

9447 鶏卵卵黄中に含まれる抗体蛋白質の構造と機能に及ぼす塩の役割

助成研究者：清水 誠（東京大学大学院 農学生命科学研究科）

【目的】 鶏卵卵黄中には一個当たり数百mgものIgG型抗体（IgY）が含まれており、IgY抗体は、腸管感染を予防する機能を持つ受動免疫食品の素材として利用できるものと期待される。また、IgYは食品中の各種成分の検出、分離、除去など、食品の加工貯蔵プロセスでも利用できるものと期待されるが、その蛋白質化学的特性については研究が少なく、食品製造、加工、貯蔵などの過程で受ける影響についても不明の点が多い。IgYの利用性を高めるためには、その特性をさらに明らかにすることが必要である。一方、IgYの特性として、高塩濃度下での高い凝集活性に関する報告がある。しかしこの凝集活性についての詳細な研究はなく、その原因についても明らかにされていない。本研究では、IgYの蛋白質化学的特性について哺乳類IgGと比較しながら検討するとともに、高濃度の塩がIgYの挙動に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

【結果と考察】 まずIgY抗体が高濃度の塩の存在下で本当に凝集反応を起こしやすいかどうかについて、ラテックス凝集法および免疫拡散法で検討した。その結果、塩を添加しない場合には凝集が起こらない低い抗体濃度でも、1～2 M NaCl存在下では凝集が起こるケースが認められ、IgY抗体による凝集反応は確かに高塩濃度下で促進されることが明らかになった。一方、高塩濃度下での高い凝集反応性が抗原抗体反応の促進によるものかどうかを確かめるために、NaCl濃度を変えてELISAを行い、その反応性に及ぼす塩濃度の影響を調べた結果、抗体の抗原結合活性自体が塩によって変化しているわけではないことが示された。高塩濃度下での凝集性の上昇の原因としては、抗体が多量体を形成し、多価抗体の如く挙動した可能性が考えられる。そこで、IgYの分子サイズに変化が起きるかどうかをゲルろ過やレーザー光散乱分析により調べたが、有意な差は認められず、高塩濃度下でのIgYの多量体形成という現象は起こっていないものと考えられた。また、紫外線や自然蛍光スペクトル分析により、高塩濃度下でもIgYの構造に大きな変化は起こっていないことが明らかになった。高いイオン強度のもとでの抗体の荷電状態の変化とそれに伴う分子間相互作用の変化が高い凝集性に関わっているのではないかと推定される。

一方、塩存在下では抗体の安定性が変化し、高塩濃度下ではIgYの酸性での安定性が低下することが明らかになった。また、酸性条件下でのIgYの安定性は、存在する塩（イオン）の種類によっても大きく変化し、カリウム、塩素、クエン酸イオンなどが存在する緩衝液中ではその活性低下が顕著であった。IgY抗体のこのようなイオンに対する感受性の高さと、高塩濃度での凝集性上昇といった現象との関連に興味もたれる。

9447 鶏卵卵黄中に含まれる抗体蛋白質の構造と機能に及ぼす塩の役割

助成研究者：清水 誠 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)

1. 研究目的

WHOの統計によると、食品に媒介された病気群は依然として先進国、途上国共通の課題であり、世界の下痢患者は年間累計十数億人に上ると推定されている。消化器性の感染症の治療には抗生物質が通常使われるが、新生児、妊娠中の母親、高齢者などその使用が望ましくない場合も多く、また耐性菌の問題など抗生物質の使用には制限があるため、これらの疾病の予防、治療を行うための別の方策を考えることはきわめて重要である。最近その対策の一つとして、牛乳や鶏卵から得られる抗体の経口摂取を利用する方法が注目されるようになった。即ち、病原性のウィルスや細菌をウシやニワトリに抗原として注射して牛乳や鶏卵中に抗体を出現せしめ、得られた抗体蛋白質を含む食品を摂取することによって病原菌による腸管内での感染を予防しようというものである。すでに、大腸菌やロタウイルスに対する牛乳抗体で乳幼児の感染を予防する試み^{1, 2)}や、成人の旅行者下痢症を予防する試み³⁾が為され、その有効性が報告されている。

鶏卵卵黄からは一個当たり約100mgものIgG型抗体(IgY)を得ることができるので、鶏卵は牛乳と並んで良い抗体源である。IgYについても、ロタウイルス、大腸菌、サルモネラ菌の感染を予防する試みが動物実験レベルで報告されており⁴⁻⁶⁾、受動免疫食品の素材としての将来的な利用が期待される。また、IgY抗体は食品中の各種成分の検出、有用成分の分離、有害物質の除去など、食品の加工貯蔵プロセスでも様々な利用できるものと期待される。しかしながら、IgYの蛋白質化学的特性については研究が少なく、食品製造、加工、貯蔵などのプロセスにおいてどのような影響を受けるかも不明の点が多い。IgYの利用性を高めるためには、その各種特性をさらに明らかにすることが必要である。

これまで知られているIgYの特性の一つに、高塩濃度下でのIgYの特異な挙動が挙げられる⁷⁾。すなわち、IgY抗体は抗原と反応して凝集体を形成するが、このIgYの凝集反応は、哺乳類IgG抗体と異なり、高塩濃度になると特に著しくなると言われている。しかしこの高塩濃度下における高い凝集活性についての詳細な研究はなく、その原因についても明らかにされていない。食品蛋白質の各種の機能特性は、共存する塩類の濃度や種類に大きく影響されることが知られており、塩類が蛋白質の構造にどのように作用し、どのような特性の変化を引き起こすかを知ることは、食品蛋白質の利用性を高める上でも重要である。また、上述のようなユニークな塩感受性を持つと言われるIgYは、蛋白質-塩類の相

相互作用を解析する上での好適な材料を提供するものと考えられる。本研究では、IgYの蛋白質化学的特性について哺乳類IgGと比較しながら検討するとともに、高濃度の塩がIgYの挙動に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

2. 研究方法

2-1. IgY抗体の調製

大腸菌、サルモネラ菌などの微生物抗原はそのホルマリン処理した死菌の懸濁液を、血清アルブミン、ヒトIgGなどの蛋白質はその溶液を用い、フロイドのアジュバントとともにニワトリに免疫し、抗体を産生させた。追加免疫後の抗体価の高い鶏卵より卵黄を分離し、Hattaら⁹⁾の方法で、抗体を分離精製した。

2-2. 抗体価の測定

特異抗体価の測定は、酵素免疫測定法(ELISA)によって行った。すなわち、ELISA測定用のマイクロプレート(Corning社製)を菌体あるいは抗原蛋白質でコーティング(4°C、一晚)した後、リン酸緩衝食塩水(PBS)で段階希釈した抗体溶液を加えた(室温、2時間)。プレートを洗浄した後、2次抗体(アフィニティー精製・ヤギ抗ニワトリIgG抗体-アルカリ性フォスファターゼ標識;Cappel社製)を加え(室温、2時間)、洗浄後、基質(p-ニトロフェニルリン酸)を加えて発色させ、405nmでの吸光値を測定してELISA値とした。

2-3. 凝集価の測定

抗原-抗体反応による凝集性を評価するには、以下の2つの方法を用いた。

①ラテックスビーズ凝集法

表面にカルボキシル基を持つ直径1μmのラテックスビーズ(Polybead Carboxylate Microspheres; Polysciences, Inc.)に抗原としてウシ血清アルブミン(BSA)を結合させた。結合にはCarbodiimide kit (Polysciences, Inc.)を用いた。このラテックスビーズの懸濁液10μlを丸底の96穴マイクロプレートに入れ、さらに適当な濃度の抗体溶液40μlを加えた後、室温で静置してビーズの凝集を観察した。

②Ouchterlony法

ガラス上に寒天(PBS中に0.5-1% Agarを溶解させたもの)を厚さ1mmになるように敷き、パンチした穴に段階希釈した抗体溶液あるいは抗原溶液を5μl加えた。室温で一晩静置した後、形成された沈降線を観察した。

2-4. 抗体の分子サイズの測定

各種条件下での抗体の分子サイズは、以下の3つの方法により推定した。

①Sephacryl S-300(Pharmacia)によるゲルろ過クロマトグラフィー

②TSK-gel G3000SW(Tosoh)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

③レーザー光散乱装置(Malvern System 4700c オートサイザー)による分子量測定

2-5. 抗体の立体構造変化の検出

高塩濃度下での抗体蛋白質の立体構造変化は、紫外線差スペクトルや自然蛍光スペクトルを比較することによって検出した。

3. 研究結果と考察

3-1. 鶏卵抗体（IgY）の作成とその基本的性質

白色レグホンの産卵鶏に死菌体や蛋白質を抗原として筋肉注射すると、追加免疫（初回免疫の2週間後）によって、血液中の特異的IgY抗体価は上昇をはじめ、4週間から8週間後にその値は最高になった。また、鶏卵卵黄中の抗体価も、血液中の抗体価の上昇より約1週間遅れて上昇した。5～6週目の鶏卵から分離した抗体の力価をELISA法で測定したところ、ELISA値は抗体濃度 $10^{-3}\%$ 付近で上昇し、抗体濃度 $10^{-4}\sim 10^{-5}\%$ 付近でプラトーに達した。このような結果は、大腸菌、サルモネラ菌、マウスやヒトのIgGなどを抗原とした場合もほぼ同様であったが、ウシ胎児血清（FCS）を抗原とした場合のように、抗体の力価が $10^{-2}\sim 10^{-3}\%$ と低い場合もあった（データ省略）。

IgYは哺乳動物のIgGに対応するクラスの抗体であると考えられているが、その構造は顕著に異なっている。表1に示すように、IgYは哺乳動物IgGにくらべてH鎖が大きい（5万に対して7万弱）、H鎖とL鎖の結合様式（S-S結合の位置）が異なる、H鎖の糖鎖の組成や結合位置が異なるなどの構造上の違いがあることが明らかになっている⁹⁾。また、IgYは哺乳動物の補体系を活性化しない、哺乳動物抗体に特異的に結合するプロテインAやGなどと結合しないなど、IgYのユニークな特性も明らかになってきている。

3-2. IgYの高塩濃度下での挙動

(1) 凝集反応

高濃度の塩の存在下でIgY抗体が本当に凝集反応を起こしやすいかどうかについて、ラテックスビーズ凝集法および免疫拡散法（Ouchterlony法）によって検討した。

表2に、BSAでコーティングしたラテックスビーズの抗FCS抗体による凝集反応の結果を示した。ここで用いた抗FCS抗体は「方法」でも述べたように力価の低いものであったため、表1の実験で用いた抗体濃度の範囲では、塩を添加しない場合にはビーズの凝集は認められなかったが、1M NaCl存在下では凝集が認められた。また2M NaCl存在下ではさらに1/2の抗体濃度で顕著な凝集が認められた。

表3には、免疫拡散法を用いた、抗マウスIgG抗体による凝集反応の結果を示した。1Mあるいは2M NaCl存在下では、NaCl非添加時には沈降線が認められなかった0.01%抗体濃度でも沈降線の形成が観察された。

以上の結果から、IgY抗体による凝集反応は確かに高塩濃度下で促進されることが明らかになった。なお、ウサギIgG抗体ではこのような塩感受性は観察されなかった。

(2) 抗原抗体反応

高塩濃度下での高い凝集反応性が抗原抗体反応の促進によるものかどうかを確かめるために、NaCl濃度を変えてELISAを行い、その反応性に及ぼす塩濃度の影響を調べた。

図1に示すように、ELISAでの反応性は塩濃度によって影響を受けず、抗体の抗原結合活性自体が変化しているわけではないことが示された。

（3）分子サイズ

高塩濃度下での凝集性の上昇の原因としては、抗体が多量体を形成し、IgA（2量体）やIgM（5量体）のような多価抗体の如く挙動した可能性が考えられる。そこで、NaCl添加、非添加の各条件下でIgYの分子サイズに変化が起きるかどうかを検討した。

Sephacryl S-300のカラム（φ10X800mm）を50mMリン酸緩衝液（PB）あるいは1 M NaClを含むPBで平衡化した後、試料としてIgYを流したが、IgYの溶出位置には有意な差は認められなかった（データ省略）。

次にTSK-gel G3000SW（φ7.5x300mm）をHPLCポンプに接続し、流速0.5ml/min、室温の条件下で同様の緩衝液で平衡化した後、試料を注入し同条件下で溶出させた。なお、本実験においては、NaCl濃度を1 Mとすると溶液の粘度が上昇しカラム圧が高まることから、NaClは0.5Mとした。表4に示すように、IgYの保持時間は0.5M NaCl存在下で有意に長くなり分子サイズはむしろ減少した結果となった。一方、同じ条件下で分析したヒトIgGでは保持時間の有意な差は観察されなかった。

レーザー光散乱装置によるサイズ測定でも、NaCl添加によるIgY分子の高分子化は認めることができなかった（データ省略）。

以上の結果から、「高塩濃度下でIgYが多量体を形成し、その結果として凝集活性が上昇する」というプロセスは起こっていないものと考えられた。ただし、HPLC分析で保持時間が延長したことは、IgY分子が高塩濃度下でよりコンパクトな形になったり、ゲルと相互作用しやすくなるなど蛋白質の構造に若干の変化が起こったことを示唆するものかもしれない。

（4）立体構造

高塩濃度でのIgYの構造に何らかの顕著な変化が起こっていないかどうかを検討するために、NaCl存在下／非存在下での紫外線差スペクトルとトリプトファンに由来する自然蛍光スペクトルを比較した。差スペクトルでは、220nm付近の吸収に変化が認められたが、蛋白質の3次構造の検討に通常用いられる260～290nm付近での吸収にはほとんど変化がみられなかった。蛍光スペクトルでも塩濃度の差によってほとんど変化が認められなかったことから（データ省略）、高塩濃度下では構造上の大きな変化は起こっていないことが明らかになった。

以上のように、IgY抗体は高い塩濃度で抗原との凝集反応を引き起こしやすいという現象が確認されたにもかかわらず、蛋白質自体に大きな構造上の変化は起こっていないと考えられた。IgYは哺乳動物IgGに比べて等電点が平均1程度低いことが報告されているが

^{10, 11)}、高いイオン強度のもとではIgYに哺乳動物IgGとは異なった荷電状態の変化が起こり、その結果、抗原抗体反応において分子間の相互作用がより進みやすくなったものと推定される。

3-3. 高塩濃度下でのIgY抗体の安定性

高塩濃度下では、抗体の抗原結合活性は変化しないが（図1）、熱やpH変化に対する安定性はどのように変化するかを調べた。

NaCl濃度を変えて抗体溶液を15分加熱し、その後抗体の活性をELISA法で測定した結果を図2Aに示した。IgY抗体の熱安定性は高濃度の塩存在下でもほとんど影響を受けないことが認められた。

一方、低いpH条件下で、NaCl濃度の違うIgY溶液を一晩インキュベートし、その後の抗体活性をELISA法で測定したところ、高塩濃度下ではIgYの酸性での安定性が低下することが明らかになった（図2B）。IgYは、哺乳動物IgGと比較して、酸性側の安定性が若干低い^{12, 13)}、特にその差は塩濃度が高い時に顕著であることを我々は見いだしており（データ省略）、これも、高塩濃度下におけるIgYに特有の何らかの構造的変化を反映しているものと考えられる。

高塩濃度下、酸性条件下でのIgYの安定性低下は、存在する塩（イオン）の種類によっても大きく影響する。図3に示すように、リン酸ナトリウム緩衝液のみでpHを調整した場合には、酸性下でのIgYの抗体活性の低下は余り大きくないが、カリウム、塩素、クエン酸イオンなどが存在する緩衝液中ではその活性低下が顕著であった。どのようなイオンが抗体活性に直接影響しているかは本研究では明らかにすることはできなかったが、IgY抗体のこのようなイオンに対する感受性の高さは、高塩濃度での凝集性上昇といった現象とも何らかの関連があるかもしれない。

4. 今後の課題

IgY抗体の高塩濃度下での高い凝集性は、抗体を用いた凝集反応試験へのIgYの利用性の高さを示すものとして興味深いのが、それ以外の抗体の用途（例えばアフィニティークロマトグラフィーへの抗体の利用）における塩の効果、影響も明らかにする必要がある。高濃度の塩存在下で行うことによって、これらの抗体利用技術の効率が上昇する可能性もあると考えられる。

なお、本研究ではIgYの塩に対する高い感受性（凝集反応性、酸による活性低下）の原因、機構を明らかにすることができなかった。この解明も、重要な今後の課題ということになろう。

5. 文献

- 1) C.Mietens, H.Keinhorst, H.Hilpert et al., *Eur. J. Pediatr.*, 132, 239 (1979).
- 2) T.Ebina, A.Sato, K.Umezu et al., *Med. Microbiol. Immunol.*, 174, 177 (1985).
- 3) C.O.Tacket, G.Losonsky, H.Link et al., *N. Engl. J. Med.*, 318, 1240 (1988).
- 4) C.Bartz, R.H.Conklin, C.B.Tunstall et al., *J. Infect. Dis.*, 142, 439 (1980).
- 5) H.Yokoyama, R.C.Peralta, R.Diaz et al., *Infect.Immun.*, 60, 998 (1992).
- 6) R.C.Peralta, H.Yokoyama, Y.Ikemori et al., *J. Med. Microbiol.*, 41, 29 (1994).
- 7) A.A.Benedict, R.T.Hersh and C.Larson, *J. Immunol.*, 91, 795 (1963).
- 8) H.Hatta, M.Kim and T.Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2531 (1990).
- 9) 清水 誠, *農化誌*, 67, 1430 (1993).
- 10) A.Polson, M.B.von Wechmar and G.Fazakerley, *Immunol. Commun.*, 9, 495 (1980).
- 11) M.R.Loeken and T.F.Roth, *Immunology*, 41, 21 (1983).
- 12) M.Shimizu, H.Nagashima, K.Sano et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 270 (1992).
- 13) M.Shimizu, H.Nagashima and K.Hashimoto, *Comp.Biochem.Physiol.*, 106B, 255 (1993).

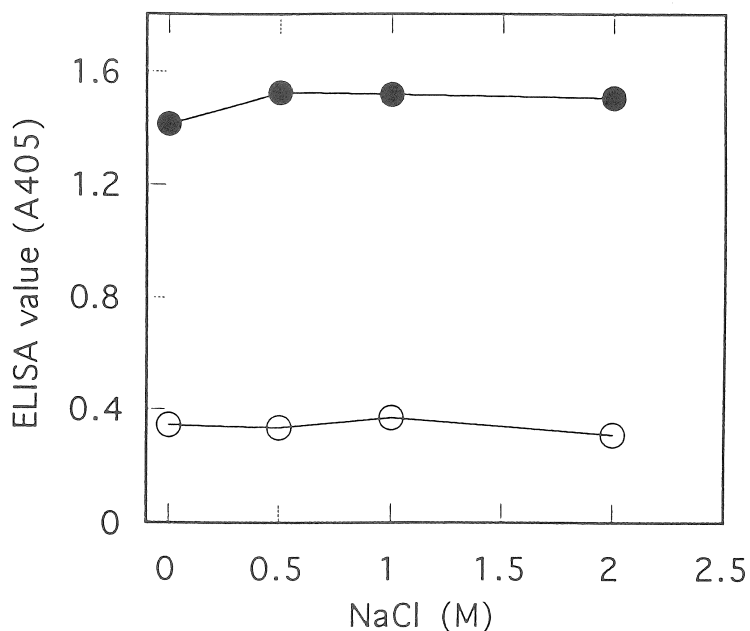


Fig. 1. Effect of NaCl on the reactivity of IgY antibody.
ELISA was performed using an antibody solution of 0.001% (●) or 0.0001% (○).

Table 1. Major structural differences between chicken IgY and mammalian IgGs deduced from their amino acid sequences.

	Chicken IgY	Rabbit IgG	Sheep IgG
Number of amino acid residues			
Heavy chain	559	440	446
Light chain	206	214	215
Number of CH domains	4	3	3
Positions of intermolecular S-S	Cys 243 Cys 331(?) Cys 338(?)	Cys 224	Cys 223
Possible N-glycosylation site in the heavy chain	299 and 398	291	294

Table 2. Agglutination by IgY antibodies in the presence or absence of high concentrations of NaCl.

A bovine serum albumin (BSA) solution was mixed with different concentrations of an anti-BSA IgY solution and allowed to stand at room temperature for 1 or 2 hr before observation of the agglutination. (+), agglutinated; (-), not agglutinated.

	NaCl conc.(M)	antibody concentration(%)				
		0.025	0.05	0.1	0.2	0.4
1 hr	0M	-	-	-	-	-
	1M	-	-	-	-	+
	2M	-	-	-	+	+
2 hr	0M	-	-	-	-	-
	1M	-	-	-	+	+
	2M	-	-	+	+	+

Table 3. Formation of precipitin lines by IgY antibodies.

A mouse IgG solution and anti-mouse IgG IgY solution were allowed to diffuse in an agar plate (Ouchterlony method) and the precipitin lines were observed after overnight incubation.

NaCl conc.(M)	antibody concentration(%)		
	0.01	0.05	0.1
0M	-	+	+
1M	+	+	+
2M	+	+	+

Table 4. Behavior of IgY and human IgG in gel filtration on TSK-gel G3000SW.

	50mM phosphate buffer	50mM phosphate buffer containing 0.5 M NaCl
	Elution time (min)	
IgY	27.27 ± 0.52	28.36 ± 0.28
Human IgG	30.19 ± 0.27	29.85 ± 0.51

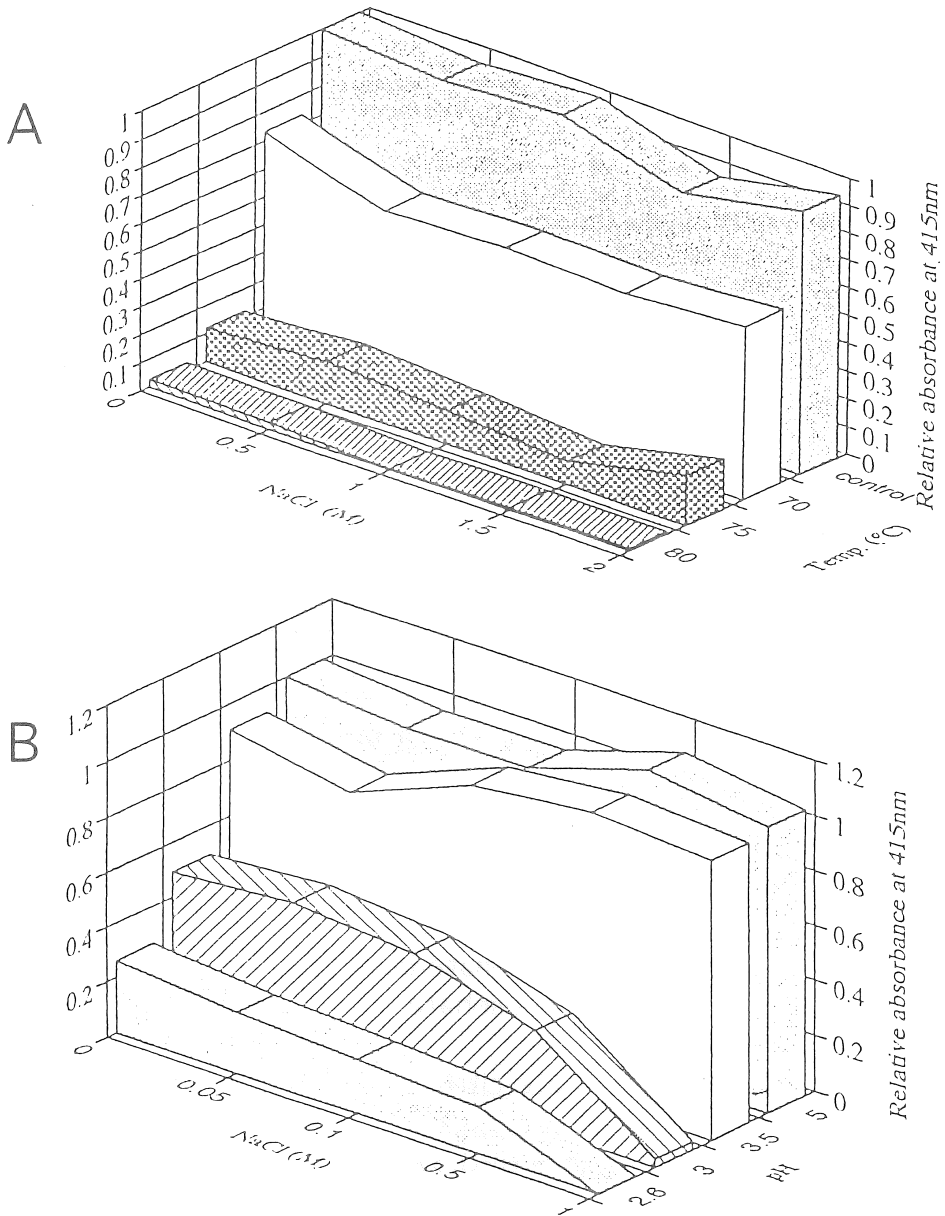


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on the reactivity of IgY antibody after heating for 15 min (A) or after incubating overnight under acidic conditions (B).

The antibody activity was measured by ELISA and expressed as the relative absorbance at 415 nm. The ELISA absorbance for the IgY antibody solution at neutral pH, without adding NaCl and without heating, was used as control.

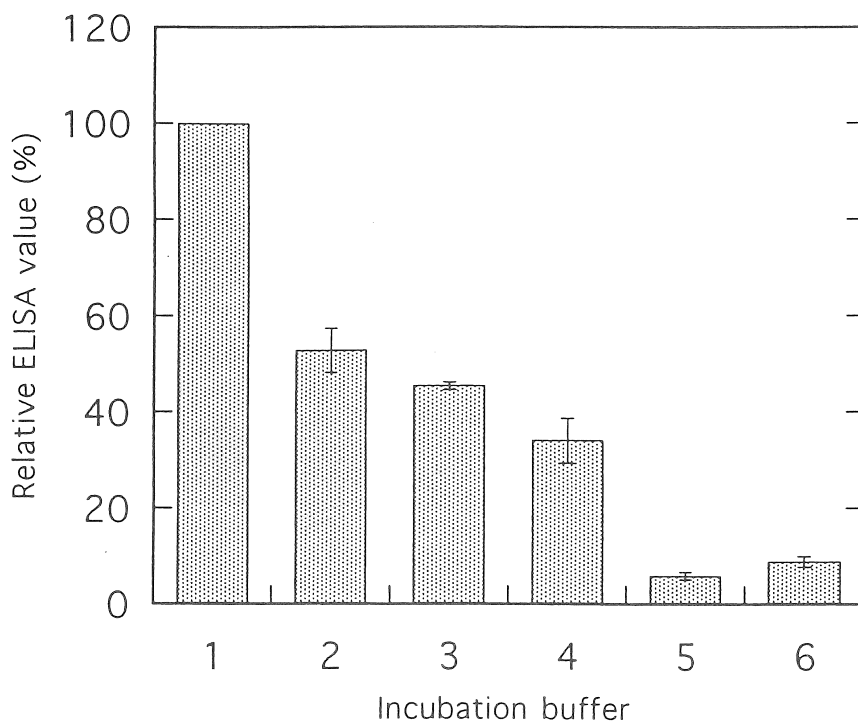


Fig. 3. Acid stability of IgY antibody in different buffer solutions.

- (1) PBS, pH 7.2 (control)
- (2) 50mM sodium phosphate buffer, pH 3.0
- (3) 100mM sodium phosphate buffer, pH 3.0
- (4) PBS-HCl, pH 3.0
- (5) sodium phosphate-citric acid-KCl buffer (I=0.25), pH 3.0
- (6) same as buffer 5 (I=0.5), pH 3.0

Effect of Salt on the Structure and Function of Egg Yolk Antibody

Makoto Shimizu

Department of Applied Biological Chemistry, Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Egg yolk is a good source of immunoglobulins, one egg containing more than 100 mg of IgG-type immunoglobulins (called IgY). The IgY antibody is therefore expected to be used for passive immune foods and for various processes in food technology. However, IgY has been only partially characterized and effects of food processing or storage conditions on the properties of IgY have not been well understood. It is necessary to characterize IgY more in detail for the use of IgY in food industry.

One of the interesting properties of IgY already reported is its high agglutination activity in a high salt solution, although the reason of this high agglutinability is not known. In this study, the effect of high concentrations of salt on the behavior of IgY was investigated.

Agglutination of antigen-coated latex microparticles by IgY antibodies was enhanced by adding 1~2 M NaCl. Precipitin line formation by immunodiffusion in an agar plate was also enhanced by high concentrations of NaCl. In spite of the high agglutination activity of IgY in high salt solutions, the reactivity itself between IgY antibodies and antigens measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was not changed by the addition of salt. Gel filtration and Laser light-scattering analyses demonstrated that polymer formation of IgY antibodies, which would produce multivalent antibody complexes, was not occurred by addition of salt. UV and fluorescence spectra indicated that no distinctive change in the conformation of IgY happened in high salt solutions. The high agglutination activity was therefore due to subtle changes in the electrical charges of the IgY molecule in the presence of high concentrations of salt.

The stability of IgY, especially under acidic conditions, was shown to be decreased by adding salt. The acid stability of IgY was variable depending on the ions contained in the acidic solutions. The activity of IgY antibodies seemed to be markedly reduced in the presence of potassium, chloride or citrate ions. The high sensitivity of IgY antibodies to such ions may relate to its unique agglutinability in the presence of high concentrations of salt.