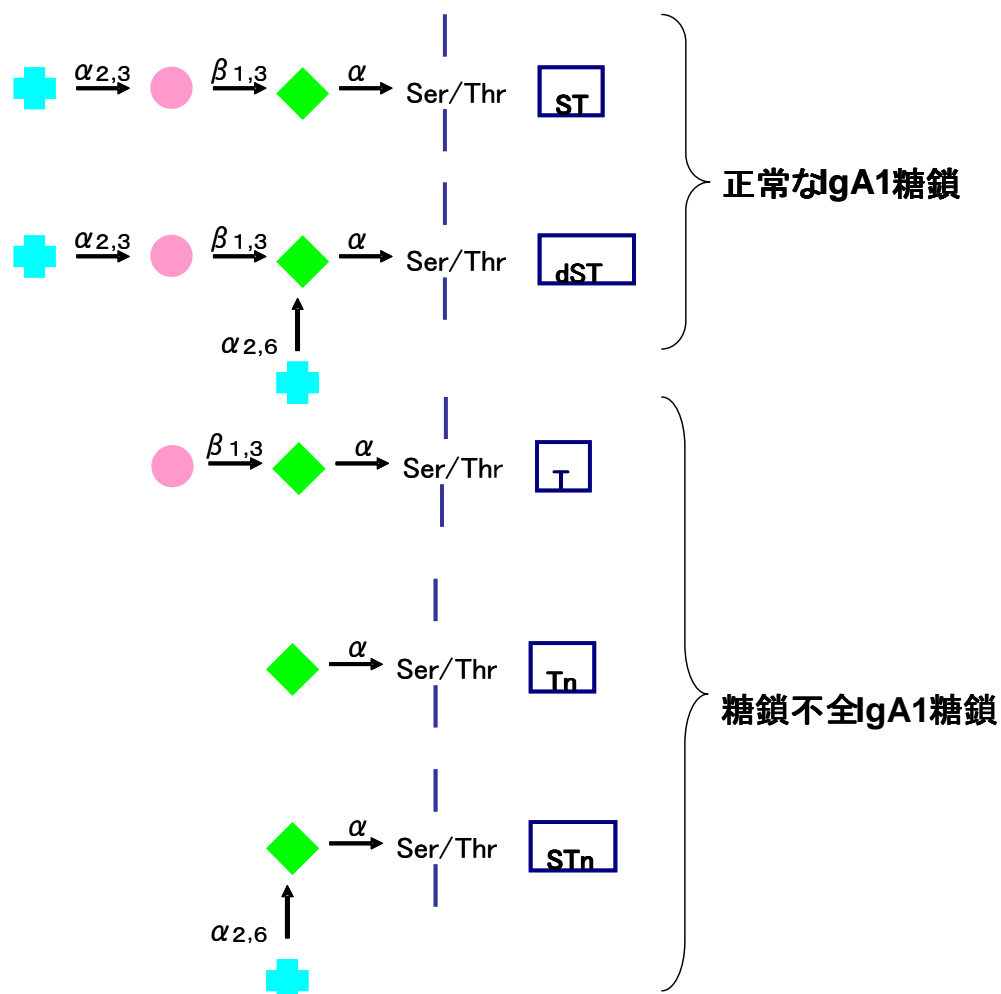


Fig.1-2-4c. 正常糖鎖と糖鎖不全

1-2-5. IgA 含有免疫複合体(IgA-IC:Immunoglobulin A-immune complexes)

IgA 腎症の一番の特徴はメサンギウム領域へ血液中の IgA が沈着することによる糸球体の炎症が挙げられる。この炎症はメサンギウム領域への IgA 沈着を発端にメサンギウム細胞の増殖および基質の増加によって引き起こされるが、沈着を起こす原因については未だ分かっていない。沈着している IgA に糖鎖不全 IgA1 が多いという報告がなされており⁽¹⁶⁾、さらに糖鎖不全 IgA1 を含む免疫複合体(IgA-IC)が IgA 腎症患者の血清に多く含まれており、メサンギウム細胞の増殖を刺激しているという報告もある⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾。しかしこのような糖鎖不全 IgA1 や IgA-IC がどのような機構で発生しているのか未だ分かっていない。

血液中で生じた免疫複合体は通常ならば貪食細胞によって処理されるが、複合体の多量発生、抗体の産生不全や貪食細胞の機能低下などの病的な状態では、腎糸球体や血管壁に沈着して補体の活性化や組織傷害を引き起こす。一般に免疫複合体の検出はこのような病的な状況が存在するかどうかを判断するのに有用である。

免疫複合体とは主に抗原と抗体の反応によって作られるものであるが、IgA1 のヒンジ部位が IgG によって抗原認識される場合があり、そのようにして免疫複合体が作られることもある。IgG が IgA1 のヒンジ部位を抗原認識する際、ヒンジ部位の糖鎖が欠損しているものほど認識しやすいと考えられている。IgA 腎症患者の血液中には IgA1 O-結合型糖鎖は十分な糖鎖形成がされず⁽⁴⁾⁽¹²⁾、これらの糖の一部あるいはヒンジグリコペプチドは抗グリカンあるいは抗ヒンジグリコペプチド特異的な抗体を自然に生じることによって認められ、IgA-IC は形成される⁽¹¹⁾。そのため血液中の糖鎖不全 IgA1 はもっぱら IgA-IC に存在し、多量体 IgA1(pIgA1)を形成しやすく pIgA1 に存在するとも言われている。

Table.1-2-5 IgA-IC の組成⁽¹⁹⁾

抗原-抗体
IgG あるいは IgM
糖鎖不全 IgA1
補体成分 C3
細胞外基質(フィブロネクチンなど)
CD89(Fcα レセプター)

1-3. Jacalin の特徴と構造

1-3-1. レクチン

レクチンとは自然界に広範囲に存在し、細胞を凝集させたり、多糖類や糖タンパク質を沈降させる活性を持ったりする、免疫反応の産物(抗体)ではない糖結合タンパク質である。レクチンは認識分子として機能し、動植物の体液中や細胞上の特異的な糖鎖と結合することにより、特定の生命現象を発現する役割を担っていると考えられている。また、その潜在的有用性から糖タンパク質・糖ペプチドの分離、組織の染色などに利用されている⁽²⁰⁾。

1-3-2. IgA1 糖鎖認識レクチン

IgA1 の糖鎖と特異的に結合することができるレクチンに Jacalin (ジャカリン) と呼ばれるものが知られており、Jacalin は O-結合型の Gal β 1,3-GalNAc や GalNAc を認識することが知られている。Jacalin の糖鎖認識については後の項で詳しく説明する。

レクチン特異結合 ELISA による診断法を開発するにあたって重要なことはどのレクチンを用いるか、ということである。現在までに様々なレクチンが試されており、その主なものを Table.1-3-2 に示す。PNA は主に Gal β 1-3GalNAc を認識するといわれているが、特異認識能が低いため実用化に至れない。SNA は NeuNAc α 2-6Gal/GalNAc を認識するといわれているが PNA と同様の理由で実用化に至っていない。また VVL に関しては GalNAc 末端をよく認識するが N-結合型も同様に認識してしまうので、O-結合型糖鎖の特異的な認識には使えない。HAA については現段階で IgA1 糖鎖による診断に有用なレクチンではないかといわれているが、結合特性や感度の面で課題があり、これも実用化に至っていない⁽⁶⁾。

Table.1-3-2. 新規 IgAN 診断の研究に利用されているレクチン⁽⁸⁾⁽²⁰⁾

略称	主な認識糖鎖	動植物の学名 (通称)
PNA	Gal β 1-3GalNAc	Arachis hypogaea agglutinin (peanut)
VVL	GalNAc 末端	Vicia villosa agglutinin (hairy vetch)
HAA	Tn 抗原	Helix aspersa agglutinin (garden snail)
SNA	NeuNAc α 2-6GalNAc	Sambucus nigra agglutinin (Elder flower)
JFL	Gal β 1-3GalNAc/GalNAc	Artocarpus integrifolia agglutinin (Jackfruit)

1-3-3. Jacalin

Jacalin は植物性レクチンの一つで Jackfruit の種子のタンパク質主成分である。また種子中にはアルトカルピン(artocarpin)と KM+というマンノース特異性レクチンも含まれている。Jacalin は O-結合型の Gal β 1-3GalNAc や GalNAc を特異的に認識するレクチンであることが以前から良く知られている。またリンパ球を活性化し、細胞分裂を引き起こすマイトジェン活性を持つレクチンとして知られるインゲンマメレクチン(phytohem agglutinin ; PHA) やピーナッツレクチン(peanut agglutinin ; PNA) などと同様の糖鎖認識をする⁽²⁰⁾。

本研究では、Jackfruit から種子を取り出し、その種子から Jacalin を抽出した。



Fig.1-3-3a. Jacalin の種子



Fig.1-3-3b. 抽出 Jacalin

1-3-3-1. Jackfruit

インド原産の熱帯性常緑高木。別名波羅蜜(パラミツ)。木は9～21m になり、その果実は世界最大級の大きさで、大きいものでは数十 kg の重さになる。果実は集合果で幹や太い枝から直接ぶら下がる⁽²¹⁾。



Fig.1-3-3-1 Jackfruit

1-3-3-2. Jacalin の構造

Jacalin の基本構造は 4 つの β シートでできた Greek-key (Fig.1-3-3-2-a) という構造 3 つで単量体を形成している⁽²²⁾。この 3 つのうち一つの Greek-key 構造にあるターン構造が切れた β シートを β サブユニット (M.W.2.1kDa、20~21 アミノ酸残基から成る) と呼び、残りの部分を α -サブユニット (M.W.10~15kDa、133 アミノ酸残基から成る) と呼ぶ⁽²³⁾。Jacalin1 分子は 4 つの単量体がそれぞれ対称に非共有結合している 4 量体構造である。 α -サブユニットには α と α' の 2 種類があり、4 つのサブユニットのうち 3 つが α 、1 つが α' である。 α' -サブユニットは α -サブユニットに N-結合型糖鎖が結合したもので、その結合部位は主にアミノ酸配列 74 のアスパラギンである。さらに α 、 α' -サブユニットのアミノ酸配列は変動する部分があり、それはアミノ酸配列 31,34,45,66,67,72,74,102,113 という報告がある。また β -サブユニットには $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の 3 種類があり、HPLC によって 1:2:4 の比率で分離された⁽²¹⁾。

Jacalin の糖鎖を認識し、結合する結合サイトは α 、 α' -サブユニットにあるといわれており、この 2 種類のサブユニットが IgA1 のヒンジ部位にある O-結合 Gal β 1-3GalNAc を認識し、結合すると考えられている⁽²¹⁾⁽²²⁾。

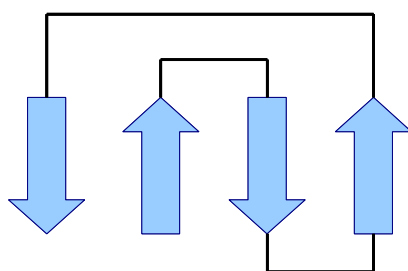


Fig.1-3-3-2a. Greek-key

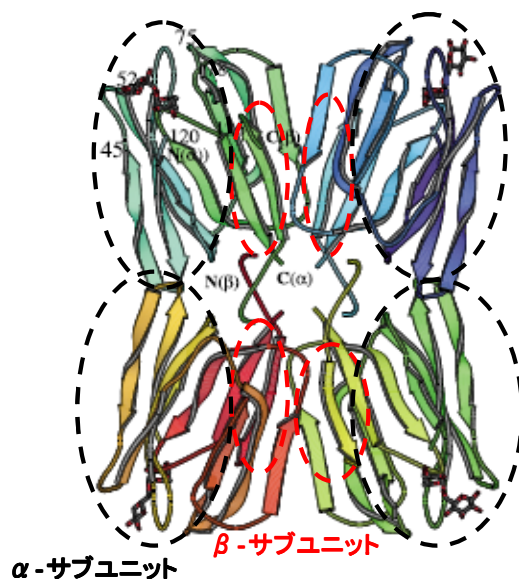


Fig.1-3-3-2b. Jacalin の構造(folding)⁽²²⁾

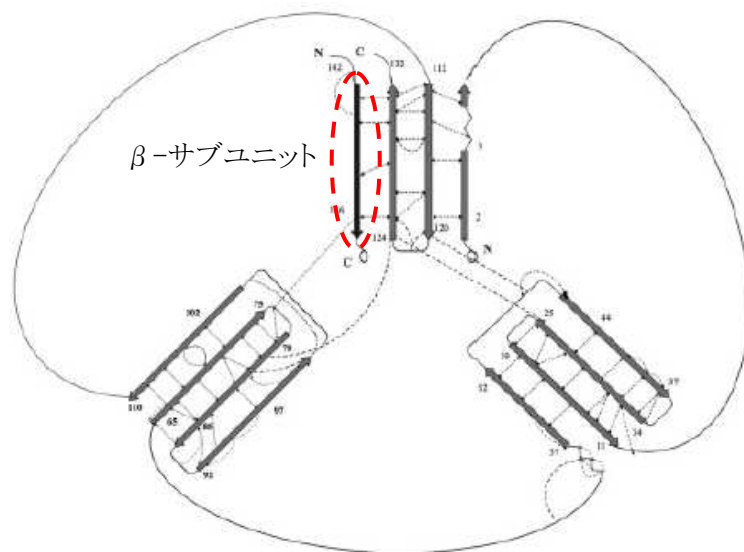


Fig.1-3-3-2c. Jacalin 単量体の構造(unfolding)⁽²³⁾

GKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQV**V**YD
 10 20 30
 40 50 60
LNGSPYVGQNH**K**SFITGFTPVKISLDFPSEYIME
 70 80 90 100
 VSGYT**G**N**V**SGYVVVRSLTFKTNKKTYGPYGVTS
 110 120 130
GTPFNLPIENGL**I**VGFKGSIGYWLDYFSMYLSL
 ○: アミノ酸配列が変動する部分

Fig.1-3-3-2d. α サブユニットのアミノ酸配列⁽²¹⁾

10 20
 β1 NEQSGKSQTVIVGSWGAKVS
 β2 NEQSGKSQTVIVGPWGAQVS
 β3 DEQSGISQTVIVGPWGAKVS

Fig.1-3-3-2e. β サブユニットのアミノ酸配列⁽²¹⁾

1-3-3-3. Jacalin の糖鎖認識

Jacalin がよく認識する糖鎖として知られているものは、O-結合型の Gal β 1,3-GalNAc(T 抗原)及び GalNAc(Tn 抗原)である。これらの糖鎖をヒンジ部位に持つ IgA1 に特異的なレクチンとしても知られており、Jacalin と糖鎖との相互作用の調査は数多くされているが、IgA1 糖鎖に関して T 及び Tn 糖鎖以外の糖鎖と Jacalin の結合について調査があまりなされていない。IgA1 には 5 種類の糖鎖が存在すると考えられているが、Tachibana K らの研究では T、Tn 及び ST 糖鎖と Jacalin が結合するが、STn 糖鎖とは結合しないという報告している⁽²⁴⁾。(dST 糖鎖に関しては行っていない。)

Jacalin の糖鎖認識はどのように行われているのか、X 線構造解析によって Jacalin と糖鎖が結合した状態の構造から明らかにされており、Jacalin の糖鎖認識サイトは α (または α')サブユニットにおける Gly1、Tyr78、Val79、Ser119、Tyr122、Trp123、Asp125 によって形成され、ポケットのようになっている⁽²²⁾⁽²³⁾。ポケットに収まる糖鎖の種類によってアミノ酸側鎖の向きが変わり、ポケットの形を変えて上記のアミノ酸側鎖と相互作用をしやすくする⁽²²⁾。

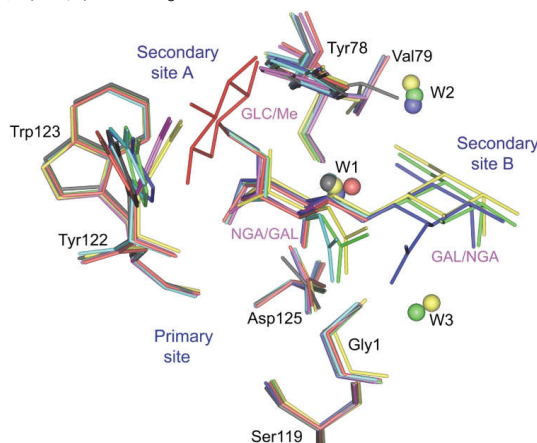


Fig.1-3-3-3a.Jacalin の糖鎖認識⁽²²⁾

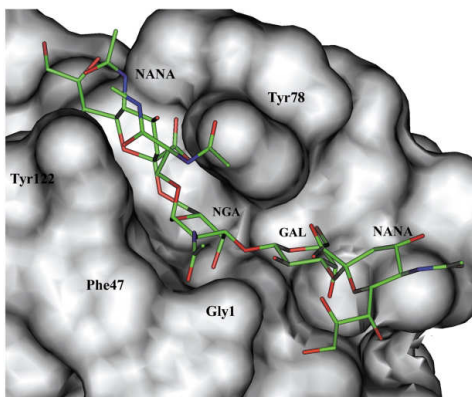


Fig.1-3-3-3b.糖鎖認識サイトのポケット⁽²²⁾

1-4. 本研究の目的

現在の IgA 腎症における診断法は患者の腎組織を採取する必要があり、正確ではあるが負担はかなり大きな診断法しかない。そのため、より負担の少ない低侵襲な診断法の開発が望まれている。そこで本研究では(1)IgA 腎症患者の IgA1 糖鎖には健常者と異なる特徴があることに着目し、IgA 腎症の新たな診断法の開発、(2)診断法の開発に用いた Jacalin に関して、複数の糖鎖を認識することができる理由についての解明を目指した。

(1)IgA 腎症の診断法を開発のためにレクチン結合 ELISA 法を用いた。この方法は糖鎖分析によく用いられる方法の一つで、一度に多くのサンプルを測定することができることや、抗体の代わりにレクチンを用いるので安価という利点がある。本研究で用いたレクチンは Jacalin で、そのままでは IgA1O-結合型糖鎖を全て認識してしまうので、糖鎖を固定化したアフィニティーカラムによって分離・精製した後に使用した。精製した Jacalin を用いることで、血液中の IgA1 糖鎖濃度を測定して、比較・検討した。

(2)Jacalin は IgA1O-結合型糖鎖を全て認識できることが分かっているが、なぜ複数の糖鎖を認識することができるのか、その理由については未だ解明されていない。本研究で IgA 腎症診断法の開発のために、アフィニティーカラムを用いて Jacalin を分離することができた。これは Jacalin という分子は 1 種類ではなく、異なる糖鎖認識能をもつ複数の Jacalin が存在しているのではないかと仮定した。そこで Jacalin が IgA1O-結合型糖鎖を全て認識できることから、IgA1O-結合型糖鎖を構成している単糖とアフィニティーカラムによって分離・精製した Jacalin とのアフィニティーを調査して、精製した Jacalin の糖鎖認識能が異なるか検証した。さらに Jacalin が糖鎖を認識する機構についても検討した。

2.方法

2-1. Jackfruit からの Jacalin の抽出、精製

Jacalin を得るために、Jackfruit を解体して種子から Jacalin を抽出することを試みた。

2-1-1. Jacalin の抽出

Jackfruit の種子から Jacalin を抽出した。

【使用器具・試薬】

- ・ Jackfruit の種子
- ・ ミキサー
- ・ スツチェ
- ・ アスピレーター (AS ONE)
- ・ 遠心分離機 (HITACHI)
- ・ 凍結乾燥機

【手順】

1. Jackfruit を解体し、種子を取り出した。
2. Jackfruit の種子の白い皮と茶色の薄皮をはがし取った。
3. 皮を取った種子 100g をミキサーに入れた。
4. milliQ を 200ml 加え、ミキサーのスイッチを ON にした。このとき水温が上がらないように約 5 秒に 1 回ミキサーを止めた。
5. 粉碎後、スツチェを用いて吸引濾過し、濾液と沈殿物に分けた。
6. 濾液は遠沈管に移して遠心分離(3000rpm×10 分)した。

2-1-2. Jacalin の精製

透析用セルロースチューブを用いて抽出 Jacalin の低分子部分を排除した Jacalin を作製した。

【使用器具・試薬】

- ・ 透析用セルロースチューブ (Cal.No,41003684/三光純薬株式会社)
- ・ Jacalin (3-1-1 の Jackfruit 抽出物)

【手順】

1. 透析用セルロースチューブを脱イオン水に浸し、透析用セルロースチューブについているグリセリンを抜き準備しておいた。
2. 準備しておいた透析用セルロースチューブに 3-1-1.の抽出物から上清のみを入れ、そのチューブを脱イオン水で満たしたビーカーに浸し、4℃で3日間透析した。1日2回脱イオン水を交換した。
3. 透析を終えた溶液を凍結乾燥瓶に入れ冷凍し、凍結乾燥した。
4. 乾燥して得られた粉末の重量を測定した。

2-2. 糖鎖固定化カラムを用いた Jacalin の精製

2-1.で Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin は IgA1 の持つ糖鎖全てを識別することなく認識してしまい、この Jacalin には 5 種類の IgA1 糖鎖をそれぞれ認識しやすい Jacalin 分子が存在していて、混合物の状態であると考えられる。そこで IgA1 糖鎖それぞれを認識する能力が高い Jacalin を作製するために、各 IgA1 糖鎖と同様の構造の糖鎖を固定化したアフィニティークラムを用いて Jacalin を分離・精製した。

2-2-1. T 構造糖鎖固定化カラムの作製

IgA1 糖鎖の一つである T 構造糖鎖を認識しやすい Jacalin を作製するために、T 構造糖鎖を固定化したアフィニティークラムを作製した。

【使用器具・試薬】

- ・ T-p アミノフェニル(T-pAP)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)

【手順】

1. T-p ニトロフェニル(T-pNP)をアミノ化して T-pAP へ変換した。(詳細は 2-2-6.を参照)
2. 変換した T-pAP を HiTrap NHS-activated HP に固定化し、T 構造糖鎖固定化カラムを作製した。(詳細は 2-2-7.を参照)

2-2-2. ST 構造糖鎖固定化カラムの作製

IgA1 糖鎖の一つである ST 構造糖鎖を認識しやすい Jacalin を作製するために、ST 構造糖鎖を固定化したアフィニティークラムを作製した。

【使用機器・試薬】

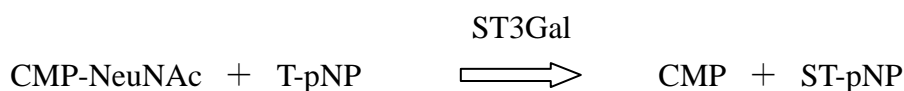
- ・ ST-p アミノフェニル(ST-pAP)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)

【手順】

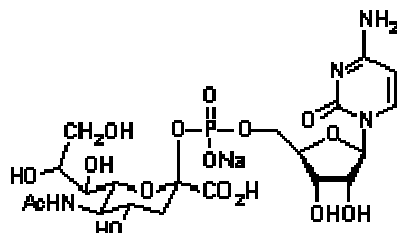
1. ST-p ニトロフェニル(ST-pNP)をアミノ化して ST-pAP へ変換した。(詳細は 2-2-6. を参照)
2. 変換した ST-pAP を HiTrap NHS-activated HP に固定化し、ST 構造糖鎖固定化カラムを作製した。(詳細は 2-2-7.を参照)

2-2-2-1. T 構造糖鎖の ST 構造糖鎖への変換

T-pNP にシアル酸糖転移酵素 (α -2,3-Gal-sialyltransferase; ST3Gal) を作用させ、ST-pNP へ変換した。ST3Gal は CMP-NeuNAc から糖タンパク質や糖脂質の非還元末端にシアル酸を転移する反応を促進する酵素である。反応は以下のように進行すると考えられる。



※CMP-NeuNAc: シチジン-5'-リン酸シアル酸



【使用試薬】

- Reaction buffer
→ 50mM MES、2mM CaCl₂、2mM MnCl₂、10mM MgCl₂、0.6% Triton-X100、100mM CMP-NeuNAc

【手順】

1. Reaction buffer 100 μ l に T-pNP 3.5mg と ST3Gal 100mU(120 μ l)を加えた。
2. 37 $^{\circ}$ C、4 日間インキュベートして、反応を促進させた。(ローテーター)
3. 熱湯で 3~5 分加熱して反応を停止させて、凍結乾燥した。

2-2-3. dST 構造糖鎖固定化カラムの作製

IgA1 糖鎖の一つであるdST 構造糖鎖を認識しやすいJacalinを作製するために、dST 構造糖鎖を固定化したアフィニティークラムを作製した。

【使用機器・試薬】

- ・ dST-p アミノフェニル(dST-pAP)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)

【手順】

1. dST-p ニトロフェニル(dST-pNP)をアミノ化して dST-pAP へ変換した。(詳細は 2-2-6.を参照)
2. 変換した dST-pAP を HiTrap NHS-activated HP に固定化し、dST 構造糖鎖固定化カラムを作製した。(詳細は 2-2-7.を参照)

2-2-3-1. 糖転移酵素作製(ST6GalNAc- I)

ST-pNP を dST-pNP への変換をする際に必要な酵素を作製した。

【使用機器・試薬】

- ・ ST6GalNAc- I stock (GlycoGene)
- ・ Anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA)
- ・ アジ化ナトリウム (Wako)
- ・ 塩化ナトリウム (Wako)
- ・ Tris buffered-saline (pH7.0)
→150mM 塩化ナトリウムを含む 10mM Tris-HCl buffer
- ・ Tris 0.6057g、塩化ナトリウム 4.35g を脱イオン水で 500mlになるように調製した後、塩酸で pH7.0 に調節した。

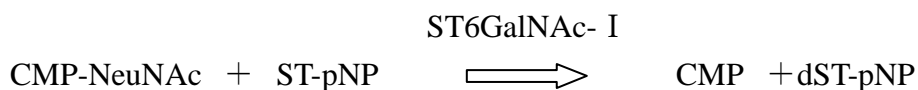
【手順】

1. ST6GalNAc- I stock(10ml)を 4℃で溶かした。
2. 終濃度が以下の組成になるようにそれぞれの溶液に加えた。
3. 0.05% アジ化ナトリウム (粉末で 5mg)
4. 150mM 塩化ナトリウム (粉末で 87mg)
5. 200 μ l の Anti-FLAG M2 affinity gel (50% 懸濁液)を加え、ローテーターを用いて 4℃で一晩穏やかに攪拌した。

6. 4℃、2000rpm で 5 分間遠心して、Anti-FLAG M2 affinity gel を沈殿させた。
 7. pH7.0 の緩衝液 Tris buffered-saline で Anti-FLAG M2 affinity gel を 2-3 回洗浄し、50% 懸濁液になるように緩衝液を加えた。
 8. 必要量ずつ分注して-80℃で保存した。(凍結融解を繰り返すことにより活性の減衰が認められる。)
- ※すべての作業は氷上で行い、試薬はよく冷えたものを使用した。また、Affinity gel の吸着を防ぐため、シリコンコートされたチップ及びチューブ類を使用した。

2-2-3-2. ST 構造糖鎖の dST 構造糖鎖への変換

ST-pNP にシアル酸転移酵素(α 2,6-Sialyltransferase- I ;ST6GalNAc- I)を作用させて dST-pNP へ変換した。ST6GalNAc- I は CMP-NeuNAc から糖タンパク質や糖脂質の非還元末端にシアル酸を転移する反応を促進する酵素である。反応は以下のように進行すると考えられる。



【使用試薬】

- Reaction buffer
→50mM MES、2mM CaCl₂、2mM MnCl₂、10mM MgCl₂、0.6% Triton-X100、100mM CMP-NeuNAc

【手順】

1. Reaction buffer 100μl に ST-pNP 3.5mg と ST6GalNAc- I 50mU(70μl)を加えた。
2. 37℃、4 日間インキュベートし、反応を促進させた。(ローテーター)
3. 熱湯で 3～5 分加熱して反応を停止させた。
4. 遠心分離(1500rpm、30 分)で酵素(ゲル)を沈殿させて上澄みを回収し、再度凍結乾燥を行った。

2-2-4. Tn 構造糖鎖固定化カラムの作製

IgA1 糖鎖の一つである Tn 構造糖鎖を認識しやすい Jacalin を作製するために、Tn 構造糖鎖を固定化したアフィニティーカラムを作製した。

【使用機器・試薬】

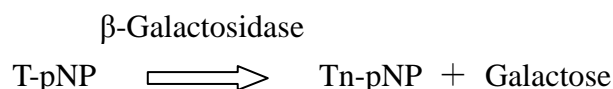
- ・ Tn-p アミノフェニル(Tn-pAP)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)

【手順】

1. Tn-p ニトロフェニル(Tn-pNP)をアミノ化して Tn-pAP へ変換した。(詳細は 2-2-6. を参照)
2. 変換した Tn-pAP を HiTrap NHS-activated HP に固定化し、Tn 構造糖鎖固定化カラムを作製した。(詳細は 2-2-7.を参照)

2-2-4-1. T 構造糖鎖の Tn 構造糖鎖への変換

T-pNP に β -Galactosidase を作用させて Tn-pNP へ変換した。 β -Galactosidase は Galactose と β 位でグリコシド結合している糖とを加水分解する酵素である。反応は以下のように進行すると考えられる。



【使用試薬】

- ・ PBS(pH7.4)

【手順】

1. PBS 100 μ l に T-pNP 3.5mg と β -Galactosidase 600U(200 μ l)を加えた。
2. 37 $^{\circ}$ C、4 日間インキュベートして反応を促進させた。(ローテーター)
3. 熱湯で 3～5 分加熱して反応を停止させた。
4. 遠心分離(1500rpm、30 分)で酵素(ゲル)を沈殿させて上澄みを回収し、凍結乾燥を行った。

2-2-5. STn 構造糖鎖固定化カラムの作製

IgA1 糖鎖の一つである STn 構造糖鎖を認識しやすい Jacalin を作製するために、STn 構造糖鎖を固定化したアフィニティークラムを作製した。

【使用機器・試薬】

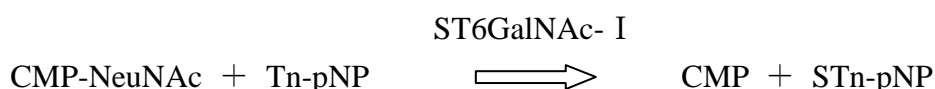
- ・ STn-p アミノフェニル(STn-pAP)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)

【手順】

1. Tn-p ニトロフェニル(Tn-pNP)をアミノ化して STn-pAP へ変換した。(詳細は 2-2-6. を参照)
2. 変換した STn-pAP を HiTrap NHS-activated HP に固定化し、STn 構造糖鎖固定化カラムを作製した。(詳細は 2-2-7. を参照)

2-2-5-1. Tn 構造糖鎖の STn 構造糖鎖への変換

Tn-pNP にシアル酸転移酵素(α 2,6-Sialyltransferase- I ;ST6GalNAc- I)を作用させて STn-pNP へ変換した。ST6GalNAc- I は CMP-NeuNAc から糖タンパク質や糖脂質の非還元末端にシアル酸を転移する反応を促進する酵素である。反応は以下のように進行すると考えられる。



【使用試薬】

- ・ Reaction buffer
→50mM MES、2mM CaCl₂、2mM MnCl₂、10mM MgCl₂、0.6% Triton-X100、100mM CMP-NeuNAc

【手順】

1. Reaction buffer 100 μ l に Tn-pNP 3.5mg と ST6GalNAc- I 50mU(70 μ l)を加えた。
2. 37 $^{\circ}$ C、4 日間インキュベートして反応を促進させた。(ローテーター)
3. 熱湯で 3～5 分加熱して反応を停止させた。

4. 遠心分離(1500rpm、30 分)で酵素(ゲル)を沈殿させて上澄みを回収し、凍結乾燥を行った。

2-2-6. T、ST、dST、Tn、STn-pNP のアミノ化

T、ST、dST、Tn、STn-pNP を HiTrap NHS-activated HP へ固定化するために、ニトロ基をアミノ化した。

【使用試薬】

- ・ 0.1M チオ硫酸ナトリウム水溶液(Wako)
- ・ ニンヒドリン溶液(Wako)
- ・ シアノ水素化ホウ素ナトリウム(Wako)

【手順】

1. T-pNP 3.5mg を 0.1M チオ硫酸ナトリウム水溶液 5ml 中で室温、1 日間激しく攪拌した。
2. その反応液中にシアノ水素化ホウ素ナトリウム 72mg を加えて、室温で 2 日間還元アミノ化を行った。
3. 反応後の溶液の一部をニンヒドリン溶液で呈色することで、Tn-pNP のアミノ化を確認した。

2-2-7. T、ST、dST、Tn、STn 構造糖鎖のカラムへの固定化

IgA1 のもつ各糖鎖をそれぞれ認識しやすい Jacalin を精製するために、T、ST、dST、Tn、STn 構造糖鎖をカラムに固定化した。

【使用器具・試薬】

- ・ PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(1ml) (GE Healthcare)
- ・ 1mM 塩酸(Wako)
- ・ Coupling buffer (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.2M 炭酸水素ナトリウム溶液
- ・ Buffer A(Blocking buffer) (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M エタノールアミン溶液
- ・ Buffer B (pH4.0)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M 酢酸 buffer

- Start buffer (pH7.0)
→0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸 buffer
- 保存溶液
→0.1% アジ化ナトリウムを含む Start buffer

【手順】

1. 塩酸を氷冷し、固定化させるサンプルをサンプル濃度が 0.5～10mg/ml になるように Coupling buffer に溶かした。
2. カラム上部のキャップを外して気泡を除くために塩酸を垂らした。その後、インレットのコネクターを付属のシリンジ用アダプターに交換した。
3. アウトレットを垂直にポキッと折り、シリンジで塩酸を 1ml/min 程度の流速で 2ml 流し、カラム内部のイソプロパノールを置換した。この操作を 3 回繰り返した。
4. 塩酸を流し終えたら直ちにサンプル溶液を流した。サンプル溶液はポンプを使って 1ml/min で 45 分循環させた。
5. Buffer A を 2ml×3 回、次に Buffer B を 2ml×3 回、再び Buffer A を 2ml×3 回流した。全てシリンジで流し、流速は 1ml/min 程度で行った。
6. 室温で 30 分静置した。
7. Buffer B を 2ml×3 回、次に Buffer A を 2ml×3 回、再び Buffer B を 2ml×3 回流した。全てシリンジで流し、流速は 1ml/min 程度で行った。
8. Start buffer 2ml を流し、保存溶液を充填して保存した。(4℃)

2-2-8. T、ST、dST、Tn、STn 認識 Jacalin の精製

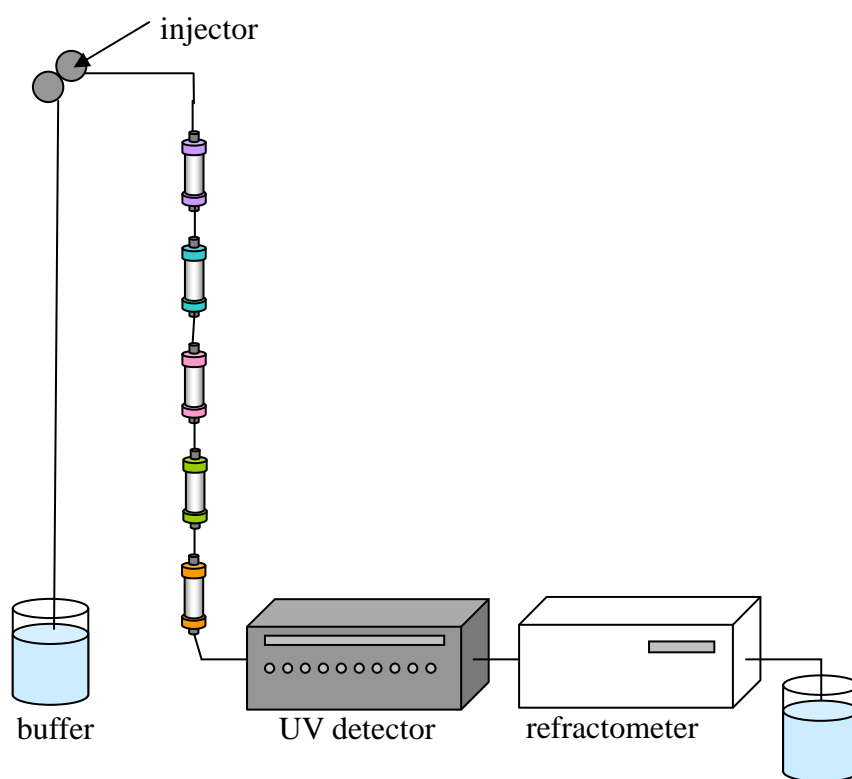
p-AP 糖鎖固定化カラムを用いて Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin からそれぞれ T、ST、dST、Tn、STn 構造のみを認識する 5 種類の Jacalin を精製した。

【使用器具・試薬】

- PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem.)
- VARIABLE WAVELENGTH UV MONITOR(HITACHI)
- Shodex RI-72(shodex)
- CENTRICUT(クラボウ)
- T-pAP 固定化カラム
- ST-pAP 固定化カラム
- dST-pAP 固定化カラム
- Tn-pAP 固定化カラム

- STn-pAP 固定化カラム
- Start buffer (pH7.4)
→175mM Tris-HCl buffer
- Elute buffer
→0.1M ガラクトースを含む Start buffer
- 保存溶液
→0.1% アジ化ナトリウムを含む Start buffer

【装置図】



2-3. 精製 Jacalin と糖とのアフィニティー測定

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びその Jacalin を糖鎖固定化カラムによって分離・精製した 5 種類の Jacalin と、IgA1 糖鎖を構成する 3 種類の単糖とのアフィニティーを調査した。

2-3-1. 蛍光強度測定の実理

一般に分子を構成している電子のエネルギーレベルはとびとびの値をとっている。分子が基底状態のときその電子は S_0 と呼ばれるエネルギーレベルにある。そこへエネルギーの高い光を照射すると、電子は光のエネルギーを吸収して、 S_0 よりも高いエネルギーレベルへ遷移する。この状態を励起状態という。励起した電子は周りの分子と衝突して、いくらかエネルギーを失って S_1 と呼ぶ、励起状態の最低エネルギーレベルになる。また電子が励起する際に照射される光は高いエネルギーが必要で、可視光よりも短い波長でなければ励起しない。

光を吸収し、励起した電子は、 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ 秒で基底状態へ遷移する。そのとき光を発する発光過程と、光を発しない無輻射過程がある。

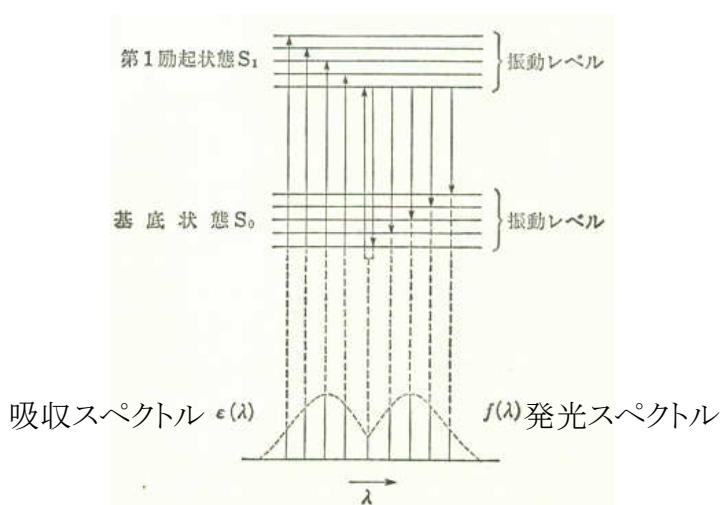


Fig.2-3-1. エネルギーレベルと吸収・発光スペクトル⁽²⁴⁾

励起状態の分子は基底状態のときに比べて、エネルギーが高く、不安定なために周りの分子と相互作用を起こしやすい。相互作用して複合体を形成すると、エネルギーが消費されて、その分の発光が減少する。これを消光効果という⁽²⁵⁾。

2-3-2. 精製 Jacalin – Gal 混合溶液の蛍光測定

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びその Jacalin を糖鎖固定化カラムによって分離・精製した 5 種類の Jacalin と、ガラクトース(Gal)とを混合して Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

2-3-2-1. Jacalin – Gal 混合溶液

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin と Gal とを混合したときの Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- Jacalin
- Galactose(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. Jacalin、Gal をそれぞれ PBS に溶解。Jacalin は 0.025mg/ml になるように希釈し、Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
2. Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
3. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-2-2. ST-Jacalin – Gal 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した ST-Jacalin と Gal とを混合したときの ST-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ST-Jacalin
- Galactose(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. ST-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. Gal は PBS に溶解。Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. ST-Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で ST-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-2-3. T-Jacalin – Gal 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した T-Jacalin と Gal とを混合したときの T-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- T-Jacalin
- Galactose(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. T-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. Gal は PBS に溶解。Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. T-Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で T-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-2-4. Tn-Jacalin – Gal 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した Tn-Jacalin と Gal とを混合したときの Tn-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- Tn-Jacalin
- Galactose(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. Tn-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. Gal は PBS に溶解。Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. Tn-Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-2-5. STn-Jacalin – Gal 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した STn-Jacalin と Gal とを混合したときの STn-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- STn-Jacalin
- Galactose(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. STn-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. Gal は PBS に溶解。Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. STn-Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で STn-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-2-6. dST-Jacalin – Gal 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した dST-Jacalin と Gal とを混合したときの dST-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- dST-Jacalin
- Galactose(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. dST-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. Gal は PBS に溶解。Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. dST-Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で dST-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-3. 精製 Jacalin – GalNAc 混合溶液の蛍光測定

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びその Jacalin を糖鎖固定化カラムによって分離・精製した 5 種類の Jacalin と、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)とを混合して Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

2-3-3-1. Jacalin – GalNAc 混合溶液

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin と GalNAc とを混合したときの Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ・ Jacalin
- ・ N-acetyl-D-galactosamine(SIGMA)
- ・ PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- ・ F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. Jacalin、GalNAcをそれぞれ PBS に溶解。Jacalin は 0.025mg/ml になるように希釈し、GalNAc は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
2. Jacalin、GalNAc 溶液を同じ体積で混合
3. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-3-2. ST-Jacalin – GalNAc 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した ST-Jacalin と GalNAc とを混合したときの ST-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ST-Jacalin
- N-acetyl-D-galactosamine(SIGMA)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. ST-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. GalNAc は PBS に溶解。GalNAc は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. ST-Jacalin、GalNAc 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で ST-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-3-3. T-Jacalin – GalNAc 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した T-Jacalin と GalNAc とを混合したときの T-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- T-Jacalin
- N-acetyl-D-galactosamine(SIGMA)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. T-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. GalNAc は PBS に溶解。GalNAc は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. T-Jacalin、GalNAc 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で T-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-3-4. Tn-Jacalin – GalNAc 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した Tn-Jacalin と GalNAc とを混合したときの Tn-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- Tn-Jacalin
- N-acetyl-D-galactosamine(SIGMA)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. Tn-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. GalNAc は PBS に溶解。GalNAc は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. Tn-Jacalin、GalNAc 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-3-5. STn-Jacalin – GalNAc 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した STn-Jacalin と GalNAc とを混合したときの STn-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- STn-Jacalin
- N-acetyl-D-galactosamine(SIGMA)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. STn-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. GalNAc は PBS に溶解。GalNAc は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. STn-Jacalin、GalNAc 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で STn-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-3-6. dST-Jacalin – GalNAc 混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した dST-Jacalin と GalNAc とを混合したときの dST-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- dST-Jacalin
- N-acetyl-D-galactosamine(SIGMA)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. dST-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. GalNAc は PBS に溶解。GalNAc は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. dST-Jacalin、GalNAc 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で dST-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-4. 精製 Jacalin – シアル酸混合溶液の蛍光測定

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びその Jacalin を糖鎖固定化カラムによって分離・精製した 5 種類の Jacalin と、N-アセチルノイラミン酸(シアル酸)とを混合して Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

2-3-4-1 .Jacalin – シアル酸混合溶液

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin とシアル酸とを混合したときの Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- Jacalin
- N-アセチルノイラミン酸(Wako)
- PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. Jacalin、シアル酸をそれぞれ PBS に溶解。Jacalin は 0.025mg/ml になるように希釈し、シアル酸は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
2. Jacalin、シアル酸溶液を同じ体積で混合
3. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-4-2. ST-Jacalin – シアル酸混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した ST-Jacalin とシアル酸とを混合したときの ST-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ・ ST-Jacalin
- ・ N-アセチルノイラミン酸(Wako)
- ・ PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- ・ F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. ST-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. シアル酸は PBS に溶解。シアル酸は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. ST-Jacalin、シアル酸溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で ST-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-4-3. T-Jacalin – シアル酸混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した T-Jacalin とシアル酸とを混合したときの T-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ・ T-Jacalin
- ・ N-アセチルノイラミン酸(Wako)
- ・ PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- ・ F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. T-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. シアル酸は PBS に溶解。シアル酸は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. T-Jacalin、シアル酸溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で T-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-4-4. Tn-Jacalin – シアル酸混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した Tn-Jacalin とシアル酸とを混合したときの Tn-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ・ Tn-Jacalin
- ・ N-アセチルノイラミン酸(Wako)
- ・ PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- ・ F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. Tn-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. シアル酸は PBS に溶解。シアル酸は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. Tn-Jacalin、シアル酸溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-4-5. STn-Jacalin – シアル酸混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した STn-Jacalin とシアル酸とを混合したときの STn-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

- ・ STn-Jacalin
- ・ N-アセチルノイラミン酸(Wako)
- ・ PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- ・ F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. STn-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. Gal は PBS に溶解。Gal は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. STn-Jacalin、Gal 溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で STn-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-4-6. dST-Jacalin – シアル酸混合溶液

アフィニティーカラムで分離・精製した dST-Jacalin とシアル酸とを混合したときの dST-Jacalin の蛍光強度の変化を測定した。

【使用試薬・機器】

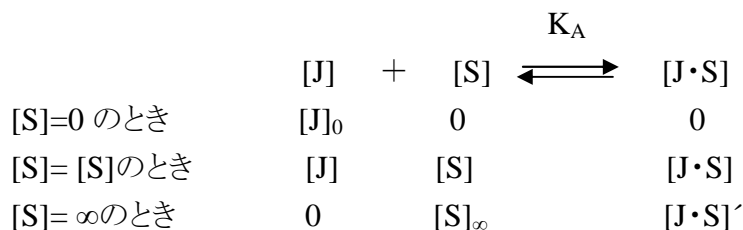
- ・ dST-Jacalin
- ・ N-アセチルノイラミン酸(Wako)
- ・ PBS
→137mM NaCl、20mM Na₂HPO₄・12H₂O、1.5mM KH₂PO₄
- ・ F-2000 形分光蛍光光度計(HITACHI)

【手順】

1. dST-Jacalin の濃度を BCA 法で決定し、0.025mg/ml になるように希釈した。
2. シアル酸は PBS に溶解。シアル酸は 5 倍ずつ希釈して複数の溶液を作製
3. dST-Jacalin、シアル酸溶液を同じ体積で混合
4. 励起波長 295nm、蛍光波長 330nm で dST-Jacalin のトリプトファン蛍光を測定

2-3-5. アフィニティーの算出

測定した Jacalin の蛍光強度から Jacalin と糖との結合定数を算出する。



$$K_A = \frac{[J \cdot S]}{[J][S]} \dots \textcircled{1}$$

[S]=0 のときの蛍光強度 $\cdots F_0$		$F_0=[J]_0$
[S]= [S]のときの蛍光強度 $\cdots F$	とすると	$F=[J \cdot S] + [J]$
[S]= ∞ のときの蛍光強度 $\cdots F_\infty$		$F_\infty=[J \cdot S]'$

[J]=[J]₀ は同じ状態、[J・S]'=[J・S]は同じ状態であるので

$$[J] = ([J \cdot S] + [J]) - [J \cdot S]' = F - F_\infty \dots \textcircled{2}$$

$$\begin{aligned} [J \cdot S] &= [J]_0 - [J] + [J \cdot S] \\ &= [J]_0 - (F - [J \cdot S]) + [J \cdot S] \\ &= F_0 - F + 2[J \cdot S] \\ &= -(F_0 - F) \dots \textcircled{3} \end{aligned}$$

②③を①式へ代入すると

$$K_A = -(F_0 - F) / (F - F_\infty)[S]$$

両辺に常用対数をとると

$$\begin{aligned} \log(K_A) &= -\log \{ (F_0 - F) / (F - F_\infty)[S] \} \\ &= -\log[S] - \log \{ (F_0 - F) / (F - F_\infty) \} \\ \log[S] &= \log(K_A) + \log \{ (F_0 - F) / (F - F_\infty) \} \dots \textcircled{4} \end{aligned}$$

④式より $\log \{ (F_0 - F) / (F - F_\infty) \}$ に対する $\log[S]$ をプロットする。

このときの x 軸との交点が $\log(K_A)$ であるので、

そこから結合定数 K_A を算出した。

※ F_∞ は Fig.2-3-5. を用いて、 $F=F_\infty$ として算出する

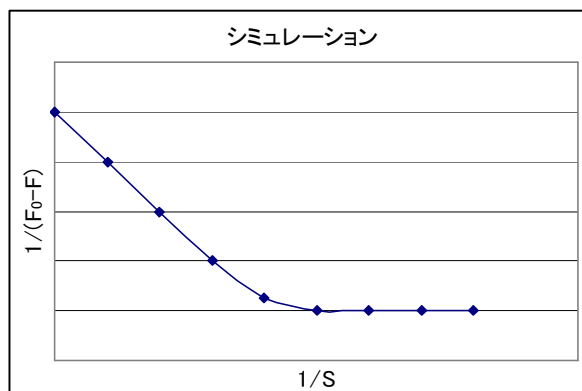


Fig.2-3-5. 1/(F₀-F)に対する 1/[S]

2-4. 精製 Jacalin 固定化カラムを用いた IgA1 の精製

IgA 腎症診断法の開発において、IgA1 糖鎖濃度を測定するときのスタンダードとなる IgA1 を作製するために、それぞれ T、ST、dST、Tn、STn-pAP 固定化カラムで精製した Jacalin を固定化させたカラムを作製し、血漿から精製 Jacalin に特異的に結合する IgA1 を精製した。

2-4-1. 精製 Jacalin 固定化カラムの作製

2-2 で作製した Jacalin を固定化させたカラムを作製した。

【使用試薬・機器】

- ・ 1mM 塩酸(Wako)
- ・ Coupling buffer(pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.2M 炭酸水素ナトリウム溶液
- ・ Buffer A(Blocking buffer) (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M エタノールアミン溶液
- ・ Buffer B(pH4.0)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M 酢酸 Buffer
- ・ Start buffer(pH7.0)
→0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸 Buffer
- ・ 保存溶液
→0.1% アジ化ナトリウムを含む start buffer
- ・ PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- ・ HiTrap NHS-activated HP(1ml) (GE Healthcare)

【固定化したもの】

- ・ T-Jacalin
- ・ ST-Jacalin
- ・ dST-Jacalin
- ・ Tn-Jacalin
- ・ STn-Jacalin

【手順】

1. 塩酸を氷冷し、固定化させるサンプルを濃度が 0.5～10mg/ml になるように Coupling buffer に溶かした。
2. カラム上部のキャップを外して気泡を除くために塩酸を垂らした。その後、インレットのコネクターを付属のシリンジ用アダプターに交換した。
3. アウトレットを垂直にポキッと折り、シリンジで塩酸を 1ml/min 程度の流速で 2ml 流してカラム内部のイソプロパノールを置換した。この操作を 3 回繰り返した。
4. 塩酸を流し終えたら直ちにサンプル溶液を流した。サンプル溶液はポンプを使って 1ml/min で 45 分間循環させた。
5. Buffer A を 2ml×3 回、次に Buffer B を 2ml×3 回、再び Buffer A を 2ml×3 回流した。全てシリンジを使って流し、流速は 1ml/min 程度で行った。
6. 室温で 30 分間静置した。
7. Buffer B を 2ml×3 回、次に Buffer A を 2ml×3 回、再び Buffer B を 2ml かける 3 回流した。全てシリンジを使って流し、流速は 1ml/min 程度で行った。
8. Start buffer 2ml を流し、保存溶液を充填して保存した。(4℃)

2-4-2. T、ST、dST、Tn、STn 糖鎖を持つ IgA1 の精製

T、ST、dST、Tn、STn-Jacalin 固定化カラムをそれぞれ用いて、T、ST、dST、Tn、STn 構造の糖鎖を持つ IgA1 を精製した。

【使用試薬・機器】

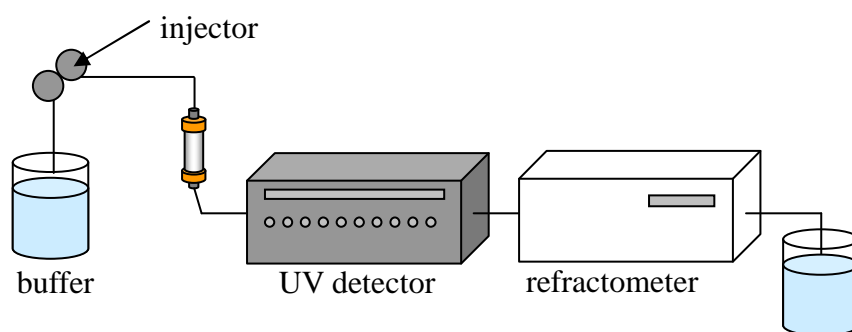
- Start buffer(pH7.4)
→175mM Tris-HCl buffer
- Elute buffer
→0.1M ガラクトースを含む start buffer
- 保存溶液
→0.1% アジ化ナトリウムを含む start buffer
- PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- VARIABLE WAVELENGTH UV MONITOR(HITACHI)
- Shodex RI-72(shodex)
- CENTRICUT(クラボウ)
- T-Jacalin 固定化カラム
- ST-Jacalin 固定化カラム
- dST-Jacalin 固定化カラム

- Tn-Jacalin 固定化カラム
- STn-Jacalin 固定化カラム

【手順】

1. 装置を図のように組んだ。
2. UV を 280nm、ポンプを 200 μ l/min の流速に設定した。
3. start buffer を流して平衡化させた。
4. サンプルを入れてカラムに吸着させ、非吸着部分を溶出した。
5. Buffer を elute buffer に替えてそれぞれのカラムに吸着した部分を溶出して、再びカラムを平衡化させた。
6. それぞれのカラムに吸着した分画を 2000rpm、60min で遠心濃縮した。
7. カラムを使い終わったら保存溶液を充填させて保存した。(4°C)

【装置図】

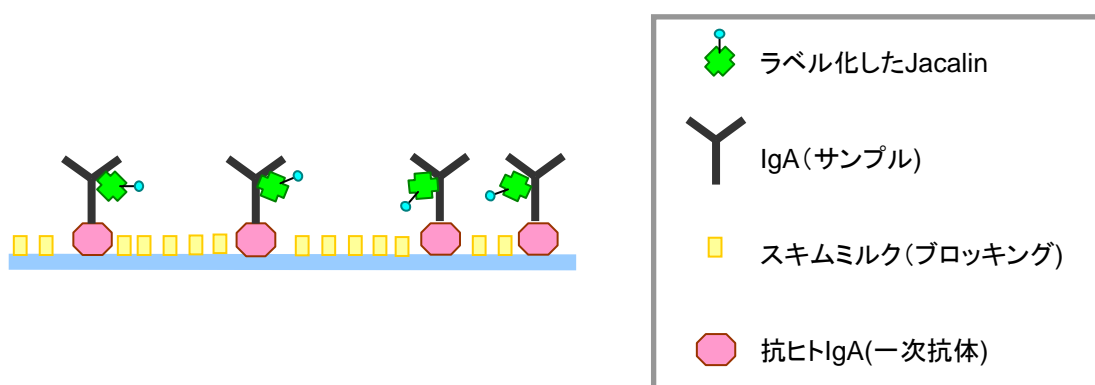


2-5. 糖鎖不全 IgA1 濃度測定

精製 Jacalin と精製 IgA1 を用いて血清中の IgA1 糖鎖濃度を測定した。

2-5-1. レクチン結合 ELISA 法について

IgA1 糖鎖濃度を測定するに当たり、ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法をベースにしたレクチン結合 ELISA 法を用いた。ELISA 法との違いは二次抗体に抗体を使わず、ラベル化したレクチンを用いる点である。今回は Horse Radish Peroxidase でラベル化した Jacalin を用いた。



2-5-2. 精製 Jacalin のラベル化

精製 Jacalin を Horse Radish Peroxidase ラベル化キット(Peroxidase Labeling Kit-NH₂)を使ってラベル化した。

【使用試薬】

- Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (同仁化学)

【ラベル化した物質】

- T-Jacalin
- ST-Jacalin
- dST-Jacalin
- Tn-Jacalin
- STn-Jacalin

【手順】

1. Jacalin 200 μ g が溶液 10 μ l 中に含まれるように調製したそれぞれの Jacalin 溶液と Washing Buffer 100 μ l を Filtration Tube に加えた。
2. ピペッティングにより軽く混合したあと、8000G で 10 分間遠心した。
3. Washing Buffer 100 μ l を Filtration Tube に加え、8000G で 10 分間遠心した。
4. Reaction Buffer 10 μ l を NH₂-Reactive Peroxidase に加えてピペッティングにより溶解させた。
5. NH₂-Reactive Peroxidase を含む溶液を Jacalin が濃縮されている Filtration Tube の膜上加え、ピペッティングにより膜上の Jacalin とよく混合したあと、37℃で 2 時間反応させた。
6. Washing Buffer 100 μ l を加えて 8000G で 10 分間遠心した。
7. Storage Buffer 200 μ l を加えて 10 回程度ピペッティングし、ラベル化された Jacalin を回収、0.5ml のアシストチューブに移して冷蔵保存した。(4℃)

2-5-3. 測定方法

この測定ではサンプル 1 種類につき、総 IgA、T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 濃度を測定することができる。

①Standard について

総 IgA 濃度を測定には IRMM-ERM DA470 血漿蛋白 国際標準品(CRM470)を、T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 の濃度測定にはそれぞれ T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin 固定化カラムによって精製した IgA1 を使用した。

②一次抗体について

すべての IgA 濃度測定で Goat anti-Human IgA affinity purified を使用した。

③二次抗体・ラベル化 Jacalin について

総 IgA 濃度測定には Goat anti-Human IgA HRP conjugate を、T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 の濃度測定にはそれぞれ Horse Radish Peroxidase ラベル化した T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin を使用した。

＜算出方法について＞

総 IgA 濃度は以下のように表すことができる。

$$\text{総 IgA} = (\text{T-IgA1} + \text{ST-IgA1} + \text{dST-IgA1} + \text{Tn-IgA1} + \text{STn-IgA1}) + \text{IgA2}$$

※今回 IgA2 は測定していない。

IgA1 糖鎖の割合については以下の式で算出している。(例として T-IgA1)

$$\text{T-IgA1 比率} = \text{T-IgA1 濃度} \div \text{総 IgA 濃度} \div (\text{T-IgA1 濃度} + \text{ST-IgA1 濃度} + \text{dST-IgA1 濃度} + \text{Tn-IgA1 濃度} + \text{STn-IgA1 濃度})$$

2-6. 統計分析

Stat View を用いて、Tukey-Kramer 法で統計分析を行った。以下で $P < 0.05$ のものを*で表した。

3. 結果

3-1. Jacalin のアフィニティー測定

Jacalin と IgA1O-結合糖鎖を構成する単糖とのアフィニティーを示す。

3-1-1. 精製 Jacalin と Gal とのアフィニティー

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びアフィニティーカラムで分離・精製した ST-Jacalin、T-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin、dST-Jacalin と IgA1O-結合型糖鎖を構成する糖の一つである Gal とのアフィニティーを測定した。

3-1-1-1. Jacalin – Gal

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin と Gal とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

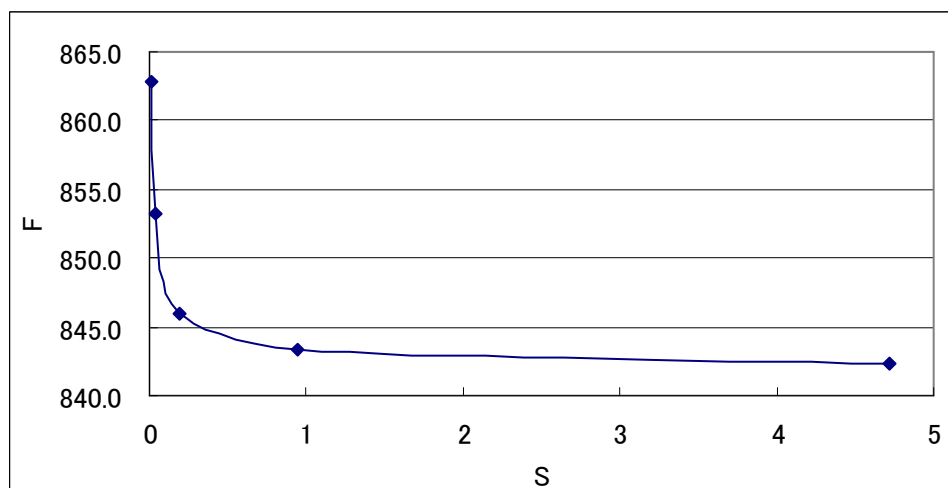


Fig.3-1-1-1a. Gal 濃度に対する精製 Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

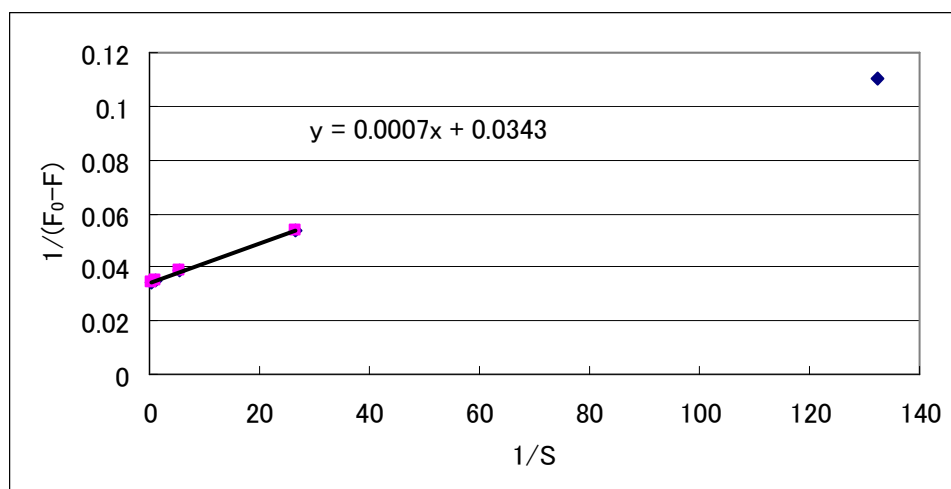


Fig3-1-1-1b.精製 Jacalin – Gal の F_{∞} 算出

Fig.3-1-1-1b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

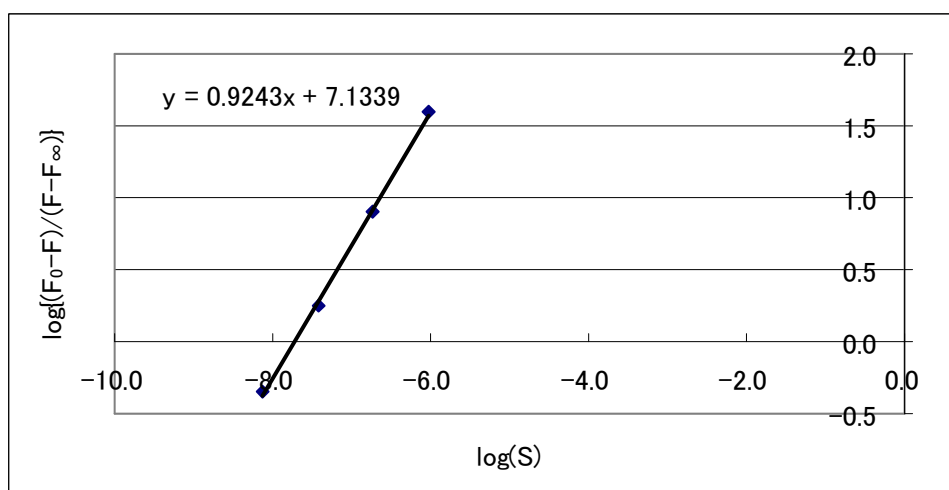


Fig3-1-1-1c.精製 Jacalin – Gal の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-1-1c のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-1-1.精製 Jacalin – Gal の結合定数 K_A (n=6)

	測定値	平均	S.D.
K_A	3.3E+07	5.3E+07	4.7E+07
	9.3E+06		
	3.0E+06		
	1.4E+08		
	5.2E+07		
	7.9E+07		

3-1-1-2. ST-Jacalin – Gal

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した ST-Jacalin と Gal とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、ST-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

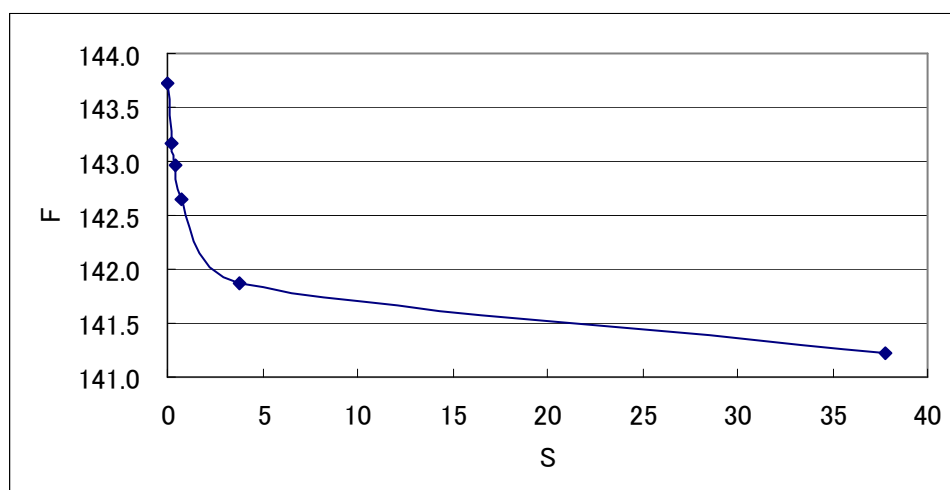


Fig.3-1-1-2a.Gal 濃度に対する ST-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

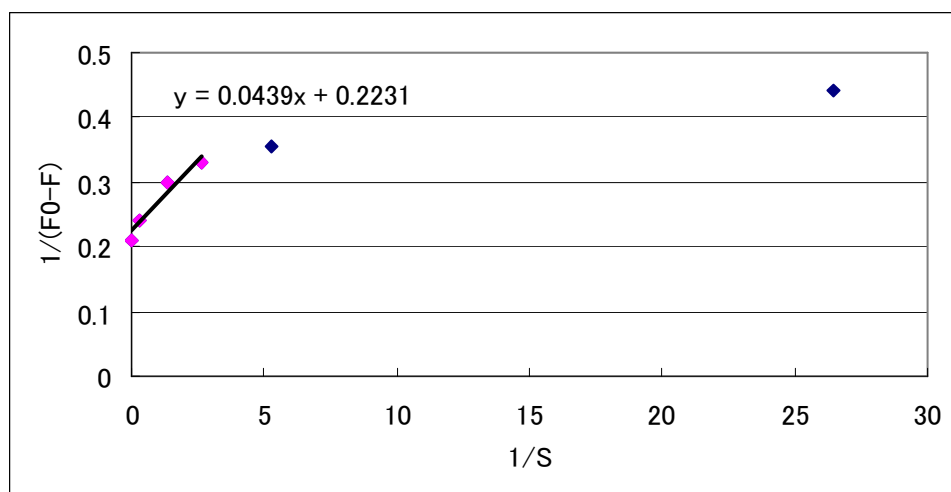


Fig3-1-1-2b.ST-Jacalin – Gal の F_{∞} 算出

Fig.3-1-1-2b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

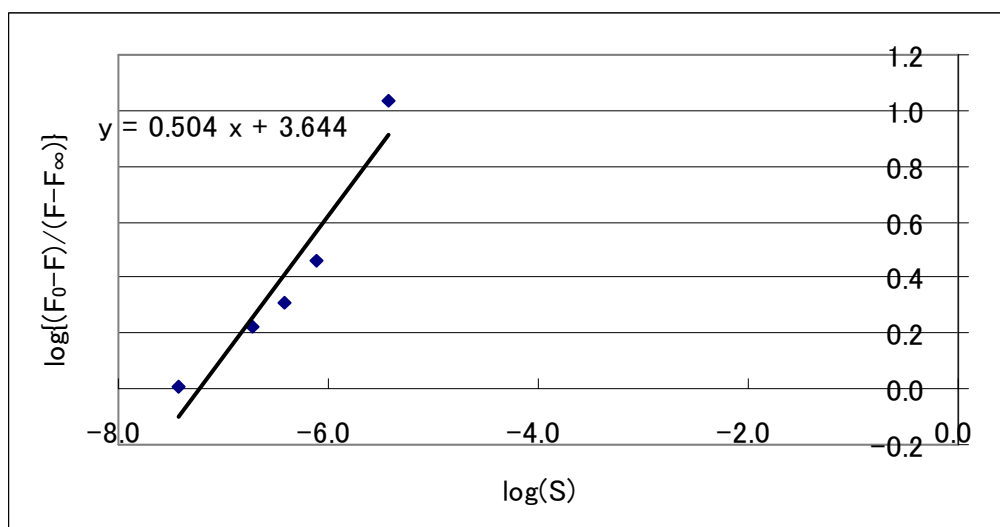


Fig3-1-1-2c.ST-Jacalin – Gal の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-1-2c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-1-2.ST-Jacalin – Gal の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.7E+07	9.7E+06	5.1E+06
	6.3E+06		
	5.9E+06		

3-1-1-3. T-Jacalin – Gal

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した T-Jacalin と Gal とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、T-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

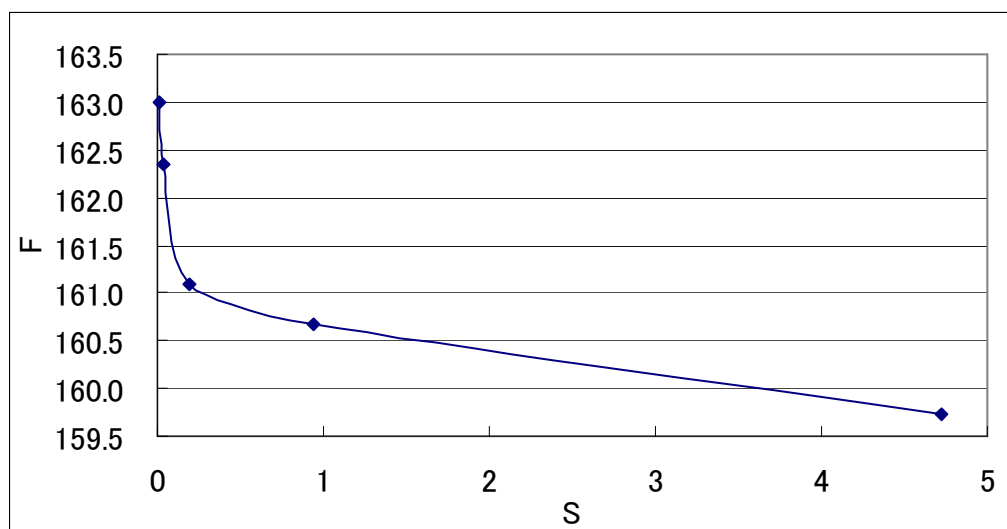


Fig.3-1-1-3a.Gal 濃度に対する T-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

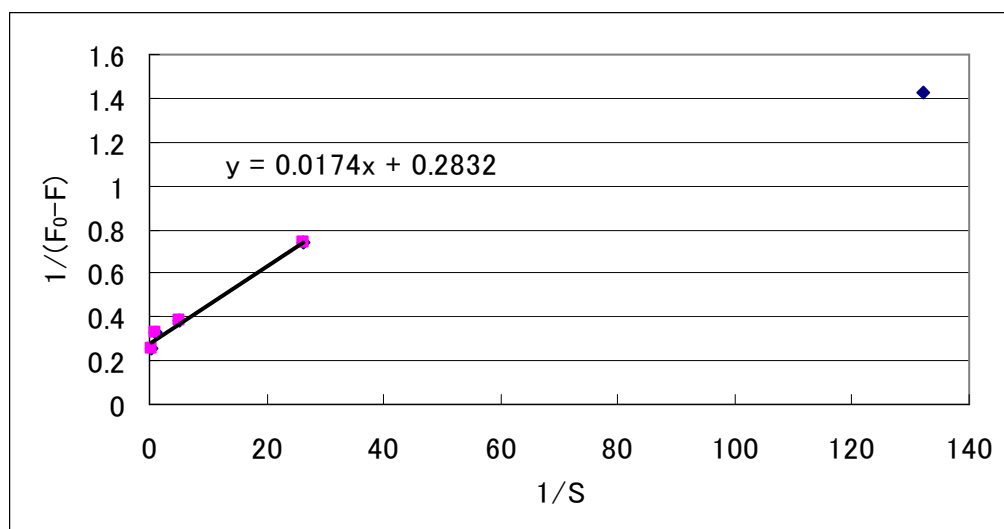


Fig3-1-1-3b.T-Jacalin – Gal の F_{∞} 算出

Fig.3-1-1-3b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

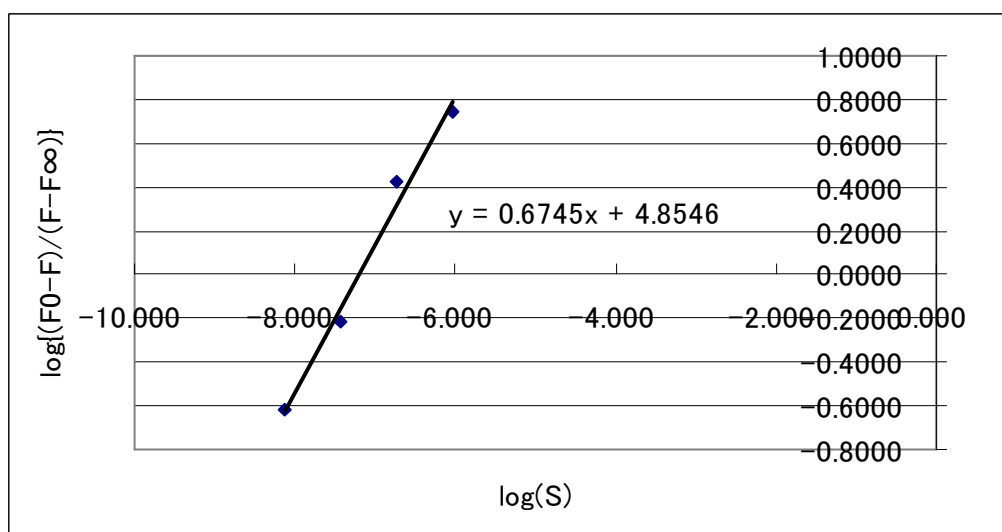


Fig3-1-1-3c.T-Jacalin – Gal の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-1-3c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-1-3.T-Jacalin – Gal の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.2E+08	4.7E+07	5.2E+07
	4.2E+06		
	1.6E+07		

3-1-1-4. Tn-Jacalin – Gal

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した Tn-Jacalin と Gal とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

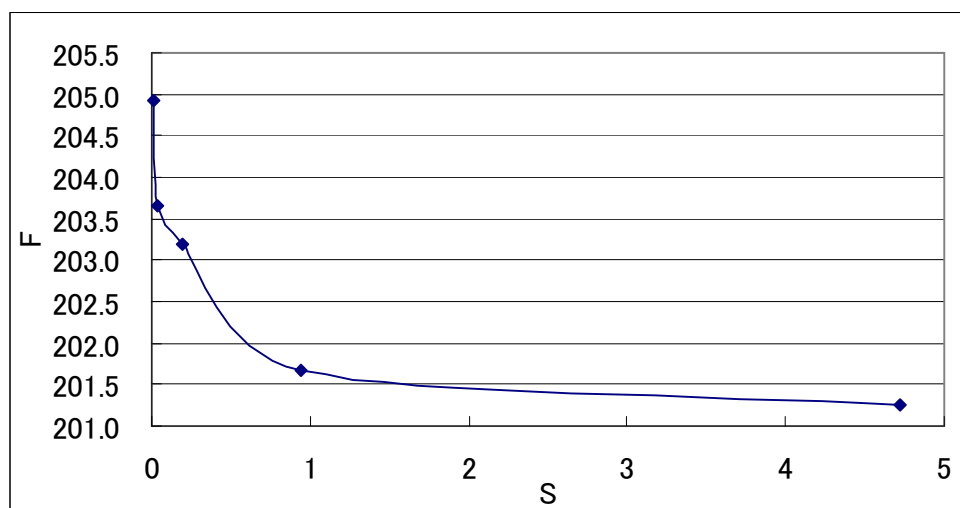


Fig.3-1-1-4a.Gal 濃度に対する Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

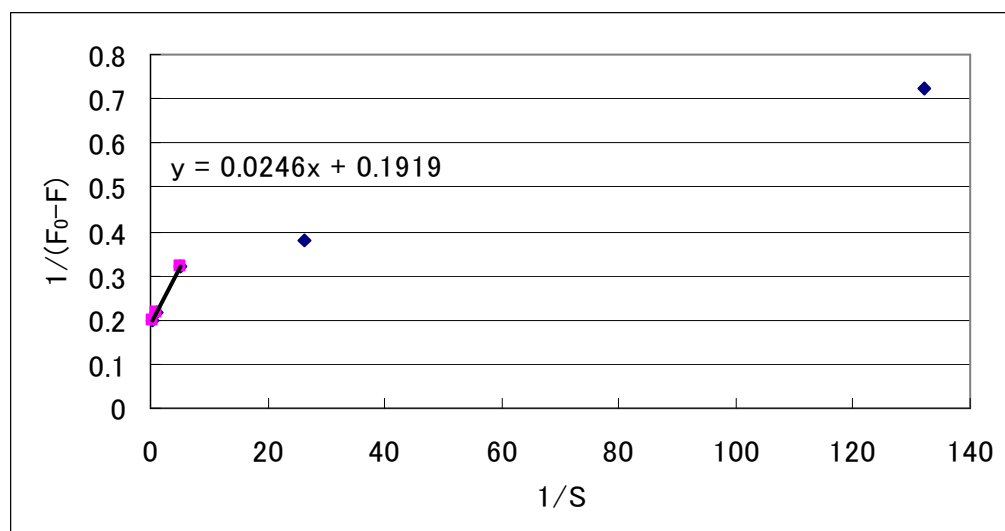


Fig3-1-1-4b.Tn-Jacalin – Gal の F_{∞} 算出

Fig.3-1-1-4b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

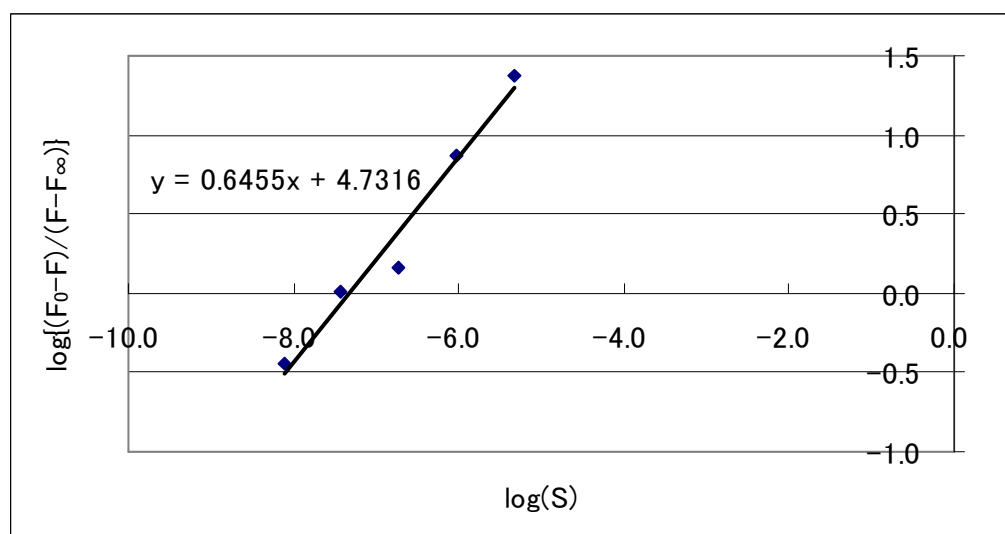


Fig3-1-1-4c.Tn-Jacalin – Gal の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-1-4c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-1-4.Tn-Jacalin – Gal の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.6E+06	9.0E+06	8.6E+06
	4.4E+06		
	2.1E+07		

3-1-1-5. STn-Jacalin – Gal

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した STn-Jacalin と Gal とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、STn-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

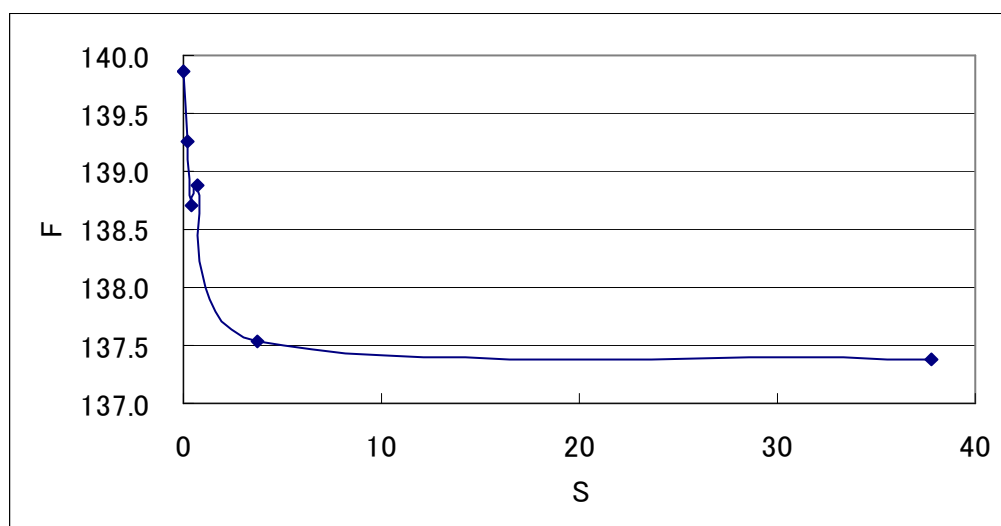


Fig.3-1-1-5a.Gal 濃度に対する STn-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

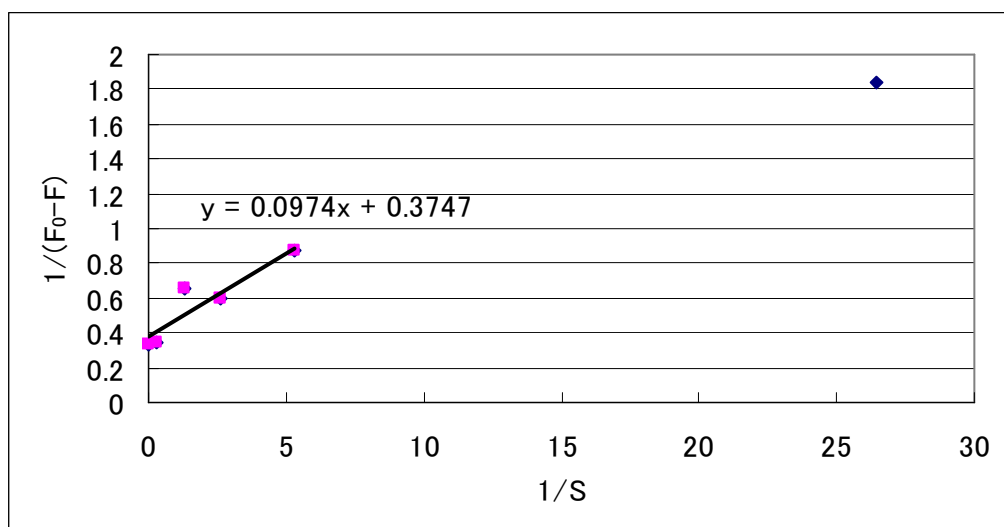


Fig3-1-1-5b.STn-Jacalin – Gal の F_{∞} 算出

Fig.3-1-1-5b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

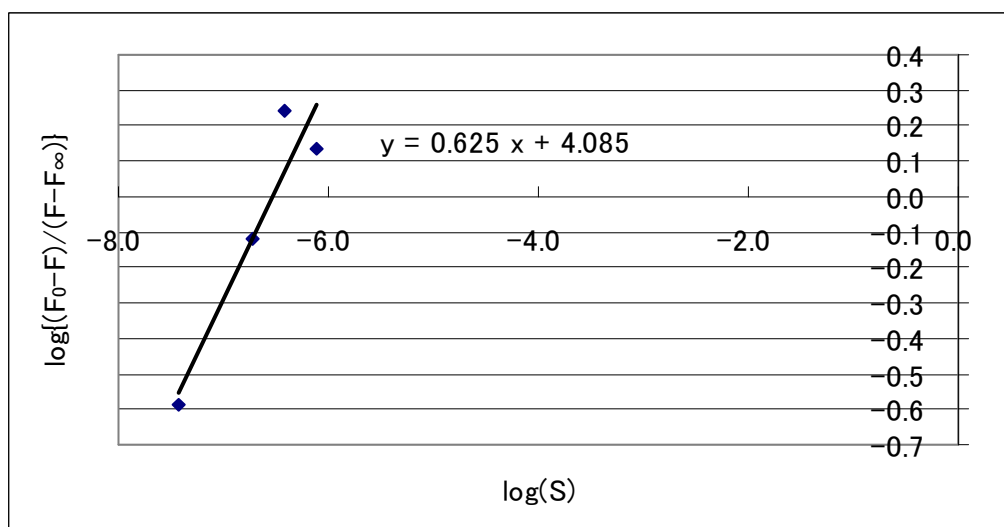


Fig3-1-1-5c.STnJacalin – Gal の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-1-5c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-1-5.STnJacalin – Gal の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	3.4E+06	1.8E+06	1.2E+06
	1.3E+06		
	6.4E+05		

3-1-1-6. dST-Jacalin – Gal

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した dST-Jacalin と Gal とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、dST-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

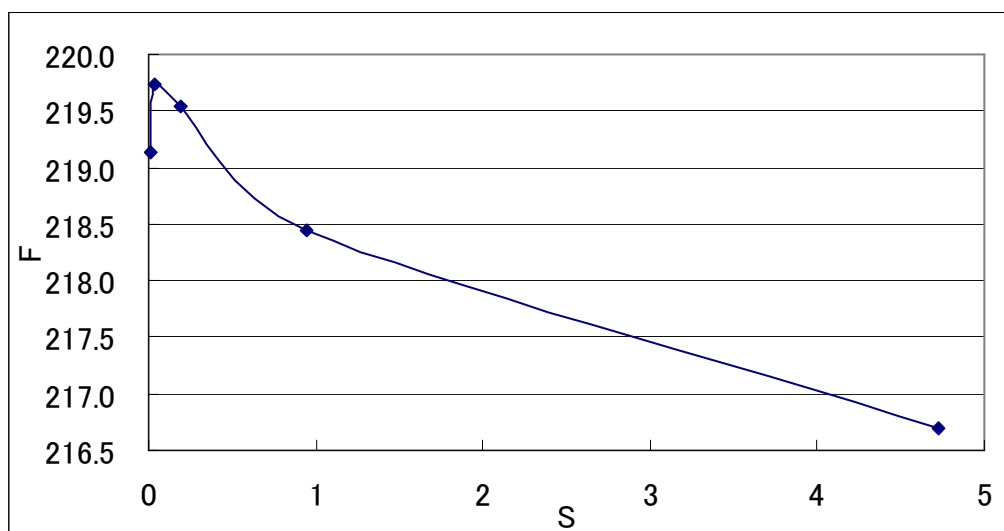


Fig.3-1-1-6a.Gal 濃度に対する dST-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

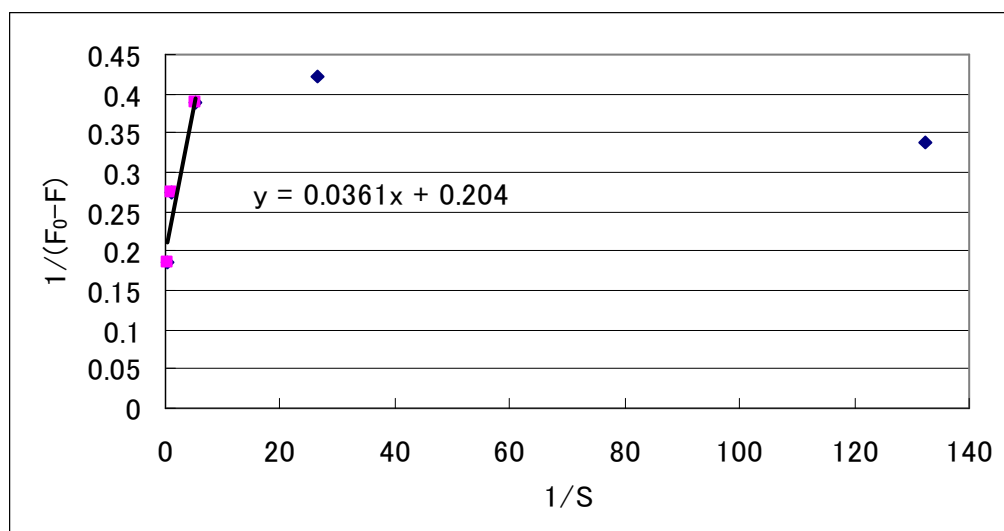


Fig3-1-1-6b.dST-Jacalin – Gal の F_∞ 算出

Fig.3-1-1-6b.から F_∞ を算出して、以下のプロットを作製した。

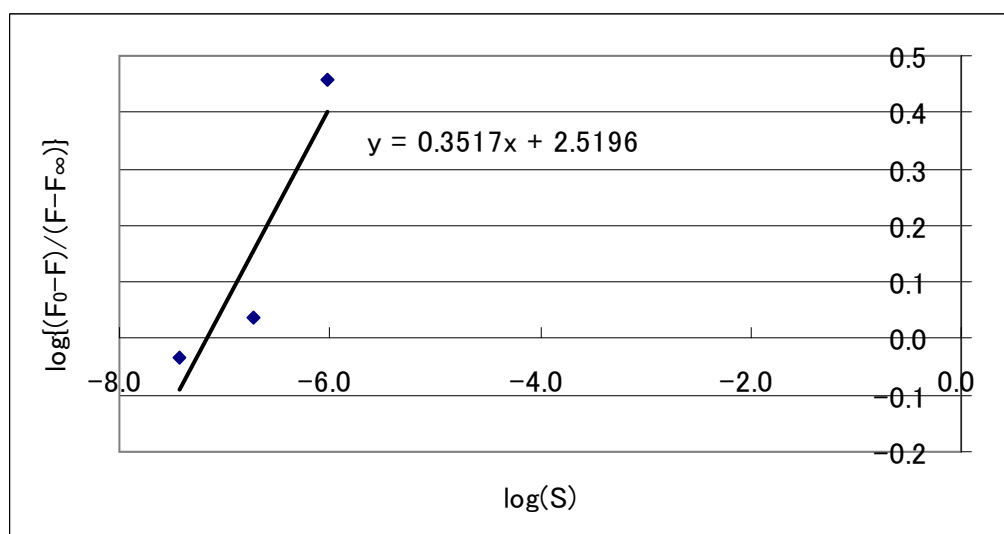


Fig3-1-1-6c.dST-Jacalin – Gal の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-1-6c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-1-6.dST-Jacalin – Gal の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	4.3E+05	7.1E+06	6.0E+06
	5.8E+06		
	1.5E+07		

3-1-2. 精製 Jacalin と GalNAc とのアフィニティー

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びアフィニティーカラムで分離・精製した ST-Jacalin、T-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin、dST-Jacalin と IgA1O-結合型糖鎖を構成する糖の一つである GalNAc とのアフィニティーを測定した。

3-1-2-1. Jacalin – GalNAc

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin と GalNAc とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

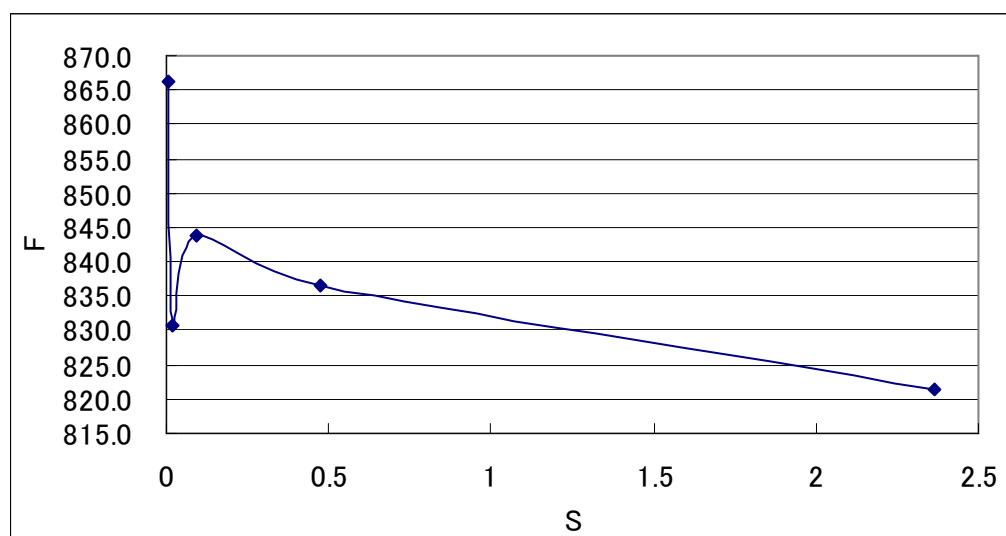


Fig.3-1-2-1aGalNAc 濃度に対する精製 Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

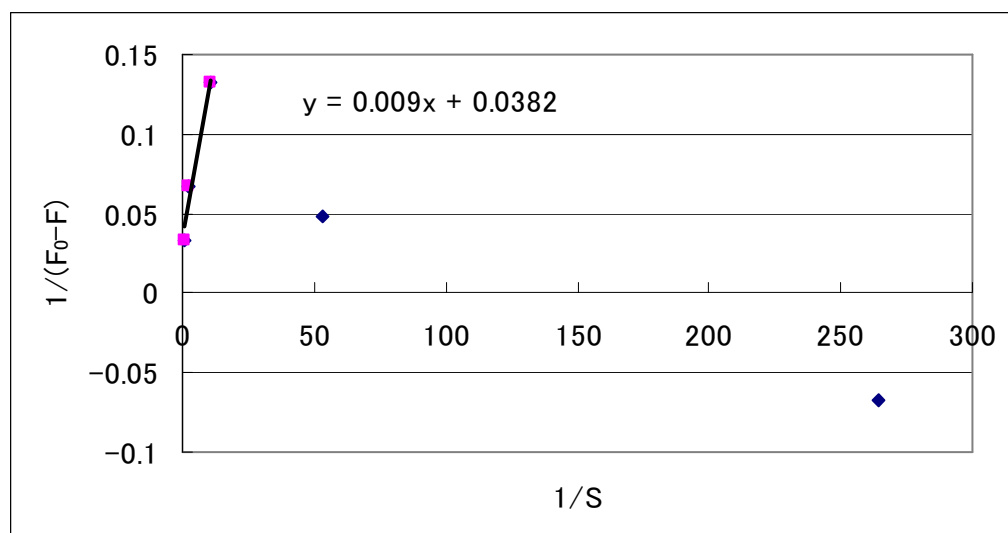


Fig3-1-2-1b 精製 Jacalin – GalNAc の F_{∞} 算出

Fig.3-1-2-1b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

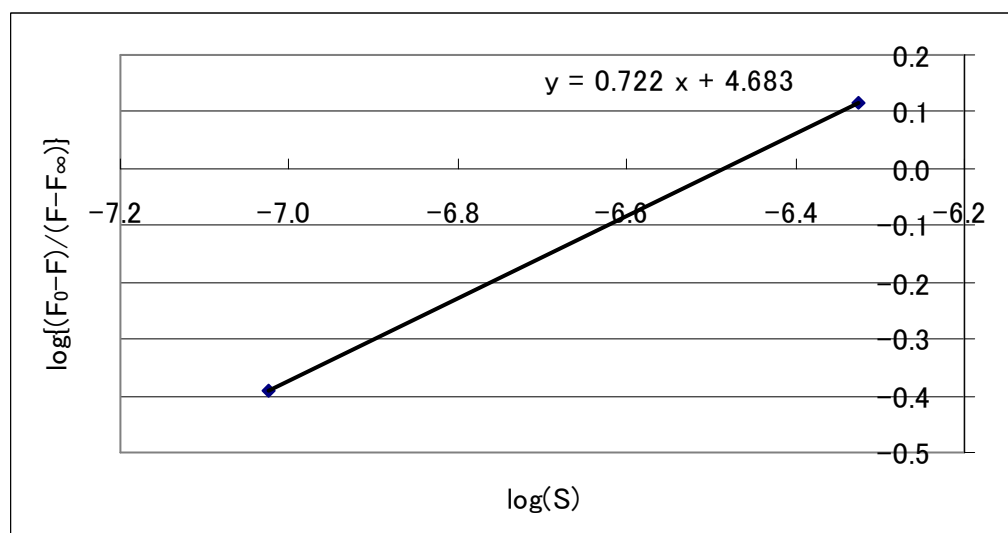


Fig3-1-2-1c 精製 Jacalin – GalNAc の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-2-1c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-2-1 精製 Jacalin – GalNAc の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	3.1E+06	2.8E+07	1.9E+07
	5.0E+07		
	3.1E+07		

3-1-2-2. ST-Jacalin – GalNAc

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した ST-Jacalin と GalNAc とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、ST-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

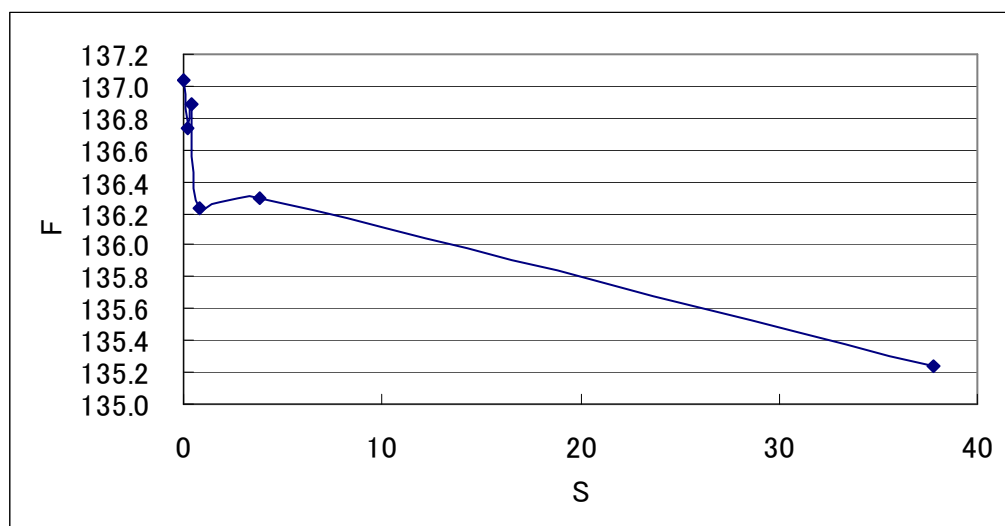


Fig.3-1-2-2a. GalNAc 濃度に対する ST-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

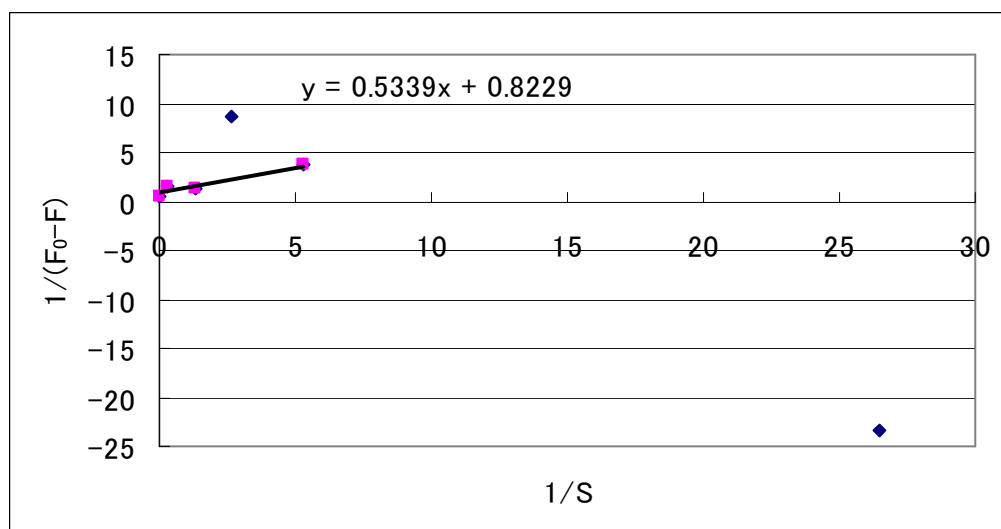


Fig3-1-2-2b.ST-Jacalin – GalNAc の F_{∞} 算出

Fig.3-1-2-2b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

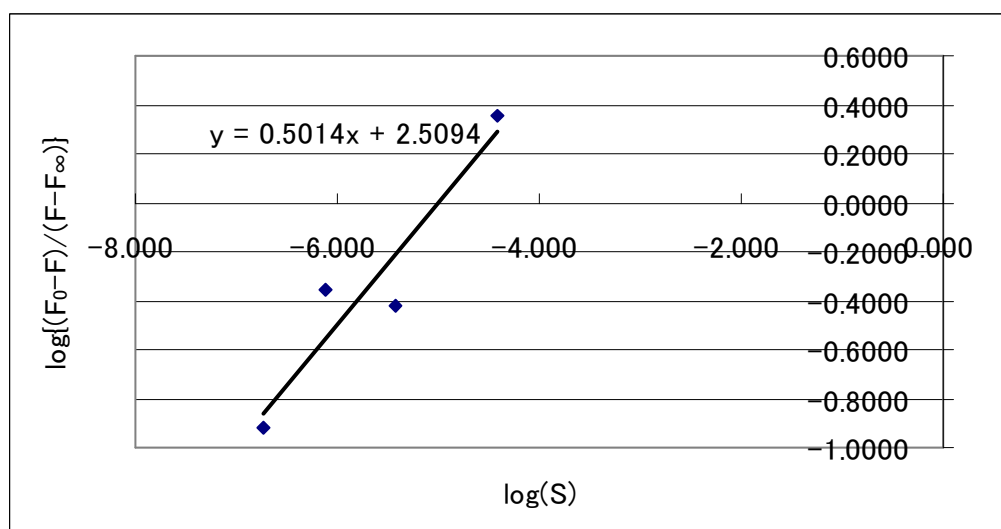


Fig3-1-2-2c.ST- Jacalin – GalNAc の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-2-2c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-2-2.ST-Jacalin – GalNAc の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.0E+05	2.6E+07	2.2E+07
	5.3E+07		
	2.6E+07		

3-1-2-3. T-Jacalin – GalNAc

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した T-Jacalin と GalNAc とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、T-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

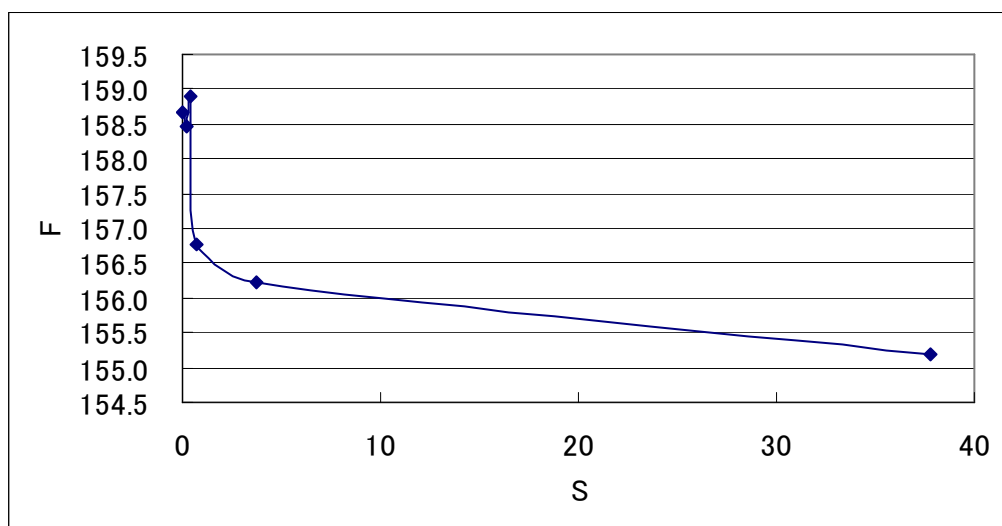


Fig.3-1-2-3a.GalNAc 濃度に対する T-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

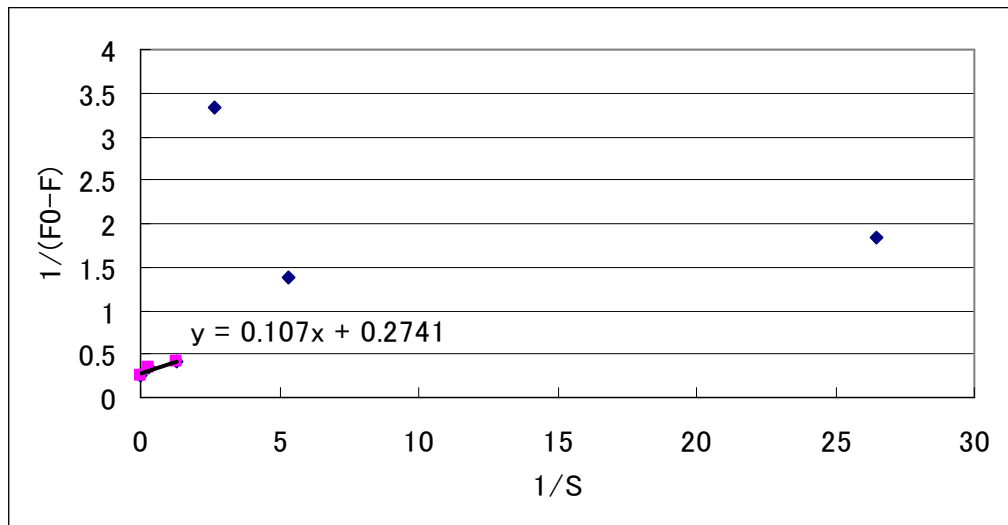


Fig3-1-2-3b.T-Jacalin – GalNAc の F_{∞} 算出

Fig.3-1-2-3b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

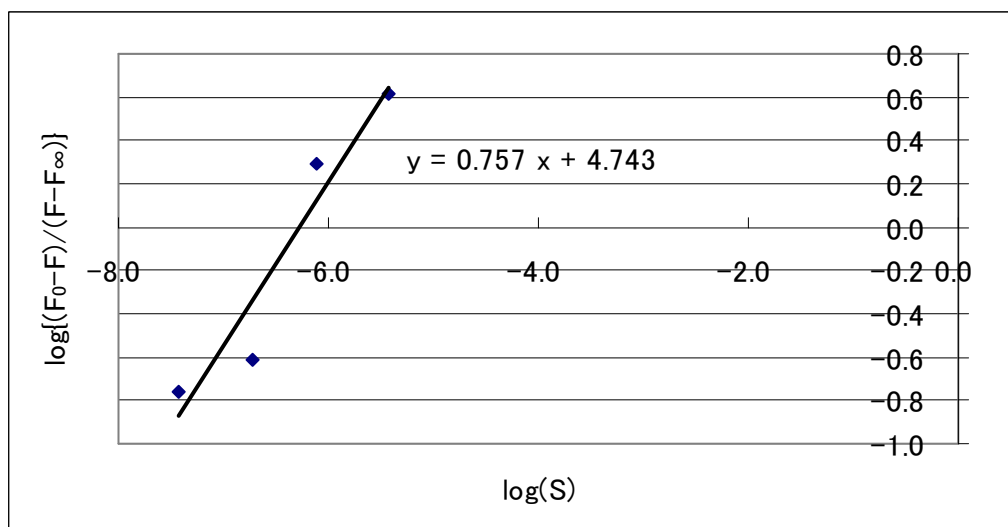


Fig3-1-2-3c.T-Jacalin – GalNAc の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-2-3c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-2-3.T-Jacalin – GalNAc の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.8E+06	3.5E+06	2.9E+06
	1.1E+06		
	7.5E+06		

3-1-2-4. Tn-Jacalin – GalNAc

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した Tn-Jacalin と GalNAc とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

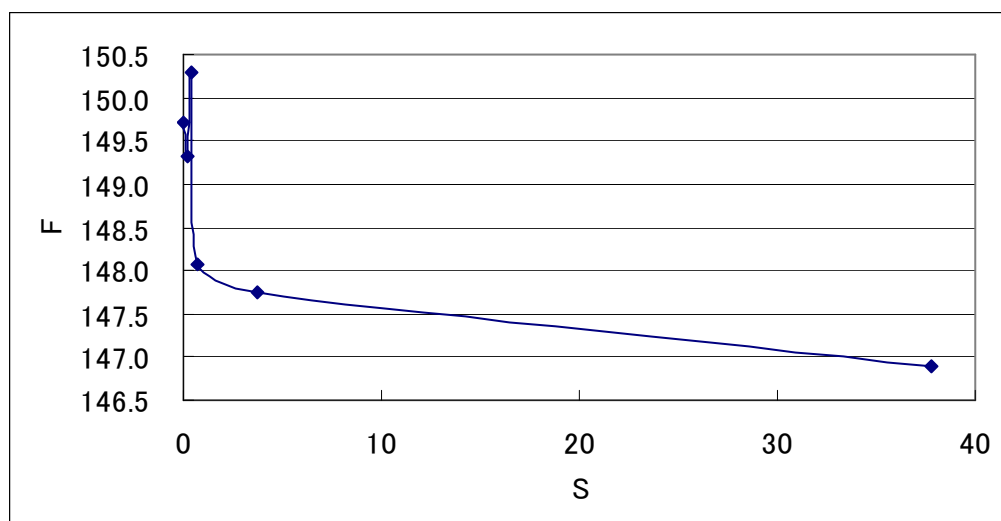


Fig.3-1-2-4a.GalNAc 濃度に対する Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

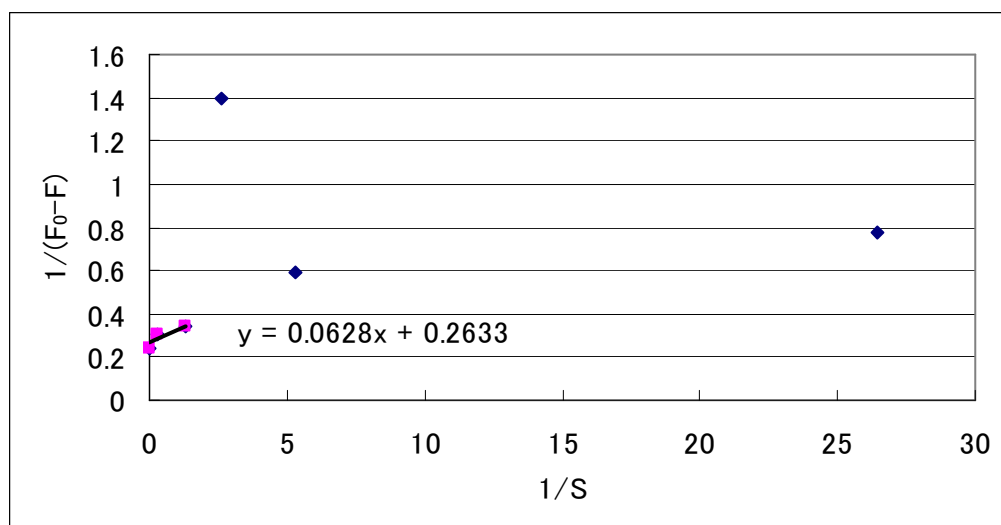


Fig3-1-2-4b.Tn-Jacalin – GalNAc の F_{∞} 算出

Fig.3-1-2-4b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

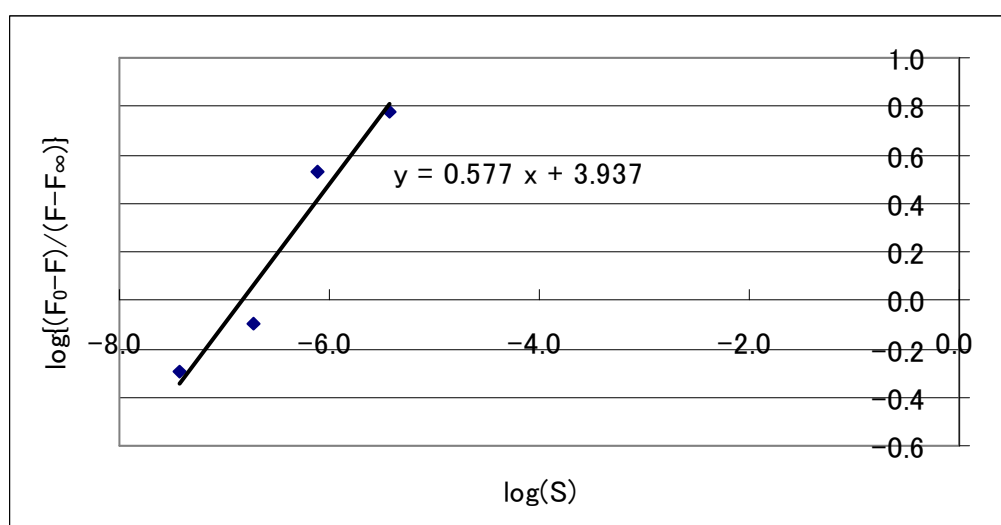


Fig3-1-2-4c.Tn-Jacalin – GalNAc の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-2-4c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-2-4.TnJacalin – GalNAc の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	6.7E+06	5.7E+07	7.3E+07
	1.6E+08		
	3.9E+06		

3-1-2-5. STn-Jacalin – GalNAc

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した STn-Jacalin と GalNAc とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、STn-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

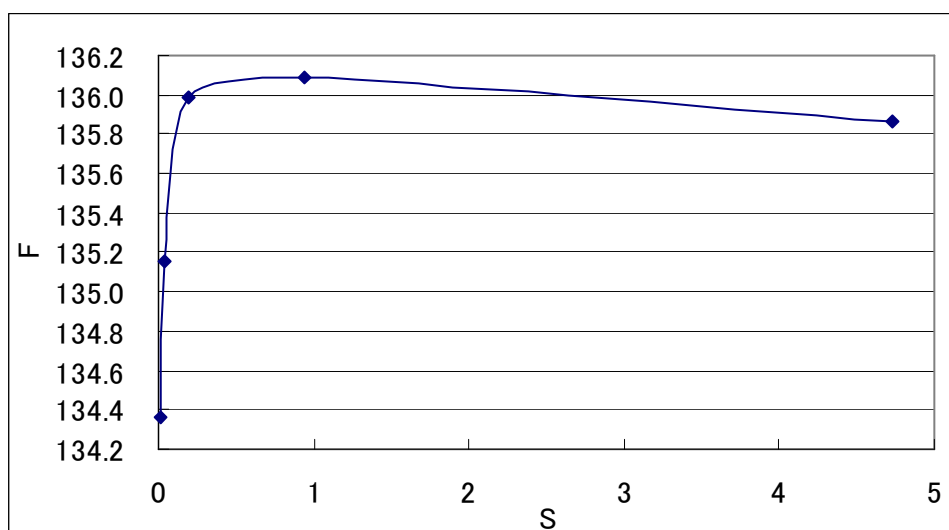


Fig.3-1-2-5a.GalNAc 濃度に対する STn-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

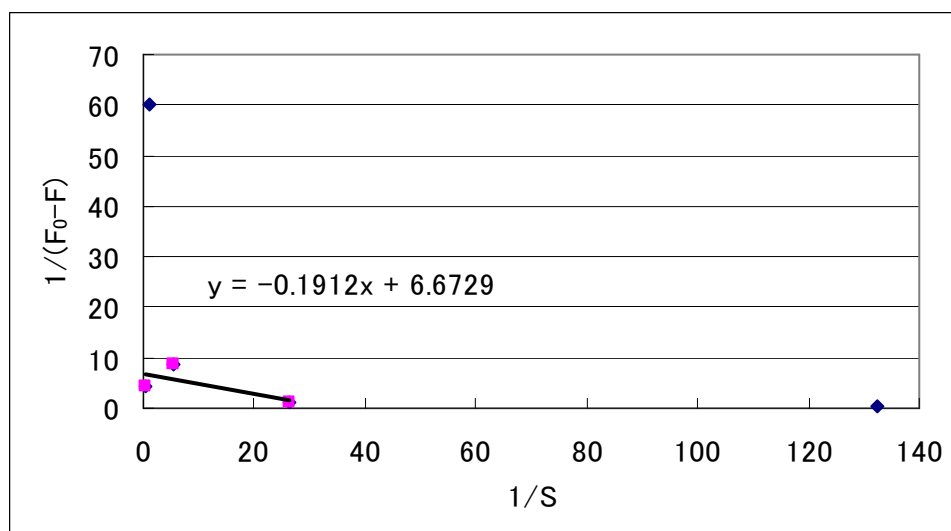


Fig3-1-2-5b.STn-Jacalin – GalNAc の F_{∞} 算出

Fig.3-1-2-5b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

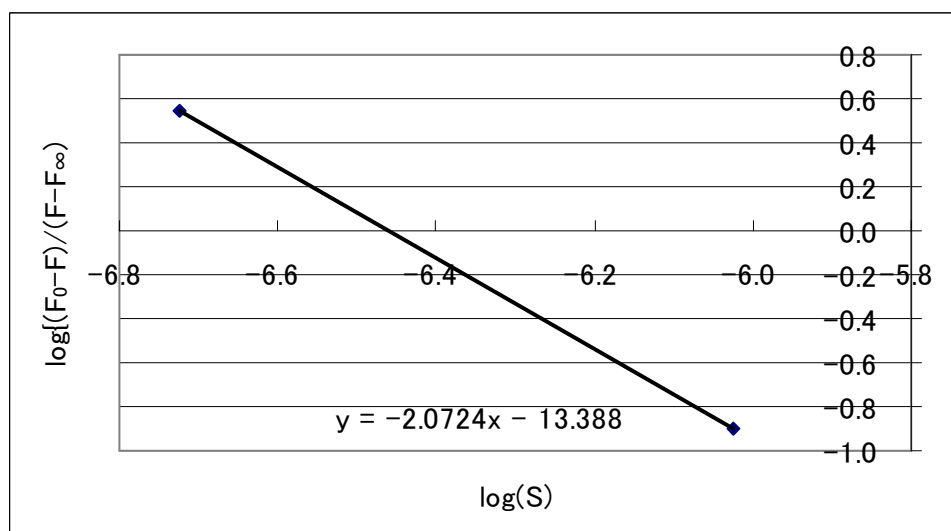


Fig3-1-2-5c.STn-Jacalin – GalNAc の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-2-5c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-2-5.STn-Jacalin – GalNAc の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	2.5E+06	2.0E+06	1.1E+06
	2.9E+06		
	4.6E+05		

3-1-2-6. dST-Jacalin – GalNAc

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した dST-Jacalin と GalNAc とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、dST-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

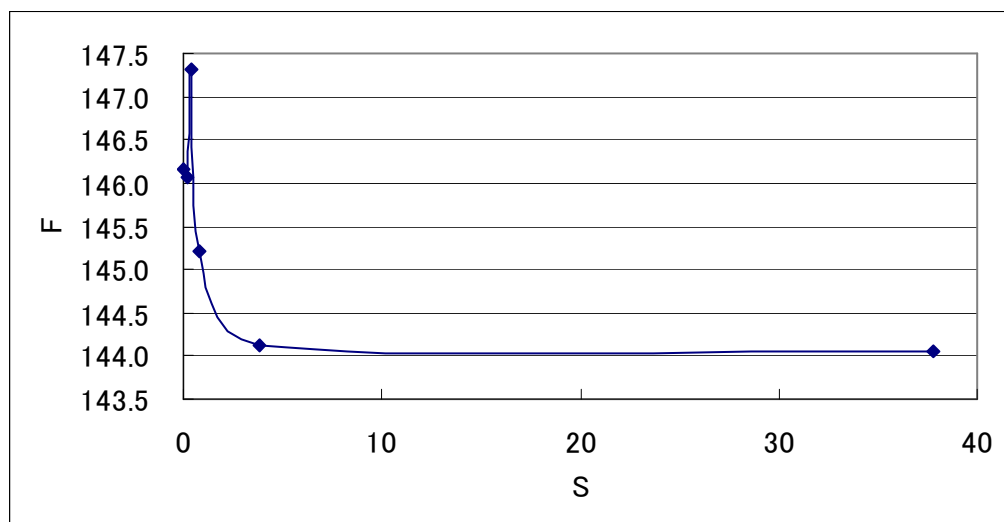


Fig.3-1-2-6aGalNAc 濃度に対する dST-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

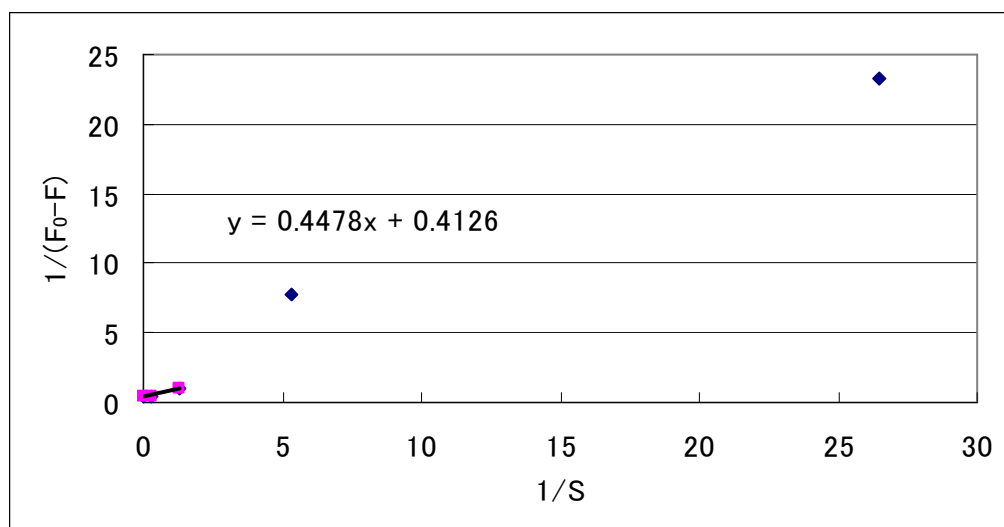


Fig3-1-2-6b.dST-Jacalin – GalNAc の F_{∞} 算出

Fig.3-1-2-6b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

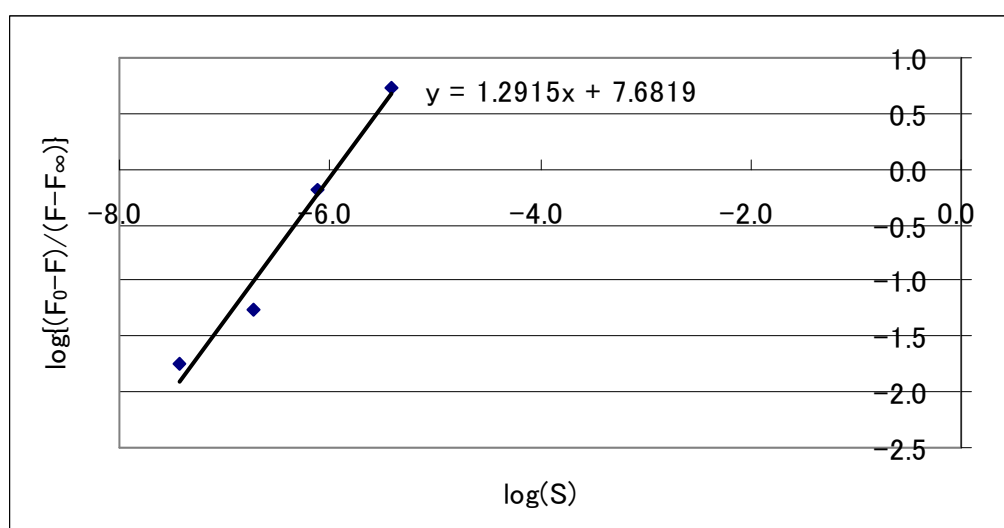


Fig3-1-2-6c.dST-Jacalin – GalNAc の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-2-6c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-2-6.dST-Jacalin – GalNAc の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	8.9E+05	1.7E+07	1.1E+07
	2.3E+07		
	2.6E+07		

3-1-3. 精製 Jacalin とシアル酸とのアフィニティー

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin 及びアフィニティーカラムで分離・精製した ST-Jacalin、T-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin、dST-Jacalin と IgA1O-結合型糖鎖を構成する糖の一つであるシアル酸とのアフィニティーを測定した。

3-1-3-1. Jacalin – シアル酸

Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin とシアル酸とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

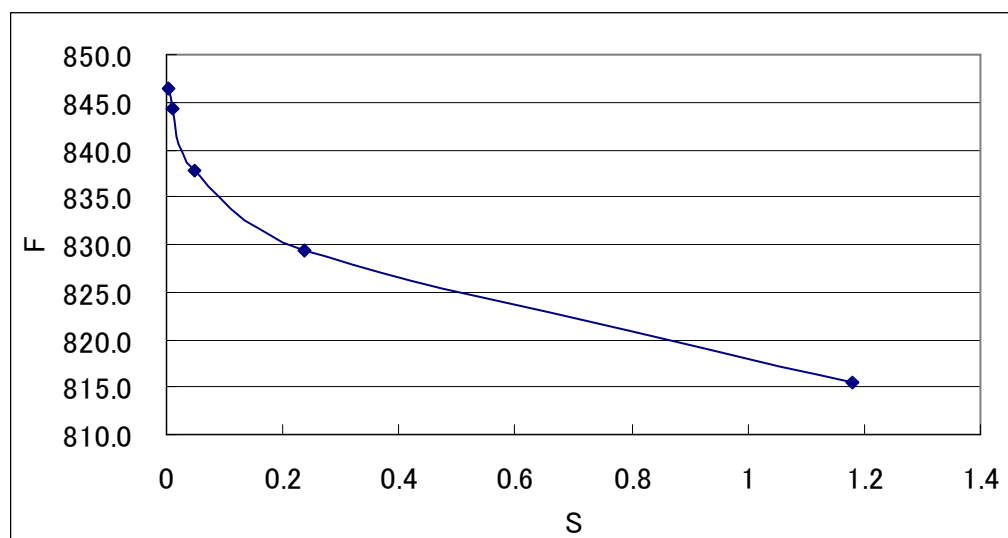


Fig.3-1-3-1a.シアル酸濃度に対する精製 Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

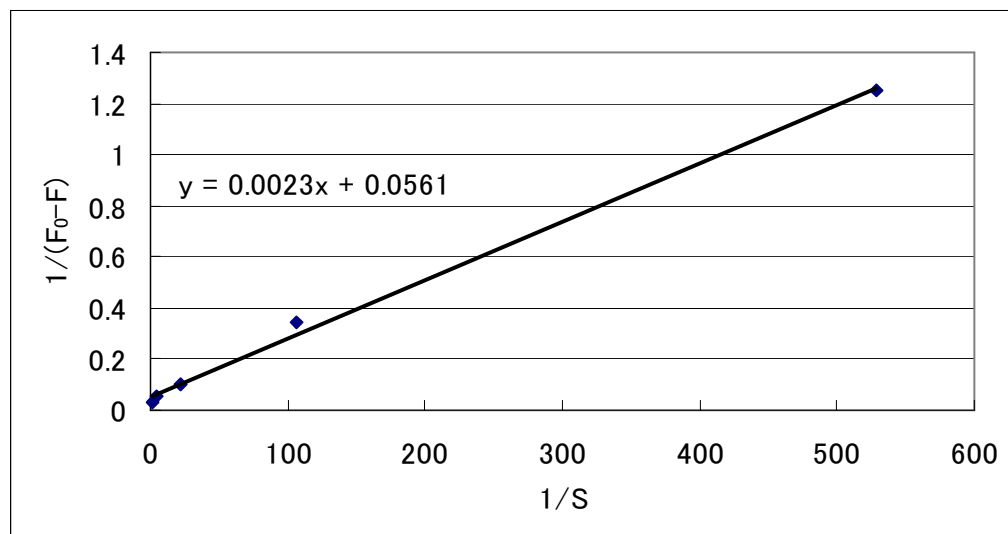


Fig3-1-3-1b.精製 Jacalin –シアル酸の F_{∞} 算出

Fig.3-1-3-1b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

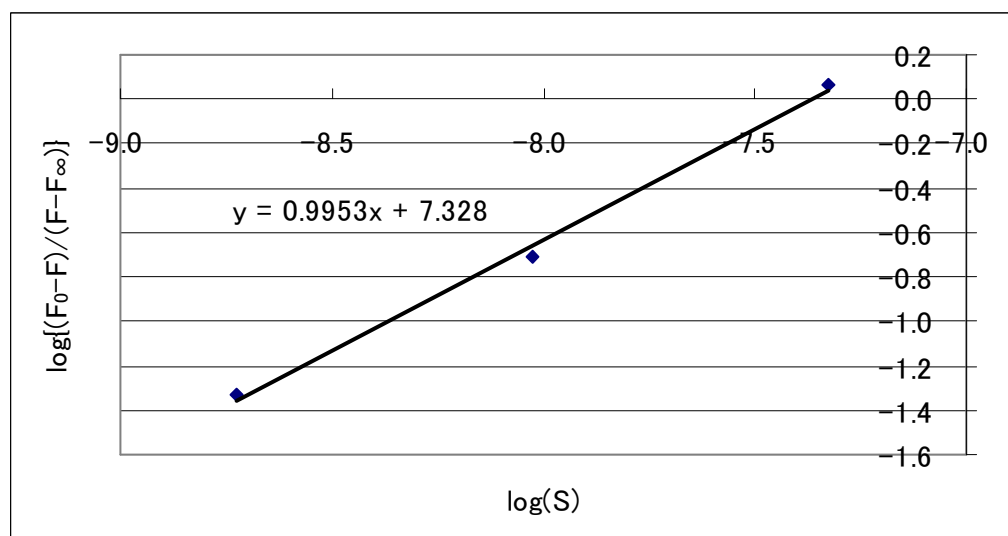


Fig3-1-3-1c.精製 Jacalin – シアル酸の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-3-1c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-3-1.精製 Jacalin – シアル酸の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	7.8E+08	3.0E+08	3.4E+08
	1.0E+08		
	2.3E+07		

3-1-3-2. ST-Jacalin – シアル酸

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した ST-Jacalin とシアル酸とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、ST-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

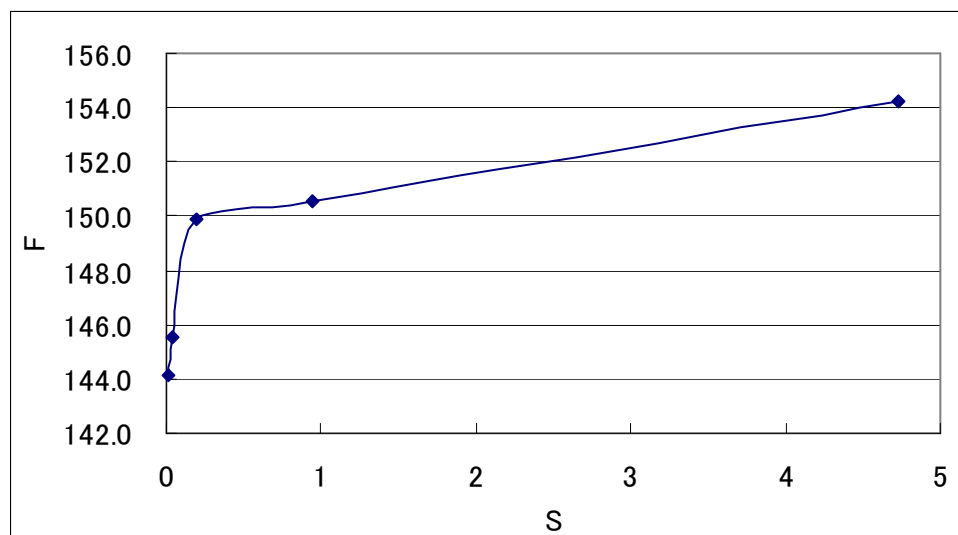


Fig.3-1-3-2a.シアル酸濃度に対する ST-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

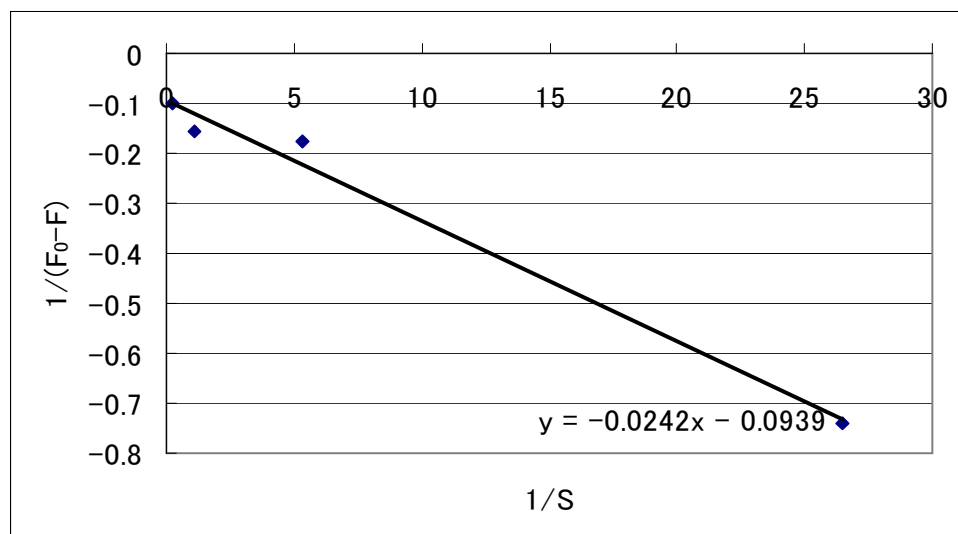


Fig3-1-3-2b.ST-Jacalin – シアル酸の F_{∞} 算出

Fig.3-1-3-2b.から F_{∞} を算出して、以下のプロットを作製した。

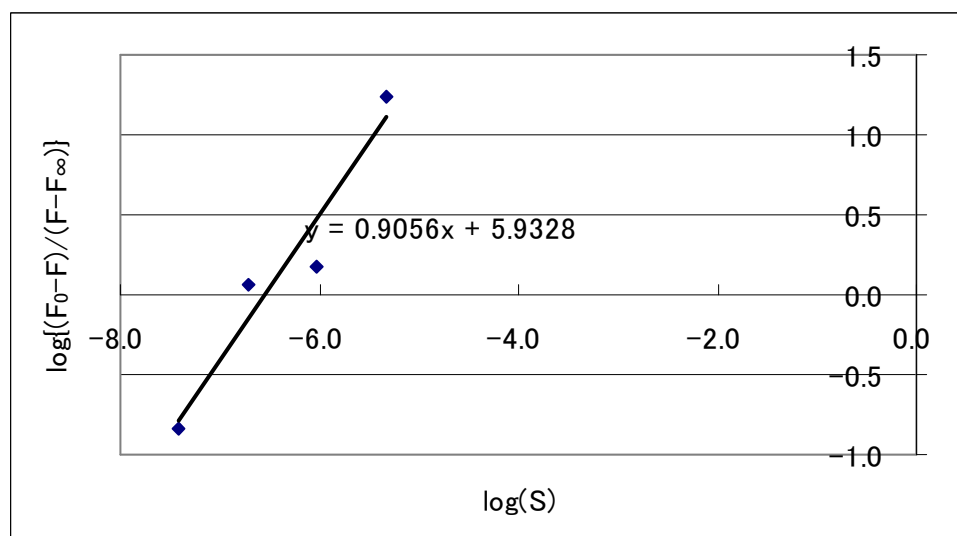


Fig3-1-3-2c.ST-Jacalin – シアル酸の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-3-2c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-3-2.ST-Jacalin – シアル酸の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	3.6E+06	3.8E+06	1.4E+06
	2.2E+06		
	5.6E+06		

3-1-3-3. T-Jacalin – シアル酸

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した T-Jacalin とシアル酸とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、T-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

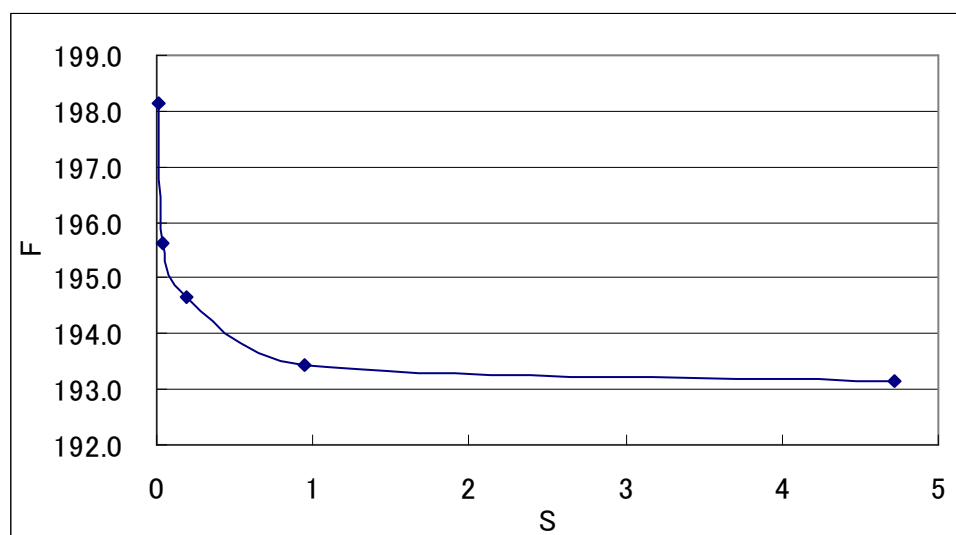


Fig.3-1-3-3a.シアル酸濃度に対する T-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

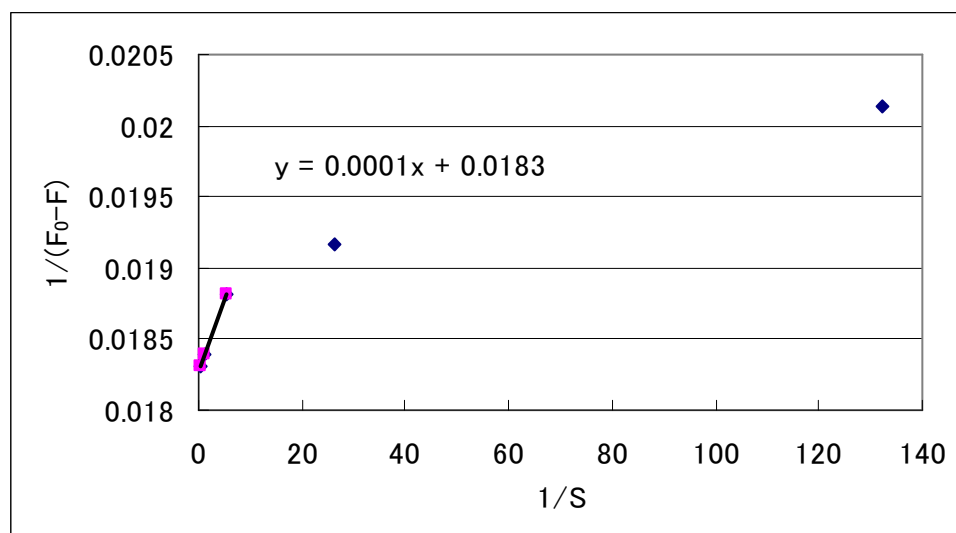


Fig3-1-3-3b.T-Jacalin – シアル酸の F_∞ 算出

Fig.3-1-3-3b.から F_∞ を算出して、以下のプロットを作製した。

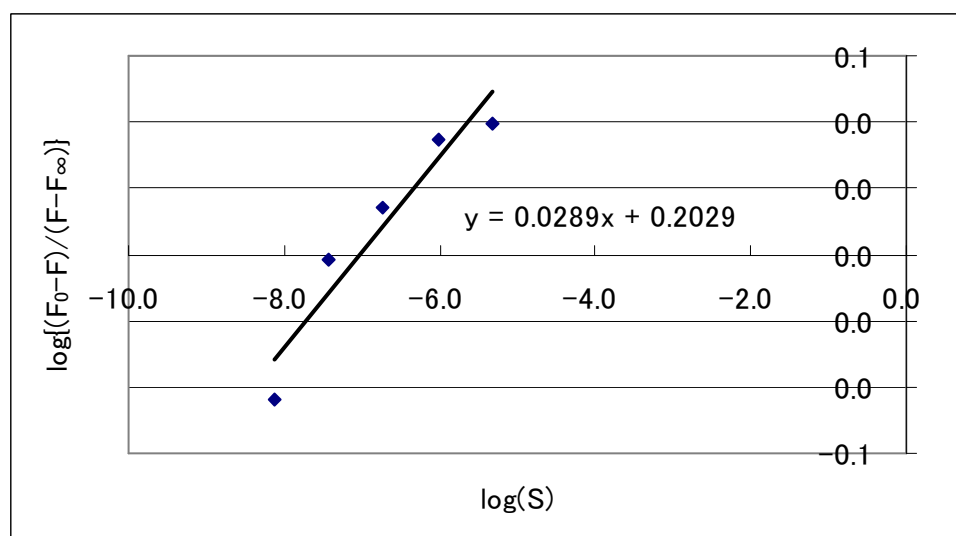


Fig3-1-3-3-c.T-Jacalin – シアル酸の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-3-3c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-3-3.T-Jacalin – シアル酸の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.1E+08	5.7E+07	4.1E+07
	1.0E+07		
	5.2E+07		

3-1-3-4. Tn-Jacalin – シアル酸

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した Tn-Jacalin とシアル酸とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

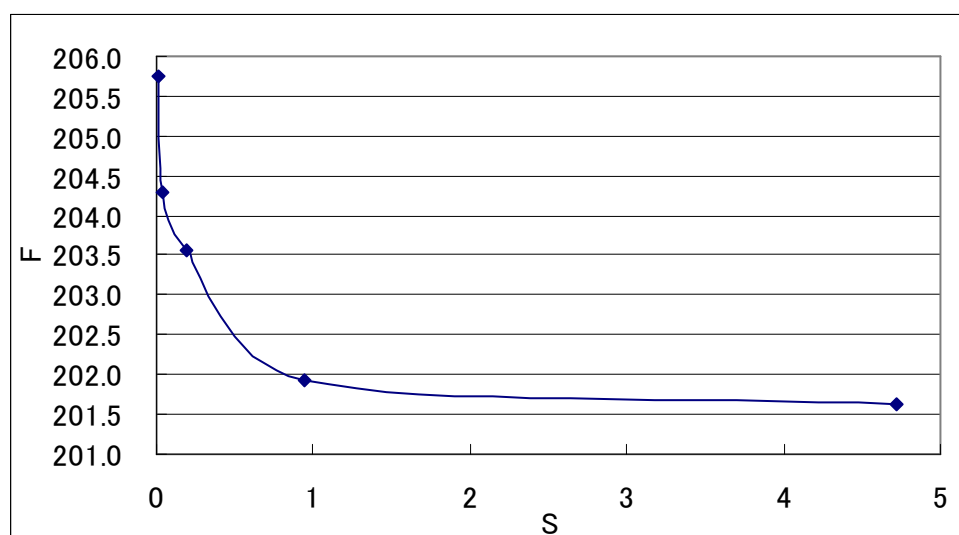


Fig.3-1-3-4a.シアル酸濃度に対する Tn-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。

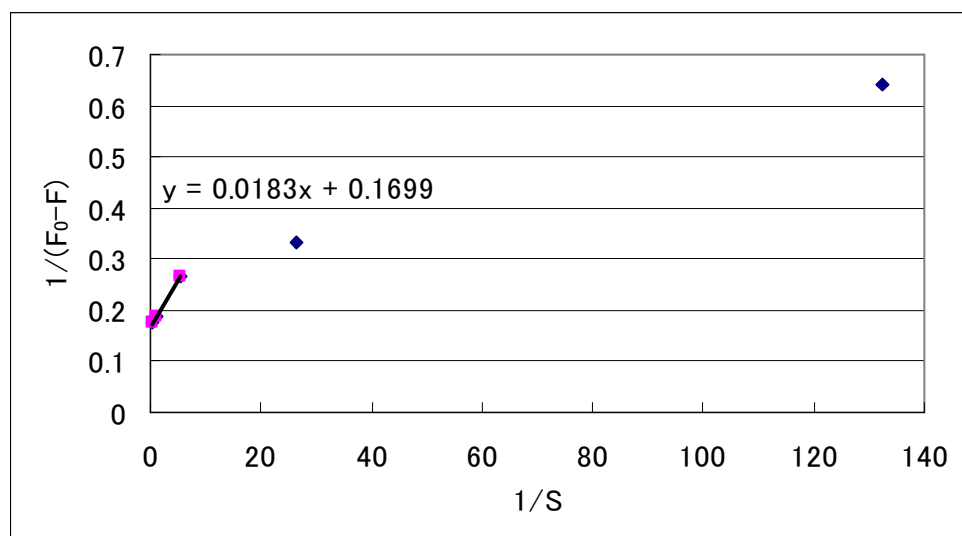


Fig3-1-3-4b.Tn-Jacalin – シアル酸の F_∞ 算出

Fig.3-1-3-4b.から F_∞ を算出して、以下のプロットを作製した。

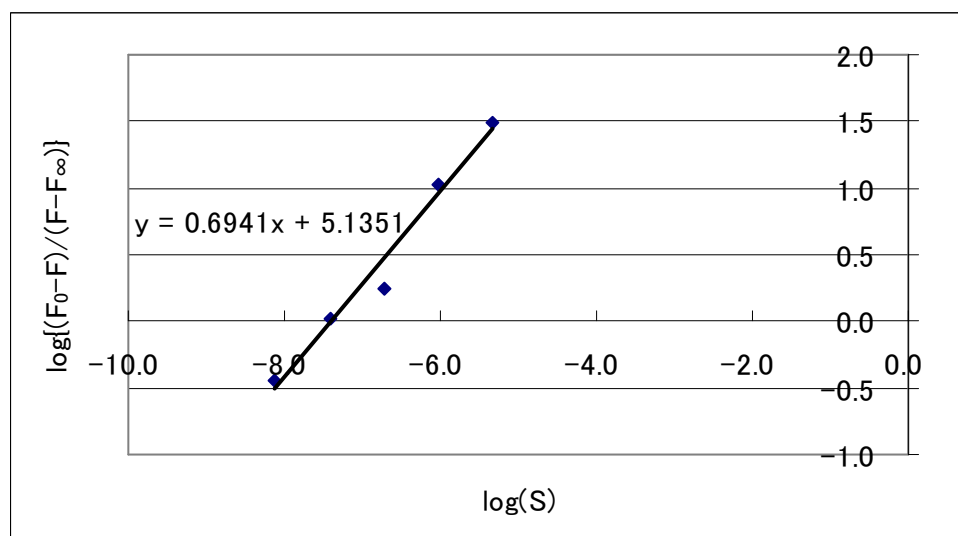


Fig3-1-3-4-c.Tn-Jacalin – シアル酸の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-3-4c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-3-3.T-Jacalin – シアル酸の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	2.5E+07	1.8E+07	8.9E+06
	2.3E+07		
	5.2E+06		

3-1-3-5. STn-Jacalin – シアル酸

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した STn-Jacalin とシアル酸とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、STn-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

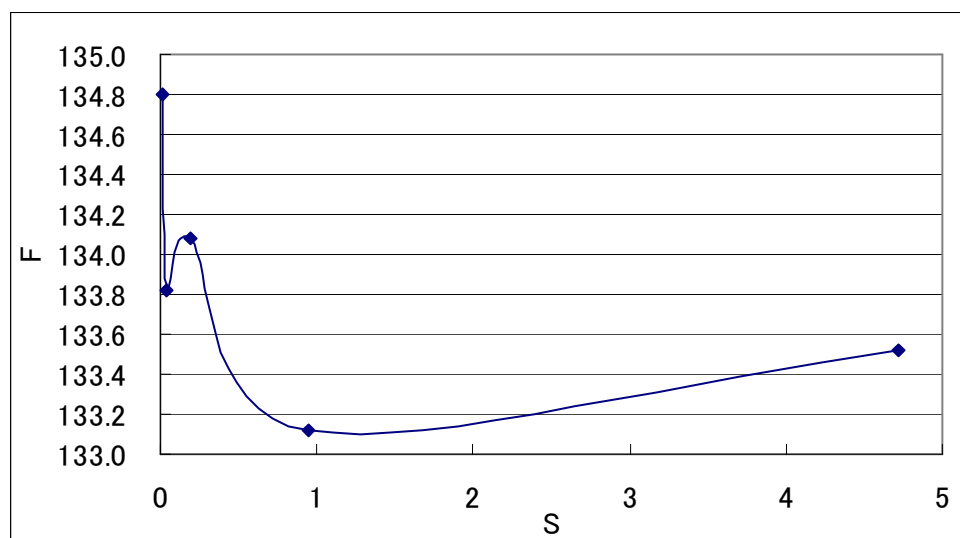


Fig.3-1-3-5a.シアル酸濃度に対する STn-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

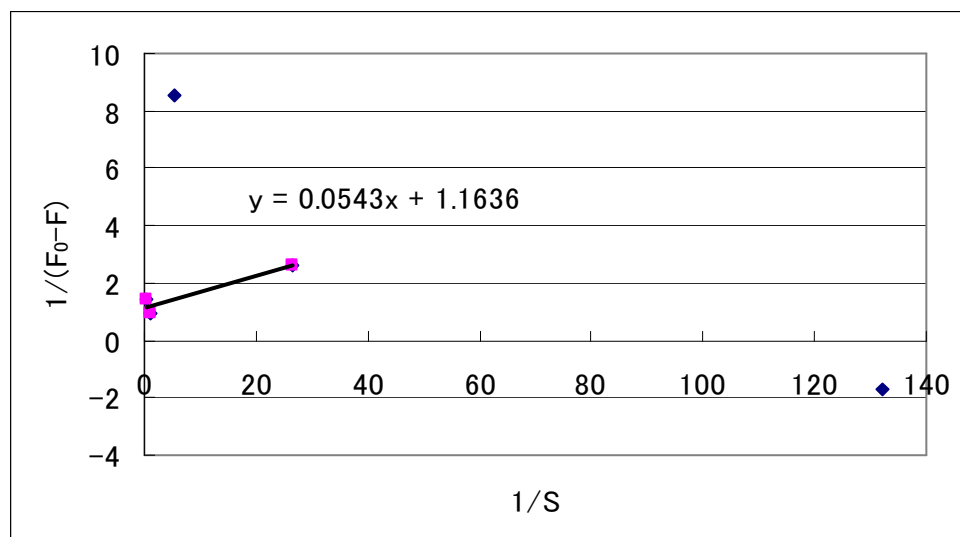


Fig3-1-3-5b.STn-Jacalin – シアル酸の F_∞ 算出

Fig.3-1-3-5b.から F_∞ を算出して、以下のプロットを作製した。

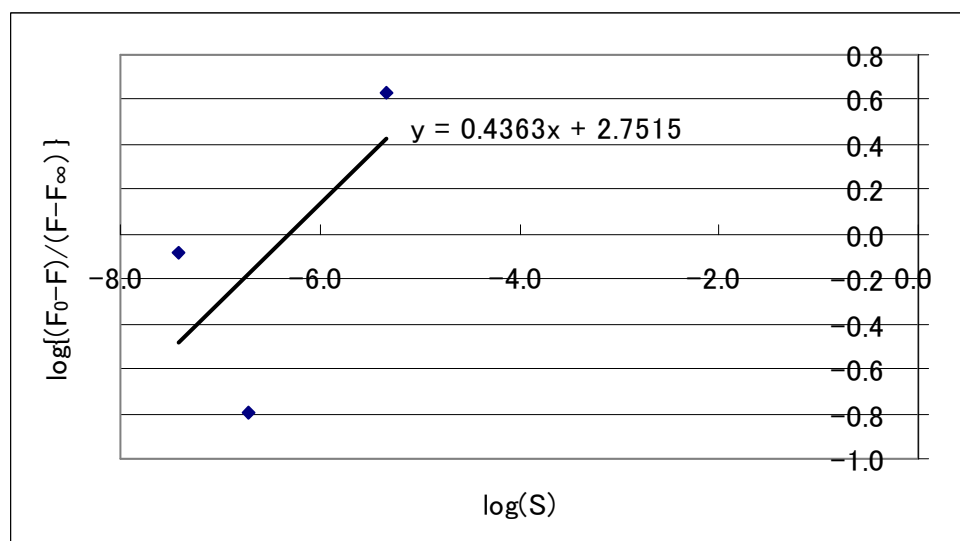


Fig3-1-3-5c.STn-Jacalin – シアル酸の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-3-5c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-3-5.STn-Jacalin – シアル酸の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	7.4E+06	3.2E+06	3.1E+06
	7.8E+04		
	2.0E+06		

3-1-3-6. dST-Jacalin – シアル酸

アフィニティーカラムを用いて分離・精製した dST-Jacalin とシアル酸とのアフィニティーを測定した。そのためにまず、dST-Jacalin のトリプトファン蛍光の変化を測定した。

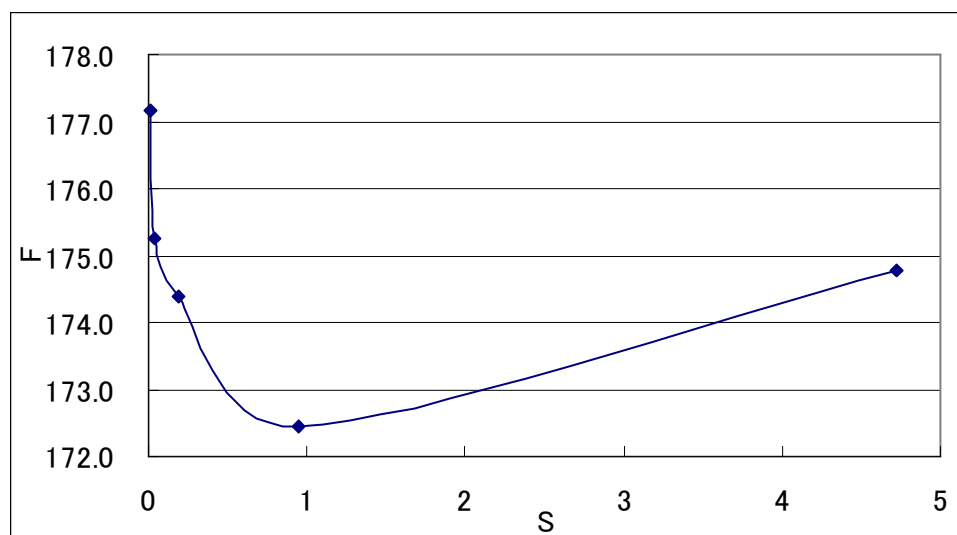


Fig.3-1-3-6a.シアル酸濃度に対する dST-Jacalin のトリプトファン蛍光変化

糖濃度に依存して蛍光強度が変化することを確認できたので、 $1/(F_0-F)$ に対する $1/S$ をプロットした。(濃度依存から外れているものは無視した。)

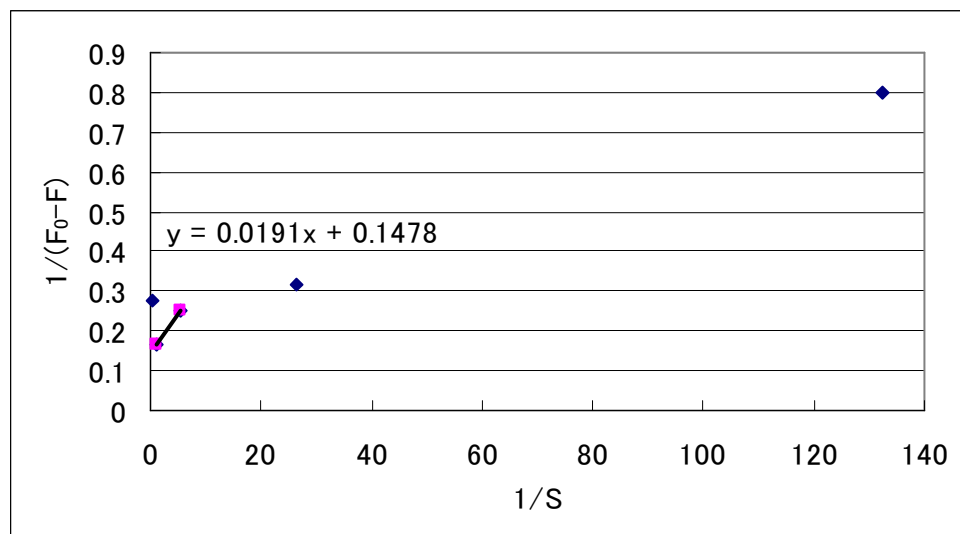


Fig3-1-3-6b.dST-Jacalin – シアル酸の F_∞ 算出

Fig.3-1-3-6b.から F_∞ を算出して、以下のプロットを作製した。

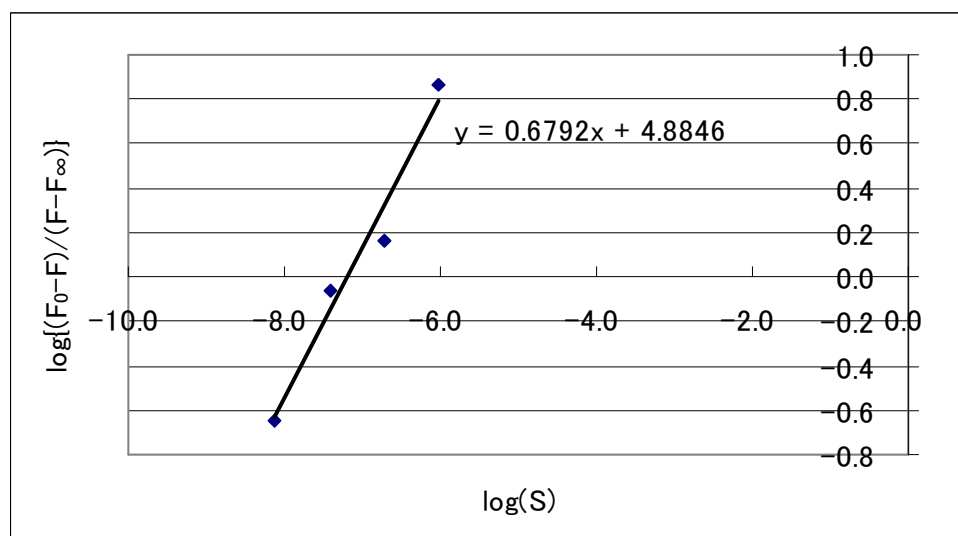


Fig3-1-3-6c.dST-Jacalin – シアル酸の $\log K_A$ 算出

Fig.3-1-3-6c.のグラフの X 軸との交点が $\log K_A$ となるので、そこから結合定数 K_A を算出した。

Table.3-1-3-6.dST-Jacalin – シアル酸の結合定数 K_A (n=3)

	測定値	平均	S.D.
K_A	1.6E+07	1.2E+08	1.5E+08
	6.5E+06		
	3.3E+08		

3-1-4. Jacalin のアフィニティーまとめ

以上の結果をまとめる。

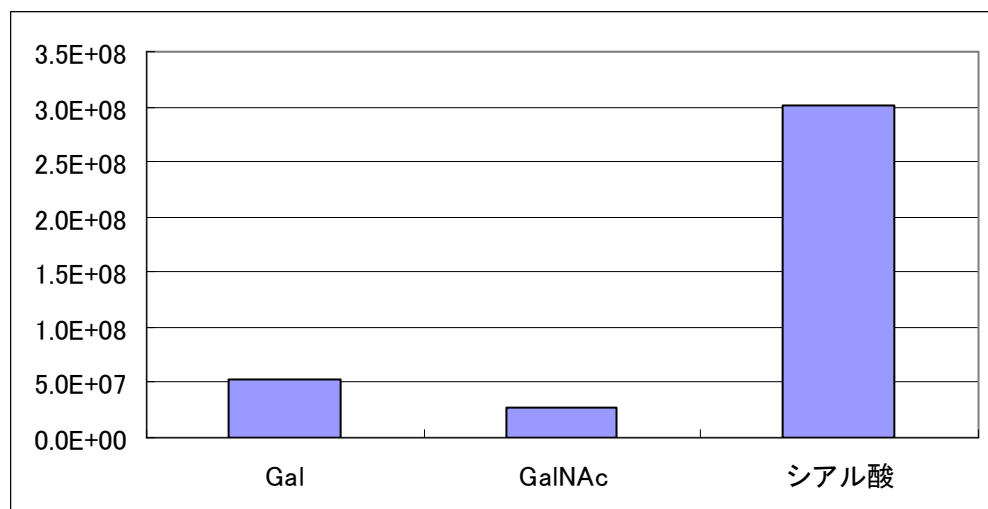


Fig.3-1-4a.抽出・精製した Jacalin と Gal、GalNAc、シアル酸とのアフィニティー

Table.3-1-4a. 抽出・精製した Jacalin と Gal、GalNAc、シアル酸とのアフィニティー

	Gal	GalNAc	シアル酸
K _A	5.3E+07	2.8E+07	3.0E+08
S.D.	4.7E+07	1.9E+07	3.4E+08

IgA1O-結合型糖鎖を構成する単糖の中で、抽出・精製した Jacalin と最もアフィニティーが強いのはシアル酸であることが分かった。

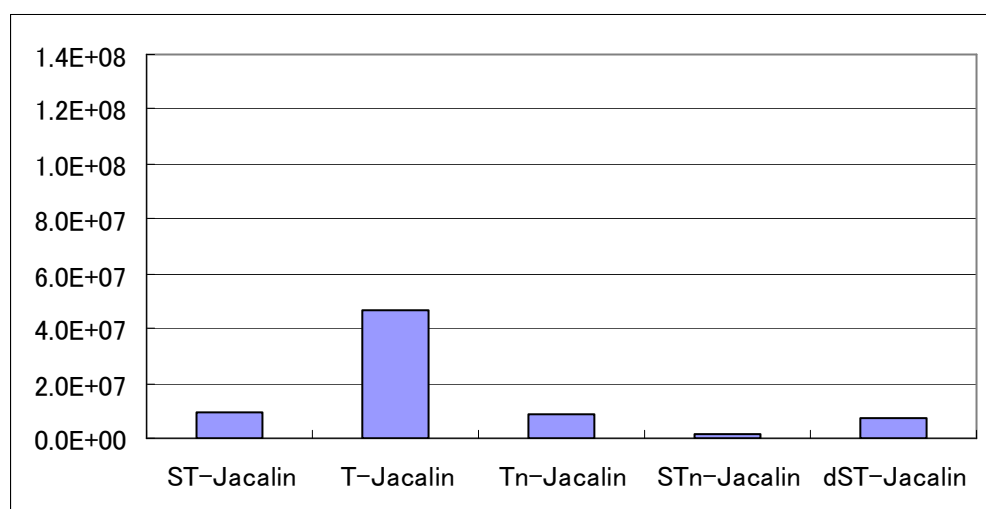


Fig.3-1-4b.分離・精製した Jacalin と Gal とのアフィニティー

Table.3-1-4b.分離・精製した Jacalin と Gal とのアフィニティー

	ST-Jacalin	T-Jacalin	Tn-Jacalin	STn-Jacalin	dST-Jacalin
K_A	9.7E+06	4.7E+07	9.0E+06	1.8E+06	7.1E+06
S.D.	5.1E+06	5.2E+07	8.6E+06	1.2E+06	6.0E+06

IgA1O-結合型糖鎖を構成する単糖の一つである Gal とのアフィニティーが最も強いのは T-Jacalin であることが分かった。

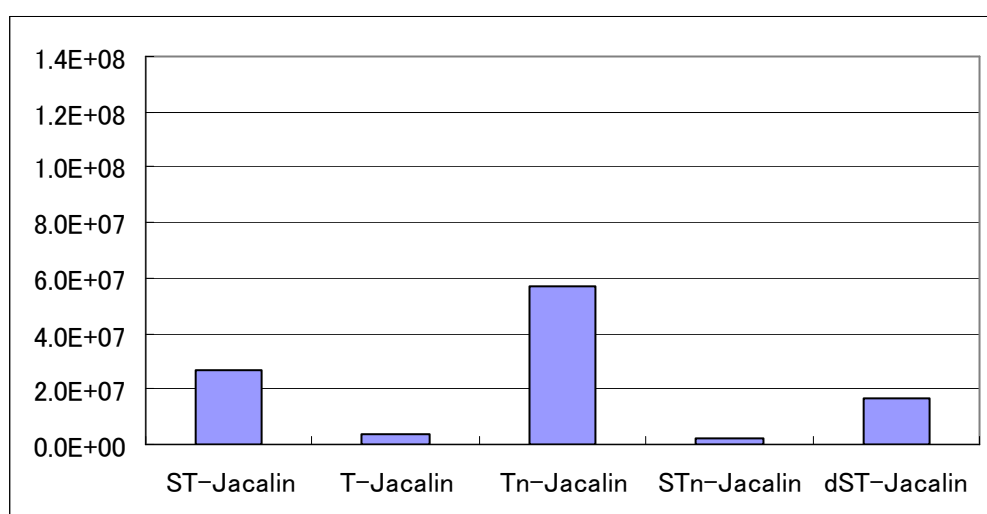


Fig.3-1-4c.分離・精製した Jacalin と GalNAc とのアフィニティー

Table.3-1-4c.分離・精製した Jacalin と GalNAc とのアフィニティー

	ST-Jacalin	T-Jacalin	Tn-Jacalin	STn-Jacalin	dST-Jacalin
K_A	2.6E+07	3.5E+06	5.7E+07	2.0E+06	1.7E+07
S.D.	2.2E+07	2.9E+06	7.3E+07	1.1E+06	1.1E+07

IgA1O-結合型糖鎖を構成する単糖の一つである GalNAc とのアフィニティーが最も強いのは Tn-Jacalin であることが分かった。

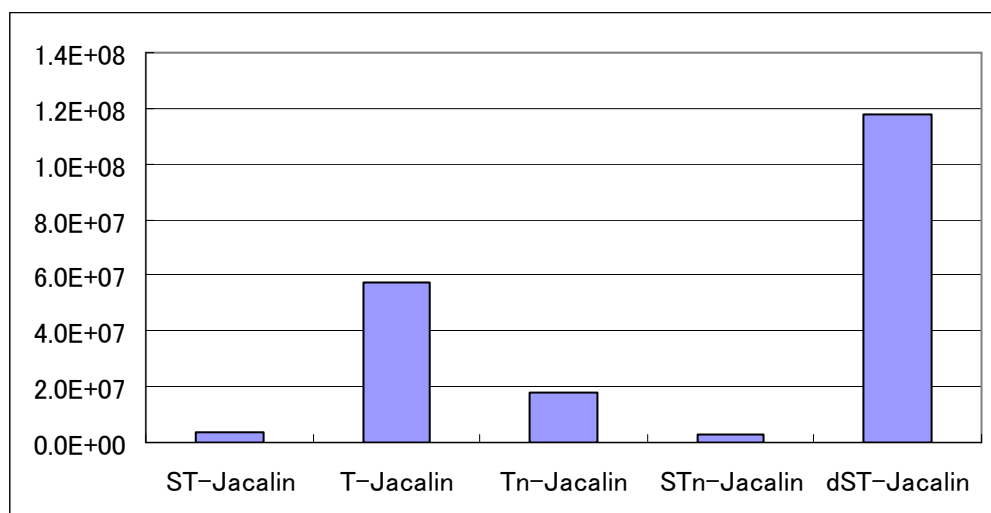


Fig.3-1-4d. 分離・精製した Jacalin とシアル酸とのアフィニティー

Table.3-1-4d. 分離・精製した Jacalin とシアル酸とのアフィニティー

	ST-Jacalin	T-Jacalin	Tn-Jacalin	STn-Jacalin	dST-Jacalin
K_A	3.8E+06	5.7E+07	1.8E+07	3.2E+06	1.2E+08
S.D.	1.4E+06	4.1E+07	8.9E+06	3.1E+06	1.5E+08

IgA1O-結合型糖鎖を構成する単糖の一つであるシアル酸とのアフィニティーが最も強いのは dST-Jacalin であることが分かった。

3-2. IgA 糖鎖濃度測定

3-2-1. 総 IgA 濃度の比較

IgA 腎症患者と健常者の血清中の総 IgA 濃度を、抗 IgA 抗体を用いて測定、比較した。

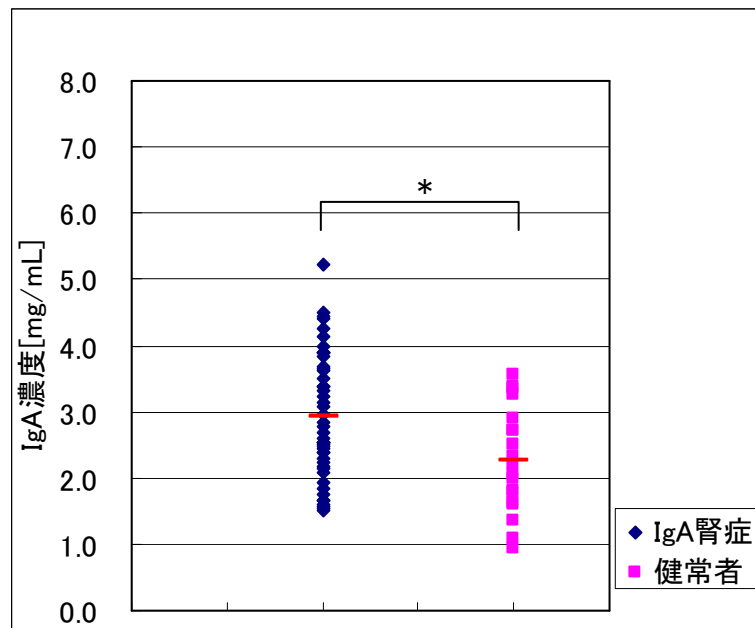


Fig.3-2-1.抗 IgA 抗体で検出した総 IgA 濃度(n=3)

健常者と IgA 腎症患者とで比較したところ、IgA 腎症患者のほうが総 IgA 濃度が高いことが分かった。

3-2-2. IgA1 糖鎖濃度の比較

IgA 腎症患者と健常者の血清中の T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 濃度をそれぞれ T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin を用いて測定、比較した。(濃度の単位は mg/ml)

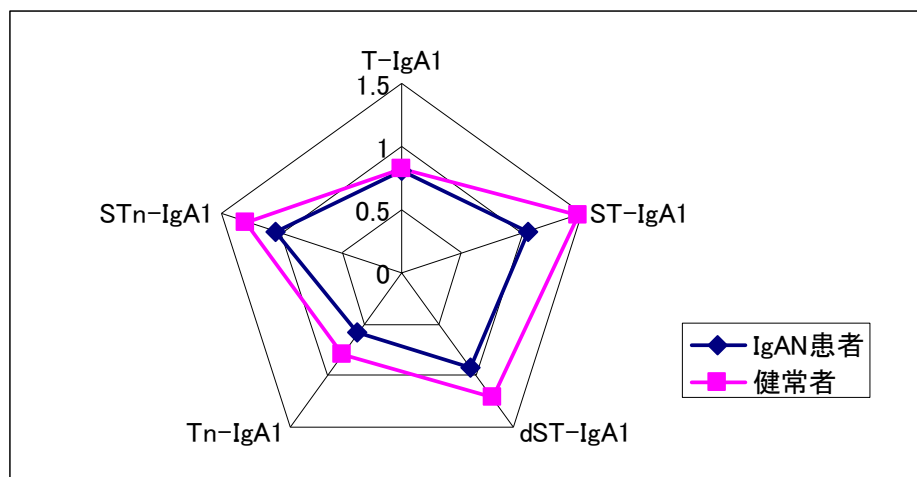


Fig.3-2-2.IgA 腎症患者と健常者における IgA1 糖鎖濃度の比較(n=3)

T-IgA1 以外の IgA1 糖鎖濃度が IgA 腎症患者より健常者で高い傾向があった。

3-2-3. IgA 糖鎖濃度を比率で比較

3-2-2 で測定した T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 濃度からそれぞれの IgA1 糖鎖比率を算出、比較した。

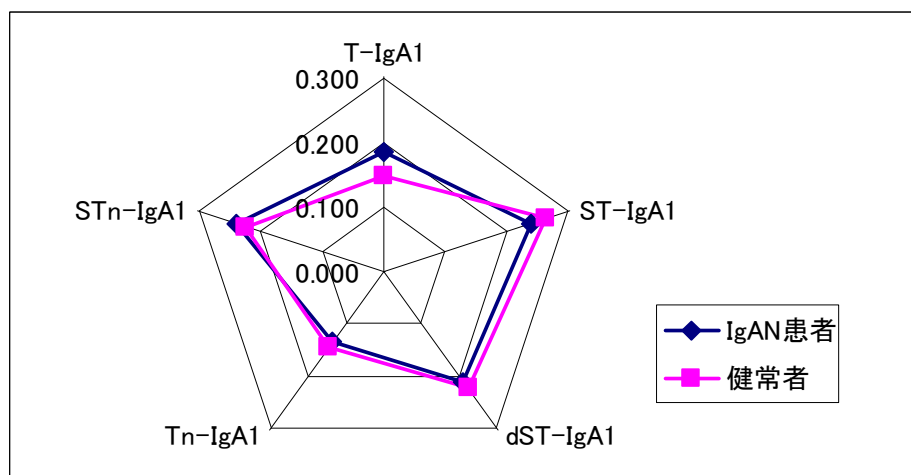


Fig.3-2-3.IgA 腎症患者と健常者における IgA1 糖鎖比率での比較(n=3)

IgA 腎症患者では T-IgA1 が高い傾向があり、健常者では ST-IgA1 が高い傾向があることが分かった。

3-2-4. IgA 腎症患者の IgA1 糖鎖傾向

以下の式を用いて、健常者と比較した IgA 腎症患者の IgA1 糖鎖の傾向を調べた。
(例として ST-IgA1 の割合)

$$\text{ST-IgA1 の割合} = \frac{\text{健常者の ST-IgA1 比率以上の IgA 腎症患者数}}{\text{全 IgA 腎症患者数}}$$

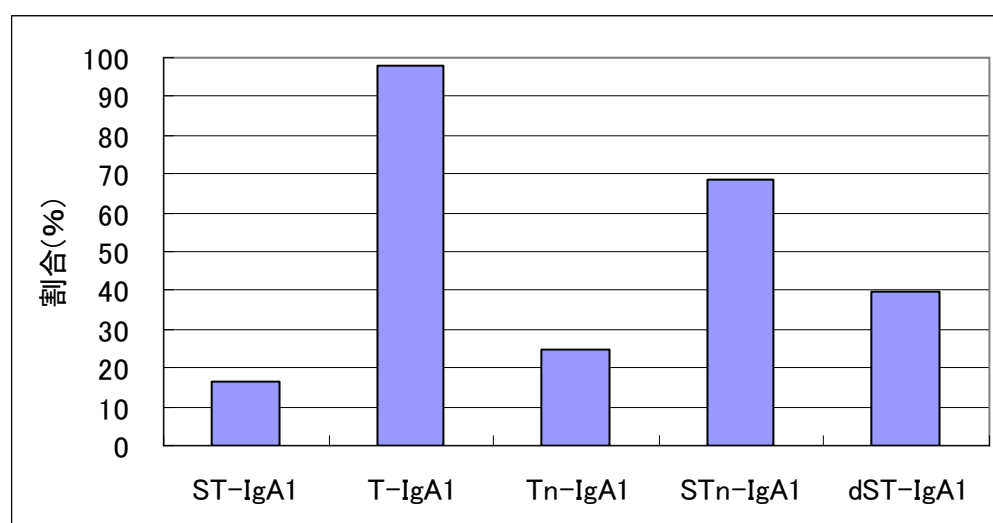


Fig.3-2-4. 健常者と比較した IgA 腎症患者の IgA1 糖鎖の傾向(n=3)

T-IgA1 の比率が高い IgA 腎症患者は 97.9%、STn-IgA1 の比率が高い IgA 腎症患者は 68.8%あり、ST-IgA1 の比率が低い IgA 腎症患者は 16.7%いたことから、IgA1 の糖鎖バランスから診断できる可能性が示唆された。

3-2-5. IgAN 患者における治療と IgA 糖鎖の関連

本研究で用いた検体には、治療として扁桃摘出を行った IgA 腎症患者もいるので、治療の有無によって IgA 糖鎖に変化が出るか調査した。

グラフの左から扁桃摘出していない IgA 腎症患者、扁桃摘出した IgA 腎症患者、健常者となっている。

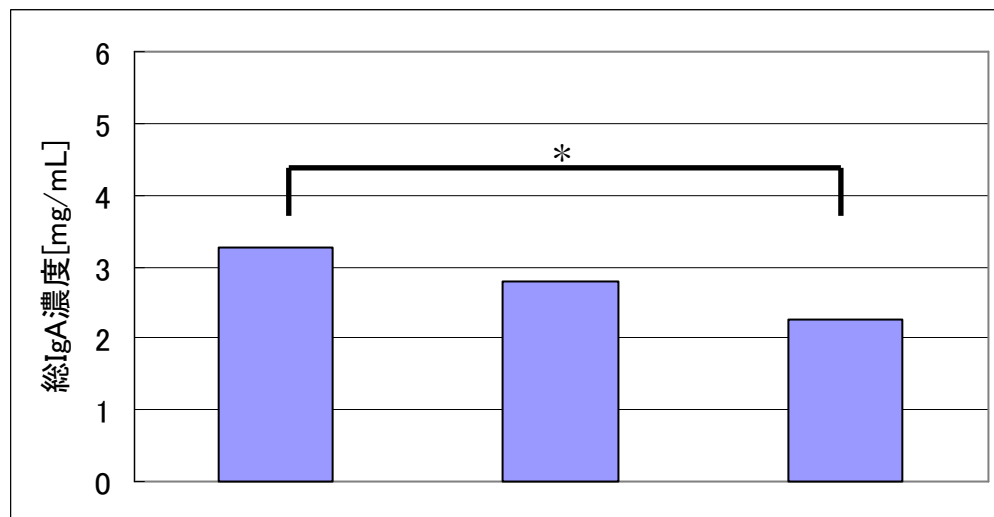


Fig.3-2-5a.治療の有無による総 IgA 濃度の変化(n=3)

治療として扁桃を摘出した IgA 腎症患者のほうが扁桃を摘出していない IgA 腎症患者よりも総 IgA 濃度が低いことが分かった。

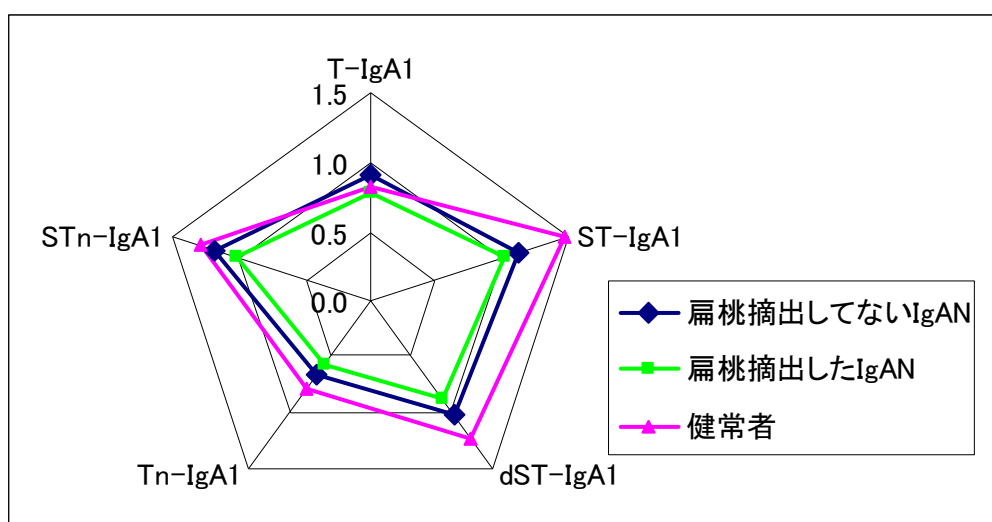


Fig.3-2-5b.治療の有無による IgA1 糖鎖濃度の比較(n=3)

扁桃摘出をした IgA 腎症患者のほうが、扁桃摘出していない IgA 腎症患者よりも IgA1 糖鎖濃度が全体的に高いことが分かった。

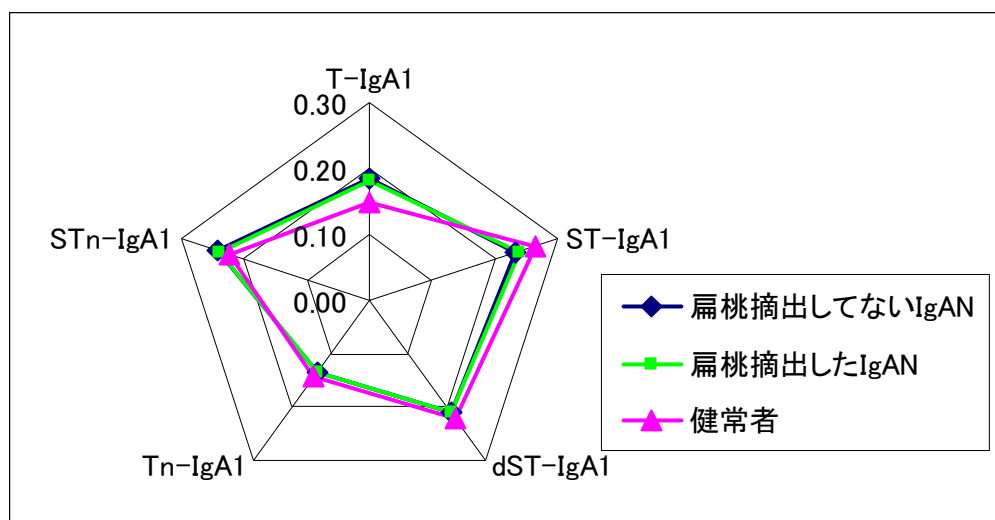


Fig.3-2-5vc 治療の有無による IgA1 糖鎖比率の比較

治療の有無に因らず、IgA 腎症患者の IgA1O-結合型糖鎖のパターンは同じだった。

4. 考察

4-1. Jacalin の糖鎖認識

Jacalin は IgA1O-結合型糖鎖を特異的に認識するといわれている。そこで本研究では IgA1O-結合型糖鎖を構成する 3 種類の糖、ガラクトース(Gal)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、N-アセチルノイラミン酸(シアル酸)と Jacalin がどの程度のアフィニティーを持つか調査した。その方法として Jacalin のトリプトファン蛍光強度の変化を利用した。

Jacalin のトリプトファンは α -サブユニットに 1 つと β -サブユニットに 1 つ存在しており、 α -サブユニットのトリプトファンは X 線構造解析によって Jacalin の糖鎖認識サイトを形成していることがわかっている⁽²²⁾。そのため、Jacalin のトリプトファン蛍光強度の変化から Jacalin とリガンドが相互作用していることがわかる。

そして今回の結果では抽出・精製した Jacalin において、シアル酸とのアフィニティーが最も高いことが分かった(Fig.3-1-4)。このことからシアル酸は Gal や GalNAc よりも Jacalin のトリプトファンと相互作用するといえる。その理由として、シアル酸には Gal や GalNAc と違い、5 位の C 原子から $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$ が伸びており、Gal や GalNAc の $-\text{CH}_2\text{OH}$ よりも OH 基が多く、トリプトファンに近付くので、OH 基とトリプトワンの N 原子や O 原子と強く相互作用できるために、シアル酸のほうが Jacalin とのアフィニティーが高くなったのではないかと考えられる。またシアル酸には 1 位に COOH 基を持っていることから、Jacalin の糖鎖認識サイトにあるアスパラギン酸とは電氣的に反発してしまうはずなので、Gal や GalNAc とは糖鎖認識サイトの中でも同じところへは入れずに、その近くに入る可能性がある。

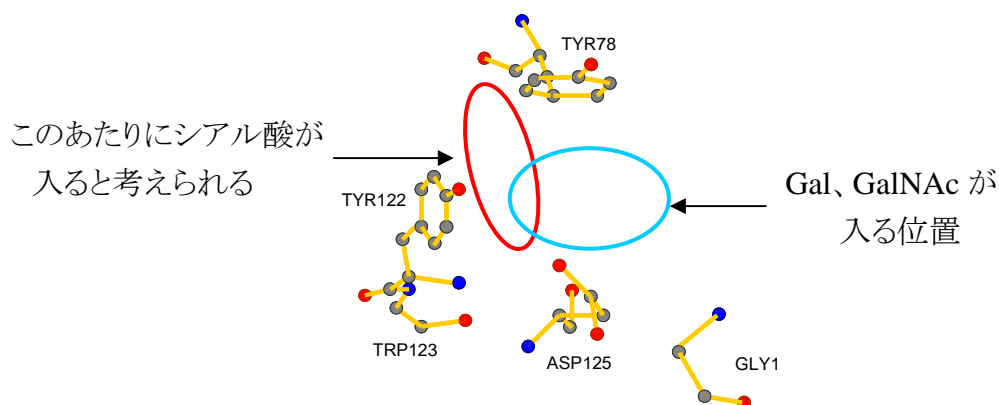


Fig.4-1a.Jacalin の糖認識予想図

次に IgA1 糖鎖を固定化したアフィニティーカラムを用いて、分離・精製した T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin の糖鎖認識についてそれぞれ考える。

まず T-Jacalin に関して、Gal を強く認識し、GalNAc の認識はあまり強くなかった (Fig.3-1-4)。これは GalNAc の 2 位の N 原子やアセチル基が T-Jacalin との相互作用を阻害していると考えられる。Jacalin のアミノ酸配列は変動する部分があるという報告⁽²¹⁾があることから、糖鎖認識サイトとは直接関連のない部分の配列が変動することによって、糖鎖認識サイトのポケットの形状も変化して、糖鎖認識サイトへ入りにくくなることがあると考えられる。

ST-Jacalin に関して、GalNAc を強く認識し、シアル酸の認識は弱かった (Fig.3-1-4)。シアル酸の認識が弱い理由は糖鎖認識サイトのシアル酸を認識する部分が、Jacalin のアミノ酸配列の変動によって変形して、シアル酸が入りにくくなるのではないかと考えられる。

dST-Jacalin に関して、シアル酸の認識が強かった (Fig.3-1-4)。Gal、GalNAc の認識も弱くないことから、糖鎖認識サイトの形状にゆがみが少なく、糖が入るのを阻害しない構造をしていると考えられる。

Tn-Jacalin に関して、GalNAc を強く認識し、シアル酸の認識がやや弱かった (Fig.3-1-4)。シアル酸の認識能が弱いのは、シアル酸が入る糖鎖認識サイトがアミノ酸配列の変動によってゆがみ、シアル酸を認識しにくくなったのではないかと考えられる。

STn-Jacalin に関して、どの糖に対しても認識が弱かった (Fig.3-1-4)。これは糖鎖認識サイトがトリプトファンとの相互作用がしにくい形状になっていて、アフィニティーが弱いという結果になったと考えられる。それはアフィニティーカラムを用いた精製をする際に、カラムに吸着していることが確認できているので、糖鎖認識能がなくなっているわけではないといえるからである。

本研究では、Jacalin と IgA1O-糖鎖を構成する単糖とのアフィニティーを調査したが、実際に Jacalin が認識しているのはグリコペプチドに結合した糖鎖なので、糖の α 位をメチル基やグリコペプチドに置換したもの、単糖ではなく二糖以上の糖鎖にしたものなどとのアフィニティーを調査することで、さらに Jacalin の糖鎖認識を理解することができると考えられる。また、本研究は Jacalin のトリプトファン蛍光を利用してアフィニティーを測定したが、Jacalin の糖鎖認識サイトにはトリプトファン以外のアミノ酸も存在していることから、それらのアミノ酸残基に注目することによって Jacalin の構造や糖鎖認識を解明することが期待できる。

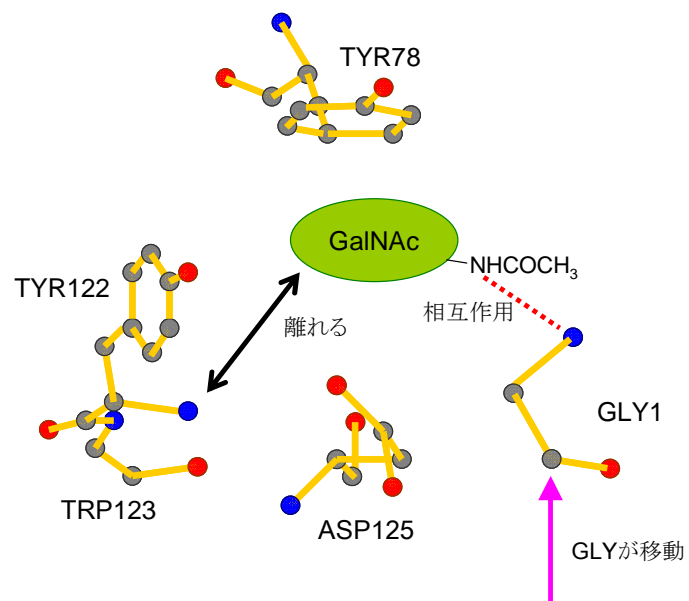


Fig.4-1b.T-Jacalin の GalNAc の認識阻害予想図

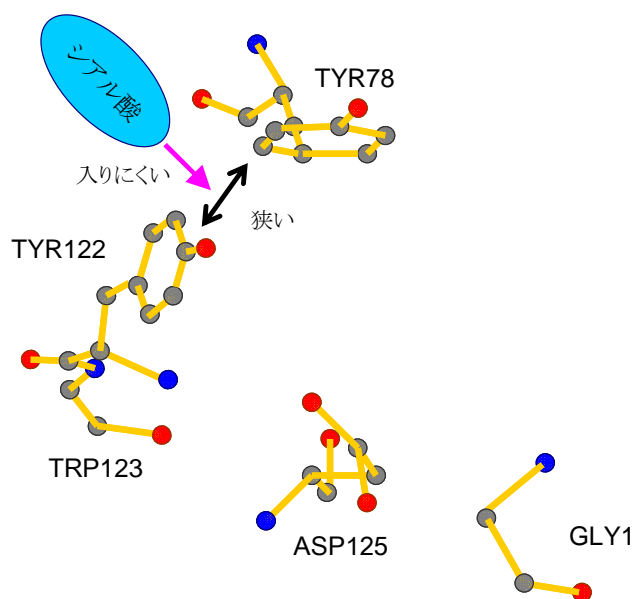


Fig.4-1c.ST-、Tn-Jacalin のシアル酸の認識阻害予想図

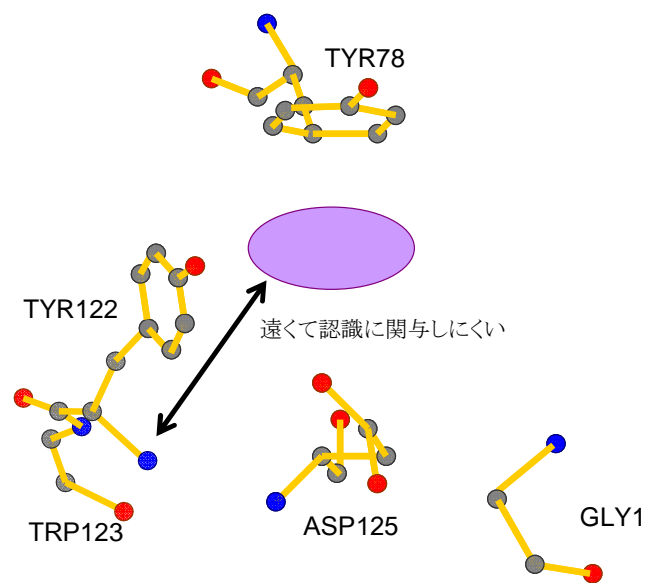


Fig.4-1d.STn-Jacalin の糖鎖認識サイト予想図

4-2. IgA 腎症と IgA1 糖鎖

IgA 腎症診断法の開発のため、IgA 腎症患者と健常者という二群で総 IgA 濃度及び T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 濃度を、抗 IgA 抗体及びアフィニティーカラムによって分離・精製した T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin を用いて測定した。その結果、総 IgA 濃度は IgA 腎症患者のほうが健常者よりも高い傾向があった(Fig.3-2-1)。これは IgA 腎症の特徴として血液中の総 IgA 濃度が高いことと一致している。

T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 濃度に関しては、T-IgA1 濃度のみ IgA 腎症患者と健常者で同程度であった。他の 4 種類の IgA1 濃度は IgA 腎症患者よりも健常者のほうが高いという結果になった(Fig.3-2-2)。この理由として、2 つのことが考えられる。

まず 1 つ目は、IgA1 の持つ O-結合型糖鎖は 1 分子に 1 本ではなく、平均 4～5 本結合していると考えられていることが挙げられる。IgA 腎症患者のほうが T-IgA1 濃度以外の IgA1 濃度が低かったのは、(1)IgA 腎症患者の IgA1O-結合型糖鎖は 1 分子中に同じものが多く結合していて、健常者の IgA1O-結合型糖鎖は 1 分子中に同じものが少ないと考えられる。(2)IgA 腎症患者の IgA1O-結合型糖鎖は 1 分子中に数本しかついておらず、健常者のほうが 1 分子中に結合している糖鎖の数が多いと考えられる。

2 つ目はアフィニティーカラムで分離・精製した Jacalin について、Jacalin と単糖とのアフィニティーを測定した結果からも分かるとおり、T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin がそれぞれ対応する IgA1O-結合型糖鎖のみを認識することができていないと考えられる。そのために T-Jacalin、ST-Jacalin、dST-Jacalin、Tn-Jacalin、STn-Jacalin を用いて IgA1 糖鎖を測定すると、認識している糖鎖がかぶっている可能性がある。それは測定した T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 濃度を全て足し合わせた値が、測定した総 IgA 濃度よりも 1～2.5 倍ほど高くなっているところからも考えられる。

上記のような理由から、測定した濃度をそのまま直接比較しにくいので、T-IgA1、ST-IgA1、dST-IgA1、Tn-IgA1、STn-IgA1 を総 IgA の中にどのくらいの割合で含んでいるのか、比率によって比較をした。その結果、健常者では ST-IgA1 が高い傾向があり、IgA 腎症患者では T-IgA1 が高い傾向があった(Fig.3-2-3)。健常者で ST-IgA1 が高いというのは、ST-IgA1 が正常糖鎖 IgA1 であることから予想通りの結果であった。しかし IgA 腎症患者で正常糖鎖 IgA1 と考えていた T-IgA1 の比率が高くなった。

本研究のように IgA1 糖鎖濃度を全て測定して、比較する研究はされておらず、T-IgA1 濃度を測定する実験もほとんどされていない。しかし糖鎖不全 IgA1 である

Tn-IgA1、STn-IgA1 の濃度をレクチン結合 ELISA 法で測定している実験はいくつもされており、その結果、IgA 腎症患者のほうがそれらの血液中の Tn-、STn-IgA1 濃度が高いと報告されている⁽²⁶⁾。さらに IgA1 の糖鎖合成において働く酵素と分子シャペロンが、血液中、扁桃の B 細胞で IgA 腎症患者では減少しているという報告もなされている⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾。そのため IgA 腎症患者の IgA1 糖鎖は Gal 欠損 IgA1 が多いと考えられている。

これらのことから本研究の結果の IgA 腎症患者のほうが T-IgA1 の割合が高い理由は、B 細胞のゴルジ装置で IgA1 が糖鎖合成された後、産生されてからのシアル酸分解が健常者よりも IgA 腎症患者で盛んに行われているのではないかと考えられる。そしてシアル酸分解は ST-IgA1 の割合が IgA 腎症患者よりも健常者で高いことから、ST-IgA1 の Gal に α 2-3 結合しているシアル酸が特に分解されると考えられる。

また dST-IgA1 にも同様のシアル酸が存在するため、分解される可能性があるが、dST-IgA1 の割合はそれほど IgA 腎症患者で低くないことから、あまり分解されていないと考えられる。この理由として、GalNAc に α 2-6 結合しているシアル酸があり、シアル酸のカルボキシル基が負電荷を持っているので、電氣的要因でシアル酸分解酵素が反応できないのではないかと考えられる。同じシアル酸でも GalNAc に α 2-6 結合しているものは STn-IgA1、dST-IgA1 の割合が減少していないことから、分解する酵素が IgA 腎症患者と健常者で同程度の存在であると考えられる。

つまり、IgA 腎症患者の血液中には α 2-3 シアリダーゼが多い、もしくは α 2-3 シアリダーゼを産生するものが多いのかもしれない。シアリダーゼを産生するものとして、パラインフルエンザウイルスなどの外来抗原が挙げられる。このような外来抗原が IgA 腎症と関連があるという研究もされており、パラインフルエンザウイルスに対する IgA 抗体が IgA 腎症患者には多いという報告がある⁽²⁹⁾ので、パラインフルエンザウイルスは IgA 腎症の病原の一つの可能性として有力であると考えられる。

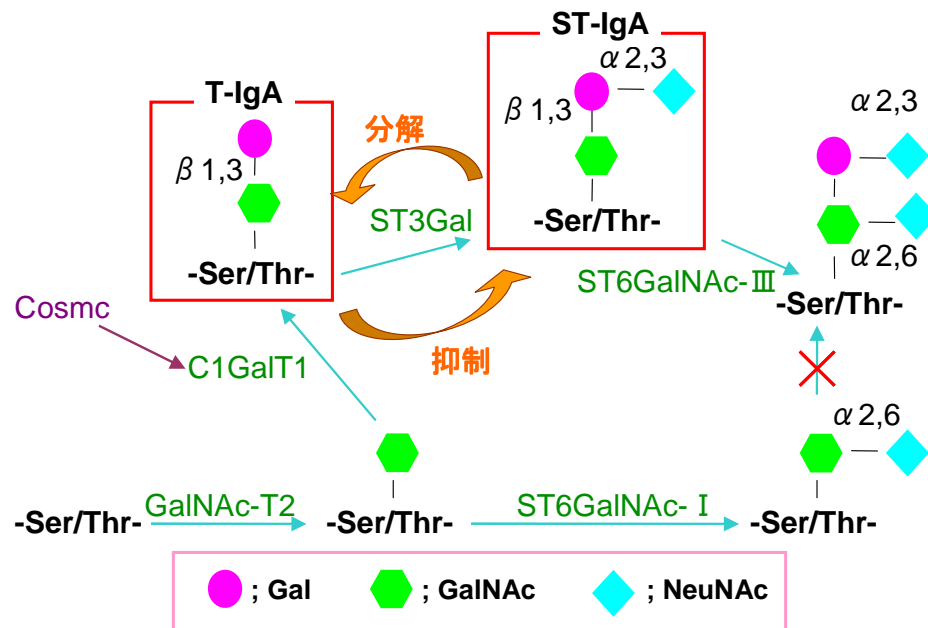


Fig.4-2.IgA1O-結合型糖鎖の合成経路

4-3.IgA1O-結合型糖鎖と扁桃摘出

本研究で使用した検体には、IgA 腎症の治療として扁桃を摘出した患者も含まれており、IgA 腎症患者の中でもこの治療の有無によって IgA1O-結合型糖鎖に違いがあるのか見たところ、治療をしていない患者よりも治療をした患者のほうが総 IgA 濃度の低下が見られたが、IgA1O-結合型糖鎖の割合について違いは見られなかった(Fig.3-2-5)。

扁桃は鼻腔や口腔から体内へ侵入した外来抗原と初めて接触する部位であることから、抗体産生が盛んに行われる。IgA は粘膜部位で多く産生されるため、扁桃でも血液中より IgA は多く産生されている。そのため総 IgA 濃度が扁桃摘出をした IgA 腎症患者で減少したと考えられる。

また IgA1O-結合型糖鎖と扁桃摘出は関連があまりないことから、IgA 腎症患者と健常者の IgA1O-結合型糖鎖に違いが生まれるのは、扁桃ではない部位で起きていると考えられる。しかしどの部位で違いが生まれるのかは不明である。

5. 結論

- 〈1〉 IgA1O-結合型糖鎖の構成成分である Gal、GalNAc、シアル酸と Jackfruit の種子から抽出・精製した Jacalin とのアフィニティーを調査したところ、シアル酸とのアフィニティーが最も強いことが分かり、Gal、GalNAc の認識能はそれほど違いがないことが分かった。またアフィニティーカラムによって分離・精製した ST-、T-、Tn-、STn-、dST-Jacalin とのアフィニティーについて、Gal の認識能が最も強いのは T-Jacalin、GalNAc の認識能が最も強いのは Tn-Jacalin、シアル酸の認識能が最も強いのは dST-Jacalin であることが分かった。これらのことから分離・精製した Jacalin は糖の認識能が異なることが明らかになった。
- 〈2〉 アフィニティーカラムで分離・精製した Jacalin を用いて、IgA1 糖鎖濃度を測定し、IgA1 糖鎖の比率から IgA 腎症診断法の開発を試みたところ、IgA 腎症患者のほうが健常者よりも T-IgA1 の比率が高く、ST-IgA1 が低い傾向があることが分かった。さらに T-IgA1 に関して、健常者の平均と比べてそれ以上の比率の IgA 腎症患者が 48 人中 47 人だった。ST-IgA1 に関しては、健常者の平均と比べてそれ以下の比率の IgA 腎症患者が 48 人中 40 人だった。これらのことからアフィニティーカラムによって分離・精製した Jacalin を用いた IgA1 糖鎖認識によって、IgA 腎症の診断が可能であることが示唆された。

6. 謝辞

本研究を進めていくにあたり、三重大学工学部分子素材工学科生体材料化学研究室の堀内隆先生、宮本啓一先生には多くの御助言と御指導をして頂き、大変お世話になりました。特に宮本先生には実験の進め方からその内容に関しても、たくさん御指導をして頂いたために、有意義な研究をすることができました。日頃から大変お忙しい身でありながら、実験結果の解釈に困惑したときや実験機器におけるトラブルが発生したときなど、研究生活の様々な場面で手助けをして頂き、本当にありがとうございました。

また分子生物工学研究室の冨田昌弘教授には修士論文の副査を担当して頂き深く感謝しております。

IgA 腎症診断法の開発を検討するために、三重大学医学部血液浄化療法部の村信介先生、村田先生をはじめとする御助力いただきましたスタッフの皆様、さらには検体として血液をご提供頂きました患者様方には大変感謝致しております。そして生体材料化学研究室の堀内孝先生、宮本啓一先生、水谷直紀先輩、石田尚志先輩、石原千明先輩、伊藤寛之先輩、羽多野由季子先輩、山崎慎也先輩、佐々木剛くん、野口寛之くん、東洋くん、堀井貴司くん、山本光則くん、阿部功児くん、境淳志くん、田野裕美さん、中村雅広くん、丹羽一喜くん、原拓也くんには健常者としての血清の提供にご協力頂き、ありがとうございました。

さらに同じ「Jacalin」を用いたテーマとして一緒に研究してきた千葉武史先輩、篠原紀子先輩、永田裕子先輩、塚本真子さん、伊藤直人くんには大変お世話になりました。先輩方には研究で苦勞しているときにアドバイスを頂いたり、Jacalin の精製を手伝って頂いたり御迷惑をお掛け致しましたが、そのおかげで充実した研究生活を送ることができました。ありがとうございました。

最後に本研究に関わることができて本当によかったと思います。「Jacalin」や「IgA 腎症」など普通の生活では関わることをできないものを知ることができ、Jackfruit という日本ではほとんど見ることもできない果実を、実際に触ったり、食べたりすることもでき、とてもよい経験をさせて頂きました。このような経験ができたのも宮本先生あつてのことなので、宮本先生には再度深く感謝申し上げます。

7. 参考文献

- (1).富野 康日己: IgA 腎症診療指針 第2版／日腎会誌 (2002)
- (2).坂井 建雄、河原 克雅: 人体の正常構造と機能 V 腎・泌尿器／日本医事新報社 (1999)
- (3).川村 哲也: 原発性糸球体疾患-IgA 腎症を中心に-／日腎会誌 (2002)
- (4).Tomana M, *et al*: Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present complexes with IgG. *Kidney International*, 1997; 52: 509-516
- (5).Hiki Y, *et al*: Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney International*, 2001; 59: 1077-1085
- (6).Moldoveanu Z, *et al*: Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney International*, 2007; 71: 1148-1154
- (7).Voet D, *et al*: ヴォート基礎生化学 第2版／東京化学同人 (2007)
- (8). Hiki Y, *et al*: O-linked oligosaccharides of the IgA1 hinge region: roles of its aberrant structure in the occurrence and/or progression of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 2009; 13: 415-423
- (9).Mestecky J, *et al*: Immunoglobulin A (IgA). *Methods in Enzymology*, 1985; 116: 37-75
- (10).Odani H, *et al*: Direct evidence for decreased sialylation and galactosylation of human serum IgA1 Fc O-glycosylated hinge peptides in IgA nephropathy by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 217: 268-274
- (11).Horie A, *et al*: IgA1 molecules produced by tonsillar lymphocytes are under-O-glycosylated in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 2003; 42: 486-496
- (12).Tomana M, *et al*: Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest*, 1999; 104: 73-81
- (13).Zhang JJ, *et al*: Binding capacity of *in vitro* deglycosylated IgA1 to human mesangial cells. *Clin Immunol*, 2006; 119: 103-109
- (14).Jonathan B, *et al*: The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Nephrology*, 2007; 12: 275-284
- (15).谷口 直之: ポストゲノム時代の糖鎖生物学がわかる／羊土社 (2002)
- (16).伊藤 幸成: 糖鎖科学の新展開／株式会社 NTS (2005)
- (17).Novak J, *et al*: Interaction of human Mesangial cells with IgA and IgA-containing immune complexes. *Kidney International*, 2002; 62: 465-475

- (18).Novak J, *et al*: IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of Mesangial cells. *Kidney International*, 2005; 67: 504-513
- (19).van der Boog P J.M. *et al*: Role of macromolecular IgA in IgA nephropathy. *Kidney International*, 2005; 67: 813-821
- (20).Sharon N, *et al*: レクチン 第2版／シュプリンガー・フェアラー東京 (2006)
- (21).Kabir S: Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods*, 1998; 212: 193-211
- (22).Jeyaprakash AA, *et al*: Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: An X-ray and modeling study. *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 217-228
- (23).Sharma A, *et al*: Structure, dynamics, and interactions of jacalin. Insights from molecular dynamics simulations examined in conjunction with results of X-ray studies. *Proteins*, 2009; 77: 760-777
- (24).Tachibana K, *et al*: Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology*, 2006; 16-1: 46-53
- (25).木下 一彦、御橋 廣眞 編: 蛍光測定 生物科学への応用／学会出版センター (1983)
- (26).Xu LX, *et al*: Aberrantly glycosylated serum IgA1 are closely associated with pathologic phenotypes of IgA nephropathy. *Kidney International*, 2005; 68: 167-172
- (27).Xie LS, *et al*: The role of C1GalT1C1 in lipopolysaccharide-induced IgA1 aberrant O-glycosylation in IgA nephropathy. *Clin Invest Med*, 2010; 33(1): E5-E13
- (28).Inoue T, *et al*: Differential expression of glycogenes in tonsillar B lymphocytes in association with proteinuria and renal dysfunction in IgA nephropathy. *Clinical Immunology*, 2010; 136: 447-455
- (29).Suzuki S: IgA 腎症とパラインフルエンザ菌-私の IgA 腎症研究史／東京図書出版会 (2007)
- (30).平成 20 年度 修士論文 糖鎖不全認識による IgA 腎症診断方法に関する研究 川寄綾香
- (31).平成 22 年度 修士論文 IgA 腎症にみられるメサンギウム細胞への IgA 沈着を制御する技術の開発 永田裕子

8. 付録

8-1. 糖鎖固定化カラムを用いた **Jacalin** の精製

8-1-1. T 構造糖鎖の ST 構造糖鎖への変換

【使用試薬】

- T antigen, p-Nitrophenyl-(Calbiochem)
- CMP-Sialic Acid, Monosodium Salt(Calbiochem)
- α 2,3-(O)-Sialyltransferase, Rat, Recombinant, Spodoptera frugiperda(Calbiochem)
- MES(同仁化学)
- Calcium Chloride (Wako)
- Manganese (II) Chloride Tetrahydrate(Wako)
- Magnesium Chloride Hexahydrate(Wako)
- Triton-X100(Sigma-Aldrich)

【溶液調製】

Reaction buffer

→50mM MES、2mM CaCl_2 、2mM MnCl_2 、10mM MgCl_2 、0.6% Triton-X100、100mM CMP-NeuAc

1. 脱イオン水 10ml に MES 97.6mg、 CaCl_2 2.22mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.55mg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.3mg を溶解させた。
2. 1.の溶液 1ml に Triton-X100 6 μ l を加えた。
3. 2.の溶液 100 μ l に CMP-NeuAc 5mg を加えた。

8-1-2. ST 構造糖鎖の dST 構造糖鎖への変換

【使用試薬】

- ST-pNP
- CMP-Sialic Acid, Monosodium Salt(Calbiochem)
- α 2,6-Sialyltransferase(ST6GalNAc- I)
- MES(同仁化学)
- Calcium Chloride(Wako)
- Magnesium Chloride Hexahydrate(Wako)
- Manganese(II) Chloride Tetrahydrate(Wako)

- Triton-X100(Sigma-Aldrich)

【溶液調製】

Reaction buffer

→50mM MES、2mM CaCl₂、2mM MnCl₂、10mM MgCl₂、0.6% Triton-X100、
100mM CMP-NeuAc

1. 脱イオン水 10ml に MES 97.6mg、CaCl₂ 2.22mg、MnCl₂・4H₂O 6.55mg、
MgCl₂・6H₂O 20.3mg を溶解させた。
2. 1.の溶液 1ml に Triton-X100 6μl を加えた。
3. 2.の溶液 100μl に CMP-NeuAc 5mg を加えた。

8-1-3. T 構造糖鎖の Tn 構造糖鎖への変換

【使用試薬】

- T antigen, p-Nitrophenyl-(Calbiochem)
- β-Galactosidase
- Acetonitrile
- PBS(Wako)

8-1-4. Tn 構造糖鎖の STn 構造糖鎖への変換

【使用試薬】

- Tn-pNP
- CMP-Sialic Acid, Monosodium Salt(Calbiochem)
- α2,6-Sialyltransferase(STGalNAc- I)
- MES(同仁化学)
- Calcium Chloride(Wako)
- Manganese(II) Chloride Tetrahydrate(Wako)
- Magnesium Chloride Hexahydrate(Wako)
- Triton-X100(Sigma-Aldrich)

【溶液調製】

Reaction buffer

→50mM MES、2mM CaCl₂、2mM MnCl₂、10mM MgCl₂、0.6% Triton-X100、
100mM CMP-NeuAc

1. 脱イオン水 10ml に MES 97.6mg、CaCl₂ 2.22mg、MnCl₂·4H₂O 6.55mg、MgCl₂·6H₂O 20.3mg を溶解させた。
2. 1.の溶液 1ml に Triton-X100 6μl を加えた。
3. 2.の溶液 100μl に CMP-NeuAc 5mg を加えた。

8-1-5. T、ST、dST、Tn、STn-pNP のアミノ化

【使用試薬】

- T antigen, p-Nitrophenyl-(Calbiochem)
- ST-pNP
- dST-pNP
- Tn-pNP
- STn-pNP
- sodium thiosulfite(Wako)
- sodium cyanoborohydrate(Wako)
- Ethanolamine(Wako)
- Ninhydrin(Wako)
- Butanol(Wako)

【溶液調製】

- 0.1M チオ硫酸ナトリウム溶液
→チオ硫酸ナトリウム 5 水和物 1.3344g を脱イオン水 50ml に溶かして調製した。
- ニンヒドリン溶液
→ニンヒドリン 0.35g を 100ml のエタノールに溶かして調製した。

8-1-6. T、ST、dST、Tn、STn 構造糖鎖のカラムへの固定化

【使用試薬・機器】

- 1M Hydrochloric Acid(Wako)
- Acetic Acid(Wako)
- Sodium Chloride(Wako)
- Sodium Acetate(Wako)
- Sodium Azide(Wako)
- Sodium Hydrogen Carbonate(Wako)

- Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate(Wako)
- Disodium Hydrogen phosphate 12-Water(Wako)
- Ethanolamine(Wako)
- PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- HiTrap NHS-activated HP(1ml)(GE Healthcare)

【溶液調製】

- 1mM 塩酸
→1N 塩酸 1ml を脱イオン水で 1000ml になるように希釈した。
- Coupling buffer (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.2M 炭酸水素ナトリウム溶液
•炭酸水素ナトリウム 1.6802g、塩化ナトリウム 2.922g を脱イオン水で 100ml になるように調整後、pH8.3 に調節した。
- Buffer A(Blocking buffer) (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M エタノールアミン溶液
•エタノールアミン 3.02ml、塩化ナトリウム 2.922g を脱イオン水で 100ml になるように調整後、pH8.3 に調節した。
- Buffer B (pH4.0)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M 酢酸 buffer
•酢酸 1.16ml を脱イオン水で 200ml になるように調製したものと、無水酢酸ナトリウム 1.64g を脱イオン水で 200ml に調製したものを 41:9 で混合した。その溶液 100ml につき塩化ナトリウム 2.922g を加え、pH4.0 に調節した。
- Start buffer (pH7.0)
→0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸 buffer
•リン酸二水素ナトリウム 4.6803g を脱イオン水で 300ml に調製したものと、リン酸水素二ナトリウム 14.3256g を脱イオン水で 400ml に調製したものを 195:305 で混合した。その溶液 500ml につき塩化ナトリウム 2.922g を加え、pH7.0 に調節した。
- 保存溶液
→0.1% アジ化ナトリウムを含む Start buffer
•Start buffer 50ml にアジ化ナトリウム 0.500g を溶かして調製した。

8-1-7. T、ST、dST、Tn、STn 認識 Jacalin の精製

【使用試薬・機器】

- D(+)-Galactose(Wako)
- 1M Hydrochloric Acid(Wako)
- Tris(hydroxymethyl)amino methane(Wako)
- Sodium Azide(Wako)
- PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- VARIABLE WAVELENGTH UV MONITOR(HITACHI)
- Shodex RI-72(Shodex)
- T-pNA 固定化カラム
- ST-pNA 固定化カラム
- dST-pNA 固定化カラム
- Tn-pNA 固定化カラム
- STn-pNA 固定化カラム

【サンプル】

- Jacalin(2-1-2 で精製したもの)

【溶液調製】

- Start buffer (pH7.4)
 - 175mM Tris-HCl buffer
 - Tris 10.5998g を脱イオン水で 500ml になるように調製後、塩酸で pH7.4 に調節した。
- Elute buffer
 - 0.1M Galactose を含む Start buffer
 - 50ml の Start buffer に Galactose 4.5g を溶かして調製
- 保存溶液
 - 0.1% アジ化ナトリウムを含む Start buffer
 - 50ml の Start buffer にアジ化ナトリウム 0.500g を溶かして調製

8-2. 精製 Jacalin 固定化カラムを用いた IgA1 の精製

8-2-1. 精製 Jacalin 固定化カラムの作製

【使用試薬・機器】

- 1M Hydrochloric Acid(Wako)
- Acetic Acid(Wako)
- Sodium Chloride(Wako)
- Sodium Acetate(Wako)
- Sodium Azide(Wako)
- Sodium Hydrogen Carbonate(Wako)
- Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate(Wako)
- Disodium Hydrogen Phosphate 12-Water(Wako)
- Ethanolamine(Wako)
- PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- HiTrap NHS-activated HP(1mℓ) (GE Healthcare)

【固定化した物質】

- T-Jacalin
- ST-Jacalin
- dST-Jacalin
- Tn-Jacalin
- STn-Jacalin

【溶液調製】

- 1mM 塩酸
→1N 塩酸 1mℓ を脱イオン水で 1000mℓ になるように希釈した。
- Coupling buffer (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.2M 炭酸水素ナトリウム溶液
•炭酸水素ナトリウム 1.6802g、塩化ナトリウム 2.922g を脱イオン水で 100mℓ になるように調整後、pH8.3 に調節した。
- Buffer A(Blocking buffer) (pH8.3)
→0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M エタノールアミン溶液
•エタノールアミン 3.02mℓ、塩化ナトリウム 2.922g を脱イオン水で 100mℓ になるように調整後、pH8.3 に調節した。

- Buffer B (pH4.0)
 - 0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M 酢酸 buffer
 - 酢酸 1.16ml を脱イオン水で 200ml になるように調製したものと、無水酢酸ナトリウム 1.64g を脱イオン水で 200ml に調製したものを 41:9 で混合した。その溶液 100ml につき塩化ナトリウム 2.922g を加え、pH4.0 に調節した。
- Start buffer (pH7.0)
 - 0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸 buffer
 - リン酸二水素ナトリウム 4.6803g を脱イオン水で 300ml に調製したものと、リン酸水素二ナトリウム 14.3256g を脱イオン水で 400ml に調製したものを 195:305 で混合した。その溶液 500ml につき塩化ナトリウム 2.922g を加え、pH7.0 に調節した。
- 保存溶液
 - 0.1% アジ化ナトリウムを含む Start buffer
 - Start buffer 50ml にアジ化ナトリウム 0.500g を溶かして調製した。

8-2-2. T、ST、dST、Tn、STn 糖鎖をもつ IgA1 の精製

【使用試薬・機器】

- D(+)-Galactose(Wako)
- 1M Hydrochloric Acid(Wako)
- Tris(hydroxymethyl)amino methane(Wako)
- Sodium Azide(Wako)
- PERISTALTIC PUMP P-1(Pharmacia Fine Chem)
- VARIABLE WAVELENGTH UV MONITOR(HITACHI)
- Shodex RI-72(Shodex)
- T-Jacalin 固定化カラム
- ST-Jacalin 固定化カラム
- dST-Jacalin 固定化カラム
- Tn-Jacalin 固定化カラム
- STn-Jacalin 固定化カラム

【サンプル】

- 血漿

【溶液調製】

- Start buffer (pH7.4)
 - 175mM Tris-HCl buffer
 - Tris 10.5998g を脱イオン水で 500ml になるように調製後、塩酸で pH7.4 に調節した。
- Elute buffer
 - 0.1M Galactose を含む Start buffer
 - 50ml の Start buffer に Galactose 4.5g を溶かして調製
- 保存溶液
 - 0.1% アジ化ナトリウムを含む Start buffer
 - 50ml の Start buffer にアジ化ナトリウム 0.500g を溶かして調製

8-3. タンパク質の定量(BCA 法)

本実験での Jacalin の定量を BCA 法で行った。

【使用試薬・機器】

- Bicinchoninic Acid(ナカライテスク)
- Sodium Tartrate(Wako)
- Sodium Carbonate(Wako)
- Sodium Hydroxide(Wako)
- Sodium Hydrogen carbonate(Wako)
- Copper(II) Sulfate Pentahydrate(Wako)
- BSA(Bovine Serum Albumin) (Thermo)
- Spectrophotometer(BIO-RAD)

【溶液調製】

- A 溶液
→ピシニコニン酸 1g、酒石酸ナトリウム 0.16g、炭酸ナトリウム 2g、水酸化ナトリウム 0.4g、炭酸水素ナトリウム 0.95g を脱イオン水に溶解して 100ml に調整後、水酸化ナトリウムを適量加えて pH11.25 に調節した。
- B 溶液
→硫酸銅(II)5 水和物 4g を脱イオン水に溶解し、100ml に調製した。

【手順】

1. スタンダードとして BSA 溶液を作製した。
2. A 溶液と B 溶液を 50:1 で混合した。
3. サンプルとスタンダードをそれぞれ 10 μ l ずつアシストチューブにとり、2 で作製した混合溶液を 100 μ l ずつ加えた。
4. ボルテックスで攪拌して 37℃、30 分間静置した。
5. OD562 を測定した。
6. タンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作成して総タンパク質量を測定した。

* Spectrophotometer の操作法

1. 電源を入れる。
2. λ を押す。
3. enter を押す。(波長の読み取り 1)
4. 波長を 562nm に設定する。
5. enter を押す。(バックグラウンド読み取りをひきますか No)
6. select → enter を押す。(繰り返して読むサンプルはありますか Yes)
7. enter を押す。(試料の反復番号 3)
8. セルに Blank (BSA 濃度 0mg/ml の液) を入れ、Read Blank を押す。
9. → を押す。
10. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄して脱イオン水を取り除く。
11. セルに試料を入れて Read Sample を 3 回押す。
12. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄して脱イオン水を取り除く
13. 11～12 を繰り返す。

8-4. IgA 濃度測定 (ELISA 法)

総 IgA 濃度を測定するために行った。

【使用試薬・機器】

- PBS
→NaCl 8g、Na₂HPO₄・12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g を脱イオン水 1ℓ に溶解
- PBST
→0.05% Tween20 を含む PBS
- Coating buffer
→Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g を脱イオン水 1ℓ に溶解し、1N HCl で pH9.6 に調節
- リン酸 buffer(pH7.4)
→NaH₂PO₄・2H₂O 0.296g、Na₂HPO₄・12H₂O 2.901g を脱イオン水 100ml に溶解
- Blocking 溶液
→3%スキムミルクを含むリン酸 buffer
- 発色基質溶液
→クエン酸一水和物 0.3828g、Na₂HPO₄(無水) 0.4735g を脱イオン水 50ml に溶解
- 発色溶液
→発色基質溶液 10.5ml に OPD 1 錠、H₂O₂ 5μℓ を溶解
- 反応停止溶液
→1N H₂SO₄
- 96 穴イムノプレート(NUNC)
- 振とう器(SANKO JUNYAKU)
- アスピレーター(アズワン)
- イムノウォッシャ(NUNC)
- マイクロプレートリーダー(BIO RAD)

【抗体、スタンダード、サンプルの希釈】

<一次抗体>

- Goat anti-human IgA
→Coating buffer で 100 倍に希釈

<スタンダード>

- 国際標準血漿
→PBS 7.84mlに 2 μ l 加えて希釈し、濃度 500ng/mlにして倍々希釈

<サンプル>

- IgA 腎症患者 (48 人分) 血清
→PBS で 20000 倍希釈
- 健常者 (19 人分) 血清
→PBS で 20000 倍に希釈

<二次抗体>

- HRP-conjugated Goat anti-human IgA
→PBS で 20000 倍に希釈

【手順】

1. 96 穴イムノプレートに一次抗体を加えて、室温で 1 時間静置した。(100 μ l/well)
2. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
3. Blocking 溶液を加えて、室温で 30 分間振とうした。(200 μ l/well)
4. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
5. サンプル、スタンダードを 2 穴ずつ加えて、室温で 1 時間振とうした。
(100 μ l/well)
6. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
7. 二次抗体を加えて、室温で 1 時間振とうした。(100 μ l/well)
8. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
9. 発色溶液を加えて、室温、暗所で 10～15 分間静置した。(100 μ l/well)
10. 充分発色していることを確認してから、反応停止溶液を加える。(100 μ l/well)
11. すぐにマイクロプレートリーダーで 490nm の吸光度を測定した。

8-5. 糖鎖不全 IgA1 濃度測定(レクチン結合 ELISA 法)

IgA1 糖鎖を測定するために行った。

【使用試薬・機器】

- PBS
→NaCl 8g、Na₂HPO₄・12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g を脱イオン水 1ℓ に溶解
- PBST
→0.05% Tween20 を含む PBS
- Coating buffer
→Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g を脱イオン水 1ℓ に溶解し、1N HCl で pH9.6 に調節
- リン酸 buffer(pH7.4)
→NaH₂PO₄・2H₂O 0.296g、Na₂HPO₄・12H₂O 2.901g を脱イオン水 100ml に溶解
- Blocking 溶液
→3%スキムミルクを含むリン酸 buffer
- 発色基質溶液
→クエン酸一水和物 0.3828g、Na₂HPO₄(無水) 0.4735g を脱イオン水 50ml に溶解
- 発色溶液
→発色基質溶液 10.5ml に OPD 1 錠、H₂O₂ 5μℓ を溶解
- 反応停止溶液
→1N H₂SO₄
- 96 穴イムノプレート(NUNC)
- 振とう器(SANKO JUNYAKU)
- アスピレーター(アズワン)
- イムノウォッシャ(NUNC)
- マイクロプレートリーダー(BIO RAD)

【抗体、スタンダード、サンプルの希釈】

<一次抗体>

- Goat anti-human IgA
→Coating buffer で 100 倍に希釈

<スタンダード>

- ST-IgA1(2-4-2 で精製)・・・ST-IgA1 測定用
→PBS で濃度 500ng/ml になるように希釈して、さらに倍々希釈
- T-IgA1(2-4-2 で精製)・・・T-IgA1 測定用
→PBS で濃度 500ng/ml になるように希釈して、さらに倍々希釈
- Tn-IgA1(2-4-2 で精製)・・・Tn-IgA1 測定用
→PBS で濃度 500ng/ml になるように希釈して、さらに倍々希釈
- STn-IgA1(2-4-2 で精製)・・・STn-IgA1 測定用
→PBS で濃度 500ng/ml になるように希釈して、さらに倍々希釈
- dST-IgA1(2-4-2 で精製)・・・dST-IgA1 測定用
→PBS で濃度 500ng/ml になるように希釈して、さらに倍々希釈

<サンプル>

- IgA 腎症患者(48 人分)血清
→PBS で 20000 倍希釈
- 健常者(19 人分)血清
→PBS で 20000 倍に希釈

<二次抗体>

- HRP ラベル化 ST-Jacalin(2-2-8 で精製)・・・ST-IgA1 測定用
→PBS で 40000 倍に希釈
- HRP ラベル化 T-Jacalin(2-2-8 で精製)・・・T-IgA1 測定用
→PBS で 10000 倍に希釈
- HRP ラベル化 Tn-Jacalin(2-2-8 で精製)・・・Tn-IgA1 測定用
→PBS で 10000 倍に希釈
- HRP ラベル化 STn-Jacalin(2-2-8 で精製)・・・STn-IgA1 測定用
→PBS で 20000 倍に希釈
- HRP ラベル化 dST-Jacalin(2-2-8 で精製)・・・dST-IgA1 測定用
→PBS で 20000 倍に希釈

【手順】

1. 96 穴イムノプレートに一次抗体を加えて、室温で 1 時間静置した。(100 μ l/well)
2. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
3. Blocking 溶液を加えて、室温で 30 分間振とうした。(200 μ l/well)
4. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
5. サンプル、スタンダードを 2 穴ずつ加えて、室温で 1 時間振とうした。
(100 μ l/well)
6. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
7. 二次抗体を加えて、室温で 1 時間振とうした。(100 μ l/well)
8. PBST で 4 回洗浄し、水分をよく取り除いた。
9. 発色溶液を加えて、室温、暗所で 10～15 分間静置した。(100 μ l/well)
10. 充分発色していることを確認してから、反応停止溶液を加える。(100 μ l/well)
11. すぐにマイクロプレートリーダーで 490nm の吸光度を測定した。