第 56 回日本電気泳動学会学会賞（児玉賞）受賞者論文
論文種目：総合論文

電気泳動法を応用した種々の糖タンパク質と病態との関連解析

飯 島 史 朗*

文京学院大学保健医療技術学部

（受付 2018 年 4 月 5 日，受理 2018 年 5 月 14 日）

SUMMARY

This review describes the application of electrophoresis in a clinical laboratory to detect microheterogeneity of protein or sugar chain structure. We developed convenient method of isoelectric focusing using cellulose acetate membrane combined with various staining methods and improved transfer method with PVDF membrane. These methods enabled the easy analysis of clinical samples, and we have explored new biomarkers for various diseases. Target biomolecules of isoelectric focusing was as follows: sugar chains of α_1 -acid glycoprotein and antichymotrypsin for inflammation, urinary transferrin for renal diseases, and sugar chains on M protein for multiple myeloma (MM).

We revealed that sugar chains with highly reactive to Con A lectin was detected in the early stage of inflammation, while in the recovery phase of inflammation, sugar chains with highly reactive to DSA lectin increased. For isoelectric point of urinary transferrin, we found that transferrin with low isoelectric point increased in the early stage of nephropathy. Further, when glycosylation of M protein in the samples of MM patients with osteolysis was examined, sugar chains in the light chain on M protein showed high reactivity with Con A lectin. Thus, the analysis of protein binding sugar chains using isoelectric focusing is applicable to develop new biomarkers of various diseases, such as inflammation, nephropathy and cancer.

Key words: cellulose acetate membrane, isoelectric focusing, inflammation, nephropathy, multiple myeloma

はじめに

電気泳動法は様々な物質の分離・同定に応用されるが，生体内高分子の分析に適用すると，病態に応じて生じた分子構造変化を検出することができる。筆者は 1988 年に日本電気泳動学会に入会以来，タンパク質およびタンパク質に結合している糖鎖構造の変化の検出を通して，新たな分析法の開発やバイオマーカーの発見につなげてきた。たとえば，糖鎖は，がんの浸潤や転移など細胞接着に関与しているものが多いことから，がんの病態変化に伴って糖鎖構造が変化することを明らかにした。本論文では，これまで本学会で報告してきた内容を中心に，臨床検査分野に電気泳動法を応用した研究成果を解説する。

セルロースアセテート膜等電点電気泳動法の開発

等電点電気泳動法は，タンパク質を構成するアミノ酸のわずかな違いや，リン酸化，結合糖鎖の違いなど翻訳後修飾を含む分子のわずかな構造の変化をとらえられる可能性がある。しかし，アガロースやポリアクリルアミドゲルなど，用いる支持体の取り扱いが煩雑であるため，臨床検査室では実施が困難であった。このため，臨床検査室で汎用されるセルロースアセテート膜を利用する高圧セルロースアセテート膜等電点電気泳動法を開発した^{1,2)}。本法の最大の特徴は，セルロースアセテート膜を複数枚重ねて電気泳動が可能な点であり，各膜へ分配されるタンパク濃度は多少異なるものの，全ての膜で全く同一の泳動パターンが得られる点である（Fig. 1）。

本法では，一回の電気泳動で得られた同一パターンのセ

Application of electrophoresis of glycoproteins for the discovery of new biomarkers

Shiro Iijima

Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University

* Corresponding author: Shiro Iijima; Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University, Mukaigaoka 2-4-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

E-mail: sijima@bgu.ac.jp

第56回日本電気泳動学会学会賞（児玉賞）受賞者論文

ルースアセテート膜に対して異なる染色法を適用し、異なる情報を得ることが可能である。このことから、CBBや銀コロイドによるタンパク質検出法を開発し、12.5 ngのタンパク質バンドの検出を可能とした。この他にも、シッフ染色による糖タンパク検出、乳酸脱水素酵素を実施例とした酵素活性染色法を開発した。さらに、セルロースアセテート膜からPVDF膜へ転写するため、膜と膜を密着させ放置する自然転写法などを開発した。これにより、抗体を用いたタンパク質の特異的検出や、レクチンによる糖タンパク糖鎖の解析が可能となり、様々な角度からの臨床検体の解析を容易とした³⁻⁵⁾ (Fig. 2)。

新たな炎症マーカー開発のための急性相反応タンパクの糖鎖解析

炎症マーカーであるCRPは、炎症の有無や重症度を反映するため、炎症の診断や経過観察を目的として頻繁に用いられている。しかし、単回のCRP測定では、その後、炎症が増悪するか、回復するかの判定はできない。このため、炎症の病態に応じて構造が変化することが知られている糖タンパク糖鎖に着目し、高圧セルロースアセテート膜等電点電気泳動法を利用し、急性相反応タンパクの糖鎖解析を行った。試料には、炎症の基点が明らかな手術前および手術後1～10日間に得られた血清を用いた。まず初めに α_1 -酸性糖タンパク質を高圧セルロースアセテート

Fig. 1 複数枚の膜を重ねての等電点電気泳動
セルロースアセテート膜を6枚重ねて電気泳動した。
1: 最上部の膜, 6: 最下部の膜, 試料: 血清,
染色: CBB.

Fig. 2 各種染色法の開発
1: シッフ染色, 2: MAM レクチン検出, 3: 乳酸脱水素酵素活性染色, 4: 抗IgM抗体検出, 5: 銀コロイド染色。試料: 血清 (1～4), アルブミン (5)。
5 (銀コロイド染色) では、レーン1 (最左) (アルブミン 100 ng) から、順次段階希釈した試料を塗布し、レーン4 (*印, 12.5 ng) まで検出した。

膜電気泳動で分離し、抗 α_1 -酸性糖タンパク質抗体で検出したところ、pI 3.1-3.6の間に11本のバンドが検出された。これらのバンドを等電点ごとに3つのグループに分け、手術後の変化を検討した結果、炎症の初期には手術前に比べ等電点が高いバンドの割合が増加し、手術後7日目以降では等電点が低いバンドの割合が増加した (Fig. 3)。このバンド変化のメカニズムを解析するため、ノイラミノダーゼ、Con A レクチンおよびDSA レクチンを用いて結合糖鎖を解析した。その結果、ノイラミノダーゼ処理では、炎症の病態に応じたバンド変化は見られなかった。一方、炎症の初期に増加した等電点が高いバンドはCon A レクチンと反応したことより低分岐型または高マンノース型糖鎖であること、炎症の回復期に増加する等電点が低いバンドはDSA レクチンと反応したことより高分岐型糖鎖を結合した α_1 -酸性糖タンパク質であることを明らかにした⁶⁾。

同じ手術前後の試料を用いて、アンチキモトリプシンについても高圧セルロースアセテート膜電気泳動法により分析した。その結果、アンチキモトリプシンでも同様に手術直後には等電点が低いバンドが検出され、回復期では等電点が高いバンドが検出された。この変化についてレクチンを用いて解析した結果、手術直後よりCon A レクチンおよびSSA レクチンとの反応性が増加し糖鎖末端にシアル酸を結合した低分岐型または高マンノース型糖鎖が増加した。また、炎症の手術後5日目以降の回復期ではPHA-L4およびDSA レクチンと反応性が高い高分岐の糖鎖をもつアンチキモトリプシンが増加した (Fig. 4)。以上より、急性相反応タンパクの糖鎖解析は、炎症の予後を予測可能な新たなバイオマーカー開発につながった。

尿中トランスフェリン分析による早期腎症の検出

早期腎症マーカーとして測定される尿中微量アルブミンは、高血圧など他の因子でも尿中に増加することが知られ

Fig. 3 手術後の α_1 -酸性糖タンパク質のpI変化
■: pI 3.11-3.25, ●: pI 3.31-3.48, ○: pI 3.52-3.59の α_1 -酸性糖タンパク質。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 手術前と比較して。n=10, 平均±SD.

Fig. 4 手術後のアンチキモトリプシン糖鎖のレクチンによる検出

試料は手術前 (-1), 手術直後 (0), 手術後 1, 2, 3, 5, 7, 10 日に採取された血清. 1: 抗アンチキモトリプシン抗体検出, 2: Con A レクチン検出, 3: SSA レクチン検出, 4: DSA レクチン検出, 5: PHA-L4 レクチン検出.

ているため, 新たな腎障害のバイオマーカー開発が望まれている. このため, 腎障害のバイオマーカーとして注目されている尿中トランスフェリンの等電点について着目し, 高圧セルロースアセテート膜電気泳動法により検討を行った. その結果, 腎症のステージが腎症前期から早期腎症へ進むと, 等電点の低いトランスフェリンが検出されるようになり, さらに障害が進むと, 血清と同じ等電点をもつトランスフェリンが検出された. すなわち, 早期腎症では, 腎臓のチャージバリアの障害が進み, 本来ならば濾過されない陰性荷電を多く持つトランスフェリンが尿中に排泄され, さらに障害が進むと血清成分がそのまま尿中に排泄されるものと予想された (Fig. 5). 以上より, 尿中トランスフェリンの等電点分析は早期腎障害のバイオマーカーとなる可能性を示した⁷⁾.

骨髄腫の新たなバイオマーカー開発

多発性骨髄腫では, 形質細胞が腫瘍性に増殖し, M タンパクと呼ばれる免疫グロブリンを血中へ多量に分泌する. また, 糖鎖は細胞間情報伝達や腫瘍の接着等に関与することから, 腫瘍マーカーの多くは糖鎖検出に基づいている. このため, さまざまな合併症を発症するものの, 診療上有用なバイオマーカーが少ない疾患の一つである骨髄腫において, M タンパクの糖鎖について検討した.

骨髄腫患者 34 例中の M タンパク糖鎖について, 20 種類のレクチンおよび 1 種類の抗体を用いて解析した. その結果, 健常人の免疫グロブリン L 鎖ではほとんど検出されない糖鎖が M タンパク L 鎖で検出され, 34 例中 32 例で用いたいずれかのレクチンと反応した. すなわち, M タンパク L 鎖には通常結合していない糖鎖が結合していることを明らかとした. 結合糖鎖とレクチンと反応性の

Fig. 5 各種腎症における尿中トランスフェリン分析

1: 腎症前期尿, 2, 3: 早期腎症尿, 4, 5: 顕性腎症尿, 6, 7: 血清. 抗トランスフェリン抗体による検出.

解析では, AAL, SSA, LCA, PHA-E4 と反応性が高いグループと BPA, ECA, Con A との反応性が高いグループ, いずれのグループに属さないものに分類された. このうち, AAL, SSA, LCA, PHA-E4 と反応性が高いグループは, 著明な骨病変が見られない症例由来であり, BPA, ECA, Con A との反応性が高いグループの試料は骨病変のある症例由来であった. さらに, M タンパク L 鎖と Con A レクチンとの反応性を解析した結果, 骨病変を有する患者由来の試料では著名な骨融解病変を有さない患者に比べ, Con A レクチンとの反応性が高かった ($p=0.028$) (Fig. 6). 以上より, M タンパク L 鎖糖鎖を Con A レクチンで解析することにより, 骨髄腫の骨病変を予測可能であることを明らかとした. 今後, さらに解析を進めることにより, 血液中に多量に分泌される M タンパクの L 鎖糖鎖は, 骨髄腫の病態を反映するバイオマーカーとなることが期待される.

まとめ

これまでの臨床検査では, 単にタンパク質を量として評価されてきた. しかし, 糖鎖修飾を含めた翻訳後修飾は, そのタンパク質の接着の制御・寿命・活性に大きく関わる.

Fig. 6 M タンパク L 鎖糖鎖解析

1-24: 骨病変を有する患者血清, 25-34: 顕著な骨病変が見られない患者血清. Con A レクチンによる検出.

このため、これらの翻訳後修飾を合わせて分析することが新たなバイオマーカー開発につながると考えられる。本論文で解説した等電点電気泳動法を活用した成果は、タンパク質糖鎖の解析が新たなバイオマーカー開発に有用であることを示すものである。今後さらに糖タンパク質の構造と病態との関連を見いだすべく、研究を進めていきたい。

本論文に関して開示すべき利益相反状態はない。

謝 辞

東京医科歯科大学に入職以来今日まで、電気泳動法についてご指導いただきました芝紀代子博士、等電点電気泳動法についてご指導いただきました戸田年総博士、骨髄腫の新たなバイオマーカー開発をご指導いただきました服部豊博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 芝紀代子, 戸田年総, 飯島史朗ら. 高圧セルロース・アセテート膜等電点電気泳動法の至適泳動条件に関する基礎的研究. 生物物理化学. 1988;32:55-60.
- 2) Shiba K, Toda T, Iijima S, *et al.* Development of a thermoelectric cooling apparatus for high-voltage isoelectric focusing on a cellulose acetate membrane. Biol Pharm Bull. 1994;17:1317-1320.
- 3) 長 裕子, 芝紀代子, 飯島史朗ら. 高圧セルロースアセテート膜等電点電気泳動法による蛋白, 糖蛋白, 特定蛋白同時3分析法. 生物物理化学. 1990;34:13-17.
- 4) 飯島史朗, 志村佐恵子, 土田敦子ら. セルロースアセテート膜等電点電気泳動法の支持体としてのSEPARAX-SP膜の有用性について. 生物物理化学. 2000;44:39-42.
- 5) Iijima S, Kimura M, Shiba K. New detection method after cellulose acetate membrane isoelectric focusing: activity staining for lactate dehydrogenase, detection for sugar chains using lectin and simple western blotting. J Clin Lab Anal. 1998;13:234-240.
- 6) Iijima S, Shiba K, Kimura M, *et al.* Changes of α_1 -acid glycoprotein microheterogeneity in acute inflammation stages analyzed by isoelectric focusing using serum obtained post operatively. Electrophoresis. 2000;21:753-759.
- 7) Sakai N, Kubota R, Iijima S, *et al.* Isoelectric focusing of urinary transferrin for detection of early stages of diabetic nephropathy. J Electrophoresis. 2012;56:1-6.