

令和 5 年 9 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H01614

研究課題名(和文) 重篤なアレルギー症状に関与する甲殻類アレルゲン構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of crustacean allergen structure associated with severe allergic symptoms

研究代表者

丸山 伸之 (MARUYAMA, NOBUYUKI)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90303908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：食物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いる。特に、甲殻類は国内外の食物アレルギーの原因食品として重要である。我々は甲殻類のアレルゲンと臨床的病型との関係について解析し、部分的にそれらの関係を明らかにした。また、臨床症状との関係について指摘されている構造的エピトープについて、カルシウム結合性タンパク質を対象に解析に利用できる小型抗体を探索し、そのスクリーニングに成功するとともに、その組換えタンパク質についても作製した。これらの研究を発展させることにより、甲殻類の様々な臨床的病型に関わるアレルゲンの同定と、甲殻類アレルギーの臨床型とエピトープの関係を解明することに寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲殻類アレルギーは国内外で非常に重要な研究対象であり、ゲノム編集などの新技術による安全な食素材の開発やアレルゲン性を低減化する調理法の開発にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The number of people suffering from food allergies continues to increase worldwide. Crustaceans are particularly important as a causative food for food allergy both domestically and internationally. We analyzed the relationship between crustacean allergens and clinical types and partially clarified their relationship. In addition, we have successfully screened small antibodies against calcium-binding proteins for analyzing conformational epitopes that have been implicated in clinical symptoms, and have also produced the recombinant proteins. By expanding on these studies, we will contribute to the identification of allergens involved in various clinical forms of crustacean allergy and to the elucidation of the relationship between clinical types of crustacean allergy and epitopes.

研究分野：Food allergy

キーワード：allergen food antibody

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象である。食物アレルギーに罹患する患者数は世界で増加の一途をたどっている。多くは IgE 抗体に依存して誘発されており、いくつかの臨床的病型に分類される。食物アレルギーの典型的なタイプとされるのが、即時型症状である。症状としては、皮膚、粘膜、呼吸器、消化器、循環器など多岐に渡り、アナフィラキシーの症状を示すこともある(1)。原因食物を摂取後に運動することによりアナフィラキシーが誘発される場合には、食物依存的運動誘発アナフィラキシーとして分類される。一方、口腔内症状を中心として誘発されるものは、即時型症状とは区別しており、口腔アレルギー症候群とされる。このような IgE 抗体依存的な食物アレルギーの臨床的病型の診断のために、食物アレルギーに関与する抗原やそのエピトープの解析は非常に重要である。また、これらの解析は食物アレルギーの免疫療法にも貢献する。

甲殻類は、国内の食物アレルギーの原因食品として第 8 位であり、18 歳以降の新規発症の原因食品として第 1 位である。このように、甲殻類は学童期以降における重要な食物アレルギーの原因食品となっている。即時型症状の頻度も高いが、小麦と並んで食物依存的運動誘発アナフィラキシーの主要な原因食品でもある(1,2)。甲殻類の代表的なアレルゲンは、トロポミオシン、アルギニンキナーゼ、ミオシン軽鎖、カルシウム結合性タンパク質、トロポニン C、トリオースリン酸イソメラーゼなどである(3)。さらに、ヘモシアニン、脂肪酸結合タンパク質なども同定されている(4,5)。これらのアレルゲンはタンパク質ファミリーに属し、筋原繊維タンパク質であるトロポミオシンは、トロポミオシンファミリーに属している(6)。また、昆虫類やダニ類との交差抗原性についても指摘されている。アルギニンキナーゼはリン酸転移に関わる酵素であり、ミオシン軽鎖、カルシウム結合性蛋白質、トロポニン C などは EF-hand ファミリーに属する。EF-hand とはカルシウムの結合に関わるモチーフであり、甲殻類アレルゲンの構造を構成することが比較的多い。このように多くのアレルゲンが甲殻類において同定されているにも関わらず、アレルゲンの種類と臨床的病型との関係は診断に利用できるほど明らかになっていない。

これまで一次構造に基づく連続性エピトープについて比較的多くの解析が行われてきた。しかし、多くのアレルゲンにおいて臨床症状との関係性が指摘されている構造的エピトープについては報告が少ない。甲殻類のアレルゲンの中には加工や調理の熱処理に耐性をもつものがあり(7)、そのようなアレルゲンには構造的エピトープが存在することが示唆される。臨床症状との関係する可能性が高いため、甲殻類においても構造的エピトープの解析を進展させることが重要であり、そのために新たなエピトープの解析法についても開発することが望まれている。

2. 研究の目的

トロポミオシン、アルギニンキナーゼ、ミオシン軽鎖、カルシウム結合性タンパク質、トロポニン C、ヘモシアニンなどの主要なアレルゲンに対する特異的 IgE 抗体価を測定し、それらに基づいて臨床的病型とアレルゲンとの関係について知見を得ることを目的とする。また、カルシウム結合性タンパク質について高次構造とアレルゲン性との関係が指摘されている。構造的エピトープの解析の解明に寄与するために、アレルギー症状に関与する血清中の IgE 抗体とアレルゲンの分子表面との相互作用を解析できる小型抗体を作製することについても目的とする。

3. 研究の方法

(1) エピトープ抗原に対する特異的 IgE 抗体価の測定

これまでブラックタイガーのアレルゲンである Pen m 1 (トロポミオシン)、Pen m 2 (アルギニンキナーゼ)、Pen m 3 (ミオシン軽鎖)、Pen m 4 (カルシウム結合性タンパク質)、Pen m 6 (トロポニン C)、Pen m 7 (ヘモシアニン) についての組換えタンパク質を主に大腸菌発現系を用いて調製した。それらと、収集した甲殻類アレルギー患者血清に対して、蛍光 ELISA 法により血清中の特異的 IgE 抗体価を測定した。

(2) カルシウム結合性タンパク質の調製

ピキア酵母を用いて Pen m 4 について発現系を構築した。Pen m 4 の遺伝子にヒスチジンタグを付加したものを人工合成し、発現ベクターに挿入した。酵母株にエレクトロポレーション法で形質転換した後、抗生物質耐性の単一コロニーを選抜し、28 °C の条件下で培養した。メタノールを含む培地で継続して誘導した後、遠心分離を行うことにより培養液を回収し、硫酸アンモニウムを加えた。遠心分離により発現タンパク質を含む沈殿を分画し、PBS 緩衝液に対して透析を行った。透析後、HisTrap FF crude (Cytiva) および HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg(Cytiva) に供した。SDS-PAGE およびタグに対するウェスタンブロットによってフラクションを分析した。

(3) カルシウム結合性タンパク質のビオチン化

Pen m 4 を化学架橋剤である EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Scientific)を用いてビオチン化した。PBS により 10mM Sulfo-NHS-LC-Biotin 溶液を調製し、Pen m 4 と混合し、室温で約 30 分反応させた。未反応の Sulfo-NHS-LC-Biotin については PBS に対して透析することにより

除去した。

(4) カルシウム結合性タンパク質に対する小型抗体の探索

酵母表面ディスプレイライブラリーより Pen m 4 に対する小型抗体を探索した(8)。タグ付き小型抗体を表示し、その発現は誘導性 Gal プロモーターによって制御される。最初のスクリーニングでは、 1×10^{10} の酵母を YEP-ガラクトース・トリプトファン ドロップアウト培地で 48 時間培養した。次に、スクリーニング用緩衝液で洗浄を行った。ストレプトアビジンマイクロビーズを含むスクリーニング用緩衝液に酵母を懸濁した。さらに、氷中でインキュベートしたのち、スクリーニング用緩衝液で洗浄し、MACS LS カラム (Miltenyi) を用いてストレプトアビジンマイクロビーズと相互作用する酵母を除去することによりセクションを行った。次に、酵母をビオチン化 Pen m 4 を含むスクリーニング用緩衝液に再懸濁した。インキュベートし、スクリーニング用緩衝液で洗浄してから、ストレプトアビジンマイクロビーズを含むスクリーニング用緩衝液に再懸濁した。さらに、スクリーニング用緩衝液で洗浄し、洗浄後のビオチン化 Pen m 4 とストレプトアビジンマイクロビーズとの複合体を MACS LS カラム (Miltenyi) に結合させた。回収後に YEP-グルコース (-Trp) 培地で一晩培養を行った。同様の操作によりスクリーニングを繰り返した。3 回目のスクリーニング後にプレートにシングルコロニーを形成させて、それらに対して PCR を行った。

(5) 小型抗体およびカルシウム結合性タンパク質の構造予測

スクリーニングにより得られた Pen m 4 に結合する小型抗体の候補分子を提示可能な酵母から Pen m 4 に対する遺伝子を同定し、その配列から推定されるアミノ酸配列を用いて ColabFold2 で構造予測を行った(9,10)。また、Pen m 4 についても同様に構造予測を行った。推定されたモデルの PDB ファイルを解析に用いた。

4. 研究成果

(1) エピアレルギーの抗原と臨床型の特徴

Pen m 1、Pen m 2、Pen m 3、Pen m 4、Pen m 6、Pen m 7 についての組換えタンパク質を調製した。Pen m 1 の甲殻類アレルギー患者に対する感作頻度が高いことが示された。これらの患者は、エビ以外の甲殻類のエキスで広く陽性を示した。原因食品を生でも加熱しても反応性を示した患者が多く、また、Pen m 1 単独感作の患者の中には食物依存的運動誘発アナフィラキシーの患者と即時型症状であった。Pen m 1 とともに Pen m 2 の陽性例も多く、Pen m 2 単独陽性も複数検出された。その中には食物依存的運動誘発アナフィラキシーを示す患者が含まれていた。また、食物依存的運動誘発アナフィラキシー以外の患者は口腔症状と全身症状を示した。生食を回避することにより症状発症を回避できる患者も存在していた。このように今回解析した患者群では Pen m 1 と Pen m 2 の感作頻度が多く、それらに次いで Pen m 6 と Pen m 7 が多いという特徴がみられた。

(2) 組換え型カルシウム結合性タンパク質の調製

以前解析した患者群では Pen m 4 についても比較的感作頻度が高い傾向が示されており、カルシウム結合性タンパク質も甲殻類において重要なアレルゲンであることを確認している。また、カルシウム結合に伴う高次構造とアレルゲン性との関係についても指摘されている(7)。そのため、Pen m 4 について連続性エピトープに加え、構造的エピトープが症状誘発に関わっている可能性が考えられる。そこで、Pen m 4 を、構造的エピトープを解析するための小型抗体の作製対象とした。まず、ピキア酵母を用いて Pen m 4 に対する組換えタンパク質を調製した。培地に分泌させるように ファクターのリーダー配列を利用する発現ベクターである pPICZalpha を用いた。メタノールを添加しつつ培養を継続し、培養液の SDS-PAGE から目的のサイズのバンドが検出された。さらに、培養液の濃縮物を HisTrap FF crude カラムに供したところ、目的のバンドを示すタンパク質がカラムに吸着し、イミダゾールにより溶出された。ヒスタジンタグに対する抗体を用いたウェスタンブロットにおいてもヒスタグが付加されていることが確認された。さらに、HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg によるゲルろ過クロマトグラフィーを行い、純度の高い組換え型 Pen m 4 を調製した。

(3) カルシウム結合性タンパク質のビオチン化

小型抗体のスクリーニングのために、Pen m 4 をビオチン化する必要がある。そこで、Pen m 4 をビオチン化処理した後、透析を行った試料について SDS-PAGE において確認したところ、ビオチン化により移動度の変化が起きていることを確認した。さらに、ELISA 法により Pen m 4 に対して感作されている患者血清を用いて、ビオチン化 Pen m 4 に対しても甲殻類アレルギー患者の血清中の特異的 IgE 抗体と結合することを確認した。このことは、作製したビオチン化 Pen m 4 が IgE 抗体結合性を示し、構造的エピトープの解析に利用できることを示唆している。

(4) カルシウム結合性タンパク質に対する小型抗体のスクリーニング

酵母表面ディスプレイライブラリーからのネガティブおよびポジティブセクションによる 3 回のスクリーニングを繰り返し、Pen m 4 に対して親和性をもつ小型抗体の候補分子を提示する

酵母を取得した。取得した酵母の保有する小型抗体をコードする遺伝子配列を同定するために、大腸菌発現用ベクターへの挿入を考慮し、小型抗体とベクターの両方を含むプライマーを用いて PCR を行った。解析したコロニーの中に小型抗体の遺伝子に対するサイズの PCR 産物を増幅するものが検出され、その遺伝子配列についてシーケンスしたところ小型抗体をコードする遺伝子であることを確認できた。以上より、Pen m 4 に対して親和性をもつ小型抗体の候補を取得した。

(5) カルシウム結合性タンパク質に対する小型抗体

Pen m 4 に対する小型抗体の構造予測を行い、予測構造には 3 ケ所の相補性決定領域が分子表面に存在していることが確認できた。これらの領域により Pen m 4 と相互作用しうるものと考えられる。さらに、ヒスチジンタグを有する Pen m 4 に対する小型抗体の組換えタンパク質を発現できる大腸菌発現系を構築した。アフィニティーカラムを用いて推定される分子量に近いサイズを示す組換え型小型抗体を精製された。本研究で作製した小型抗体と Pen m 4 の組換えタンパク質を用いて、両分子の相互作用の解析などを行う。

(6) 考察

本研究では、甲殻類アレルゲンに対してアレルゲンの種類と臨床的病型との関係について知見を得た。また、カルシウム結合タンパク質に対する小型抗体の候補分子を作製した。これらの研究成果は、それぞれの臨床的病型に関わるアレルゲンの同定と、それらの臨床型とエピトープの関係を解明することに寄与する。甲殻類は国内外で非常に重要な食物アレルギーの研究対象であり、将来的には昆虫食との交差する抗原の同定やそれらの交差反応についても調査する必要がある。また、本研究での成果は、ゲノム編集などの新技術による安全な食素材の開発やアレルゲン性を低減化する調理法の開発にも寄与することが期待される。

<引用文献>

Ebisawa M. JAPANESE GUIDELINES FOR FOOD ALLERGY 2021 FROM CHILDHOOD TO ADULTHOOD. *Allergy* 2022;71(10):1195-1200.

Akimoto S, Yokooji T, Ogino R, Chinuki Y, Taogoshi T, Adachi A, Morita E, Matsuo H. Identification of allergens for food-dependent exercise-induced anaphylaxis to shrimp. *Sci Rep* 2021; 11: 5400.

Molecular Allergology User 's Guide 2.0. 2022. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology.

Wai CYY, Leung NYH, Leung ASY, Ngai SM, Pacharn P, Yau YS, Rosa Duque JSD, Kwan MYW, Jirapongsananuruk O, Chan WH, Chua GT, Lee QU, Piboonpocanun S, Ho PK, Wong JSC, Li S, Xu KJY, Wong GWK, Chu KH, Leung PSC, Vichyanond P, Leung TF. Comprehending the allergen repertoire of shrimp for precision molecular diagnosis of shrimp allergy. *Allergy* 2022;77:3041-3051.

Johnston E, Kamath S, Iyer S, Pratap K, Karnaneedi S, Taki A, Nugraha R, Schaeffer P, Rolland J, O'Hehir R, Lopata A. Defining specific allergens for improved component-resolved diagnosis of shrimp allergy in adults. *Mol Immunol*. 2019;112:330-337.

Faber M, Pascal M, Kharbouchi O, Sabato V, Hagendorens M, Decuyper I, Bridts C, Ebo D. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy* 2017;72:842-848.

Zhao J, Zhu W, Zeng J, Liu Y, Li H, Wang H, Zhang Z, Lin H, Li Z. Insight into the mechanism of allergenicity decreasing in recombinant sarcoplasmic calcium-binding protein from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with thermal processing via spectroscopy and molecular dynamics simulation techniques. *Food Res Int*. 2022; 157:111427.

Valdés-Tresanco M, Molina-Zapata A, González Pose A, Moreno E. Structural Insights into the Design of Synthetic Nanobody Libraries. *Molecules* 2022;27:2198.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Zidek A, Potapenko A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021;596: 583-589.

Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 2022;19(6):679-682.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nobuyuki Maruyama
2. 発表標題 Novel components to diagnose food allergy
3. 学会等名 2022 International Congress of 50th Anniversary KAAACI (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuyuki Maruyama
2. 発表標題 Allergen components to diagnose food allergy
3. 学会等名 49th PHILIPPINE SOCIETY OF BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY Annual Convention (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福富 友馬 (FYKUTOMI YUMA) (30463110)	独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・アレルギー研究室・室長 (82710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------