

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度
課題番号：18390043
研究課題名：(和文) 環境中アレルゲンの一次構造並びに高次構造を認識する高感度エピトープ解析手法の開発
研究課題名：(英文) Development of high sensitive analyzing methods for linear- and conformational-epitope of environmental allergens
研究代表者：手島 玲子(TESHIMA REIKO)
国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・部長
研究者番号：50132882

研究成果の概要：① フェージディスプレイ法で同定したソバ主要アレルゲンで 2S アルブミンである 16-kDa タンパク質(BWp16)の、エピトープの候補領域を確認した。②くるみ及びダイズの主要アレルゲン、2S アルブミン及び GlymBd30k の単離を行い、エピトープ解析に供した。③ バイオインフォマティクス手法による既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルゲンエピトープ予測法に関して、タンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)B 因子、並びに抗体との結合部の確率を併用することで、アレルゲンエピトープ予測の精度の上昇が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	7,500,000	0	7,500,000
平成 19 年度	4,100,000	0	4,100,000
平成 20 年度	3,300,000	0	3,300,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	0	14,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境アレルゲン, バイテクノロジー, バイオインフォマティクス, エピトープ, 免疫学

1. 研究開始当初の背景

研究開始当時において、アレルゲンとして同定されているタンパク質は、800 種程度あったが、この内、エピトープの解析の進んでいるものは、30 種程度で、まだまだ、十分な解析の進んでいないのが現状であった。また、バイオテクノロジーの発展により、今まで、人類が食した経験のない新規産生タンパク質も、食品等に導入されてくることとなり、環境中タンパク質の、アレルゲン性の

予測を行なうに際し、エピトープ予想の行なえるシステムを作ることが、重要な課題であった。

2. 研究の目的

本研究は、環境中アレルゲンの一次構造並びに高次構造を認識する高感度エピトープ解析手法の開発を行うことにより、アレルゲン性の低減化を行なうこと、及び新規タンパク質のアレルゲン性の予測を行なうこと

を目的に、以下の3点の研究を主に行った。

すなわち、(i) 立体構造エピトープ (conformational epitope) を含むアレルゲンのミモトープ等のファージディスプレイ法を用いて網羅的に解析する実験方法の開発、(ii) (i) のミモトープ法等で得られた中で、IgE 抗体の結合する一次構造エピトープ (linear epitope) をペプチドチップに固定し、高感度に多数の患者血清との反応性を調べる解析法の開発、(iii) バイオインフォマティクス手法を利用してエピトープモチーフを抽出し、局所配列、立体構造などから、エピトープを予測するための方法の開発、である。

3. 研究の方法

(1) ファージディスプレイ法を用いる立体構造を含むエピトープを解析する手法の開発—そば主要アレルゲンであるペプシン耐性を有する16-kDaタンパク質のcDNAを大腸菌に組込み、組換えタンパクの発現、精製を行う。ランダムなアミノ酸配列を有するペプチドを提示しているM13ファージライブラリーを用いて、16kDaタンパクのエピトープ様の配列 (ミモトープ) を同定する。ファージディスプレイ法により得られたエピトープ配列をペプチドの段階的重複鎖 (overlapping peptide) を固定した (spot) 膜を用いて同定した一次構造エピトープ配列と比較し、立体並びに直鎖型のエピトープを同定する。

(2) 野生型組換えアレルゲンタンパク質及びその変異体の大腸菌での作製を行い、IgE結合能、好塩基球ヒスタミン遊離能の野生型との比較によるアレルゲン性をもつための分子レベルでの性質の解析—上記で得られたエピトープの、IgE結合性を確認するため、得られたエピトープ配列等に変異を導入した組換え16-kDaタンパク質を作製し、そばアレルギー患者IgEとの反応性を検討し、エピトープを確定する。

(3) 本研究で得られたエピトープ情報並びに既存のアレルゲンのエピトープ情報から、アレルゲンのエピトープ付近に特徴的なアミノ酸配列の物理化学的因子の特徴を解明し、任意のアミノ酸配列の中にエピトープがあるかどうかを推定する方法の開発—立体構造の分かっているタンパク質のアミノ酸配列から、立体構造と相関を持つアミノ酸配列の特徴をまず解析し、その条件下でのアレルゲンのモチーフを探索する。

(4) そば以外のアレルゲンの主要アレルゲンの解析—これから、遺伝子改変植物等の開発が予想される、魚、コメ、ダイズの主要アレルゲンの解析を行なう。また、アレルゲン性物質の表示対象になることが予想されるクルミについてもその主要アレルゲンを解析した。手法としては、主に二次元電気泳動の手

法にて試料中のタンパク質の分離を行い、アレルギー患者血清中のIgE抗体が認識するタンパク質をウェスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) ファージディスプレイ法を用いる立体構造を含むエピトープを解析する手法の開発

—そば主要アレルゲンであるペプシン耐性を有する16-kDaタンパク質のcDNAを大腸菌に組込み、組換えタンパクの発現、精製を行った。12個のランダムなアミノ酸配列を有するペプチドを提示しているM13ファージライブラリーを用いて、16kDaタンパクのエピトープ様の配列 (ミモトープ) を同定し、ペプチドの段階的重複鎖 (overlapping peptide) を固定した (spot) 膜を用いて得られた一次構造エピトープ配列との比較を行った。ミモトープで同定したそば主要アレルゲンである16-kDaタンパク質 (BWp16) の、エピトープの候補領域のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成し、一部の變異体でIgE抗体との結合活性の減少を確認した。その結果、BWp16の10個のシステイン残基のうち、中心近くに存在する65及び66のシステインをセリン残基に替えた変異体において、BWp16と血清との反応性の低下、消化に対する抵抗性の低下が確認された。

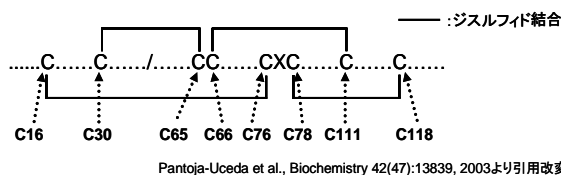


図1 2S アルブミンファミリーのジスルフィド結合。太字は予想されるBWp16のシステイン残基の番号を示す。

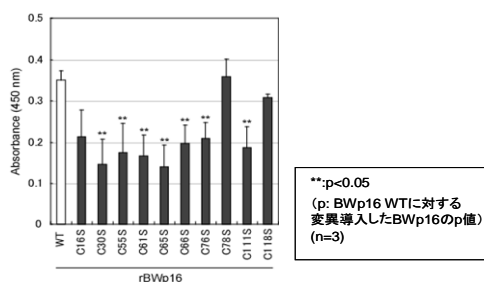


図2 システイン残基に変異導入した組換えBWp16とマウス抗BWp16抗体との反応性。

(2) 野生型組換えアレルゲンタンパク質及びその変異体の大腸菌での作製—アレルゲンの立体エピトープの形成に関与すると思われるシステイン残基の変異体を作成し、そばアレルギー患者IgE抗体との反応性を検討し、システイン残基の立体エピトープへの関与の有無を検討し、特定の位置のシステイン残基による分子内ジスルフィド結合が、IgE抗体と

の結合活性、ペプシン分解性に大きく影響を与えることが判明した。立体エピトープの形成に関与すると思われるシステイン残基のシングル及びダブル変異体を作成し、そばアレルギー患者IgE抗体との反応性を検討し、特定の位置のシステイン残基による分子内ジスルフィド結合の、IgE抗体との結合活性を検討した。また、リニアエピトープの候補領域(K98~E106)のアミノ酸の変異体(アラニンへの変異体)について、IgE抗体との結合活性を検討し、E99A, D103AでIgE結合活性の低下が観察された。

BWp16の構造解析を行うために、N末端部のアミノ酸を切断したΔN-rBWp16を大腸菌に発現させ、精製後、結晶を形成させてからX線による構造解析を行い、2Sアルブミンに特徴的なα-ヘリックス構造を有することが判明した。また、精製したrBWp16に対する単クローン抗体を用いて抗原抗体複合体の構造解析に着手した。

(3) アレルゲンのエピトープ付近に特徴的なアミノ酸配列の物理化学的因子の特徴の解明 --- バイオインフォマティクス手法による既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルゲンエピトープ予測法の検討を開始した。AUFインデックスのプロットのピークは、二次構造の端に近いところに存在していることが確認された。バイオインフォマティクス手法による既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルゲンエピトープ予測法に関して、タンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)B因子、並びに抗体との結合部の確率を併用することで、アレルゲンエピトープ予測の精度の上昇が確認された。

(4) そば以外のアレルゲンの主要アレルゲンの解析 --- これから、遺伝子改変体の開発が予想されるさけ、コメ、ダイズの主要アレルゲンの解析を行った。手法としては、二次元電気泳動にて試料中のタンパク質の分離を行い、それぞれの食品に対するアレルギー患者血清中のIgE抗体が認識するタンパク質をウェスタンブロット法で解析した。さけでは、コラーゲン、パルブアルブミンに加え、アルドラーゼもアレルゲンの候補として考えられた。コメでは、アミラーゼインヒビター、グリオキサレースに加え、50-60kDaタンパク質もアレルゲンの候補として考えられた。アレルゲンとして報告のない50-60kDa IgE結合タンパク質については、トリプシン消化後、LC/MS/MSでタンパク質の同定を行った。ダイズでは、主要アレルゲンGlymBd30kの単離を行い、性質を調べると共に、タンパク質に対する抗体を作成し性質の解析を行った。また、アレルゲン性物質の表示対象になることが予想されるクルミについては、主

要アレルゲンである2Sアルブミンの単離を行い、性質を調べると共に、タンパク質に対する抗体を作成し性質し、ELISAによる測定系を開発した。

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7件)

- ① Satoh R., Koyano S., Takagi K., Nakamura R., Teshima R., Sawada J, Immunological Characterization and mutational analysis of the recombinant protein BWp16, a major allergen buckwheat. Biol. Pharm. Bull. 31(6), 1079-1085 (2008) 査読有
- ② Doi H., Touhata Y., Sakai S., Urisu A., Akiyama H. Teshima R. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of walnut proteins in processed foods. J. Agric. Food Chem. 56(17) 7625-7630(2008) 査読有
- ③ Morishita N., Kamiya K., Matsumoto T., Teshima R. et al. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of soybean proteins in processed foods. J. Agric. Food Chem. 56(16), 6818-6824(2008) 査読有
- ④ 手島玲子, ソバ主要アレルゲンの解析, アレルギーの臨床(2009) in press 査読無
- ⑤ 佐藤里絵, そばに含まれるアレルギー物質, 理大科学フォーラム(2008) (8) 52-59 査読無
- ⑥ Koyano S., Takagi K., Teshima R., Sawada J. Molecular cloning of cDNA recombinant protein expression and characterization of buckwheat 16-kDs major allergen. Int. Arch. Allergy Immunol. 140, 73-81 (2006) 査読有
- ⑦ Akiyama H., Sakata K., Teshima R., Sawada J., Maitani T. Profile analysis and immunoglobulin E reactivity of wheat protein hydrolysates. Int. Arch. Allergy Immunol. 140, 36-42(2006) 査読有

[学会発表] (計17件)

- ① 手島玲子, アレルゲン研究の最前線, 日本食品化学学会第15回総会, 学術大会(2009. 5. 29), 東京
- ② 佐藤里絵, 児矢野聡, 高木加代子, 中村里香, 澤田純一, 手島玲子, ソバ主要アレルゲンBWp16の解析, 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2008年11月27日, 東京
- ③ 佐藤里絵, 中村里香, 小松晃, 大島正弘, 手島玲子: トリプトファン含量の高い遺伝子組換えイネのアレルゲン性の解析, 日本生化学第81年会(2008. 12. 11), 神戸

- ④中村亮介、中村里香、手島玲子：アレルギーデータベース ADFS のデータ改訂について、日本薬学会第 129 年会(2009. 3. 26)，京都
- ⑤朝川直行、手島玲子、美宅成樹：アレルギータンパク質の頻出する配列領域の特徴、第 7 回日本蛋白質科学会年会(2007. 5. 26) 仙台
- ⑥Teshima R., Nakamura R: Development of allergen database for food safety (ADFS), HESI new methods workshop (2007, 10. 24), Nice, France
- ⑦中村里香、手島玲子、佐藤里絵、中島紫、川崎ナナ、山口照英、澤田純一、名古屋博之：GM 遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルギー性について、日本生化学第 80 年会(2007. 12. 12)，横浜
- ⑧佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、リコンビナントソバアレルギー Bwp16 の免疫科学的解析、日本生化学第 80 年会 (2007. 12. 12), 横浜
- ⑨佐藤里絵、中村里香、小松晃、大島正弘、手島玲子：高トリプトファン含有遺伝子組換えイネ系統のアレルギー性に関する研究、日本薬学会第 128 年会 (2008. 3. 27)，横浜
- ⑩ Nakamura R., Nakamura R., Teshima R.: Allergen database/Introduction of ADFS, HESI novel protein safety evaluation workshop (2008. 2. 21), Tokyo
- ⑪ Teshima R., Nakamura R., Sato R.; Analysis of allergens and allergenome/ Fish, Rice, HESI novel protein safety evaluation workshop (2008. 2. 21), Tokyo
- ⑫中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：改訂版アレルギーデータベース ADFS (Allergen Database for Food Safety) について、日本薬学会第 127 年会 (2007. 3. 28) 富山
- ⑬ Satoh R., Koyano S., Takagi K., Nakamura R., Teshima R., Sawada J.: Characterization of Bwp16, a candidate major allergen in buckwheat, 2nd International Symposium on Molecular Allergology (2007. 4. 23) Roma, Italy
- ⑭中村里香、手島玲子、佐藤里絵、澤田純一、名古屋博之、遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルギー性について、日本薬学会第 127 年会 (2007. 3. 28) 富山
- ⑮佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、ソバアレルギー Bwp16 の解析、日本薬学会第 127 年会 (2007. 3. 28) 富山
- ⑯ 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、ソバ主要アレルギー Bwp16 の解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006. 12)
- ⑰手島玲子 児矢野聡 中村里香 中村亮介 佐藤里絵 高木加代子 澤田純一、そば 16kDa アレルギーの組換えタンパク質の調製と免疫学的特性の検討、第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2006. 11. 4) 東京

〔図書〕 (計 1 件)

手島玲子 食品アレルギー (そば), 「食品・免疫アレルギーの事典」上野川修一編集, 朝倉書店 in press (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手島 玲子 (TESHIMA REIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・部長

研究者番号：50132882

(2) 研究分担者

美宅 成樹 (MITAKU SHIGEKI)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：10107542

中村 亮介 (NAKAMURA RYOSUKE)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官

研究者番号：50333357

佐藤 里絵 (SATO RIE)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・リサーチレジデント

研究者番号：10399371