

抗ヒトアセチル化乳酸脱水素酵素 B₄ 抗体の性状： 非修飾乳酸脱水素酵素 B サブユニットとの反応性*

須藤加代子**・河野弘明**・前川真人**
神田進司**・菅野剛史**

Summary

An anti-acetylated lactate dehydrogenase (LD) B₄ anti-serum was prepared from a New Zealand white male rabbit. This anti-serum formed soluble LD and antibody complexes with non-acetylated LD B₄ molecules without inhibiting the LD activity.

This property was also found in other LD isoenzymes containing B subunit in their molecules. Changes of electrophoretic mobility towards the cathodic side were observed in these LD antibody complexes, and free and bound LD isoenzymes were completely separated and could be quantitated by densitometric analysis. These soluble complexes were completely precipitated by the addition of anti-rabbit immunoglobulin G and the free LD activity was clearly measured by the assay of remaining activity in the centrifugal supernatant.

Employing these two separating methods, i.e., the electrophoretic and the immunological method, the equilibrium constant (K) and the heterogeneity index (a) of the antibody for each LD isoenzyme were measured by Sips plot analysis. The antibody showed a high affinity to LD isoenzymes and a different heterogeneity index for each LD isoenzyme. These findings should be useful for the analysis of enzyme linked immunoglobulin appearing in human sera.

Key word: anti-lactate dehydrogenase B₄ antibody, soluble immune complex, heterogeneity index, anti-acetylated lactate dehydrogenase antibody, lactate dehydrogenase isoenzyme.

はじめに

乳酸脱水素酵素 (EC, 1.1.1.27, LD) は B (H) と A (M) の 2 種のサブユニットよりなる 4 量体である。この B₄ に対する抗体作成は困難であるとの報告¹⁾もあるが、A, B 両サブユニットは免疫学的に分画可能である²⁾。これに対してアセチル化 B₄ は良好な免疫原であり、得た抗体はアセチル化 B₄ と免疫複合体を形成し活性阻害、沈降反応を示すことが Burd らにより報告されている³⁾。しかしこの抗体は非修飾 B₄ とも反応し、可溶性で活性阻害のない免疫複合体も生成するといわれている³⁾。

一方、LD 結合性免疫グロブリン (glob) は自己抗体と考えられていたが^{4,5)} その産生機序、病態との関連は未だ明らかにされていない。この LD と結合免疫 glob の複合体は可溶性であり大部分は活性阻害が観察されない。今回我々は抗アセチル化 B₄ 抗体が非修飾 B₄ と LD 結合性免疫 glob と同様な可溶性で活性阻害のない免疫複合体を作ることから、この抗ヒトアセチル化抗体を作成し、その性状について検討したので報告する。

方 法

1. LD B₄ の精製は Burd らの方法³⁾ に従った。輸血用保存血 (期限切れ) 4 l を用い 32 mg の LD B₄ を

* Properties of anti-human acetylated lactate dehydrogenase B₄ antibody: Reaction with non-acetylated lactate dehydrogenase B subunit.

** Kayoko Sudo, Hiroaki Kohno, Masato Maekawa, Shinji Kanda, Takashi Kanno, 浜松医科大学附属病院検査部

(受付 1984年1月30日, 受理 1984年3月14日)

得た。

2. LD B₄ のアセチル化は Rajewsky の方法¹⁾に従い無水酢酸を用い N-アセチル化した。

3. アセチル化 B₄ 抗体の作成は Burd らの方法³⁾に従い New Zealand white male rabbit に 4 mg のアセチル化 B₄ を complete Freund's adjuvant と共に免疫し, 24日, 48日目に追加免疫し, 10日後に抗血清を得た。得た抗血清中の家兎 LD は 5'-AMP セファロースカラムで3回処理し抗血清中の LD 活性を10単位以下とした。

4. ヒト LD の5種のアイソザイムのうち B₄, B₃A₁, B₂A₂ は Burd の方法³⁾に従いヒト赤血球より分離した。また B₁A₃ と A₄ は Ryan の方法⁶⁾に従い, 子宮筋腫, 子宮頸癌のため全摘した子宮の1部より分離した。

5. LD アイソザイム分画はセロゲル膜 (Chemetron 社製) を支持体とする塩谷らの方法⁷⁾に従った。デンストメトリーはヘレナ社の CliniScan を用い 570 nm にて行った。分子量の推定には 4~30% gradient polyacrylamide gel (Pharmacia 社製) を用い Tris-borate, pH 8.4 にて泳動し, LD 活性染色は通常アイソザイム染色を行った⁷⁾。また分子量のマーカー蛋白は電気泳動用カリブレーションキット高分子量蛋白用 (Pharmacia 社製) を用いた。

6. LD のBサブユニット量は LD の分子量を14万, specific activity を 700 U/mg⁸⁾ として各 LD アイソザイムの活性値より計算しモル濃度で表示した。本実験では精製純化した抗体を用いないので抗体濃度を用いる代わりに Steward⁹⁾ の述べた total antibody binding sites (Ab_t) を用いることとした。Ab_t は $1/b - 1/[Ag]$ プロットを $1/[Ag]=0$ に外挿して求めた。b は抗原抗体複合物濃度, [Ag] は遊離抗原濃度である。また Sips の式¹⁰⁾ を利用した Steward の方法⁹⁾ に従い, 平衡定数 (K), 多様性係数 (a) を $\log(Ab_t - b)/b$ と $\log[Ag]$ の関係より求めた。

7. LD の活性測定は Wroblewski and LaDue¹¹⁾ の方法によった。蛋白の定量は Lowry 法¹²⁾によった。

8. Anti-rabbit IgG(Goat), anti-rabbit IgM(Goat), anti-rabbit IgA (Goat) は Miles-Yeda 社製を用いた。他の試薬は特級を用いた。

結 果

1. 抗ヒトアセチル化 B₄ 抗体とヒト LD アイソザイムの反応

1) 反応上清中の LD 活性とアイソザイム像
精製した B₄, B₃A₁, B₂A₂, B₁A₃, A₄ と抗アセチル化

Table 1. Lactate dehydrogenase (LD) activity in supernatant.

	Resultant LD activity in supernatant	
	Activity (U/l)	(%)
LD B ₄ +saline	533	100
LD B ₄ +anti-serum	512	96
LD B ₃ A ₁ +saline	494	100
LD B ₃ A ₁ +anti-serum	567	115
LD B ₂ A ₂ +saline	679	100
LD B ₂ A ₂ +anti-serum	748	110
LD B ₁ A ₃ +saline	407	100
LD B ₁ A ₃ +anti-serum	458	113
LD A ₄ +saline	449	100
LD A ₄ +anti-serum	512	120

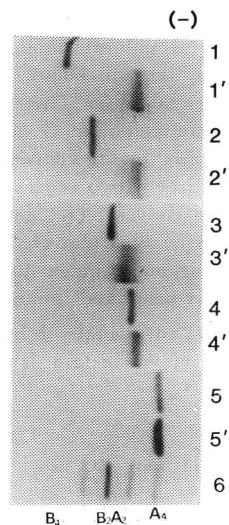
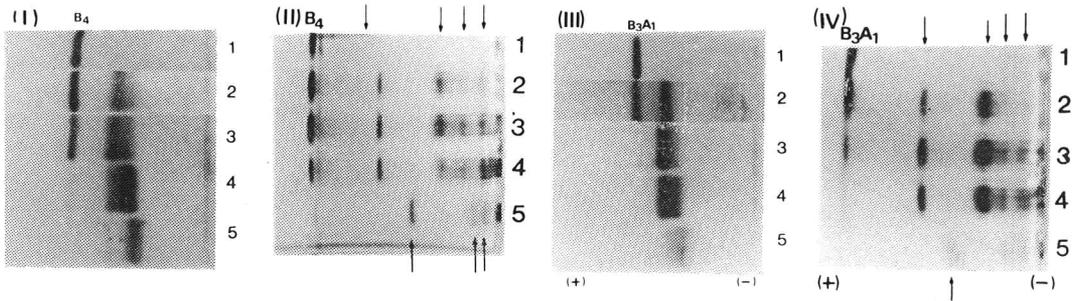


Fig. 1. Electrophoretic analysis of anti-acetylated B₄ anti-serum complexes with native lactate dehydrogenase (LD) isoenzymes on Cellogel membrane.

1 : LD B₄+saline, 1' : LD B₄+anti-serum,
2 : LD B₃A₁+saline, 2' : LD B₃A₁+anti-serum,
3 : LD B₂A₂+saline, 3' : LD B₂A₂+anti-serum,
4 : LD B₁A₃+saline, 4' : LD B₁A₃+anti-serum,
5 : LD A₄+saline, 5' : LD A₄+saline.

Each isoenzyme was incubated with saline or anti-acetylated B₄ anti-serum for 20 hrs at room temperature. The supernatant solution, centrifugated at 2,000 rpm for 10 min was used for electrophoretic analysis.

B₄ 抗体を等量混和し室温 1 昼夜後に 2,000 rpm, 10 分間遠心しその上清の LD 活性を測定した。抗体の代わりに



(I) (Cellogel membrane) and (II) (4-30% gradient polyacrylamide amide gel)
 1 : LD B₄+saline
 2 : LD B₄+anti-serum (diluted 22 times by saline)
 3 : LD B₄+anti-serum (diluted 11 times by saline)
 4 : LD B₄+anti-serum (diluted 6 times by saline)
 5 : LD B₄+anti-serum (original)
 (III) (Cellogel membrane) and (IV) (4-30% gradient polyacrylamide gel)
 1 : LD B₃A₁+saline
 2 : LD B₃A₁+anti-serum (diluted 22 times by saline)
 3 : LD B₃A₁+anti-serum (diluted 11 times by saline)
 4 : LD B₃A₁+anti-serum (diluted 6 times by saline)
 5 : LD B₃A₁+anti-serum (original)

Fig. 2. Zymograms of isoenzymes with different concentration of anti-acetylated B₄ anti-serum.

Table 2. Reaction of anti-acetylated LD B₄ anti-serum with various LD isoenzymes.

	Resultant LD activity with anti-rabbit immunoglobulin					
	Anti-IgG		Anti-IgM		Anti-IgA	
	U/1	%	U/1	%	U/1	%
B ₄ +saline	384	100	345	100	307	100
B ₄ +anti-serum	2	0.3	292	84.6	216	70.3
B ₃ A ₁ +saline	393	100	354	100	311	100
B ₃ A ₁ +anti-serum	7	1.8	294	83.1	224	72.0
B ₂ A ₂ +saline	483	100	435	100	386	100
B ₂ A ₂ +anti-serum	61	12.6	439	100.9	328	84.9
B ₁ A ₃ +saline	271	100	243	100	276	100
B ₁ A ₃ +anti-serum	45	16.6	281	115.6	259	93.8
A ₄ +saline	481	100	432	100	384	100
A ₄ +anti-serum	519	107.9	507	117.4	429	111.7

生食を添加し同様に操作した場合とを比較した結果を Table 1 に示した。抗血清添加による LD 活性阻害は観察されなかった。またその上清の LD ザイモグラムを Fig. 1 に示した。抗血清添加により A₄ 以外はいずれも易動度が陰極側に变化した。

2) 免疫複合体の多様性と抗体抗原比の変化による分子量の変化

抗血清を22倍、11倍、6倍に希釈し、精製 LD アイソザイム溶液と等量混和し1昼夜反応後の LD アイソザイム分画像を Fig. 2 に示した。セロゲル膜(左)と4~30% gradient polyacrylamide gel (右)を支持体として電気泳動後の LD ザイモグラムを観察した。Fig. 2 に示す様にセロゲル膜にて易動度の陰極側の分画が2~5と抗血清の濃度比の上昇に伴い増加した。また陰極側

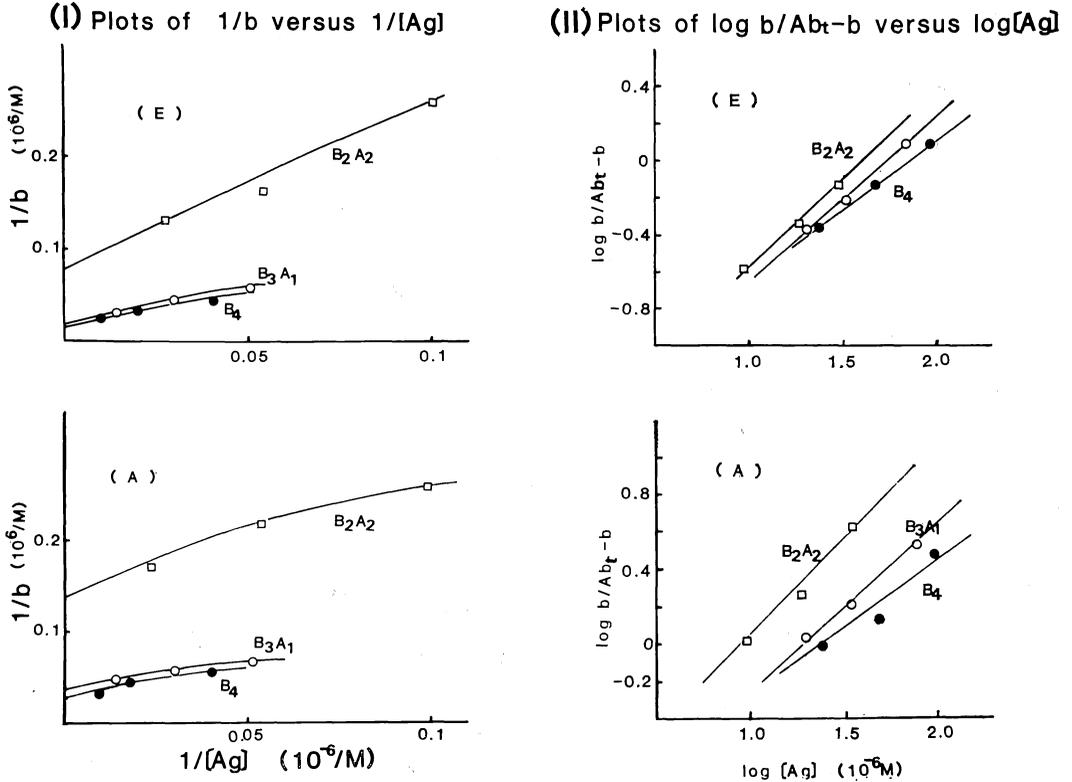


Fig. 3. Binding curves (I) and Sips plot (II) for the interaction of antiacetylated lactate dehydrogenase (LD) B_4 with native lactate dehydrogenase isoenzymes containing B subunits.

(E) Electrophoretic separation of free and bound LD.

(A) Anti-rabbit IgG precipitated separation of free and bound LD B.

(I) Determination of total antibody binding sites (Ab_t).

Abscissa: reciprocal of free antigen concentration $[Ag]$ (M).

Ordinate: reciprocal of antigen-antibody concentration b (M), expressed by bound B subunits.

Extrapolation to $1/[Ag]=0$ gives Ab_t (see text)

(II) Determination of equilibrium constant (K) and heterogeneity index (a).

Abscissa: $\log [Ag]$.

Ordinate: $\log b/(Ab_t-b)$.

Sips formula: $\log b/(Ab_t-b) = a \log K + a \log [Ag]$.

K is $1/[Ag]$ for which $\log b/(Ab_t-b)=0$, and a is slope of regression line.

に泳動された分画には抗体の持つ負の荷電の差異によると推定される多様性のあることが示された。一方, gradient PAGE には複数の分子量の LD が観察された。 B_4 には高分子 LD の分子量は 33 万, 48 万, 75 万, 105 万, 118 万, 135 万と計算された。また B_3A_1 には 33 万, 53 万, 80 万, 110 万, 135 万と計算された。しかし free の LD の B_4 は 12.5 万, B_3A_1 は 14 万, B_2A_2 は 18 万, B_1A_3 は 27 万と計算される。これらは LD アイソザイムには易動度の影響が大なため, gradient によ

る分子量の推定が困難であることを示している。泳動時間を長くすることによってはこの問題点は解決しなかった。免疫 glob と結合することにより易動度は遅くなるため実際の分子量より大きく計算されていると推定できる。

抗血清の濃度比を増加させるに従い free の LD の量は減少した。 Fig. 2 には B_4 , B_3A_1 のみを示したが B_2A_2 にも同様であった。この free の LD と抗体と結合した (b) LD の比はセロゲル膜電気泳動後のザイ

モグラムをデントメトリーすることにより定量可能であった。

3) 抗家兎免疫 glob との反応

抗アセチル化 B₄ 抗体と LD の反応後の上清にさらに抗家兎免疫 glob, G.M.A を各々添加し, 2,000 rpm, 10 分間遠心後の上清中の LD 活性を Table 2 に示した。抗家兎 IgG 添加により B₄, B₃A₁, B₂A₂, B₁A₃ と抗ヒトアセチル化 B₄ 抗家兎血清の混合物の上清の LD 活性は沈降した。しかし, 抗 IgM, 抗 IgA 添加にては活性は 70~116% 上清中に観察された。このことは生成した抗アセチル化 B₄ 抗体のクラスは G であることを示している。

2. 抗ヒトアセチル化 B₄ 抗体と LD の各アイソザイムとの結合定数 (K) と多様性係数 (a) の測定

抗血清の量を一定にし LD 活性を変化させて反応後にセロゲル膜電気泳動し, この LD ザイモグラムをデントメトリーした。陰極側の分画を生成した免疫複合体 (b) として活性比を測定した。この活性比はそれぞれのアイソザイムのサブユニット構成から換算し, B サブユニットのモル濃度を計算した (方法 6)。同様に [Ag] も free の B サブユニットのモル濃度で示してあり, 1/b と 1/[Ag] の関係を Fig. 3 (E (I)) に示した。さらに抗家兎 IgG を添加し, 遠心上清中の LD 活性から同様に b と [Ag] を B サブユニットの量に計算した結果が Fig. 3 (A, (I)) である。このプロットを外挿してえられる 1/[Ag]=0 の点の b が total antibody binding sites (Ab_t) である⁹⁾。

Fig. 3 の右 (II) はいわゆる Sips プロットである。log b/(Ab_t-b)=0 の点の 1/[Ag] が結合定数 K=1/[Ag] である。また傾きから親和性に関する均一性を示す指標で heterogeneity index とよばれる a 値⁹⁾ を求めた。Table 3 には泳動法と抗家兎 IgG 沈降法にてそれぞれ求めたアイソザイム別の B サブユニットに対する K

Table 3. Equilibrium constant(K) and heterogeneity index(a) of anti-human acetylated LD B₄ anti-serum

Method	LD	K(1/mole)	a
Electrophoretic analysis	B ₄	1.3×10 ⁸	0.75
	B ₃ A ₁	1.9×10 ⁸	0.85
	B ₂ A ₂	2.5×10 ⁸	1.01
Anti-rabbit IgG precipitation method	B ₄	4.0×10 ⁸	0.70
	B ₃ A ₁	5.1×10 ⁸	0.85
	B ₂ A ₂	11.2×10 ⁸	1.01

値, a 値を示した。

考 察

今回我々が作成した抗ヒトアセチル化 LD B₄ 家兎抗体は, Burd ら⁹⁾ が報告した結果と同様にアセチル化しない B₄ と反応し活性阻害を起ささない可溶性複合体を作成した。さらに他の B サブユニットを含む LD とも同様な可溶性複合体を作成した。この可溶性複合体は抗家兎 IgG と反応したが, 抗家兎 IgA, 抗家兎 IgM とは反応しなかった。従って, 得た抗 LD B 抗体のクラスは IgG であることが示された。これらの性状を利用し, (1)複合体が活性阻害を示さないことから電気易動度の違いを活性染色で検出する方法 (泳動法) と, (2)可溶性複合体を抗家兎 IgG にて沈降させ上清の LD 活性を測定する方法 (免疫法) にて, 結合定数 (K) と多様性係数 (a) を求めた⁹⁾。K 値は LD の B サブユニットの含量の減少により大となった。この解析法は酵素結合性免疫 glob の性状の解析に有効な手法と考える。今回の K 値は LD の活性ではなく反応液中の各々のアイソザイム中の B サブユニットの量として表現している。もし B サブユニットを認識しているならば, いずれのアイソザイムにても K 値は類似することが推定される。従って今回の結果からは LD の立体構造も認識していることが推定された。

抗体標品の a 値は 0.5~0.8 といわれている。本抗血清の B₄ に対する a 値が 0.75 であり, B サブユニットの含量の減少に伴い 1 に近づいた。B₂A₂ にはほぼ 1 であり, その結合が均一であることが推定された。可溶性の複合体を作ることからも結合部位が限られていることが推定できる。

通常は修飾された蛋白に対する抗体は非修飾蛋白と反応しないことが多い。修飾 LD B₄ に対する抗体は非修飾 LD の B サブユニットを持ついずれのアイソザイムとも反応した。このことはヒトの血清中に存在する LD 結合性免疫 glob の産生機序, 存在様式を考える上で非常に興味ある知見と思われる。本実験にては生体中 (特に血清) に存在する抗原量に近い範囲を用いている。このことは一つの問題点であるかもしれない。しかし Burd らは同様の抗原量の範囲でアセチル化 B₄ とは沈降複合体を作り, 非アセチル化 B₄ とは可溶性複合体を形成したことを報告している⁹⁾。ヒトの LD B₄ に対する抗体は, プタとウシの LD B₄ とは免疫複合体を作成するが, 鳥類の LD B₄ とは反応しないことが知られている¹³⁾。従って酵素結合性免疫 glob の存在の原因は自己抗体のみではなく変性酵素に対する抗体である可能性も

含めて今後検討されるべきであると思われる。

文 献

- 1) Rajewsky, K. : Bioch. Bioph. Acta, **121** : 51, 1966.
- 2) Rajewsky, K. et al. : J. Exp. Med., **126** : 581, 1967.
- 3) Burd, J.F. and Vsatengui-Gomez, M. : Bioch. Bioph. Acta, **310** : 238, 1973.
- 4) Ganrot, P.O. : Experientia, **23** : 593, 1967.
- 5) 菅野剛史他 : 生物物理化学, **19** : 65, 1975.
- 6) Ryan, L.D. and Vestling, C.S. : Arch. Bioch. Bioph., **160** : 279, 1974.
- 7) 塩谷実枝子他 : 臨床病理, **19** : 469, 1971.
- 8) 五十嵐富三男, 中山年正 : 臨床化学, **11** : 115, 1982.
- 9) Steward, M.W. and Petty, R.E. : Immunology, **22** : 747, 1972.
- 10) Sips, R. : J. Chem. Phys., **16** : 490, 1948.
- 11) Wroblewski, F. and LaDue, J.S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **90** : 210, 1955.
- 12) Lowry, O.H. : J. Biol. Chem., **193** : 265, 1951.
- 13) Malvano, R. et al. : Eur. J. Nucl. Med., **4** : 379, 1979.