

総説

食品中のアレルゲンの予測

手島 玲子* 中村 亮介

The Method of the Prediction for Food-protein Allergenicity

Reiko TESHIMA* and Ryosuke NAKAMURA

Division of Novel Foods and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences:
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; * Corresponding author

1. はじめに

現在、わが国では少なくとも300万人が何らかの食物アレルギーを持っていると考えられている。しかし、アレルギーに対する有効な治療法はなく、アレルギーを誘発する原材料を含む食品を避けることが、最も一般的な治療・予防法となっている。

アレルギー物質を含む食品に関して、表示による情報提供の必要性が高まったことから、平成13年4月に食品衛生法関連法令の改正が行われ、アレルギー物質を含む食品の表示制度が定められた。厚生労働省は、原因物質別の発症数および重篤度に関する調査結果を基に、卵、牛乳、小麦、そば、落花生の5品目を省令により特定原材料と定め、すべての流通段階での表示を義務づけた。また、通知で定める特定原材料に準ずる20品目（あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、キウイフルーツ、鶏肉、バナナ（平成16年11月追加）、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン）については表示を推奨した。平成20年6月3日にはさらに省令が改正され、重篤な症状を引き起こすことが知られているえび、かにの2品目が新たに特定原材料となり、これまでの推奨表示品目から義務表示品目となった。詳しい解説は、既報告を参照いただきたい¹⁾。

一方、遺伝子組換え食品などの新しい食品や、従来、食経験の少ない食品も出現しており、食品中のアレルギー物質（アレルゲン）の予測をすることは、重要な課題となっている²⁾。今回は、食品中のアレルゲンの概要ならびにアレルゲン予測に関する最近の動向を紹介し、今後の展望についても概観してみたいと思う。

2. アレルギー研究の歴史

食品中のアレルゲンの話に入る前に、まず、アレルギー研究の歴史について概観してみたい。Table 1にまとめを示すが、アレルギーという概念は、1950年代までは、アトピー（奇妙な病気）という言葉に代表されるように、通

Table 1. History of the allergic study

年代	段階	研究の展開
1950s	第1段階 (Stage 1)	アレルギー研究の初期段階 アトピー（奇妙な病気）という概念
1967	第2段階 (Stage 2)	アレルギーの古典的研究段階 IgE抗体の発見 (Dr. Ishizaka) IgE抗体を介する即時型アレルギーのメカニズム解析
1980	第3段階 (Stage 3)	アレルギーの近代的研究段階 サイトカインの発見 アレルゲンの分子生物学的解析の進展
2000	第4段階 (Stage 4)	アレルギーの続近代的研究段階 アレルギーの環境、遺伝要因も含めた広範な原因究明、治療の研究

常の免疫反応でなく、枯草熱患者のように過敏な反応が起きる事例を総称して使われており、これが、第1段階に相当する。次いで、1967年に、石坂公成夫妻によりIgE抗体が発見され、IgE抗体を介する即時型アレルギーのメカニズム解析の進んだ第2段階、サイトカインなどのアレルギーにかかわる役者が登場してきた第3段階、環境要因や遺伝要因も含めて総合的に理解しようとする第4段階に入り、現在に至っている。特にアレルゲンに関する研究は、IgE抗体が発見された第2段階に続く1980年代に入ってから第3段階において、分子生物学的解析手法の進展もあり、精力的に研究されるようになってきた。すなわち、IgE抗体を介する即時型アレルギーを引き起こす食物アレルゲンや環境中アレルゲンは、大部分がタンパク質であるということが分かってから、アレルゲンタンパク質をコードする遺伝子のクローニングから一次配列の決定がずいぶん進んできている。以下、食物アレルゲンに絞って、アレルゲンの種類について記す。

3. 食物中のアレルゲンの種類

既知の食物アレルゲンは、大部分が、分子量1~6万の可溶性タンパク質である。食物アレルゲンは、その構造、酵素活性等から、いくつかのファミリーに分類することができるが、主なものを以下に紹介する。

* 連絡先

国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部: 〒158-8501
東京都世田谷区上用賀 1-18-1

(1) 植物由来食品アレルギー

a) プロラミンスーパーファミリー (Prolamin super family)

プロラミンスーパーファミリーには、多くの種子植物の主要アレルギーが属する。このファミリーは、穀物に含まれる水溶性の種子貯蔵タンパク質群からなるグループで、2S アルブミン (2S albumins), プロラミン (cereal prolamins), α -アミラーゼ/トリプシンインヒビターファミリー (α -amylase/trypsin inhibitor family), 非特異的脂質輸送タンパク質 (nsLTP) などが含まれていて、 α -ヘリックスからなる球状ドメイン (領域) と、保存されたパターン of 6 または 8 個のシステイン残基からなるモチーフを持つことで特徴づけられているタンパク質グループである。例えば、2S アルブミンファミリータンパク質では、いくつかの分子の立体構造解析の結果、これらのシステイン残基は 4 組のジスルフィド結合 [$\cdots C \cdots C \cdots CC \cdots CXC \cdots C \cdots C \cdots$] を形成することが報告されている^{4), 5)}。このジスルフィド結合により、2S アルブミンファミリータンパク質はコンパクトで安定な構造を取ることができ、これによって消化液により分解されにくくなり、その結果、アレルギーとして機能すると考えられている。なお、これらタンパク質は、分子量 1 万 2 千から 1 万 6 千で、植物特異的なタンパク質であることが知られている。2S アルブミンファミリーの主なものには、ピーナッツアレルギーである Ara h 2, そばアレルギー Fag e 2⁶⁾, ゴマアレルギー Ses i 1, ブラジルナッツアレルギー Ber e 1 などがある。

b) クピンファミリー (Cupin superfamily)

主なものに 7S 種子貯蔵タンパク質 (vicilins) と、11S 種子貯蔵タンパク質 (legumins) がある。これらタンパク質は、共通の 2 つのモチーフ配列 [$G(X)_5HXH(X)_{11}G$ と $G(X)_5P(X)_4H(X)_3N$ (ここで X は、非特異的なアミノ酸を指す)] があり⁷⁾、2 個の β -バレル (barrel) 構造をとっている。Vicilin は、単量体の分子量は約 5 万で、3 量体として存在することが多く、ピーナッツの Ara h 1⁸⁾ の例のように、3 量体になることで、熱や消化酵素に耐性を示すようになることが報告されている。Legumins も、単量体の分子量は約 5 万で、3~6 量体として存在することが多い。ピーナッツの Ara h 3⁹⁾ や大豆の glycinin¹⁰⁾ が主なものである。

c) Bet v 1 ファミリー (Bet v 1-homologous superfamily)

Bet v 1 は、1989 年に Breiteneder ら¹¹⁾ により、最初にクローニングされた分子量約 1 万 8 千のしらかばの主要アレルギーであり、現在 20 以上の相同性タンパク質が、広い範囲の植物種中に知られており、植物中に広く存在する共通アレルギーの性質を有している。このタンパク質の機能はよく分かっていないが、多くの植物に広く存在するタンパク質であり、Bet v 1 はりんごの主要アレルギー Mal d 1 などとの相同性が高く¹²⁾、しらかば花粉症の患者が食物アレルギー症状を呈する場合の原因アレルギーと

しても知られている。

d) プロフィリン (Profilin superfamily)

プロフィリンは、分子量 1 万 2 千から 1 万 5 千の比較的小さな分子で、すべての真核細胞のアクチン結合タンパク質として比較的広く存在する。植物中のプロフィリンは、他の動物などのプロフィリンと幾分異なった構造を取っていて、しらかば Bet v 2 アレルギーの場合、N 末側の α -ヘリックスと最初の β -シート構造の間にエピトープがある¹³⁾。プロフィリンも花粉症と食物アレルギーの交差反応に関与するアレルギーであるが、それぞれの花粉や食物で、プロフィリンの IgE 結合能、臨床的重要性には違いがある。

(2) 動物由来食品アレルギー

人々がそれほど多くの種類の動物由来の食品を食していないこともあり、現在までに、動物アレルギーに関する報告は植物のそれに比べてそれほど多くないが、その構造からいくつかのファミリーに分類することができる¹⁴⁾。

a) トロポミオシン

トロポミオシンは、筋肉において、アクチンとミオシンとともにその収縮の制御にかかわる比較的構造の保持された主要なタンパク質である。それらは、分子量約 4 万の棒状の分子で、アクチンフィラメントに沿ってコイル状に巻きつくような形で存在している。プロフィリンと同様に、すべての真核細胞に存在するが、アレルギー性のあるトロポミオシンは、無脊椎動物に限定され、甲殻類と軟体動物の主に 2 つのグループに分けられる¹⁵⁾。甲殻類のトロポミオシンは、相同性が高いため、甲殻類の中での交差反応性を示すことがあるが、脊椎動物のトロポミオシンとは交差反応性を示さない。

b) パルブアルブミン

パルブアルブミンは、カルシウムと結合することによる筋肉繊維の弛緩に重要な物理的変性に強い分子量約 1 万 2 千のカルシウム結合タンパク質の 1 種である。それらは、魚や両生類の筋肉に高濃度で存在するが、鳥類や哺乳類の速筋繊維には、少ない量しか存在しない。それらは、カルシウム結合性の E-F hand 構造を持ち、花粉のボルカルシンやゴキブリのトロポミオシン C のような他のアレルギーと同様の構造を有する。魚の β -パルブアルブミンは、多くの魚やカエルで、アレルギーとして同定されている¹⁶⁾。パルブアルブミンは、魚種間やカエルの間で交差反応性が示される場合の原因アレルギーともなっている。

c) カゼイン

カゼインは、哺乳類にのみ存在するタンパク質である。カゼイン (Bos d 8) は、牛乳を凝固させた時の沈殿物を生成するタンパク質で、いくつかの種類のタンパク質よりなる。 α -S1-, β -, α -S2-, κ -カゼインはよく知られており、タンパク質凝集塊を構成する加熱には強いタンパク質である。牛由来カゼインと、他の山羊や羊のカゼインとの交差反応性は低いようである¹⁷⁾。

(3) その他の食物アレルゲン

a) システインプロテアーゼ

主要なアレルゲンとして、その酵素領域にシステイン残基を有するシステインプロテアーゼの中でもパパイン様の C1 ファミリーに属するものがある。C1 ファミリーには、ダニの Der p 1、かもがやの主要アレルゲンである β -expansin やパパインなどの多くの食物アレルゲンが含まれる。食物アレルゲンとしては、キウイフルーツのアクチニジン¹⁸⁾や大豆の Gly m Bd 30K, Gly m 1、とも呼ばれる 34 kDa タンパク質がある¹⁹⁾。

b) リポカリン

リポカリンは、脂溶性の物質との結合活性があり、ステロイド、脂質などのキャリアとして機能することが知られている。リポカリンアレルゲンの主なものには、げっ歯類の尿、動物の表皮などがあるが、食物アレルゲンでは、牛乳のアレルゲンである β -ラクトグロブリンが唯一のものである²⁰⁾。

c) リゾチームファミリー

食物アレルゲンでリゾチームファミリーに属するものには、卵のマイナーアレルゲンである lysozyme (Gal d 4) と牛乳のマイナーアレルゲンである α -ラクトアルブミンがある²¹⁾。

d) トランスフェリンファミリー

トランスフェリンは、真核細胞において、遊離の鉄の濃度を制御するための鉄結合性の糖タンパク質であるが、食物アレルゲンでこのファミリーに属するものは、牛乳と卵のマイナーアレルゲンであるラクトフェリンとオボトランスフェリンがある。

e) セルピン

セルピンは、セリタンパク分解酵素阻害剤 (Serine Proteinase Inhibitor) の性質を持つタンパク質の総称であるが、このファミリーに属する食物アレルゲンとして、卵アレルゲンのオボアルブミンがある。

f) アルギニンキナーゼ

アルギニンキナーゼに属する食品中のアレルゲンとしては、無脊椎動物のえびに含まれるアレルゲンがある²²⁾。

g) クラス 1 キチナーゼ

キチナーゼは、キチンを加水分解する酵素で、病原体に対して植物に抵抗性を与える酵素であるが、6つのクラスのうち、クラス 1 キチナーゼは、ラテックスタンパク質ヘベインと同一性を有する。食物アレルギーとしては、アボガド、クリ、バナナにクラス 1 キチナーゼに同一性のあるアレルゲンが存在し、ラテックス果物症候群の原因となっている。

h) タウマチン様タンパク質

タウマチン様タンパク質ファミリー (TLPs) は、PR-5 と呼ばれ、植物の防御タンパク質として働き、害虫の侵入に抵抗性を有するかなり安定なタンパク質である。分子内の 8 個の S-S 結合により、タンパク質が安定で、熱や消化性に対して強い作用を持つ。多くの TLP アレルゲン

が、リンゴ、キウイフルーツ、ブドウ、サクランボで単離されている²³⁾。

以上、食品中のアレルゲンの属するファミリーについての概要を示した。

4. バイオインフォマティクス手法を用いるタンパク質のアレルゲン性の予測について

次に、アレルゲン性の予測についての話に移りたいと思う。新規タンパク質のアレルゲン性の予測については、遺伝子組換え食品中の新規タンパク質のアレルゲン性の予測の観点から研究が進んできた経緯があり、評価としては、平成 15 年のコーデックス委員会 (FAO/WHO 合同食品規格計画) から提案されたガイドライン²⁴⁾をもとに行われることが多い。新規タンパク質のアレルゲン性の評価の第一段として、主に 2 つのものがあり、1 つは、既知アレルゲンとの間に配列や構造で同一性、すなわち交差反応性の検討を *in silico* で行うもので、2 つめは、タンパク質の物理的安定性を実験的に評価する方法である。この章では、前者の *in silico* で行うバイオインフォマティクス手法について解説を行いたいと思う。

新規タンパク質と既知アレルゲンとの同一性が高いと、抗体に対して交差反応性を示す可能性が考えられ、既知アレルゲンに対して IgE 抗体を持つ患者にアレルギーが惹起される可能性が考えられる。通常、バイオインフォマティクス手法による同一性検索は、平成 15 年の FAO/WHO ガイドラインのアレルギー試験の項目に書かれた方法 (FAO/WHO 2003) に基づいて得られたデータが参考とされる。すなわち、連続 80 以上のアミノ酸残基のうち、35% 以上の同一性、および部分配列に着目した連続したアミノ酸の完全一致 (8~6 残基) に関するデータである。これは、分子全体の同一性と、エピトープ (抗原決定基) の同一性を念頭にした部分配列の同一性の両面からの検索を行おうとするものである。なお、実際には、連続した 6 個のアミノ酸残基の完全一致に関しては、擬陽性がありすぎるということが知られており、7 ないし 8 個の連続アミノ酸残基の一致性のデータが参考とされることが多い。Table 2 には、最近の更新もされている主要なアレルゲン専用データベースを示す。IUIS (WHO/IUIS (International Union of Immunological Society); Allergen Nomenclature Subcommittee), Allergome (A Database of Allergenic Molecules), SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins), AllergenOnline (FARRP, Allergen Protein Database), ADFS (Allergen Database for Food Safety)) を示したが、この中で、FAO/WHO (2003) の方法に基づく相同検索できるアレルゲンデータベースとしては、SDAP, FARRP と私たちの開発した ADFS²⁵⁾ の 3 つがある。それぞれのデータベースの特徴について、以下、説明を行う。

まず、IUIS のデータベースは、WHO/IUIS により提供されている登録アレルゲンおよびイソアレルゲンの公式

Table 2. Allergen online database

データベース	Type of allergen 収納アレル ゲンの種類	Epitope エピトープ	FAO/WHO-アレルゲン性予測法*		他のアレルゲン 性予測手法**	Clinical informa- tion
			Peptide exact-match	Alignment		
IUIS (Allergen nomenclature)	All	No	No	No	No	No
Allergome	All	No	No	Blast	No	Yes
SDAP	All	Yes	Yes (<i>n</i> mer)	FASTA or FASTA slide window	No	No
Allergen online (FARRP)	All	No	Yes (8 mer)	FASTA or FASTA slide window	No	No
ADFS (Allergen database for food safety)	All	Yes	Yes (<i>n</i> mer)	FASTA	Pftool***	No

*: FAO/WHO-based bioinformatics risk assessment tools (FAO/WHO 2003)

***: Alternative or complements to FAO/WHO-based bioinformatics risk assessment tools

***: Pftool-based sequence similarities to motifs generated by MEME

データベースで、最新バージョンは平成 22 年 4 月となっている。Allergenome は、近年構築されたイタリアに事務局をおくデータベースで、文献として報告される新規アレルゲンに関する情報が収載されている。SDAP は、米国、University of Texas Medical Branch の提供するデータベースで、アレルゲンの立体構造、エピトープ情報、検索機能、FAO/WHO (2003) が提唱するタンパク質のアレルゲン性予測法が登載されている。AllergenOnline は、米国ネブラスカリンカーン大学の the Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) が提供しているデータベースで、ピアレビューにより精査されたアレルゲンの情報が収載されている。ADFS は、国立医薬品食品衛生研究所で、平成 17 年に構築したデータベースで、文献より精査した多数のエピトープ情報の収載、Hileman らの方法²⁶⁾に準拠した FAO/WHO 予測法の収載、Stadler らの Motif-based 法²⁷⁾によるモチーフによる相同性検索の機能が収載されていることに特徴がある。ADFS は、最も最近で、平成 22 年 2 月に更新をしており、最新の更新版に登録されたエピトープ数は 92 個で、エピトープ収載数としては、知られているアレルゲンデータベースの中で最も多い数となっている。なお、モチーフ構造を利用する予測法に関しての有用性の評価はこれからのさらなる検討が必要と思われるが、いろいろなグループが、FAO/WHO 法を補足する手法の開発に取り組んでいる。以下、私たちの、Motif-based 法について、簡単に紹介する。Motif-based 法概念は、アレルゲンは、すべてに共通した構造はないが、3 章で述べたように、アレルゲンをいくつかのモチーフに分けて分類することができるということが基礎となっている。

Stadler らの理論に従って ADFS は独自に収載したアレルゲンからモチーフを MEME 法で抽出し、第一段階で、調べたい配列 (クエリ配列) とモチーフとの比較を行ない、第二段階ではモチーフに分類されなかったアレルゲンとクエリ配列を BLAST によりペアワイズ (1 : 1) 検索を行うという方法をとっている。アレルゲン性予測ツールである Motif-based 法の有効性についていくつかの評価

を行ったが、人工生成非アレルゲンデータセットを用いた評価においては、902 本の真のアレルゲンアミノ酸配列と、その 3 倍量に当たる真の非アレルゲンアミノ酸配列とを用い、本ツールがどれだけ正しくアレルゲン性を予測できるかについて調べた。第二段の BLAST によるペアワイズ検索において、Precision (%), Recall (%), Specificity (%) の合計が最大になる BLAST E-value カットオフ値を 10^{-13} とするとき、それぞれの値は 100.0%, 99.4%, 100.0% と、極めて良好であることを確認した。他のモデルを用いた評価の詳細は、既報告を参照いただきたい²⁸⁾が、ADFS の Motif-based 法によるアレルゲン性予測ツールの信頼性は、Stadler の報告における結果とほぼ同程度で、FAO/WHO 法よりも精度の面で大きく上回っていた。Motif-based 法は、FAO/WHO 法と併用することで、FAO/WHO 法の持つ擬陽性の多いという欠点を補う方法になる可能性が考えられる。

5. タンパク質の消化性試験とアレルギー患者血清との反応性試験の併用の例について

この章では、新規タンパク質のアレルゲン性の評価の第一段としての 2 つめの評価法である、タンパク質の物理的安定性の実験について解説を行う。

食物アレルギーは、一般に経口摂取されたタンパク質が消化管において酵素的分解を受けながら腸に到達し、その免疫系組織に捕捉され抗原として提示されることで成立すると言われる。したがって、食物アレルゲンの抗原性には消化されやすさが深く関与する。私たちも、基礎的なデータを得る目的で、各種タンパク質について同一実験条件を用いて人工胃腸液による分解性試験を行い、消化されやすさと抗原性の関係について検討した²⁹⁾。アレルゲンとして知られているタンパク質は、アレルゲンとして知られていないタンパク質に比べて、全長タンパク質あるいはその断片が人工胃液による消化に抵抗性を有する傾向のあることを確認することができた。検討したタンパク質の 1 つで卵白中の主要なアレルゲンであるオボムコイド (OVM) については、人工胃液による分解産物と患者血清との反応性

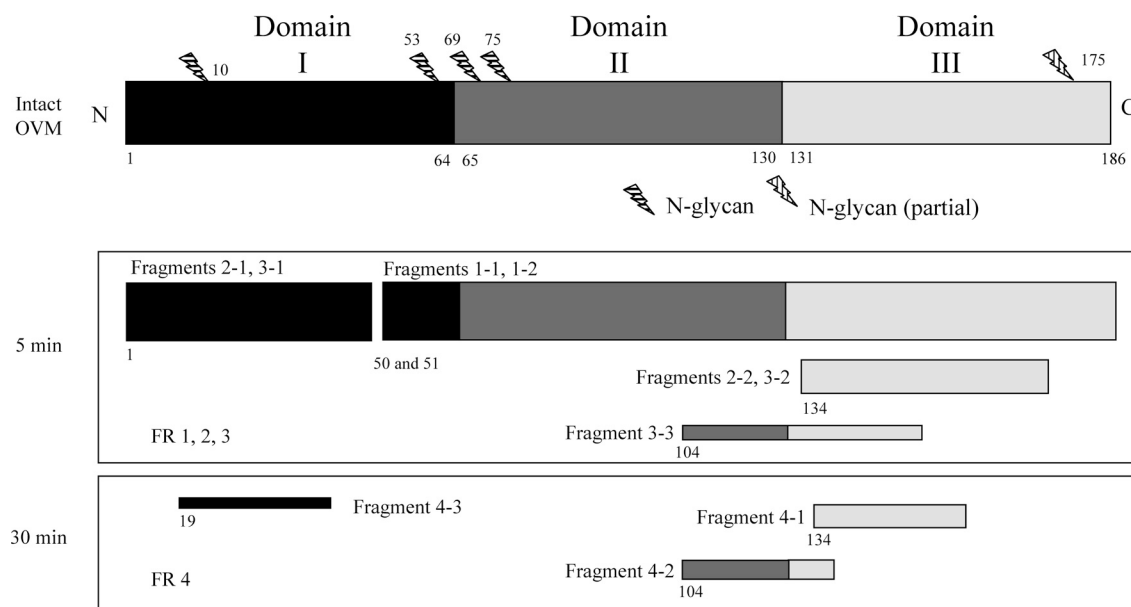


Fig. 1. Schematic representation of the SGF-digestion pattern of OVM

This panel is a summary of the OVM digestion pattern according to N-terminal analysis. The area of each square of the fragments appeared after 5 min and 30 min digestion represents approximate weight % to intact protein before digestion.

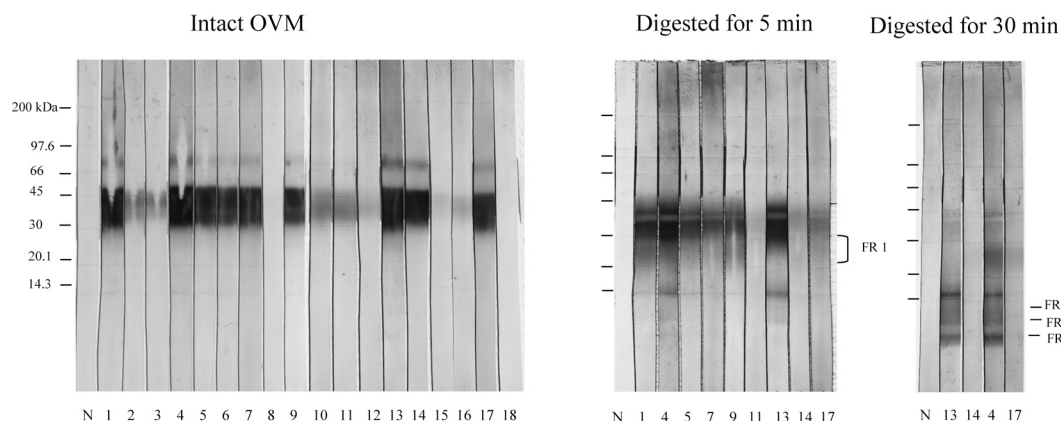


Fig. 2. Western blot analysis of intact OVM and the fragments with serum IgE from egg white allergic patients and a normal volunteer

The number under each strip corresponds to the serum number as follows; N: serum from normal volunteer, Numbers 1-18: sera from egg white allergic patients. Molecular weights are shown at left.

を検討し、分解によるアレルゲン性の変化を検討した。その結果、全長 OVM は比較的速く分解されて検出できなくなったものの、消化断片が複数生成し、それらの断片が一部の患者に対して抗原性を持つことを見いだした³⁰⁾。これらの消化断片についてアミノ酸配列を解析することによって OVM の分解過程を詳細に検討し、患者の IgE 抗体が認識する配列によってはある程度消化の進んだ OVM によってもアレルギー反応を起こす可能性があることを示唆する結果を得た。

OVM は全長 186 アミノ酸からなる単鎖の糖タンパク質であり、3つのドメインからなる構造をとる (Fig. 1)。pepsin/OVM 比が 1 unit/ μ g の人工胃液中で分解した OVM 溶液を SDS-PAGE で分離すると、約 25 kDa のブ

ロードなバンドを示す断片と 10 kDa, 7 kDa および 4.5~6 kDa の断片が検出された (Fig. 2)。25 kDa のバンドは 2 分後、10 および 7 kDa のバンドは 5 分後に強度が最大となり以後減少したが、4.5~6 kDa のバンドは 30 分消化後にも増加し続けていた。5 分後の消化物を SDS-PAGE 後、転写膜から 25, 10, 7 kDa のバンドを切り取り、N 末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、OVM はまず、ドメイン I の C 末端近く (49E と 50F あるいは 50F と 51G の間) で切断され、ドメイン I の大部分を含む 10 あるいは 7 kDa の断片と C 末端側の約 25 kDa の断片が生成することが示唆された。このほかにも 10 あるいは 7 kDa 断片からは、ドメイン III の大部分を含む 134 V 以降の配列と、ドメイン II の後半とドメイン

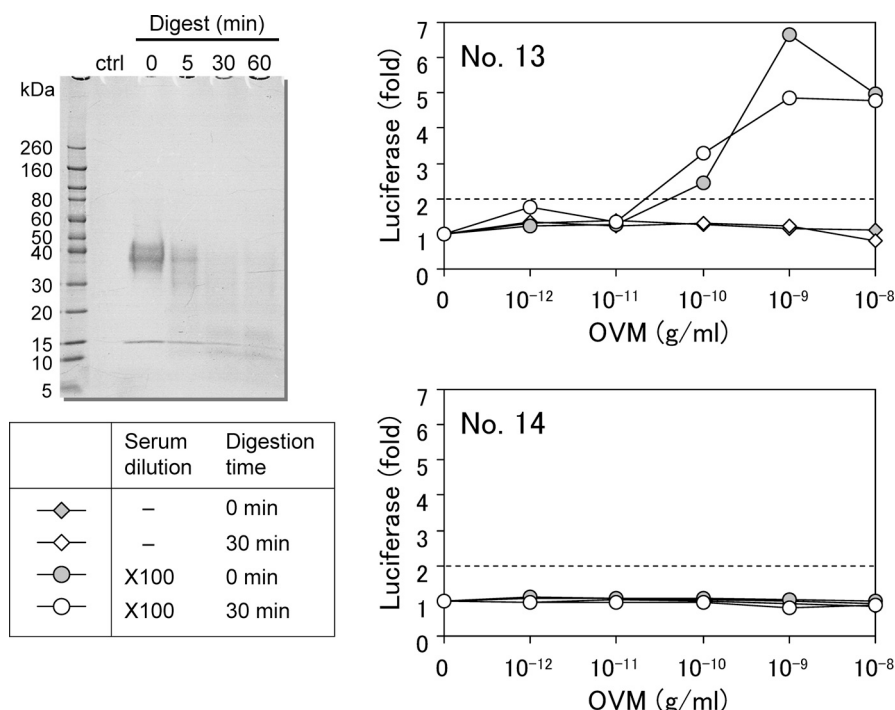


Fig. 3. Measurement of the luciferase expression in egg white allergenic patient's serum IgE-sensitized RS-ATL8 cells stimulated by intact OVM or its fragment

As for egg white allergic patient's sera, sera from No. 13 and No. 14 patients were used.

III の前半を含む 104N 以降の配列が検出された。30 分後の消化液では 4.5~6 kDa のバンドが強く検出され、同様に N 末端解析を行ったところ、25, 10 あるいは 7 kDa 断片がさらに分解した断片が検出された。30.6% と最も多かったのは 134 V 以降の断片でドメイン III の一部、次いで 104 N 以降のドメイン II 後半部分からドメイン III にかけての部分が 24.0%, ドメイン I の一部である 19 V からの配列が 20.6% であった。OVM のドメイン III は患者血清中の IgE 抗体に対する結合活性が高く、ヒトの IgE エピトープが存在するとの報告もあるが、今回の実験から、消化管内に比較的長くとどまる 4.5~6 kDa 断片中にドメイン III の一部が主要成分として含まれていることが明らかとなった。

4.5~6 kDa の断片に対する患者血清の反応性については、OVM 陽性患者 14 名のうち 3 名の血清で反応性が確認された。これらの試料提供者を追跡調査した結果、いずれも卵白アレルギーが寛解に至らず、数年を経ても卵白摂取不可能であることが判明した。

以上のように消化抵抗性の断片が残りがやすく、その断片が患者の血清と反応する場合は、食物アレルギーの原因となる可能性が予想された。今回用いたような、タンパク質の人工胃腸液による分解性試験、SDS-PAGE 後の転写膜からのバンドの切り出し、アミノ酸配列解析、および患者血清との反応性の検討を組み合わせた実験系は、アレルギー誘発性を評価する場合にも有用と考えられた。

次いで、消化酵素分解 OVM と患者 IgE との反応を、培養細胞を用いて検討した結果を紹介する。細胞は、ヒト

型 IgE 受容体を導入した細胞 (RBL-SX38) に、pNFAT-LUC (Luciferase) を安定に導入した細胞 (RS-ATL8) を用いた³¹⁾。卵白アレルゲンであるオボムコイドの全長と消化断片の両方に陽性の IgE 抗体 (患者 No. 13) を持つ患者血清で細胞を感作した場合、惹起抗原として、オボムコイドばかりでなくオボムコイドの人工胃液消化抵抗性フラグメントを用いても細胞の活性化を起こすことが判明した (Fig. 3)。一方、消化前のオボムコイドには結合するがオボムコイドの消化断片には結合活性を有さない患者 (No. 14) の IgE 抗体を用いた場合には、細胞の活性化は見られなかった。この結果から、アレルゲンの生体での消化も考慮にいれた評価が、*in vitro* 培養細胞を用いても可能であることが示された。

6. アレルゲン性の予測に関する研究の今後の動向について

以下、新規タンパク質のアレルゲン性の予測に関する研究の今後の動向について記してみたい。

a. アレルゲンの解析ならびに情報の蓄積

新規タンパク質のアレルゲン性を予測するに際しては、既存のアレルゲンに関する情報の蓄積が必要である。アレルゲノームと呼ばれるプロテオーム技術とアレルギー患者血清中 IgE 抗体とタンパク質の結合性を網羅的に解析する技術の開発が進んでおり、また、複数のアレルゲンをチップに固定化し、用いる特異的 IgE 抗体の量を少量で、多項目アレルゲンの同時測定できる技術も開発されてきている。さらに、培養細胞を用いて、その細胞の持つ IgE

受容体の架橋形成から、IgE とアレルゲンの結合が、臨床症状を引き起こしうるかを予測する手法の開発も進んでいる。

以上のような技術を用いて蓄積されたアレルゲンに関する情報をアレルゲンデータベースに反映させることで、アレルゲン情報の有用な活用が図られることが期待される。

b. アレルゲンのエピトープ解析の進展

新規タンパク質と既存アレルゲンとの交差反応性を予測するには、全長の相同性ばかりでなく、IgE 抗体との結合部位であるアレルゲンの抗原決定基 (B 細胞エピトープ) の解析も重要である。エピトープ解析には、(1) Synthetic peptides (SPOT assay), (2) Phage library, (3) Recombinant fragments, (4) Enzyme and chemical fragmentation, (5) Multipin peptide library などの技術がある。(3) のアレルゲンタンパク質の部分配列を大腸菌に発現させてその部分配列の IgE 結合活性を調べる方法や、(4) の全長のアレルゲンタンパク質を酵素または化学的に切断してその断片と IgE 結合活性を調べる方法は、従来よりよく用いられてきた方法であるが、最近では、ペプチドライブラリーを用いた網羅的方法として、直鎖のエピトープであれば、(1) の Spot assay³²⁾ が、立体エピトープも含めた解析であれば、(2) の Phage library 法が用いられてきている。(1) の Spot assay 法は、例えば、アミノ酸 2 mer ずつずらして合成した 8~12 mer のアミノ酸よりなるペプチドを 1 つの膜に固定した SPOT 膜アミノ酸と、IgE 結合活性を調べる方法であり、(2) の Phage library 法のミモトープ (mimotope)^{33), 34)} と呼ばれる方法では、ファージ上に 12 mer 程度のアミノ酸からなるペプチドを at random に発現させ、IgE 結合性を調べるもので、実在のエピトープでなくてもそれを模倣 (mimic) する配列 (しばしば立体エピトープに相当する) も候補として挙げられてくる。

以上、新しいエピトープ解析手法の導入も進んでおり、解析が難しいとされてきた B 細胞エピトープ情報の蓄積もさらに進んでいくものと思われる。なお、この B 細胞エピトープの解析は、アレルギーの診断においても重要な情報を提供するものである。

c. バイオインフォマティクス手法による新規アレルゲンの既知アレルゲンとの交差反応性ならびに、エピトープ部位を予測するためのバイオインフォマティクス手法の整備

新規タンパク質のアレルゲン性を予測するに際し、既知アレルゲンとの相同性から交差反応性を予測するバイオインフォマティクス手法については、従来の FAO/WHO (2003) の手法に加え、さらに予測の精度を上げるための検討が進められていくものと思われる。また、エピトープ部位を予測するためのバイオインフォマティクス手法の整備も一部のグループで進められている³⁵⁾。

d. その他

以上、新規タンパク質のアレルゲン性予測手法の中で、

主に既知のアレルゲンとの交差反応性からアレルゲン性を予測する方法の展望について記してきたが、タンパク質の感作性を予測する方法は、非常に難しく、現時点で、まだリスク評価にまで使えるところまでは至っていないのが現状であるが、2 つの研究の動向について解説を行いたい。1 つは、T 細胞エピトープの予測に関する研究で、いくつかのバイオインフォマティクス手法が開発されてきている。具体的にば、II 型組織適合性抗原 (MHC class II) との結合の親和性を予測する方法³⁶⁾ などの方法があり、B 細胞エピトープを予測するよりも精度は高い方法と考えられているが、MHC class II 抗原とペプチドが結合しても、Th2 細胞の活性化につながるとは限らないこともあり、タンパク質のアレルゲン性の予測に直接的につながるものとしては、現時点ではまだとらえられていない。もう 1 つの動物モデルに関しても、新規タンパク質の感作性を予測するには、動物とヒトの種差もあり、また感度と特異性において完全といえるモデルは存在しないが、Brown Norway rat のように³⁷⁾、経口でのタンパク質の感作に高感受性の動物モデルも開発されており、経口での感作のメカニズム解析が進めば、動物モデルで得られたデータは、weight of evidence の考え方で、アレルゲン性を予測するときの示唆を与えてくれるものになると思われる。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費および食品安全委員会研究費により行われたものである。

文 献

- 1) Adachi, R., Sakai, S., Akiyama, H., Teshima, R. Labeling system and detection methods for food allergens—Mandatory labeling of shrimps and crabs as food allergens—. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, J-225–J-230 (2009).
- 2) Teshima, R. Genetically modified foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, J-225–J-230 (2009).
- 3) Radauer, C., Breiteneder, H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **120**, 518–525 (2007).
- 4) Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Gimenez-Gallego, G., Rico, M., Santoro, J. Solution structure of RicC3, a 2S albumin storage protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry*, **42**, 13839–13847 (2003).
- 5) Kezuka, Y., Itagaki, T., Satoh, R., Teshima, R., Nonaka, T. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of a major buckwheat allergen. *Acta Cryst.*, **F65**, 1267–1270 (2009).
- 6) Koyano, S., Takagi, K., Teshima, R., Sawada, J. Molecular cloning of cDNA, recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16-kDa major allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **140**, 73–81 (2006).
- 7) Mills, E. N. C., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P. S., Gunning, A. P., Morris, V. J. Allergens of the cupin

- superfamily. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 925–929 (2002).
- 8) Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 172–179 (1991).
- 9) Rabjohn, P., Helm, E. M., Stanley, J. S., West, C. M., Sampson, H. A., Burks, A. W., Bannon, G. A. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J. Clin. Invest.*, **103**, 535–542 (1999).
- 10) Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Nishikawa, K., Kitamura, K. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 831–853 (1995).
- 11) Breitender, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner O., Breitenbach, M. The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.*, **8**, 1935–1938 (1989).
- 12) Jenkins, J. A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P. R., Breiteneder, H., Mills, E. N. Structural relatedness of plant food allergens with specific references to cross-reactive allergens: An *in silico* analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **115**, 163–170 (2005).
- 13) Fedorov, A. A., Ball, T., Mahoney, N. M., Valenta, R., Almo, S. C. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profiling. *Structure*, **5**, 33–45 (1997).
- 14) Jenkins, J. A., Breiteneder, H., Milles, E. N. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **120**, 1399–1405 (2007).
- 15) Wild, L. G., Lehrer, S. B. Fish and shellfish allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **5**, 74–79 (2005).
- 16) Hilger, C., Thill, L., Grigioni, F., Lehnert, C., Falagiani, P., Ferrara, A., Romano, C., Stevens, W., Hentges, F. IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin, *Allergy*, **59**, 653–660 (2004).
- 17) Ah-Leung, S., Bernard, H., Bidat, E., Paty, E., Rance, F., Scheinman, P., Wal, J. M. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy*, **61**, 1358–1365 (2006).
- 18) Fahlbusch, B., Rudeschko, O., Schumann, C., Steurich, F., Henzgen M., Schlenvoit, G., Jager, L. Further characterization of IgE-binding antigens in kiwi, with particular emphasis on glycoprotein allergens. *J. Invest. Allergol. Clin. Immun.*, **8**, 325–332 (1998).
- 19) Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Zhu Y. L., Hirano, H., Nishikawa, K. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30 K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1030–1033 (1993).
- 20) Virtanen, T. Lipocalin allergens. *Allergy*, **56** (Suppl. 67), 48–51 (2001).
- 21) Nitta, K., Sugai, S. The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin. *Eur. J. Biochem.*, **182**, 111–118 (1989).
- 22) Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L., Chow, I. P. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J. Immunol.*, **170**, 445–453 (2003).
- 23) Breiteneder, H. Taumatin-like proteins—A new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, **59**, 479–481 (2004).
- 24) 厚生労働省の遺伝子組換え食品ホームページ: <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsnshi> (7-2) コーデックスバイオテクノロジー応用食品特別部会資料 <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/dna/dl/02-02-02.pdf>
- 25) Nakamura, R., Teshima, R., Takagi, K., Sawada, J. Development of allergen database for food safety (ADFS): An integrated database to search allergens and predict allergenicity. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **123**, 32–36 (2005).
- 26) Hileman, R. E., Silvanovich, A., Goodman, R. E., Rice, E. A., Holleschak, G., Astwood, J. D., Hefle, S. L. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **128**, 280–291 (2002).
- 27) Stadler, M. B., Stadler, B. M. Allergenicity prediction by protein sequence. *FASEB J.*, **17**, 1141–1143 (2003).
- 28) Nakamura, R., Nakamura, R., Teshima, R. Major revision of the allergen-database for food safety (ADFS) and validation of the motif-based allergenicity predicted-tool. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **127**, 44–49 (2009).
- 29) Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., Sawada, J. Comparative study of *in vitro* digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 969–973 (2003).
- 30) Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., Ito, S., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Hayakawa, T., Kohno, Y., Urisu, A., Sawada, J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **136**, 23–32 (2005).
- 31) Nakamura, R., Uchida, Y., Higuchi, M., Nakamura, R., Tsuge, I., Urisu, A., Teshima, R. More convenient, more sensitive cell-based allergy test by means of luciferase expression after IgE-crosslinking on the cultured mast cells. *Allergy*, **65**, 1266–1273 (2010).
- 32) Fields, G. B., Nobel, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 161–214 (1990).
- 33) Hantusch, B., Krieger, S., Untermayr, E., Scholl, I., Knittelfelder, R., Flicker, S., Spitzauer, S., Valenta, R., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E. Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **114**, 1294–1300 (2004).
- 34) Satoh, R., Koyano, S., Takagi, K., Nakamura, R., Teshima, R. Identification of an IgE-binding epitope of a major buckwheat allergen, BW p 16, by SPOTs assay and mimotope screening. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **153**, 133–140 (2010).
- 35) Asakawa, N., Sakiyama, N., Teshima, R., Mitaku, S. Characteristic amino acid distribution around seg-

- ments unique to allergens. *J. Biochem.*, **147**, 127–133 (2009).
- 36) Zhang, G. L., Khan, A. M., Srinivasan, K. N., August, J. T., Brusic, V. MULTIPRED: A computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides. *Nucleic Acid Res.*, **33**, W172–W179 (2005).
- 37) Knippels, L. M., Penninks, A. H. Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **207**, 157–160 (2005).