

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06236

研究課題名(和文) 魚類アレルギー(パルプアルブミン)の立体的なIgE抗体結合エピトープの構造解明

研究課題名(英文) Study of conformational IgE-binding epitopes of fish allergen, parvalbumin

研究代表者

小林 征洋(KOBAYASHI, Yukihiro)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：30511753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：硬骨魚類共通のアレルゲンであるパルプアルブミン(PV)の抗体結合部位(エピトープ)の解析を行った。硬骨魚類は複数のPV遺伝子(pvalb)をもつが、筋肉ではpvalb1～pvalb4が高発現し、アレルゲンPVはすべてこれらに属した。これらの相同遺伝子は他の脊椎動物が硬骨魚類から分岐した後に遺伝子重複で生じたとみられ、アレルゲン以外の硬骨魚類PVや他生物のPVにはみられなかった。エピトープと同位置の残基は硬骨魚類のpvalb1～pvalb4で保存されており、他生物では変異が多かった。これら残基の分子表面上の静電ポテンシャルは、硬骨魚類同士で似ているが、その他の生物では相違が多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マサバPVのエピトープは様々な魚類で保存されており、フォールディングにより分子表面に出現すること、アレルゲンとなるPVの相同遺伝子は魚類以外の生物が分岐した後に、魚類において遺伝子重複によって生じた可能性があることが判明した。これらのことは、魚類間のPVの相同性が低いにもかかわらず高い抗原交差性(同じ抗体が結合する性質)をもつことと、魚類以外のPVがアレルゲンとなるのは稀であることの要因といえる。エピトープの情報は適切な魚類アレルギーの診断や抗体結合能を失わせたPVの投与による根本治療の開発、加工食品の表示制度の改善に重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the IgE-binding sites (epitopes) of parvalbumin (PV), a major allergen in teleost fish. Teleost fish have multiple homologous genes of PV (pvalb), but only pvalb1 to pvalb4 are highly expressed in muscle, and all allergenic PVs belong to these 4 genes. These homologous genes were likely generated by gene duplication after other vertebrates diverged from teleost fish. In addition, these genes were not found in non-allergen PVs of teleost fish or PVs of other organisms. The epitope and co-located residues were conserved in pvalb1 to pvalb4 of teleost fish, and were, however, frequently mutated in other organisms. The electrostatic potentials of these residues on the molecular surface were similar among teleost fish, but differed frequently among the other organisms.

研究分野：食品化学

キーワード：パルプアルブミン IgE結合エピトープ アレルゲン 魚類

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは生命維持に必須な食品摂取で誘発されるため、他のアレルギーより問題は深刻である。日本では、魚類アレルギーは成人における食物アレルギー新規発症例の第2位であり、大きな問題となっている。魚類アレルギーの共通する誘起物質(アレルゲン)として、パルプアルブミンが同定されている。パルプアルブミンは脊椎動物特有の分子量約10-12 kDaのタンパク質で、Ca²⁺結合性をもち、筋肉弛緩に関与する。多くの研究から、硬骨魚類パルプアルブミンのヒトIgE抗体と結合する領域(IgE抗体結合エピトープ)の構造は、様々な魚種で類似すると考えられている。我々はこれまでに、IgE結合エピトープがポリペプチド鎖上ではなく、タンパク質が適切に折り畳まれた際に出現する領域にある可能性を報告した。その後、マサバパルプアルブミンのIgE結合エピトープを解析し、2つの立体構造IgE抗体結合エピトープの構造を明らかにした。これらのエピトープを形成するアミノ酸は、一次構造上でみるとそれぞれ遠く離れて点在していた。

パルプアルブミンは超耐熱性タンパク質であるが、少なくともマサバパルプアルブミンは100℃を超える加熱で熱変性し、IgE結合エピトープが崩壊するためIgE反応性が失われる。このことから、様々な魚種でパルプアルブミンを変性させることができれば、魚肉の低アレルゲン化が可能になるだけでなく、熱変性させたパルプアルブミンを副作用を伴わない免疫療法に利用することもできる。しかし、様々な魚種のパルプアルブミンがマサバパルプアルブミンと同様の立体構造IgE結合エピトープを有するかは不明である。

患者のIgE抗体は様々な魚種のパルプアルブミンに対して同等の反応性を示すことが多いが、魚種によっては異なる場合もある。また、同じ魚種のパルプアルブミンでもアイソフォームによって、IgE抗体との反応性が大きく異なる場合もある。パルプアルブミンの相同遺伝子は複数存在するが、筋肉で発現するアイソフォームをコードする相同遺伝子がどれであるかの情報はほとんどない。IgE結合エピトープを比較するにはアミノ酸配列は必須であることから、アレルゲンとなる相同遺伝子を特定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、マサバパルプアルブミンの立体構造IgE結合エピトープの情報を活用し、様々な魚種のパルプアルブミンのエピトープの構造と性質を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) パルプアルブミン遺伝子の系統樹解析

硬骨魚類157個、軟骨魚類5個、肉鰭類5個、両生類11個、鳥類3個および哺乳類14個のパルプアルブミン遺伝子の演繹アミノ酸配列について系統樹解析を行った。なお、IUISアレルゲンデータベースに登録されている硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類のパルプアルブミンの配列を含めた。

(2) パルプアルブミン遺伝子の発現量解析

NCBIに登録されているDNAマイクロアレイデータを基に、ゼブラフィッシュおよびニジマスのパルプアルブミン遺伝子の発現量を調べた。

(3) パルプアルブミン遺伝子のcDNAクローニング

近縁種のパルプアルブミン遺伝子を基にプライマーを作製し、9魚種のパルプアルブミン遺伝子をcDNAクローニングした。

(4) パルプアルブミンのIgE反応性および抗原交差性

上記で使用した9魚種の抽出液に対するIgE反応性を調べてパルプアルブミン含有量と比較し、パルプアルブミンとIgE抗体との親和性の強弱を推定した。また、7魚種の精製パルプアルブミンのIgE反応性を調べるとともに、抗原交差性を調べた。

(5) 静電ポテンシャル解析

RCSB Protein Data Baseにある魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類のパルプアルブミンの立体構造データを用い、分子表面上における静電ポテンシャルを調べた。

4. 研究成果

(1) エピトープの解析にあたり、アレルゲンとして登録されている魚類パルプアルブミン遺伝子が硬骨魚類の筋肉で発現している主要なアイソフォームであることを明らかにする必要がある。そこで、まずパルプアルブミン遺伝子の分類を行った。アレルゲンデータベースに登録されてい

るすべてのパルプアルブミンのアミノ酸配列に、遺伝子座が明らかになっている既知のパルプアルブミンの配列の相同遺伝子を加えて系統樹解析を行った。その結果、硬骨魚類でアレルゲンとなるパルプアルブミンは pvalb1 から pavalb4 のいずれかの相同遺伝子にコードされることが判明した。アレルゲンとはならない硬骨魚類のパルプアルブミンは pvalb5 から pavalb10 に分類された。一方、アレルゲンとして登録されている軟骨魚類、両生類、爬虫類のパルプアルブミンは pvalb6 および pvalb7 にコードされていた。アレルゲンとしての報告がない哺乳類パルプアルブミンは pvalb6 から pvalb9 に分類された。これらの結果から、硬骨魚類アレルゲンは pvalb1 から pavalb4 のいずれかであり、硬骨魚類パルプアルブミンが魚種間で高い抗原交差性を示すのは、これらがオースログの関係にあるためと考えられた。一方、硬骨魚類のパルプアルブミンが軟骨魚類、両生類、爬虫類または鳥類との間で低い抗原交差性を示し、哺乳類が IgE 反応性を示さないのは、硬骨魚類との間でパラログの関係にあるためと考えられた。

(2) データベースの DNA マイクロアレイデータを基に、ゼブラフィッシュおよびニジマスのパルプアルブミンの相同遺伝子の mRNA 発現量を調べた。その結果、pavalb1 から pavalb4 が高発現しており、pavalb4 が特に高かった。

(3) これまでにパルプアルブミンの配列が解析されていなかった 9 魚種のパルプアルブミンについて cDNA クローニングを行い、cDNA 配列および演繹アミノ酸配列を決定した。この際、参考とした近縁種のパルプアルブミンには pavalb1 から pavalb4 のいずれかを用いた。決定した配列について系統樹解析を行ったところ、pavalb1 から pavalb4 に分類された。既に明らかにしたマサバの主要エピトープ残基とこれら 9 魚種のアミノ酸配列を比較としたところ、マサバのエピトープ残基と同位置の残基は同一のアミノ酸であるか同じ性質のアミノ酸に置換されており、IgE 結合エピトープがよく保存されていた。

(4) 9 魚種の抽出液の IgE 反応性を調べたところ、パルプアルブミン含有量が多く IgE 反応性が弱い親和性が低いとみられるグループと、パルプアルブミン含有量が少なく IgE 反応性が強い親和性が高いとみられるグループに分けられた。これら魚種のアミノ酸配列をマサバのエピトープ残基と比較すると、グループごとに共通した置換がみられることが分かった。7 魚種の精製パルプアルブミンの IgE 反応性を調べたところ、反応性に強弱がみられるものの高い抗原交差性が認められ、同じ IgE 結合エピトープを共有していることが確認された。

(5) マサバパルプアルブミンの分子表面上における静電ポテンシャルと、アレルゲンとして報告のある硬骨魚類のパルプアルブミン、硬骨魚類パルプアルブミンと交差性があるまたはあることが疑われる軟骨魚類、両生類、爬虫類および鳥類のパルプアルブミン、ならびにアレルゲンとしての報告がない哺乳類パルプアルブミンの静電ポテンシャルを比較した。その結果、マサバパルプアルブミンのエピトープにおける静電ポテンシャルのパターンは他の硬骨魚類でもほぼ同じであり、軟骨魚類、両生類、爬虫類および鳥類では僅かに異なるパターンを示した。一方、哺乳類パルプアルブミンの静電ポテンシャルは電位が著しく異なる領域が存在した。これらのことから、硬骨魚類以外のパルプアルブミンでは限られた一部の領域と IgE 抗体との間で斥力が強く働き、IgE 反応性が低下または消失するものと予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------