

学位論文題名

水産無脊椎動物トロポミオシンの食品製造過程における
挙動とアレルギー性変化に関する研究

学位論文内容の要旨

1997年度に厚生省（現厚生労働省）が主体となり、食物アレルギーに関する全国調査がおこなわれた。その調査結果から、(i) 乳幼児に限らず、成人においても食物アレルギー患者が多い（食物アレルギーを起こした人の割合はそれぞれ8.6%および9.3%）ことや、(ii) 乳幼児や若年層におけるアレルギー原因物質（アレルゲン）の第一位は卵であるのに対して、成人では魚類やエビ・カニ等の甲殻類が上位を占めていること等が初めて明らかとなった。近年になって、さまざまな魚貝類のアレルゲンタンパク質が同定され、節足動物（甲殻類）や軟体動物等の無脊椎動物ではトロポミオシン（TM）、魚類ではパルブアルブミンおよびコラーゲン、魚卵では β -コンポーネントが主要アレルゲンであると報告されている。アレルゲン物質の同定は主に生鮮品を用いておこなわれているが、我々は魚貝類を生のみまだけではなく、加熱調理品や加工食品としても摂取している。そのため、生鮮魚貝類のアレルゲン物質が明らかとなった現在、水産加工食品のアレルゲン性に関する研究もおこなう必要がある。しかし、これまでに魚類加工食品のアレルゲン性に関する報告例はあるが、節足動物や軟体動物を原料とした加工食品のアレルゲン性についての研究は見当たらない。

我が国における重要な水産加工食品原料として、ホタテガイやスルメイカが挙げられる。これらを乾燥させて作られる乾製品では、製造過程にメイラード反応が進行し、タンパ

ク質のアミノ基と還元糖のカルボニル基との間で複雑な反応が起きている。しかし、このような反応がアレルギー物質にどのような影響を与えているかは不明である。そこで本研究では、製造過程中に起きるメイラード反応がホタテガイおよびスルメイカの主要アレルギーである TM のアレルギー性におよぼす影響について検討した。また、無脊椎動物間の抗原交差性の有無やメイラード反応とアレルギー性変化の関係を解明することを目的に、TM の IgE 結合エピトープの同定をおこなった。

第一章では、グルコースやリボースとのメイラード反応の進行に伴うホタテガイ TM (以下、グルコースと反応した TM を TM-g とする) のアレルギー性変化について検討した。その結果、TM と還元糖との間でメイラード反応が進行すると TM のアレルギー性は著しく増大した。次に第二章では、ホタテガイと同じ軟体動物門に属するスルメイカを試料としたところ、リボースとメイラード反応したスルメイカ TM (以下、TM-r) のアレルギー性は大きく低下し、グルコースやリボースと反応したホタテガイ TM とは全く異なる挙動を示した。これについては、反応性ε-アミノ基を対象とした修飾実験の結果から、TM 分子中のリジン残基へのグリコシル基の結合ではなく、メイラード反応の進行に伴う TM の立体構造変化に起因する現象であると推察した。

第一章および第二章の結果から、メイラード反応の進行に伴いホタテガイとスルメイカ TM のアレルギー性が大きく変化することが判明した。そこで第三章では、メイラード反応が進行した TM を摂食することを想定し、ペプシンおよびトリプシンを用いたプロテアーゼ処理が両 TM のアレルギー性におよぼす影響について検討した。メイラード反応が進行した TM はプロテアーゼ処理により低分子化していたが、メイラード反応の進行に伴って起きたアレルギー性変化は消化物においても維持されていた。すなわち、ホタテガイ TM-g では native TM (TM-n) よりもアレルギー性が高く、スルメイカ TM-r ではそ

れより低かった。この結果より、両消化物中に IgE 結合能が変化した領域を含む消化断片が存在していることが示唆された。しかし SDS-PAGE の結果によると、ホタテガイ TM-n および TM-g のペプシン・トリプシン消化物では消化断片を明瞭に検出できないほど低分子化が進行していた。そこで、ペプシン・トリプシン消化物をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。その結果、TM-n 消化物では大部分が分子量 3,500 以下まで低分子化していたのに対して、TM-g 消化物では分子量 3,500 以上の断片が大部分を占めており、ホタテガイ TM-g 消化物の方が分子サイズの大きなペプチド群を有していた。このことが、ペプシン・トリプシン消化物においてもホタテガイ TM-g のアレルギー性が高かったことと関係していると考えられた。

第三章までは、モデル実験系を用いてアレルギー性変化を検討した。そこで第四章では、第一章および第二章で観察された TM のアレルギー性変化が加工食品中の TM においても同様に起きているか検討した。すなわち、市販の干しホタテガイ貝柱および干しスルメイカから TM を単離し、そのアレルギー性を測定した。その結果、ホタテガイとスルメイカのいずれの乾製品においても、製造過程中に TM はメイラード反応していたが、そのアレルギー性は全く変化しておらず、モデル系の結果と異なっていた。その原因として、メイラード反応の進行温度や反応性還元糖の量の違い、筋線維中に存在している TM と精製した TM ではメイラード反応に伴う構造変化の起こり方の違い等が考えられた。

ホタテガイ乾製品は生のまま摂取するだけでなく、調味素材としてさまざまな料理に供される。そのため第五章では、ホタテガイ乾製品エキスのアレルギー性について調査した。その結果、エキス中にはうま味や甘味に関与する遊離アミノ酸にとどまらず、アレルギータンパク質である TM が多く溶出していた。また TM は、一般的なアレルギータンパク質の特性である高い熱安定性を有しており、エキス製造工程を経てもそのアレルギー性

は全く低下していなかった。

第六章では、TM 中のヒト IgE 結合エピトープ部位に関する情報を得るためホタテガイとスルメイカ TM のエピトープ部位解析をおこなった。酵素分解した両 TM を用いて解析したところ、両 TM には少なくとも 2ヶ所のエピトープ領域が存在することが示唆された。まず 1ヶ所は、両 TM において共通領域（N 末端から 77-105 残基目）であった。この領域はブラウン・シュリンプにおいてエピトープ部位と同定されており、節足動物（甲殻類や昆虫類）TM とも高いアミノ酸配列相同性を示したことから、無脊椎動物に共通のエピトープ領域である可能性が高い。2ヶ所目は両 TM で異なる位置であり、ホタテガイでは 169-189 残基、スルメイカでは 269-284 残基（C 末端領域）であった。前者は軟体動物 TM 間でのみ高い相同性を示したことから、軟体動物固有のエピトープ領域であると思われる。一方、後者はブラウン・シュリンプ TM のエピトープ部位と一致していたことから、軟体動物に加えて節足動物 TM とも抗原交差性を示す可能性が高い領域であると推定される。

以上、本研究の成果を総括すると、ホタテガイおよびスルメイカ TM を用い、水産加工食品製造過程における TM のアレルギー性変化を初めて明らかにした。また、メイラード反応が進行した TM の消化性や、無脊椎動物 TM 間の抗原交差性に関する知見も得ることができた。今後、魚貝類アレルギー患者が安心して魚貝類を摂食できるよう、低アレルギー化水産加工食品の開発に本研究の成果が応用されることを期待したい。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐伯宏樹
副査	教授	今野久仁彦
副査	教授	川合祐史
副査	教授	尾島孝男
副査	教授	塩見一雄
副査	助教授	岸村栄毅

学位論文題名

水産無脊椎動物トロポミオシンの食品製造過程における 挙動とアレルギー性変化に関する研究

水産物を原料とした乾燥食品では、製造過程でメイラード反応が進行しているが、この反応が食品のアレルギー性におよぼす影響は不明である。そこで本研究では、ホタテガイとスルメイカの主要アレルギーであるトロポミオシン (TM) に注目し、メイラード反応が TM のヒト IgE 結合能 (以下、アレルギー性) におよぼす影響について検討した。また TM のヒト IgE 結合エピトープの同定をおこない、メイラード反応に起因するアレルギー性変化との関連を考察した。得られた成果は以下の通りである。

1. ホタテガイとスルメイカの精製 TM を用いて、グルコースおよびリボースとのメイラード反応が TM のアレルギー性におよぼす影響を検討した。その結果ホタテガイ TM のアレルギー性は、メイラード反応の進行に伴って著しく増大した。一方、スルメイカ TM のアレルギー性は、メイラード反応の影響を受けて大きく低下し、両 TM において全く異なる挙動を示した。そして、反応性ε-アミノ基を対象とした化学修飾実験の結果から、上記のアレルギー性変化が TM 中リジン残基へのグリコシル基の結合ではなく、メイラード反応の進行に伴う TM の高次構造変化に起因する現象であると推察した。
2. メイラード反応が進行した TM を摂食することを想定し、ペプシンおよびトリプシンを用いたプロテアーゼ処理が両 TM のアレルギー性におよぼす影響を検討した。メイラード反応が進行した TM はプロテアーゼ処理によって低分子化したが、メイラード反応の進行に伴って起きたアレルギー性変化は消化後も維持されていた。これらの結果より、両 TM の消化物中に、IgE 結合能が変化した領域を含む消化断片の存在が示唆された。

3. 加工過程でメイラード反応が進行していると判断したホタテガイとスルメイカ乾製品から TM を調製し、そのアレルゲン性を測定した。その結果、ホタテガイとスルメイカのいずれの乾製品においても製造過程にメイラード反応が進行していたが、TM のアレルゲン性は全く変化していなかった。さらにホタテガイ乾製品エキスのアレルゲン性について調査したところ、エキス中に溶出した TM のアレルゲン性は加熱処理に対してきわめて安定であることが確認できた。これらの結果は先に示した精製 TM での知見とは相違していたが、その理由として、筋肉中で他のタンパク質と相互作用している TM と精製 TM では、メイラード反応に伴う構造変化の起こり方が異なる可能性があると推定した。
4. ヒト IgE 結合エピトープ部位に関する情報を得るため、ホタテガイとスルメイカ TM のエピトープ解析をおこなったところ、両 TM には少なくとも二ヶ所のエピトープ領域が存在することを明らかにした。まず両 TM において共通のエピトープ領域 (N 末端から 77-105 残基目) を見いだした。この部分のアミノ酸配列は既知の節足動物 TM とも高い相同性を示したことから、無脊椎動物に共通のエピトープ領域であると推定した。一方、両 TM で部位の異なるエピトープ領域は、ホタテガイでは 169-189 残基、スルメイカでは 269-284 残基 (C 末端領域) であった。先にホタテガイとスルメイカでは、TM のアレルゲン性がメイラード反応によって受ける影響が全く異なっていたが、両者のエピトープ領域の違いがこの差異に関わっている可能性がある。そして一連の解析結果から、メイラード反応によって IgE 結合能が変化する未知のエピトープが、ホモロジー共通領域とは別の部位に存在していると推定した。

本研究は、メイラード反応が水産無脊椎動物 TM のアレルゲン性におよぼす影響を定量的に明らかにした。また、ホタテガイとスルメイカ TM 中に複数のヒト IgE 結合エピトープを見いだした。本論文の公開発表会においては、審査員より 5 件、一般聴講者より 2 件の研究内容に関する質問がなされたが、申請者はいずれも適切な回答をおこない、研究に対する理解を深めさせた。以上、論文内容の吟味と発表会における討論を通して、審査員一同は主論文の学術的価値を認め、本研究の申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。