 原 著

順天堂医学. 2007, 53
P. 121~130

IgA腎症患者におけるMass Spectrometry (MS) を 用いたIgA結合蛋白の解析

坂 本 慶 子*1)
KEIKO SAKAMOTO

鈴 木 祐 介*1)
YUSUKE SUZUKI

田 中 裕 一*1)
YUICHI TANAKA

峯 木 礼 子*2)
REIKO MINEKI

藤 村 務*2)
TSUTOMU FUJIMURA

高 ひかり*2)
HIKARI TAKA

堀 越 哲*1)
SATOSHI HORIKOSHI

村 山 季美枝*2)
KIMIE MURAYAMA

上 野 隆*2)
TAKASHI UENO

富 野 康日己*1)
YASUHIKO TOMINO

目的：IgA腎症の病因にIgA免疫複合体（IgA-IC）の関与が議論されているが、いまだその抗原は同定されていない。今回われわれはMSを用いて、血清中のIgA結合蛋白を解析することで、抗原の有無を検討した。

対象：IgA腎症患者6名、扁桃摘出術とステロイドパルスの併用療法3クールを完了したIgA腎症患者5名と健康人8名を解析した。

方法：血清400 μ lとジャカリンを混合結合させた後、0.8Mガラクトースで溶出した。溶出した蛋白はSuperdex 200 10/300GLカラムで分画し、各分画より蛋白を抽出し、電気泳動後、liquid chromatography-electron spray ionization mass spectrometry (LC-ESI MS) で解析した。さらに、治療前後の血清から得たジャカリン結合蛋白をWestern blottingにて定量的に比較した。

結果：IgA1/IgA1結合蛋白は、170kDa、340kDa、680kDa、680kDa以上の4つのピークに分画化された。それぞれの分画において、MSの解析ではapolipoprotein, immunoglobulin (Ig) heavy chain (α , μ , γ), light chain, Ig J chain, fibronectin, C1INH, C4bp, α 1MGなどの内因性物質が認められた。特に、C4bpは患者群で高頻度に認められた。治療後では、170kDaと680kDa以上の蛋白濃度が上昇し、340kDaの蛋白濃度が低下する傾向にあった。また、IgA1結合IgG、C4bp、C3の発現量は、治療後に減少していた。

結論：今回の検討では、IgA1結合蛋白中に明らかな外来性抗原を確認することはできなかったが、IgGやC4bpはIgA腎症の病因に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

キーワード：IgA腎症、IgA結合蛋白、マスペクトロメトリー

* 1) 順天堂大学医学部内科学教室腎臓内科学講座

* 2) 順天堂大学医学部生体分子研究部門

* 1) Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

* 2) Division of Proteomics, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
[Sept. 22, 2006 原稿受領][Oct. 26, 2006 掲載決定]

はじめに

IgA腎症は、フランスのBergerとHinglaisにより『糸球体メサンギウム領域へのIgAとIgGの顆粒状沈着を特徴とするメサンギウム増殖性腎炎』としてはじめて報告された¹⁾。糸球体メサンギウム領域にIgA1を主体とする免疫グロブリンの沈着物を認めるが、多くの場合C3, IgG, IgM等と共に局在している²⁾。原発性糸球体腎炎のなかで最も頻度が高く、約3～4割の患者が腎不全に進行する。IgA腎症は、腎移植後約5～6割の患者に再発が認められるという報告³⁾、IgA腎症患者ドナーから非IgA腎症患者に移植した場合、糸球体IgA沈着が消失すること⁴⁾などより、病態の主な異常は腎臓ではなく全身の免疫系にあると考えられている。現在、糖鎖不全や高分子のIgA免疫複合体(IgA-IC)形成を含むIgAそのものの異常も議論されているが、病因はいまだ不明である。

扁桃炎は、しばしば肉眼的血尿や腎障害増悪の誘因になることから、IgA腎症の病因として上気道の細菌あるいはウイルス感染に関連した免疫応答の異常が考えられている。近年、扁桃摘出とメチルプレドニゾロンの併用療法が蛋白尿・血尿の改善ばかりではなく、メサンギウム細胞の増殖、間質の線維化も改善させるとする報告⁵⁾⁶⁾があり、IgA腎症におけるこの治療の臨床的有用性が議論されている。このことは、扁桃における病巣感染が深く関わることを示唆するものであり、扁桃での抗原抗体反応が注目される理由の一つである。IgA腎症の病因としてIgA-ICの関与は長年議論されているが、その抗原はいまだ同定されていない。

今回われわれはIgA-ICに含まれる内因性または外来性抗原の存在を確かめるため、IgA腎症患者血清からIgA結合蛋白を抽出し解析した。ヒト血清IgA1はN型糖鎖に加え、ヒンジ部にはO型糖鎖をもつ特殊な糖蛋白であり⁸⁾、ジャカリンは、IgA1のO型糖鎖のgalactose-N-acetyl-galactosamine (Gal-GalNAC) に選択的に結合

することから、IgA1/IgA1結合蛋白の抽出に頻用されている。また、抽出した蛋白の解析方法としては、アミノ酸配列、ペプチド配列、蛋白の同定という順で解析し、不特定蛋白同定に有効であるliquid chromatography-electron spray ionization mass spectrometry (LC-ESI MS)を用いた。MSを用いて、血清中のIgA結合蛋白を解析することで抗原の有無を検討した。

対象と方法

対象：当科で腎生検を実施し、IgA腎症と診断された患者6名（予後良好群1名、予後比較的良好群1名、予後比較的不良群3名、予後不良群1名）より得た血清を解析した。さらに、扁桃摘出と3クルのステロイドパルス療法を完了した患者5名（予後比較的不良群4名、予後不良群1名）の治療前後の血清も解析した。ステロイドパルス療法は、0.5g/日のメチルプレドニゾロンを2ヵ月毎に3日間連日静注にて行い、ステロイドパルス間は0.5mg/kgのプレドニゾロンを隔日経口投与とした。対照血清は、慢性疾患のない健常ボランティア8名より得た。

ジャカリンアガロースゲルによるIgA1/IgA1結合蛋白の回収と分画：血清IgA1は、Roque-Barreira法を用いて抽出した⁹⁾。血清とジャカリン400μlずつ等量で混合させた後、10,000回転/3分間遠心し、沈殿物であるIgA1/IgA1結合蛋白を0.8Mグルコースと0.01M phosphate buffered saline (PBS) (pH7.4)で洗浄後0.8Mガラクトースで溶出し、さらにSuperdex 200 10/300 GLカラムにより分画した。Superdex 200 10/300 GLは、150mMNaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を用いて溶出した。それぞれの分画の濃度は、Pierce社のBCA蛋白定量キットを用いて決定した。

溶液中のガラクトース除去：サンプルにトリクロロ酢酸(TCA)を加えて、20%TCA溶液に調整し、氷冷下で1時間以上放置した。13,000回転/4℃/30分間遠心後、沈殿物を冷アセトン

1mlで3回洗浄した。洗浄後の沈殿物を濃縮乾固した。

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) : IgA1/IgA1 結合蛋白の各分画をSDS-PAGEで分離した。分離ゲルは10%, 濃縮ゲルは4%のacrylamide-piperazine diacrylamide (PDA)を使用した。ガラクトース除去後のサンプルにサンプルバッファーを加え95℃, 3分間加熱後, アクリルアミドを20 μ mol加えて電気泳動のサンプルとした。ゲル1枚あたり30mA, 1時間のprerun後, 各分画から1.5 μ gの蛋白をアプライし, 6mAで1時間, 15mAで2時間泳動した。電気泳動はMinekiらの方法¹⁰⁾を用いてin situ alkylationを行い, 泳動中にシステインの還元・アルキル化を行った。

銀染色: 患者6名と健常人5名の電気泳動後のゲルをAmersham Bioscienceのプロトコールを用いて銀染色し, 比較した。固定には50% Ethanol

/20% Acetic acidを用いた。

trypsinによるゲル内消化とペプチドの抽出: Minekiらの方法に倣い, trypsinを用いてゲル内消化した¹⁰⁾。銀染色で確認された蛋白のバンドを1×1mm角にカッターで切断し, 0.5mlのチューブに移し, 30mM potassium ferricyanideと100mM Sodium thiosulfateを用時調整で1:1に混合後100 μ l加え, 37℃/10分で脱染色後, 精製水を加え37℃/10分/5回洗浄した。その後, acetonitrileを加えて37℃で10分間インキュベートし, 陰圧で乾燥させた。10ng/ μ lのtrypsin 30~50 μ lを加え0℃/45分後, 吸収されなかった酵素液を除き, pH8.5の100mM ammonium bicarbonateを10 μ l加え, 15~18時間37℃でインキュベートした。その後, ペプチドを下記の3溶液(1) 0.1% TFA/50% acetonitrile, (2) 15% isopropanol/5% formic acid/25% acetonitrile, (3) 80% acetonitrileにて抽

表-1 Western blottingに用いた抗体

1次抗体	希釈	2次抗体
マウス抗ヒト IgA1 (Southern Biotech USA)	1/500	HRP標識抗マウス IgG
HRP標識ヤギ抗ヒト IgG (ZYMED Laboratories USA)	1/2000	—
マウス抗ヒト IgM (ZYMED Laboratories USA)	1/500	HRP標識抗マウス IgG
マウス抗ヒト complement component 3 (Abnova Taiwan)	1/5000	HRP標識抗マウス IgG
ウサギ抗ヒト C4bp (福島県立医科大学藤田教授供与)	1/5000	HRP標識抗ウサギ IgG
ウサギ抗ヒト Fibronectin (Santa Cruz Biotechnology California)	1/500	HRP標識抗ウサギ IgG
ヤギ抗ヒト C1INH (R&D USA)	1/2000	HRP標識抗ヤギ IgG

出した。抽出された溶液を回収後、陰圧で濃縮し、MSで解析した。

LC-MSによる解析：LC-MSによる解析は、nano LCと接続したAPI QSTAR Pulsar I hybrid型質量分析計（Applied Biosystems, Framingham, CA, USA）を用いて施行した。MSの条件は、イオンスプレイ電圧2.4kV、CEM電圧2.2kV、カーテングス（N₂）10、コリジョンガス（N₂）5、コリジョンエネルギー20～50eVで解析した。Nano-LCはDiNa（KYA TECH Corporation, Japan）を用い、0.2mm id×50mm Magic C₁₈カラムでサンプルを分離した。溶液は、A液：0.1% formic acid, B液：0.1% formic acid / 90% acetonitrileを使用した。A液100%で30分、その後55分でB液の割合を80%まで増加させ、サンプルを親水性の高い順に分離溶出させた。流速は0.3 μ l / 分で行った。蛋白の検索には、Mascot search engine（matrix science, NCBI）を用いた。

Western blottingによる解析：血清（25 μ l）をジャカリンに結合・溶出し、得られた蛋白をWestern blottingにて定量的に解析した。電気泳動後の蛋白は、blotting buffer（10mM CAPS, 10% methanol, pH 11.0）を用いImmobilon P膜に50V / 45分間にて転写した。非特異的結合を除くため、膜を0.1% Tween-20 / 1.5% bovine serum albumin（BSA） / PBSにて室温で1時間インキュベートし、その後、表-1に示した抗体を各々の希釈倍率で調製し1次抗体、2次抗体ともに室温で1時間反応させた。発色はECL plus溶液（GE Health care）で行った。発現したバンドの強度は、quantity one（BIO-RAD）のソフトを用いOptical Density（OD）を半定量化し、治療前後の2群間の比較はt検定で $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

正常人とIgA腎症患者間での比較

IgA腎症患者5名、健常人3名について比較し

たところ、両群間での血清蛋白濃度は、患者 $43.68 \pm 0.95 \text{ mg/ml}$ 、健常人 $43.47 \pm 1.33 \text{ mg/ml}$ （ $p = 0.8$ ）で有意な差は認められなかった。また、IgA1 / IgA1結合蛋白の濃度は、患者 $1.29 \pm 0.14 \text{ mg/ml}$ 、健常人 $0.77 \pm 0.1 \text{ mg/ml}$ であり、患者において有意に高値であった（ $p = 0.04$ ）。

さらに、IgA1 / IgA1結合蛋白中の各分子量毎の蛋白濃度をIgA腎症患者6名と健常人5名で比較した。ゲル濾過カラムによる分画化のパターンは患者も健常人も同様で、680kDa以上、680kDa、340kDa、170kDaの分子量の位置に高いピークを認め、特に340kDaの位置に最も高いピークがみられた。

その後、抽出された各分画のIgA1 / IgA1結合蛋白を電気泳動し、グループ間で銀染色のバンドを比較した。バンドのパターンや強さに患者と健常人間で一定の差は、認められなかった。銀染色で認めた各々のバンドについてMSにて解析を行ったところ、apolipoprotein, immunoglobulin（Ig）heavy chain（ α , μ , γ ）, light chain, IgJ chain, fibronectin（FN）, C1 inhibitor（C1INH）, C4 binding protein（C4bp）, α 1 microglobulin（MG）等がIgA1結合蛋白として認められた。このシステムでは、IgA1結合蛋白中に内因性物質は認められるものの、明らかな外来性抗原と思われる蛋白は同定されなかった。なお、C4bpは、患者群の高分子量分画（680kDa、680kDa以上）において高頻度に認められた（患者6名中3名、健常人5名中1名）。

患者5名と健常人3名の間で、IgA1 / IgA1結合蛋白中のIgA1, IgG, IgM, C3, C4bp, C1INH, FNの含有量をWestern blotting法で比較した（図-1）。IgG・C4bp量は正常人より患者において有意に高値であった。逆に、IgM量は患者よりも正常人において高値であった。IgA1, C3, FN, C1INHは、患者と健常人間では明らかな差は認められなかった。IgGは320kDa近傍の分画に多く、それより大きい分子量の分画には少ない傾向にあった。反対にC4bpは、320kDaの

図-1 正常人とIgA腎症患者の治療前後での蛋白量の比較

治療前後の患者血清中のIgA1/IgA1結合蛋白量をWestern blottingで評価した。IgG, C4bp量は健康人より患者において有意に高かった。C3量は有意差を認めないものの、患者において高い傾向にあった。IgG, C4bp量は治療後に有意に低下した。C3量は有意差を認めないものの治療後に低下傾向にあった。

分画には認められず、680kDaや680kDa以上の分子量に多く認められた。

IgA腎症患者の治療前後での比較

扁桃摘出+ステロイドパルス治療前後で比較検討したところ、血清IgG値は、治療前 $1004.5 \pm 100 \text{ mg/ml}$ であったが治療後は $721.5 \pm 69.07 \text{ mg/ml}$ であった ($p=0.057$)。IgA値は、治療前 $438 \pm 66.5 \text{ mg/ml}$ で治療後は $235.5 \pm 31.62 \text{ mg/ml}$ であった ($p=0.13$)。C3値は、治療前 $96.0 \pm 3.97 \text{ mg/ml}$ であり、治療後は $86.5 \pm 3.11 \text{ mg/ml}$ であった ($p=0.47$)。IgG値やIgA値は、治療前後で有意な差はないものの治療後に減少傾向を認めた。しかし、血清蛋白濃度に治療前後で有意な差は認められなかった (治療前 vs. 治療後; 43.68 ± 0.95 vs. 後 44.1 ± 1.23

図-2 治療前後での各IgA1結合蛋白量の変化率

血清中IgA1/IgA1結合蛋白の治療後の変化率を示す。変化率はWestern blottingの発現量をoptical density (OD)で数値化し、(治療後OD-治療前OD)/治療前ODで示した。治療後にIgGは31.4%、C3は34.3%、C4bpは23.0%の減少を認めた。

mg/ml , $p=0.8$)。また、IgA1/IgA1結合蛋白の濃度は、治療前 $1.29 \pm 0.14 \text{ mg/ml}$ であっ

たが、治療後は $0.68 \pm 0.11 \text{ mg/ml}$ であり治療後に著明に減少した ($p=0.008$)。

扁桃摘出＋ステロイドパルス療法後、680kDa以上の分画の蛋白濃度は、有意に増加した（治療前 vs. 治療後； $0.017 \pm 0.001 \text{ mg/ml}$ vs. $0.026 \pm 0.002 \text{ mg/ml}$, $p=0.02$ ）。また、340kDaは減少傾向（治療前 vs. 治療後； 0.067 ± 0.01 vs. $0.058 \pm 0.012 \text{ mg/ml}$, $p=0.62$ ）、170kDaは増加傾向（治療前 vs. 治療後； 0.01 ± 0.002 vs. $0.01 \pm 0.00176 \text{ mg/ml}$, $p=0.81$ ）を示したが、有意な差は認められなかった。分離剤の有無、pHの影響、ジャカリンの有無、尿素の添加などの条件を変え検討したが、それらによる各分画の蛋白濃度に変化はみられなかった。

治療前後でIgA1/IgA1結合蛋白中のIgA1、IgG、IgM、C3、C4bp、C1INH、FN量を比較したところ（図-1、図-2）、C4bp量は治療後に有意差をもって減少した。また、IgG、C3量は治療後に有意差はないものの、減少傾向を認めた。IgA1、IgM、FN、C1INH量については、治療による変化は認められなかった。

考 察

IgA腎症の病因にIgA-ICの関与が議論されている。IgA-ICを形成するものとして、外来抗原には、現在までのところ細菌¹¹⁾、ウイルス¹²⁾、真菌、食物¹³⁾、内因性抗原には糖鎖異常を起こしたIgA⁷⁾などを示唆する報告がなされている。これに関連してヒンジ部の糖鎖異常によりN-acetylgalactosamine (GalNAC)が曝露されているIgA1は、構造的に不安定であり、自己凝集し高分子IgA1を形成しやすいこと¹⁴⁾、様々な蛋白に対して粘着性が強く¹⁵⁾細胞外基質に粘着しやすいこと、IgA自身がIgG¹⁶⁾17)により抗原として認識され、IgA-IgG ICを形成する可能性のあることなどが報告されている。また、その他にIgA結合蛋白として、FN¹⁸⁾、Fc alpha (Fc α) レセプター (CD89) の可溶フォーム等¹⁹⁾が報告されている。

今回われわれは、MSを使用してIgA1結合蛋白を解析することにより、内因性あるいは外因性の抗原の有無を検討した。今回用いたシステムでは、明らかな外来性抗原を見つけることは出来なかったが、IgA結合蛋白としてIgGと補体因子 (C4bp, C1INH) を認め、それらが治療後に量的に変動することを確認した。

現在までに報告されている外来性抗原が今回のシステムで認められなかったことについては、1) 実際に血清IgA結合蛋白のなかに外来性抗原が存在しなかった、2) 今回解析したバンド中の目的とする外来抗原の蛋白量が、nano LC-MS検出必要最小量25フェムトに満たなかった可能性、3) IgA結合蛋白中には外来性抗原が存在するものの、トリプシン消化後の検体に目的とするペプチドが含まれていなかった可能性などが考えられた。

今回使用したMSのシステムの感度は、細菌やウイルス、真菌由来の蛋白も十分検出可能であること、IgA腎症患者計6名全ての患者にMSによる検索を施行したにも関わらず、外来性抗原が認められなかったことを考えると目的とするペプチドのとりこぼしの可能性は低いと思われ、1)の理由（外来抗原が存在しなかった）が推測された。

レクチン経路は、マンノース結合レクチン (MBL) やフィコリンなどのレクチンが膜上の標的糖鎖に反応した後、MBLに会合している酵素のMASP-1 (MBL associated serine protease) により活性化される。一方、第2経路はC3が活性化され活性型C3となる。IgA腎症患者の腎糸球体メサンギウム領域内では、このレクチン経路と第2経路の両方が活性化されていると報告されている²⁰⁾。

今回、IgAに結合する蛋白として補体ではC4bp、C1INH、C3等が認められた。C4bpは、古典経路とレクチン経路を調節しており、C3 convertase (C4b2a) complexからC2aへの変換、factor IによりC4bの変換を促進している^{21)~25)}。

また、C1INHはIgAと同様にO型糖鎖を所有する蛋白であり、C1qとMBLを阻害することにより補体系を制御している²⁶⁾。しかし、C1INH

はO型糖鎖を所有しているため、非特異的にジャカリンに結合している可能性も考えられた。事実、C1INHの量は治療前後で変化していなかった。Dahaらは、レクチン経路、第2経路の両者の活性は、高分子IgA/IgA-ICで最も強く、2量体近傍IgA/IgA-IC、単量体IgAがこれに続いている²⁷⁾²⁸⁾。実際今回の研究において、分子量毎に分画した蛋白を治療前後で比較した場合、C4bpは320kDaの部分では発現しておらず、680kDa、680kDa以上の高分子IgA/IgA-ICに強く発現し、治療とともに発現量が低下していた。さらに、IgA1結合C3、C4bpは治療により減少し、C1INHは変化しないという結果も得られた。この結果からも、IgA腎症患者のレクチン経路や第2経路の活性が治療により低下する可能性が考えられた。一方、IgA1結合MBLは、MSでも確認されず定量的評価もできなかった。

MBLについては、1) IgA腎症患者におけるMBLの腎糸球体メサンギウム沈着は、約25%に認められ、全例にみられるわけではないこと、2) MBLが血清中ではIgAと結合せず、メサンギウム領域へ沈着したIgAとのみ結合し、それにより腎局所でレクチン経路が活性化される可能性のあること、3) 患者の血清中ではレクチン経路の活性化も多少は認められるものの、第2経路の活性が主体である可能性のあることなどが、考えられた。

IgA腎症患者の治療前後でジャカリン結合蛋白(IgA1/IgA1結合蛋白)をSuperdex 200 10/300により比較したところ、治療後に340kDaの分画に減少傾向が認められた。Western blottingにて、患者ではIgGが340kDa(2量体近傍の分子量)で健常人と比して強く認められ、治療後に減少傾向にあった。このことは、340kDa近傍の分画には、IgA1-IgA1ホモダイマーのみが存在するのではなく、IgA1-IgGヘテロダイマーが混合しており、治療によるIgA1-IgGヘテロダイマーの減少が、この分画の蛋白量の減少につながった可能性が考えられた。

以上より、IgA腎症では、糖鎖異常をきたした

IgAそのものが抗原となり、IgGとの間でヘテロダイマーを形成し、病態に深く関わった可能性が示唆された。

結 語

今回用いたシステムでは、IgA腎症患者の血清IgA結合蛋白中に明らかな外来性抗原由来の蛋白成分は確認できなかった。しかし、治療前後の変化から、IgG、C4bp、C3を含むIgA-ICが本症の病態に関わっている可能性が考えられた。

本研究にあたりご指導を賜りました順天堂大学腎臓内科学講座・生体分子研究部門の皆様方に心からお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Berger J: IgA glomerular deposits in renal disease. *Transplant Proc*, 1969; **1**: 939~944.
- 2) Emancipator SN: IgA nephropathy and Henoch-Schönlein syndrome. *Heptinstall's pathology of the kidney*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1998: 479~539.
- 3) Odum J, Peh CA, Woodroffe AJ, *et al*: Recurrent mesangial IgA nephritis following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, 1994; **9**: 309~312.
- 4) Silva FG, Chander P, Hardy MA, *et al*: Disappearance of glomerular mesangial IgA deposits after renal allograft transplantation. *Transplantation*, 1982; **33**: 241~246.
- 5) Masuda Y, Tamura S, Sugiyama N: The effect of tonsillectomy and its postoperative clinical course in IgA nephropathy with chronic tonsillitis. *Adv Otorhinolaryngol*, 1992; **47**: 203~207.
- 6) Abe K, Miyazaki M, Kohno S, *et al*: Clinical immunohistochemical study of immunoglobulin A nephropathy (IgAN) before and after tonsillectomy. *Acta Otolaryngol*, 2004; **555**: 20~24.

- 7) Kokubo T, Hiki Y, Kobayashi Y, *et al*: Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. *J Am Soc Nephrol*, 1998; **9**: 2048 ~ 2054.
- 8) Takatani T, Iwase H, Higashihara M, *et al*: Compositional similarity between immunoglobulins binding to asialo-agalacto-IgA1-Sepharose and those deposited in glomeruli in IgA nephropathy. *J Nephrol*, 2004; **17**: 679 ~ 686.
- 9) Roque-Barreira MC, Campos-Neto A: Jacalin: an IgA-binding lectin. *J Immunol*, 1985; **134**: 1740 ~ 1743.
- 10) Mineki R, Taka H, Murayama K, *et al*: In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics*, 2002; **2**: 1672 ~ 1681.
- 11) Suzuki S, Nakatomi Y, Arakawa M, *et al*: Haemophilus parainfluenzae antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy. *Lancet*, 1994; **343**: 12 ~ 16.
- 12) Andre PM, Le Pogamp P, Ramee MP, *et al*: In Epstein-Barr virus involved in primary IgA nephropathy? *Nephron*, 1990; **54**: 185 ~ 186.
- 13) Jackson S, Moldoveanu Z, Galla JH, *et al*: IgA-containing immune complexes after challenge with food antigens in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol*, 1992; **89**: 315 ~ 320.
- 14) Iwase H, Tanaka A, Hotta K, *et al*: Aggregated human serum immunoglobulin A1 induced by neuraminidase treatment had a lower number of O-linked sugar chains on the hinge portion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999; **724**: 1 ~ 7.
- 15) Iwase H, Ohkawa S, Hotta K, *et al*: Study of the relationship between sticky human serum IgA1 and its O-glycan glycoform. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; **261**: 472 ~ 477.
- 16) Tomana M, Matousovic K, Mestecky J, *et al*: Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int*, 1997; **52**: 509 ~ 516.
- 17) Yan Y, Xu LX, Zhao MH, *et al*: Self-aggregated deglycosylated IgA1 with or without IgG were associated with the development of IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol*, 2006; **144**: 17 ~ 24.
- 18) Jennette JC, Wieslander J, Falk RJ, *et al*: Serum IgA-fibronectin aggregates in patients with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura: Diagnostic value and pathogenic implications. The Glomerular Disease Collaborative Network. *Am J Kidney Dis*, 1991; **18**: 466 ~ 471.
- 19) Van Der Boog PJ, Van Zandbergen G, van Kooten C, *et al*: Fc alpha RI/CD89 circulates in human serum covalently linked to IgA in a polymeric state. *J Immunol*, 2002; **168**: 1252 ~ 1258.
- 20) Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V: Human C4-binding protein. II Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med*, 1978; **148**: 1044 ~ 1051.
- 21) Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V: Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; **76**: 6596 ~ 6600.
- 22) Daha MR, van Es LA: Relative resistance of the F-42-stabilized classical pathway C3 convertase to inactivation by C4-binding protein. *J Immunol*, 1980; **125**: 2051 ~ 2054.
- 23) Fujita T, Nussenzweig V: The role of C4-binding protein and beta 1H in proteolysis of C4b and C3b. *J Exp Med*, 1979; **150**: 267 ~ 276.
- 24) Fujita T, Tamura N: Interaction of C4-binding protein with cell-bound C4b. A quantitative analysis of binding and the role of C4-binding pro-

- tein in proteolysis of cell-bound C4b. *J Exp Med*, 1983; **157**: 1239 ~ 1251.
- 25) Hiemstra P S, Gorter A, Daha MR, *et al*: Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol*, 1987; **17**: 321 ~ 326.
- 26) Cai S, Dole VS, Davis AE 3rd: A direct role for C1 Inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol*, 2005; **174**: 6462 ~ 6466.
- 27) Rits M, Hiemstra PS, Daha MR, *et al*: Activation of rat complement by soluble and insoluble rat IgA immune complexes. *Eur J Immunol*, 1988; **18**: 1873 ~ 1880.
- 28) Janoff EN, Fasching C, Dalmasso AP: Killing of streptococcus pneumoniae by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *J Clin Invest*, 1999; **104**: 1139 ~ 1147.

Summary

Analysis of IgA1-binding protein using liquid chromatography electron spray ionization mass spectrometry (LC-ESI MS) in patients with IgA nephropathy (IgAN)

Objective : Although the major pathogenic abnormalities of IgAN are considered present in the systemic immune system rather than the kidneys, the pathogenesis of this disease remains unclear. Abnormalities of IgA including under-glycosylation and polymeric IgA immune complex (IC) formation have been discussed in relation to pathogenesis. Since upper respiratory tract infection exacerbates IgAN and tonsillectomy has therapeutic effects on this disease, previous studies have examined the involvement of antigens in this disease. However, obvious antigens that form IgAIC have not been identified.

In this study, we analyzed IgA binding protein (BP) in serum from IgAN patients using LC-ESI TOF MS to determine whether exogenous antigens are involved in IgAIC formation.

Materials : Six patients with IgAN (n=1 good prognosis, n=1 relatively good prognosis, n=3 relatively poor prognosis, n=1 poor prognosis), five patients (n=4 relatively poor prognosis, n=1 poor prognosis) who had undergone tonsillectomy and 3 courses of steroid pulse therapy and eight healthy volunteers were examined in this study.

Methods : Serum 400 μ l was added to jacalin, and IgA1/IgA1-BP was eluted using 0.8M galactose. The eluted protein was fractionated on a Superdex 200 10/300GL column. When 1.5 μ g of protein from each fraction was electrophoresed on acrylamide gel, 30 to 40 bands confirmed by silver staining of each sample were analyzed by LC-ESI MS. Moreover, changes in IgA1-BP due to the therapy were also analyzed. Jacalin-binding protein, which was obtained from 25 μ l of serum, was subjected to Western blotting to quantitatively evaluate the identified protein. The protocol for steroid therapy was as follows; intravenous pulse administration of methylprednisolone of 0.5 g/day $\times$ 3 days every two months and oral administration of prednisolone at 0.5 mg/kg every other day after each pulse therapy.

Results : The eluted protein showed 4 peak fractions (170kDa, 340kDa, 680kDa, and higher

than 680kDa). In each fraction of IgA1/IgA1-BP, MS identified apolipoprotein, immunoglobulin (Ig) heavy chain (α , μ , γ) and light chain, IgJ chain, fibronectin, C1INH, C4bp and α 1MG. C4bp was frequently observed in the patient group (patients; 3/6, volunteers; 1/5). This system failed to determine any obvious exogeneous antigen in the IgA1-BP. Interestingly, tonsillectomy with steroid pulse therapy increased concentrations of the 170 and higher than 680kDa peaks and decreased that of the 340kDa peak. After this therapy, IgA1-binding IgG decreased in the 340kDa and 680kDa fractions, while IgA1-binding C4bp decreased in the 680kDa and higher fractions.

Conclusions : Although we could not confirm exogeneous antigen in IgA1-BP, the present findings suggested that IgG and C4bp might be involved in the formation of pathological IgAIC.

Key words : IgA nephropathy, IgA1-binding protein, mass spectrometry