

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11642

研究課題名（和文）米アレルギー緩和成分の解明

研究課題名（英文）Study on food ingredients that alleviate rice allergy

研究代表者

得字 圭彦（Tokuji, Yoshihiko）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90322883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アレルギー症状を緩和するコメ品種「ゆきひかり」と効果のない「きらら397」のメタボローム比較の結果、ゆきひかりにはグルタチオン関連物質が少なかった。Native PAGE解析では「ゆきひかり」特有の約350kDaのタンパク質が観察され、還元型グルタチオン添加で減少することが確認された。nanoLC-MS/MS解析で350kDaのタンパク質は複数のアレルギーペプチドから成る複合体であることが分かった。以上より、「ゆきひかり」ではグルタチオン含量が低いため、アレルギータンパク質がジスルフィド結合を介して巨大な複合体を形成し、アレルギー症状の緩和に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

米品種「ゆきひかり」がアレルギー症状を緩和するメカニズムが、グルタチオン含量の低さとそれに伴うタンパク質のジスルフィド結合に関わる可能性が明らかになった。また、 α -アミラーゼ/トリプシンインヒビターやゲリオキサラーゼなどのアレルギータンパク質が巨大な複合体を形成することが示された。この発見は、食物アレルギーの生化学的な理解を深める重要な知見となり、新たなアレルギー検出法や治療法の開発に役立つ。また、アレルギー緩和米の育種の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：A metabolomic comparison of Yukihihikari, a rice variety that alleviates allergic symptoms, and Kirara 397, a rice variety with no effect, showed that Yukihihikari contained fewer glutathione-related substances. nanoLC-MS/MS analysis revealed that the 350 kDa protein was a complex of multiple allergenic peptides. These results suggest that the allergenic proteins form a large complex via disulfide bonds and contribute to the alleviation of allergic symptoms due to the low glutathione content in Yukihihikari.

研究分野：食品科学、植物生理学

キーワード：ジスルフィド結合 アレルギー グルタチオン 米

1. 研究開始当初の背景

米アレルギーは米を食べることが原因で下痢、頭痛、湿疹などの症状がおこる疾病で、近年増加傾向にある。成長とともに自然に耐性化する場合がある他の食物アレルギーとは異なり、米アレルギーは成人になっても治りにくく(中村ら, 2010)、さらにアナフィラキシーショックを起こす小麦アレルギー等の他の食物に対するアレルギーを併発する傾向も強い(小倉ら, 2014)。米アレルギー患者は、医師や栄養士から低アレルゲン米等を利用しながら必要最小限の米除去の栄養指導を受けて治療にあたるが、重要なエネルギー源で且つタンパク源となり主食でもある米を食事から除去することは、低栄養や QOL 低下の問題を生む。

これまで、米アレルギー対策の研究は、加工技術や遺伝子ノックダウン技術を用いたその除去に関するものが先行してきた(山田ら, 2006)。一方、米アレルギー患者が食べる米を一般の品種から「ゆきひかり」に置き換えると、患者の症状が緩和されるという臨床報告がある(Hasegawa et al., 1998; 柳原, 2001)。しかし、ゆきひかりにはアレルゲンが他のイネ品種と同程度含まれており、腸内細菌を介してアレルギーの発症と関連する難消化性デンプンについても一般品種との差異は見出されておらず、アレルギー症状を緩和させるアレルゲン以外の成分は未解明である(柳原, 2003)。

申請者は、アレルギー症状を抑える「ゆきひかり」とその効果を持たない一般品種のヒト腸管細胞への作用の差を試験管内で評価するため、腸管上皮細胞様に分化させたヒト Caco-2 培養細胞に対して炊飯米を人工消化液で分解した産物を作用させ、細胞から RNA を抽出して網羅的遺伝子発現比較を行った。その結果、ゆきひかりでのみ特徴的に発現が変化する遺伝子を複数見出した。本申請課題では、これらの遺伝子の中から、米アレルギー緩和能力の指標として利用可能なマーカー遺伝子を選抜する。さらに、マーカー遺伝子をもちいた *in vitro* 評価系を Caco-2 培養細胞で確立する。この評価系を用いて、これまで未知であったゆきひかりのアレルギー緩和に關与する機能性物質本体を解明しようとするものである。

2. 研究の目的

本研究課題では、米品種「ゆきひかり」のアレルギー症状緩和に關与する成分を同定することを目的として研究を行う。ヒトが米を食する場合、炊飯調理することが多い。また、食べてから消化管内で消化液による分解を受けて腸まで届き吸収される。これまで、ゆきひかりと一般品種の生の米成分の比較分析は行われてきたが、米を炊飯し人工消化液で分解した産物を網羅的に比較した研究はない。本申請課題では、一般の米品種とゆきひかりの炊飯米の人工消化液による分解産物のメタボローム網羅的比較解析を世界に先駆けて行うことにより、これまで未解明であった米アレルギー症状緩和機能に關与する成分の候補を選定する。

米アレルギーのモデル動物実験系や培養細胞を用いた評価系はこれまで確立されておらず、このことが米アレルギーの作用メカニズムや症状緩和成分の同定を困難にしていた一因であった。申請者は、先行研究で Caco-2 培養細胞に対して米アレルギー症状緩和作用をもつゆきひかりの消化産物を作用させ、ゆきひかり特異的に応答して発現変動する遺伝子を初めて同定した。本申請課題では、これらのマーカー遺伝子の発現レベルを指標として用いることにより、米アレルギー抑制効果の *in vitro* 評価系を新たに開発する。この系を用いてメタボローム解析で選抜された候補成分について米アレルギー症状緩和能力を評価し、当該機能に關与する成分を同定する。また、これと並行して一般の米品種とゆきひかりの炊飯米の人工消化液による分解産物を各種クロマトグラフィーで分画し、各画分について同様に培養細胞の評価系を用いて評価し、米アレルギー症状緩和に關与する画分を同定する。そして、メタボローム解析を通じて同定された成分と分離した活性画分に含まれる成分の双方が一致することを確認する。特定された成分については、食物アレルギーモデルマウスに投与し、個体レベルでもアレルギー症状抑制に寄与するかを検証する。

この研究で米アレルギー症状抑制に關与する成分が解明されれば、当該成分を医薬として用いたり、含有量を変化させた米品種の開発に応用できる。

3. 研究の方法

(1) 炊飯米のメタボローム解析: 炊飯米を凍結乾燥し、水溶性画分と脂溶性画分を分離し、水溶性画分は CE-TOFMS、脂溶性画分は LC-MS/MS にて各々成分の網羅的解析を行った。

(2) 米タンパク質の分析: 米から変性剤を含む溶液で総タンパク質を抽出し SDS-PAGE で分離し、CBB 染色して解析した。プロテアーゼ阻害剤を含む緩衝液で抽出した水溶性タンパク質は、SDS-PAGE と Native PAGE 両方で分析した。また、一次元目を Native-PAGE、2 次元目を SDS-PAGE で分離した二次元電気泳動は、銀染色して解析した。

(3) ゆきひかり特異的タンパク質複合体の構成成分の同定: ゆきひかりに特異的なタンパク質複合体のバンドを Native-PAGE のゲルから切出し、トリプシン処理の後、NanoLC-MS により断片ペプチドを解析し、当該バンドに含まれるタンパク質のアミノ酸配列を同定した。

(4) ウエスタンブロッティング: タンパク質複合体に含まれていたうち、アレルゲンタンパク質

の RAG1 と GlyI-11 のアミノ酸配列のユニークな領域のペプチドを合成してウサギに免疫し、抗体を作成した。米タンパク質を SDS-PAGE および Native PAGE で分離し、PVDF 膜に転写し、この抗体を使って両タンパク質を検出した。定量的な解析は全自動ウエスタン装置を用いて解析した。

4. 研究成果

米品種「ゆきひかり」は以前から米アレルギー症状を緩和する米と言われているが、その効果の原因物質やアレルギー抑制メカニズムは未解明である。LC-MS/MS および CE-TOFMS を用いたメタボローム解析で「ゆきひかり」とアレルギー緩和効果がない品種 A の炊飯米に存在する低分子代謝物を比較したところ、254 種類の代謝物を検出できた。その中で、ゆきひかりと品種 A の間で含量に有意差があるものが 83 種あり、含量の Fold change が 1.5 倍以上の代謝物は 36 種類あった。この 36 種がどのような代謝経路にある物質であるかを明らかにするため、Metaboanalyst でエンリッチメント解析を行った結果、グルタチオン代謝に関連する物質が有意に変動していることがわかった。とくに、レドックス（酸化還元状態）制御に関わる還元型グルタチオン（GSH）がゆきひかりに少ないことを見出した。レドックスはタンパク質のジスルフィド結合に影響を及ぼし、その構造を変化させる。ジスルフィド結合を壊さない Native PAGE で米の水溶性タンパク質を分析したところ、品種 A には少なくとも、ゆきひかりには豊富な約 350kDa タンパク質バンドを発見した。Native PAGE/SDS-PAGE の二次元電気泳動を行った結果、複数のペプチドから成る複合体であることがわかった。この複合体は GSH を添加すると減少することから、ジスルフィド結合により複合体化している可能性が示唆された。350kDa のタンパク質複合体を電気泳動バンドから切出し、nanoLC-MS/MS で構成するペプチドを調べたところ、複数のアレルギータンパク質が含まれていることがわかった。アレルギータンパク質としてすでに報告されている γ -アミラーゼ/トリプシンインヒビターファミリーに属する RAG1 やグリオキサラーゼ I (GlyI-11) のアミノ酸配列が含まれており、RAG1 のアミノ酸配列にはシステイン残基が多く含まれていた。RAG1 と GlyI-11 の部分配列に対する抗体を作成し、米の総タンパク質を SDS-PAGE で分離しウエスタン解析をしたところ、それぞれ約 20kDa および約 39kDa のバンドが検出され、RAG1 はゆきひかりに GlyI-11 はきらら 397 に多く存在していた。水溶性タンパク質を Native PAGE で分離しウエスタン解析したところ、RAG1 および GlyI-11 いずれの抗体でもゆきひかりで同じ約 350kDa の位置にバンドが検出されたことから、RAG1 と GlyI-11 は複合体を形成している可能性が示された。

以上より、ゆきひかりでは、還元型グルタチオン GSH が少ないために、RAG1 に多く含まれるシステイン残基が還元されにくいので、他のアレルギータンパクとジスルフィド結合して複合体化していると考えられた。複数のアレルギータンパク質が複合体化するために、消化酵素による分解や消化管での吸収がされにくいために、アレルギー症状を抑えていることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 得字圭彦、天間館貴子
2. 発表標題 グルタチオンとコメアレルゲンタンパク質の構造
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------