

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580301

研究課題名(和文) 魚貝類アレルギー疾患に関わる応答分子マーカーの探索とアレルギー性評価への応用

研究課題名(英文) Search of the molecular marker concerned with seafood allergic disease and the application to an allergenicity evaluation

研究代表者

石崎 松一郎 (ISHIZAKI, SHOICHIRO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：40251681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： 現在食物アレルギーは世界中で数多く存在するが、わが国では魚介類を他国より多く、かつ多様な種類を摂取する関係上、魚介類アレルギー患者が比較的多いことが知られている。しかしながら、魚介類アレルギーの発症メカニズムは解明されておらず、発症に関連する遺伝子群の詳細も明らかにされていない。

そこで本研究では、魚介類アレルギーの発症に関わる遺伝子群の特定を目的に、魚介類アレルギーモデルマウスを構築することで、魚介類アレルギー発症時に特異的に発現量が増加する遺伝子を特定することに成功し、インターロイキン-5と呼ばれるサイトカインの一種が魚介類アレルギー発症時に特異的に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Seafoods, including fish, crustaceans and mollusks, are well recognized as one of the most common causes of food allergy mediated by immunoglobulin E antibodies. However, the mechanism concerning to onset of seafood allergy is not elucidated, and the details of the gene expression in conjunction with the onset are not clarified.

Therefore, in this study, seafood allergy model mouse was constructed for the purpose of the identification of the gene cluster about onset of seafood allergy. As a result, the gene which the expression increased was specifically identified in case of the onset of seafood allergy by the cDNA subtraction method. It was revealed that a kind of cytokine called interleukin-5 specifically participated in the onset of seafood allergy.

研究分野：水産化学

キーワード：アレルギー 食品 アレルゲン 魚介類 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギーは増加傾向にあり大きな社会問題になっている。花粉症やダニアレルギーといった他のアレルギー疾患同様に、食物アレルギーは免疫系の異常により高濃度に産生されたイムノグロブリン E (IgE) を介して発症するが、生命の維持にとって不可欠な食品の摂取によって引き起こされるだけでなく、重篤な場合にはアナフィラキシーショックにより死亡することもあるという点で、他のアレルギー疾患より問題は深刻である。

アレルギー原因食品としては卵、牛乳、米、小麦といった農畜産物が世界的に有名で、これら食品に関してはアレルギー誘起物質（アレルゲン）の単離同定、アレルギーの感作・発症に重要な T 細胞エピトープおよび IgE エピトープ（B 細胞エピトープ）の解析など詳細な研究が行われ、米やミルクなどではすでに低アレルゲン食品も開発されている。一方、魚貝類の消費量が多いわが国では魚貝類摂取によるアレルギーも無視できない。実際、平成 8～11 年度に厚生省（現厚生労働省）食物アレルギー対策検討委員会が実施した全国規模のアンケート調査により、日本の成人における食物アレルギーでは魚貝類が原因食品の約半分を占めることが判明し、魚貝類アレルギーの重要性が一躍クローズアップされた。

魚貝類のアレルゲンに関するこれまでの研究は主として欧米で行われ、魚類の主要アレルゲンはパルブアルブミン、甲殻類の主要アレルゲンはトロポミオシンであるという結論に達していた。しかしながら、わが国では摂取する魚貝類の種類が非常に多い、すなわち感作される魚貝類が多様であるため、上記 2 種類のアレルゲンでは説明できない事例が多数報告されていた。このような背景のもと、これまでにわが国では分子生物学的観点からのアプローチによって、各種魚貝類のア

レルゲンの特定と cDNA クローニングによる一次構造解析で大きな成果を挙げている¹⁻⁵⁾。さらに、アレルギーの感作に関わる T 細胞エピトープとアレルギーの発症に関わる IgE エピトープに関しては、マサバパルブアルブミンで解析し、エピトープペプチドの免疫寛容効果を実証されている⁶⁾。一方甲殻類アレルゲンであるトロポミオシンについては、そのアミノ酸配列が甲殻類（特にエビとカニ）の間でも特定の領域で変異が見られ、甲殻類と軟体動物では配列全般にわたって著しい変異が見られることが明らかにされている⁷⁻⁸⁾。さらに興味深いことに、甲殻類アレルギー患者は必ずしもトロポミオシンにのみ感受性を示すわけではなく、エビアレルギー患者とカニアレルギー患者ではアレルギー発症因子が異なることも見出している。しかしながら、アレルギーの感作に関わる T 細胞エピトープとアレルギーの発症に関わる IgE エピトープに関しては、申請者らは一部アレルゲンで検討したがまだ十分な成果を得るに至っていないし、国外でも研究例は少なく、その発症メカニズムの解明には至っていない。現在のところ、T 細胞エピトープについては、申請者らのグループがマサバパルブアルブミンで解析し、エピトープペプチドの免疫寛容効果を実証したのが唯一の研究例である。

一方、アレルギー疾患は、多数の遺伝因子と環境因子が複雑に関係し合って発症するため、これまで原因遺伝子を捉えることが困難とされてきた。しかしながら、マイクロアレイ技術の急速な進展により、遺伝子の多様性や遺伝子の発現解析が比較的容易にかつ定量的に行なうことができる状況にある。すでに、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー疾患における DNA マイクロアレイ解析が行なわれており、アレルギー疾患患者由来の T 細胞や単球で顕著に発現変動する遺伝子としてケモカイン受容体 CCR4 や Toll 様受容体、インターロイキン(IL)-12、インターフェ

ロンγなどが確認されている。これらの情報は魚貝類アレルギー疾患における応答分子マーカーの探索においても極めて参考になるものと考えられる。他の食物アレルギーには見られない特徴的な魚貝類アレルゲンの多様性と生物間の交差性からもたらされる一様ではない発症パターンが遺伝子と環境の相互作用解明の鍵となることを考えると、魚貝類アレルギー疾患応答分子マーカーの発現様式に関する情報は、将来のアレルギー疾患予防にとって必須であるし、魚貝類、特にその加工品の正確なアレルゲン性評価や低アレルゲン食品の開発にとっても重要であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、食物アレルギー疾患は世界的規模で増加している。中でも我が国では魚貝類アレルギー患者の割合が多く、その重要性が以前から指摘されてきた。魚貝類アレルギーは他の食物アレルギーに比べ、原因物質であるアレルゲンタンパク質の種類が突出して多様であり、さらに生物間の交差性が極めて高いことが特徴であるが、魚貝類アレルギーの発症に関わる応答分子マーカーの発現様式に関しては全く解明されていない。

そこで本研究では、魚貝類アレルギーの発症メカニズムを明らかにするため、魚貝類アレルギーモデルマウスを用いて、魚貝類アレルギー応答分子マーカーの網羅的探索を行なうとともに、魚貝類アレルギー疾患関連分子マーカーの誘導を指標とした各種水産物および水産加工食品のアレルゲン性および抗アレルゲン性機能評価を実施し、魚貝類アレルギーさらには食物アレルギーの発症予防に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 魚貝類アレルギーモデルマウスの作製

魚貝類アレルギー患者を対象としたヒト遺伝子解析を行なう場合、文部科学省が定め

る「ヒトゲノム研究に関する基本原則」により、その利用や保管が厳密に規制されている。そこで、ヒトの魚貝類アレルギーにおける感作と類似していると考えられるマウスモデル系を構築し、魚貝類アレルギー発症マウスの遺伝子発現解析を行なった。すなわち、甲殻類および魚類アレルギーの主要アレルゲンであるトロポミオシン (TM) およびパルブアルブミン (PA) をブラックタイガーおよびマサバ筋肉からそれぞれ常法により調製し、BALB/cCrSlc マウス (6 週齢, 8 匹/群, 三協ラボサービス) に精製 TM 抗原あるいは精製 PA 抗原に免疫賦活剤であるフロイントアジュバントを混合して作製した各懸濁液 (25 μg/マウス) を day 0 (初回免疫日) および day 4 の 2 回腹腔内投与することで 1 次免疫を行なった。さらに、day 10~16 の間 1 日 1 回、各抗原溶液 (100 μg/mL) の 5 μL をマウスに経口投与して 2 次免疫を行なった。その後、day 0, 12, 20, 24, 39 および 53 にマウスの尾静脈から採血し、ELISA 法によって血中抗 TM および抗 PA IgE 抗体量を測定した。最終的に TM 抗原および PA 抗原の誘発によって IgE 抗体濃度が 5 倍以上に上昇した時点でそれぞれ甲殻類および魚類アレルギーモデルマウスとした。

(2) モデルマウスを用いた甲殻類および魚類アレルギー関連遺伝子群の網羅解析

甲殻類および魚類アレルギー発症マウス (Tester) およびアレルギー未発症マウス (Driver) よりそれぞれ抽出したトータル RNA から、SMARTerTM PCR cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いて cDNA を構築した。作製した cDNA を PCR に供することにより cDNA の増幅を行ない、その後 CHROMA SPIN-1000 column を用いて cDNA の精製を行った。つぎに、PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (タカラバイオ) を用いてサブトラクションを行ない、最終的に Subtracted cDNA を構築した。すなわち、各 cDNA に *Rsa* I を加え

制限酵素処理を行った後、アダプターを付加した Tester を Driver とハイブリダイズさせ、発現量に差のある遺伝子を濃縮した。これを PCR 増幅することで Subtracted cDNA とした。Subtracted cDNA の評価はハウスキーピング遺伝子 (G3PDH) を用い、サブトラクション効率を用いて行った。

4. 研究成果

精製 TM および PA をマウスに投与した結果、血中抗 TM および抗 PA IgE 抗体量は共に有意に増加することが認められた (図 1)。アレルギーを発症した場合、免疫機能の働きによってアレルゲンに特異的に結合する IgE が生産され、血中 IgE 量が増加することがすでに知られていることから、本研究によって、代表的な甲殻類および魚類アレルギー発症マウスが構築できたと考えられる。魚介類アレルギー発症マウスの作製は、魚介類アレルギー発症メカニズムを明らかにする上で極めて重要なステップであり、今後様々な魚介類アレルギーの発症モデルとして、本研究で構築した手法が活用できると考えられる。

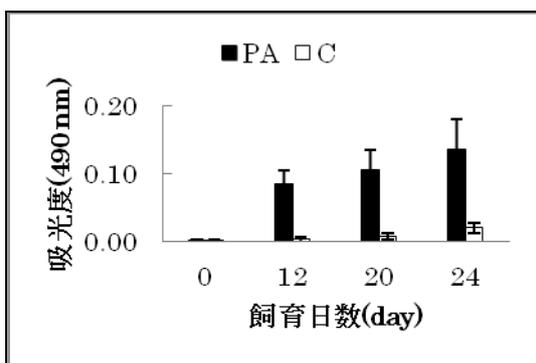
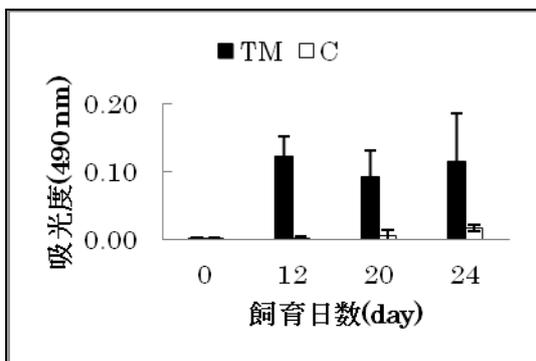


図 1 マウス血中抗魚介類アレルゲン IgE 量

つぎに、実験方法に基づき作製した subtracted cDNA を評価するため、Subtracted cDNA およびサブトラクション前の Tester および Driver cDNA につき、PCR 増幅により G3PDH の明瞭な確認されるまでのサイクル数を比較した結果、Subtracted cDNA では TM 群、PA 群ともにサブトラクション前の cDNA に比べ、サイクル数が 10 程度多いことが確認されたことにより、甲殻類アレルギーおよび魚類アレルギー特異的 Subtracted cDNA を構築することができたと判断された (図示せず)。そこで、これらの Subtracted cDNA を対象に、あらかじめアレルギー発症時に特異的に発現すると予想された遺伝子群 (IL-4, 5, 13, 18, NF- κ B および TGF- β) の種間配列をもとに設計した特異プライマーを用いて PCR 増幅による特異遺伝子の発現を調べた結果、IL-5 遺伝子が甲殻類、魚類アレルギー発症マウスにおいて、特異的に発現量が増加することが認められたことから、魚介類アレルギーの発症に IL-5 遺伝子が少なからず関与していることが示唆された (図 2)。

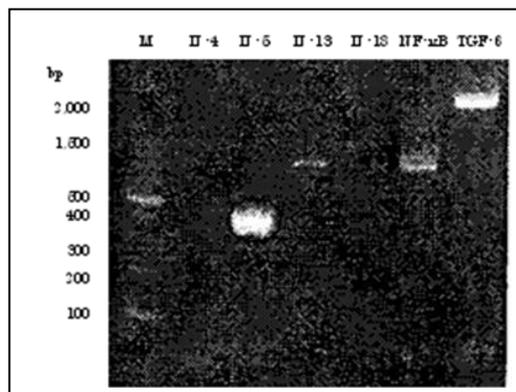


図 2 cDNA サブトラクション法による甲殻類アレルギー発症関連遺伝子の検出

IL-5 はインターロイキン-5 と呼ばれ、アレルギー性鼻炎、喘息およびアトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患との関連がすでに報告されており、主として活性化 T 細胞および肥満細胞より産生されることが知られている。B 細胞や好酸球の活性化、増殖・分化に重要な役割を演じるサイトカインの一種

であるが、好塩基球のヒスタミン遊離の増強作用も確認されている物質である。したがって、魚介類アレルギー発症時に好酸球の増加を伴う炎症性疾患が起こることが考えられた。

<引用文献>

- (1) Y. Hamada, H. Tanaka, S. Ishizaki, M. Ishida, Y. Nagashima and K. Shiomi: Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1149-1156 (2003).
- (2) A. Kobayashi, H. Tanaka, Y. Hamada, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy*, **61**, 357-363 (2006).
- (3) K. Motoyama, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Cephalopod tropomyosins: Identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1997-2002 (2006).
- (4) K. Motoyama, Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 985-991 (2007).
- (5) Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y. Lu, H. Ushio, K. Shiomi: Comparative analysis of barnacle tropomyosin: Divergence from decapod tropomyosins and role as a potential allergen. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **147**, 230-236 (2007).
- (6) S. Tomura, S. Ishizaki, Y. Nagashima, K. Shiomi: Reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by mutations at Ca²⁺-binding sites. *Fish. Sci.*, **74**, 411-417 (2008).
- (7) K. Motoyama, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y.

Lu, H. Ushio, and K. Shiomi: Identification of tropomyosins as major allergens in Antarctic krill and mantis shrimp and their amino acid sequence characteristics. *Marine Biotechnol.*, **10**, 709-718 (2008).

- (8) A. Emoto, S. Ishizaki, K. Shiomi: Tropomyosins in gastropods and bivalves: Identification as major allergens and amino acid sequence features. *Food Chem.*, **114**, 634-641 (2009).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) M. Suzuki, K. Shimizu, Y. Kobayashi, S. Ishizaki, and K. Shiomi: Paramyosin from the disc abalone *Haliotis discus discus*, *J. Food Biochem.*, **38**, 444-451 (2014), DOI 10.111/jfbc.12072.
- (2) H. Mita, A. Koketsu, S. Ishizaki, and K. Shiomi: Molecular cloning and functional expression of allergenic sarcoplasmic calcium-binding proteins from *Penaeus* shrimps. *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 1737-1742 (2013), DOI 10.1002/jsfa.5961.
- (3) A. Morii, H. Mita, S. Ishizaki, and K. Shiomi: Importance of conformation for the IgE reactivity of sarcoplasmic calcium-binding protein from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *European Food Research Technol.*, **236**, 165-170 (2013), DOI 10.1007/s00217-012-1867-8.
- (4) S. Ishizaki, Y. Sakai, T. Yano, S. Nakano, T. Yamada, Y. Nagashima, K. Shiomi, Y. Nakao, and H. Akiyama: Specific Detection by the Polymerase Chain Reaction of Potentially Allergenic Salmonid Fish Residues in Processed Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 980-985 (2012), DOI 10.1271/bbb.110992.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 清水景子・鈴木 翠・嶋倉邦嘉・石崎松一郎・塩見一雄. 各種軟体動物のパラミオシンのアレルゲン性および一次構造解析. 平成 24 年度日本水産学会秋季大会, 2012, 山口県下関市, 独立行政法人水産大学校, 平成 24 年 9 月 14 日~17 日.

(2) 森井愛花・小林征洋・田中雄太・嶋倉邦嘉・石崎松一郎・塩見一雄. マサバパルブアルブミンの立体構造 IgE 結合エピトープの解析. 平成 24 年度日本水産学会秋季大会, 2012, 山口県下関市, 独立行政法人水産大学校, 平成 24 年 9 月 14 日~17 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.Laboratory-mbfb-303.ac>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 松一郎 (ISHIZAKI, Shoichiro)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号: 40251681

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: