免疫グロブリンと結合した LDH の性状 —5'-AMP-Sepharose 4B に対する親和性の差異*—

園田 啓・嵯峨実枝子・松本宏治郎・加野象次郎**

Summary

In this report, we described the differences of immunoglobulin-linked LDH in affinity to 5'-AMP-Sepharose 4B by use of the mini-column method and discussed them with respect to the kinetic properties.

Affinity of immunoglobulin-linked LDH whose electropherograms exhibited broad patterns (broad pattern type) was different from that of immunoglobulin-linked LDH with extra bands in enzymograms (extra band type).

In the cases of extra-band types due to either IgA- or IgG-linkage, LDH activities were not detected in the unadsorbed fractions and completely recovered in the NADH fractions of 5'-AMP-Sepharose 4B. Recovery of LDH activities derived from immunoglobulin-linked LDH was also confirmed by high speed liquid chromatography. On the other hand, in the cases of broad pattern types of IgG-linked LDH, LDH activities and those derived from IgG-linked LDH were eluted in the both two fractions.

IgA-linked LDH (extra band) could not be distinguished from normal sized LDH in their K_m values for β -NADH, K_m values of IgG-linked LDH (broad pattern) were observed slightly larger than those of normal sized LDH. K_i values of IgA-linked LDH (extra band) for 5'-AMP against β -NADH were intermediate between those of LDH-1 and LDH-5.

These results indicated that broad pattern types of IgG-linked LDH would have lower affinity to 5'-AMP-Sepharose 4B than extra-band types of immunoglobulin-linked LDH and normal sized LDH.

Key words : immunoglobulin-linked LDH, binding affinity to 5'-AMP, kinetical properties of LDH, circulating immune complex.

血清中の酵素が免疫グロブリンと結合し高分子の状態 で存在する現象は, Wilding ら¹⁾が amylase と γ -globulin の結合例を報告したことにはじまる. その後アイソエン ザイム分析の普及に伴って, lactate dehydrogenase,²⁾ alkaline phosphatase,³⁾ creatine kinase,⁴⁾ aspartate aminotransferase,⁵⁾ などの血清酵素と免疫グロブリンとの結合例も見出されてきた.

このなかで lactate dehydrogenase (LDH) と免疫グロブリンとの結合例は, 1967年 Ganrot⁶⁾ により見出されて以来, Biewenga,⁷⁾ Nagamine,⁸⁾ 菅野ら⁹⁾ により数

多くの IgA 結合例, IgG 結合例が報告されている.

これらの報告の多くは, 自己の酵素と特異的に結合する免疫グロブリンの出現, すなわち, 免疫異常という観点のもとに検索が進められてきた. しかし, 現在まで必ずしもそれを立証するに十分な成績は得られておらず, 結合様式や酵素学的性状に関する定量的解析は少ない.

我々は, このような免疫グロブリンと結合した LDH の酵素学的性状について, 5'-AMP-Sepharose 4B に対する親和性および, β -NADH に対する親和性について検

* Properties of immunoglobulin-linked LDH. —Differences in the affinity to 5'-AMP-Sepharose 4B—

** Akira Sonoda, Mieko Saga, Kojiro Matsumoto, Shojiro Kano, 慶応義塾大学医学部付属病院中央臨床検査部臨床化学.
(受付 1981年6月26日)

討したので報告する。

材料および方法

1. 免疫グロブリン結合性 LDH の症例は、当検査部における日常の LDH アイソエンザイム分析の中から、電気泳動の易動度の異なるパターンとして見いだされたものである。薄層ゲル透過にて高分子 LDH の存在を確認し、イムノフィクセーションにて LDH に結合した免疫グロブリンを同定した。

2. LDH 活性の測定：0.67 mmol/l ビルビン酸、0.14 mmol/l β -NADH、0.1 mol/l リン酸緩衝液 pH 7.4 の条件の下で、LKB 8600 Reaction Rate Analyzer を用いて行った。

3. LDH アイソエンザイムの分画と LDH 結合性免疫グロブリンのクラス・タイプの決定：LDH アイソエンザイムの分画は、セルロゲル膜を支持体に用いた塩谷らの方法¹⁰⁾に準じて行った。免疫グロブリンのクラス・タイプの同定は、須藤らのイムノフィクセーション法¹¹⁾にしたがった。薄層ゲル透過は、Sephadex G-200 Superfine を用い、試料展開後、Separax を2枚重ねて蛋白を転写し、1枚は蛋白染色、他の1枚は LDH 染色を行った。

4. LDH アイソエンザイムの部分精製標品の調製：ヒト肝臓、心臓のホモネジネートから、5'-AMP-Sepharose 4B (Pharmacia) アフィニティークロマトグラフィー¹²⁾ および DEAE Sepharose CL 6B (Pharmacia) により部分精製したアイソエンザイム標品を調製した。

5. 5'-AMP-Sepharose 4B に対する親和性の検討：ゲル容量 100 μ l のミニカラムを用い、試料添加後、リン酸緩衝液で十分洗浄し、1.0 mmol/l β -NADH (オリエンタル酵母) にて溶出した。なお、条件の詳細は結果の項に記した。

6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による免疫グロブリン結合性 LDH のゲル透過と高分子 LDH の分離：TSK 5000 PW と 3000 SW (東洋曹達) を用いた松本らの方法^{13,14)}にしたがい行った。すなわち、TSK 5000 PW 1 本、TSK 3000 SW 2 本のカラムを直列につなぎ、500 mmol/l NaCl を含む 10 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 pH 8.5 にて溶出した。溶離液を 360 mmol/l D,L-乳酸リチウム (半井化学)、2.0 mmol/l β -NAD (オリエンタル酵母) を含有する 200 mmol/l diethanolamine-HCl pH 9.0 緩衝液と 1:1 で混和し、4 分間 37°C で反応させ、生成される NADH の蛍光を Ex. 365 nm Em. Schoeffel Filter No. 418 でモニターした。

7. 酵素学的性状の検討：HPLC により分離した高分子 LDH 活性の画分をコロジオンバックにて透析・濃縮し試料とした。 β -NADH (オリエンタル酵母) に対する K_m 値、5'-AMP (Sigma) の β -NADH に対する K_i 値の算出は、日立320型自記分光光度計および BX-1 (Canon) を用いて、一反応の時間経過より求める等々力らの方法¹⁵⁾にしたがった。すなわち、 β -NADH に対する K_m 値については、0.1 mol/l リン酸緩衝液 pH 7.4、50 μ mol/l β -NADH 0.5 mmol/l ビルビン酸の条件の下で試料添加により反応を開始させ、30秒間隔で 340 nm における吸光度を計測した。この各時点における残存 β -NADH 濃度と時間との関係を、Henri-Michaelis-Menten の式の積分型に導入して K_m 値を算出した。また、5'-AMP の β -NADH に対する K_i 値は、上記反応条件に 1.0 mmol/l、3.0 mmol/l となるように 5'-AMP を加え同様の処理を行って求めた。

結 果

1. 5'-AMP-Sepharose 4B ミニカラム法の条件設定

正常分子サイズ LDH を含む患者血清を用い、ゲル容量 100 μ l のミニカラム法における試料の添加・洗浄・ β -NADH 溶出などの条件設定を行った結果を Fig. 1 に示した。ミニカラム法の再現性を良くするために、溶出各段階に遠心操作を加えたが、その遠心条件と LDH 活性の回収率の関係を検討し、その結果を Fig. 1-a, b に示した。回転数を 1,000, 1,500, 2,000 rpm、遠心時間を 30, 60, 90, 120 秒と条件を変えたが、NADH 溶出画分にはいずれの場合も 90% 以上の高い LDH 活性の回収率が得られた。また、未吸着画分には、添加 LDH 活性の 1% 以下の活性しか認められなかった。そこで、各溶出段階における遠心条件は、1,500 rpm、60秒に設定した。Fig. 1-c は、溶出に用いる β -NADH の濃度を 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/l と変えて LDH 活性の回収率を見たものである。なお、溶出に用いた β -NADH の液量は、400 μ l とした。図からも明らかのように、 β -NADH 濃度は高濃度の方が高い回収率を示したが、ここでは 1.0 mmol/l とした。1.0 mmol/l の β -NADH の溶出液量と LDH の回収率の関係を Fig. 1-d に示した。溶出液量が増加するにつれて回収率は良くなっているが、ここでは溶出液量を 500 μ l とした。

また、部分精製した LDH に 0.50~0.86 mmol/l となるように β -NADH を添加し、LDH 活性を測定したのが得られる活性値への影響は見られなかった。

以上の結果より、ゲル容量 100 μ l のミニカラム法の

Fig. 1. Establishment of experimental conditions for the 5'-AMP-Sepharose 4B mini-column method.

- Recoveries of LDH activities of NADH fraction in various centrifugal conditions.
●—●: 1,000 rpm, ■—■: 1,500 rpm, ▲—▲: 2,000 rpm.
- Recoveries of LDH activities of unadsorbed fraction in various centrifugal conditions.
●—●: 1,000 rpm, ■—■: 1,500 rpm, ▲—▲: 2,000 rpm.
- Effect of NADH concentration on recoveries of LDH activities.
- Effect of elution volumes on recoveries of LDH activities.

条件を以下のように設定した。10 mmol/l リン酸緩衝液 pH 7.2 (緩衝液A) で十分緩衝化したカラムに遠心操作 (1,500 rpm 60秒) を加え、ゲル内の過剰な緩衝液を除く。試料添加後、同様の遠心操作を行い未吸着画分を得る。次にゲル容量の約10倍の緩衝液Aおよびゲル容量の約5倍の 100 mmol/l リン酸緩衝液 pH 7.0 (緩衝液B) で洗浄を行い、再び遠心操作を加えてゲル内の緩衝液を除く。さらに、1.0 mmol/l β -NADH を含有する緩衝液A 500 μ l を添加し、遠心操作により LDH を溶出して N-ADH 溶出画分を得る。

2. ミニカラム法による正常分子サイズ LDH と免疫グロブリン結合性 LDH の挙動

Fig. 2 に種々のアイソエンザイムパターンを示す患者血清 (H/M 比 0.46~4.56) を試料として上述のミニカラム法にて分析した結果を示す。NADH 画分へは、添加 LDH の90%以上 ($n=32$, $95.1 \pm 2.1\%$) の良好な回収率が得られ、未吸着画分には1%以下 ($n=32$, $0.6 \pm 0.2\%$) の活性しか認められなかった。

Fig. 2. Recoveries of LDH activities from patient sera with various H/M ratios by the 5'-AMP-Sepharose 4B mini-column method.

Conditions of the 5'-AMP-Sepharose 4B mini-column method were described in the text.

Table 1 には、IgA 結合性 LDH 6 例、IgG 結合性 LDH 6 例について、今回確立したミニカラム法により分析した結果を示した。IgA 結合性 LDH と IgG 結合性 LDH (extra band) の場合、正常分子サイズ LDH と同様、未吸着画分への活性はほとんど認められず、LDH 活性はほぼ完全に NADH 画分に回収された。一方、IgG 結合性 LDH (broad pattern) の場合には、明らかに未吸着画分にも活性が認められた。

ミニカラム法を用いて溶出した IgA 結合性 LDH、IgG 結合性 LDH の NADH 溶出画分を HPLC によりゲル透過した結果を Fig. 3 に示した。IgA 結合性 LDH の場合、NADH 溶出画分中にも高分子 LDH が原血清とほぼ同じ割合で存在しており、IgA と結合して高分子化した LDH はミニカラム法の操作中に解離することなく回収されることが明らかとなった (Fig. 3-a)。IgG 結合性 LDH (broad pattern) は、未吸着画分、NADH 溶

出画分の両方に高分子化した LDH が検出された (Fig. 3-b)。

3. 免疫グロブリン結合性 LDH の酵素学的性状

免疫グロブリン結合性 LDH を含有する患者血清 500 μ l を試料とし、HPLC により分離した免疫グロブリン結合性 LDH の β -NADH に対する Km 値、および 5'-AMP の β -NADH に対する Ki 値を求め、その結果を Table 2 に示した。

IgA 結合性 LDH の β -NADH に対する Km 値は、LDH-1、LDH-5 よりやや大きい有意な差は認められなかった。一方、IgG 結合性 LDH の β -NADH に対する Km 値は正常分子サイズ LDH よりも大きな値が得られた。また、IgA 結合性 LDH の 5'-AMP の β -NADH に対する阻害実験の結果、阻害形式は LDH-1、LDH-5 と同様に拮抗阻害であり、Ki 値は LDH-1、LDH-5 の中間の値を示した。

Table 1. Recoveries of LDH activities from the sera with immunoglobulin-linked LDH by the 5'-AMP-Sepharose 4B mini-column method.

Case No.	Heavy-chain class	Light-chain type	Pattern of enzymogram	Recoveries of LDH activities in unadsorbed fraction %	Recoveries of LDH activities in NADH fraction %
1	A	κ	extra	0.5	97.3
2	A	κ	extra	0.6	102.7
3	A	κ	extra	0.4	95.1
4	A	κ	extra	0.1	95.4
5	A	κ	extra	0.5	98.0
6*	A	κ	extra	0.8	95.6
7*	G	κ	extra	0.8	93.8
8	G	κ, λ	broad	14.5	85.7
9*	G	κ	broad	17.6	84.5
10	G	κ, λ	broad	12.6	88.0
11	G	κ, λ	broad	20.9	81.4
12*	G	λ	broad	25.2	70.5

* obtained by the method previously reported.¹⁶⁾

Table 2. Kinetical properties of immunoglobulin-linked LDH

	LDH-1	LDH-5	IgA-LDH	IgG-LDH
Km value for NADH (μ mol/l)	15	12	20 21	38 40
Ki value of 5'-AMP for NADH (mmol/l)	4.3	2.3	3.0 3.1	

Km values for β -NADH and Ki values of 5'-AMP for β -NADH were obtained by the integration method, described in the text.

Fig. 3. Analysis of immunoglobulin-linked LDH by high speed gel permeation chromatography.

a) Chromatograms of IgA-linked LDH

i) original serum

ii) NADH fraction of the mini-column method

b) Chromatograms of IgG-linked LDH (broad type)

i) original serum

ii) unadsorbed fraction of the mini-column method

iii) NADH fraction of the mini-column method

Conditions of HPLC were described in the text.

考 察

免疫グロブリン結合性 LDH に関するこれまでの報告は, Ganrot⁶⁾ による最初の報告例が lupoid cirrhosis であったことから, 自己免疫疾患との関連でこの現象を現解しようとする試みがなされてきた。

井本,¹⁷⁾ 菅野ら⁹⁾ は, papain 処理後, 免疫グロブリンの Fab 部分と LDH が結合していることを, さらに, Biewenga,⁷⁾ 加野,¹⁸⁾ 菅野,⁹⁾ 長嶺ら¹⁹⁾ は結合している免疫グロブリンは, その H 鎖に関係なく, L 鎖は κ 型が優

位であることを明らかにした。また, IgA 結合性 LDH と IgG 結合性 LDH とでは, 結合するアイソエンザイムに差のあることを桑,²⁰⁾ 杉田ら²¹⁾ は報告している。

免疫グロブリン結合性 LDH について, 5'-AMP-Sepharose 4B のミニカラム法を用いた今回の検討結果は, 5'-AMP-Sepharose 4B に対して IgA 結合性 LDH, IgG 結合性 LDH (extra band) が正常分子サイズ LDH とほぼ同様の親和性を有するのに対し, IgG 結合性 LDH (broad pattern) はこれに比べ明らかに低い親和性を有することを示している。

また、IgG 結合性 LDH の酵素学的性状に関する十分な検討は今回できなかったが、IgA 結合性 LDH の場合、 β -NADH に対する K_m 値、5'-AMP の β -NADH に対する K_i 値は正常分子サイズ LDH との間に有意な差を認めなかった。このことは、IgA 結合性 LDH が 5'-AMP-Sepharose 4B に対して強い親和性を有することとよく一致する。

IgG 結合性 LDH については、 β -NADH に対する K_m 値が正常分子サイズ LDH よりも大きく、このことが 5'-AMP-Sepharose 4B に対する低い親和性を示す原因とも考えられる。しかし、この点に関しては、5'-AMP の β -NADH に対する K_i 値を求めることにより明らかにしていく必要がある。

松本¹⁴⁾らは、HPLC により分離した高分子部分のパターンが IgA 結合性 LDH の場合、高分子 LDH が一種類であるのに対し、IgG 結合性 LDH の場合には、2 種類存在することを示している。このことは、LDH と免疫グロブリンの結合様式が IgA 結合性 LDH の場合には IgA : LDH が 1 : 1 と思われるのに対し、IgG 結合性 LDH (broad pattern) の場合には、IgG : LDH が 1 : 1 の他に 1 : 2 あるいは 2 : 1 といった結合様式をとる可能性も示している。IgG 結合性 LDH (broad pattern) の 5'-AMP-Sepharose 4B に対する低い親和性は、このような結合様式の差異によるものかもしれない。

今後、結合の特異性、結合様式などについて定量的な解析を加えることが、免疫グロブリンと LDH が結合し高分子の状態で存在する現象の本態を解明していく上で重要なことと思われる。

結 語

免疫グロブリン結合性 LDH の酵素学的性状について検討を行った。

1. 5'-AMP-Sepharose 4B を用いるミニカラム法の分析条件を設定した。

2. IgA 結合性 LDH と IgG 結合性 LDH とでは、5'-AMP-Sepharose 4B に対する親和性に明らかな差が存在し、IgG 結合性 LDH (broad pattern) は、正常分

子サイズ LDH、IgA 結合性 LDH に比べ明らかに低い親和性を示した。

3. β -NADH に対する K_m 値は、正常分子サイズ LDH と IgA 結合性 LDH の間には有意な差は認めなかったが、IgG 結合性 LDH (broad pattern) の K_m 値は、正常分子サイズ LDH よりも大きな値を示した。

4. 5'-AMP の β -NADH に対する K_i 値は、IgA 結合性 LDH において LDH-1, LDH-5 の中間の値を示し、有意な差を認めなかった。IgG 結合性 LDH についても今後同様の検討が必要である。

文 献

- 1) Wilding, P. et al. : Ann. Intern. Med., **60** : 1053, 1964.
- 2) Markel, S. F. and Janich, S. L. : Am. J. Clin. Pathol., **61** : 328, 1964.
- 3) Nagamine, M. and Ohkuma, S. : Clin. Chim. Acta, **65** : 39, 1975.
- 4) Prabhakaran, V. et al. : Clin. Chem., **25** : 112, 1979.
- 5) 桑 克彦他 : 生物物理化学, **22** : 243, 1979.
- 6) Ganrot, P. O. : Experimentia, **23** : 593, 1967.
- 7) Biewenga, J. and Feltkamp, T. E. W. : Clin. Chim. Acta, **64** : 101, 1975.
- 8) Nagamine, M. : Clin. Chim. Acta, **36** : 139, 1972.
- 9) 菅野剛史他 : 生物物理化学, **19** : 337, 1975.
- 10) 塩谷実枝子他 : 臨床病理, **19** : 469, 1971.
- 11) 須藤加代子他 : 生物物理化学, **23** : 145, 1979.
- 12) Bachman, B. and Lee, C. Y. : Anal. Biochem., **72** : 153, 1976.
- 13) 松本宏治郎他 : 臨床化学, **9** : 396, 1980.
- 14) 松本宏治郎他 : 生物物理化学, **24** : 355, 1981.
- 15) 等々力 徹他 : 臨床病理, **27**(補) : 517, 1979.
- 16) 園田 啓他 : 生物物理化学, **23** : 271, 1979.
- 17) 井本 勉他 : 生物物理化学, **19** : 469, 1971.
- 18) 加野象次郎 : 生物物理化学, **21** : 201, 1977.
- 19) 長嶺光隆 : 生物物理化学, **21** : 193, 1977.
- 20) 桑 克彦他 : 生物物理化学, **21** : 209, 1977.
- 21) 杉田 収, 屋形 稔 : 生物物理化学, **22** : 151, 1978.