

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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580138
 研究課題名（和文）通電処理による卵白オボムコイドアレルギー活性低減化に関連する蛋白高次構造の研究
 研究課題名（英文）Structural changes accompanying mitigation of the allergic action of ovomucoid after passing an electric current
 研究代表者
 松本 知明 (MATSUMOTO TOMOAKI)
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
 研究者番号：30128318

研究成果の概要（和文）：鶏卵成分で最もアレルギー活性の高いオボムコイド蛋白に直流電流の通電処理を行うと、陰極側、陽極側双方でアレルギー活性が減弱すること、とくに陰極側で減弱することを見出した。通電処理前後のオボムコイド蛋白をトリプシン処理し、質量分析装置で比較解析したところ、システインを含む2個のペプチド領域（⁵⁷E-⁶³K、¹²³H-¹²⁸R）が通電処理後の陰極、陽極双方で検出されなかった。通電により、これらの部位で変化が生じたと推測される。陰極側でのみ著しいチオール基数増加をみたが、今回の結果から分子内S-S結合開裂部位は特定されなかった。さらに鶏卵アレルギー患者で、陰極側変性オボムコイド蛋白を用いる経口負荷試験を行ったが、臨床的有用性は証明できなかった。

研究成果の概要（英文）：Ovomucoid is the most prominent allergen causing hen's egg allergy, containing S-S bonds that may be responsible for its allergic action. The allergic action of this protein has been reduced after electrolysis on both the anode and the cathode sides when evaluated by mean of skin prick. The results for modifications of ovomucoid after electrolysis showed two distinct peptide fragments (⁵⁷E-⁶³K, ¹²³H-¹²⁸R) had lost with matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Although the total free SH groups in ovomucoid were increased on the cathode side, the regions for breaking S-S bonds have not been determined in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：卵アレルギー、卵アレルゲン、低アレルゲン化、オボムコイド、直流電流、プロテオミクス、蛋白高次構造

1. 研究開始当初の背景：(1) 鶏卵は乳幼児にとって基本となる栄養源である。しかしながらそのアレルゲン活性は高く、わが国の食物アレルギーの原因食品としては最も多く、全食物アレルギー患者の30%を占めると報告されている。これらの乳幼児では鶏卵摂取によって、皮膚にじんま疹やアトピー性皮膚炎が生じたり、呼吸困難や下痢、嘔吐がおこったり、まれに意識障害がみられる。鶏卵のアレルゲン蛋白は主に卵白部分にあり、なかでもオボムコイドはアレルゲン活性がきわめて高い。しかもこの蛋白は加熱によってアレルゲン性が損なわれないため、この低アレルゲン化は久しく医療上の課題となっている。

(2) 卵白からオボムコイド蛋白を取り除く試みや、オボムコイド蛋白そのもののアレルゲン性を減弱化する手法が、いくつか報告されている。

1) まず、この蛋白が塩に溶けるため、大量の食塩水を用いて洗浄することで、加熱卵白から除去することが行われている。しかしながら、製造コストや食材としての食感の点で問題があり、この手法によって得られる低アレルゲン化粉末卵白は、経口免疫寛容誘導などを目的とする医療用試薬の範囲を出ていない。

2) オボムコイドに還元剤dithiothreitol(DDT)を加えて分子内S-S結合を開裂すると、IgE抗体との結合性が平均28%低下すると報告されている。ただ、これは鶏卵に化学物質を添加するものであり、食品加工としては適さない。

3) オボムコイド蛋白は186個のアミノ酸からなり、アミノ酸60個ずつの3つのタンデムなドメインから成る球状蛋白で、各々Gal

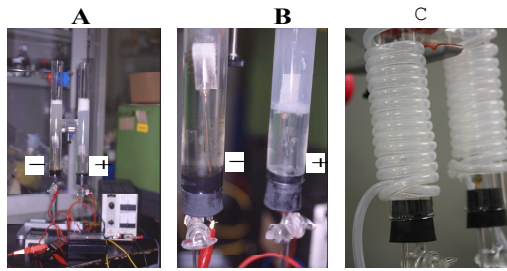
d1.1, Gal d1.2, Gal d1.3と命名されている。Gal d1.3は1個のアルファヘリックスと3個のベータヒダ構造によって成り立つが、1個のアミノ酸、37番目のフェニルアラニンをメチオニンに置換すると、アルファヘリックス構造がなくなりアレルゲン活性が著しく低下することが分かっている。ただ、これは動物の遺伝子組み換えを目指すものであり、食品加工として疑問が残る。

4) オボムコイドを小麦蛋白と一緒に加熱して凝集化させるとアレルゲン性が著しく低下するという報告がある。また、卵白の固形分濃度を0.2~0.3%にし、かつpH10~11.5に調整して80°C以上で加熱処理すると、オボムコイドが変性し低アレルゲン化するという報告もある。さらに、オボムコイドに100~400MPaの高圧処理を行うと、IgE抗体との結合性が低下するという観察もある。チロシン残基が分子内部から分子表面に移動するためと考えられている。これらは、限られた条件下での食品加工技術として応用できるかもしれない。

以上のように、オボムコイド蛋白そのものを、日常の食生活に提供できるよう、食材として鶏卵がもつ本来の食感を損なうことなく低アレルゲン化し、かつそれを工業的産可能とする技術はまだ得られていない。

2. 研究の目的：卵白成分の中で最もアレルゲン活性の高いオボムコイド蛋白が、通電処理によって低アレルゲン化される機序を蛋白生化学的に解明する。この低アレルゲン化法によって得られるオボムコイド蛋白の臨床的有益性を確かめる。

3. 研究の方法：



(1) A に大型電気分解装置の全体像、B に白金電極板周囲の拡大像を示す。さらにC に示すように、内径5ミリ、外径6ミリのシリコンチューブを装置全体に巻きつけ、恒温低温水槽で-5℃に冷却した水道水を循環させることによって装置全体を冷却した。通電時間を通して、装置周囲を循環するシリコンチューブ内温度はほぼ0.2℃であり、通電中の装置内溶液温度が16~17℃に保たれるため、ジュール熱に伴う蛋白変性が防止できる。

(2) 1%オボムコイド蛋白を直流で通電処理(90V, 0.23A, 30分)し、その前後のジスルフィド(S-S)結合の解裂を、エールマン法でチオール基(-SH)量を測定することによって評価した。また還元試薬を用いない条件下でポリアクリルドアミノゲル電気泳動を施行して分子量を観察し、さらに等電点分離して二次元電気泳動を行った。得られたスポット蛋白にトリプシン処理を行い、各々のペプチドをマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析装置(MALDI-TOF/TOF, 4700 Proteomics Analyzer)によって分析し、そのペプチド指紋を蛋白データベースと照合した。

(3) 加熱卵白を細かく砕き、食塩水で洗浄して得られる粒子に、通電処理前後のオボムコイド蛋白溶液を一定量加える。各々をポリスチレンチューブに入れ、チョコレートシロップを加えて攪拌する。これを用いて、鶏卵アレルギー患者に経口負荷試験を行う。なお、この研究に先立っては、熊本

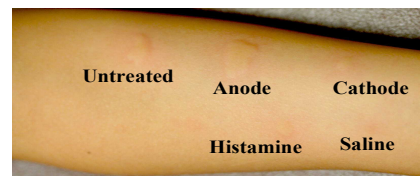
大学生命科学系倫理委員会に審査を諮り許可を得ている。

4. 研究成果：(1) 通電処理によるオボムコイド蛋白のアレルゲン活性の変化

図2

乾燥卵白を含む食品を用いて、鶏卵アレルギーが疑われる18名(0~21歳、男13名、女5名)に、オープンチャレンジで経口負荷試験を施行した。その結果7名に陽性反応が観察され、卵白アレルギーと確定診断できた。これらの患者に対して皮膚プリックテストを施行した。通電処理前後の1%オボムコイド蛋白溶液を各々、前腕内側皮膚上に

Skin prick test with 1% ovomucoid



滴下し、小児用使い捨てプリック針(米国リンコリン社製)で穿刺して、20分後に表面に出現する膨疹の最大径を計測した。対照として生理食塩水と1%ヒスタミン液も滴下した。写真で示すように、通電前溶液に比べ、陽極、陰極側で得られる膨疹は小さく、とくに陰極側溶液で小さくなった。各々の患者に対して、以下の式に当てはめて膨疹抑制率(百分比)を算定し、低アレルゲン化率とした。患者7名の平均値として、陽極側で15%、陰極側で23%の減弱が観察された。

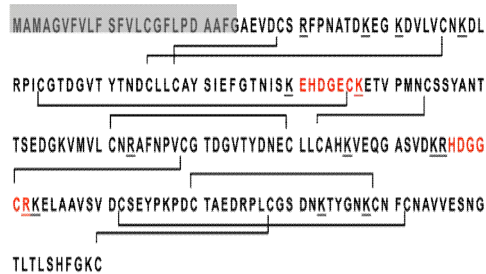
$$100 - (\text{通電後膨疹径} / \text{通電前膨疹径}) \times 100$$

乾燥卵白0.5グラムを用いた経口負荷試験で血管浮腫を生じ、十分に洗浄した加熱卵白0.5グラムを用いた経口負荷試験では陰性と判断された21歳男性に対して、洗浄した加熱卵白に陰極側で得られた1%オボムコイド溶液を1ml混じて、改めて経口負荷試験を施行した。その結果、飲用後ほどなく喉頭違和感、咳込みが生じ、8分後から眼周囲の

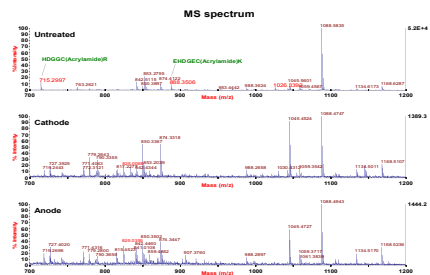
紅斑、腫脹が観察された。

(2) 通電処理によるオボムコイド蛋白の生化学的变化

1%オボムコイド溶液中のチオール基量をエールマン法で測定した。その結果、通電処理によって陰極側で著しくチオール基が増加することが分かった(通電前: 1.2 nmol/ml, 陽極側: 2.8 nmol/ml, 陰極側: 14.8 nmol/ml)。オボムコイド蛋白は分子間 S-S 結合を持たないため、分子内 S-S 開裂が陰極側で生じたと考えられる。



通電処理前後のオボムコイド蛋白をトリプシン処理し質量分析したところ、上の図で示すように、システインを含む2個のペプチド領域 (⁵⁷E-⁶³K, ¹²³H-¹²⁸R) が通電処理後の陽極側、陰極側で検出されなかった。通電



処理により、この部位でのシステインが何らかの変化を受けたことが予想される。当初は、通電処理により S-S 結合が切断されると予想したが、カルバミドメチル化された場合のペプチドに相当するシグナルが、通電処理後の試料において検出されなかった。即ち、オボムコイド蛋白低アレルゲン化に関連する蛋白立体構造変化には還元反応以外の関与も疑われた。

そこでまず、通電処理前後のオボムコイド蛋白を、還元作用をもたない溶媒を用いて二次元電気泳動したところ、きわめて多彩なスポットが得られた(上から順に通電前溶液、陽極側採取液、陰極側採取液)。比較的大きいスポットを各々から切り取り、ゲルに含まれる蛋白にトリプシン酵素処理を行い、得られたペプチド断片を質量分析装置で解析した。さらにオボムコイドのアミノ酸組成から得られる理論的ペプチド断片の中から、システイン残基をもつペプチドを選び、そのペプチド同士を組み合わせたときの分子量の理論値を計算し、質量分析装置で得られた実測値と比較した。その結果、通電前オボムコイド蛋白分析から S-S 結合候補として2種類の組み合わせ候補が得られた(候補1: ²⁴M-⁷R, ¹⁸D-²⁴K のペプチド間、候補2: ²⁵D-⁵⁶K, ¹⁶⁰T-¹⁸⁵K のペプチド間)。陽極側からも通電前とは異なる3種類の候補が得られた(候補1: ²⁴M-¹⁴K, ¹³⁰E-¹⁵⁹K, ⁵⁷E-⁶³K の3つのペプチド間、候補2: ¹⁶⁵C-¹⁸⁵K, ¹⁸D-²⁴K のペプチド間、候補3: ⁹⁰A-¹²¹K, ¹⁸D-²⁴K のペプチド間)。さらに陰極側からも、それらとは異なる2種類の S-S 結合候補が得られた(候補1: ¹⁵E-²⁴K, ⁵⁷E-⁸²K, ¹²³R-¹²⁸R の3つのペプチド間、候補2: ¹⁵E-²⁴K, ¹⁶⁵C-¹⁸⁵K のペプチド間)。

以上から、通電処理後の陽極側および陰極側のオボムコイド蛋白では、その S-S 結合部位に関して多彩な変化が生じていることが分かった。これらに伴うオボムコイド蛋白立体構造の変化がその低アレルゲン化に関連していると予想される。



橋本 修 (HASHIMOTO OSAMU)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：50289427

しかしながら今回の研究では、陰極側で得られる強い低アレルギー化現象、および陰極側でみられるチオール基増加を各々説明できる蛋白構造変化は確定されなかった。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- 1 Matsumoto T. Mitigation of the allergic action of ovomucoid with electrical energy. 第 4 回欧州小児科学アカデミー会議. 2012 年 10 月 8 日 (イスタンブール、トルコ共和国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本知明 (MATSUMOTO TOMOAKI)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤医師
研究者番号：30128318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

井上 勳 (INOUE KAORU)
熊本高等専門学校・教授
研究者番号：00106113