

## 新たな炎症マーカー開発のためのアンチキモトリプシン結合糖鎖構造解析

○飯島 史朗<sup>1</sup>, 櫻井 愛<sup>1</sup>, 久保田 亮<sup>1</sup>, 田原 佳代子<sup>1</sup>, 服部 豊<sup>1</sup>(<sup>1</sup>慶應大薬)

**【目的】**炎症性疾患においては、肝臓で産生される各種急性相反応蛋白質(CRP、アンチキモトリプシン(ACT)など)が血中で増加し、サイトカイン刺激によって ACT の付加糖鎖構造が変化するなどの翻訳後修飾が報告されている。CRP 以外の急性相反応蛋白質は、これまで個々の蛋白質の機能のみしか評価されていないが、蛋白質の寿命、シグナル伝達など糖鎖の持つ多様な情報を併せて考慮することにより、CRP とは異なる新たな炎症マーカーとなりうる。本研究では、急性相反応蛋白質の一つである ACT の糖鎖構造変化と炎症の病態との関連を明らかとするため、ACT 付加糖鎖構造解析を行った。

**【方法】**血清中の ACT を、抗 ACT 抗体を結合させたカラムにより精製し、ACT の糖鎖構造を解析した。すなわち精製した ACT をプロテアーゼ処理し、そのフラグメントを Tricine-SDS-PAGE を用いて分離し、各種レクチンカラム、HPLC を用いて糖鎖結合フラグメント精製した。さらに、PNGase F で糖鎖を遊離、プロテインシーケンサーおよび TOF-MS で、その構造を分析した。また、レクチンとの反応性より結合糖鎖の推定を行った。さらに、モデリングソフトウェアを用いて、付加糖鎖を含めた ACT の立体構造を解析した。

**【結果と考察】**ACT には、N 結合型糖鎖が結合可能なアミノ酸配列が 6 ヶ所存在している。解析した結果、5 ヶ所に糖鎖の結合を確認した。レクチンとの反応性の解析より、Con A, DSA, PHA-E4, AAL, LCA, SSA レクチンとの反応性が認められ、またこの反応性は糖鎖結合部位ごとに異なっていた。一方、O 結合型糖鎖は、検出されなかった。TOF-MS、レクチン分析の結果、127 番目のアスパラギンに 3 分岐複合糖鎖が結合していることがわかった。これらの糖鎖は、ACT のキモトリプシン結合部位する付近に存在しており、この糖鎖構造の変化は ACT 活性の制御に関与していることが予想された。今後、炎症によるどの結合糖鎖構造が変化するか解析し、炎症マーカーへの応用を検討する。