

## 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 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790980

研究課題名（和文） 構造生物学的手法を用いた大豆アレルギーの病態の解明

研究課題名（英文） Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy

研究代表者

森田 秀行（MORITA HIDEYUKI）

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50444302

研究成果の概要（和文）：

リコンビナント P34 を用いたリンパ球幼若化反応や ImmunoCAP といった免疫学的手法は、大豆アレルギー患者の診断の補助的ツールとなりうるとともに、今後リコンビナント P34 のさらなるエピトープ解析や変異導入実験を行い、それらをペプチド療法などに応用することにより、大豆アレルギーの新規治療法への研究に役立てられる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Our new purification method did not change the immune responses to rP34. PBMCs from allergic subjects, but not from control subjects, showed an enhanced allergen-stimulated proliferation response to endotoxin-free recombinant P34. Furthermore, the ImmunoCAP system using our purified recombinant P34 that retains its tertiary structure may be useful for the identification of patients with soybean allergy or for the indication of outgrown allergy. Purified recombinant P34 may be useful tool for the evaluation of soybean allergies, and a specific immunotherapy for soybean allergy based on recombinant should be considered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：大豆アレルギー、リコンビナント P34、エンドトキシン、エピトープ、リンパ球幼若化反応、ImmunoCAP

## 1. 研究開始当初の背景

大豆は日本人にとって重要な食材であり、またイソフラボン等有用な栄

養源を含み、健康への有益性が大きいため、大豆タンパクはますます多くの製品に使用されてきている。し

かしそれに伴い、特に欧米を中心に幼少児の大豆アレルギーの増加がひとつの問題となっている。これに対するアレルギーを克服することは重要な課題であると考えた。大豆のアレルゲンはいくつか挙げられるが、その中でも P34 はアトピー性皮膚炎である大豆感受性患者の 65%近くがアレルゲン反応を示すとされており、大豆の主要アレルゲンとして注目されている。

## 2. 研究の目的

大豆の主要アレルゲンである P34 に着目し、リコンビナント蛋白を精製するとともに、大豆アレルギー患者の血液サンプルを用いて、B 細胞および T 細胞エピトープの解析や、抗原タンパクの構造生物学的解析を通じて、大豆アレルギー発症機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

大豆主要アレルゲンである P34 のリコンビナント蛋白の精製方法を確立し、大腸菌を用いて大量精製した。精製したリコンビナント P34 からエンドトキシン除去作業を行い、それを用いて大豆アレルギー患者 9 名および健常者 9 名の血清に対してリンパ球幼若化反応を行った。また大豆アレルギー患者 18 名 (outgrown 群 9 名 + allergy 群 9 名) に対して ImmunoCAP によるリコンビナント P34 特異的 IgE の測定を行った。また、rP34 の特性を知るために構造モデルを作製し、構造学的検討も行った。

## 4. 研究成果

精製して得られたリコンビナントP34 をそのまま用いて、アレルギーのないコントロール 5 人の血球に対してリンパ球幼若化反応を行ったところ、全員非特異的な増殖反応を認めた。これは大腸菌から精製したリコンビナント蛋白がエンドトキシンを有しており、これが非特異的な細胞増殖を引き起こしているためと考えられた。

P34 は SPE31 と 78%という高い相同性を有しており、ともに papain family に属しており、それを基に P34 の構造モデルを作製した。構造モデルから P34 はふたつのドメインを有し、左は主に  $\beta$  シート、右は主に  $\alpha$  ヘリックス構造となっており、真ん中に cleft が存在することがわかった

(Figure1-a)。表面に疎水性残基が多く存在する (Figure1-b) ことから、これがよりエンドトキシンとの結合能を高めている可能性がモデル構造から推測された。

Figure1-a

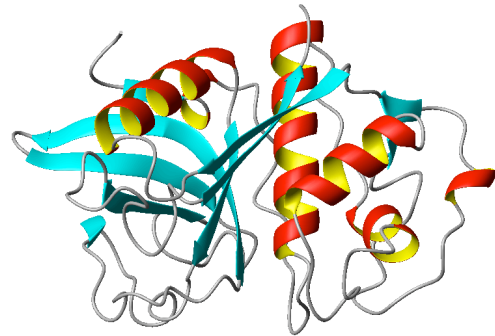
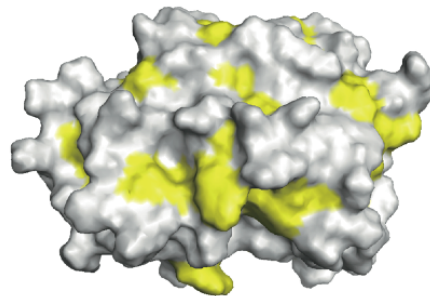


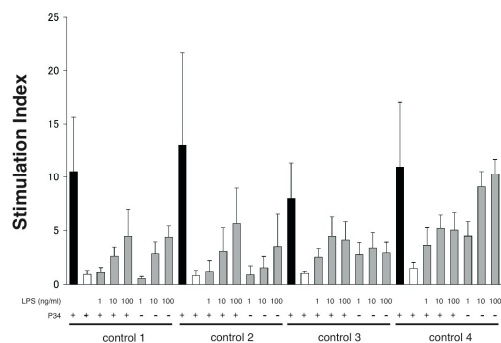
Figure1-b



黄色部分が疎水性残基

そこで、高濃度 SDS を用いたエンドトキシン除去作業を加えた後に、再度リンパ球幼若化反応を施行したところ、いずれも非特異的な増殖反応は認められなくなった (Figure2)。

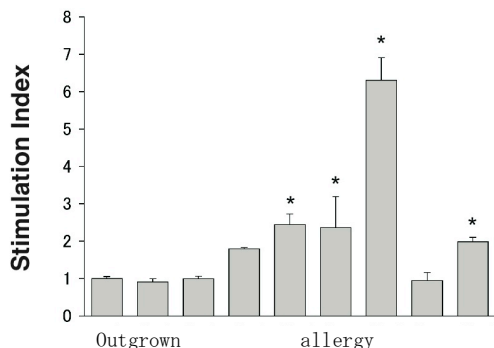
Figure2



エンドトキシンプリーの recombinant P34 を用いてリンパ球幼若化反応を行ったとこ

る、すでに outgrown した 2 名の患者は全く反応を示さなかった。一方臨床的にアレルギー反応を示す群では、6 名中 4 名が有意差を持って細胞増殖を認めた (Figure3)。

Figure3



これらの結果から、endotoxin を除去したリコンビナントタンパクを抗原としてリンパ球幼若化反応を行い T 細胞反応性の評価することは、非即時型アレルギーの診断に有用であるとともに、SI の経過を追うことにより、食物除去解除に関して補助的な役割を果たすことも可能と考えられた。

一方、recombinant P34 を用いた ImmunoCAP RAST の系を独自に確立し、大豆患者群 18 名に施行したところ、Outgrown 群において rP34 特異的 IgE 陽性者は 9 名中 1 名のみであった。それに対して、allergy 群では 9 名中 4 名陽性者が存在していた。ただし、score4 を超えるような患者は存在しなかった。なお、中間値は allergy 群 1.63kUA/l、outgrown 群は 0.50 であった。今後さらに数を増やして検討を行う必要があるが、recombinant P34 を用いた ImmunoCAP RAST は特に即時型大豆アレルギーの診断や、outgrown の判定の補助的ツールとして今後有用である可能性が示唆された。

リコンビナント P34 を用いたリンパ球幼若化反応や ImmunoCAP といった免疫学的手法は、大豆アレルギー患者の診断の補助的ツールとなりうるとともに、今後リコンビナント P34 のさらなるエピトープ解析や変異導入実験を行い、それらをペプチド療法などに応用することにより、大豆アレルギーの新規治療法への研究に役立てられる可能性を示した。

## 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 2 件)

1) H. Morita, H. Kaneko, H. Ohnishi, Z. Kato, K. Kubota, T. Yamamoto, E. Matsui, T. Teramoto, T. Fukao, K. Kasahara and N. Kondo : Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. International Journal of Molecular Medicine 29: 153-158, 2012. 査読有

2) H. Morita, H. Kaneko, H. Ohnishi, Z. Kato and N. Kondo: Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. Allergy 66: 985-986, 2011. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1) 森田秀行 「大豆主要アレルゲン Recombinant P34 を用いた免疫学的手法の臨床応用」 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2011 年 11 月 10 日

2) 森田秀行 「Recombinant P34 を用いた ImmunoCAP System の有用性の検討」 第 48 回日本小児アレルギー学会 福岡 2011 年 10 月 23 日

3) 森田秀行 「Recombinant P34 を用いた ImmunoCAP System の有用性の検討」 第 6 回岐阜小児アレルギー学会 岐阜 2011 年 6 月 3 日

4) 森田秀行 「食物アレルギーにおける抗原特異的リンパ球幼若化反応の意義と応用」 第 46 回日本小児アレルギー学会学術集会 福岡 2009 年 12 月 5 日

5) 森田秀行 「B and T cell epitope analysis in soybean allergic patients -Identification of T cell epitope by in silico system」 第 19 回国際喘息学会日本・北アジア部会 東京 2009 年 7 月 10 日

6) 森田秀行 「大豆主要アレルゲン P34 を用いた大豆アレルギー患者の免疫学的検討」 第 21 回日本アレルギー学会春期学術大会 岐阜 2009 年 6 月 4 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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
特記すべき事項なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田秀行 (MORITA HIDEYUKI)  
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：50444302

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：