

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14415

研究課題名（和文）小麦の低アレルゲン化に関与するプロアントシアニジンの探索と作用機序に関する研究

研究課題名（英文）Evaluation of reduced allergenicity of wheat using proanthocyanidins

研究代表者

村上 太郎 (Satsuki-Murakami, Taro)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：70393254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：果実や種実などのプロアントシアニジン（PAC）の抽出物はグリアジンに結合することによって、ELISAでの小麦の測定に影響を与える。このため、本研究ではPACによるグリアジンへの結合能を利用することで、小麦の低アレルゲン化法の開発に繋がる可能性があると考え、グリアジン中のエピトープとの結合に関与するPACを食品中から探索することを目的とした。グリアジン中の33残基のペプチドを認識する抗体を利用して、グリアジンのエピトープに対するPACの結合能を評価する方法を確立した。また、植物種ごとのPACの差異は高分解能飛行時間型質量分析装置で分析することによって解析することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では小麦グリアジン中の33残基のペプチドを認識する抗体を利用することによって、PACのグリアジンへの結合能を評価する方法を確立した。また、PACのPhologlucinol分解産物を高分解能飛行時間型質量分析装置で分析することによって、植物種ごとのPACの差異解析も可能であったため、今後はグリアジンへの結合能の高いPACの構造確認への応用も期待される。本研究で得られた成果を応用することで、グリアジンへの結合能の高い植物中のPACを確認することができるため、小麦の低アレルゲン化法の開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Extraction solutions containing proanthocyanidins (PACs) were observed to inhibit gluten quantification using ELISA. Consequently, we hypothesize that utilizing the binding affinity of PACs to gliadin could potentially facilitate the development of a hypoallergenic approach for wheat. The primary objective of this investigation was to explore the involvement of PACs in binding to epitopes within gliadin. Through the utilization of an antibody that specifically recognizes the immunodominant 33-mer peptide derived from α -gliadin, a methodology for assessing the binding capacity of PACs to the gliadin epitope was established. Distinctions in PACs across various plant species were discernible through the implementation of high-resolution time-of-flight mass spectrometry.

研究分野：食品化学

キーワード：小麦グリアジン プロアントシアニジン 高分解能質量分析装置 ELISA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小麦は主食となる穀物の一つであり、多くの加工食品の原材料として利用されてきた。一方で、小麦中のタンパク質は食物アレルギーに関する課題も報告されている。欧米では、小麦グルテン感受性の自己免疫疾患であるセリアック病が多く報告されており、グルテンの使用についての食品の表示が義務化されている。国内では即時型アレルギーについての全国モニタリング調査が行われており、小麦は鶏卵と乳とともに食物アレルギーの3大原因食品と報告されている[Ebisawa et al. 2017]。国内では、小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの主要なアレルゲンに対する血清中 IgE 抗体の調査から、少なくとも 0.21%以上の成人が小麦アレルギーを有していると推定される[Morita et al. 2012]。小麦アレルギーは成人での発症数が最も多いため[Ebisawa et al. 2017]、有効な治療法が必要とされている。

食物アレルギーに関しては、これまでアレルギーを引き起こす食品をできる限り除去して摂取しないという対応が行われてきた。乳幼児で発症数の多い鶏卵や牛乳などのアレルギーでは現在の対応でも耐性を獲得しやすいが、小麦による食物アレルギーは成人での発症数が最も多く、耐性獲得のための治療法が必要とされている。小麦は多くの食品の原材料として汎用されており、食事から小麦を除去することはアレルギー患者に多くの負担が伴う。

近年、積極的にアレルゲンとなる食品を最小限接摂取することによって食物アレルギーを治療できる可能性が示唆されるようになり、経口免疫寛容を利用した治療法の臨床研究が進められている。しかしながら、一定数の患者でアナフィラキシーなどの重篤な症状を起こす場合もあり、低アレルゲン化した食品が必要とされている。

2. 研究の目的

小麦中のタンパク質は溶解性の違いによって4種類に分類されており、水溶性のアルブミン、塩溶性のグロブリン、アルコール溶性のグリアジン、アルカリ可溶性のグルテリンに分類されている。製パン業者での職業性喘息として古くから確認されてきたアレルギーは、グロブリンとグリアジンからアレルゲンが報告されている。一方で、小麦の摂取による即時型アレルギーの主要なアレルゲンは、グリアジンもしくはグルテニンに分類される[Tatham & Shewry 2012]。

グリアジンはアミノ酸配列に Proline と Glutamine の含有量が高く、これらのアミノ酸を含む繰返し配列によって消化酵素による分解を受けにくい [Haush et al. 2002]。このアミノ酸の繰返し配列中には小麦アレルギー患者の血清中の IgE 抗体との結合に必要なエピトープが確認されている[Arentz-Hansen et al. 2002]。グリアジンは小麦の主要なアレルゲンであるため、グリアジン中のエピトープによって引き起こされる免疫応答を制御することができれば、小麦の低アレルゲン化法の開発に繋がる可能性がある。近年、海外では食品中のプロアントシアニジン (Proanthocyanidin: PAC) 抽出物を利用した小麦の低アレルゲン化についての研究も報告されている[Perot et al. 2017]。PAC による低アレルゲン化法は落花生にも応用されており[Plundrich et al. 2014]、新たな低アレルゲン化法としての開発が期待されている。

これまでに果実や種実などの PAC を含む食品の抽出物により、ELISA でのグリアジンに対するポリクローナル抗体との抗原抗体反応が阻害を受けていることを確認した [Satsuki-Murakami et al. 2018]。このため、PAC によるグリアジンへの結合能を利用することによって、小麦の低アレルゲン化法の開発に繋がる可能性があると考え、本研究ではグリアジン中のエピトープとの結合に関与する PAC を食品中から探索することを目的とした。また、PAC が結合したグリジアンの消化吸収後のアレルゲン性を評価するための評価系についても検討を行った。

3. 研究の方法

3.1 グリアジンのエピトープとの結合に関与する PAC の探索

PAC のスクリーニング法としてはグリアジン中の 33 残基のペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体 (G12 mAb) を利用した競合 ELISA 法を利用した[Morón et al. 2008]。Prolamin Working Group (PWG) から入手したグリアジンの標準物質 PWG-Gliadin を、マイクロプレートの各 well に分注後、4 °C で一晩静置して固相化した。0.1 % Tween20 含有 PBS (PBS-T) で洗浄後、5 % スキムミルクを含む PBS-T を加えて 1 時間ブロッキングを行った。PBS-T で洗浄後、G12 mAb (Biomedal: 1 mg/mL) は 3 % BSA を含む PBS-T で段階希釈して分注後、1 時間静置した。PBS-T 洗浄し、TMB によって 20 分間発色後 1 mol/L 硫酸によって反応を停止し、マイクロプレートリーダーによって 450 nm における吸光度を測定した。得られた吸光度から各 well に固相化するグリアジンの濃度と G12 mAb の希釈率について最適化した。

PAC を含む試料として、ビルベリー、リンゴンベリー、ブドウ種子、ライチ種子、落花生種皮、カカオ、赤米、月見草の抽出物入手した。試料からは Robbins らによる抽出法を一部改良して PAC を抽出した。各試料抽出液は Dimethylaminocinnamaldehyde による比色法を利用して総 PAC 量を定量した[Prior et al. 2010]。定量後、0.12-250 µg/mL となるように PBS で段階希釈して G12 mAb と混合し、ローテーターによって 1 時間混合した。混合液はグリアジンを固相化したマイクロプレートに分注後、最適化した条件と同様の操作を行って、各 well の吸光度を求めた。各 well の吸光度と PAC 量から統計解析ソフトウェア OriginPro2020 によって反応阻害曲線を求め、50% 阻害濃度 (IC50) を算出した。

3.2 PACの化学構造の解析

食品中の PAC は基本骨格や重合度が異なる化合物が含まれているため、各抽出液を Phologlucinol の存在下で基本骨格となる単量体まで酸加水分解後に分析した[Koerner et al. 2009]。分解した PAC の単量体は高速液体クロマトグラフィーによって分離後に、高分解能飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS) X500R (SCIEX) によって PAC を分析した。得られたマススペクトルを解析することによって、各試料の基本骨格とガロイル基などの修飾を確認した。また、LC-QTOF/MS によって確認できた各ピークは各化合物のプリカーサーイオンの精密質量とその強度を MarkerView ソフトウェア (SCIEX) によって多変量解析を行った。

3.3 グリジアンの消化吸収による影響評価

PWG-Gliadin を人工消化液によって消化後、Caco2 細胞を利用した腸管吸収モデルを利用して評価を行った[Minekus et al. 2014, Artursson et al. 2001]。腸管吸収モデルでは経上皮電気抵抗装置 (TER) の測定によって、培養後と評価中の単層形成の状態を確認した。また、グリアジン中のエピトープペプチドを含む 33 残基のペプチドの吸収について評価を行った。次に、人工消化液の評価を確認した際に、Caco2 細胞の生育阻害が確認されたため、消化酵素の阻害剤や消化液の希釈率について検討を行った。

4. 研究成果

4.1 グリアジンのエピトープとの結合に関与する PAC の探索

競合 ELISA 法による発色条件を最適化した結果、各 well に 100 ng の PWG-Gliadin を固相化し、G12 mAb 抗体を 1/64000 希釈した際に良好な結果が得られた。このため、最適化した条件によって、各試料から抽出した PAC 抽出物を段階して反応阻害曲線を求めた。反応阻害曲線から求めた 50% 阻害濃度(IC50)は試料ごとに差異が確認され (2.7-52 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ライチ種子から抽出した PAC の IC50 が最も低く、グリアジンのエピトープに対する結合能が最も高いと推定された。

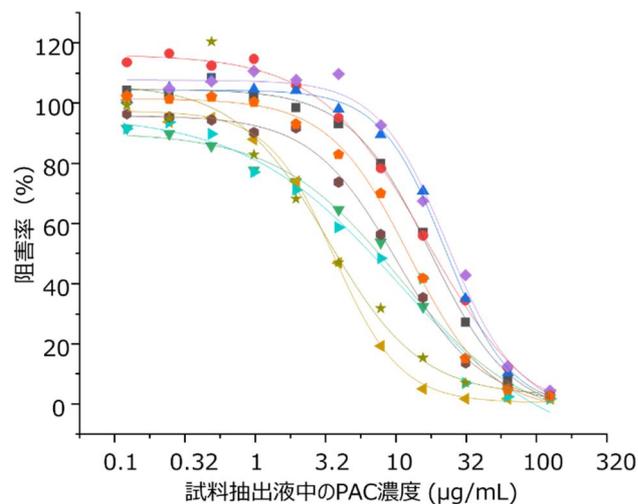


図1 PAC抽出液によるグリアジンの反応阻害曲線

4.2 PACの化学構造の解析

得られたマススペクトルから各試料中の PAC 中の基本骨格を確認したところ、主要な基本骨格として報告されている Epicatechin や Catechin が確認された。また、一部の試料では A 環の水酸基が C 環の 2 位に結合したエーテル結合を含む A タイプの PAC が確認された。また、各化合物のプリカーサーイオンの多変量解析を行った結果、IC50 の濃度が低かったライチ種子や落花生種皮に共通する特異的なプリカーサーイオンが確認された (図 2)。確認されたプリカーサーイオンの精密質量を化合物ライブラリーで検索を行い、文献情報から該当する化合物を確認したところ、図 3 に示す A タイプの procyanidin の延長鎖に由来することが確認された [Koerner et al. 2009]。A タイプの procyanidin の結合は PAC の立体構造にも関与するため、ライチ種子や落花生種皮の PAC に特異的な立体構造がグリアジンへの結合能に関与していることが示唆された。また、PAC の分解産物の多変量解析によって、植物種ごとの PAC の差異解析が可能であることが確認された。

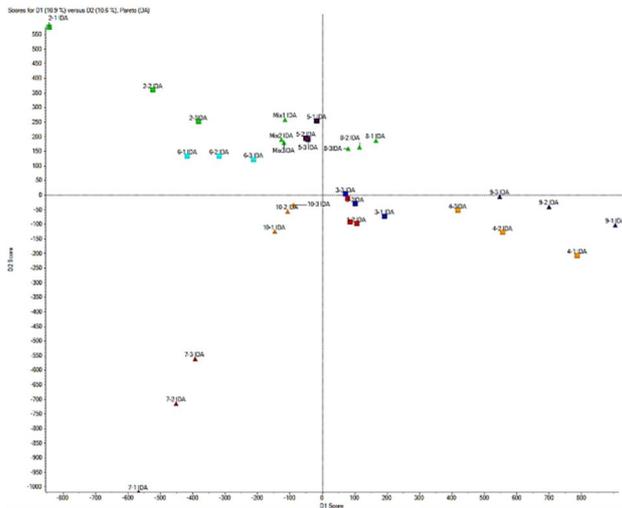


図2 PACのPhloglucinol分解産物の主成分分析

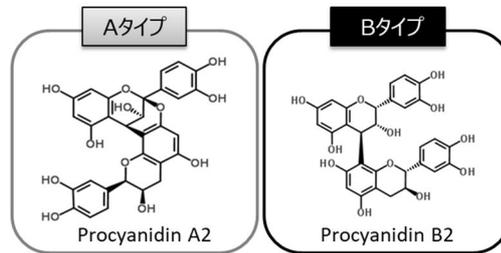


図3 試料中に含まれるプロアントシアニジンの基本骨格

4.3 グリジアンの消化吸収による影響評価

PBS緩衝液で溶解した33残基の小麦グリアジンペプチドを利用して、腸管吸収モデルによる評価を行った。内腔側にペプチドを添加した際にはTERの変化は6時間後にも確認されず、細胞の生育阻害も確認されなかった。また、6時間後の側底側の培地を採取し、G12 mAbを利用した競合ELISA法によって測定を行った結果、小麦グリアジンペプチドが検出されたため、33残基の小麦グリアジンペプチドは腸管内に吸収されることが確認された。

次に、人工消化液で消化した小麦グリアジンについてCaco2細胞を利用した腸管吸収モデルによる評価を行った際に、細胞の生育阻害が確認されたため腸管吸収による影響を評価できなかった。遠心式フィルター(分画分子量10000)を透過することによって生育阻害が軽減されたことから、分子量10000以上の消化酵素などにより生育阻害を受けていることが示唆された。

細胞の生育阻害は人工消化液中の消化酵素による影響が考えられたため、人工消化液による細胞の生育阻害を解消するための条件について検討を行った。消化液中のキモトリプシンなどのセリンプロテアーゼの阻害剤である4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride(以下AEBSF)を人工消化液に添加して、試料添加後の経上皮電気抵抗値(TER)を経時的に測定した。評価の結果、AEBSFを加えた場合にもTERの減少と細胞の剥離が確認された。人工消化液をPBSによって段階希釈することによって、Caco2細胞の生育阻害について軽減された。人工消化液による生育阻害を軽減する方法について検討した結果、本研究期間内では消化液の希釈以外には生育阻害を改善する方法は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上太郎, 村野晃一, 山崎朋美, 柿本葉, 若栗忍, 高取聡, 角谷直哉, 渡辺卓穂
2. 発表標題 精度管理用試料を利用した特定原材料（小麦）の測定阻害評価と改良抽出法についての検討
3. 学会等名 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上太郎, 村野晃一, 山崎朋美, 柿本葉, 若栗忍, 高取聡, 角谷直哉, 渡辺卓穂
2. 発表標題 特定原材料（小麦）の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製
3. 学会等名 AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION第25回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上太郎, 村野晃一, 山崎朋美, 柿本葉, 若栗忍, 高取聡, 角谷直哉, 渡辺卓穂
2. 発表標題 特定原材料（小麦）の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製
3. 学会等名 第59回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上太郎, 村野晃一, 山崎朋美, 柿本葉, 若栗忍, 高取聡, 角谷直哉, 渡辺卓穂
2. 発表標題 特定原材料（小麦）の改良抽出法の室間共同試験による評価
3. 学会等名 日本食品化学学会 第29回総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上太郎、村野晃一、工藤鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫
2. 発表標題 特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定
3. 学会等名 第58回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上太郎、工藤鮎子、村野晃一、山口之彦、山野哲夫
2. 発表標題 小麦グリアジンのエビトープとの結合に関与する プロアントシアニジンの探索
3. 学会等名 日本食品化学学会 第 26 回総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>カカオを含む加工食品からの小麦タンパク質の改良抽出法について http://www.iph.osaka.jp/s011/20220221103111.html</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------