

Figure 5 各種HWPsのサイズ排除クロマトグラム

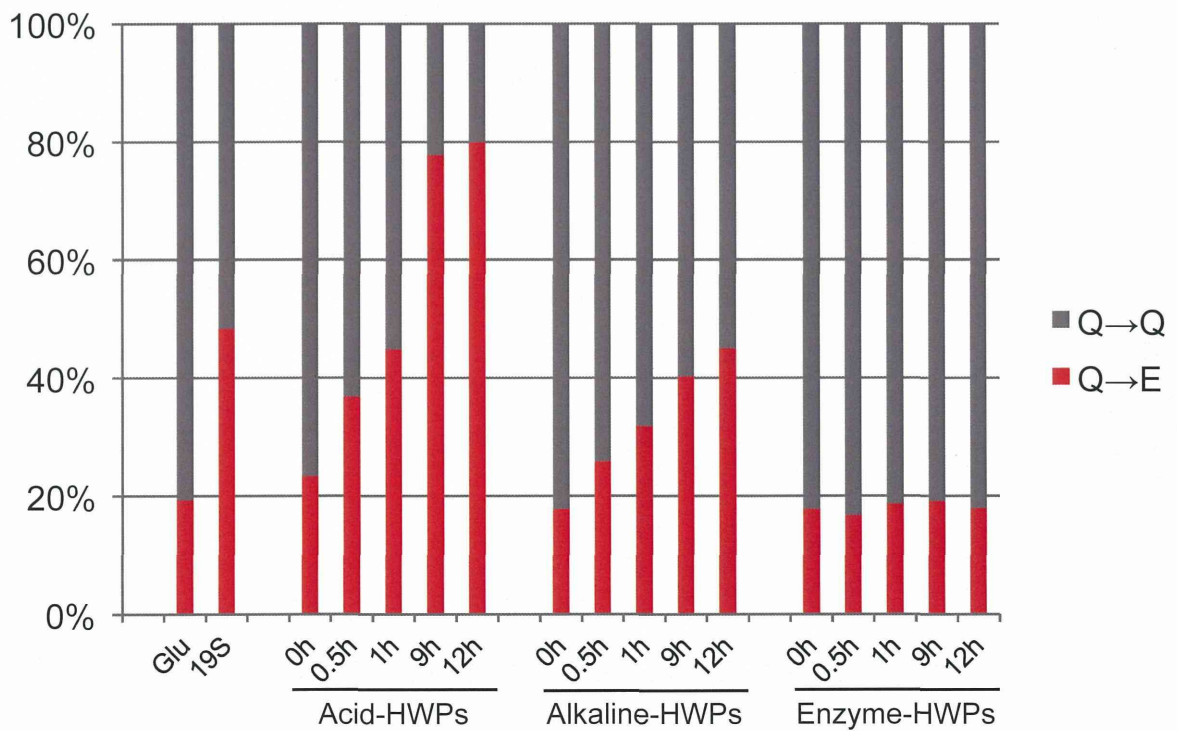


Figure 6 各種HWPsにおける検出ペプチド中のグルタミンの脱アミド化率

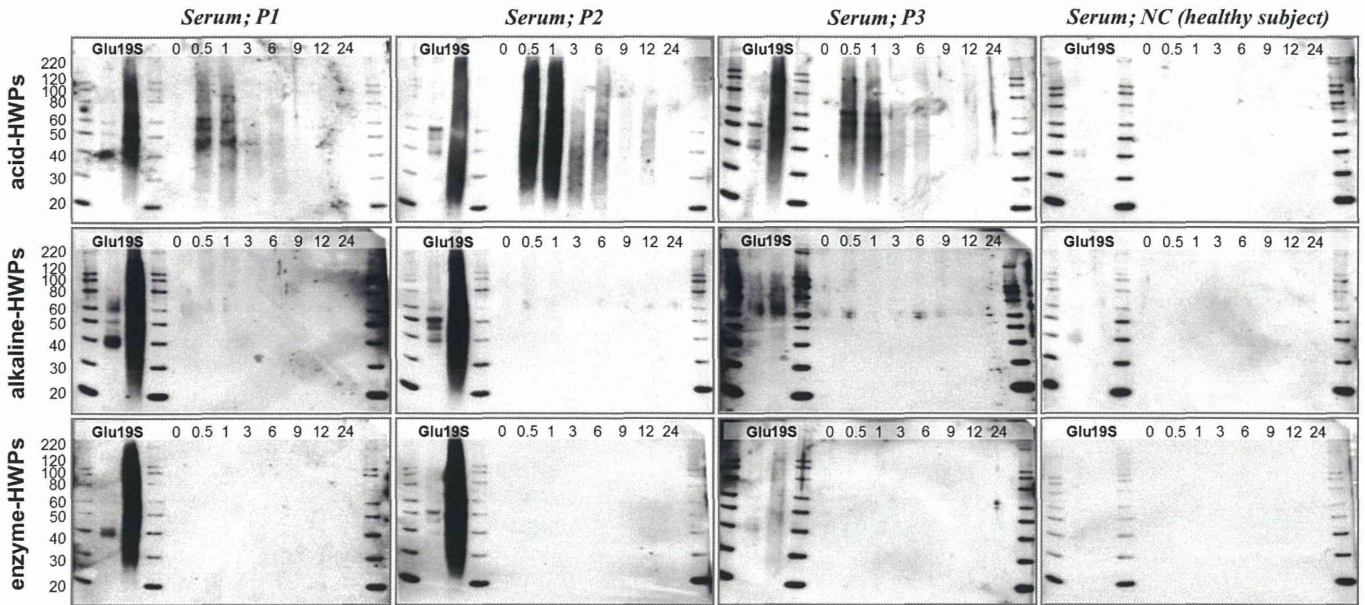


Figure 7 茶のしずく石鹼患者血清を用いたウェスタンブロッティング

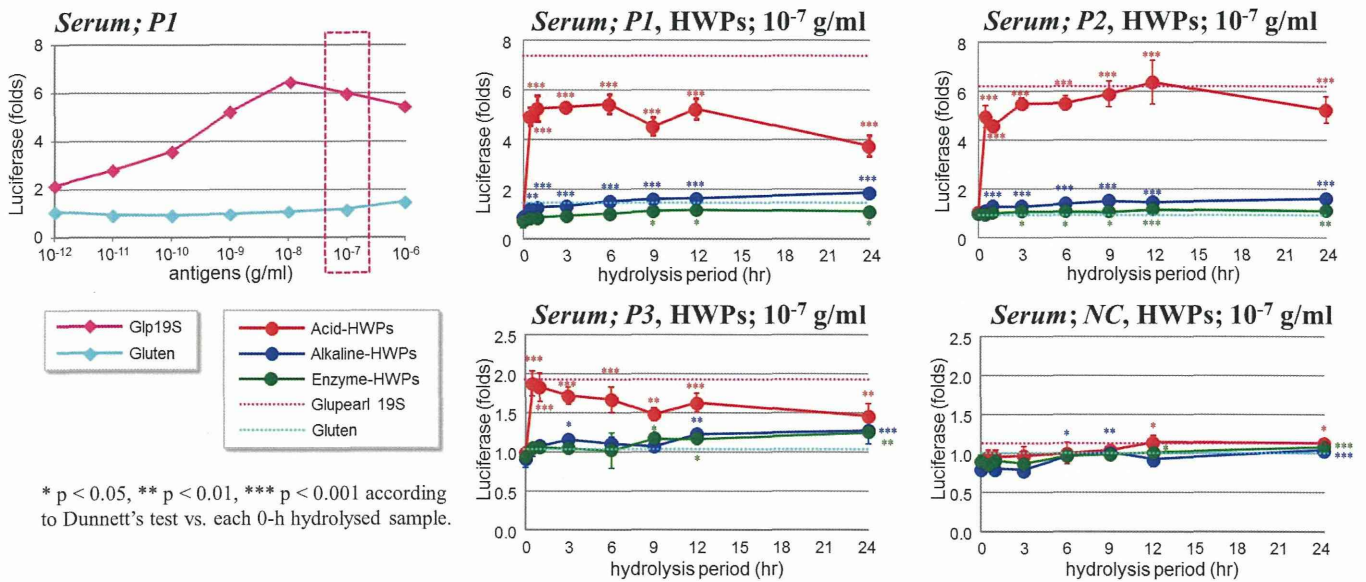


Figure 8 茶のしずく石鹼患者血清を用いた各種HWPのEXiLE応答パターン

(医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析)

研究分担者 伊東祐二 鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻

研究要旨

茶のしずく小麦アレルギーの原因と考えられる IgE 抗体の特性解析を行うため、患者 IgE 由来の単鎖 Fv 抗体ライブラリから、グルテンならびにグルパール 19S に対する特異抗体の単離を、バイオパンニングと次世代シーケンサーを組み合わせた方法により試みた結果、主としてグルテンに対する複数種の抗体ファージの取得に成功した。これらの大腸菌並びにグラム陽性菌 *Brevibacillus brevis* による単鎖 Fv 抗体の発現を行い、抗原特異性、エピトープ解析を行った結果、これらの抗体のいくつかは、グルテンに対する結合活性を維持しながらも、抗体ファージでは見られなかったグルパールに対する結合活性を上昇させていた。これらの結果は、茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者由来の IgE 抗体クローンの中に、グルテンとグルパールに交差結合活性を示す抗体が存在することを明らかにしており、このような交差反応性を示す抗体による小麦アレルギー発症の機構が推定された。

A. 研究目的

本研究の目的は、医薬部外品・化粧品に含まれる様々な工業添加物によるアレルギーの発症原因の解明に向け、アレルギー患者から原因となる抗体を単離し、その特異性や性質を決定することで、アレルギー反応に関わる物質の網羅的抗原性の解析を行うことである。このような、疾患の直接的原因となる抗体クローンの解析は、本研究で用いる抗体ファージライブラリー技術によって初めて可能であり、より詳細な抗原性の解析が達成できる。

一昨年度において、茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者 13 名の中から、原因となるグルパール 19S に対する比較的高い IgE 抗体をもつ患者(患者 4 と患者 12)を選択し、抗体ライブラリーを構築した。昨年度、このライブラリーを使った、グルテン並びにグルパール 19S に対するバイオパンニングを行い、パンニング後の通常のクローン化並びに ELISA スクリー

ニングによって 3 種のグルテンに対する特異的クローンファージの単離に成功したが、更に、広く特異的抗体配列を得るため、本年度は、次世代シーケンサーを用いた配列解析を導入することによって、新たな特異的 IgE 抗体の単離を進め、得られた抗体の配列並びに抗原との結合特性から、茶のしずく小麦アレルギーの原因と考えられる加水分解小麦に対する IgE 抗体の生成機構に関する考察を行った。

B. 研究方法

生体サンプルと生体材料、患者血漿を用いた ELISA 測定、IgE 抗体ファージライブラリーの作製、バイオパンニングによる抗体クローンの単離については、平成 24、25 年度の報告書に記載した方法に従って行った。

次世代シーケンサーによる IgE 抗体の VH 領域の網羅的配列解析 構築した IgE 抗体ライブラリーあるいはバイオパンニング後の抗体ライブラリーからファージミド DNA を精製し、

これを鋳型に VH 特異的 5' 並びに 3' プライマーを用いて、VH 遺伝子を増幅した (図 1 A)。これを用いた次世代シーケンサー (NGS) 用のサンプル調製は、基本的に TruSeq™ DNA Sample Preparation v2 (Illumina) のプロトコールに従って行った。増幅した PCR 産物の両端に、index 並びに P5 ならびに P7 アダプター配列を付加するための PCR を行い、さらにインデックス配列を付加した P5 並びに P7 配列を付加するための PCR を行った。解析は、次世代 DNA シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて行った。P5 並びに P7 側から読まれたシーケンサーデータは、CLC Genomics Workbench ver5 (CLC Bio) ソフトウェア上の "Merge Overlapping Pairs" tool を使って連結し、全長の VH 遺伝子配列を決定した。

次世代シーケンサーによって得られた VH 配列を使った抗原特異的 VH 配列の特定解析
抗原特異的 VH 配列の特定のための解析は、ruby プログラム上で作成した自前のプログラムによって行った。すなわち、得られたすべての VH の DNA 配列をアミノ酸変換し、パンニング前後でのそれぞれの VH の配列の含有率 (出現頻度、%) を計算した。次にそれぞれの配列について、パンニングによる含有率の変化を調べ、パンニング前に対するパンニング後での出現頻度の増加率 (増幅倍率) を評価した。

アミノ酸配列に基づいた分子系統樹の作成は以下の方法で行った。増幅倍率が 2.5 倍以上の配列を選択し、Genetyx ソフトウェア上で、ClustalW プログラムにより配列アラインメントを行い、アラインメントデータをもとに Neighbor-joining 法を使って分子系統樹を作成した。

次世代シーケンサーによる得られた IgE 抗体の VH の配列を持つ単鎖 Fv 遺伝子の単離

次世代シーケンサーによって得られた VH の配列を持つ単鎖 Fv 抗体遺伝子の再構築は、図 1 B に示したように、ファージミドベクター上の単

鎖 Fv 遺伝子をコードする領域の上流と下流のプライマーならびに VH の CDR3 に相補的な 2 本のプライマーを用い、VH の 5' 末端から VH の CDR3 までと、VH-CDR3 からリンカーと VL を含む単鎖 Fv 遺伝子のコード領域の下流の 3' 領域までを増幅し、得られた 2 つの DNA 断片を Over extension PCR にて連結することにより、完全長の単鎖 Fv 遺伝子を得た。

得られた遺伝子は、DNA シーケンサーによる配列解析を行った後、両端に付加された *Sfi* I、*Not* I の制限酵素サイトを使って再度ファージミドベクターに挿入後、大腸菌に感染、ヘルパーファージを重感染させることによって、単鎖 Fv 抗体提示ファージを調製した。

IgE の H ϵ 鎖遺伝子の確認解析

得られた単鎖 Fv の VH 遺伝子が、IgE 由来であることの確認するため、図 1 C に示した様に、IgE 重鎖 (H ϵ) 特異的なプライマーを用いて、患者由来の cDNA を鋳型にして、特異的な遺伝子が増幅するかどうかを確認した。まず、患者由来の cDNA を鋳型にして増幅した H ϵ の CH1 領域の特異的のプライマーと VH の上流プライマーで増幅した遺伝子プールを調製した。この遺伝子プールを鋳型にし、単離した抗体の VH の CDR3 に相補的なプライマーを使って PCR を行った後、0.7%アガロースゲル電気泳動を行った。

大腸菌での単鎖 Fv の発現と分画

得られた小麦タンパク質特異的単鎖 Fv を提示したファージクローンを *E.coli* HB2151 に感染させ、アンピシリンプレート上でコロニーを形成させた。選択したコロニーを 2TYAG (2% glucose, 100 μ g/mL ampicillin を含む) で一晚培養後、再度 100 倍に希釈して 2TYAG に加え、37 $^{\circ}$ C、1.5 時間、OD600=0.6~0.8 まで培養した。遠心後のペレットを、2TYAI (100 μ g/mL ampicillin と 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を含む 2TY 培地) で分散後、37 $^{\circ}$ C、16 時間で培養した。1,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5min で遠心後、上清 (supernatant) 画分を回収した。ペレット

を 1×TES (0.5 mM EDTA と 0.5 M sucrose を含む 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0) で分散させ、5 倍量の 0.2×TES を混合し、氷上で 30 分間静置した。18,000×g, 4 °C, 5min 遠心後、上清を回収してこれを periplasm 画分とした。1×PBS でペレットを溶き、95 °C の温浴で 5 分間ボイル後、18,000×g, 4 °C, 5min、遠心して上清を回収し、これを cytosolic 画分とした。回収した培養上清 (sup)、ペリプラズム空間 (peri)、細胞内 (cyto) 画分での発現をドットブロッキング後の抗 His タグ抗体による検出法にて検出した。

***Brevibacillus brevis* での単鎖 Fv の発現**

Brevibacillus brevis 発現ベクターである pBIC4 ベクター (ヒエダ醤油) に単鎖 Fv 遺伝子を PCR により増幅した。アガロースゲル電気泳動で確認後、PCR 産物を DNA 精製カラムを用いて精製した。次に、pBIC4 DNA と PCR 産物 (単鎖 Fv 遺伝子) をモル比で 1 : 2 になるように混合し、*Brevibacillus* Competent Cell (*Brevibacillus* Expression System、ヒエダ醤油) に形質転換後、1mL MT 培地を加え、37°C、120rpm、1 時間培養した。培養液を MTNm (10µg/mL neomycin を含む) プレートに播き、37°C で一晚培養した。

形成したコロニーを選択後、2SYNm (50µg/mL neomycin を含む 2SY 培地) あるいは TMNm (10µg/mL neomycin を含む TM 培地) 培地で、37°C、120rpm、64 時間培養した。この際、24 時間ごとにサンプリングし、5,000×g、5min 遠心分離後、上清画分を回収した。

C. 研究結果

加水分解小麦に対するアレルギー患者由来の抗体ライブラリーからの通常バイオパンニングによる抗体ファージの単離と結合特性 平成 24 年度の報告において、13 人の加水分解小麦 (グルパール 19S) を含む茶のしずく石鹸を使用したに小麦アレルギー症状をもつ患者の中から、グルテン (GT) 並びにグルパール 19S (GP) に対して

同等の反応を有する患者 P4 と、グルテンに対するよりもグルパール 19S に対して高い反応性を有する患者 P12 を選択し、これらの患者の遺伝子ソースを用いた、IgE 由来の単鎖 Fv 抗体ライブラリーを構築した。昨年度では、患者 P4 由来のライブラリーを使って、GP (グルパール 19S) に対するバイオパンニングを行うことにより、2 種類の特異的なクローン B9 と G7 を得た。本年度では、図 2C-E に示したように、さらにバイオパンニングを進めた結果、図 3 に示したように、昨年度の患者 P4 由来の抗体ライブラリーからの GP に対するバイオパンニングによる 2 クローン (P4-GP-B9 と P4-GP-G7) に加え、患者 P4 由来の抗体ライブラリーから GT に対するバイオパンニングにより P4-GT-B7、P4-GT-E7 の 2 クローン、さらに患者 P12 由来の抗体ライブラリーから GP に対するバイオパンニングにより P12-GP-8、P12-GP-14、P12-GP-18 の 3 クローンを得た。それらのグルテン並びにグルパール 19S に対する結合活性を調べた結果を図 3A に示す。すべてのクローンにおいて、グルテンに対し高い結合活性を示し、特に、P4-GP-B9 と P4-GP-G7 ならびに P12-GP-8、P12-GP-14、P12-GP-18 においては、グルパールに対してバイオパンニングを行ったにも関わらず、グルテンに高い特異性を示す結果となった。また興味深いのは、P4-GT-E7 については、グルテンに対するバイオパンニングによって得られたのにもかかわらず、弱いながらグルパールに対する反応性を示していることである。これらの通常バイオパンニングで得られた 7 クローンのアミノ酸配列とその遺伝子型を図 3B と 3C にまとめた。**患者 P4 由来の抗体ライブラリーを用いたグルテンに対するバイオパンニングによって得られた抗体 VH 配列の次世代シーケンサー (NGS) による解析** グルパールに特異的、もしくは、グルテ

ンとグルパールに同等の結合活性を有するよう
な抗体クローンの単離を目指していたのにもか
かわらず、得られたクローンのほとんどがグルテ
ン特異的であったため、さらにクローンを探
索するため、次世代シーケンサー (NGS) を用
いた解析を行った。

昨年度も結果の一部について示したが、患者 P4
由来のライブラリーを使った GT (グルテン) に対
する 1 回のバイオパンニングによって、増幅され
てくる IgE 抗体の VH 配列の解析を行った結果を
図 4 に示す。

図 4A では、パンニング前後での VH 遺伝子のリ
ード数とユニークな (固有の) 配列数を示した。
パンニング前では、20310 のリード数に対し、
16391 のユニークな配列が見られ、パンニング後
では、8320 のリード数に対して 7306 のユニーク
な配列が見られた。これらのユニーク配列のすべ
てについて、含有率 (出現頻度、%) を計算し、
パンニング操作後での増幅倍率を計算した。その
結果の 1 部を図 4B に示す。最も高いものでは
33.8 倍の増幅倍率が見られ (NGS-P4-GT1)、
増幅率が 2.5 倍以上のものは、全部で 88 個あ
った。これらの 88 個の配列について、分子系統樹
を作成した結果を図 4C に示した。これらの 51 個
の配列は、約 11 個 (P-Z) のクラスターを形成し
た。患者 P4 のライブラリーからグルテンに対す
る通常パンニングによって得られた P4-GT-B7 は、
NGS 解析から得られた高い増幅倍率 (26.5) を示
す配列 (NGS-)P4-GT2 と一致したことから、本法に
よる抗原特異的な抗体クローンの特定の有用性
が示された。同じ患者 P4 のライブラリーからグ
ルテンに対する通常パンニングによって得られ
た (NP-)P4-GT-E7 については、NGS 解析では同じ
もしくは類似した配列は系統樹上では見られな
かった。一方、同じ患者 P4 のライブラリーから

GP に対する通常パンニングによって得られた
NP-P4-GP-B9、NP-P4-GP-B9 は、それぞれ、図 4C
において、R クラスター並びに U クラスターの中
でも高い配列相同性を示した。このことは、GP 対
するパンニングによって得られた VH クロ
ンは、図 3A の結合特異性でもそうであったように、
GP 特異的というわけではなく、GT 特異的 VH 配列
と近似したものであることが分かった。

*患者 P12 由来の抗体ライブラリーを用いた GP (グ
ルパール) に対するバイオパンニングによって得
られた抗体 VH 配列の次世代シーケンサー
(NGS) による解析* 同様に、患者 P12 由来
のライブラリーを使ったグルパールに対するバ
イオパンニングによって増幅されてくる VH の配
列解析を行った結果を図 5 に示す。図 5A では、
パンニング前の 11888 の全リード数に対し、ユニ
ークな配列は 10074 であり、パンニング後では、
31412 のリード数に対し、25064 のユニークな配
列が見られた。パンニング前後での各配列の増幅
倍率 (一部) を図 5B に示すが、最も増幅倍率の
高いもので、6.0 倍であり、前項の患者 P4 ライブ
ラリーでの濃縮に比べ、濃縮率は高くないことが
分かった。濃縮倍率が 2.5 倍以上の配列 (51 配列)
を使って分子系統樹を作成した結果を図 5C に示
した。系統樹上、配列は 9 個のクラスターに分類
された (F-N)。クラスター K に分類された
NGS-P12-GP-22 ならびに NGS-P12-GP-34 は、それ
ぞれ GP に対する通常のバイオパンニングによ
って得られた NP-P12-GP-18 と NP-P12-GP-8 の VH 配
列 (図 3) と同一であり、また、GP に対する通常
のバイオパンニングによって得られたもう一つ
のクローンである NP-P12-GP-14 についても互
いに高い相同性を有する配列を持つクラスター I に属
することから、本法による抗原特異的配列配列の
特定が、意味のある有用な方法であることを強く

示唆している。

NGS-P4-GT1 との NGS-P4-GT2 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築によって得られた 5 種の抗体クローンの特性 次世代シーケンサーによって、グルテンあるいはグローバルに対する特異的な抗体の VH 配列は明らかになったが、この方法では、VL 側の配列情報は得られない。そこで、パンニング後のファージミドベクターの遺伝子プールを用いて、図 1 B に示した方法で、NGS-P4-GT1 と NGS-P4-GT2 の VH 配列の CDR 3 に相補的なプライマーを用いて単鎖 Fv 抗体の再構築を行った。再構築した単鎖 Fv 遺伝子の配列と、得られた単鎖 Fv を提示したバクテリオファージのグルテンあるいはグルパールに対する結合活性を ELISA で調べた結果を図 7 と 8 に示す。

NGS-P4-GT1 の VH-CDR3 配列を元に、単鎖 Fv 遺伝子を増幅したところ、図 7 B に示したように、VH の配列は全体的に類似しており、これらは、元はほぼ同一のクローンと考えられる。ただ、NGS-P4-GT1-E では H-CDR3 以外の領域に 6 箇所の変異が見られ、これについてはファージの増幅の際の PCR によってこのような複数の変異が生じたとは考えにくくことから、おそらく共通の祖先を持つ異なる B 細胞クローン由来の配列であることが示唆される。一方、L 鎖に関しては、全部で 5 種類の配列が見られた。ただし、NGS-P4-GT1-A, B, C においては、L 鎖の CDR1, 2, 3 の領域を含め、互いに高い相同性があったことから、共通の祖先を持つ異なる B 細胞由来の配列である可能性が高いと考えられた。

これらの NGS-P4-GT1 由来の 5 種類の単鎖 Fv 抗体ファージの結合特異性は、図 7 A に示すように、いずれのクローンともグルテンに対する結合活性が見られたことから、これらの単鎖 Fv 抗体においては、VH がグルテンに対する抗原認識に深く

関わっており、L 鎖の違いはあまり大きく影響しないように見える。

一方、NGS-P4-GT2 の VH 配列を元に、L 鎖を増幅したところ、図 8 B に示したように、H 鎖ではほとんどアミノ酸配列に違いがなかったが、L 鎖に関しては全部で 5 種類の異なる配列が得られた。これらの単鎖 Fv ファージの結合特異性を調べた結果、図 8 A に示したように、NGS-P4-GT2B, D, E では結合活性が見られるのに対し、NGS-P4-GT2-A と C では、結合活性がほぼ消失していた。このことから、これらのクローンのグルテンに対する結合においては、L 鎖の依存性が高いことが示された。結合活性を有する NGS-P4-GT2B, D, E のうち、D と E は、比較的長い L-CDR 3 のループ構造を持っているが、NGS-P4-GT2B では、NGS-P4-GT2A と C と H-CDR のループの長さのみでは、グルテンとの結合を説明できない。また、NGS-P4-GT2 の VH 配列は、通常のパニングから得られた NP-P4-GT-B7 の VH と同一であったが、NP-P4-GT-B7 の VL の配列と同じものは、NGS-P4-GT2A-E の中にはなかった。

NGS-P12-GP8 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築によって得られた 3 種の抗体クローンの特性 図 5 において、患者 P12 の抗体ライブラリーから GP に対するバイオパンニングによって得られたファージの次世代シーケンサーによる VH 配列解析で、高い配列相同性を持つクラスター M より、NGS-P12-GP8 (増幅倍率: 4.5) の VH 配列を用いて、単鎖 Fv 遺伝子の再構築を行った。その結果、図 8 B に示したように、H 鎖の領域の配列は、得られた 3 クローンの間では完全に一致したが、L 鎖の配列は、すべて異なっていた。これらの 3 つのファージクローンについて、結合活性を評価したところ、図 8 A に示したように、3 つのクローンとも、結合活性が極めて弱いものであった。

以上示したように、バイオパンニング後の通常のスクリーニング、並びに、次世代シーケンサー解析を組み入れたバイオパンニングによる抗原特異的なクローンの単離を行ったが、現状では、グルテンに対する特異性を持った抗体は見られるものの、特に茶のしずく石鹼による小麦アレルギーと密接な関連を持つと考えられるグルパール19Sに対して特異性を持った抗体は未だ得られていない。現状の特異性の評価では、バクテリオファージに提示された状態での単鎖 Fv 抗体を用いてきたが、ファージ上に提示された抗体では、複雑な抗原内部に存在するエピトープの認識が難しい可能性が考えられることから、可溶性の単鎖 Fv 抗体を用いて、以下、特異性を検討することとした。

大腸菌並びにグラム陽性菌 *Brevibacillus brevis* での単鎖 Fvno 発現と結合活性評価 可溶性の単鎖 Fv 抗体を調製するために、大腸菌 (図 9A) 並びにグラム陽性菌である *B. brevis* (図 9B) での発現を試みた。大腸菌の発現では、クローン化したファージを大腸菌 HB 2 1 5 1 に感染させ、IPTG にて単鎖 Fv 抗体の発現を誘導後、培養上清 (sup)、ペリプラズム空間 (peri)、細胞内 (cyto) での発現を、ドットブロッキング後の抗 His タグ抗体による検出法にて検出した。結果を図 9A に示した。図 9C に示した発現試験を行ったものうち、大腸菌での発現が見られた NP-P12-GP-8、NP-P12-GP-18、NP-P4-GP-G7、NGS-P4-GT1C、NGS-P4-GT2 B、NGS-P4-GT2 E については、NTA カラムにて、単鎖 Fv 抗体の精製を行った。一方で、並行して、これらのクローンのうち、通常バイオパンニングにより得られた 7 つのクローンについて、*B. brevis* での発現を行った結果、

NP-P4-GP-B9 の 1 クローンのみが発現が見られた (図 9B) ことから、大腸菌の場合と同じ方法にて、培養上清から精製を行った。

次に、精製された単鎖 Fv 抗体について、グルテン並びにグルパールに対する結合活性を評価した (図 10)。興味深いことに、NP-P12-GP-8 並びに NP-P4-GP-G7 は、抗体ファージのレベルでは、グルパールに対する特異性がわずかしみられなかったが (図 2A)、単鎖 Fv 抗体では、グルテンへの結合活性を維持しながら、明らかにグルパールに対する結合活性が上昇していることが分かった。グルパールに対する通常パンニングにより得られたもう一つの NP-P4-GP-B9 については、抗体の結合活性が極めて弱かった。

一方で、グルテンに対するバイオパンニング後の次世代シーケンサーの解析から得られたクローン NGS-P4-GT1 由来の NGS-P4-GT1C ならびに NGS-P4-GT2 由来の GS-P4-GT2E 抗体については、グルテンに対してのみ高い特異性を示した。しかし、興味深いことに GS-P4-GT2B では、抗体ファージの状態ではほとんどグルパールに対する結合活性が見られなかったのに対し、単鎖 Fv 抗体では、明らかにグルパールに対する結合特異性が上昇していた。この観察は、先の NP-P12-GP-8 並びに NP-P4-GP-G7 のクローンで見られた現象と同じであった。

D. 考察

P12-GP-8、P4-GP-G7 で見られた、抗体ファージでは見られないグルパールに対する活性が、単鎖 Fv 抗体の場合では顕著に増加していることは、加水分解小麦によるアレルギー発症の原因となる IgE 抗体の生成機構を考える上では極めて興味深い。図 1 に示したように、患者 P4 並びに特に P12 においては、グルパールに対する IgE 抗体価が高

く、構築した IgE 抗体ライブラリーからはグルパールに対する抗体クローンの単離が容易であると予想された。しかし予想に反して、GP に対するバイオパンニングにおいて得られるクローンファージの結合特異性は、多くはグルテンのみであり、グルパールに対する結合活性は全く見られないか、極小さなものであった。このファージでの活性と単鎖 Fv での特異性の違う理由として、いくつかの可能性が考えられる。1 つは、ファージ上に提示された単鎖 FV 抗体では、何らかの立体的な障害のために、グルパール上の酸加水分解によって生じた特異的なエピトープを認識しにくいようになっているのかもしれない。このため、グルパールに対するバイオパンニングによって得られたクローンも、ファージレベルでの結合特異性はほとんどがグルテンに特異的であり、グルパールに結合活性を示すものはごく一部であった。一方で、精製した単鎖 Fv ではグルパールに対する結合特性が明らかに上昇した理由として、単鎖 Fv のようなファージから離れた小さな分子では、立体的な障害もなく、グルパール上の特異的なエピトープを認識できることを意味しているのかもしれない。

本研究によって初めて、クローンレベルで、グルパールとグルテンに交差結合活性をもつ IgE 由来の抗体が存在することが明らかとなった。このことは、加水分解小麦によるアレルギー発症の原因となる IgE 抗体の特性を考える上で重要であろう。従来、酸加水分解によって生じた新たなエピトープを特異的に認識する IgE 抗体が産生されると考えられてきた（例えば、酸加水分解反応で生じるイソペプチド等を認識する抗体）が、少なくとも本研究で得られたグルパールを認識する抗体は、酸加水分解によって生じた特殊なエピトープのみを認識するものではなく、グルパールの特異

なエピトープを認識しながらも同時に元のグルテンのエクトープを認識するものであった。このような交差性を持つ抗体の抗原認識機構がどの様になっているかを明らかにするには今後さらに検討を進めていかないとはいけませんが、この発見は、グルテンの酸加水分解によって生じた新たなエクトープが引き金となり、それらが強い抗原性を持つことで、この新たなエピトープと（おそらくは近接した）グルテンのエピトープを認識する抗体が生じた可能性を強く示唆するものである。

このような分子認識の変化を説明する現象として、NGS-P4-GT2-B と NGS-P4-GT2-E の構造活性相関を見る事は有用だろう。これらの2つのクローンは、VH 領域は共通であり、VL の配列のみが異なるが、図 1 0A の最下段に示したように、前者ではグルパールに対する結合活性が高いが、後者ではグルパールに対する結合活性が弱くなっている。このように共通の VH を持ち、グルテン上の同じエピトープを認識しているにも関わらず、VL の違いによってグルパール上に生じた特異的なエピトープに対する結合特性が変化している。

通常的小麦アレルギー患者の血清で見られる IgE は、グルテンのみを認識することが知られている（データは示していない）が、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーの患者の血清中の IgE は、グルパールとグルテン双方に結合活性を示していた。我々の結果から推定すると、この交差結合活性は、独立の IgE 分子由来ではなく、おそらくは、IgM 抗体の遺伝子プールからクラススイッチによって IgE 抗体が生じる際に、通常グルテンに対する結合活性を維持しながら、同時に加水分解小麦に特有のエピトープを認識できる抗体が生成することによって、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーが発症した可能性を示唆できる。

このような推論の一方で、我々のアプローチは

いくつかの限界を持っていることが明らかとなった。これは原理的に予想されることであるが、単鎖 Fv 抗体ファージライブラリーの構築では、VH と VL の遺伝子は人工的にシャッフルされ、本来の B 細胞中の組み合わせを必ずしも持っていない。このことは今回得られた単鎖 Fv 抗体の結合特異性が、この人工的な組み合わせによって生まれたことを完全に排除することはできない。これを解決するには、近年行われている B 細胞クローン由来の抗体ライブラリーを作るしかないが、この技術が一般化されるには、しばらく時間がかかりそうである。もう一つの限界は、単鎖 Fv 抗体という発現のフォーマットの問題である。図 9 において、大腸菌と *B. brevis* における単鎖 Fv の発現を行ったが、抗体ファージにおいて、発現が確認された 16 クローンのうち、大腸菌で発現が確認できたものはわずか 6 クローンであった。また、*B. brevis* では、試験に供した 7 クローンのうち、発現が見られたものは、わずか 1 クローンだった。このように、発現の頻度が低い理由としては、単鎖 Fv クローンの安定性やホールディングの問題が考えられる。実際の IgE の抗体では、VH ならびに VL は、Fab 断片の中で存在しており、このような微妙な特異性を持った抗体の性質を比較するには、単鎖 Fv 抗体ではなく、Fab 抗体として発現した方が、より正確な特異性の情報を与えてくれるだろう。

本法では、単鎖 Fv 抗体ファージライブラリーを用いて、特に、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーの原因となる IgE 抗体の同定を目指した。最終的に得られたクローンは、グルパールとグルテンに交差活性をもつクローンと、グルテンにのみ結合活性をもつクローンであり、グルパールのみ結合活性を有する抗体クローンは得られなかった。しかし、これは、グルパールのみの特異

性を有する抗体クローンの存在を排除するものではない。先にも述べたように、ファージ上に提示された単鎖 Fv 抗体では、グルパールのもつ特異的なエピトープを認識しにくいことが示唆されたが、もしこれが本当であるならば、抗体ライブラリー中に、グルパールのみの特異性を有する抗体があったとしても、バイオパンニングではうまく増やすことができないであろう。このようなことを可能にする方法としては、ビオチン化した抗原をもちい、溶液状態でファージと抗原を反応させたり、抗体をファージ上にディスプレイする際に、提示用に使っているファージコートタンパク質 (g3p) と抗体をつなぐリンカーを長くするなどして、抗体の結合の自由度をあげるなどの工夫が必要である。

E. 結論

IgE 抗体ライブラリーを使ったバイオパンニングと次世代シークエンサーによる網羅的解析手法を使って、茶のしずく石鹼による小麦アレルギーの原因となる IgE 由来の単鎖 Fv 抗体の単離に成功した。得られた抗体クローンの特徴は、グルパールとグルテン双方に交差結合活性を示すものであり、このことから、グルパールによって誘発された IgE 抗体が、小麦アレルギーを引き起こす機構が推定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y., Minami, M.,

and Taki M., Construction of a crown ether-like supramolecular library by conjugation of genetically-encoded peptide linkers displayed on bacteriophage T7, *Chemical Communications*, Vol.30, pp.3887-4012 (2014).

- 2) Mizukami M., Tokunaga H., Onishi H., Ueno Y., Hanagata H., Miyazaki N., Kiyose N., Ito Y., Ishibashi M., Hagihara Y., Arakawa T., Miyayuchi A., Tokunaga M., Highly efficient production of VHH antibody fragments in *Brevibacillus choshinensis* expression system, *Protein Expression and Purification*, Vol. 105, pp.23-32 (2014)
- 3) 伊東祐二, 宮崎誠生, 榎元友里恵, フェージディスプレイ法, 免疫測定法~基礎から先端まで~, 講談社, 東京 (2014) pp.137-146

2. 学会発表

- 1) 藤山愛子, 榎元友里恵, 古川大和, Hui Kam Man, 松田知成, 伊東祐二, 次世代シーケンサーを用いた網羅的抗体配列解析によるルテラン特異的な肝癌患者由来抗体の解析, 平成26年度日本生化学会九州支部例会(福岡), 2014年5月
- 2) 梅村修平, 福富友馬, 手島玲子, 松田知成, 伊東祐二, 小麦アレルギー発症機構の解明を目指したアレルギー特異的 IgE の同定, 平成 26 年度日本生化学会九州支部例会 (福岡), 2014年5月
- 3) 梅村修平, 福富友馬, 手島玲子, 松田知成, 伊東祐二, 次世代シーケンサーを用いた小麦アレルギー特異的 IgE の同定法, 第 38

回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(福岡), 2014年9月

- 4) 今給黎厚志, 伊東祐二, ランダムペプチドライブラリーから得られた低親和性ペプチドの *Brevibacillus* 発現システムを用いた機能評価系の構築, 第 38 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(福岡), 2014年9月
- 5) 伊東祐二, 岸本聡, 宮崎誠生, 萩原義久, 松田知成, アルパカ免疫・非免疫抗体ライブラリーからの抗原特異的な VHH フラグメントの選別と特性解析, 第 37 回日本分子生物学会年会(横浜) 2014年11月
- 6) 梅村修平, 福富友馬, 手島玲子, 松田知成, 伊東祐二, 次世代シーケンサーを用いた網羅的配列解析による小麦アレルギー特異的 IgE の同定法, 第 37 回日本分子生物学会年会(横浜) 2014年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

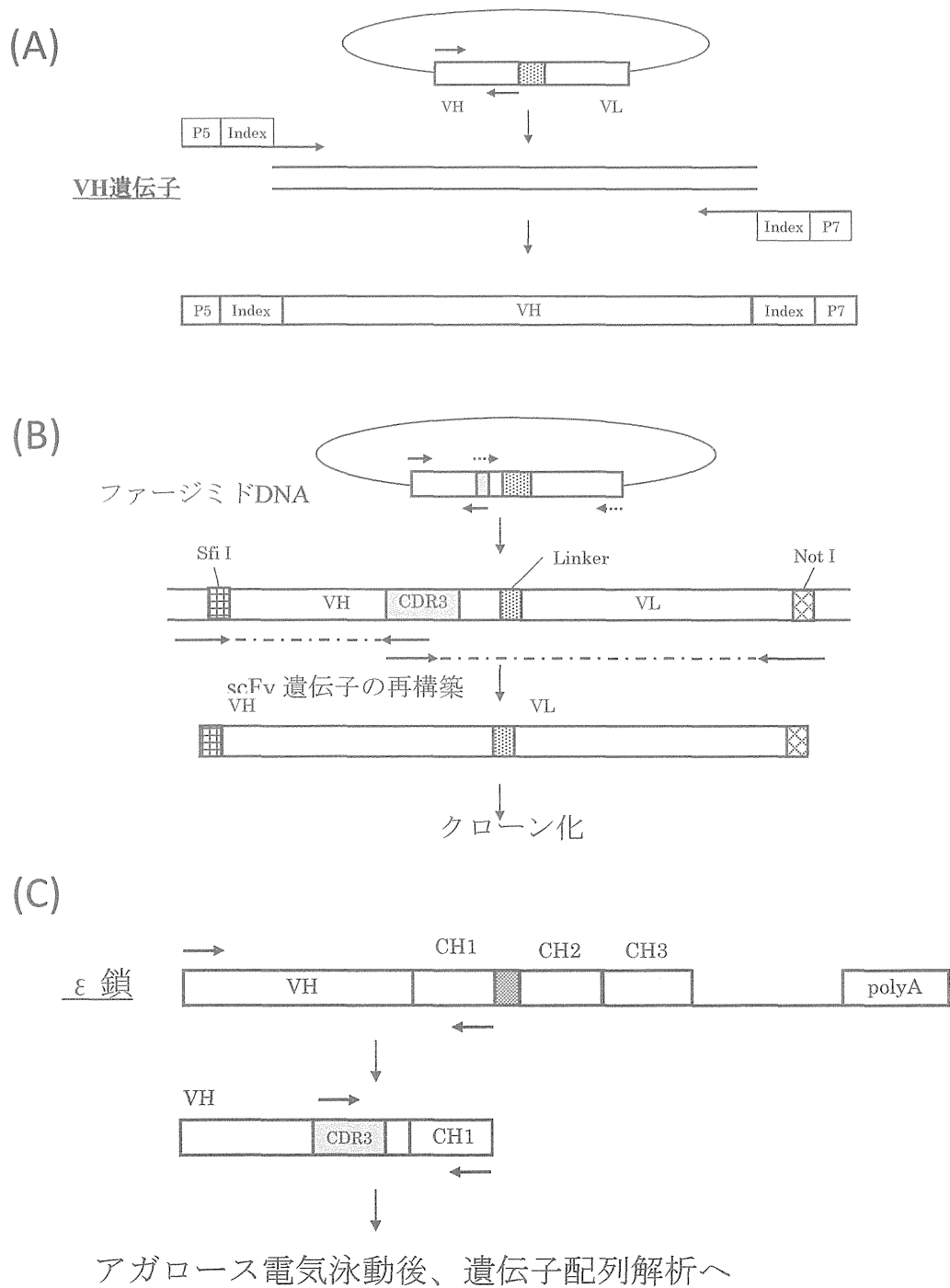


図1 本研究で用いた遺伝子工学的な手法

(A) 次世代シーケンサー解析のためのファージミドベクターからの VH 遺伝子の増幅 (B) VH の CDR3 配列を基にした単鎖 Fv 遺伝子の再構築 (C) H ϵ 鎖 (IgE 重鎖) 特異的なプライマーを用いた VH 遺伝子の増幅確認

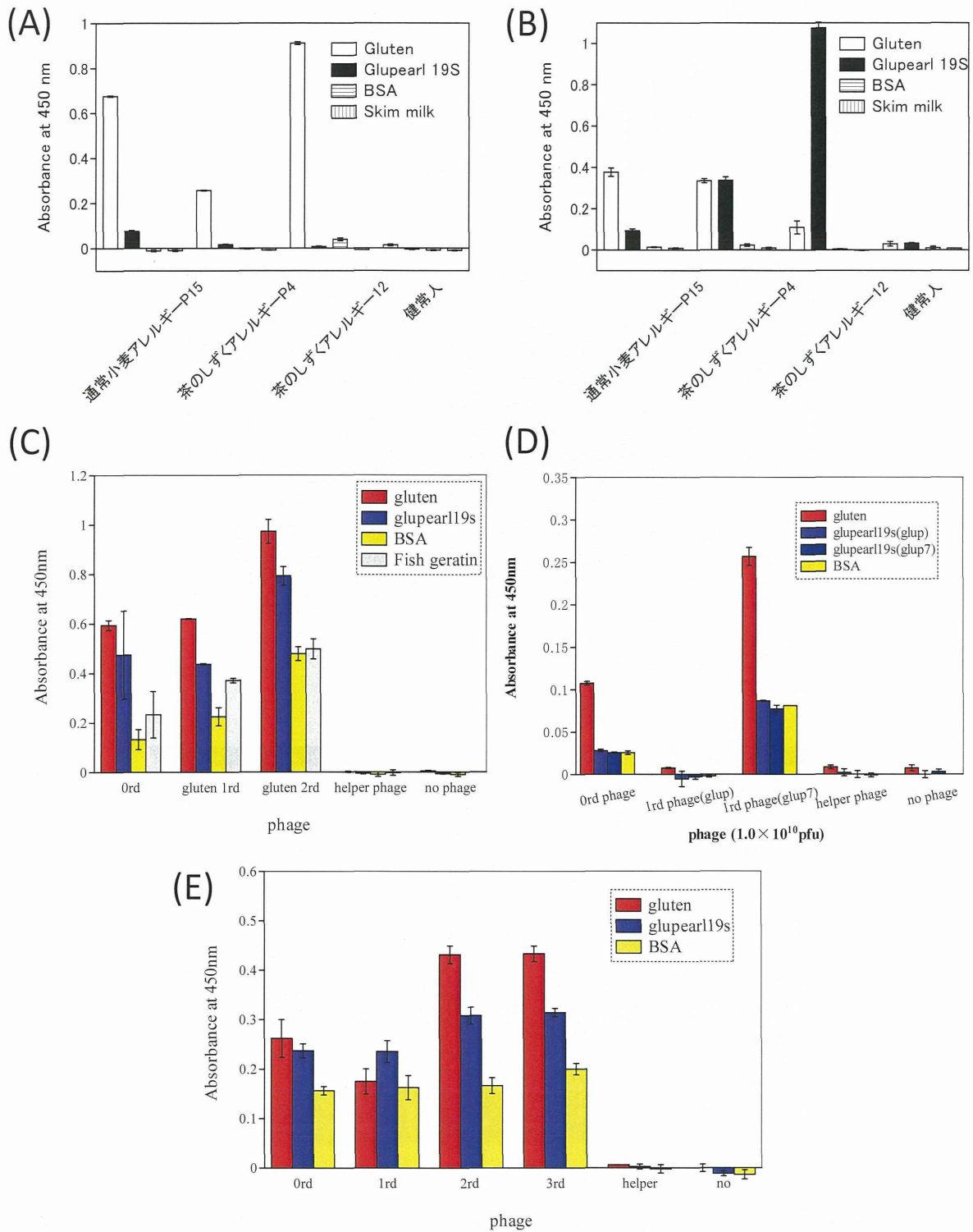


図2 小麦アレルギー患者 P4、P12 由来の血清中の IgG1 並びに IgE のグルテン並びにグルパールに対する抗体価 (A, B) と、患者 P4 由来の IgE 抗体ライブラリーを使ったグルテン (C) 並びにグルパール (D) に対するバイオパンニング、患者 P12 由来の IgE 抗体ライブラリーを使ったグルパール (E) に対するバイオパンニングによるに特異的抗体ファージの濃縮

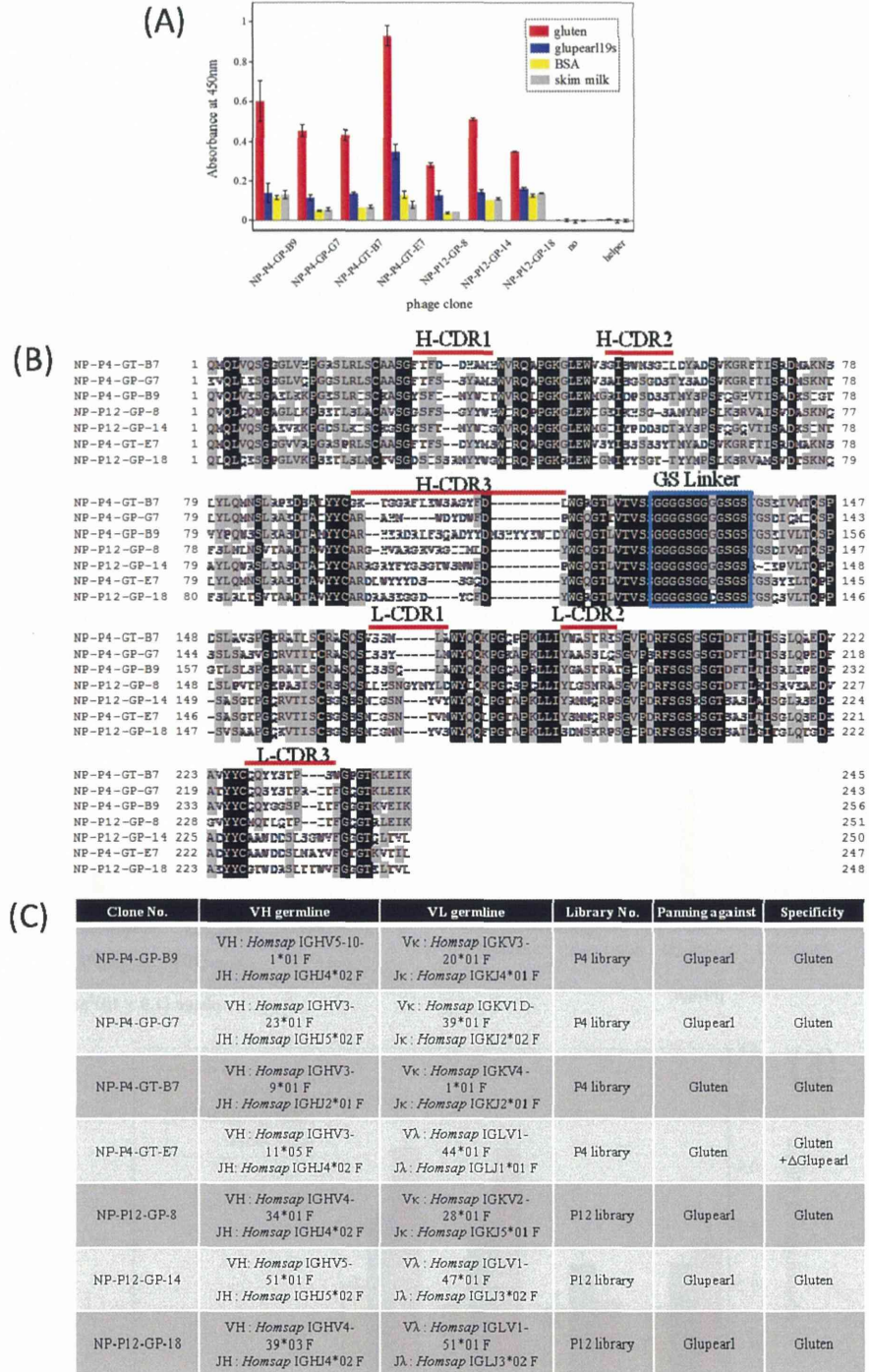


図3 通常のパンニングより単離された小麦グルテンもしくは加水分解小麦（グルパール19S）に対する患者 IgE 由来の抗体クローンの ELISA による結合活性 (A)、単鎖 Fv 抗体遺伝子の配列 (B) 並びに各クローンの VH 並びに VL の抗体遺伝子解析 (C) 特に (C) における各抗体クローンの命名法については、NP (Normal biopanning) -P4 あるいは P12 (由来患者) -GT (グルテンに対するバイオパンニング) あるいは GP (グルパールに対するバイオパンニング) -クローン番号の形で記した。最初に、NP がついていないものも、通常パンニング由来のクローンを示す。抗体クローンの遺伝子型解析は、インターネット上の抗体遺伝子型解析ソフトウェア IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/) 上で行った。

(A)

P4	0 round library (パニング前)	1 st round library (グルテンパニング後)
Total sequences	20310	8320
Unique sequences	16391	7306

(B)

配列ID	増幅倍率	パニング前含有率	パニング後含有率	アミノ酸配列
P4-0T1	33.705404	C.CC0000514	C.134381515	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T2	26.1943131	C.CC0373626	C.204720555	Q ^Q QLVQSGDELV ^Y TRQ ^Y QEL ^Y EL ^Y SLA ^Y SG ^Y FTFD ^Y RL ^Y EW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y Y ^Y SD ^Y FTW ^Y
P4-0T3	15.2578231	C.CC0000514	C.09040458	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T4	14.4732173	C.CC0000514	C.08183635	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T5	14.4732173	C.CC0000514	C.08183635	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T6	14.4732173	C.CC0000514	C.08183635	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T7	13.29712655	C.CC0373626	C.12438047	EV ^Y QLLE ^Y SD ^Y Q ^Y LV ^Y Q ^Y Q ^Y Q ^Y EL ^Y EL ^Y SLA ^Y SG ^Y FT ^Y FD ^Y RL ^Y EW ^Y VR ^Y Q ^Y AP ^Y Q ^Y Q ^Y LEW ^Y Y ^Y SD ^Y FTW ^Y
P4-0T8	12.2012104	C.CC0000514	C.20432112	EV ^Y QLLE ^Y SD ^Y Q ^Y LV ^Y Q ^Y Q ^Y EL ^Y EL ^Y SLA ^Y SG ^Y FT ^Y FD ^Y RL ^Y EW ^Y VR ^Y Q ^Y AP ^Y Q ^Y Q ^Y LEW ^Y Y ^Y SD ^Y FTW ^Y
P4-0T9	12.0102104	C.CC0000514	C.20432112	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T10	11.809221	C.CC0329884	C.12308817	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T11	10.8146493	C.CC0373626	C.10175062	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T12	9.848841153	C.CC0000514	C.04333325	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T13	9.848841153	C.CC0000514	C.04333325	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T14	9.848841153	C.CC0000514	C.04333325	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T15	9.848841153	C.CC0000514	C.04333325	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T16	9.711066845	C.CC0329884	C.470844545	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T17	7.732578	C.CC0400742	C.10175062	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T18	7.238430865	C.CC0373626	C.08183635	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T19	7.238430865	C.CC0373626	C.08183635	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T20	7.238430865	C.CC0000514	C.03391748	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T21	7.238430865	C.CC0000514	C.03391748	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG
P4-0T22	7.238430865	C.CC0000514	C.03391748	Q ^Q QLVQSGAEVTKRQSS ^Y KVCKLASQ ^Q QFFSD ^Y FTW ^Y VRQAPQ ^Q QLEW ^Y LQK ^Y SP ^Y NG

(C)

◆増幅倍率2.5倍以上のクローン及び通常のパンニングで獲得したクローンのアミノ酸配列を基にした分子系統樹

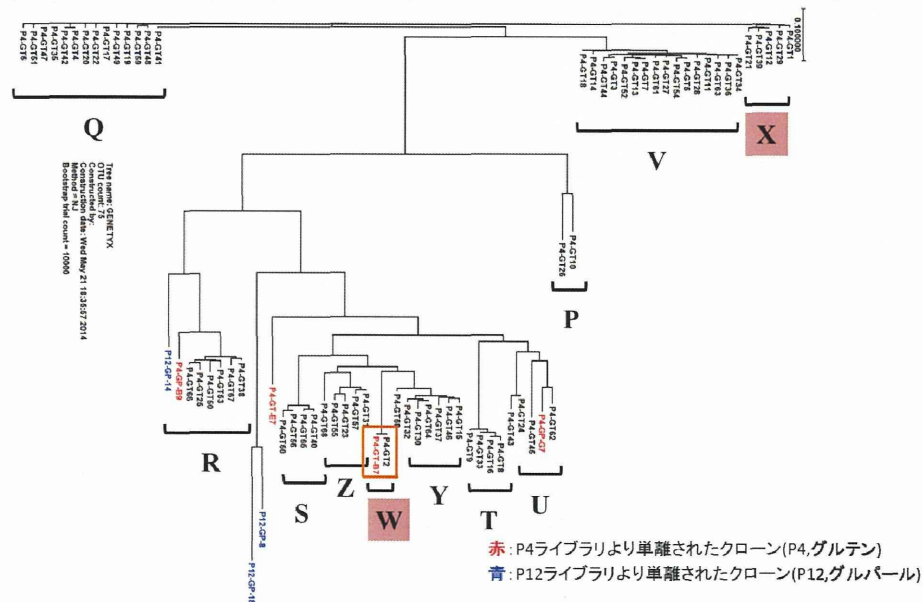


図4 患者P4由来の抗体ライブラリーを用いたグルテンに対するバイオパンニングによって得られた抗体クローンの次世代シーケンサーによるVH配列解析(A)と、バイオパンニングにより2.5倍以上の増幅倍率を示したVH配列(B、但し配列は一部)並びにその配列を用いた分子系統樹解析(C) (C)では、系統解析によって形成されたクラスターを、P-Zのサブグループ(クラスター)に分類した。また、赤と青で示したのは、通常のバイオパンニングで得られたP4並びにP12由来の抗体クローンを示す。

(A)

P12	0 round library (パニング前)	1 st round library (グルパールパニング後)
Total sequences	11888	31412
Unique sequences	10074	25064

(B)

配列ID	増幅倍率	パニング前含有率	パニング後含有率	アミノ酸配列
P11-G ³ 1	6.11847205	0.015812	0.095088	QMQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 2	5.362116205	0.007906	0.041601	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 3	5.362116205	0.007906	0.041601	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 4	5.362116205	0.007906	0.041601	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 5	5.374185379	0.015812	0.084251	QMQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 6	4.886250854	0.007906	0.03865	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 7	4.886250854	0.007906	0.03865	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 8	4.510385404	0.007906	0.055658	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 9	4.510385404	0.015812	0.071816	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 10	4.251977307	0.126492	0.537842	QMQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 11	4.194510054	0.007906	0.052687	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL
P11-G ³ 12	4.194510054	0.007906	0.052687	QVQLVQSGAEVKKPGSIVSKASGSPFSPNPFTVROAFQGLGNLGMISPIYNGVAEYACRFQGL

◆増幅倍率2.5倍以上のクローン及び通常のパニングで獲得したクローンのアミノ酸配列を基にした分子系統樹

(C)

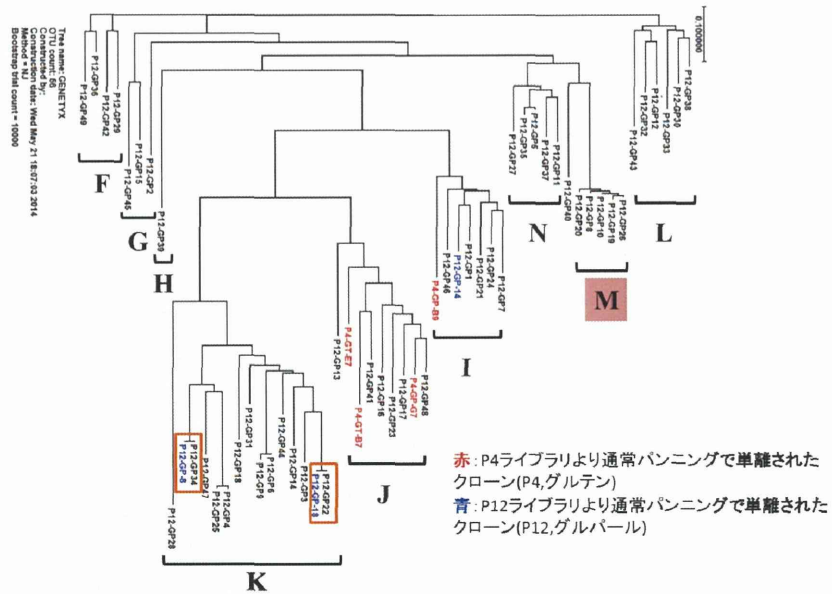


図5 患者P12由来の抗体ライブラリーを用いたグルパールに対するバイオパニングによって得られた抗体クローンの次世代シーケンサーによるVH配列解析(A)と、バイオパニングにより2.5倍以上の増幅倍率を示したVH配列(B、但し配列は一部)並びにその配列を用いた分子系統樹解析(C) (C)の系統解析によって形成されたクラスターをF-Nのサブグループ(クラスター)に分類した。また、赤と青で示したのは、通常のバイオパニングで得られたP4並びにP12由来の抗体クローンを示す。

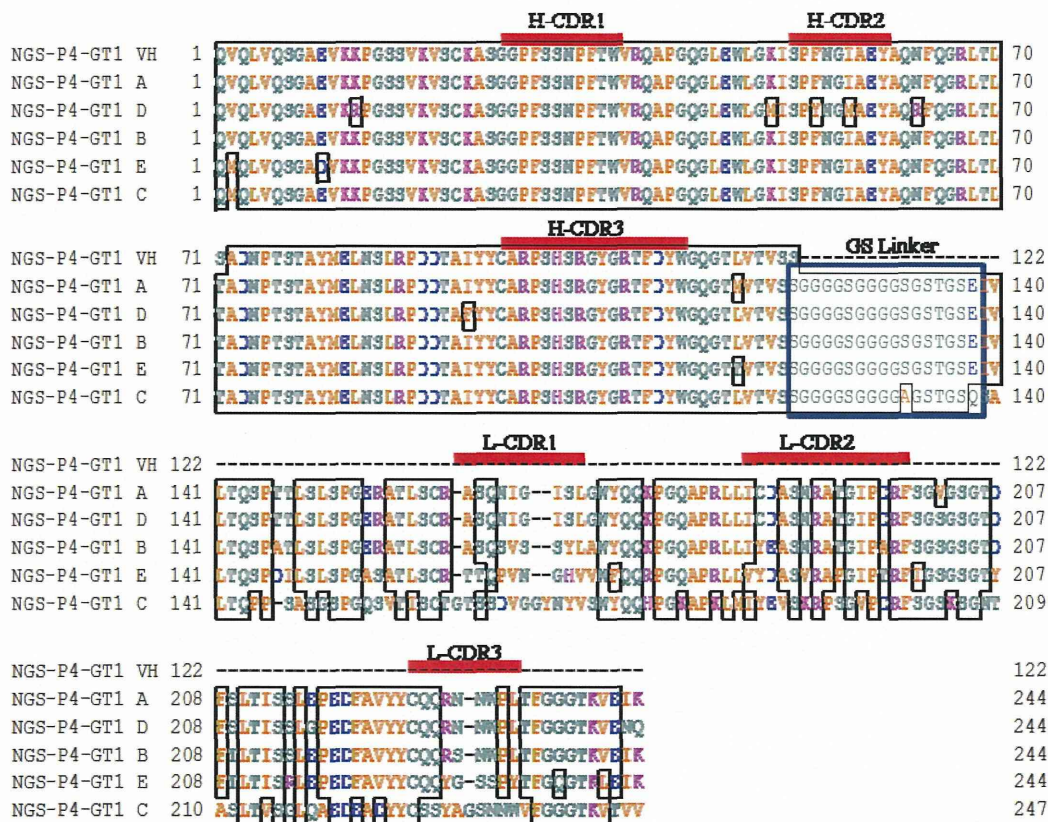
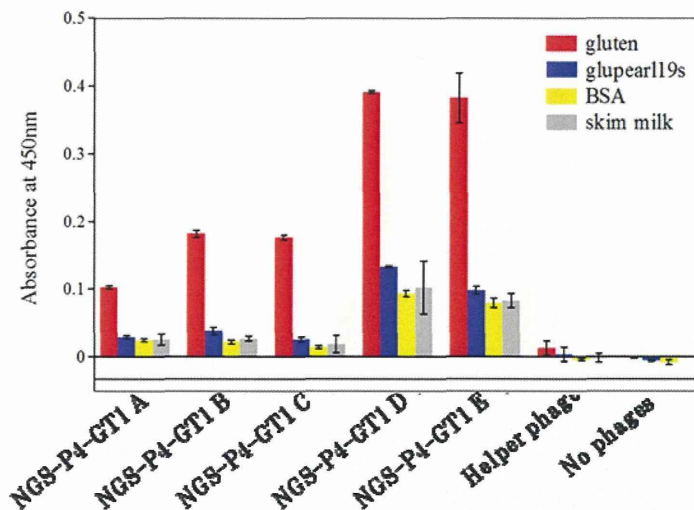


図6 次世代シーケンサー解析から得られた NGS-P4-GT1 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築によって得られた 5 種の抗体クローン (H 鎖は同じだが L 鎖の配列が異なる) の ELISA による結合配列と、それらの単鎖 Fv 配列のアミノ酸配列

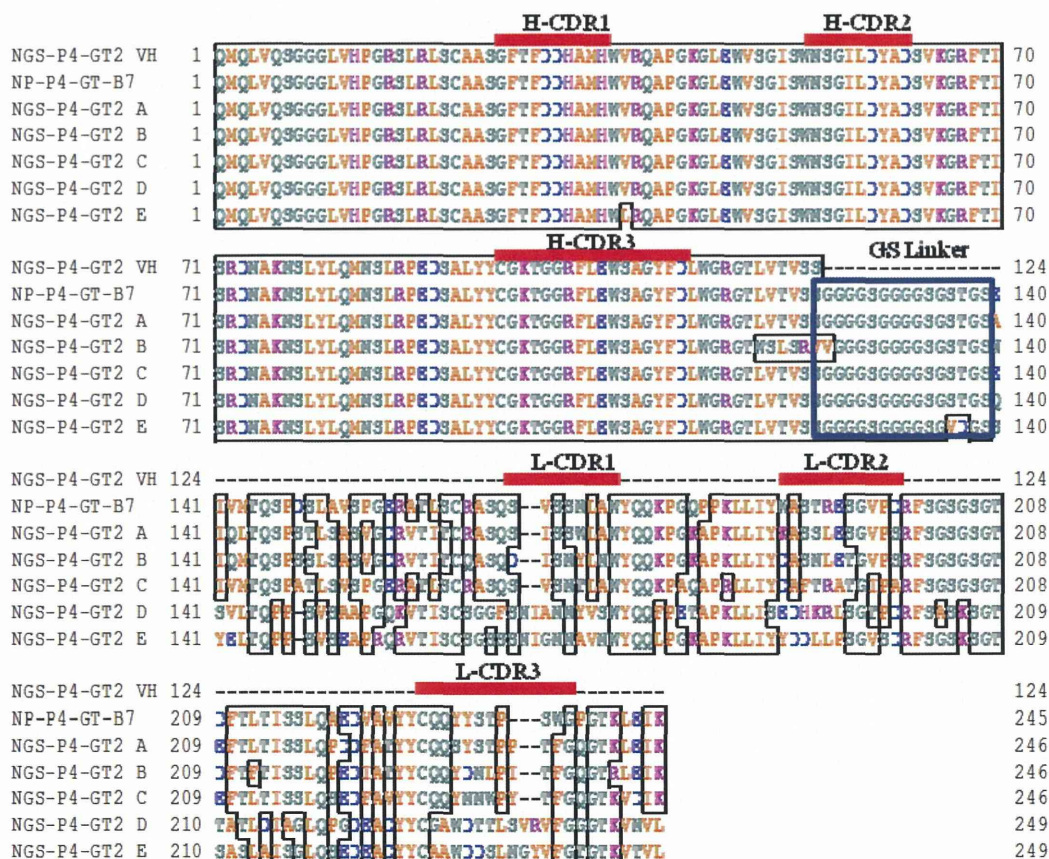
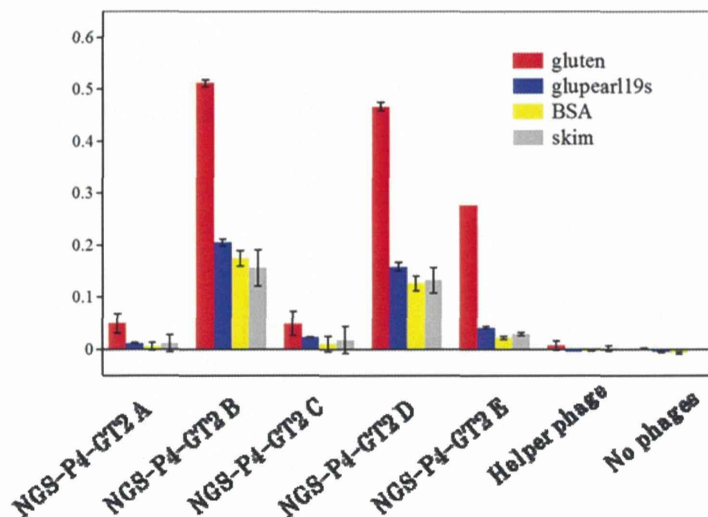


図7 次世代シーケンサー解析から得られた NGS-P4-GT2 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築によって得られた 5 種の抗体クローン (H 鎖は同じだが L 鎖の配列が異なる) の ELISA による結合配列と、それらの単鎖 Fv 配列のアミノ酸配列

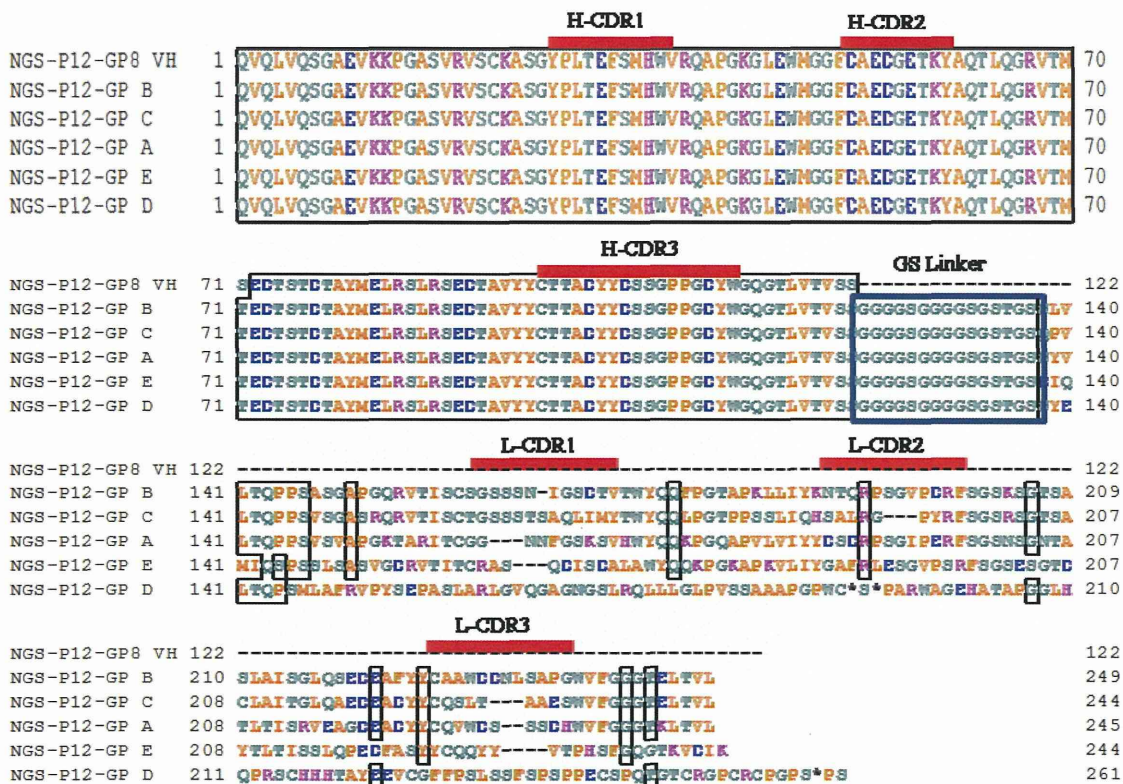
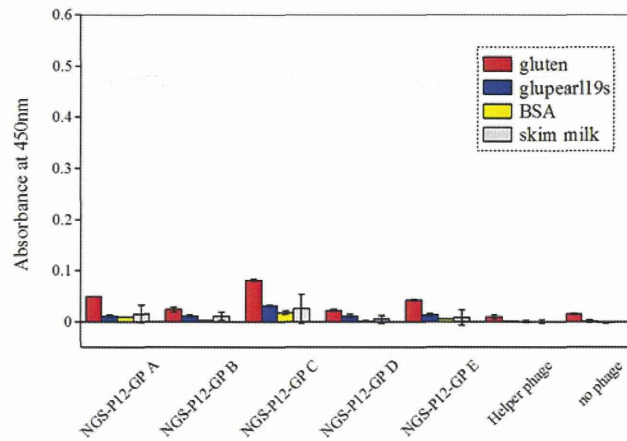


図8 次世代シーケンサー解析から得られた NGS-P12-GP1 の VH 配列を持つ単鎖 Fv 配列の再構築によって得られた3種の抗体ファージ (H鎖は同じだがL鎖の配列が異なる) のELISAによる結合配列と、それらの単鎖 Fv 配列のアミノ酸配列

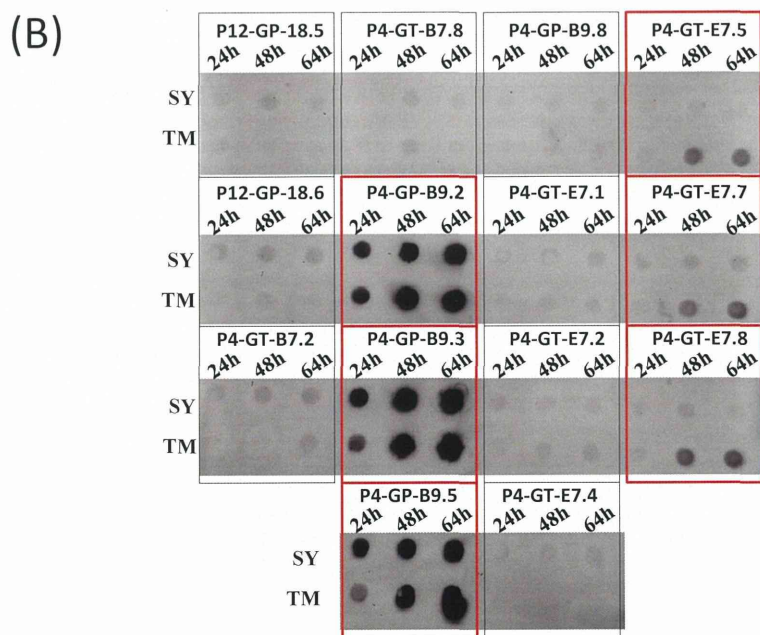
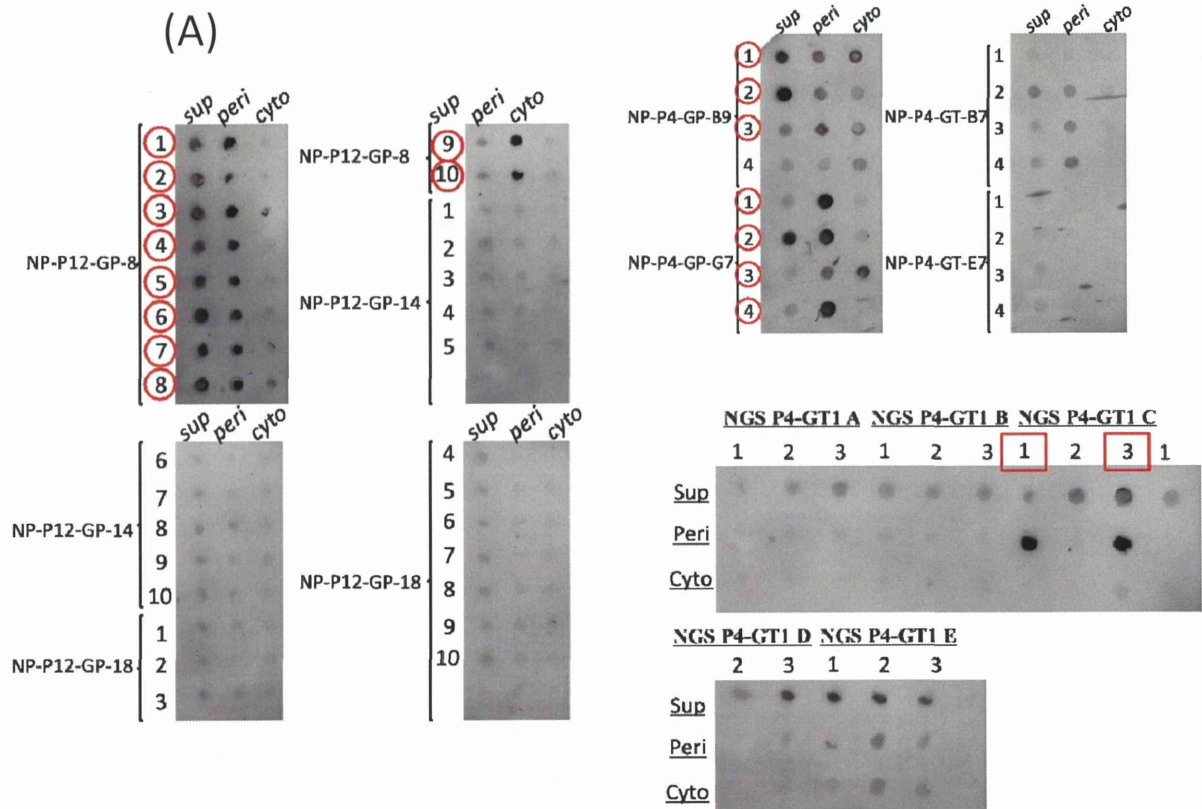


図9 グルテン、もしくはグルパール 19S に結合する IgE 由来の単鎖 Fv 抗体の大腸菌 (A) 並びに *Brevibacillus brevis* (B) でのドットブロッキングによる発現試験