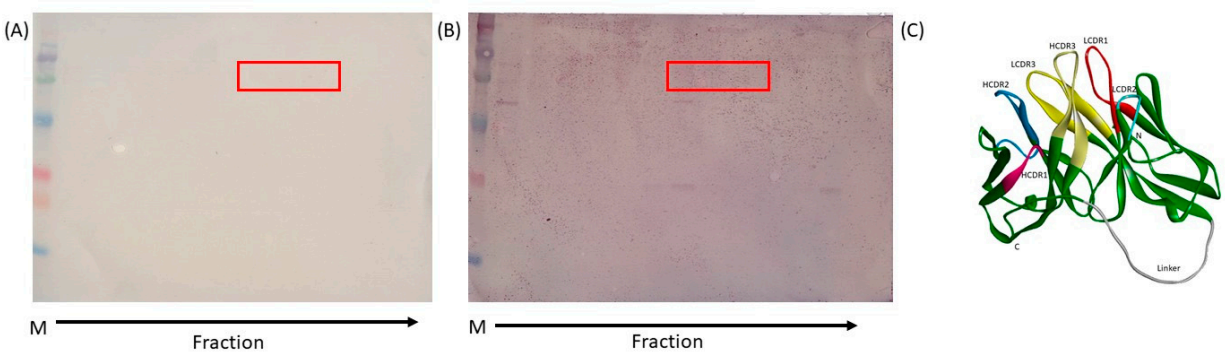
92　IgE抗体糖鎖に着目したアレルギー診断ツールの開発	丸山　伸之

【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



IgE 抗体糖鎖に着目したアレルギー診断ツールの開発

丸山　伸之

京都大学 大学院農学研究科 農学専攻 品質設計開発学分野

Key words：アレルギー，IgE 抗体，診断ツール，糖鎖

緒　言

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。そのため、様々なアレルギー性疾患の病態の研究が行われ、治療法および診断法の開発が試みられている。

アレルギー症状を示す患者の血液に含まれる原因抗原の抽出液に対する特異的な抗体（特異的 IgE 抗体）を定量する検査により、原因抗原に対する感作の判断が行われている。しかし、アレルギー症状のない患者に対しても血中に特異的 IgE 抗体が検出されることが多く、IgE 抗体をもつこととアレルギー症状を発症することは必ずしも一致しない。また、総タンパク質に対する血中における IgE 抗体の量と症状の重篤度についても相関しないことが、この検査法の問題点となっている。

IgE 抗体が抗原と結合し、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す。IgE 抗体に結合している糖鎖の中には、糖鎖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、その役割については長年不明であった。最近、IgE 抗体における糖鎖に付加す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［1～5］。このような IgE 抗体の糖鎖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

1. シアル酸結合 IgE 抗体発現用ベクターの設計

定常領域のみに対するヒト IgE 抗体の発現用ベクターである pVITRO1-dV-IgE/κ を入手した［6］。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た［7］。プライマーによる PCR により定常領域を発現するベクターに対する遺伝子および可変領域をコードする遺伝子を増幅した。それら 4 つの遺伝子断片を混合し、HiFi DNA assembly Master mix を等量加えて反応させた。大腸菌に形質転換後に、ハイグロマイシンを添加した LB プレートで選抜した。PCR、制限酵素処理により予備的に目的の発現ベクターについて確認後、シーケンスにより、作製した発現ベクターの可変領域の配列を確認した。PureLink Hipure Plasmid DNA purification kit を用いてプラスミドを調製した。

2. シアル酸結合 IgE 抗体の発現

HEK ヒト培養細胞を Expi293 Expression Medium を用いてフラスコ中で 125 rpm、37℃、8% CO_2の条件で旋回培養を行った。培養後、3～7 日目に細胞数及び生存率を確認し、3～5×10^6cells/ml および>90% viability の状態まで培養後に 1／10 量を用いて 3 回以上継代を行い、抗体の発現に使用した。精製したプラスミドを ExpiFectamine と複合体を形成させ、細胞に導入した。翌日エンハンサーを添加した後、4～6 日後に細胞および上清を回収した。

3. シアル酸結合 IgE 抗体の分画

培養時の上清を濃縮し、滅菌ろ過を行った。クロマトグラフィーシステム Akta pure L1（Cytiva）を用いて、Superdex200 Increase 10/300GL　カラムにより、上清を分画した。

4. シアル酸結合単鎖可変領域フラグメントの発現と精製

ニワトリ抗体ライブラリーからのファージディスプレイによりシアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントの遺伝子配列に対して［8]、大腸菌発現系を構築した。pET52 および pMAL ベクターを用いた発現ベクターを構築した。大腸菌 BL21（DE3）に形質転換し、isopropyl β-D-thiogalactopyranoside により発現を誘導した。

5. シアル酸結合単鎖可変領域フラグメントの予想構造モデル

Alpha-fold2 を用いて、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。

結　果

1.　組換え型 IgE 抗体の発現

カバノキ花粉の抗原である Bet v 1 に対する組換え型 IgE 抗体のための発現ベクターを構築し、HEK ヒト培養細胞で発現させた。感染後 4～6 日後の培地を回収し、SDS-PAGE を行った。還元剤であるメルカプトエタノールの添加および非添加の条件において、複数のバンドが検出された。さらに、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、HRP 結合させた抗ヒト IgE 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 1A)。還元剤であるメルカプトエタノールを添加した条件においてバンドが検出された。

2.　組換え型 IgE 抗体の複合糖鎖の検出

ヒト培養細胞を用いて作製した IgE 抗体において複合糖鎖が結合するかを検証するために、レクチンである SiaFind Lectenz を用いた。SiaFind Lectenz はシミュレーションにより開発された人工タンパク質であり、シアル酸を特異的に検出するレクチン様糖鎖結合タンパク質である。ニトロセルロース膜に転写したタンパク質に対して SiaFind Lectenz で処理し、結合させたヒスチジンタグを検出するために抗ヒスチジンタグ抗体で処理した。さらに、HRP 結合抗マウス IgG 抗体で SiaFind Lectenz を検出した。いくつかのバンドが明確に発色するとともに、抗体の分子量のサイズである高分子領域も発色した（図 1B)。

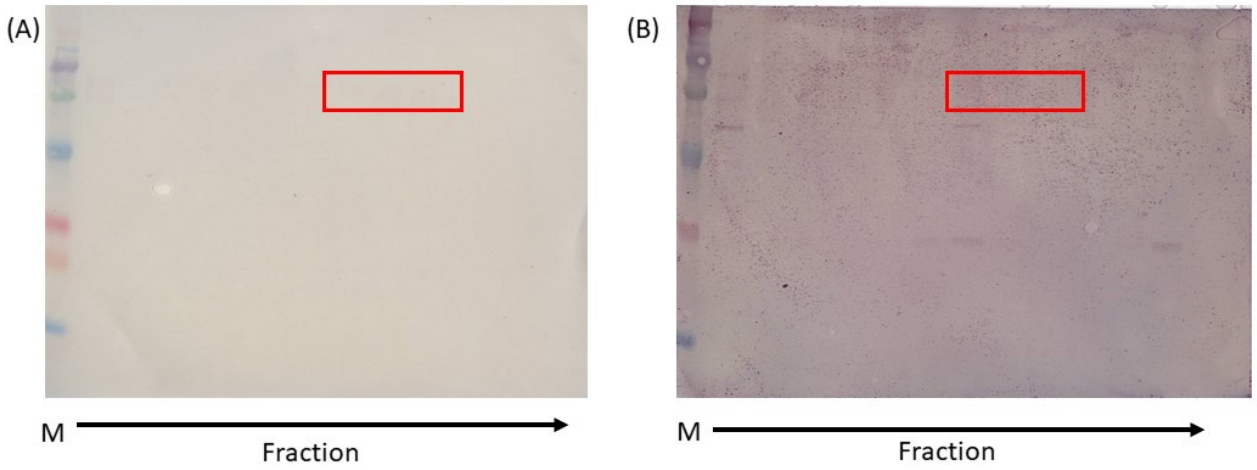


図 1.　組換え型 IgE 抗体の複合糖鎖の検出

A)　抗 IgE 抗体による検出。

B)　レクチンによる検出。

赤枠は組換え型 IgE 抗体と予想される領域。

3. 組換え型単鎖可変領域フラグメントの作製

シアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントにタグを付加し 2 種類の大腸菌発現用ベクターを構築した。まず、pET ベクターを用いて発現を試みたが、タグに対するアフィニティークロマトグラフィーにより単鎖可変領域フラグメントは精製できなかった。次に、MBP 融合タンパク質として単鎖可変領域フラグメントを発現させた。MBP を融合した単鎖可変領域フラグメントの発現を確認し、MBP を結合するアフィニティーカラムに結合し、マルトースにより競合的に溶出させた（図 2A）。その画分について、ゲルろ過クロマトグラフィーなどにより、精製を試みた（図 2B）。

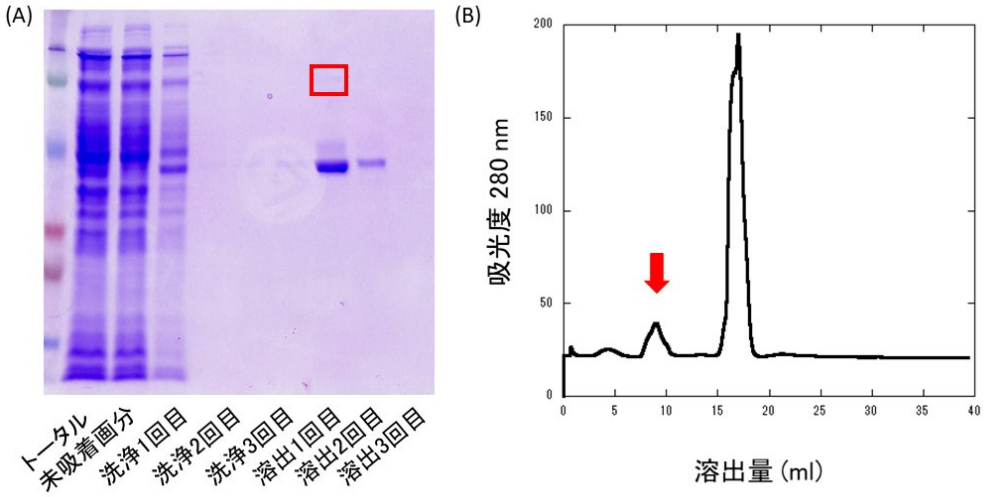


図 2. 組換え型単鎖可変領域フラグメントの精製

A) MBP に対するアフィニティークロマトグラフィーによる精製（赤枠が融合タンパク質を示すバンド）。

B) アフィニティークロマトグラフィーの溶出画分の精製（赤矢印が融合タンパク質の溶出を示す）。

4. 単鎖可変領域フラグメントの予測構造

シアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントの構造の予測を行った。重鎖（H）および軽鎖（L）に由来する相補性決定領域（CDR1～3）の部位が予測された。HCDR3、LCDR3、HCDR2 により、抗原との相互作用部位が形成されると推定された（図 3）。

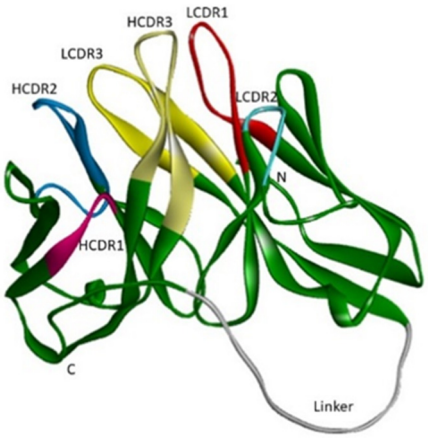


図 3. シアル酸に対する単鎖可変領域フラグメント

考　察

本研究では、アレルギー症状への寄与が示唆されている IgE 抗体に結合するシアル酸に対する小型抗体の作製を試みた。発現タンパク質については部分精製までしか行うことができなかったが、様々なタイプのシアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントあるいはナノボディーを探索することにより、アレルギーの診断ツールに利用可能と考えている。構造予測したデータについても糖鎖との複合体について解析することにより、様々なシアル酸に結合する単鎖可変領域フラグメントあるいはナノボディーを設計できる可能性がある。また、ヒト化ラット好塩基球白血病細胞を用いて、患者血清中の抗原特異的 IgE 抗体と抗原との反応を解析できるレポーターアッセイが報告されている［9, 10］。このようなシステムと本研究のツールを組み合わせることにより、IgE 抗体に結合するシアル酸の役割を明確にすることも可能となるであろう。このような研究がアレルギーの新たな診断法の開発に寄与することが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野で実施されたものである。本研究の遂行にあたり、ご協力賜った研究室のメンバーに感謝する。

文　献

1） Kai-Ting C Shade, Michelle E Conroy, Nathaniel Washburn, Maya Kitaoka, Daniel J Huynh, Emma Laprise, Sarita U Patil, Wayne G Shreffler, Robert M Anthony. Sialylation of immunoglobulin E is a determinant of allergic pathogenicity. Nature. 2020 Jun;582(7811):265-270. doi: 10.1038/s41586-020-2311-z. Epub 2020 May 20. PMID: 32499653

2） Markus M Xie, Carolyn R Bertozzi, Taia T Wang. Immunoglobulin E sialylation regulates allergic responses. Immunol Cell Biol. 2020 Sep;98(8):617-619. doi: 10.1111/imcb.12368. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32632971

3） Beatriz Moya, Chiara Tontini, Alexandra Santos. IgE sialylation: Unravelling a key anaphylactic mediator. Allergy. 2021 May;76(5):1598-1600. doi: 10.1111/all.14649. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33147354

4） Vattepu R, Sneed SL, Anthony RM. Sialylation as an Important Regulator of Antibody Function. Front Immunol. 2022 Apr 7;13:818736. doi: 10.3389/fimmu.2022.818736. eCollection 2022. PMID: 35464485

5） Alexandra Flemming. Does IgE sialylation hold the key to allergy? Nat Rev Immunol. 2020 Jul;20(7):408-409. doi: 10.1038/s41577-020-0364-8. PMID: 32514034

6） Dodev TS, Karagiannis P, Gilbert AE, Josephs DH, Bowen H, James LK, Bax HJ, Beavil R, Pang MO, Gould HJ, Karagiannis SN, Beavil AJ. A tool kit for rapid cloning and expression of recombinant antibodies. Sci Rep. 2014 Jul 30;4:5885 doi: 10.1038/srep05885.

7） M Levin, A M Davies, M Liljekvist, F Carlsson, H J Gould, B J Sutton, M Ohlin. Human IgE against the major allergen Bet v 1--defining an epitope with limited cross-reactivity between different PR-10 family proteins. Clin Exp Allergy. 2014 Feb;44(2):288-99. doi: 10.1111/cea.12230.

8） Han Wang, Zong-Cheng Wu, Pan Hu, Hong-Lin Ren, Yan-Song Li, Yu Zheng, Cong Wang, Zeng-Shan Liu, Shi-Ying Lu. Identification of chicken-derived scFv against N-glycolylneuraminic acid retrieved from an immune library by phage display. Protein Expr Purif. 2021; 182:105841. doi: 10.1016/j.pep.2021.105841.

9） Wan D, Wang X, Nakamura R, Alcocer MJC, Falcone FH. Use of Humanized RBL Reporter Systems for the Detection of Allergen-Specific IgE Sensitization in Human Serum. Methods Mol Biol. 2020;2163:145-153. doi: 10.1007/978-1-0716-0696-4_11.

10) Nafal J S Barwary, Daniel Wan, Franco H Falcone. NPY-mRFP Rat Basophilic Leukemia (RBL) Reporter: A Novel, Fast Reporter of Basophil/Mast Cell Degranulation. Methods Mol Biol. 2020;2163:163-170. doi: 10.1007/978-1-0716-0696-4_13.