

氏 名 (本 籍)	深 谷 真 一 (京都府)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 554 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 9 月 10 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	人乳糖タンパク質に特異性を示すモノクローナル抗体 1CF11 のエピトープ解析
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 矢 部 富 雄 副査 岐阜大学 教 授 金 丸 義 敬 副査 静岡大学 教 授 森 誠 副査 岐阜大学 教 授 石 田 秀 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

モノクローナル抗体 1CF11 (以下 1CF11 とする) は人乳由来 MUC1 ムチンを抗原として作製された IgM クラスの抗体である。これまでに、1CF11 はヒト外分泌液中の糖タンパク質に共有される新規の糖鎖エピトープを特異的に認識することが示唆されたが、その生物学的重要性や構造特性は十分に解明されていない。本研究では 1CF11 のエピトープ解析を目的として実験を行い、以下の成果を得た。

(1) トランスフェリンファミリータンパク質の 1CF11 抗体反応性

ヒトおよびウシ乳由来のラクトフェリン (それぞれ hLf、bLf)、ヒト血清由来トランスフェリン (hTf) および鶏卵白由来オボトランスフェリン (oTf) を用いて、イムノブロッティングおよび競合 ELISA 等による分析を行い、1CF11 抗体は乳由来のラクトフェリン (hLf、bLf) のみに反応し、特に hLf に強い反応性を示すことを明らかにした。また、bLf の抗体反応性は N 結合型糖鎖除去の影響を受けず、限定トリプシン分解により失われるが、hLf は限定トリプシン分解後も反応性を維持し、N 結合型糖鎖除去により大幅に反応性を低下することを明らかにした。これらの結果から、hLf の 1CF11 エピトープには異なる二種の構造要素 (N 結合型糖鎖関連および非関連構造要素) が関与することを示唆した。

(2) 人乳ラクトフェリンの 1CF11 エピトープ解析

還元アルキル化 - トリプシン分解処理により hLf の低分子ペプチドを調製した。次に ConA レクチンカラムに分解物を供し、非吸着画分 (ConA UB) および吸着画分 (ConA BO) を分離した。ConA UB は N グリコシダーゼ F を用いた脱糖鎖処理の影響を受けなかったが、ConA BO ではほぼ完全に反応性が消失した。これらの結果は、hLf が異なる二種の構造要素を有することを明確に示している。加えて、未分画ペプチド混合物の抗体反応性が hLf 全分子と比べ大きく低下することから、多価抗体である 1CF11 が異なる二種の構造を同時に認識することにより、

全 hLf 分子に対する 1CF11 の反応性が飛躍的に高まる可能性を示唆した。

次に、逆相カラムクロマトグラフィー (Cosmosil 5C18 AR-II) により ConA BO を分画し、後半に溶出する四つの画分に強い抗体反応性が観察され、脱 N 結合型糖鎖処理によりその反応が消失することを認めた。MALDI-TOF/MS および MS/MS 分析の結果、1CF11 反応性 N 結合型糖鎖の多くが N ロープ側の Asn¹³⁸ に結合し、C ロープ側の Asn⁴⁷⁹ には非反応性 N 結合型糖鎖が結合する可能性を示唆した。

1CF11 反応性画分に対しエンド或いはエキソグリコシダーゼ処理を行った。その結果から、hLf の N 結合型糖鎖関連構造要素においては、N 結合型糖鎖非還元末端部に存在する Fuc 残基を中心とする糖鎖構造が 1CF11 による認識に重要な役割を果たすことを指摘した。さらに、数種類のコシ化オリゴ糖を用いた競合 ELISA を行い、1CF11 が Le^x のような α 1,3 結合 Fuc 含有タイプ II 型 (Gal β 1-4GlcNAc) 構造よりも、 α 1,4 結合 Fuc 含有タイプ I 型 (Gal β 1-3GlcNAc) 構造に強い親和性を示すこと、ラクトース付加などの鎖長延長により 1CF11 の親和性が增強される可能性のあることを示した。

審 査 結 果 の 要 旨

モノクローナル抗体 1CF11 は、人乳 MUC1 ムチンを抗原として 1989 年にその作製が報告されたものであるが、他の多数のヒト外分泌液糖タンパク質とも反応し、それらに共通して発現される新規の構造要素 (エピトープ) を認識する可能性が示唆されている。また、1CF11 エピトープはヒト外分泌液糖タンパク質の感染防御や免疫賦活作用の機能発揮に関与する可能性も考えられる。本論文で、申請者は、人乳中の含量が多く、強い抗体反応性を示すヒトラクトフェリン (hLf) を分析試料として用いて、1CF11 エピトープ構造の解明を試みた。そして、得られた結果から、1CF11 が認識するエピトープ構造、エピトープ局在性、反応特性およびその生理学的意義について次のように考察した。

まず、hLf と構造の類似したトランスフェリンファミリータンパク質の抗体反応を比較し、抗体認識に及ぼす構造の差異の影響を検証した。その結果、hLf の 1CF11 抗体反応性には N 結合型糖鎖が関与する構造要素 (N 結合型糖鎖関連構造要素) と関与しない構造要素 (N 結合型糖鎖非関連構造要素) の両者が関与する可能性を指摘した。

次に、二種のエピトープ構造要素が hLf 分子内のどの部分に局在しているか検証した。その結果、hLf が示す抗体反応性の多くは N 結合型糖鎖が一分子結合したほぼ全ての N ロープ (N) と N 結合型糖鎖が二分子結合した僅かな C ロープ (C1) に起因し、N 結合型糖鎖が一分子結合した大部分の C ロープ (C2) は抗体反応性をほとんど示さないことを明らかにした。抗体反応を示す N および C ロープ由来フラグメントには N 結合型糖鎖関連および非関連構造要素が共に存在しており、また、N 結合型糖鎖関連構造要素は分子表面に存在し、非関連構造要素は分子内に内包されていると推測される結果を得た。

さらに、hLf に存在する二種の構造要素を個別に分離することを目的とし、hLf 低分子ペプチド混合物を調製した。ConA レクチンカラムを用いた分画により、ConA UB に N 結合型糖鎖非関連構造要素、ConA BO に N 結合型糖鎖関連構造要素を分離し、逆相カラムを用いて更に分画を進めた。低分子化することで hLf の抗体反応性が大幅に低下することから、hLf が示す 1CF11 との反応が多価反応であることを示唆した。また ConA UB に含まれる N 結合型糖鎖非関連構造要素が示す抗体反応には糖鎖が関与しない可能性を

指摘した。ConA BO 由来ペプチド画分に含まれる主要ペプチドの MS/MS スペクトル測定の結果から、C ロープ Asn⁴⁷⁹ に結合する N 結合型糖鎖の多くは抗体反応に関与せず、抗体反応に関与する N 結合型糖鎖の多くは N ロープ Asn¹³⁸ に結合すると推察した。

最後に、N 結合型糖鎖のどのような構造が抗体反応に関与するか検証した。連続的エキソグリコシダーゼ処理および Endoglycosidase F2 処理の結果、hLf に存在する N 結合型糖鎖関連構造要素の主体は、非還元末端 $\alpha 1, 3$ 結合 Fuc を含む N 結合型糖鎖の部分構造であることを強く示唆した。また、 $\alpha 1, 3$ 結合 Fuc 以外の N 結合型糖鎖部分構造の候補として、ポリラクトサミン型コア糖鎖の一部が抗体反応に関与する可能性も指摘した。

以上、本研究は、人乳ラクトフェリンの 1CF11 モノクローナル抗体との反応の詳細な解析を通して、1CF11 抗体が認識するエピトープ構造には N 結合型糖鎖関連及び非関連の二種の構造要素が関与すること、また、人乳ラクトフェリンの強い 1CF11 抗体反応性はそれらの構造要素との多価結合に起因することを示し、生物認識における新しい側面を指摘していることから、審査委員会は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

以上の結果の一部は、1) Shinichi Fukaya, Chisato Shinoda, Tomio YABE, Yoshihiro KANAMARU: Involvement of Both N-Glycan-relevant and N-Glycan-irrelevant Structural Elements in the Recognition of Human Milk Lactoferrin by 1CF11 Monoclonal Antibody, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press)、2) Shinichi Fukaya, Tomio YABE, Yoshihiro KANAMARU: Non-Reducing Terminal Fucose within N-Linked Glycan Plays a Significant Role in the Recognition of Human Milk Lactoferrin 1CF11 Monoclonal Antibody, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press) にまとめられ、学位論文の基礎となる公表論文となっている。