

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580151

研究課題名（和文）植物性アレルゲンにおける糖鎖構造と共通抗原性との関連性に関する研究

研究課題名（英文）Relationship between the common epitope and the structure of sugar chains in plant allergens

研究代表者

辻 英明（TSUJI HIDEAKI）

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：20093875

研究成果の概要（和文）：

大豆アレルゲン Gly m Bd 28K および小麦アレルゲン Tri a Bd 28K の糖鎖構造について検討を行い、いずれのアレルゲンもマンノース、*N*-アセチルグルコサミンを含み、キシロースおよびフコースを含有しており、これらの糖鎖はアスパラ銀結合型糖鎖であり、*N*-アセチルグルコサミン部分にフコースおよびキシロースが結合していることが示された。しかも、この糖鎖を含むペプチドがこれらのアレルゲンと反応する IgE 抗体と特異的に発現することが明らかになった。

また、Gly m Bd 28K のタバコ培養細胞での発現過程で、すでに Gly m Bd 28K の cDNA がクローニングされているが、その cDNA はシグナルペプチドを含んでいるものの、まだ 5' 側の非翻訳領域を含め全長構造は不明であり、その構造の解明が必要となり、検討を行った。その結果、従来知られていたシグナルペプチドに新たに 3 個のアミノ酸残基が追加され、さらに非翻訳領域 20 塩基が明らかになった。この結果は、タバコ培養細胞での当該アレルゲンの発現の基盤を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the allergenicity of soybean allergen, Gly m Bd 28K, and wheat allergen, Tri a Bd 27K. These allergens were shown to contain fucose and xylose in addition to mannose, *N*-acetyl glucosamine, indicating that the sugar moieties of these allergens may be asparagine-linked sugar chain. Furthermore, these sugar moieties were shown to bind IgE antibodies in sera of patients sensitive to soybean and wheat.

The cDNA encoding Gly m Bd 28K has been cloned. However, the cDNA has the part encoding the signal peptide of the precursor for Gly m Bd 28K, but the cDNA has not the perfect cDNA encoding full length of mRNA for the allergen. In the present study, three amino acid residues on the signal peptide and 20-bp on the 5' untranslated region were elucidated by 5' RACE kit. This finding provides useful information on the expression of the allergen in cultivated tobacco cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：大豆、小麦、アレルゲン、糖鎖、共通抗原、発現タンパク質、Gly m Bd 28K、Tri a Bd 27K

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは従来大豆および小麦におけるアレルゲンについて詳細に検討し、その全貌を明らかにした (T. Ogawa et al., Investigation of the IgE-binding proteins in soybean in immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J. Nutr Vitaminol. Sci.*, 37, 555-565 (1995). M. Kimoto et al., Isolation and molecular cloning of a major allergen, Tri a Bd 27K. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press (2008)). また、大豆および小麦における主要なアレルゲンを同定するとともに、興味深い事実を見出している。すなわち大豆アレルゲン Gly m Bd 30K、Gly m Bd 28K および小麦アレルゲン Tri a Bd 17K はいずれもアスパラギン結合型糖タンパク質であり、その糖鎖部分が患者血清中の特異的な IgE 抗体と反応する可能性を見出している。

(2) 私たちは小麦におけるアレルゲンである Tri a Bd 27K および Tri a Bd 36K もアスパラギン結合型糖タンパク質であり、その糖鎖部分がアレルゲン性に関与する可能性を示す根拠を得ている。これらの根拠は小麦および大豆におけるアレルゲンの多くは糖鎖が重要な鍵となりうることを示している。

(3) これまで、花粉アレルゲンならびに幾つかの食物アレルゲンにおける糖タンパク質性アレルゲンにおいてその糖鎖部分がアレルゲン性の重要なエピトープ構造を形成している可能性が指摘されている。この報告および申請者らが得た結果は糖鎖がアレルギー発症において上述の共通抗原の一つとして機能するという魅力ある考え方を提起するものである。しかしながら、糖鎖の正確な化学構造を決めた例は極めて少なく、しかも、そのために糖鎖構造とアレルゲン性 (IgE 抗体との結合性) との関連性については全く解明されていないのが現状である。

(4) 植物における糖タンパク質の糖鎖の構造は比較的単純であり (上図参照)、類似の糖鎖を有するものが数多く存在する。このことは、植物中のアレルゲンの多くは糖鎖を介してアレルゲン性を示すものと考えられるが、

その実態は不明である。これまで、植物性アレルゲンにおける糖鎖とそれらのアレルゲン性との関連性について、申請者の結果を含めて幾つか報告されているが、糖鎖が確かにアレルゲン性に関与することは疑いないものと思われる。結合における糖鎖の化学構造の特徴とアレルゲン性に関する関連性についてはなんら情報を与えてくれない。このように、糖鎖に基づく植物性アレルゲンの課題は依然として混沌としており、そのために植物性アレルゲンによるアレルギーを診断する上でもいろいろな問題点を提起している。

2. 研究の目的

上記の課題を克服するために、大豆アレルゲン Gly m Bd 28K 及び小麦アレルゲン Tri a Bd 27K 糖鎖そのものを切り出してそれを単離するとともに、患者血清中の糖鎖と反応する血清を用いて、糖鎖そのものとそれに特異的な IgE 抗体との反応性を直接検討し、明確にすることにより、当該課題を解決する。

3. 研究の方法

1) 本アレルゲンを大量に調製し、得られたアレルゲンを2通りの方法で処理する。一つはトリプシンなどにより限定水解して糖鎖を保持した糖ペプチドを単離・精製する。この際、結合様式の異なる糖ペプチドも別々に分離して精製する。二つ目は糖鎖の結合様式を決定して構造を解明するため、ヒドラジン分解して糖鎖をアミノピリジル化する。4種類の糖鎖はそれぞれ分離・精製する。構造決定はHPLC、Mass分析、NMRなどを駆使して行う。

2) 1) で得られた4種類の糖ペプチドをニトロセルロース膜などにブロットするかマイクロプレートに吸着させた後、阻害的なELISAまたは直接的なELISAにより糖鎖部分と患者血清中のIgE抗体との反応性を詳細に検討する。

3) この研究中に、これらのアレルゲンの糖鎖の血清中のIgE抗体との反応性を検討するには、大量に発現タンパク質を必要とするので、これをタバコ培養細胞中での発現についても検討した。

4. 研究成果

(1) 大豆アレルゲン Gly m Bd 28K 及び小

麦アレルゲン Tri a Bd 27K についての研究

①大豆アレルゲン Gly m Bd 28K における糖鎖の糖組成分析を行った。その結果、マンノース、N-アセチルグルコサミン、キシロースおよびフコースが3:2:1:1のモル比を示した。N-アセチルガラクトサミンおよびグルコースは認められなかった。この事実は本アレルゲンがアスパラギン結合型糖タンパク質であることを示している。

既に、本アレルゲンに対する cDNA のクローニングには成功しているが、その cDNA を大腸菌にて発現させた発現タンパク質と患者血清との反応性を検討した。発現タンパク質は大豆から直接精製して得られた Gly m Bd 28K と同様に患者血清中の IgE 抗体と反応することが認められた。しかしながら、大腸菌で得られた発現タンパク質と患者血清中の IgE 抗体との反応性は天然型の本アレルゲンのそれと比べると著しく弱かった。このことは、発現タンパク質が糖鎖を保持していないことを考慮すると、患者血清中の IgE 抗体の大半が本アレルゲンの糖鎖と反応するということを示唆している。

そこで、この問題をさらに究明するために、本アレルゲンより糖鎖を含むペプチドの単離を行った。すなわち、大豆より得られた本アレルゲンをリジルエンドペプチダーゼで消化後、C4 カラムを装備した HPLC にて糖ペプチドを単離した。得られた糖ペプチドは本アレルゲンの N 末端から 23 残基からなり、20 番目のアスパラギン残基に糖鎖が結合していることが明らかになった。

さらに、糖鎖を除去するために、グリコペプチダーゼ A を用いて処理した。得られた脱糖ペプチドは HPLC により精製した。本アレルゲンおよび糖ペプチドは 7 人の患者血清中の IgE 抗体とすべて反応した。しかし、脱糖ペプチドは全く反応しなかった。この結果は、本アレルゲンに感受性を示す患者血清中の IgE 抗体のほとんどすべてがその糖鎖と結合することを示すものである。

最近、植物性アレルゲンにおける糖鎖が患者血清中の IgE 抗体と反応することが報告されているが、大豆における本アレルゲンも同様な性質を示すことが明らかになった。

②小麦主要アレルゲン Tri a Bd 27K の性質について詳細に検討した。分析にあたり、本アレルゲンのモノクローナル抗体を作成して、小麦における本アレルゲンを SDS-PAGE における 2 次元電気泳動により分析した結果、等電点および分子量の異なる複数のバンド

が認められた。これらのスポットを切り出し、N 末端アミノ酸分析を行ったところ、Tri a Bd 27K に所属し、いくつかのアミノ酸残基が異なる多形態で存在していることが明らかになった。

また患者血清と反応性を示すのはヒヨウチャワンタケのフコースと反応するレクチンに陽性のアスパラギン結合型糖鎖を有するスポットのみであり、ペルオキシダーゼの糖鎖に対する抗体を用いても同様な結果を得た。さらに、糖鎖を有する Tri a Bd 27K をゲルから切り出し、糖組成分析した結果、マンノース、N-アセチルグルコサミンが検出されたほか、ガラクトース、フコース及びキシロースの存在が示された。また、本アレルゲンを大腸菌にて発現させた組み換え型タンパク質と患者血清との間には反応性は認められなかった。

以上の事実を総合すると、Tri a Bd 27K が患者血清中の本アレルゲンと特異的に反応する IgE 抗体の大半が、本アレルゲンに結合しているアスパラギン結合型糖鎖と反応することを示すものである。

③大豆アレルゲン Gly m Bd 28K のタバコ培養細胞における発現

上述のタバコ細胞における発現は、発現するタンパク質へのアスパラギン結合型糖鎖を付加し、しかもその糖鎖にフコース及びキシロース残基が修飾される。2010 年度、この発現を試み、目的とするアレルゲンが発現するためには、当該アレルゲンの cDNA を全長の mRNA の配列を確認する必要があることが支援された。

今年度は、この結果に基づいて、その 5' 側の道の配列を 5' -RACE キットを用いて明らかにした。その結果、従来知られていたシグナルペプチドの N 末端側に新たに 3 個のアミノ酸配列が明らかになり、さらにその上流側に 20 個の非翻訳配列が明らかになった。この結果は、当該アレルゲンの発現において極めて有力な情報を提供するものである。

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 3 件)

- ① M. Kimoto, M. Suzuki, N. Komiyama, A. Kunitomo, H. Yamashita, M. Hiemori, K. Takahashi, and H. Tsuji, Isolation and molecular cloning of a major allergen, Tri a Bd 27K. Biosci. Biotech.

Biochem., 2009, Vol. 73, No. 1, pp. 85-92.

- ② N. Komiyama, M. Hiemori, M. Kimoto, M. Suzuki, H. Yamashita, Y. Takahashi and H. Tsuji, Preparation and epitope mapping of a monoclonal antibody against Tri a Bd 27K, a wheat major allergen. Biochem. Biotechnol. Biochem., 2009, Vol. 73, No. 9, pp. 2113-2116.
- ③ M. Hiemori, Y. Yoshida, M. Kimoto, H. Yamashita, K. Takahashi, K. Takahashi, N. Komiyama, and H. Tsuji, Investigation of multiple forms of Tri a Bd 27K, a major wheat allergen, by immunoblotting analysis. Biochem. Biotechnol. Biochem., Vol. 74, No. 1, pp. 199-202.

[学会発表] (計1件)

- ① 小宮山展子、比江森美樹、木本眞順美、山下広美、辻英明、小麦主要アレルゲンTri a Bd 27Kに対するモノクローナル抗体の作製及びその応用、第63回日本栄養食糧学会本大会、長崎ブリックホール、2009年5月。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 英明 (TSUJI HIDEAKI)
岡山県立大学保健福祉学部・教授
研究者番号：20093875

(2) 研究分担者

木本眞順美 (KIMOTO MASUMI)
岡山県立大学保健福祉学部・教授
研究者番号：40108866
比江森美樹 (HIEMORI MIKI)
岡山県立大学保健福祉学部・准教授
研究者番号：80326412