

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560054

研究課題名(和文)食物アレルギーにおける食品タンパク質の高次構造の重要性

研究課題名(英文)Importance of structure of food proteins on the allergenicity

研究代表者

丸山 伸之(MARUYAMA, NOBUYUKI)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90303908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーを発症する患者は増加の一途をたどっており、広く食品素材として利用されている植物種子に対してアレルギー症状を示す患者も増加している。本研究では、アレルギーの主要な原因食品である大豆について、アレルギー症状に重要なタンパク質の構造領域を同定するとともに、アレルギー症状に関わるエピトープの構造的特徴を見出した。

研究成果の概要(英文)：There has been an increase in patients who develop food allergies, as well as an increase in patients who exhibit allergy symptoms to plant seeds, which are widely used as food materials. In the present study, we identified structural regions of proteins that are important for allergy symptoms in soybean, a major cause of food allergies, and also found structural features of epitopes involved in allergy symptoms.

研究分野：食糧タンパク質化学

キーワード：種子 貯蔵タンパク質 高次構造 大豆 アレルゲン

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーを発症する患者は増加の一途をたどっており、広く食品素材として利用されている植物種子に対してアレルギー症状を示す患者も増加している。アレルギー症状を発症すると、原因となる食品を食べることができないため、食事に含有している成分への厳密な注意が必要となり、患者の生活の質を大きく低下させる。植物種子のタンパク質の中には、ヒトの健康の維持、増進に役立つ機能についても報告されているものもあるため、植物種子をより広く食素材として利用するためにも、種子タンパク質のアレルゲン性を詳細に解析する必要がある。

食物アレルゲンの多くは安定な構造をとるタンパク質であり、それらの高次構造がアレルギー症状の発症に関与していると考えられている。我々は、これまで主要なアレルゲンである種子貯蔵タンパク質について立体構造を解析するとともに、アレルギー症状に関わるエピトープと構造との関係を解析してきた。しかし、アレルギー症状の発症に関わるエピトープの構造的特徴については明確になっていない。

食物のアレルゲンについて、WHO/IUISにおいてデータベース化されており、現在、8種類の大豆タンパク質がアレルゲンとして登録されている(表 1)。1980年代にスペインのバルセロナで起こった喘息症状に対する原因抗原として、Gly m 1 (Hydrophobic protein)、Gly m 2 (Defensin)が同定されている。また、花粉によって感作されたのち、果物・野菜などを摂取することにより口腔症状を起こす Profilin と PR-10 が、Gly m 3 と Gly m 4 と命名されている。種子に含まれる貯蔵タンパク質は落花生などの多くの植物において、食物アレルギーの主要なアレルゲンとなっている。大豆においてもそれらの貯蔵タンパク質がアレルゲンとして同定されている(Gly m 5, 7S グロブリン; Gly m 6, 11S グロブリン; Gly m 8, 2S アルブミン)。

本研究では、これらのアレルゲンの中で即時型アレルギー症状の主要原因タンパク質である貯蔵タンパク質の中で、サブユニット間で構造の多様性をもつ 7S グロブリンについて解析を行った。

表1 大豆アレルゲン

	タンパク質	推定分子量
Gly m 1	Hydrophobic protein	8k
Gly m 2	Defensin	6k
Gly m 3	Profilin	14k
Gly m 4	Pathogenesis-related protein 10	17k
Gly m 5	7S globulin	48-65k
Gly m 6	11S globulin	52-61k
Gly m 7	Seed biotinylated protein	68k
Gly m 8	2S albumin	16k

2. 研究の目的

本研究では、アレルギーの主要な原因食品である大豆について、アレルギー症状に重要な大豆タンパク質の構造領域を同定するとともに、アレルギー症状に関わるエピトープの構造的特徴を見出すことを目的としている。主要な大豆アレルゲンである 7S グロブリンについて、サブユニットレベルでの反応性の違いを明確にするとともに、患者血清との反応性に寄与する特徴的な領域についてエピトープの解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 大豆タンパク質の調製

脱脂した大豆種子からタンパク質を抽出し、クロマトグラフィーにより 7S グロブリンを精製した。また、大腸菌発現系を用いて 7S グロブリンの3種類のサブユニットに対するリコンビナントタンパク質を調製した。サブユニットにおいてはN末端のエクステンション領域について、その領域に対する発現系を構築した。発現タンパク質について、アフィニティーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製タンパク質について、N末端シーケンス解析および質量分析などにより確認した。

(2) 大豆タンパク質のアレルゲン性の解析  
Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay 法により、プレートにコーティングした精製タンパク質と結合する大豆アレルギー患者血清中に含まれる特異的 IgE 抗体を、標識 2 次抗体を用いて定量した。測定にはマイクロプレートリーダーを用いた。

(3) 大豆タンパク質のエピトープ解析  
エピトープを解析するために、サブユニットのエクステンション領域の一次構造に基づいてオーバーラップさせた合成ペプチドを調製した。それらに対する患者血清中の特異的 IgE 抗体の反応性を解析することにより、反応性の高い合成ペプチドに対応する一次構造を同定した。

4. 研究成果

(1) 大豆 7S グロブリンのサブユニットレベルでのアレルゲン性解析

8種類の大豆アレルゲンがデータベースに登録されている。大豆 7S グロブリンは複数のサブユニットを含んでおり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3種類(図 1)のサブユニットにより構成されている。種子より調製した大豆 7S グロブリンは、それらのサブユニットがランダムに会合した 3 量体を基本構造としている(図 2)。そのため、種子から単一のサブユニットを調製することは難しい。大腸菌発現系によって調製した組換えタンパク質を用いることにより大豆 7S グロブリンの単一サブユニットのアレルゲン解析が可能となる。また、大豆 7S グロブリンの3種類のサブユニットには糖

鎖が付加されている。アレルゲンの解析には糖鎖による交差反応の影響がある場合もあるため、糖鎖の付加が起こらない大腸菌発現系を用いることにより糖鎖の交差性を排除して解析も可能である。そこで、大豆 7S グロブリンの3種類のサブユニットについて組換えタンパク質を用いて比較解析すると、および 'サブユニットが サブユニットよりも多くの患者血清において特異的 IgE 抗体が検出されることが明確になった。

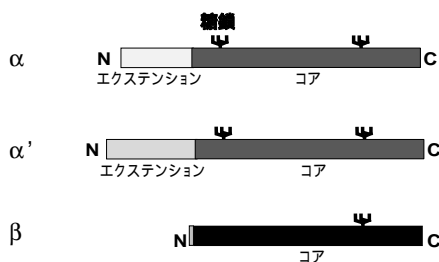


図1 7Sグロブリン サブユニットの構造模式図

および 'サブユニットには サブユニットには存在していないN末端の親水性のエクステンション領域をもつことから、'サブユニットのエクステンション領域の反応性について解析した。大腸菌発現系を用いて、'サブユニットのエクステンション領域の組換えタンパク質を調製し、解析に使用した。'サブユニットの全長を用いた解析結果と同様に非常に多くの患者血清において特異的 IgE 抗体が検出された。このことから、エクステンション領域が 7S グロブリンのアレルゲン性に寄与する重要なドメインであることが明らかになった。



図2 7Sグロブリンの立体構造

(2) 'サブユニットのエクステンション領域のエピトープ構造

安定同位体標識した 'サブユニットのエクステンション領域に対する NMR 解析でのデータでは、観測された多くのシグナルが重なりあうため、ディスオーダー領域を構造中に多く含むことが想定された。これまで、食品タンパク質の安定な高次構造とアレルゲン性との関係について報告されているが、エクステンション領域のようなディスオーダー構造をとるタンパク質のアレルゲン性についても検討する必要があることが示唆さ

れた。

エクステンション領域の一次構造に基づいてオーバーラップさせた合成ペプチドに対する反応性を解析したところ、反応性の高い複数のペプチドを同定した。これらの配列を比較したところ共通性が示唆される構造的特徴が見出された。これまでに種子タンパク質のエピトープの構造的な共通性については明確になっていないため、本研究で見出された構造的特徴に着目することにより、エピトープとなりやすい食品タンパク質の構造を明らかにできる可能性が示唆された。

本研究で見出した点に着目して、今後、さらに解析を進める予定である。

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)

丸山 伸之

リコンビナント大豆コンポーネントを利用したアレルゲン解析  
日本小児難治喘息アレルギー疾患学会誌  
2015, 13, 47-49

査読有

丸山 伸之

ナッツ類アレルゲンコンポーネントと分子構造  
日本小児アレルギー学会誌  
2015, 29, 303-311

査読有

〔学会発表〕(計8件)

丸山 伸之

植物性食物アレルギーにおけるコンポーネント  
第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 イブニングシンポジウム  
2014年5月9日 京都国際会議場(京都府・京都市)

丸山 伸之

リコンビナント大豆コンポーネントを利用したアレルゲン解析  
第31回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 ワークショップ  
2014年6月28日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

柴田瑠美子, 村上 洋子, 小田嶋 博, 丸山 伸之

乳幼児の重症大豆アレルギーにおける Gly m 5, Gly m 6, Gly m 8, Gly m 4 特異 IgE 抗体  
第19回日本ラテックスアレルギー研究会  
2014年7月27日 一橋大学(東京都・千代田区)

丸山 伸之

臨床診断に有効な植物性アレルゲンコンポーネント  
第51回日本小児アレルギー学会 シンポジ

ウム

2014年11月9日 四日市市文化会館(三重県・四日市市)

丸山 伸之

食物抗原コンポーネントタンパク質の研究の進歩

第15回 食物アレルギー研究会 特別プログラム講演

2015年2月1日 昭和大学(東京都・品川区)

丸山 伸之, 中川 朋子, 伊藤 浩明, 田中

昭, 佐藤 さくら, 海老澤 元宏

診断効率の高い大豆アレルギーコンポーネントの分子設計に関する検討

第64回日本アレルギー学会学術大会 ミニシンポジウム

2015年5月27日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・品川区)

佐藤 さくら, 山本 幹太, 丸山 伸之, 海老澤 元宏

新規アレルギーコンポーネントの臨床応用への期待

第52回 日本小児アレルギー学会 シンポジウム

2015年11月21日 なら100年会館(奈良県・奈良市)

丸山 伸之

植物性食物アレルギーにおけるコンポーネント

第2回日本アレルギー学会総合アレルギー講習会 教育セミナー

2015年12月12日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計2件)

丸山 伸之

食物アレルギー解析の進歩

小児科診療

2014, 77, 10, 1249-1253 診断と治療社 東京

丸山 伸之

アレルギーとコンポーネントの研究の進歩  
医学の歩み

2014, 252, 927-930 医歯薬出版株式会社

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hinshitsusekkei.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 伸之(MARUYAMA NOBUYUKI)

京都大学大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 90303908

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし