

平成18年度研究助成報告書

米アレルゲンに対する単クローン抗体の作成と抗原特異性の解析

松田 幹*

要 約

本研究は、米アレルギーにおける主要アレルゲンの免疫化学的および物理化学的性質の解明に関する研究、また、実際に摂取する食品のレベルでのアレルゲンの分析、定量や、製造、保蔵、加工、調理などの過程での変性や分解に関する研究などへの応用展開を目的としている。これまでに米16kDa米アレルゲンタンパク質に対するモノクローナル抗体を1クローン作成し、これを用いた免疫ブロット解析および遺伝子クローニングの結果から、類似の構造を持つ14-16kDaの複数のアレルゲンが存在することが示唆された。本研究助成による研究では、14-16kDa アレルゲンに共通のエピトープを認識するクローンとそれぞれを識別するクローンの両方の単離を目指して14-16kDaアレルゲンの混合物で免疫したマウスから脾細胞を調製しハイブリドーマを作成した。新たに2クローン(4D9および5D3)が得られ、以前に取得していた単クローン抗体25B9を加えて、3種の抗体を用いて分離精製した個々の14-16kDa アレルゲンおよび大腸菌で発現させた組換えアレルゲンとの反応性を解析し、各クローンの抗原認識特異性を明らかにした。さらに、それらの抗体が米アレルゲンの立体構造を識別するか、すなわち加熱等により変性したアレルゲンとも反応性を示すかを解析した。その結果、25B9は、6つの画分に分離したアレルゲンのいずれとも反応性を示すが、新たに得られた5D3および4D9は、最も酸性の等電点を持つ16kDaのアレルゲンは認識しないことが明らかとなった。さらに、4D9は18℃で発現させた組換えアレルゲン(RA17)とは結合するが、38℃で発現させたアレルゲンとは結合しないことが示され、立体構造に依存したエピトープを認識することが示唆された。

*名古屋大学大学院生命農学研究科

研究の目的

米や小麦などの穀物の摂取によるアレルギーの症例が報告されており、その原因物質であるアレルゲンの分離・精製や構造解析、さらに遺伝子の構造や発現様式の解析も急速に進んでいる。このような一連の基礎的データの蓄積を基盤にして、アレルゲン成分の免疫化学的および物理化学的性質の特徴、さらに実際に摂取する食品に視点をおいた製造、保蔵、加工、調理などの諸過程でのアレルゲンの変性や分解に関する研究に移行しつつある。このような研究への展開を目指して、本研究では、これまでに同定してきた米アレルゲンタンパク質に対して異なる領域を認識する複数のモノクローナル抗体を作成することを目的とする。これまでに得られている単クローン抗体としては、我々が既に作成したクローン(25B9)が唯一のものであるが、それも併せて複数の特異性が異なる抗体を用いた高感度分析系を確立することを最終目的とする。

研究方法

米の主要アレルゲンである14-16kDaアレルゲンは、分子量と等電点が僅かに異なる一群の塩可溶性タンパク質で、そのcDNA塩基配列に基づくアミノ酸配列が70%以上一致する相同性が高いタンパク質である。これらの混合物を抗原としてマウスを免疫し、その脾細胞からハイブリドーマを作成して、得られる単クローン抗体の抗原認識特異性を解析した。

1) 米からの14-16kDaアレルゲンの抽出と部分精製

粉碎した精白米から既に確立した方法により14-16kDaアレルゲンを塩溶液で抽出し、硫酸による塩析で濃縮した後、DEAEイオン交換クロマトグラフィーにより部分精製した。

2) 14-16kDaアレルゲン混合物によるマウスの免疫と血清特異抗体の測定

BALB/cマウスを部分精製アレルゲンで免疫し、経時的に採血して血清中の特異IgG抗体の上昇をELISAによりモニターした。

3) 細胞融合によるハイブリドーマの作成とスクリーニング

抗体価が上昇したマウスの脾臓を摘出し、脾細胞とマウスミエローマ(P3)細胞をPEG法により融合し、HAT培地により選択した。培養上清の特異抗体をELISAで測定することにより陽性クローンのスクリーニングそし、限界希釈法によりクローン化を行った。

4) 単クローン抗体の大量精製と14-16kDaアレルゲンとの反応性の解析

鉱物油を腹腔内に注射したCDF1マウスに抗体を産生するハイブリドーマ細胞を移植し、数週間後に生成した腹水を採取し、そこに含まれる単クローン抗体を得た。ELISA法および免疫ブロット法により各単クローン抗体と14-16kDaアレルゲンとの反応性を解析した。

5) 組換え型14-16kDaアレルゲンの調製

14-16kDaアレルゲンをコードするcDNAの中で、これまでに取得した3種のcDNA、RA14、RA17およびRA20について大腸菌発現系(pETシステム)を用いてヒスチジンのタグが付加されたチオレドキシンの融合タンパク質として異なる温度(18および37°C)で発現させた。タグを利用してニッケルキレートカラムにより精製した。

結 果

1) 14-16kDaアレルゲンに特異的な単クローン抗体の取得

細胞融合後のアレルゲン特異ハイブリドーマのスクリーニングにより5つの陽性クローン候補が得られ、限界希釈法によるクローン化を経て、最終的に2つのクローン(4D9および5D3)を得た。

2) 14-16kDaアレルゲンの各成分と単クローン抗体との反応性解析

ゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせ、14-16kDaアレルゲン分離精製し、各成分と得られた単クローン抗体との反応性を、還元および非還元条件下でSDS処理した後のSDS-PAGEおよび免疫ブロット法により解析した(図1)。14-16kDaアレルゲンは、イオン交換クロマトグラフィーにより6つの各分(ピーク)に分画され、それらの画分に含まれるアレルゲンと今回得られた2つの単クローン抗体との反応特異性は、既に取り得ていた単クローン抗体、25B9、とは少し異なることが明らかとなった。図1に示すように、4D9と5D3は、アレルゲンを還元状態でSDS処理すると、ブロットしてSDSを除去した後も全ての画分において反応性を示さなかった。一方、25B9は、還元処理の有無にかかわらず、6つの画分のアレルゲンと、特に画分2-4と強い反応性を示した。また、4D9と5D3は非還元状態でのSDS-PAGE/免疫ブロット解析により、画分1-5のアレルゲンと強い反応性を示したが画分6とはほとんど反応性を示さなかった。それに対して、25B9は画分6のアレルゲンとも他の

画分と同等の反応性を示した。

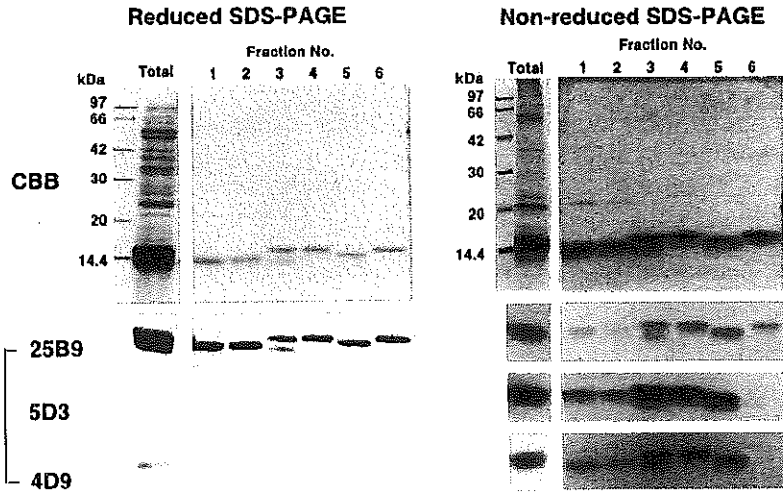


図1 米14-16kDaアレルゲンと3種の単クローン抗体との反応特異性
イオン交換クロマトで分画した14-16kDaアレルゲン(レーン1から6)を非還元(左)、
還元(右)条件でSDS-PAGE、免疫ブロット解析した。

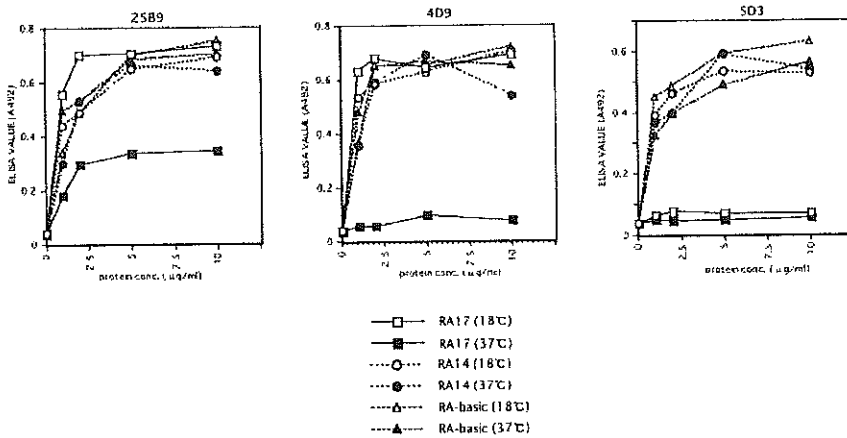


図2 組換え型米14-16kDaアレルゲン(RA14, RA17, RA-basic)と3種
の単クローン抗体との反応特異性:ELISAによる解析

2) 組換え14-16kDaアレルゲンと単クローン抗体との反応性解析

14-16kDaアレルゲンの中で既にcDNAクローンが得られているRA14、RA17およびRA-basicについて大腸菌発現系を用いて37°Cおよび18°Cでチオレドキシンの融合タンパク質として発現させた。組換えタンパク質を、ニッケルキレート親和性カラムを用いて精製し、3種の単クローン抗体との反応性をELISAにより解析した(図2)。RA14およびRA-basicは、いずれの温度で発現させた場合も、3種の単クローン抗体と強く反応した。一方、RA17に対する結合特異性は3種の単クローン抗体間で大きく異なっていた。25B9と4D9は、それぞれ、18°Cで発現させた組換えタンパク質とは強く反応したが、37°Cで発現させたタンパク質とは、結合の強度が半減および消失した。一方、5D4は、18°Cおよび37°Cで発現させたタンパク質のいずれとも結合を示さなかった。

考 察

米14-16kDaアレルゲンは等電点の違いによって6つの画分に分離され(図1)、それぞれの分子量とN-末端アミノ酸配列の情報に基づいて、cDNAとの対応付けが可能である。画分3-5はRA14に、画分6はRA17にコードされたタンパク質を含むと推定される。一方、画分1-2に含まれる14 kDaのタンパク質は、そのN-末端アミノ酸配列はRA-basicの翻訳産物と一致する。したがって、図1と図2に示した単クローン抗体の結合特異性は、矛盾しないで良く対応している。すなわち、画分6のタンパク質および組換えRA17タンパク質と強く結合するのは25B9であり、一方、いずれとも反応性を示さないのが5D3である。4D9はこれらの中間的な性質で、非還元条件であってもSDSとともに加熱処理された画分6のタンパク質および37°Cで高発現させた(おそらくミスフォールドした)RA17とは反応性を示さないものと考えられる。これらの結果から、これまでに得られていた25B9は14-16kDaアレルゲンアイソフォームのいずれの分子にも共通で立体構造には依存しないエピトープを認識し、今回得られた5D4はRA14とRA-basicに共通でRA17には存在しない立体構造依存性のエピトープを認識することが示唆された。さらに4D9はアイソフォームに共通で、かつ立体構造に依存するエピトープを認識すると考えられた。

このように3種の単クローン抗体は、分離精製した個々の14-16kDa アレルゲンおよび大腸

菌で発現させた組換えアレルギーとの反応性に、それぞれ特徴的な点があり、熱変性やプロテアーゼによる分解など、食品の加工過程やイネ胚乳中での生物学的プロセスでの14-16kDaアレルギーの増減や分子構造の変化を追跡する有効なプローブとしての応用が期待できる。

謝 辞

本研究課題に対して研究助成をいただいた財団法人杉山産業化学研究所にお礼申し上げます。