

氏名	大山友香子
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1245号
学位授与の日付	2020年9月28日
学位論文題名	Analysis of O-glycoforms of the IgA1 hinge region by sequential deglycosylation 「段階的脱グリコシル化法によるIgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造解析」 Scientific Reports. 2020;10:671
指導教授	坪井直毅
論文審査委員	主査 教授 鈴木敦詞 副査 教授 下野洋平 教授 富田章裕

論文内容の要旨

【緒言】

IgA腎症は高頻度な糸球体腎炎であり、IgA1を含む免疫複合体が糸球体に沈着して腎炎を惹起する。IgA1はヒンジ部に集簇化したO結合型糖鎖を最大6個持つ。ヒンジ部O結合型糖鎖にガラクトース欠損(Galactose deficient; Gd)が生じたIgA1(Gd-IgA1)は、IgA腎症患者血中で増加しており、糸球体沈着IgA1の特徴とも一致する。また、近年、Gd-IgA1に対するモノクローナル抗体(mAb)が開発され、糸球体沈着IgAを疾患特異的に染色することが明らかとなった。これらの知見から、特定部位にガラクトース欠損をもつGd-IgA1の病態への関与が示唆され、腎炎惹起性Gd-IgA1の糖鎖付着部位を含む分子レベルでの構造解析が求められる。

【目的】

IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造は、①糖鎖付着数、②付着する糖鎖構造、③糖鎖付着部位による多様性があり、解析には困難をきたす。そこで、本研究では、段階的脱グリコシル化法と質量分析計を用いて、IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖プロファイリングとガラクトース欠損糖鎖(Gd-glycan)付着部位を定量同定するハイスループットワークフローの確立を目指した。

【方法】

1. IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造プロファイリング作成

健常黒人(男性5人、女性5人)血清100uLから精製したIgAのシアル酸をノイラミニダーゼで切断し、還元トリプシン処理後、高速液体クロマトグラフィー—高分解能質量分析計(LC-HRMS)を用いて測定した。三井情報株式会社と共同開発した自動解析ソフトウェア(Glycan Analyzer)を用いて、IgA1ヒンジペプチドに結合する単糖の数に応じたプロファイリングを作成し、Extracted ion chromatogram(XIC)から各O-glycoformを定量した。Glycan Analyzerの結果は手動解析との相同性を確認した。

2. Gd-glycan付着部位定量同定

健常黒人5人の混合IgAをIgA特異的プロテアーゼ(AK183)で切断し、ノイラミニダー

ゼ、O-グリコシダーゼを用いて、Gd-glycanのみをヒンジ部ペプチド主鎖に残した。還元トリプシン処理後、Electron-transfer dissociation combined with supplemental higher energy collision dissociation(ETHcD)tandem MSを用いて、Gd-glycan結合部位を特定した。

【結果】

シアル酸処理後のIgA1ヒンジ部糖ペプチドをLC-HRMSで測定すると、12種類の糖ペプチドが検出された。取得したマススペクトラムからGlycan Analyzerを用いて、糖鎖構造プロファイリングを作成した。手動解析から得られたプロファイリングと強い正の相関関係を認め、相同性が確認できた($R^2=0.993$, $P<0.001$)。

AK183でIgA1ヒンジ部ペプチド長を短縮し、ノイラミニダーゼ/O-グリコシダーゼ処理後LC-HRMSで測定すると、ノイラミニダーゼ単独処理時に同定された12種類の糖ペプチドピークは4種類に減少した。これは糖鎖がないペプチド主鎖、Gd-glycanが1個-3個結合している糖ペプチド(1-3 Gd O-glycoform)と同定された。これらをブレイクサーイオンに設定し、ETHcD tandem MSでGd-glycan付着部位を求めた。各Gd O-glycoformのXICから糖鎖付着部位の異なる異性体の定量同定を行うと、多いものから順に T^{236} , S^{230} , T^{233} , T^{228} , S^{232} であった。

【考察】

本研究では脱グリコシル化法による糖鎖構造単純化と自動解析ソフトウェアの導入により、ハイスループットなIgA1ヒンジ部O結合型糖鎖構造プロファイリング作成が可能となった。また、AK183でペプチド主鎖を短縮後、段階的脱グリコシル化法にてGd-glycanのみをペプチド主鎖に残すことで、ETHcDによる効率なペプチド断片化が得られた。さらに、Gd-glycan付着部位による異性体を感度良く検出することで、Gd-glycanの付着部位の定量同定が可能となった。

この新規解析法は、患者健常者間のGd-glycanの量やその付着部位の定量比較を可能とし、IgA腎症患者特異的なIgA1糖鎖構造の同定が期待できる。

【結語】

段階的脱グリコシル化法と質量分析計を用いて、IgA1ヒンジ部O結合型糖鎖プロファイリングとGd-glycan付着部位の定量同定を可能にするハイスループットワークフローを確立した。

論文審査結果の要旨

IgA腎症の病因として、IgA1を含む免疫複合体が形成されることが知られているが、IgA1ヒンジ部でガラクトース欠損(Gd, galactose-deficient)O結合型糖鎖が生じることが免疫複合体形成と腎症の発症に関連することが明らかとなってきた。本研究では、腎炎惹起性のGd-IgA1の糖鎖付着部位の構造解析を目的とした。脱グリコシル化法による糖鎖構造単純化と質量分析法により、IgA1ヒンジ部O型糖鎖プロファイリングとGd-glycan付着部位の同定の2点を可能とする手法を確立した。

審査過程において、今回明らかとされたGd-glycanの各々の付着部位が、疾病への寄与度と関係するか、プロファイリングでえられたデータが病態と直接関連するかなどの質問がなされた。今回の研究成果は手法の確立であり、病態との関連は今後の検討課題であるが、診断・病勢マーカーとしての可能性や、糖鎖構造変化を生み出す上流の機序の解明につながる可能性が議論された。また、血中レベルのIgAと糸球体組織レベルでのIgAとの相同性についても検討が重要との議論がなされた。

本研究の手法は、病因・病態の本質を解明するために有用と考えられ、また今後の発展性も期待できる研究結果であると考えられた。以上により、本論文は医学博士の学位にふさわしい内容であると判断した。