

C型レクチン受容体に対する新規のモノクローナル抗体の樹立

飯島 綾菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：澁谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

[背景]

C型レクチン受容体とは、カルシウム依存的に糖鎖に結合するタンパク質であり、外来微生物由来の糖鎖を認識することで微生物の食食、炎症性メディエーターの産生、ヘルパーT細胞の分化などを制御し、自然免疫及び獲得免疫応答を制御する[1]。さらに、死細胞やがん細胞などの宿主細胞上の糖鎖を認識して免疫応答を制御し、生体内恒常性の維持に寄与している[2,3]。

本研究室ではC型レクチン受容体の一つである受容体Xに着目した。受容体Xは、その細胞内領域に免疫受容体抑制性チロシンモチーフをもつが、受容体Xの詳細な発現局在、及び免疫反応における機能は未だ不明である[4]。

[目的]

マウス受容体Xのタンパク質レベルでの発現局在を解析するため、マウス受容体X特異的モノクローナル抗体を樹立する。

[方法・結果]

(1) 抗受容体X抗体を産生するハイブリドーマの作製

免疫動物である受容体X遺伝子欠損(受容体X^{-/-})マウスに対し、受容体XとヒトIgG-Fc領域のキメラタンパク質(受容体X-Fc)を免疫した。初回免疫の3ヶ月後に脾細胞を採取し、ミエローマ細胞株SP2/0と融合させ、ハイブリドーマの選択培地であるHAT培地(hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium)で培養した。クローン化した2345種類のハイブリドーマの培養上清を用いて親細胞株(RMA)及び受容体X強制発現細胞株を染色し、抗受容体X抗体を産生するクローンを、フローサイトメトリー法によりスクリーニングした。その結果、1クローンが受容体Xへの結合性を示し(図1A)、それ以外の全クローンは示さなかった(図1B)。結合性を示したクローンをTX109と命名した。TX109ハイブリドーマをヌードマウスに腹腔内投与し、得られた腹水から抗体を精製した。

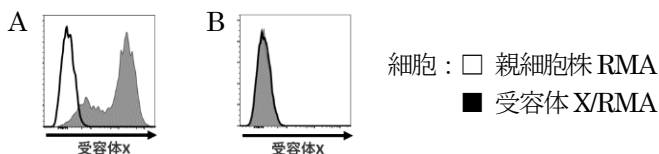


図1 抗受容体Xハイブリドーマのスクリーニング

(2) TX109抗体の特性の検証

①分子量の解析

SDS-PAGE法により、TX109抗体の分子量を非還元条件下及び還元条件下で解析した。その結果、TX109抗体は非還元条件下で約200 kDa、還元条件下で64 kDa及び30 kDaの分子量を示した(図2)。

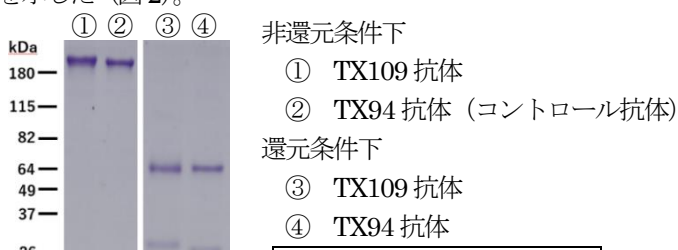


図2 TX109抗体の分子量解析

② IgGアイソタイプの決定

受容体X強制発現細胞株をTX109抗体で一次染色し、各マウスIgGアイソタイプ(IgG1, 2a, 2b, 3, Igκ, Igλ)に結合する抗体で二次染色したのち、フローサイトメトリー法により二次抗体のTX109抗体への結合を解析した。IgG1(図3A)及びIgκ(図3B)に対する抗体のみがTX109抗体に結合したため、TX109抗体はIgG1抗体であり、κ鎖の軽鎖を持つことが示された。

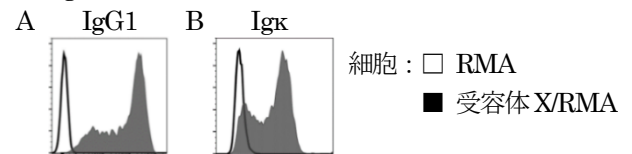


図3 TX109抗体のアイソタイプの決定

③ 受容体Xへの結合特異性の評価

受容体X、及び受容体Xとアミノ酸配列の相同性が高いC型レクチン受容体(受容体X, y, a, b)のヒトIgG-Fcキメラタンパク質を作製し、TX109抗体との結合をELISA法により解析したところ、TX109抗体は受容体Xにのみ用量依存的に結合した(図4)。

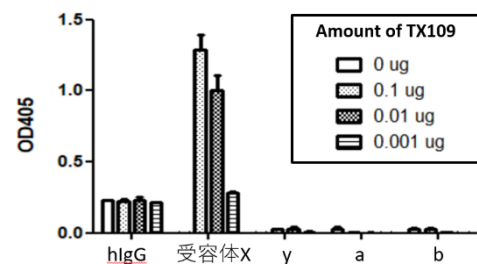


図4 ELISA法によるTX109抗体の結合特異性の評価

[考察]

本研究で得られた受容体Xに対する抗体を産生するクローンは一つだった。その他は抗体産生能を持たない、あるいは、Fc部分に対する抗体を産生するクローンであると考えられる。

TX109抗体が、還元条件下でのSDS-PAGEで64 kDaと30 kDaの分子量を示したのは、還元剤により重鎖と軽鎖間のジスルフィド結合が切断され、検出されたためと考えられる。

TX109抗体は受容体Xに特異的に結合したことから、TX109抗体によって認識されるエピトープは、受容体Xにのみ存在する構造であることが推測される。

[今後の予定]

TX109抗体を用いてマウスの様々な細胞での受容体Xの発現を解析し、受容体X発現細胞における受容体Xの機能を解析する。

[参考文献]

[1] Nature Immunology Rev 13 (9), 817-22. (2012).
 [2] Immunity 52, 1-13. (2019).
 [3] Cancer Immuno Res 7 (2), 321-334. (2019).
 [4] J. Biol. Chem. 282, 22370-5. (2007).