

報 文

サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型（ヤマメ）と
遡河型（サクラマス）のアレルゲンの比較解析

(平成23年6月7日受理)

嶋倉 邦嘉 綿谷 ゆきな 塩見 一雄*

Comparative Analyses of Allergens between Landlocked and Anadromous Species of
Masu Salmon *Oncorhynchus masou masou*

Kuniyoshi SHIMAKURA, Yukina WATAYA and Kazuo SHIOMI*

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology:
4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan; *Corresponding author

Although the difference in allergenicity between landlocked and anadromous salmon is little understood, only anadromous salmon are recommended to be labeled in the current allergen labeling system. This study was designed to examine the allergenic potency of landlocked species (yamame) and anadromous species (sakuramasu) of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*, with special reference to parvalbumin, a known major fish allergen. Analysis of the heated extracts by SDS-PAGE suggested that yamame contains parvalbumin in the muscle at considerably higher levels, as compared with sakuramasu. In accordance with this, the parvalbumin content in the muscle of yamame (1.8–7.8 mg/g), determined by visible-light ELISA, was significantly higher than that of sakuramasu (0.28–0.52 mg/g). Furthermore, fluorescence ELISA experiments showed that the heated extract from yamame reacts with serum from fish-allergic patients more strongly than that from sakuramasu. Three parvalbumin isoforms (PA-I, -II and -III) were individually purified from yamame and sakuramasu by gel filtration and reverse-phase HPLC. Based on the retention times in reverse-phase HPLC and the molecular weights estimated by MALDI/TOF-MS, PA-I, -II and -III from yamame were judged to be identical with PA-I, -II and -III from sakuramasu, respectively. Taken together, our data indicate that landlocked masu salmon (yamame) is more allergenic than anadromous salmon (sakuramasu).

(Received June 7, 2011)

Key words: *Oncorhynchus masou masou*; サケ salmon; ヤマメ landlocked masu salmon; サクラマス anadromous masu salmon; アレルゲン性 allergenicity; アレルゲン allergen; パルバルブミン parvalbumin; コラーゲン collagen

はじめに

食物アレルギーは、ヒトの健康維持にとって必須である食物が原因となるだけでなく、アナフィラキシーショックにより死亡する危険性があるという点で、花粉症やダニアレルギーといったほかのアレルギー疾患より問題は深刻である。そこでわが国では、食物アレルギーによる健康危害を未然に防止するために、2001年4月にアレルギーを起こす恐れがある原材料を含む加工食品には原材料を含むことを表示する制度が開始された（1年間の猶予期間があったので、実質的な制度開始は2002年4月からである）。そ

の後のアレルギー発症状況の継続的調査やアレルゲン（アレルギー誘発物質）に関する研究の進展などを踏まえて制度の一部見直しが行われ、現時点では表示が義務化されている特定原材料は7品目（えび、かに、小麦、そば、卵、乳、落花生）で、その他に表示が奨励されている特定原材料に準ずるものが18品目となっている。

特定原材料に準ずる品目の1つである「さけ」は、同一種であっても河川・湖沼にとどまるもの（陸封型）と海に下って再び戻ってくるもの（遡河型または降海型）があり、異なる名前がつけられている。たとえば、*Oncorhynchus masou macrostomus*の陸封型はアマゴ、遡河型はサツキマス、*O. masou masou*の陸封型はヤマメ、遡河型はサクラマス、*O. mykiss*の陸封型はニジマス、遡河型はスチールヘッド、*O. nerka*の陸封型はヒメマス、遡河型は

* 連絡先 shiomi@kaiyodai.ac.jp

東京海洋大学食品生産科学科:〒108-8477 東京都港区港南
4-5-7

ベニザケと呼ばれている。サケ類のうち、アレルギー表示が奨励されているのは遡河型のみで、陸封型は表示の対象外である。アレルギー表示制度が始まった当時は陸封型サケ類と遡河型サケ類のアレルゲンを比較したデータはなかったため、消費量が多くアレルギー発症例も多い遡河型サケ類のみが表示制度の対象にされたものと思われる。しかし最近、Kondoら¹⁾により、*O. nerka*の陸封型（ヒメマス）と遡河型（ベニザケ）のIgE反応性は同等であり、さらに両者はお互いに抗原交差性を示すことが報告された。両魚種におけるアレルゲンの含量や成分の相違などについては不明確であるが、この報告は、陸封型サケ類もアレルギー表示対象に加える必要があることを強く示唆している。そこで本研究では、サケ類の適切なアレルギー表示方法を検討するための基礎データをさらに蓄積することを目的とし、*O. masou masou*の陸封型（ヤマメ）と遡河型（サクラマス）のアレルゲンを、魚類の主要アレルゲンとして知られているパルプアルブミン²⁾に特に焦点を当てて比較した。

実験方法

1. 加熱抽出液の調製

ヤマメは東京海洋大学水圏科学フィールド教育研究センター大泉ステーションで飼育されたものを、サクラマスはオホーツク海沿岸で漁獲されたものを試料とした。ヤマメ（3個体）およびサクラマス（3個体）の各個体から背側の普通肉を採取し、それぞれを3倍量の0.15 mol/L NaCl-0.01 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）とともにエースホモジナイザー AM-12（（株）日本精機製作所製）を用いてホモジナイズ（10,000 rpm, 10 min）した。ホモジネートは80°Cの温浴中で振とうしながら20 min加熱し、冷却後、遠心分離により得られた上清を加熱抽出液として用いた。なお、魚類の主要アレルゲンであるパルプアルブミンは加熱の有無にかかわらず容易に抽出される。一方、パルプアルブミンに次ぐ重要な魚類アレルゲンとして同定されているコラーゲン^{2), 3)~5)}の場合、非加熱条件では水や緩衝液に不溶である。そこで魚肉からパルプアルブミンとコラーゲンの両方を抽出できる条件を予備的に検討し、最も効果的であった80°C, 20 min加熱という条件を本研究では採用した。

2. SDS-PAGE

SDS-PAGEには泳動装置としてPhastSystem（GE-Healthcare社製）を、ゲルとしてPhastGel Gradient 8-25（GE-Healthcare社製）を使用した。試料は0.1 mol/L dithiothreitol-2% SDS-4 mol/L 尿素-0.0625 mol/L Tris-HCl緩衝液（pH 7.3）に溶解し、80°C, 10 minの加熱変性後、泳動に供した。泳動後のゲルはCBB（Coomassie Brilliant Blue R-250）で染色した。分子量マーカーにはPrecision Plus Protein Standards（Bio-Rad Laboratories社製）を使用した。

3. 血清

魚類アレルギー患者（9名）の血清は、藤田保健衛生大学、千葉大学医学部および横浜市立大学医学部から提供された。なお、東京海洋大学でこれらの患者血清を用いた研究を行なうことについては、上記のすべての機関の倫理委員会で審議され承認を得ている。また、患者はいずれも、医療機関における問診およびCAP-RAST (capsulated hydrophilic carrier polymer-radioallergosorbent test)により魚類アレルギーと診断されている。さらに、メバチの筋肉から精製したパルプアルブミンおよびコラーゲンとの反応性を既報⁵⁾に準じてELISAで調べ、9名のうち5名の血清はパルプアルブミンのみに対する特異IgEを、残り4名の血清はコラーゲンのみに対する特異IgEを有することを確認している。本研究では、パルプアルブミンのみを認識する5名およびコラーゲンのみを認識する4名の血清をそれぞれプールして使用した。

4. ELISA

加熱抽出液中のパルプアルブミン濃度の測定および精製過程でのパルプアルブミンの検出は、Ishikawaら⁶⁾の可視光ELISAに準じて行った。試料50 μ Lを96ウェル平底プレート（ELISA用プレートHタイプ；住友ベークライト（株）製）に固相化後、1次抗体である抗カエルパルプアルブミンモノクローナル抗体（1:5,000; Sigma-Aldrich社製）50 μ L、2次抗体であるHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体（1:10,000; Kirkegaard & Perry Laboratories社製）50 μ Lと順次反応させた。なお、1次抗体として用いたモノクローナル抗体は、各種魚類のパルプアルブミンも認識することを確認している。^{5), 7)~9)} 次いで基質溶液（0.1% α -フェニレンジアミン-0.03% 過酸化水素-0.05 mol/L リン酸-クエン酸緩衝液, pH 5.0）を用いて酵素反応を行った後、490 nmの吸光度を測定した。パルプアルブミンの定量のためには、既報⁸⁾に従って精製したマサバのパルプアルブミン（0.03~10 μ g/mL）を用いて検量線を作成した。一方、加熱抽出液と患者血清（パルプアルブミンを認識する患者のプール血清またはコラーゲンを認識する患者のプール血清）のIgEとの反応は、Hamadaらの方法⁹⁾に準じて蛍光ELISAで調べた。この場合、3,000倍希釈した加熱抽出液50 μ Lを96ウェル平底プレート（ELISA用プレートHタイプ（黒）；住友ベークライト社製）に固相化し、1次抗体には患者血清（1:250）50 μ Lを、2次抗体には β -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgE抗体（0.24 μ g/mL; American Qualex社製）50 μ Lを用いた。酵素反応は0.01% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-1 mmol/L MgCl₂-0.01 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）を基質溶液として行い、励起波長367 nm、蛍光波長453 nmで蛍光強度を測定した。

5. 精製方法

加熱抽出液（ヤマメおよびサクラマスのいずれも個体2からの加熱抽出液）20 mLをSephacryl S-100HRカラム（2.5 i.d. $\times$ 105 cm; GE-Healthcare社製）に添加し、0.15

mol/L NaCl–0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。溶出液は 10 mL ずつ分取し、220 nm の吸光度を測定するとともに、パルブアルブミンは抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体を用いた可視光 ELISA で検出した。ELISA 陽性フラクションを集め、次に TSKgel ODS-120T カラム (0.46 i.d. × 25 cm; 東ソー(株)製) を用いた逆相 HPLC に供した。カラムは 0.1% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルの濃度勾配 (濃度勾配条件については Fig. 4B 参照) により、流速 1 mL/min で溶出した。220 nm における吸光度を UV 検出器でモニターしながらピークに対応した溶出液を手動で分取した。パルブアルブミンの確認は抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体を用いた可視光 ELISA により行った。

6. 分子量の測定

精製パルブアルブミンの分子量は 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて分析した。試料溶液 1 μ L とマトリックス溶液 (10 mg/mL のシナピン酸溶液) 4 μ L を混合し、1 μ L をサンプルプレート (381 Opti-TOF 96 Well Insert, 123 × 81 mm; Applied Biosystems 社製) に添加して乾燥後、測定に供した。なお、装置の較正にはウシインシュリンとシナピン酸を用いた。

結 果

1. 加熱抽出液の SDS-PAGE 分析

ヤマメ 3 個体、サクラマス 3 個体から調製した加熱抽出液の SDS-PAGE による分析結果を Fig. 1 に示すが、両魚種ともに泳動パターンの個体差は見られなかった。魚種間で比べると、12 kDa 付近のパルブアルブミンと考えられるタンパク質は CBB 染色の強度からヤマメのほうが明らかに多かった。37 kDa 付近に認められるバンドは耐熱性

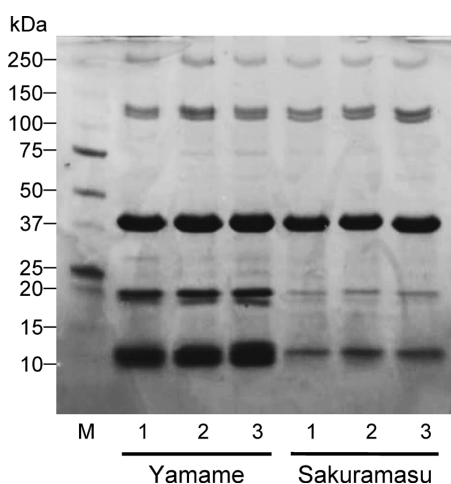


Fig. 1. SDS-PAGE of heated extracts from three specimens (1–3) of landlocked species (yamame in Japanese) and anadromous species (sakuramasu in Japanese) of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*

Lane M: marker proteins.

タンパク質のトロポミオシン、120 kDa および 240 kDa 付近に認められるバンドはコラーゲンの α 鎖、 β 鎖と推定されるが、これらタンパク質の両魚種における含量は CBB 染色の強度からほぼ同程度と判断された。なお、ヤマメに顕著に見られる 20 kDa 付近のタンパク質の本体は不明である。

2. パルブアルブミンの定量

SDS-PAGE 分析によりパルブアルブミン含量はサクラマスよりヤマメのほうが多いことが示唆されたので、抗カエルパルブアルブミン抗体を用いた ELISA による定量を試みた。マサバから精製したパルブアルブミンを標準タンパク質として検量線 (Fig. 2) を作成し、ヤマメ 3 個体およびサクラマス 3 個体の普通肉中のパルブアルブミンを定量した。結果を Table 1 に示すが、ヤマメ (1.8–7.8 mg/g) のほうがサクラマス (0.28–0.52 mg/g) よりかなり高含量で、SDS-PAGE の結果とよく対応していた。

3. 加熱抽出液の IgE 反応性

ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液と患者の血清 IgE との反応を蛍光 ELISA で調べた結果を Fig. 3 に示す。パルブアルブミン含量から予想されるように、パルブアルブミンを認識する患者の血清 IgE はサクラマス抽出液よりヤマメ抽出液に対して強く反応した。Student's *t*-test による有意差検定 ($p < 0.05$ で有意差ありと判定) において

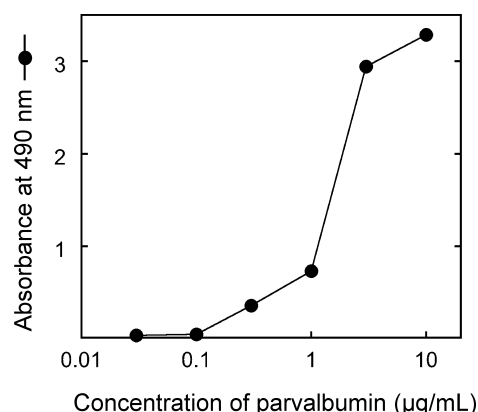


Fig. 2. Calibration curve for the determination of parvalbumin

Pacific mackerel parvalbumin was used to make the calibration curve.

Table 1. Contents of parvalbumin in white muscle of landlocked species (yamame in Japanese) and anadromous species (sakuramasu in Japanese) of salmon *Oncorhynchus masou masou*

Species	Specimen	Content of parvalbumin (mg/g)
Yamame	1	1.8
	2	2.3
	3	7.8
Sakuramasu	1	0.28
	2	0.48
	3	0.52

も、IgE反応性はヤマメのほうがサクラマスより有意に高かった。なお、ヤマメとサクラマスのパルブアルブミン含量の違いと比べるとELISAにおける蛍光強度の違いはそれほど大きくないかもしれないが、ELISAの蛍光強度は濃度ではなく濃度の常用対数とシグモイド曲線の関係になるので、ヤマメの方がサクラマスよりもパルブアルブミン含量が高いことと十分に対応しているものとみなされた。一方、SDS-PAGEの結果からコラーゲン含量は両魚種でほぼ同じと判断されたが、そのことと対応してコラーゲン

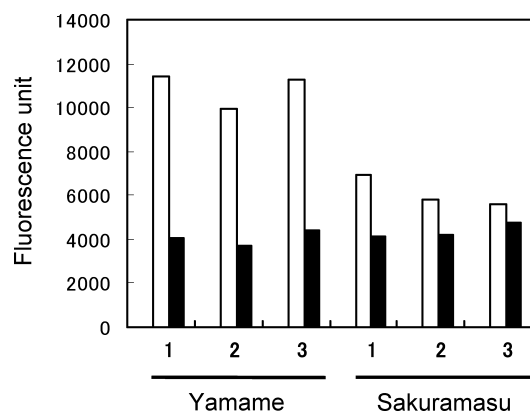


Fig. 3. IgE reactivity of heated extracts from three specimens (1–3) of landlocked species (yamame in Japanese) and anadromous species (sakuramasu in Japanese) of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*

IgE reactivity was analyzed by fluorescence ELISA using pooled serum from fish-allergic patients specifically recognizing parvalbumin (□) or collagen (■).

を認識する患者の血清IgEは、両魚種の加熱抽出液に対して同程度の反応を示した。Student's *t*-testによっても両魚種の反応性には有意差が認められなかった。

4. パルブアルブミンの精製

両魚種のパルブアルブミンをSephacryl S-100HRカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよびTSKgel ODS-120Tカラムを用いた逆相HPLCにより精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、両魚種ともパルブアルブミンはフラクション38付近に溶出されたことが可視光ELISA分析により確認された(Fig. 4A)。ゲルろ過で得られたELISA陽性画分を逆相HPLCに供すると、両魚種ともにパルブアルブミンは3つのピークに検出された(Fig. 4B)。それぞれのピークにはSDS-PAGE的に純度の高いパルブアルブミンが含まれ(データ示さず)、保持時間の順にヤマメのPA-I、PA-IIおよびPA-III、サクラマスのPA-I、PA-IIおよびPA-IIIと命名した。ヤマメのPA-I、PA-IIおよびPA-IIIの保持時間は、それぞれサクラマスのPA-I、PA-IIおよびPA-IIIとほぼ一致していた。また、これらパルブアルブミンの分子量をMALDI/TOF-MSで分

Table 2. Molecular weights of parvalbumins purified from landlocked species (yamame in Japanese) and anadromous species (sakuramasu in Japanese) of salmon *Oncorhynchus masou masou*

Species	Molecular weight		
	PA-I	PA-II	PA-III
Yamame	11,615.6	11,145.9	11,144.9
Sakuramasu	11,615.4	11,143.0	11,143.4

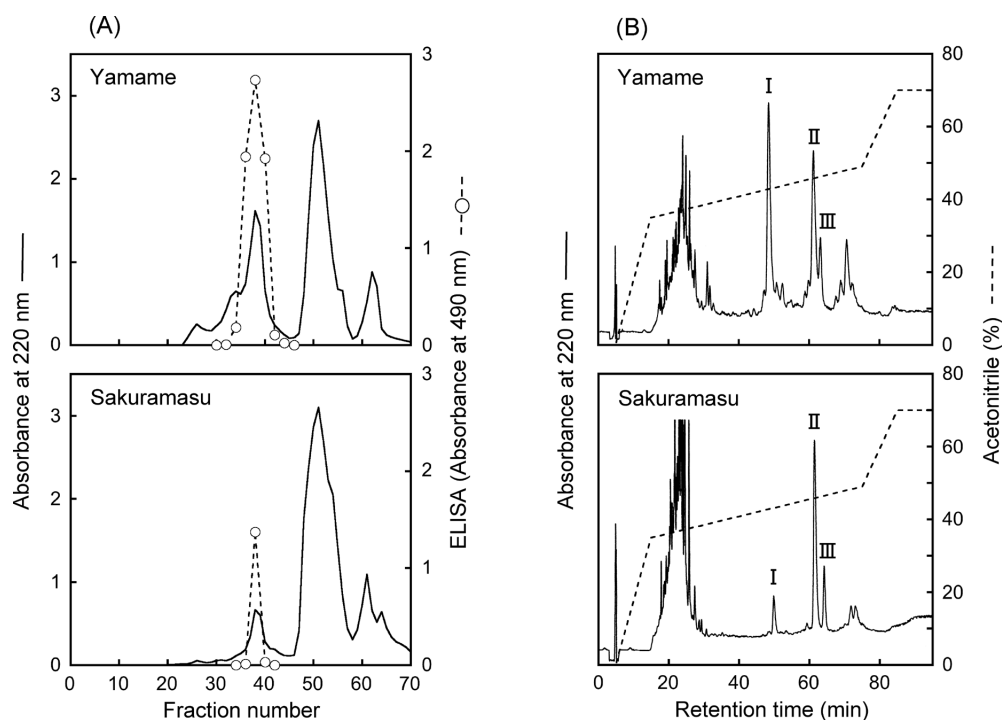


Fig. 4. Purification of parvalbumin from landlocked species (yamame in Japanese) and anadromous species (sakuramasu in Japanese) of masu salmon *Oncorhynchus masou masou* by gel filtration (A) and reverse-phase HPLC (B)

析した結果をTable 2に示すが、ヤマメのPA-I, PA-IIおよびPA-IIIの測定値は、それぞれサクラマス、PA-I, PA-IIおよびPA-IIIの測定値と非常に近い値であった。

考 察

本研究では、サケ類 *O. masou masou* の陸封型（ヤマメ）と遡河型（サクラマス）のアレルゲンを、魚類の主要アレルゲンであるパルプアルブミンに特に着目して比較検討した。まずパルプアルブミン含量であるが、加熱抽出液のSDS-PAGE分析の結果からヤマメの方がサクラマスよりかなり高いことが示唆され（Fig. 1）、このことは抗カエルパルプアルブミンモノクローナル抗体を利用したELISAによる定量（ヤマメ：1.8～7.8 mg/g、サクラマス：0.28～0.52 mg/g）で裏づけられた（Table 1）。本研究での定量結果は検量線作成に用いたマサバのパルプアルブミン換算であるので、必ずしも正確な含量ではないかもしれないが、両魚種におけるパルプアルブミンの含量比は反映していると考えられる。アレルギーの問題とは別に、同一魚種の陸封型と遡河型の間に認められたパルプアルブミン含量の大きな違いが何に起因するのかは生化学的に興味深い検討課題である。

パルプアルブミン含量の違いに対応して、パルプアルブミンを認識する（コラーゲンは認識しない）患者の血清IgEは、サクラマスの加熱抽出液よりヤマメの加熱抽出液に対して強く反応した（Fig. 3）。魚類アレルギー患者の80%以上はパルプアルブミンを認識する（その一部はコラーゲンも認識する）ので⁵⁾、本研究結果は、多くの魚類アレルギー患者にとって陸封型のヤマメのほうが遡河型のサクラマスよりアレルギー発症の危険性が高いことを意味している。一方、コラーゲンを認識する（パルプアルブミンは認識しない）患者の血清IgEは、両魚種に対して同程度の反応性を示した（Fig. 3）。魚類アレルギー患者の10%程度はコラーゲンのみを認識するが⁵⁾、これらの患者にとってもヤマメの摂取によるアレルギー発症の危険性が、サクラマスより低いとはいえない。

ゲルろ過および逆相HPLCにより、ヤマメおよびサクラマスのいずれからも3成分のパルプアルブミンアイソフォーム（PA-I, PA-II, PA-III）が得られた（Fig. 4）。本研究では、これらパルプアルブミンアイソフォームのアミノ酸配列を解析するには至らなかった。しかし、逆相HPLCでの保持時間、MALDI/TOF-MSで測定した分子量、さらにヤマメとサクラマスは同一魚種であることを考慮すると、ヤマメのPA-I, PA-IIおよびPA-IIIは、それぞれサクラマスのPA-I, PA-IIおよびPA-IIIと同一成分であることが強く示唆される。ただし、ヤマメもサクラマスも1個体での検討であるが、逆相HPLCでのピーク面積からヤマメでは3成分のうちPA-Iが、サクラマスではPA-IIが主成分であるというように、3成分のパルプアルブミンの組成比は両種で多少の違いが認められる（Fig. 4）。

本研究において、ヤマメとサクラマスのパルプアルブミ

ンは質の点では同等であること（＝組成比は多少異なるが同じ3成分のパルプアルブミンアイソフォームで構成されていること）、含量の点ではヤマメのほうがかなり高いことが明らかになった。したがって、*O. masou masou* の場合、陸封型（ヤマメ）のほうが遡河型（サクラマス）よりアレルギー発症の危険性が高いと結論できる。*O. nerka* の陸封型（ヒメマス）と遡河型（ベニザケ）のIgE反応性は同等であるというKondoらの報告¹⁾も考慮すると、サケ類の表示奨励を遡河型に限定している現行のアレルギー表示制度は見直す必要があるかもしれない。そのためにも、*O. masou macrostomus* の陸封型（アマゴ）と遡河型（サツキマス）、*O. mykiss* の陸封型（ニジマス）と遡河型（スチールヘッド）などについてもアレルゲンの比較検討が望まれる。

謝 辞

魚類アレルギー患者の血清を提供していただいた藤田保健衛生大学の宇理須厚雄先生、千葉大学医学部の河野陽一先生、下条直樹先生、横浜市立大学医学部の池澤善郎先生に御礼申し上げます。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究B）、厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）、日本水産株式会社および日水製薬株式会社からの共同研究費を得て行われたものであり、併せて感謝いたします。

文 献

- 1) Kondo, Y., Ahn, J., Komatsubara, R., Terada, A., Yasuda, T., Tsuge, I., Urisu, A. Comparison of allergenic properties of salmon (*Oncorhynchus nerka*) between landlocked and anadromous species. *Allergol. Int.*, **58**, 295–299 (2009).
- 2) Shiomi, K. Current knowledge on molecular features of seafood allergens. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **51**, 139–152 (2010).
- 3) Sakaguchi, M., Toda, M., Ebihara, T., Irie, S., Hori, H., Imai, A., Yanagida, M., Miyazawa, H., Ohsuna, H., Ikezawa, Z., Inouye, S. IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 579–584 (2000).
- 4) Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K. Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 285–291 (2001).
- 5) Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K., Shimojo, N., Kohno, Y., Shibata, R., Nishima, S., Ohsuna, H., Ikezawa, Z. Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. *Allergol. Int.*, **52**, 139–147 (2003).
- 6) Ishikawa, M., Shimakura, K., Nagashima, Y., Shiomi, K. Isolation and properties of allergenic proteins in the oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.*, **63**, 610–614 (1997).
- 7) Kobayashi, A., Tanaka, H., Hamada, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shiomi, K. Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy*, **61**, 357–363 (2006).

-
- 8) Hamada, Y., Tanaka, H., Ishizaki, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1149–1156 (2003).
- 9) Hamada, Y., Tanaka, H., Sato, A., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shiomi, K. Expression and evaluation of IgE-binding capacity of recombinant Pacific mackerel parvalbumin. *Allergol. Int.*, **53**, 271–278 (2004).