

IgA1 糖鎖分析のためのアイソタイプ型ジャカリンの開発

The development of jacalin isotypes for the analysis of sugar chains on IgA1.

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

Yuto EBI, Mie University, Toshihiro HATA Mie University, Isato SUGA, Mie University,
 Naoto ITO, Mie University, Tomohiro MURATA Mie University, Eiji ISHIKAWA, Mie University,
 Masaaki ITO, Mie University, Keiichi MIYAMOTO Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie University

Abstract: IgA1 have *O*-glycans combined with the amino acid sequence of the hinge region of them. *O*-glycans consist of three kinds of sugars. It has been reported that there are galactose deficient “abnormal *O*-glycans” in IgA1 of IgA nephropathy patients. In addition, these IgA1 are considered to be involved in the formation of immune complexes that cause the development of IgA nephropathy. Therefore, the analysis of the *O*-glycans of IgA1 may be effective for the diagnosis of IgA nephropathy. In this study, we indicated jacalin, a kind of plant lectins showing the binding specificity to the *O*-glycans of IgA1, has multiple isotypes. Then we purified isotypes jacalin that have different specificity to *O*-glycans by affinity chromatography, and analyzed them by two-dimensional electrophoresis. Further, it was shown the possibility of isotypes monomeric jacalin that is effective for *O*-glycan analysis of IgA1 by purification of monomeric jacalin that keep their affinities to *O*-glycans.

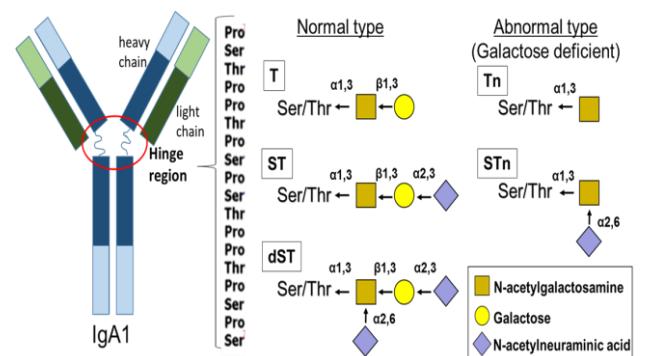
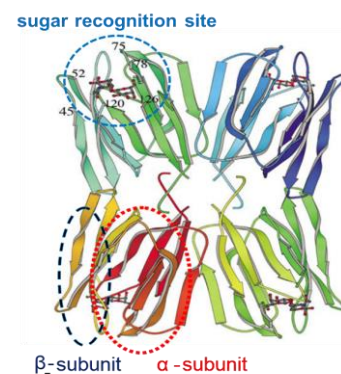
Key Words: jacalin, IgA1, *O*-glycan, two-dimensional electrophoresis

1. 緒言

IgA 腎症は、糸球体メサンギウム細胞への IgA1 を主体とする免疫複合体の沈着を特徴とする慢性糸球体腎炎である。本症の発症メカニズムは未だ明らかにされていないが、近年、IgA 腎症患者は血中 IgA1 の O-結合糖鎖において、ガラクトースの欠損した不完全な糖鎖構造を健常者に比べ多く持つことが報告されている⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。さらに、メサンギウム細胞に沈着した免疫複合体が不完全な糖鎖を持つ IgA1 (糖鎖不全 IgA1) を含むといった報告もなされており⁽⁴⁾⁽⁵⁾、糖鎖不全 IgA1 の免疫複合体形成への関与が考えられる。

IgA1 の O-結合糖鎖について、IgA1 はヒンジ部位と呼ばれる部分のアミノ酸配列中のセリンまたはスレオニン残基に対して、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、N-アセチルノイラミン酸から成る O-結合糖鎖を持つ。IgA1 が持つ O-結合糖鎖には、3 種類の正常糖鎖 (T,ST,dST 型)、ガラクトースの欠損した 2 種類の異常糖鎖 (Tn,STn 型) の 5 種類が考えられており (Fig.1)、IgA 腎症の発症に関与するとされるこれら IgA1 ヒンジ部位糖鎖の分析による診断への有用性が示唆される。

本研究では、糖鎖分析に用いる素材として、クワ科植物であるジャックフルーツの種子に含まれるジャカリンに着目した。ジャカリンは植物性レクチンの一種であり、四量体を基本構造とする (Fig.2)。4 つの α -サブユニットにはそれぞれ糖鎖認識サイトが存在し、IgA1 ヒンジ部位糖鎖を特異的に認識することが知られている⁽⁶⁾。ジャカリンが IgA1 の持つ複数の糖鎖構造を認識できる理由として、一部のアミノ酸配列の変異によるジャカリンのアイソタイプ型の存在が考えられる。そのため、IgA1 ヒンジ部位糖鎖特異性の異なるアイソタイプ型ジャカリンの精製を目的とし、アフィニティークロマトグラフィーによる分画、二次元電気泳動によるアイソタイプ間の違いの検証を行った。

Fig.1 *O*-glycosylation of IgA1Fig.2 Ribbon model of jacalin tetramer⁽⁷⁾

2. 方法

2-1 ジャックフルーツ種子タンパクの抽出

ジャックフルーツの種子をミキサーで粉砕し、吸引ろ過により水溶性成分の回収を行った。その後12~16kDa透析用セルロースチューブを使用し4℃で3日間透析を行い、透析後の溶液を凍結乾燥した。

2-2 アイソタイプ型ジャカリンの精製

IgA及び5種類のIgA1ヒンジ部位糖鎖を固定化したHiTrap NHS-activated HPカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを行い、ジャックフルーツ種子タンパクから各IgA1ヒンジ部位糖鎖に特異的なアイソタイプ型ジャカリンを精製した。

2-3 二次元電気泳動によるジャカリンの分析

pH勾配4-7の等電点電気泳動、及び15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによる二次元電気泳動法を用いて各アイソタイプ型ジャカリンの分析を行った。ゲルの染色にはFramingo蛍光染色を用い、フルオロフォレスター3000でタンパクの検出、蛍光強度の比較を行った。

2-4 化学変性剤による単量体ジャカリンの精製

ジャックフルーツ種子タンパクを8M尿素により変性させた後、6~8kDa透析用セルロースチューブを用いて透析を行い、尿素の除去を行った。その後、20kDa限外ろ過ユニットを用いた遠心ろ過により単量体成分を分取し、アフィニティクロマトグラフィーを行うことでIgA1ヒンジ部位糖鎖に特異的なアイソタイプ型単量体ジャカリンの精製を行った。

2-5 SDS-PAGEによる単量体ジャカリン精製の評価

15%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行い、分子量分布を評価した。ゲルの染色にはFramingo蛍光染色を用い、フルオロフォレスター3000でタンパクの検出、蛍光強度の比較を行った。

3.結果

3-1 二次元電気泳動によるジャカリンの分析

アフィニティクロマトグラフィーによりジャックフルーツ種子タンパクから分画したIgA結合成分(IgA結合ジャカリン)の二次元電気泳動結果から、IgAへの結合特異性を持つジャカリンには等電点の異なる複数のアイソタイプが存在することが示された(Fig.3)。

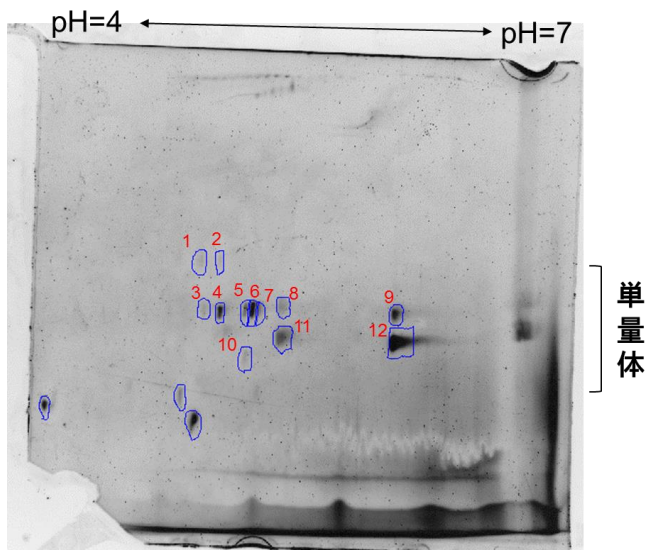


Fig.3 Two-dimensional electrophoresis of IgA-binding jacalin.

また、dST糖鎖に結合したジャカリンの二次元電気泳動において同様のスポットが得られたことから、ジャカリンがO-結合糖鎖を認識し結合していることが示された(Fig.4)。

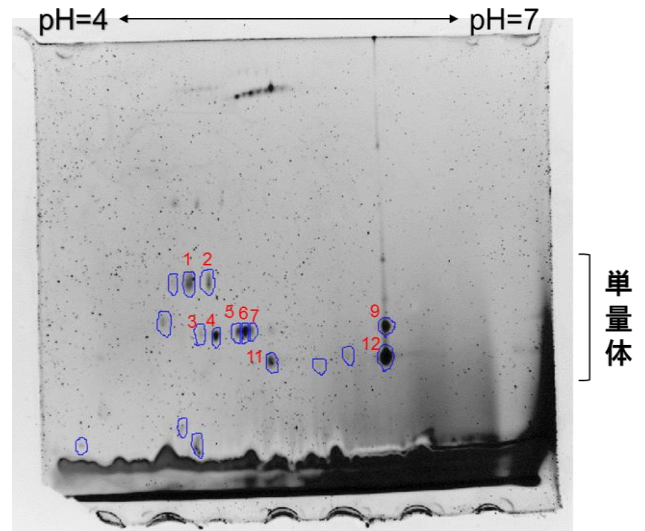


Fig.4 Two dimensional electrophoresis of isotype jacalin. (Specific to O-glycan dST in Fig.1)

次に、5種類のO-結合糖鎖に結合した各アイソタイプジャカリンの二次元電気泳動結果からスポットの蛍光強度の比較を行うことで、アイソタイプ間の違いを調査したところ、各アイソタイプ型ジャカリンで異なるスポット発現パターンが示された(Fig.5)。

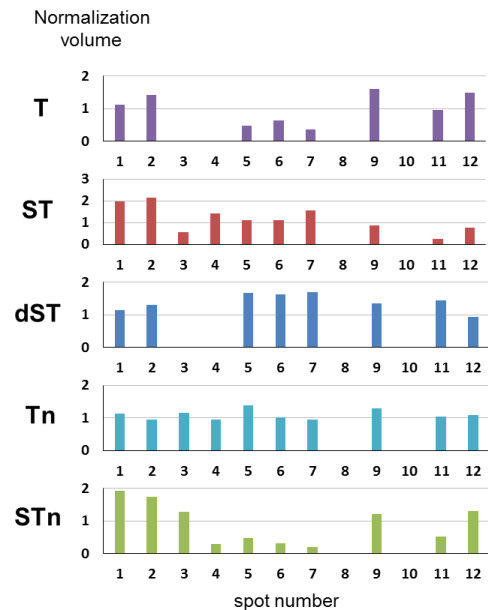


Fig.5 Comparison of the spot intensity in the isotype jacalin

3-2 SDS-PAGEによる単量体ジャカリン精製の評価

SDS-PAGEの結果から、尿素処理によるジャックフルーツ種子タンパクの多量体成分の単量体への解離が示された(Fig.5-A)。

また、尿素除去後、分画した単量体成分のうちIgA及びdST糖鎖に結合した成分は、共に15kDa付近において2つの単量体ジャカリンバンドを示した(Fig.5-B)。このことから、IgA1ヒンジ部位糖鎖に対する結合能を保持した単量体ジャカリンの精製を行うことができたと考えられる。

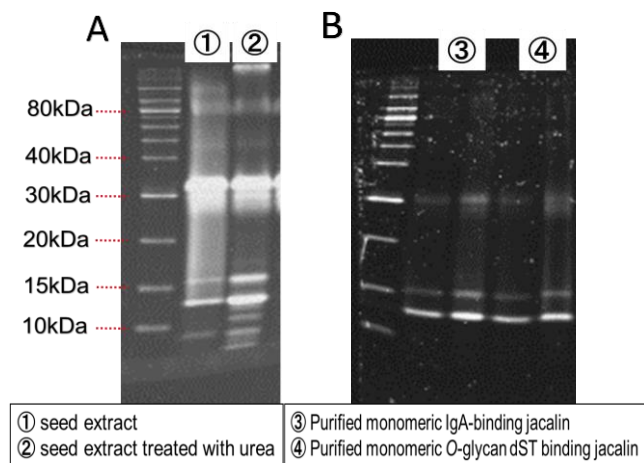


Fig.5 SDS-PAGE of (A)seed extract, (B)monomeric jacalin

4.考察

4-1 アイソタイプ型ジャカリンの二次元電気泳動結果

本研究により、IgAに結合特異性を示すジャカリンには等電点の異なる複数のアイソタイプが存在することが明らかとなった。しかし、5種類の糖鎖それぞれに特異性を示したアイソタイプ型ジャカリンの二次元電気泳動結果からは、アイソタイプ間での異なるスポット発現パターンが示されたが、各アイソタイプにおける特異的なスポットを特定することはできなかった。この理由として、ジャカリンが四量体構造で存在するためではないかと考える。ジャカリン四量体を形成する4つの α -サブユニットはそれぞれ糖鎖認識サイトを持っているが、ジャカリンの糖鎖認識サイトを含む一部のアミノ酸配列の変異が報告されているように⁽⁶⁾、それぞれの α -サブユニットは同一ではなく、認識糖鎖の異なるサブユニットから構成されていると考えられる。そのため、アフィニティクロマトグラフィーで精製した各糖鎖特異的ジャカリンには別の糖鎖に特異性を示すサブユニットも含まれており、二次元電気泳動の結果において単一ではなく複数のスポットとして検出されたと考えられる。

4-2 単量体ジャカリンの2つのバンドについて

二次元電気泳動の結果から、より糖鎖特異性の高いジャカリンを精製するためには四量体ではなく単量体のジャカリンからアイソタイプ型ジャカリンを精製する必要があると考え、尿素を用いた変性により多量体ジャカリンを解離させ、単量体ジャカリンの精製を行った。SDS-PAGEの結果から、精製した単量体ジャカリンはIgA及びO-結合糖鎖への結合能を保持した2種類の単量体バンドを示した。これは、ジャカリンの α -サブユニットには分子量のわずかに異なる α '-サブユニットが存在するためであるが、この違いが糖鎖特異性に起因しているのかは不明である。しかしながら、本研究で精製したアイソタイプ型単量体ジャカリンを二次元電気泳動で分析することで、アイソタイプ間での特異的なスポットを特定することができるのではないかと考えられる。

5.結論

IgAに結合特異性を示すジャカリンには等電点の異なる複数のアイソタイプが存在することが示された。また、化学変性剤を用いることで糖鎖特異性を保持した単量体ジャカリンを精製することができたことから、より糖鎖認識精度の高いアイソタイプ型単量体ジャカリンのIgA1糖鎖分析への有効性が示唆された。

6.参考文献

- (1) M.Tomana, K Matousovic, Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG, *Kidney International*. vol.52, pp.509-516, 1997.
- (2) 川寄綾香, 糖鎖不全認識によるIgA腎症診断方法に関する研究. 平成20年度 三重大学大学院工学研究科修士論文, 2009.
- (3) 永田裕子, 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, 平成22年度 三重大学大学院工学研究科修士論文, 2011.
- (4) M.Tomana, J.Novak, 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.
- (5) J.Novak, Z.Moldoveanu, IgA nephropathy and Henoch-Schoenlein purpura nephritis: aberrant glycosylation of IgA1, formation of IgA1-containing immune complexes, and activation of Mesangial cells. *Contributions to Nephrology*, vol.157, pp.134-138, 2007.
- (6) S.Kabir, Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*)seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods*, vol.212, pp.193-211,1998.
- (7) A.Arockia, Crystal Structure of the Jacalin-T-antigen Complex and a Comparative Study of Lectin-T-antigen Complexes. *Journal of Molecular Biology*, vol.321, pp.637-645, 2002.