

機関番号：15401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791078
 研究課題名(和文) 小麦アレルギーにおけるアレルゲン特異IgEのレパートリー解析と診断への応用
 研究課題名(英文) Analysis of allergen-specific IgE repertoire in wheat allergy and its application for the diagnosis
 研究代表者
 松尾 裕彰(MATSUO HIROAKI)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：60346385

研究成果の概要(和文)：

精度の高い小麦アレルギー検査方法の確立を目指して、小麦リコンビナントアレルゲンの大腸菌における発現を試みた。その結果、水溶性アレルゲンは、シャペロンタンパク質と共発現することによりグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として可溶化発現させることに成功した。不溶性アレルゲンは、pET または pCold ベクターを用いて発現させることが出来た。作製した一部のリコンビナントアレルゲンに患者血清 IgE が結合することを確認した。したがって、本研究で作製したアレルゲンは、小麦アレルギーの診断に応用できると示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we tried to produce the recombinant wheat allergens in *Escherichia coli* to establish a new *in vitro* method for accurate diagnosis of wheat allergy. We succeeded in producing the water-soluble wheat allergens as fusion proteins with glutathione-S-transferase by means of a co-expression of chaperon plasmid and pGEX-6p-1. The recombinant water-insoluble allergens were expressed using a pET or pCold system. The IgE-binding to some of the recombinant allergens were detected indicating that these recombinant proteins can be applied to the measuring of allergen-specific IgE antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：小麦アレルギー，検査，アレルゲン，IgE抗体

1. 研究開始当初の背景

近年わが国では花粉症を代表とするアレルギー疾患は増加傾向にあり、食物アレルギーも例外ではない。食物アレルギーの中で小麦アレルギーは鶏卵、乳製品の次に多く、そ

の患者数は増加傾向にある。小麦アレルギーの根治療法として、減感作療法が有効であるとの報告があるが、その治療法は確立されておらず、現時点での治療の原則は小麦除去食療法である。小麦を含有する食品は多岐にわ

たり、除去食療法は患者やその家族にとって大きな負担となる。したがって、不必要な小麦除去を行わないために、正確に診断することが極めて重要である。現在、小麦アレルギーの確定診断には、小麦摂取後に症状が誘発されるか否かを確認する食物負荷試験が必要不可欠である。しかし、試験時にアナフィラキシーショックを起こす危険を伴うため、可能な限り避けたい検査である。以上のことから、安全で精度の高い *in vitro* の小麦アレルギー検査法の開発は急務であるといえる。

最近の研究で、アレルゲン刺激による好塩基球やマスト細胞の脱顆粒反応の感受性は、アレルゲン分子上の多価エピトープに対する特異 IgE の種類、量および受容体への親和性の強さ、すなわち「アレルゲン特異 IgE 抗体のレパートリー」により決定されることが明らかにされている。したがって、食物アレルギー特異 IgE 抗体価の測定に加え、アレルゲン特異 IgE 抗体のレパートリーを調べることで、個々の患者について症状の重症度や負荷試験において誘発される症状を推測できると考えられる。

小麦アレルギーには、小麦摂取のみで蕁麻疹や喘息が誘発される即時型小麦アレルギー、小麦製品摂取後に運動を行うことでアナフィラキシーが誘発される小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA)、パン製造業者に認められるパン職人喘息や小麦接触蕁麻疹・皮膚炎、小麦アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎など様々な病型が存在する。これまでの研究で、感作経路 (消化管, 上気道粘膜, 皮膚) の違いにより感作されるアレルゲンが異なることや小麦アレルギー患者は複数のアレルゲンに感作されているケースが多いことが明らかにされている。このような背景から、アレルゲン特異 IgE 抗体のレパートリーによって、誘発される小麦アレルギーの症状 (蕁麻疹, アナフィラキシー, 喘息, 皮膚炎など) が決定されると考えられた。

2. 研究の目的

患者個々の感作アレルゲン特異 IgE 抗体のレパートリーと臨床症状との関連性を明らかにし、誘発される症状をより詳細に推測できる小麦アレルギー検査法を確立することを最終目標として、本研究では、抗原特異 IgE 抗体の測定に利用するリコンビナント小麦アレルゲンの作製を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示す小麦アレルゲンのリコンビナントタンパク質の作製を行った。[水溶性アレルゲン] α -Amylase inhibitor (AI-0.19, CM3, CM16), Thioredoxin (TRX), Triosephosphate isomerase (TPIS),

Peroxidase (Per), Thiol reductase (27kP), Lipid transfer protein (LTP), Purple acid phosphatase (PAP), Serpin (Ser#10), Serine proteinase inhibitor (SerpA), Avenin-like protein (ALP)

[不溶性アレルゲン] α / β -gliadin, γ -gliadin, ω 1,2-gliadin, ω 5-gliadin, LMW-glutenin, HMW-glutenin

(1) 小麦アレルゲン cDNA のクローニング

受粉後 2 週および 5 週の小麦 (農林 61 号株) の実から total RNA を抽出した。この RNA を用いて、Omniscript RT Kit (QIAGEN) にて oligo dT をプライマーに cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型にして、各遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いて PCR 反応を行い、目的遺伝子を増幅した。PCR 反応には、正確性の高い KOD-Plus DNA polymerase (TOYOBO) を用いた。増幅した遺伝子を pTA2 ベクターにクローニングした後、塩基配列を決定した。

(2) リコンビナント小麦アレルゲンの発現および精製

水溶性小麦アレルゲンは、クローニングした遺伝子を pGEX-6p-1 (Amersham Bioscience) に組み込み、*E. coli* Rosetta 2 を宿主大腸菌として用いてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させた。リコンビナントタンパク質を発現誘導した大腸菌は Phosphate buffered saline (PBS) に懸濁し、超音波破碎機にて破碎した。破碎液を遠心分離した上清を Glutathione Sepharose 4B カラムに添加し、結合した GST 融合タンパク質を 10 mM 還元型グルタチオンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) にて溶出した。発現時に封入体を形成したリコンビナントタンパク質は、菌体破碎液を遠心分離後、沈殿に含まれる封入体を 0.5% Triton-X100 にて洗浄し、2% β -メルカプトエタノールと 7.5 M 尿素を含む PBS にて可溶化後、透析を行うことにより可溶化した。シャペロンタンパク質との共発現は、pKJE-8, pTf16 (Takara) シャペロンプラスミド、および、宿主大腸菌として *E. coli* BL21 株を用いて行った。

不溶性アレルゲンは、pET21 (a) (Novagen) あるいは pCold III (Takara) ベクターを用いて発現させた。発現の確認は抗グリアジン抗体を用いたウエスタンブロット法により行った。発現したタンパク質は、菌体より 70% エタノールで抽出し逆相高速液体クロマトグラフィー (C8 カラム) を用いて精製した。

(3) 患者血清 IgE の水溶性リコンビナント小麦アレルゲンへの結合解析

GST-小麦アレルゲン融合タンパク質溶液を PreScission Protease にて、GST と小麦アレルゲンに切断した。反応液を Glutathione

Sepharose 4B カラムに通すことにより、GST をタンパク質溶液中から除去した。粗精製した水溶性リコンビナントアレルゲンに対する患者血清 IgE の結合は、HRP 標識抗ヒト IgE 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

(1) 小麦アレルゲン遺伝子のクローニング

EST データベースに登録されている小麦アレルゲン塩基配列を基に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、全ての目的遺伝子を増幅しクローニングすることが出来た。塩基配列を解析した結果、27kP 遺伝子は全長 699 bp であった。データベースに報告されていた配列 (GenBank accession No. AB085212) と比較すると、7 箇所にもミューテーションが認められたが、塩基配列から予測されるアミノ酸配列はデータベースのものと完全に一致していた。PAP 遺伝子は 1026 bp であり、報告されている配列と比べると、51 bp の欠失および 15 箇所にもミューテーションが確認された。999 bp の PER 遺伝子は、報告されている cDNA 配列と同じ配列であった。AI-CM3 および AI0.19 は、それぞれ 375 bp および 423 bp であり、報告されている cDNA 配列と完全に一致した。TRX は 327 bp であり、8 箇所にもミューテーションが認められた。TPIS は 327 bp であり、2 箇所にもミューテーションが認められた。LTP は 273 bp であり、1 箇所にもミューテーションが認められた。Serpine は、配列の異なる 3 種類の cDNA (Serp-A, -B, -C) がクローニングされた。Serp-A 遺伝子のアミノ酸配列は Y11485 遺伝子から予測されるアミノ酸配列と 99.5% の相同性を示し、他の Serpin-B, C よりも相同性が高かった。ALP 遺伝子は 495 bp であり、その塩基配列は報告されている ALP 遺伝子 (CD898855) と完全に一致していた。AI-CM16 は、異なる 2 種類の遺伝子 (AI-CM16A, AI-CM16B) がクローニングされた。AI-CM16A および AI-CM16B のアミノ酸配列は、報告されている AI-CM16 遺伝子 (X17537) から予測されるアミノ酸配列とそれぞれ 90.8% および 97.5% の相同性を示した。Ser#10 については、全長 255 bp の 4 種類の遺伝子がクローニングされた。EU051824 配列から予測されるアミノ酸配列と比較すると、1 アミノ酸の変異が認められた。 α/β -Gliadin 遺伝子は 807 bp であり、U08287 と同一の配列であった。 γ -Gliadin 遺伝子は全長 840 bp であり、AF12067 遺伝子と比較すると、9 塩基の挿入と 1 塩基の変異が認められた。 ω 1, 2-gliadin は、全長 1,101 bp であり、AF280606 配列と比べると全長で 81 bp 長かった。予想されるアミノ酸配列の相同性は 83% であった。LMW-glutenin は、全長 855 bp であり、AB62860

遺伝子と塩基配列で 97.8%、アミノ酸配列で 97.2% のホモロジーが認められた。HMW-glutenin 遺伝子は、全長 2,385 bp であり報告されている M22208 と cDNA で 99.9%、アミノ酸で 99.7% の相同性であった。

小麦アレルゲンをコードする遺伝子は、染色体上に複数コピーが存在することが知られている。今回行った遺伝子のクローニングにおいても、数種の異なる塩基配列の cDNA がクローニングされた。本研究では、報告されているアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質をリコンビナントアレルゲンとして発現させた。

(2) リコンビナント小麦アレルゲンの発現および精製

水溶性アレルゲンを pGEX-6p-1 に組み込み、宿主大腸菌として Rosetta 2 用いて GST-アレルゲン融合タンパク質として発現させる事に成功した (Fig. 1)。しかしながら、4 種 (Ser#10, SerpA, TRX, TPIS) 以外のリコンビナントタンパク質は封入体を形成していた。

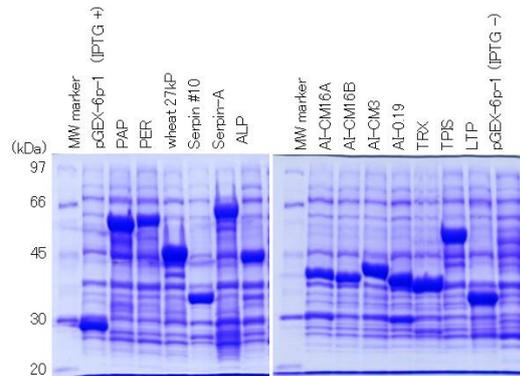


Fig 1 GST-小麦アレルゲン融合タンパク質の発現

封入体として発現したタンパク質は、尿素入り緩衝液で溶解後、PBS にて透析することによりリフォールディングを行うことで可溶化することが出来た。Glutathione Sepharose 4B を用いて精製した融合タンパク質を解析した結果、70% 以上の純度であった (Fig. 2)。

精製した GST-小麦アレルゲン融合タンパク質から GST タグの切断除去を試みた。

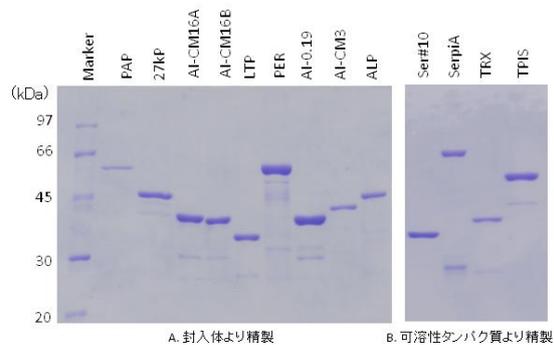


Fig 2 粗精製リコンビナントタンパク質の SDS-PAGE 解析

PreScission Protease により、GST と小麦アレルゲンに切断可能であった。しかし、封入体を形成したアレルゲンについては、Glutathione Sepharose 4B カラムやイオン交換カラムクロマトグラフィーでは GST と目的アレルゲンを分離精製することが出来なかった。この理由として、リフォールディングが正常に行われていないと考えられたため、融合タンパク質をシャペロンタンパク質と共発現させることによる可溶化発現を行った。その結果、DnaJ, DnaK, GrpE, GroEL, GroES, Tf といったシャペロンと共発現することにより、可溶化発現させることに成功した (Fig. 3)。

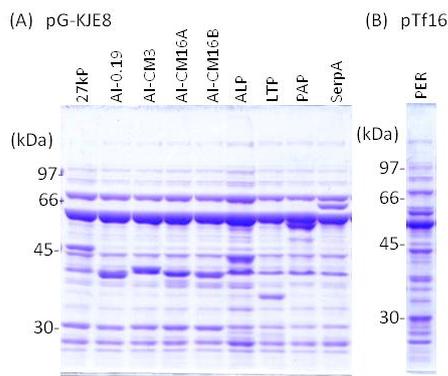


Fig. 3 シャペロンと共発現した可溶性画分のSDS-PAGE解析

不溶性アレルゲンの内、 α/β -gliadin, γ -gliadin, LMW-glutenin, HMW-glutenin は pET ベクターを用いて、 $\omega 1, 2$ -gliadin および $\omega 5$ -gliadin は発現ベクターとして pCold III を用いて発現誘導を行った。IPTG により発現を誘導した大腸菌の全タンパク質を SDS-PAGE により解析した結果、CBB 染色では各タンパク質の明らかな発現は認められなかったが、抗 gliadin 抗体によるウエスタンブロットの結果、全ての目的タンパク質が発現している事を確認した。発現したタンパク質は、菌体より 70%エタノールで抽出し逆相高速液体クロマトグラフィー (C8 カラム) を用いて精製することが出来た。HMW-glutenin については HPLC による分離で 2 つのピークが認められ、大腸菌内で一部分解されていると考えられた (Fig. 4)。

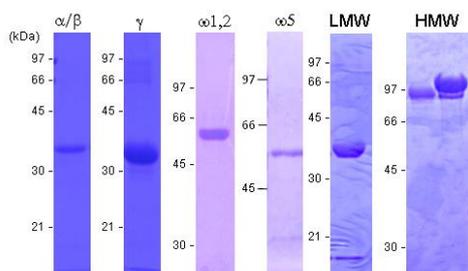


Fig. 4 リコンビナント不溶性アレルゲンのSDS-PAGE解析

(3) 患者血清 IgE の水溶性リコンビナント小麦アレルゲンへの結合解析

精製した GST-小麦アレルゲン融合タンパク質に対する IgE の反応性を、5 名の小麦アレルギー患者血清を用いて解析した。その結果、患者血清 IgE は AI-0.19, 27kP および PER にそれぞれ結合した。したがって、これらのリコンビナント小麦アレルゲンは特異 IgE 抗体の測定に利用することができると示唆された。しかしながら、実験に利用した患者血清中に、今回作製したリコンビナント水溶性小麦アレルゲンに対する特異 IgE 抗体が含まれているとは限らない。今後、小麦粉より精製したネイティブアレルゲンとリコンビナントアレルゲンのアレルゲン性の比較、および、多数の患者と健常者血清を用いた IgE 結合解析を行い、リコンビナントアレルゲンの診断への有用性を明らかにしたい。

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 9 件)

1. 原田晋, 和田康夫, 松尾裕彰: 寒冷下のみ症状が発現した小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの 1 例. 皮膚科の臨床, 査読有, 53(1): 97-100, 2011.
2. Matsuo H, Uemura M, Yorozuya M, Adachi A, Morita E: Identification of IgE-reactive proteins in patients with wheat protein contact dermatitis. Contact Dermatitis, 査読有, 63(1): 23-30, 2010.
3. 原田晋, 松永亜紀子, 宮地里江子, 松尾裕彰: チョコチップの同時摂取により反応が増強した小麦アレルギーの 1 例. 皮膚科の臨床, 査読有, 52(3): 375-378, 2010.
4. 上野充彦, 足立厚子, 福本毅, 西谷奈生, 藤原規広, 松尾裕彰, 河野邦江, 森田栄伸: 小麦依存性運動誘発アナフィラキシーと Baker's asthma 合併例における原因抗原の解析. アレルギー, 査読有, 59(5): 552-557, 2010.
5. Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A: Food-dependent exercise-induced anaphylaxis - importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis-. Allergol Int, 査読有, 58(4): 493-498, 2009.
6. 森田栄伸, 松尾裕彰: 【食物アレルギーの新たな進展】 食物依存性運動誘発アナフ

- イラキシンの抗原分析. 臨床免疫・アレルギー科, 査読無, 51(4): 371-376, 2009.
7. 松尾裕彰: 小麦アレルギー診断法の確立に向けて. Visual Dermatology, 査読無, 8(9): 960-964, 2009.
 8. 上野充彦, 足立厚子, 福本 毅, 西谷奈生, 藤原規広, 松尾裕彰, 河野邦江, 森田栄伸: 小麦依存性運動誘発アナフィラキシーと baker's asthma 合併例における小麦中の原因抗原の検討. Visual Dermatology, 査読無, 8(9): 918-920, 2009.
 9. 足立厚子, 松尾裕彰, 河野邦江, 森田栄伸: 小麦による接触蕁麻疹と protein contact dermatitis. Visual Dermatology, 査読無, 8(9): 930-932, 2009.

[学会発表] (計3件)

1. 松尾裕彰, 石井香, 高萩俊輔, 秀道広: アスピリンによるヒト好塩基球からのヒスタミン遊離増強機序の検討. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 2010年11月25-27日.
2. 萬谷みゆき, 森田栄伸, 松尾裕彰: 水溶性小麦アレルゲンのリコンビナント蛋白質の作製. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田市, 2009年10月29-31日.
3. 原田晋, 和田康夫, 松尾裕彰: 寒冷条件下でのみ症状の誘発を認めた小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの1例. 第60回中部支部学術大会. 京都市, 2009年10月10-11日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 裕彰 (MATSUO HIROAKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 60346385

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: