

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26282018

研究課題名（和文）重篤なアレルギー症状を引き起こす小麦タンパク質の分子構造の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular structure of wheat protein causing severe allergic symptoms

研究代表者

丸山 伸之（MARUYAMA, NOBUYUKI）

京都大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：90303908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物種子は広く食品として利用されているが、種子に含まれるタンパク質はアレルギーの原因物質となることが多い。小麦は日常の食生活の重要な素材であるが、主要なアレルギーの原因物質ともなっている。特に、小麦は3大アレルギーの一つである。本研究では、リコンビナントタンパク質を用いた小麦アレルギーの比較解析から、小麦タンパク質の中で、 ω -グリアジンが主要なアレルギーであることを示した。さらに、特徴的な構造がアレルギー症状の要因となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Plant seeds are widely consumed as food. However, seed proteins are often the causative substances of food allergy. Wheat is an important part of the daily diet, but it is also one of the three major allergenic food. In this study, comparative analysis of wheat allergens using recombinant proteins indicated that ω -gliadin is the major allergen among wheat proteins. Furthermore, its allergenicity is attributed to characteristic structural factors.

研究分野：食物アレルギー

キーワード：アレルギー 小麦 エピトープ

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーを発症する患者は増加の一途をたどっており、広く食品素材として利用されている植物種子に対してアレルギー症状を示す患者も増加している。アレルギー症状を発症すると、原因となる食品を食べることができないため、食事に含有している成分への厳密な注意が必要となり、患者の生活の質を大きく低下させる。植物種子のタンパク質の中には、ヒトの健康の維持、増進に役立つ機能についても報告されているものもあるため、植物種子をより広く食素材として利用するためにも、種子タンパク質のアレルゲン性を詳細に解析する必要がある。

アレルゲンについて、WHO/IUIS などにおいてデータベース化されている。小麦について、現在、20種類以上の小麦タンパク質がアレルゲンとして登録されている(表)。重要な食物アレルギーの原因物質であるピーナッツにおいて、データベース上では17種のアレルゲンが掲載されていることから、小麦のアレルゲンの種類は非常に多いことが分かる。その中には、小麦グルテンを構成するタンパク質(グリアジンおよびグルテニン)が含まれている。花粉によって感作されたのち、食物を摂取することによりアレルギー症状を起こす Profilin が、Tri a 12 と命名されているが、同様のアレルゲンとして重要な PR-10 はアレルゲンとして同定されていない。非常に多くのアミラーゼインヒビターがアレルゲンとして同定されており、これらはパン喘息の原因アレルゲンとの報告が多く、小麦アレルゲンの特徴である。

種子には類似した性質をもつタンパク質が多く含まれているために、アレルゲンを小麦種子から調製することは困難であることが多い。そのため、組換えタンパク質を用いてアレルゲン解析を行うことが有効である。

表 小麦アレルゲン

| Allergen | Biochemical |
|----------|--|
| Tri a 12 | Profilin |
| Tri a 14 | Non-specific lipid transfer protein |
| Tri a 15 | Monomeric α -amylase inhibitor |
| Tri a 18 | Agglutinin isolectin |
| Tri a 19 | α -5 gliadin |
| Tri a 20 | γ -gliadin |
| Tri a 21 | α/β -gliadin |
| Tri a 25 | Thioredoxin |
| Tri a 26 | High molecular weight glutenin |
| Tri a 27 | Thiol reductase homologue |
| Tri a 28 | Dimeric α -amylase inhibitor |
| Tri a 29 | Tetrameric α -amylase inhibitor |
| Tri a 30 | Tetrameric α -amylase inhibitor |
| Tri a 31 | Triosephosphate isomerase |
| Tri a 32 | 1-cys-peroxiredoxin |
| Tri a 33 | Serpin |
| Tri a 34 | Thioredoxin |
| Tri a 35 | Dehydrin |
| Tri a 36 | Low molecular weight glutenin |
| Tri a 37 | α -purothionin |
| Tri a 39 | Serine protease inhibitor like protein |
| Tri a 40 | Chloroform/methanol-soluble 17 protein |
| Tri a 41 | Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1 |
| Tri a 42 | Hypothetical protein from cDNA |
| Tri a 43 | Hypothetical protein from cDNA |
| Tri a 44 | Endosperm transfer cell specific PR60 precursor |
| Tri a 45 | Elongation factor |

2. 研究の目的

本研究では、これらの数多くの小麦アレルゲンの中で即時型アレルギー症状の主要原因タンパク質に対する組換えタンパク質を調製し、同定する。さらに、主要なアレルゲンのエピトープについて解析し、小麦アレルゲンのアレルギー症状に関連する構造について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 小麦タンパク質の組換えタンパク質の調製

アレルギー症状に対する原因物質となる可能性のある小麦タンパク質(貯蔵タンパク質、インヒビター、防御タンパク質など)のタンパク質に対する組換えタンパク質を調製する。

小麦タンパク質の遺伝子について、バイオリソース配布機関からの分与、あるいは登熟期の種子より調製した cDNA からの取得などにより、本研究に用いた。

貯蔵タンパク質である、 α -グリアジン、 β -グリアジン、 γ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニンの組換えタンパク質を調製するために、これらの cDNA をタグとなる配列とともにベクターに挿入した発現用プラスミドを用いた。組換えタンパク質が不溶性として得られものは、可溶化したのち、タグに対するアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

Profilin, non-specific lipid transfer protein, monomeric α -amylase inhibitor, dimeric α -amylase inhibitor, α -purothionin についても、大腸菌発現系を構築し、クロマトグラフィーにより組換えタンパク質を調製した。

(2) アレルギー症状に関与する小麦タンパク質の解析

調製したアレルゲンタンパク質を ELISA プレートに吸着させ、ウェルをリン酸緩衝液により洗浄後、患者血清と反応させた。数時間インキュベートしたのち、リン酸緩衝液で洗浄し、酵素標識した抗ヒト IgE 抗体を用いて各画分に結合したヒト IgE 抗体量をマイクロプレートリーダーにより測定した。それぞれのタンパク質に対して結合した特異的 IgE 抗体量を定量した。

(3) 小麦タンパク質のエピトープ解析

エピトープを解析するために、 α -グリアジンの一次構造に基づいてオーバーラップさせた合成ペプチドを調製した。それらに対する患者血清中の特異的 IgE 抗体の反応性を解析することにより、反応性の高い合成ペプチドに対応する構造を同定した。

(4) 物性の異なる小麦タンパク質のアレルゲン性に関する解析

多様な用途に加工利用するために、様々な物

性を持つ小麦タンパク質が利用されている。食品利用されている様々な物性をもつ小麦タンパク質を抽出し、それらのアレルゲン性について解析した。

4. 研究成果

(1) アレルギー症状に關与する小麦タンパク質の解析

調製した組換えタンパク質をマイクロプレートにコーティングし、それらの結合する患者血清中の特異的 IgE 抗体を測定した。一方、 α -グリアジン、 β -グリアジン、 γ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニンなどの貯蔵タンパク質において特異的 IgE 抗体値を比較解析すると、 β -グリアジンに感作されている患者が多く、次いで γ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン、 α -グリアジンの順であった。さらに、Profilin, non-specific lipid transfer protein, monomeric α -amylase inhibitor, dimeric α -amylase inhibitor, β -Purothionin についても同様の解析を行い、これらのアレルゲンに対しては貯蔵タンパク質よりも感作されている患者が少なかった。以上の比較から、貯蔵タンパク質が小麦の主要アレルゲンであり、特に β -グリアジンが重要な原因アレルゲンであることが示された。

(2) 小麦主要アレルゲンのエピトープ構造の解析

β -グリアジンについてエピトープの解析を行った。 β -グリアジンはN末端の繰り返し配列をもつドメインと、システイン残基を多く含むドメインにより構成されている(下図)。解析した患者血清において、N末端部のドメインに強く反応を示す配列が複数認められ、患者間でも共通して強い反応性を示した。これらの配列を比較することにより、アレルゲン性に關与する共通性の高い構造の特徴が示唆された。

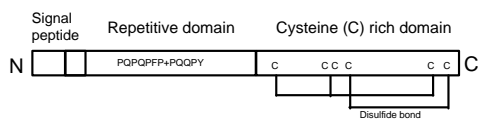


図. α -グリアジンの構造模式図

(3) 物性の異なる小麦タンパク質のアレルゲン性に関する解析

多様な用途に加工利用しやすくするために処理した、様々な物性を持つ小麦タンパク質が利用されている。そこで、物性の異なる小麦タンパク質を用いてアレルゲン性を比較した。未処理の小麦タンパク質とは異なる反応性を示したことから、加工のための処理条件を検討することにより、アレルゲン性を低減化できる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計4件)

丸山 伸之

食物アレルゲン解析の進歩

小児科診療, 診断と治療社, 東京, 2014, 77, 10, 1249-1253.

丸山 伸之

アレルゲンとコンポーネントの研究の進歩

医学の歩み, 医歯薬出版株式会社, 2014, 252, 927-930.

Borres, MP, Maruyama N., Sato S., Ebisawa M.

Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy

Allergology International, 2016, 65, 378-387.

丸山 伸之

バイオテクノロジーの進歩と抗原学

アレルギー・免疫, 医薬ジャーナル社, 東京, 2016, 21-27.

[学会発表](計9件)

丸山 伸之

植物性食物アレルギーにおけるコンポーネント

第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 イブニングシンポジウム

2014年5月9日 京都国際会議場(京都府・京都市)

丸山 伸之

臨床診断に有効な植物性アレルゲンコンポーネント

第51回日本小児アレルギー学会 シンポジウム

2014年11月9日 四日市市文化会館(三重県・四日市市)

丸山 伸之

食物抗原コンポーネントタンパク質の研究の進歩

第15回食物アレルギー研究会 特別プログラム講演

2015年2月1日 昭和大学(東京都・品川区) 佐藤 さくら、山本 幹太、丸山 伸之、海老澤 元宏

新規アレルゲンコンポーネントの臨床応用への期待

第52回日本小児アレルギー学会 シンポジウム

2015年11月21日 なら100年会館(奈良県・奈良市)

丸山 伸之

植物性食物アレルギーにおけるコンポーネント

第2回日本アレルギー学会総合アレルギー講習会 教育セミナー

2015年12月12日 パシフィコ横浜(神奈川

県・横浜市)

丸山 伸之, 佐藤 さくら, 田中 昭, 海老澤 元宏

小麦 -5 グリアジン陰性症例におけるアレルギーコンポーネントの臨床性能の解析
第 65 回日本アレルギー学会学術大会 ミニシンポジウム

2016 年 6 月 19 日 東京国際フォーラム(東京都)

丸山 伸之

食物アレルギーにおけるアレルギーコンポーネント

愛知免疫アレルギーを語る会 招待講演

2016 年 8 月 6 日 名古屋国際ホテル(愛知県・名古屋市)

福田 啓伸, 吉原 重美, 中山 元子, 加藤 正也, 安藤 祐輔, 宮本 学, 有阪 治,

丸山 伸之

小麦運動誘発性アナフィラキシーの感作アレルギーコンポーネント

日本小児アレルギー学会

2016 年 10 月 9 日 前橋商工会議所(群馬県・前橋市)

Maruyama, N.

Seed storage proteins in crops: biosynthesis and accumulation

The second Kasetser University and the Graduate School of Agriculture

Kyoto University Bilateral Symposium on Food, Environment, and Life for the Next Generation

2016.12.6 Kyoto

〔図書〕(計 1 件)

丸山 伸之

食物アレルギー

食物アレルギー Food Allergy, 診断と治療社, 東京, 2016, 110-117

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hinshitsusekkei.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 伸之 (MARUYAMA, NOBUYUKI)

京都大学大学院農学研究科・准教授

研究者番号 : 90303908

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

三上 文三 (MIKAMI, BUNZO)

京都大学大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 40135611

(4)研究協力者

なし