

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658110

研究課題名(和文) アレルゲン分子構造情報とタンパク質発現情報を援用した食品アレルゲンの再評価

研究課題名(英文) Allergenic potential re-evaluation for food proteins utilizing proteome and allergen structure databases

研究代表者

松田 幹 (Tsukasa, Matsuda)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20144131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：既知アレルゲン(アレルギー疾患の原因となる物質)と植物種子に含まれるタンパク質のデータベースを活用して、種子タンパク質と既知アレルゲンの分子構造を比較した。類似性が認められた種子タンパク質について、アレルギー患者血清抗体(アレルゲンと結合するタンパク質)との結合を調べた結果、多くは抗体との結合性を示したが、ほとんど結合しないタンパク質もあることが明らかとなった。本研究で用いた方策が未知タンパク質のアレルゲン性の評価に有効であることが示された。同時に、食品アレルゲンの評価に関しては、既知アレルゲンとの分子構造の類似性に加え、変性や消化分解に対する感受性も考慮する必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Utilizing the databases for known allergens (molecules causative of allergic diseases) and proteins in plant seeds, molecular structures were compared between the known allergens and the plant seed proteins. Then, the seed proteins identified to be structurally similar to any known allergens were subjected to the assay for binding with antibodies (proteins with allergen binding ability) from allergic patients. Many of the identified proteins showed the antibody binding, whereas some showed almost no binding. Thus, the strategy adopted in this study was shown to be effective to evaluate allergenic potential of novel proteins. It was also suggested that in the case of food allergens the susceptibility of proteins to denaturation or digestive degradation have to be considered for the evaluation of protein allergenicity in addition to the structural similarity.

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：食品 タンパク質 免疫 アレルギー プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー原因タンパク質の分子構造に関する情報の蓄積と活用技術の進歩

IgE 抗体が関与する即時型食物アレルギーを誘発する原因タンパク質 (アレルゲン) については、患者血清 IgE 抗体との結合を高感度で分析する技術、機器が普及したことから、関連する基礎および臨床の研究者により解析が進み、多数の潜在的アレルゲンが同定されてきた。国内外のいくつかの公的機関により、同定されたアレルゲンのアミノ酸配列や分子立体構造 (結晶構造) に関する情報が収集、整理され、アレルゲンデータベースとして一般に公開されている。たとえば、本邦の国立医薬品食品衛生研究所による Allergen Database for Food Safety には、アレルゲンの立体構造や抗体が結合する領域の情報なども含めて多くの情報が収集されている。また、国際免疫学連合 (IUIS) と世界保健機構 (WHO) が共同で運営しているデータベースには、国際的な専門学術機関 (学会) として認証された公式のアレルゲンリスト (‘Official list of allergens’) が作成されて公開されている。

一方、近年の遺伝子解析装置や質量分析機などの分析機器の進歩により、大量の塩基配列の決定や微量タンパク質の同定などが可能となり、オーミクスと称される多種類の分子を網羅的に解析する研究が進んでいる。このような網羅的研究の展開により、特定の組織や時期における遺伝子の発現 (トランスクリプトーム: 転写, mRNA のレベル) やタンパク質の存在 (プロテオーム: 翻訳, タンパク質のレベル) の全体像を見ることができ、研究成果が蓄積されてきた。これらの解析データに関する情報はデータベースとして広く公開され、目的の分子の検索や類似の構造の探索、比較解析などが可能になった。

2. 研究の目的

即時型食物アレルギーの原因となるアレルゲンタンパク質は、アレルギー患者血清に含まれる IgE 抗体との反応性を指標にして探索・同定が進んでおり、それらのアミノ酸配列の情報はアレルゲンデータベースとして登録・公開されている。一般に、このようなデータベースに登録された配列と類似の配列を持つ食品タンパク質はアレルゲンとなるリスクがあると考えられている。一方、口腔アレルギー症候群として知られる花粉と果物に関連するアレルギーでは、花粉アレルギーとして鼻や目の粘膜を経由して免疫感作され、花粉と果実に共通のアレルゲンが含まれる場合には、果実を食べることで唇や喉など、口腔内でアレルギー性の炎症反応などが誘発される。しかし、一般に生の果実を食べた場合に限られており、缶詰のフルーツでは誘発されず、また、誘発される症状は口腔内に限定され腹痛や下痢などの消化管での症状は見られない。この例のように、免疫

感作されてはいるが (血清中に特異的 IgE 抗体は存在するが)、加熱や酸などで原因アレルゲンが変性したり食物として摂取された後に消化管内で消化分解を受けたりすれば食物アレルギーが誘発されないこともありうる。したがって、血清中に特異的 IgE 抗体が存在しても、それらの抗体は別個のアレルゲンに対して産生された交差反応性を示す抗体であり、食物タンパク質が本来の抗原ではない可能性もある。したがって、その抗体が認識・結合する食品タンパク質は必ずしも食物アレルギーを誘発しない、すなわち食品アレルゲンとしては作用しないこともあり得る。例えば、穀物や豆類など植物性の食物によるアレルギーでは、近縁種の植物の花粉タンパク質で免疫感作されて産生された IgE 抗体が、種子 (穀物や豆) のタンパク質に結合するような例 (免疫交差反応) は、それほど少なくないと予想された。そこで、アミノ酸配列の類似性や免疫交差反応性、さらに血清 IgE 抗体との反応性に基づいて、図 1 に示すように、食品アレルゲンを再評価するための研究を行った。

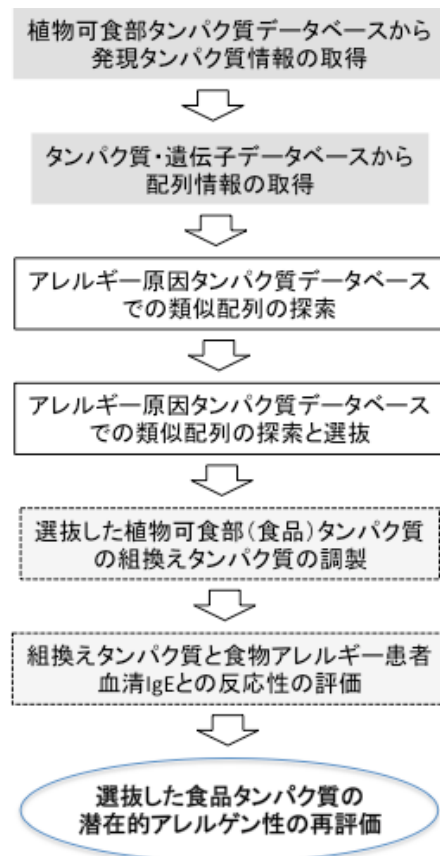


図 1 : 分子構造情報とタンパク質発現情報を援用した食品アレルゲンの再評価スキーム

3. 研究の方法

(1) 食用植物種子 (可食部) に含まれるタンパク質に関する情報の取得

食用植物の種々の組織で発現するタンパク質を網羅的に解析・同定した情報が含まれるデータベースを活用して植物種子で発現

するタンパク質の情報を得た。次に、そのタンパク質の遺伝子およびアミノ酸配列に関する情報を当該植物のゲノムデータベースを含む関連データベースから取得した。

(2) 既に同定されているアレルゲンとの分子構造類似性の比較

国際的ネットワークにより構築され公開されているアレルゲンデータベースに登録されているアレルゲンタンパク質（食物アレルギーのみならず花粉症や喘息など全てのアレルギーを含む）のアミノ酸配列情報を利用して、上記の植物種子で発現するタンパク質のアミノ酸配列と類似性を持つ既知のアレルゲンが存在するか否かを検索した。既知アレルゲンとアミノ酸配列が類似性を持つことが示された種子タンパク質の中から類似性の程度が上位のタンパク質を選抜し、以下の解析の対象とした。

(3) 選抜した解析対象タンパク質の組換えタンパク質としての大量調製

組換えタンパク質を調製するためのcDNAは遺伝子データバンクより分与を受けた。プラスミドに挿入して増幅させ、大腸菌で過剰発現させるための発現ベクターに組み込んだ。形質転換大腸菌を大量培養し、発現誘導した後、分画やクロマトグラフィーを用いて目的の組換えタンパク質を分離精製した。精製タンパク質の純度を、ゲル電気泳動法により確認した。

(4) 既知アレルゲンと類似の構造を持つ組換えタンパク質に対する特異抗体の調製

精製した組換えタンパク質をアジュバントと混合してマウスの腹腔内に投与し、さらに2回の追加投与により抗体応答を誘導した。採血後、血清を分離して各特異抗体として以下の免疫化学実験に用いた。

(5) 精製した組換えタンパク質とアレルギー患者血清IgEとの反応性の評価

微量高感度定量分析が可能のように独自に改良を加えたスポットブロットアッセイ法、さらに、より定量性が高い酵素免疫測定法(ELISA)を用いて測定した。タンパク質に特異的に結合したIgEを酵素標識抗-IgE二次抗体と化学発光検出系を用いて、組換えアレルゲンタンパク質と患者血清IgEとの結合を定量的に解析した。

(6) 既知アレルゲンと類似の構造を持つタンパク質の植物可食部での発現の解析

食用植物の各組織からタンパク質を抽出し、電気泳動法で分離した後、上記の特異抗体を用いた免疫ブロット法により目的タンパク質の発現を確認し、組換えタンパク質を標準として発現量を推定した。また、植物の凍結組織薄切片を作成し、特異抗体および蛍光標識抗体を用いて免疫染色し、植物組織における分布、局在を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 既知アレルゲンと類似構造を持つタンパク質の探索と組換えタンパク質の調製

植物種子で同定されているタンパク質の中から、既知のアレルゲンタンパク質と類似の構造(アミノ酸配列)を持つタンパク質をスクリーニングした結果、相当数の類似タンパク質が存在することが明らかとなった。その中から一定の割合以上での配列同一性を持つ複数のアレルゲン候補タンパク質を選抜した。選抜した種子タンパク質のcDNAを発現ベクターに組み込み、大腸菌で過剰発現させた結果、いずれも以降の解析に十分量のタンパク質として発現されていることを確認した。これらのタンパク質を抽出して親和性クロマトグラフィーにより分離精製した。ゲル電気泳動により高い純度が確認された組換えタンパク質について、マウスを用いた特異抗体の作成とアレルギー患者血清IgE抗体との反応性解析を進めた。

(2) 既知アレルゲンと類似構造を持つタンパク質の食用植物組織での分布

食用植物の各組織からのタンパク質抽出液をゲル電気泳動で分離し調製した特異抗体を用いた免疫ブロット法によりアレルゲン類似タンパク質の各組織での発現を調べた。その結果、予想通りに発現しているタンパク質が多く確認された。一方、プロテオームデータベースに登録されているにも係らず、本研究での免疫化学分析条件では検出限界以下のタンパク質も存在した。このようにアレルゲンの候補タンパク質が微量成分である場合には食物としての摂取量も含めて、腸管吸収や血中濃度、さらに組織への移行量なども含め、アレルギー応答を誘発する閾値を超えるかを十分に検討する必要がある。

(3) 既知アレルゲンと類似構造を持つタンパク質とアレルギー患者IgE抗体との反応性

分離精製した組換えタンパク質を抗原としてヒトIgE抗体との反応性を調べた。血液を提供いただいた患者さんは、食物アレルギーを含む何らかのアレルギー性疾患を持つが、必ずしも本研究で対象とした植物種子の摂取により即時型アレルギーを誘発することを確認するような経口負荷試験は行われていない。血清サンプルの中から、本研究で対象とした植物種子タンパク質に対して高いIgE抗体価を示したサンプルを選抜して以下の研究に用いた。スポットブロット法およびELISA法を用いて上述の個々の精製組換えタンパク質に対する各患者血清IgEとの結合能を測定した。血清間でのばらつきはあるものの、多くのタンパク質は患者血清に対してIgE陽性を示したが、一方で、ほとんどの患者血清のIgEと反応性を示さないタンパク質も存在した。

既知アレルゲンとのアミノ酸配列の類似性と血清IgE抗体との反応性との相関を解析すると、必ずしも正の相関は見られず、既知アレルゲンとの配列の類似性が低いタンパク質の中にも多くの患者血清に対して高いIgE抗体価を示す例や、反対に、配列類似性が高いにもかかわらず、分析した全ての血清

について、低い IgE 結合しか示さない例もあった。前者のように配列類似性が低い場合には、免疫交差反応性による IgE 結合は低いと推定されるため、植物種子に含まれるタンパク質自身によりアレルギー感作が成立したものと推定された。一方、後者のように既知のアレルゲンとの配列類似性が高いにも係らず IgE 抗体がほとんど検出されないことは、このタンパク質自身はアレルゲンとしての潜在性は持っているものの、本研究で対象とした植物種子のタンパク質としてはアレルギー感作を成立させにくい、すなわち食物としての経口摂取では免疫応答を誘導しにくいものと推定された。

本研究において示されたように、確かにアミノ酸配列が何らかの既知アレルゲンに類似性を示す食物タンパク質には実際に患者血清 IgE 抗体との反応性を示す場合が多くあり、このような一次構造の類似性から食物アレルゲン潜在性を評価することは一定の意味があることが示された。一方、その逆の場合もあり、既知アレルゲンとのアミノ酸配列の類似性は信頼性の高い必要条件ではあるが、必ずしも十分条件ではないことも示された。これは、食物アレルギーにおいては、アレルゲンタンパク質が粘膜上皮から体内に取込まれるまでに、加工や調理、消化管内での変性や分解、という食物アレルゲンに特有のプロセスが存在することに大きく依存するものと考えられた。すなわち、呼吸器や口腔の粘膜から未変性、未分解のままの状態で体内に取込まれる場合には、高いアレルゲン性 (IgE 抗体産生誘導や症状の誘発) を示すようなタンパク質でも、変性や消化分解を受け易い場合には食物アレルゲンとしては潜在性が低いものと推定される。本研究で用いた研究の方策が未知タンパク質のアレルゲン性の評価に有効であることが示された。また、このようなアレルゲンの評価に関する研究成果に加えて、本研究で行ったアミノ酸配列と発現の情報から選抜、絞り込みをするアプローチは、潜在的アレルゲンを探索するには有効であることも明らかとなった。

今後の研究として、植物可食部で発現するタンパク質の中で、既知のアレルゲンとの配列類似性の高いタンパク質について、さらに種類を増やして、植物性食品に対する食物アレルギー症状を誘発する患者さんの血清の IgE 抗体との反応性を解析するような、臨床医学領域との連携研究が期待される。それらの中で IgE との反応性を示さないタンパク質について、酸変性や消化酵素に対する感受性を調べることで、上述したような、食物アレルギーにおける特殊性に関してより深い議論が可能となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Hirano K, Hino S, Oshima K, Okajima T,

Nadano D, Urisu A, Takaiwa F, Matsuda T., Allergenic potential of rice-pollen proteins: expression, immuno-cross reactivity and IgE-binding., *J. Biochem.* (査読有), 154(2)195-205, 2013 DOI: 10.1093/jb/mvt044

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 松田 幹、高分子食品成分の腸管吸収と体内動態、第 67 回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム、名古屋、2013/5/13

② 松田 幹、腸管免疫と腸内微生物および食品因子、日本食物繊維学会第 17 回学術集会、福岡、中村学園大学、2012/11/23

③ 平野 可奈、日野 真吾、大島 健司、岡島 徹也、灘野 大太、宇理 須 厚雄、松田 幹、イネ種子に含まれるイネ科植物花粉アレルゲンホモログタンパク質はアレルギー患者 IgE と反応する 2012 年度日本農芸化学学会大会、京都、2012/3/23

〔その他〕

ホームページ等

所属研究室ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~molreg00/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 幹 (MATSUDA, Tsukasa)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：20144131