

アイソタイプ型ジャカリンを用いた IgA1 糖鎖の分析に関する研究

Research on analysis of IgA1 glycans using isotopic Jacalin.

○ 畑俊宏 (三重大) 伊藤直人 (三重大) 衣斐勇人 (三重大) 石川英二 (三重大)
村田智博 (三重大) 伊藤正明 (三重大) 堀内 孝 (三重大) 宮本啓一 (三重大)

Toshihiro HATA Mie University, Naoto ITOU Mie University, Yuto EBI Mie University,
Eiji ISHIKAWA Mie University, Tomohiro MURATA Mie University, Masaaki Itou Mie University,
Takashi HORIUTI Mie University, Keiichi MIYAMOTO Mie University

Abstract: O-glycans have combined with the amino acid sequence of the hinge region of IgA1, and the glycans consist of three kinds of sugar. There is a report that many IgA1 seen by IgA nephropathy patient with O-glycans in which galactose lacked among this three sugar. Then, in order to develop the glycans measuring method using Jacalin which combines with O-glycans of IgA1 specifically, we have tried that Jacalin's analysis by two dimensional electrophoresis and the IgA1 O-glycans analysis by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. It was shown that jackfruit seed protein comprehend several differs constituents which have O-glycans recognition ability. Moreover, it suggested that by analyzing an IgA1 hinge region O-glycans using Jacalin, a possibility of being applicable to diagnosis of IgA nephropathy.

Key Words: Jacalin, Human immunoglobulin A1, O-glycans, two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF/TOF-MASS

1. 緒言

IgA腎症は国内の慢性糸球体腎炎の半数以上を占める腎臓病である。しかしその診断方法には患者への負担が大きい生検以外には開発されていない。近年、IgA腎症患者のIgA1ヒンジ部位のアミノ酸に結合する糖鎖異常に関して報告がなされ⁽¹⁾⁽²⁾、IgA1ヒンジ部位の糖鎖分析による診断法の開発が期待されている。

IgA1のヒンジ部位のアミノ酸配列中には、糖鎖結合サイトが存在し、その糖鎖は3種類の糖（ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルノイラミン酸）で形成される。この3種類の糖の組み合わせにより5種類のO-結合糖鎖が知られている。その中でも特にガラクトースが欠如している糖鎖がIgA腎症患者のIgA1に多く見られる異常糖鎖の可能性があると報告されている(Fig.1)。

そこで本研究ではIgA1の簡易的な糖鎖測定法を開発することを目的に、IgA1ヒンジ部位の糖鎖に特異性があるとされるジャカリン（ジャックフルーツ種子成分）のアイソタイプ型⁽³⁾に着目し、各糖鎖に対するジャカリンの糖鎖認識能に関して調査を行った。

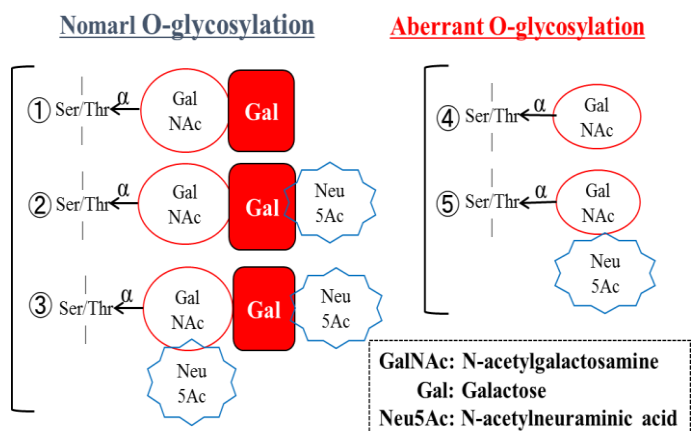


Fig.1 O-glycosylation of IgA1



Fig.2 Jacfruit and the seed

2. 方法

2-1 アイソタイプ型ジャカリンの精製

ジャックフルーツの種子をミキサーで粉砕し、12~16kDaの透析膜を用い、脱イオン水に対して透析後に凍結乾燥した。得られた粉末をIgA1ヒンジ部位に結合する糖鎖（5種類）を固定化したHiTrap NHS-activated HPカラムによるアフィニティークロマトグラフィーを行い、各IgA1糖鎖に特異的なジャカリンを精製した（以下、アイソタイプ型ジャカリンと呼ぶ）。

2-2 二次元電気泳動によるジャカリンの分析

各種アイソタイプ型ジャカリンの二次元電気泳動による分析を行った。（一次元目は等電点4.0-7.0、二次元目は分子量による分離）タンパクの検出にはFramingo染色を用い、蛍光検出装置にてスポットを検出した。

2-3 MALDI-TOF/TOF質量分析によるIgA1の糖鎖分析

アイソタイプ型ジャカリンを固定化したカラムを用いて、人血漿からIgA1を分離した。得られたIgA1に対してSDS-PAGE、アルキル化処理、トリブシン処理、脱塩、ナノLCによる分画を行った後、AB sciex 4800 plus を使用したMALDI-TOF/TOF質量分析を行い糖鎖分析を行った⁽⁴⁾。

3. 結果

3-1 二次元電気泳動によるジャカリンの分析

精製したアイソタイプ型ジャカリンの二次元電気泳動結果をFig.3に示す。等電点と分子量の異なるスポットを複数確認した。

PI4.0

PI7.0

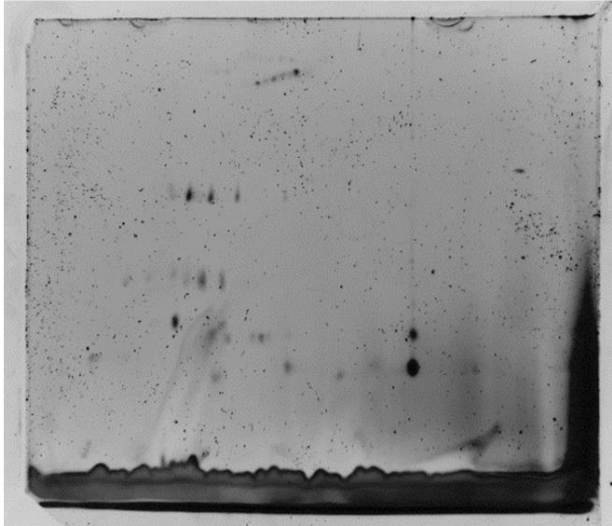


Fig.3 Two-dimensional electrophoresis of isotype jacalin .
(Specific to O-glycosylation① in fig.1)

3-2 IgA1の糖鎖分析

精製したジャカリン固定化カラムにより分離したIgA1のMALDI-TOF/TOF質量分析の結果から、IgA重鎖の配列が同定できた。さらにナノLC後のMALDI-TOF/TOF質量分析のピーク分析から、IgA1ヒンジ部位の糖鎖特定が出来る部位であることが分かった。

4.考察

本研究によりジャックフルーツ種子成分から分離したアイソタイプ型ジャカリンは糖鎖認識能の異なる複数の成分を含んでいることが明らかになった。この理由は、ジャカリンのアミノ酸配列の変化が原因と考えられる。ジャカリンのアミノ酸配列の中に他のアミノ酸に変化する部位が存在する報告が知られている⁽²⁾。この可変アミノ酸は、現在確認されているだけでも12個存在する。すなわち糖鎖認識サイトの周辺に存在している可変部分が糖鎖認識において認識糖鎖の種類に影響を与えていることが示唆された。

MALDI-TOF/TOF質量分析によるIgA1糖鎖分析から、各アイソタイプ型ジャカリンがどのIgA1糖鎖に特異的に結合したかを明らかに出来、こうして作成したジャカリン分子を用いることで、簡単で精度の高いIgA1の糖鎖測定法の開発が期待できる。

5.結論

ジャックフルーツ種子のタンパク質には糖鎖認識能の異なる複数の成分が存在する事が示された。またジャカリンを用いてIgA1ヒンジ部位糖鎖を分析する事で、IgA腎症の診断に応用できる可能性が示唆された。

6.参考文献

(1) M.Tomana,Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies.,The Journal of Clinical Investigation, vol.104, pp.73-81,1999.

(2) J.Mestecky, Immunoglobulin A(IgA),Methods in Enzymology,vol.116, pp.37-75,1985.

(3) S.Kabir ,Jacalin a jackfruit *Artocarpus heterophyllus* seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research, Journal of Immunological Method vol212, pp.193-211,1998.

(4) V Franca,Elucidating heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycosylation by use of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry:Role of cysteine alkylation during sample processing, Journal of proteomics,vol92, pp.299-312,2013.