

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：26401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00833

研究課題名(和文)新規卵白アレルゲンL-PGDSの高感度定量法の開発と低アレルゲン化

研究課題名(英文)Development of ICT EIA to determine egg white allergen, L-PGDS aiming at reducing allergenicity.

研究代表者

鈴木 麻希子 (Suzuki, Makiko)

高知県立大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：60437001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵白アレルゲンであるLipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) を定量するため、高感度な免疫複合体転移測定法(ICT EIA法)を開発した。組換え型L-PGDSを標準としたICT EIA法の検出感度は0.01 ng/mlであり、従来法の2,000倍高感度であった。卵白たんぱく質粗抽出液の測定では、阻害物質の存在が示唆され、複合体解析を行った結果、L-PGDSがオボアルブミンと結合していることが明らかになった。硫酸沈殿により分画した卵白たんぱく質(0.6～6 μg/ml)をICT-EIA法に用いると、濃度依存的な蛍光強度の増加が観られた。

研究成果の概要(英文)： We developed a sensitive Immune Complex Transfer Enzyme Immunoassay (ICT EIA) that enables us to measure levels of Egg white allergen, lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS). The detection limit of this assay is 0.01 ng/ml, when we used recombinant L-PGDS as standards. This sensitivity is higher 2000-fold than ELISA which we have developed previously. However, we observed inhibitors against this assay in egg white. To identify this inhibitors, we analyzed L-PGDS complex. Our data shows that L-PGDS bind to ovalbumin. When we used 90% Ammonium sulfate fraction of egg white for determine L-PGDS in egg white by ICT EIA, the fluorescence intensity was dependent of egg white protein within 0.6～6 μg/ml.

研究分野：病態分子栄養

キーワード：卵白アレルゲン L-PGDS ICT EIA

1. 研究開始当初の背景

我々は鶏卵白中に患者血清 IgE 抗体と反応する新規なタンパク質として、lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) を同定した (Suzuki M et al. *Allergol Int*, 2010, 59, 175-183.)。さらに、通常はオボアルブミン (OVA) とアジュバントを腹腔投与して感作した後、微量の OVA を経口投与すると、免疫寛容が起こるが、微量 OVA と同時に L-PGDS を経口投与すると免疫寛容が抑制されることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究においては、我々が作製した鶏 L-PGDS に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を改良して、高感度免疫測定法の開発を行い、鶏卵中の L-PGDS 含量をコントロールする方法の提案へと繋げる。

3. 研究の方法

(1) モノクローナル抗体の調製

Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) に対する 4 種のモノクローナル抗体 (5E, 3B, 2A, 12F) ペプシン処理を予備的に行い、ウルトロゲルにて Fab' を精製した。

BALB/c マウス (雄, 6 週齢) にプリスタン を 1 頭当たり 0.5 ml 腹腔投与し、6~11 日後にハイブリドーマ (5E または 3B) を 1 頭当たり 2×10^6 cells 腹腔投与した。その後マウスの様子を観察しながら、腹水を採取した。採取した腹水を遠心 (3000 rpm, 4, 15 min) し、血球やプリスタンを取り除いた。

mAb の精製はアフィゲル Protein A MAPS-II キットを用いて行った。得られた mAb を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で一晚透析し、2 種の鶏 L-PGDS に対する mAb (5E, 3B) を精製した。得られた mAb は -25 で保存した。それぞれの抗体にペプシン処理を行い、ウルトロゲルにて Fab' を精製した。抗 L-PGDS Fab' (5E) をガラクトシダーゼで標識し、抗 L-PGDS Fab' (3B) については、DNP 化、ビオチン化を行った。

(2) 卵白の分画

卵白に 3 倍量の 10 mM PBS, pH6.8 を加えて 4 で 30 分間攪拌し、冷却遠心機を用いて 14000 rpm, 4 で 20 分間の条件で遠心分離後、上清を採取し、卵白たんぱく質粗抽出液とした。4 で混和しながらこの上清に 70 %、または 90 % 飽和硫酸となるように硫酸アンモニウムを加え、同様の条件で遠心を行い、その沈殿を PBS (pH 6.8) 15 ml で溶解し、一晚 PBS (pH 6.8) で透析を行った。また上清も同様に透析を行った。採取した上清はその後、PBS と共に限外濾過用チューブに添加し、冷却遠心機を用いて 4000 rpm, 10 で 250 μ l 程度になるまで遠心させた。

(3) タンパク定量

タンパク定量は標準たんぱく質として BSA を用い、Pierce BCA Protein Assay Kit のプロトコールに従って測定した。

(4) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli の方法に従って、タンパク質試料に等量の SDS-PAGE 用の sample buffer を添加し、100 で 5 分間加熱後、12% または 13% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。

(5) ウェスタンブロット

卵白たんぱく質粗抽出液を 13% ポリアクリルアミドゲルに 20 μ g/lane となるように添加し、電気泳動を行った。SDS-PAGE により分離した後、Towbin らの方法に従ってゲル状のたんぱく質をニトロセルロース膜に電気的に転写した。転写膜をボンソー染色液 (0.1% Ponceau S/1% 酢酸) にて 5 分間染色した後、1% 酢酸で脱色し、たんぱく質バンドを検出した。次いで 10 mM NaOH でたんぱく質バンドの脱色を行い、さらに 150 mM NaCl および 0.05% Tween 20 を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH7.3 (TBS/Tween) で揺らしながら 5 分 \times 3 回洗浄した。次に TBS/Tween (ブロッキング液) を含む 1 % BSA により室温で 60 分間ブロッキングを行った。続いてブロッキング液で mAb - 5E, 3B をそれぞれ 2 μ g/ml になるように希釈し、4 で一晚反応を行った。翌日 TBS/Tween で 5 分 \times 3 回洗浄し、二次抗体として、ブロッキング液で 3000 倍に希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体を添加し、室温で 60 分間反応させた。その後 TBS/Tween で 5 分 \times 4 回洗浄し、Peroxidase Stain Kit for Immuno-blotting を用いて発色法による検出を行った。20 分間反応させ、免疫複合体を検出し、その後、蒸留水で 5 分 \times 4 回洗浄し、反応を停止させた。

免疫沈降の分析には、10% ポリアクリルアミドゲルを用い、10 μ l/lane で添加した。ビオチン標識抗 L-PGDS 抗体 (3B) は、1 μ g/ml で用いた。また、ビオチン標識抗オボトランスフェリン抗体 (biorbyt) は、3000 倍希釈で用いられた。Streptavidin Peroxidase (KPL) は 10000 倍希釈で用いられた。抗オボアルブミン抗体は (森永生科学研究所) の FASPEK エライザ 卵 (卵白アルブミン) に付属の酵素標識抗体をそのまま用いた。

(6) ELISA

10 mM リン酸緩衝液 (PBS), pH7.2 で 1 mg/ml に希釈した anti L-PGDS monoclonal antibody 50 μ l を 96 穴マイクロプレートの各ウェルへ添加し、4 で一晚静置することにより固相化を行った。ウェル内の液を除き、150 nM NaCl および 0.05 % Tween20 を含むリン酸緩衝液 (PBS/Tween) pH 7.4 で 3 回洗浄後、PBS/Tween に 1 % 牛血清アルブミ

ンを溶解した液（ブロッキング液）を各ウェルに 300 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間 30 分ブロッキングを行った。次いで、ウェル内の液を除去後、PBS/Tween で 3 回洗浄し、rL-PGDS (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/ml) または試料（タンパク質濃度 8 mg/ml）を 1 ウェルあたり 50 μ l 添加して、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間反応させた。ウェル内の液を除去後、PBS/Tween で 3 回洗浄し、二次抗体として、ブロッキング液で 1 mg/ml に希釈した Biotinylated anti L-PGDS monoclonal antibody を 50 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間反応させた。ウェル内の液を除去後、PBS/Tween で 3 回洗浄し、ブロッキング液で 10000 倍希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを 50 μ l ずつ添加し、室温にて 30 分反応させた。PBS/Tween で 5 回洗浄後、4 mM フェニレンジアミンおよび 0.01 % H_2O_2 を含む基質溶液を 50 μ l 添加し、室温にて反応を行った。2M H_2SO_4 を 50 μ l 添加して反応停止後、波長 490 nm における吸光度を測定した。5E または 3B または 12F を固相化抗体として用い、ビオチン標識抗体としては 3B または 5E を用いた。

(7) ICT EIA

β -D ガラクトシダーゼ標識した L-PGDS Fab' (5E)、ジニトロフェニル (DNP) 化ビオチン化 L-PGDS Fab' (3B) をそれぞれ 30fmol、10fmol になるように 0.1 M NaCl、1 mM $MgCl_2$ 、0.1 % BSA を含む 10 mM PBS、pH 7.0 (Buffer A) で希釈し、100 μ l ずつガラス試験管に添加した。そこに Buffer A で希釈した L-PGDS (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 ng/ml) または卵白たんぱく粗抽出液またはその分画を 100 μ l ずつ添加した。なお、日差再現性の検討では 3 ng/ml の L-PGDS を用いた。添加回収試験では、10 ng/ml の L-PGDS を 5 μ l 用いた。4 $^{\circ}$ C で 16 時間静置した後、抗 DNP 抗体固相化ビーズを加え、Bio-Shaker を用いて 25、210 strokes/分 で 30 分間振盪した。ビーズを洗浄後、2 mM DNP-リジン/Buffer A を 150 μ l ずつ添加した別の試験管に移し、25、210 strokes/分 で 30 分間振盪した。次いで、試験管からビーズを除き、ストレプトアビジン固相化ビーズを加え、25、210 strokes/分 で 30 分間振盪した。その後、0.01 % BSA を含む Buffer A を 200 μ l ずつ添加した別の試験管にビーズを移し、0.2 mM 4-メチルウンベリフェニル β -D-ガラクトピラノシド (4MUG) を 200 μ l ずつ添加して、30 $^{\circ}$ C で 20 時間反応を行った。0.1 M Gly-NaOH pH 10.3 を 2 ml 添加して反応停止した後、励起波長 390 nm 蛍光波長 490 nm における蛍光強度を、分光蛍光光度計を用いて測定した。

(8) blue native / SDS-PAGE

NativePAGE™ 4-16 % Bis-Tris Gel を、

Mini Gel Tank にセットし、陽極側にあらかじめ冷やしておいた Anode Buffer (2.5 mM Bis-Tris, 2.5 mM Tricine)、陰極側に Dark Blue Cathode Buffer (2.5 mM Bis-Tris, 2.5 mM Tricine, 0.0002 % CBB G-250) を注いだ。卵白たんぱく質粗抽出液 40 μ g/lane をゲルに添加した。4 $^{\circ}$ C でゲルの 1/3 から 1/2 程度まで泳動を行った。Dark Blue Cathode Buffer を Light Blue Cathode Buffer (2.5 mM Bis-Tris, 2.5 mM Tricine, 0.00002 % CBB G-250) に交換し、4 $^{\circ}$ C にて約 45 分泳動を行った。泳動後のゲルを 1 レーンごとに切り出して SDS-PAGE 用の 1 \times Sample buffer に浸し、10 分間振盪した後、500 W の電子レンジで 20 秒間、50 $^{\circ}$ C で 20 分間加熱し、クエンチ溶液 (1 \times Running Buffer : 99.5 % Ethanol = 4 : 1) に移して 15 分間振盪した。そのゲルを、SDS-PAGE のゲルの上に乗せ、12 % ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、ウエスタンブロットを行った。

(9) 免疫沈降

SureBeads ProteinG 磁気ビーズ (Bio-rad) 27.5 μ l を PBS で洗浄し、PBS で 0.5 mg/ml に希釈した卵白たんぱく質粗抽出液 1200 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間、転倒混和を行った。その後、上清 1100 μ l に、PBS で 0.4 mg/ml に希釈した抗 L-PGDS 抗体を添加して、4 $^{\circ}$ C で一晩、転倒混和を行い、免疫複合体を形成させた。翌日、新たに SureBeads ProteinG 磁気ビーズ 25 μ l を PBS で洗浄し、形成された免疫複合体を含む溶液 1000 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 3 時間反応を行った。PBS で 4 回洗浄し、2 \times Sample buffer 25 μ l を加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱して免疫沈降を溶出した。溶出液に等量の PBS を加えてウエスタンブロットに用いた。

4. 研究成果

(1) 抗 L-PGDS 抗体 (5E, 3B, 2A, 12F) のペプシン処理

2A, 12F は Fab' が分解されてしまい、ICT EIA 法にそのまま用いること困難であった。そこで、5E, 3B の大量調製を行うこととした。抗 L-PGDS 抗体 5E, 3B をそれぞれペプシン処理し、それぞれ抗 L-PGDS Fab' (5E)-Gal, 抗 L-PGDS Fab' (3B)-DNP-Bio を得た。

(2) ICT EIA 法の同時再現性、日差再現性 同時再現性は、6.9% と良好な結果となり、日差再現性は 11.1% という結果であった (Table 1)

Table 1

	回数	平均値	CV (%)
同時再現性	n = 10	183.8	6.9
日差再現性	n = 5	163.3	11.1

(3) ELISA 法と ICT EIA 法の感度比較
 既報の 50 ng/ml ~ 160 ng/ml よりも高くなり 20 ng/ml ~ 100 ng/ml となった。一方、ICT EIA 法では 0.01 ng/ml ~ 10 ng/ml と高く、ELISA 法と比較すると 2000 倍となった (Fig.1)。モル濃度で示すと 4.8 fM ~ 4.8 pM となり、検出限界は 50 amol/assay となることから、期待された感度が得られたことが明らかとなった。

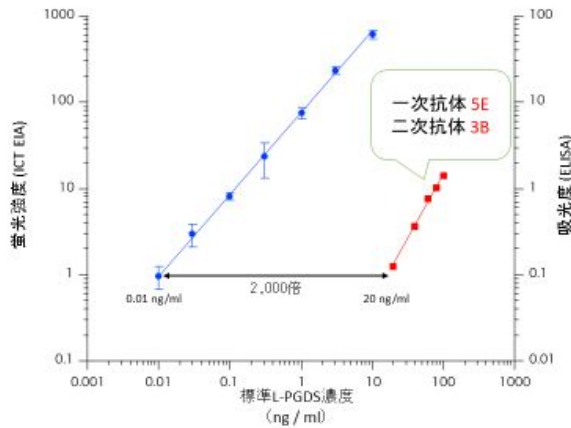


Fig.1 ELISA 法と ICT EIA 法の感度比較

(4) 卵白中 L-PGDS の定量

PBS によりたんぱく質を抽出した卵白たんぱく質粗抽出液を用いて ICT EIA 法による定量を試みた。しかしながら、濃度依存的な蛍光強度の上昇が観られず、なんらかの阻害物質の存在が示唆された。

(5) 卵白中 L-PGDS の分画

卵白中の L-PGDS の定量を行うにあたり、ELISA 法との比較を考慮しての他に、粗抽出液に硫酸アンモニウムを加えてたんぱく質を沈殿させ再度 PBS に溶解し、透析した画分を得た。70%飽和硫酸沈殿では、沈殿のみならず、上清にも L-PGDS の存在が確認されたが、90%飽和硫酸沈殿では、完全に沈殿することが確認された (Fig. 2)。

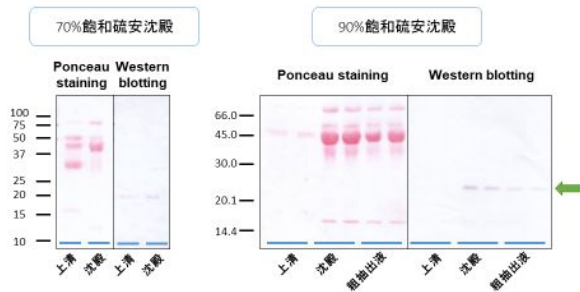


Fig. 2 硫酸沈殿による分画

(6) blue native/SDS-PAGE による L-PGDS の複合体解析

卵白たんぱく質粗抽出液を blue native/SDS-PAGE で分離した後に抗 L-PGDS 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果では、本来の分子量と異なる分子量 76 kDa 付近に反応が観られた。一部の L-PGDS が複合体を形成したまま分離されている可能性が考えられた (Fig. 3)。これは、blue native-PAGE から SDS-PAGE へと二次元電気泳動を行う場合、SDS-PAGE 単独の電気泳動を行うのとは違い、高温・加熱処理ができず、還元が不十分で、複合体を形成したまま検出された可能性が考えられた。そこで、免疫沈降による複合体解析を行った。

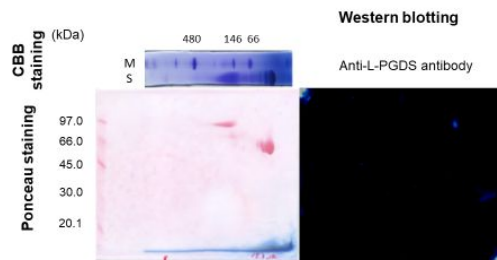


Fig. 3 卵白たんぱく質の blue native/SDS-PAGE

(7) 免疫沈降による L-PGDS の複合体解析

鶏 L-PGDS に対する 4 種のモノクローナル抗体 (5E、3B、2A、12F) は、いずれも免疫沈降に用いることができることが明らかとなった (Fig. 4)。

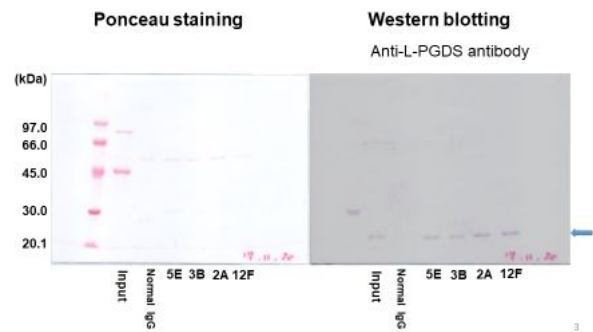


Fig. 4 抗 L-PGDS 抗体による卵白たんぱく質の免疫沈降

免疫沈降により精製した L-PGDS 複合体をウエスタンブロットで解析した結果、L-PGDS はオボトランスフェリンとは結合せず、その一部はオボアルブミンと結合することが明らかとなった。しかしながら、免疫沈降に用いる抗 L-PGDS 抗体によって精製される L-PGDS の量や、複合体組成に差異が観られた。この原因として、抗体のエピトープが異なることが考えられる。先行研究により、2A、12Fの方が5E、3Bより親和定数がやや小さいことが明らかとなっていることから、より多くの L-PGDS が得られたと考えられる。実際、免疫沈降された L-PGDS 量は、2A、12Fの方が5E、3Bよりも多かった。5E、

3Bで免疫沈降を行ったものではL-PGDSの結合量が少ないにも拘わらず、5E、3B、2AではオボアルブミンとL-PGDSが結合していることが示唆され、12Fではその結合は見られなかった。この複合体組成の違いは、L-PGDSが複数の複合体を形成しており、そのコンフォメーションの違いと抗体のエピトープの違いから、抗L-PGDS抗体の結合した複合体が異なっていることが考えられる。

(8) 添加回収試験

90%飽和硫酸沈殿による分画を用いて、卵白たんぱく質濃度が0.6 µg/ml (10000倍希釈) ~ 6 µg/ml (100000倍希釈)の範囲であれば、添加したL-PGDS (10 ng/ml)の回収率は100%となり、濃度依存的な測定が可能となることが明らかとなった (Fig. 5)。

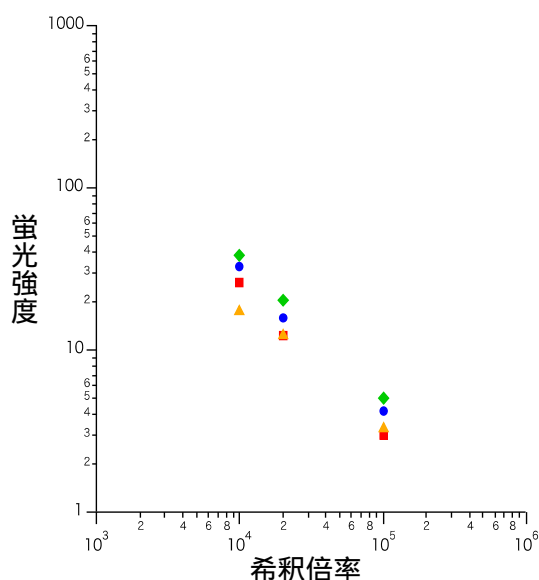


Fig.5 硫酸沈殿後の卵白たんぱく質を用いたL-PGDSの添加回収試験

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

沼田聡, 石田千佳, 井原未紗子, 竹馬明美, 田中守, 鈴木麻希子
卵白アレルギー L-PGDS に対する高感度酵素免疫測定法の開発と阻害物質の解析, 第72回日本栄養・食糧学会, 2018.5.11-13, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市), 岡山県立大学 (岡山県総社市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 麻希子 (SUZUKI, Makiko)
高知県立大学・健康栄養学部・准教授
研究者番号 : 60437001

(2) 研究分担者

沼田 聡 (NUMATA, Satoshi)
高知県立大学・健康栄養学部・助教
研究者番号 : 10565857

田中 守 (TANAKA, Mamoru)
高知県立大学・健康栄養学部・助教
研究者番号 : 00612350