

N-28

複合糖質の非還元末端 GlcNAc を特異的に認識するモノクローナル抗体 (MAC-1) の性質

The characterization of monoclonal antibody specific to Lc₃Cer(MAC-1)○南山潤太郎¹, 大竹正弥², 芹澤元², 上宮悠³, 鈴木佑典⁴, 塩谷一紗⁵, 海老塚弘子⁵, 有田正信⁵, 櫛泰典⁴*Juntaro Minaniyama¹, Masaya Otake², Hajime Serizawa², Hisashi Kamimiya³, Yusuke Suzuki⁴, Kazusa Shiotani⁵, Hiroko Ebizuka⁵, Masanobu Arita⁵, Yasunori Kushi⁴

Abstract: Three glycosphingolipids (GSLs) carrying terminal GlcNAc residues were detected in bovine erythrocytes by immunological analysis using a monoclonal antibody (MAC-1) and purified by repeated silica beads column. Two GSLs were characterized by proton NMR, MALDI/TOF-MS, methylation analysis and immunological studies. These structures were concluded to be as follows: GlcNAcβ1-3Galβ 1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-1Cer (nLc₃Cer) and GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-1Cer (IV⁶GlcNAc-nLc₃Cer).

The mAb is useful for studying the detailed structures of GSLs carrying terminal GlcNAc1-3Gal epitopes as well as for studying the precise distribution of the GSLs expression in tissues.

1. 緒言

複合糖質の中で ラクト或いはネオラクト系糖鎖 (Galβ 1-4GlcNAc, Galβ 1-3GlcNAc) は、血液型抗原、腫瘍、分化の関係から注目されている。しかしながら組織、細胞における分布や局在についての研究が他の糖鎖の生合成の経路のものに比べて少ない。またラクトサミンの合成は合成速度の違いからか、その中間体である N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が非還元末端に露出した糖鎖を有するものが存在しないか或いは存在量が極めて少ない。近年、微量糖脂質抗原を免疫原とする効率のよい特異モノクローナル抗体 (mAb) の作製法が報告されている¹⁾。そこで、牛赤血球膜の GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer (Lc₃Cer) を抗原にしてモノクローナル抗体 (MAC-1) を作成した²⁾。本研究では樹立した MAC-1 の詳細な性質を調べ、詳細な関連糖脂質を精製し構造解析を行い、今後の研究の発展に寄与できるツールとしての可能性を検討した

2. 実験方法

2.1 カラムクロマトグラフィーによる牛赤血球膜由来中性糖脂質の分離

イアトロビーズを用いて牛赤血球膜から抽出した中性糖脂質を分離した。溶媒は、クロロホルム (C) / メタノール (M) / 水 (W) の濃度勾配を使用した。分離した糖脂質を

,MAC-1を用い TLC/免疫染色により MAC-1 反応性糖脂質を確認した。

2.2 糖脂質の精製

分離した糖脂質をアセチル化後、イアトロビーズを用い分離し単一化した。溶媒は、1,2-ジクロロエタン/アセトンの濃度勾配を使用し、脱アセチル化した試料を TLC 免疫染色を用い、MAC-1 反応性糖脂質を確認した。

2.3 機器分析による構造解析

MALDI-TOF/MS, NMR, GC を使い、糖鎖の構造解析を行った。

3. 結果, 考察

牛赤血球膜中性糖脂質から3種類の MAC-1 反応性糖脂質を確認した。そのうちの2種類の糖脂質 (糖脂質 X, 糖脂質 Y) に関して、精製を行った (Fig. 1)。

MALDI-TOF/MS による分子量測定より、糖脂質 X は5糖を含んだ糖脂質、糖脂質 Y は6糖を含んだ糖脂質と推測された (Fig. 2)。また¹H-NMR によりそれぞれの糖の結合様式を決定した。さらに、糖脂質 X, Y は GC により各糖の結合位置を決定した。これら機器分析により、反応性を示した糖脂質は nLc₃Cer と IV⁶GlcNAc nLc₃Cer であると確認できた。本研究によって、MAC-1 は免疫した Lc₃Cer だけでなく、より糖鎖が長く、非還元末端に GlcNAc を持つ糖脂質に対しても反応性を有

1: 日大理工・院(前)・応化 2: 日大理工・学部・応化 3: 日大理工・院(後)・応化 4: 日大理工・教員・応化 5: 東京家政大・教員

することが示唆された. nLc_5Cer, IV^6nLc_5Cer よりも糖鎖の長い糖脂質にも反応を示すので, さらに糖鎖の長い MAC-1 反応性糖脂質を精製し構造解析を行っていく予定である.

この研究において MAC-I 反応性の糖脂質の完全構造は X と Y に着いて行われた. Z に関しては, 十分な量が確保されておらず, 予想される構造は nLc_9Cer であるが, さらなる検討が必要である.

現在, 共同研究において, エンド β ガラクトシダーゼ C を発現し, 糖鎖の末端に GlcNAc を露出する TG マウスの解析を行っている. このマウスは皮膚に異常が起き, その生化学的解析が興味深い. この MAC-1 はこの TG マウスの表現系と本抗体の可変領域の cDNA 解析結果から, リウマチ等の自己免疫疾患の患者から得られる抗体の可変領域と高い相同性を有していることが明らかにされた. これらの事実の関連と表現系の解析は, 引き続き行う予定である.

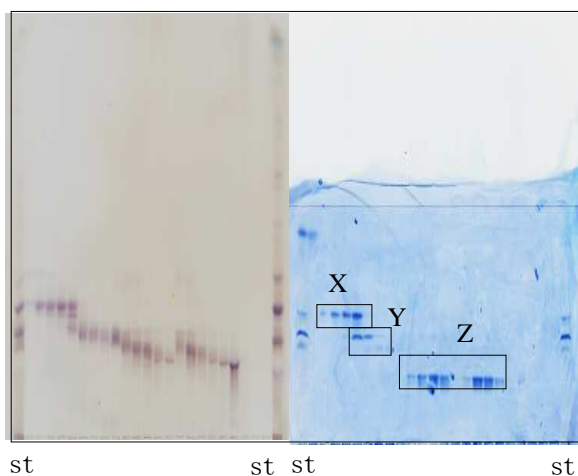


Fig.1 Separation of MAC-I reactive GSLs on Silicic acid column chromatography.

4. 参考文献

- [1] Kannagi, R. (2000) Monoclonal anti-glycosphingolipid antibodies. *Methods Enzymol.* **312**, 160-179.
- [2] Nozaki *et al.* (2010) Production and characterization of monoclonal antibodies specific to lactotriaosylceramide. *Glycobiology* **20** (2), 1631-1642

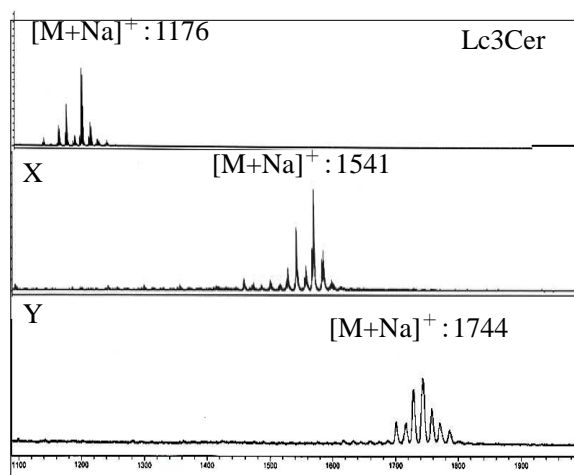


Fig.2 Analysis by MALDI/TOF-MS

GSL carrying terminal GlcNAc	MW
Lc_3Cer	1176
nLc_5Cer	1541
$IV^6GlcNAc nLc_5Cer$	1744