

【目的】 アレルギーで苦しむ人の数は世界で増加の一途をたどっており、先進諸国においては何等かのアレルギー症状を呈する人が人口の半数近くを占めるとまで言われている。食品を摂取した時にアレルギー症状を示す食物アレルギーや花粉などの環境抗原に対してアレルギー症状を示す患者が増加し、重篤なアレルギー症状を引き起こす危険を抱え、日々の継続する症状により生活の質を大きく低下させることも多い。様々なアレルギー性疾患の病態の研究が進み、治療法および診断法の開発が試みられている。IgE抗体が抗原と結合することにより、マスト細胞などから化学物質を放出することによりアレルギー症状を引き起こされる。そして、IgE抗体には糖鎖が結合しており、その構成成分にシアル酸が結合している複合糖鎖が含まれる。最近、IgE抗体の糖鎖に含まれるシアル酸がアレルギー症状に関わることが示唆されている。このようなIgE抗体の糖鎖の構成成分の寄与はアレルギーの重篤度にも関わる可能性もある。本研究では、IgE抗体に結合するシアル酸に対する抗体を作製し、IgE抗体中のシアル酸量を簡易に定量するためのツールを開発する。

【方法】 定常領域のみに対するヒトIgE抗体の発現用ベクターを用い、可変領域については主要なカバノキ花粉の抗原であるBet v 1に対するIgE抗体の構造情報に基づいて設計し、遺伝子を人工合成して、ヒト培養細胞で発現させた。精製したプラスミドをExpiFectamineと複合体を形成させ、細胞にDNAを導入した。4~6日後に細胞および培地を回収した。培養液を濃縮したものを滅菌ろ過して、Superdex200 Increase 10/300GLカラムにより、培養液を分画した。この試料について抗IgE抗体およびレクチンでのシアル酸検出を行った。一方、ニワトリ抗体ライブラリーからファージディスプレイによりスクリーニングされたシアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントの組換えタンパク質調製のため、大腸菌発現系を構築した。MBP融合タンパク質として発現を確認し、部分精製を行った。シアル酸との相互作用について検証するため、この単鎖可変領域フラグメントについて構造予測を行った。

【結果】 還元剤の添加および非添加の条件において、SDS-PAGEにおいて複数のバンドが検出された。ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、HRP結合させたヒトIgE抗体に対するgoat-ポリクローナル抗体を用いて組換え型IgE抗体を検出した(図A)。IgE抗体における複合糖鎖の結合を検証するために、レクチンであるSiaFind Lectenzを用いた。SiaFind Lectenzにより、いくつかのバンドが明確に発色するとともに、抗体と予想される領域も発色した(図B)。組換え型IgE抗体中の複合糖鎖を検出する抗体を作製するために、ニワトリ抗体ライブラリーからファージディスプレイによりスクリーニングされた単鎖可変領域フラグメントの大腸菌発現系を構築し、発現の確認とともに部分精製を行った。さらに、複合糖鎖と抗体との相互作用を検討するために、シアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントの構造を推測した(図C)。

組換え型IgE抗体の複合糖鎖の検出

