

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580245

研究課題名（和文） 魚卵アレルギーにおける交差性成立機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of antigenic cross-reactivity mechanism in fish roe allergy

研究代表者

佐伯 宏樹 (SAEKI HIROKI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：90250505

研究成果の概要（和文）：

魚卵の主要アレルゲンである卵黄タンパク質 ( $\beta^{\prime}$ -c) のアレルゲン解析と交差性調査を行なった。(1) シロザケ  $\beta^{\prime}$ -c 分子のアミノ酸配列上に 5 カ所の IgE エピトープを見出した。このうち 3 カ所は、多くの魚類  $\beta^{\prime}$ -c 間でアミノ酸配列が類似した領域に存在していた。これら魚類共通エピトープが、魚卵アレルギーの交差性成立に関与していると思われる。(2) ボラ卵にはシロザケ  $\beta^{\prime}$ -c との間で IgE 交差性を示す 6 種類の  $\beta^{\prime}$ -c アイソフォームが存在した。(3) 性成熟したシロザケの筋肉には  $1 \mu\text{g/g}$  を超える  $\beta^{\prime}$ -c 様タンパク質が存在したので、このような魚肉の摂取が魚卵アレルギーを惹起する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Allergen analysis of major allergic yolk protein,  $\beta^{\prime}$ -component ( $\beta^{\prime}$ -c) was examined in this study and the results were as follows: (1) Five kinds of IgE sequential epitopes in  $\beta^{\prime}$ -c were identified by overlapped peptide mapping and ELISA. The three kinds of the IgE-binding sites seem to be common epitopes of fish roe, because they were located in high homologous regions of fish  $\beta^{\prime}$ -cs. (2) Six kinds of  $\beta^{\prime}$ -c isoforms were prepared from mullet roe and they showed IgE cross-reactivity with salmon  $\beta^{\prime}$ -c. (3) Vitellogenin subfragment over  $1 \mu\text{g/g}$  were observed in matured salmon muscle and they showed  $\beta^{\prime}$ -c-specific IgE-binding ability, suggesting food intake of fish meat may induce sensitization to fish roe allergy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：魚卵，食物アレルギー，アレルゲン， $\beta^{\prime}$ -コンポーネント

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギーは先進諸国において大きな問題となっている。特に日本では、海産物を多く摂取する文化的背景もあり、魚介類アレルギーが多く報告されている。なかでも魚卵は、1~3歳児におけるアレルギー発症例が魚介類中で最も多く、いくらは、食品衛生法でアレルギー表示推奨品目に指定されている。しかし、魚卵に関するアレルゲン情報は少なく、その感作機構や抗原交差の範囲等、不明な点が多い。

本研究者は、魚卵の主要アレルゲンが、卵黄タンパク質の一種である $\beta'$ -cであることを見だし、その一次構造を明らかにするとともに、交差性情報の充実をはかってきた。しかしながら、アレルギー発症の引き金となるIgEの結合部位は不明であり、魚種間交差性の範囲や魚卵以外の食物との交差性に関する情報も少なかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、食用魚卵における共通アレルゲン( $\beta'$ -c)の一次構造を決定後、そのエピトープ解析をおこない、共通エピトープの存在(図1)を立証するとともに、同エピトープの確定を主目的とした。また、魚卵アレルギーにおける交差性情報のさらなる収集を目指し、からすみ原料であるボラ卵とシロザケ卵間のIgE交差性および魚卵アレルギーと魚肉摂取の関係について検討し、交差性成立機能の一端を明らかにしようとした。

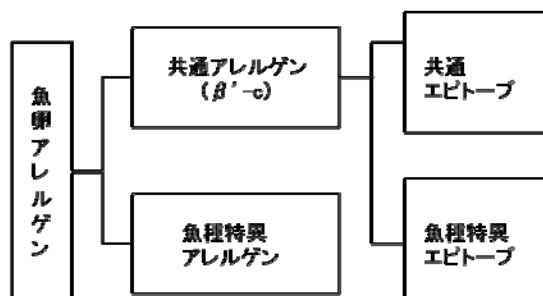


図1. アレルゲン解析の概略

### 3. 研究方法

#### (1) シロザケ $\beta'$ -cのエピトープ解析.

シロザケ $\beta'$ -cを限定消化し、生じたペプチドを分画した。そして、各ペプチドのIgE反応性を、いくらアレルギー患者血清を用いたELISAによって調べた。そして、得られたIgE反応ペプチドを配列分析に供し、これを本研究で補強した $\beta'$ -cの一次配列情報にあてはめた。続いて、患者血清IgEの結合が確認されたペプチドを基にオーバーラップペプチドを合成して同様のELISAに供し、IgEエピトープを決定した。

#### (2) 魚卵アレルギー交差性情報の充実.

魚種間交差性の調査は、各種魚卵の塩溶性画分のIgE反応性を阻害ELISAで調べた。また、シロザケおよびボラの卵から $\beta'$ -cを精製し、いくらアレルギー患者血清を用いた阻害ELISAによって、両者の抗原交差性について検討した。

魚卵と魚肉および内臓間の抗原交差性に関する検討は、性成熟したシロザケの筋肉と内臓組織の抽出物を抗 $\beta'$ -c抗体を用いたELISAに供し、 $\beta'$ -c様成分の検出を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) シロザケ $\beta'$ -cのIgE結合部位の決定.

シロザケ $\beta'$ -cを各種のプロテアーゼで限定消化して、9種類のペプチドを得た。これらをELISAに供したところ、図2に示すように、4種類のIgE反応ペプチドを得た。各ペプチドのアミノ酸配列は“A: DHASEQNHINVK” “B: GEGVSLYAK” “C: VVDWMK” および “I: YPVNMPLSCYQVLAQDCTIELK”であった。そこで次に、これら4種のペプチド配列を基に、オーバーラップペプチドを合成し(図3)、これらのIgE反応性をELISAで調べた。その結果、Ep.A: DHASEQNHIN” “Ep.B: GVSPLY” “Ep.C: VVDWMK” “Ep.I-1: NMPLSCYQV” “Ep.I-2: LAQDCTIEL”の5配列部分をIgEエピトープと判断した。

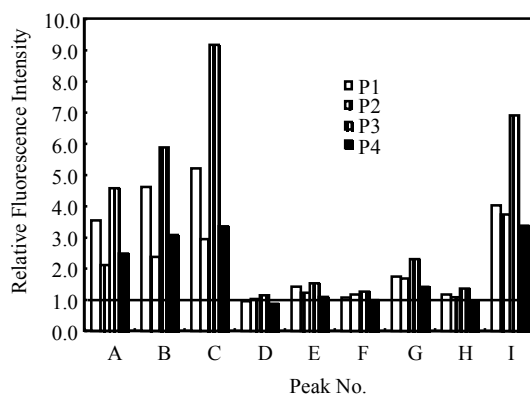


図2. シロザケ $\beta'$ -c限定消化ペプチドに対するシロザケ $\beta'$ -c特異IgEの反応性. A~I: 消化ペプチド. P1~P4: いくらアレルギー患者血清. 相対蛍光強度: 4検体の健常者血清の平均値に標準偏差の3倍を加算した値を基準として算出.

これらのアミノ酸配列は、 $\beta'$ -c内でN末端配列からそれぞれ51, 108, 132, 25および34番目に位置していた。Ep.I-1とEp.I-2は、ボラ、スケトウダラ、マツカワ等、複数魚種の $\beta'$ -c間で配列一致率の高い部位に存在しているもので、広範囲の魚種間交差性に関与しているものと推測される。以上の結果は、本研究者が予想していた魚種共通エピトープ

の存在とそれを介した交差性成立の可能性を示唆している。

なお、各種のデータベース検索において、魚肉成分や魚類以外の卵黄タンパク質中には、今回決定した IgE 結合部位と相同な部位は確認されなかったため、 $\beta^{\prime}$ -c の IgE 反応交差性は魚卵間にのみ成立すると思われる。

Origin	1	5	10	15	20																				
PA1	D	H	A	S	E	Q	N	H	I	N	V	K													
PA2				A	S	E	Q	N	H	I	N	V	K												
Peak A				E	Q	N	H	I	N	V	K														
PA4	D	H	A	S	E	Q	N	H	I	N															
PA5	D	H	A	S	E	Q	N	H																	
PB1	G	E	G	V	S	L	Y	A	K																
Peak B				G	V	S	L	Y	A	K															
PB3	G	E	G	V	S	L	Y																		
Peak C	P	C	I	V	V	D	W	M	K																
Peak I	P	I	Y	P	V	N	M	P	L	S	C	Y	Q	V	L	A	Q	D	C	T	I	E	L	K	
PI2				N	M	P	L	S	C	Y	Q	V													
PI3								L	S	C	Y	Q	V	L	A	Q									
PI4												Y	Q	V	L	A	Q	D	C	T					
PI5												L	A	Q	D	C	T	I	E	L					

図3. 合成ペプチドの配列一覧

(2) 魚種間交性の調査

ボラ卵の 0.5M NaCl 抽出画分をヒドロキシアパタイトカラムで分画したところ、図4に示すように、6種類の  $\beta^{\prime}$ -c アイソフォーム (M $\beta$ 1~M $\beta$ 6) を得た。

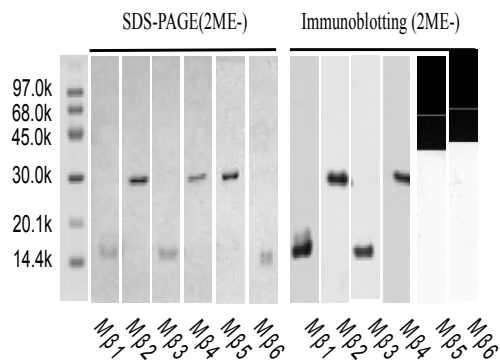


図4 ボラ  $\beta^{\prime}$ -c の非還元下 SDS-PAGE (左) および抗シロザケ  $\beta^{\prime}$ -c 抗体を用いたイムノブロッティング (右)

これらのアイソフォームは、低分子成分 (15k, 単量体) と高分子成分 (30k, 二量体) に大別され、N 末端アミノ酸配列が極めて類似していた (図5)。そして、いずれの M $\beta$  も抗シロザケ  $\beta^{\prime}$ -c 抗体を用いたイムノブロッティングにおいて、明確な反応が確認された。

次にこれらの M $\beta$  を、いくらアレルギー患者血清を用いた阻害 ELISA に供試し、シロザケ  $\beta^{\prime}$ -c との抗原交差性について調べたところ、全ての M $\beta$  が、シロザケ  $\beta^{\prime}$ -c と特異 IgE の反応を明確に阻害した (図6)。また、各 M $\beta$  の阻害能に差異は見られなかった。

以上の結果を従来の知見とあわせると、サケ、タラ、カレイ、ニシン、ボラなど日本で一般的に消費される魚卵類の  $\beta^{\prime}$ -c 間に IgE 交

差性が成立することが明らかである。

	1	5	10	15	20																								
M $\beta$ -1	I	T	K	A	H	A	V	E	E	N	L	V	R	D	T	L	I	T	F	N									
M $\beta$ -2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	X	.	.	.	.	.					
M $\beta$ -3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	G	.	Q	.	.	
M $\beta$ -4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M $\beta$ -5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M $\beta$ -6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	S	.	G	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	I	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

図5. ボラ  $\beta^{\prime}$ -c アイソフォームの N 末端アミノ酸配列

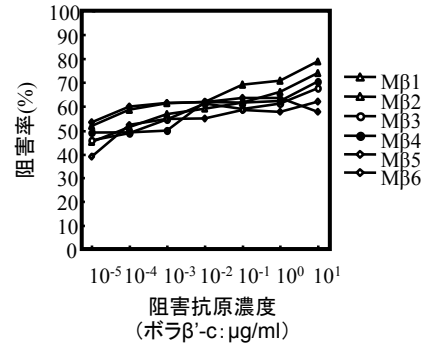


図6. シロザケ  $\beta^{\prime}$ -c (固相抗原) とボラ  $\beta^{\prime}$ -c (阻害抗原) の IgE 交差性を調べた阻害 ELISA

(3) 魚卵と魚肉および内臓間の抗原交差性に関する検討

前記 (2) で述べたように、データベース検索の結果によると、 $\beta^{\prime}$ -c の交差性は魚卵間にのみ成立すると思われる。しかし一方で、魚卵と魚肉間で IgE 交差性の存在を示唆する報告が存在する。そこで、抗  $\beta^{\prime}$ -c 抗体を用いたサンドイッチ ELISA とイムノブロッティングを用いてシロザケの筋肉と内臓に含まれる  $\beta^{\prime}$ -c 様成分を定量し、魚卵と魚肉間の抗原交差性に対する血中ビテロジェニン (Vg :  $\beta^{\prime}$ -c の前駆タンパク質) の関与について検討した。

シロザケ (オス 10 尾, メス 15 尾) から抽出した筋肉, 肝臓および腎臓から特定原材料抽出用試薬 (森永生科学研究所) を用いてタンパク質を抽出し、これに含まれる  $\beta^{\prime}$ -c を抗  $\beta^{\prime}$ -c 抗体を用いた ELISA によって定量した。結果を表1に示す。まずメス試料 (表1: F1-F15) では、全検体の筋肉, 腎臓および肝臓中に  $\beta^{\prime}$ -c 様タンパク質が検出された。この含有量は、いずれの魚体・部位でも、食品衛生法・アレルゲン表示制度における表示推奨量 (いくらとして 1g/g) を超えていた。またオス試料 (M1-M10) においても、10 検体中 7 検体の筋肉, 4 検体の肝臓で  $\beta^{\prime}$ -c 様タンパク質が検出された。なお  $\beta^{\prime}$ -c が卵黄タンパク質であることから、その含有量はメス試料よりも僅かであった。

イムノブロッティング解析によると、抗 $\beta^{\prime}$ -c抗体と反応・定量されたタンパク質は、 $\beta^{\prime}$ -cの他、分子量40k-200k以上のサブユニットを含む成分が含まれていた( $\beta^{\prime}$ -cは16-18Kの2サブユニット)。データベース検索において、筋肉や内臓中の既知タンパク質中には(2)で決定したIgE結合部位と相同性の高い部位の存在が確認されなかったため、筋肉や中で定量された $\beta^{\prime}$ -c様タンパク質は、血液中のVgの消化断片であると判断した。

表1. シロザケ筋肉、腎臓および肝臓中の $\beta^{\prime}$ -c

サンプルNo.	魚肉( $\mu\text{g/g}$ )	腎臓( $\mu\text{g/g}$ )	肝臓( $\mu\text{g/g}$ )
M1	0.02	0.00	0.00
M2	0.02	0.00	0.01
M3	0.03	Trace	0.00
M4	0.02	0.00	0.01
M5	0.14	Trace	0.17
M6	0.00	0.00	0.00
M7	Trace	0.00	0.01
M8	0.01	0.00	0.00
M9	0.00	0.00	Trace
M10	0.15	0.00	0.00
F1	0.1748	66.2696	0.1406
F2	1.8795	63.8452	34.7200
F3	6.3845	30.5287	14.8139
F4	3.3882	36.3965	25.9200
F5	2.1310	42.6817	7.4800
F6	3.0870	3.6957	1100.7804
F7	0.5190	53.8315	1762.9877
F8	1.3478	22.3098	1458.6399
F9	12.0815	4.3750	289.1862
F10	0.1793	1.2500	237.9041
F11	0.9855	0.0000	943.5897
F12	4.4080	7.4024	249.0524
F13	1.1639	4.8383	1748.4950
F14	3.5942	9.8551	337.1237
F15	2.0446	14.0914	465.3289

含有量 (M:オス, F:メス)

本実験で供試した魚類(表1)のうち、メスF1-F5は北海道での沿岸漁獲解禁後に市場で購入し、その他の雌雄個体は、河川遡上の直前に漁獲し、数日間の蓄養後、採卵・採精に用いられた個体である。メス個体については、魚体全体の部位が魚卵アレルギーを感作する可能性がある。またオス個体は、 $\beta^{\prime}$ -c含有量が少ないとはいえ、婚姻色の観察されない漁獲解禁直後では、雌雄の判別が難しく、さらに切り身などの加工品になった場合は雌雄の区別ができない。以上を踏まえると、漁獲シーズンのシロザケについては、雌雄を問わず、魚卵に準じるアレルギー含有食品として取り扱うことを検討すべきである。

(4) まとめ

本研究によって、魚卵中の $\beta^{\prime}$ -cを介したアレルギー交差性には、共通のIgEエピトープの存在が関与していると判断できる。また、

魚卵は筋肉や内臓との間にもVgを介した擬似的なアレルギー交差性を成立させることが確認できた。この結果は、魚肉の摂取によっても魚卵アレルギーの感作・発症が起こりうることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. Y. Shimizu, A. Nakamura, H. Kishimura, A. Hara, K. Watanabe, H. Saeki. Major allergen and its IgE cross-reactivity among the salmonid fish roe allergy. Journal Agricultural and Food Chemistry, 57, 2314-2319 (2009)  
DOI: 10.1021/jf8031759

[学会発表] (計3件)

1. 清水 裕, 史 凌嘉, 原 彰彦, 岸村栄毅, 佐伯宏樹. シロザケの筋肉および内臓におけるいくらかのアレルゲンの検出, 平成24年度栄養・食糧学会大会, 2012年5月19日, 東北大学.  
2. 李卓思, 清水 裕, 渡辺一彦, 原 彰彦, 岸村栄毅, 佐伯宏樹. カラスミ卵黄中の主要アレルゲンに関する研究, 平成22年度日本水産学会秋季大会, 2011年9月23日, 京都大学.  
3. 清水 裕, 渡辺一彦, 原 彰彦, 岸村栄毅, 佐伯宏樹. シロザケ卵アレルギーのエピトープ解析, 平成23年度日本水産学会春季大会, 2011年3月28日, 東京海洋大学

[図書] (計2件)

1. 清水 裕, 佐伯宏樹. 魚卵アレルギーの本体と性状, “魚貝類アレルギーの科学”, pp. 47-59, 2010, 恒星社厚生閣.  
2. 佐伯宏樹, 渡部一彦. 食物アレルギーの原因食品, 魚卵, “食物アレルギーA to Z” pp. 107-114, 2010, 第一出版.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 宏樹 (SAEKI HIROKI)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
研究者番号: 90250505

(2) 研究分担者

原 彰彦 (HARA AKIHIKO)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授  
研究者番号: 40091483

(3) 研究分担者

清水 裕 (SHIMIZU YUTAKA)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・技術職員  
研究者番号: 00374629