

学 位 論 文 題 名

魚卵アレルギータンパク質の構造解析および検知法の開発

学位論文内容の要旨

いくら、たらこ、かずのこ等さまざまな魚卵の喫食習慣がある日本では、1980 年代初頭より魚卵アレルギーの症例が報告されている。また、食物アレルギー表示制度において「いくら」が表示推奨品目に指定されているように、魚卵アレルギーは留意すべき症例のひとつとして認識されている。しかしながら、魚卵のアレルギータンパク質やその構造に関する報告はほとんど存在しない。また、アレルギー物質の検知法に関しては、食品への表示が義務化されている 7 品目（鶏卵、牛乳、小麦、エビ、カニ、そば、落花生）を対象とした検知法がすでに開発されており、製品チェック等に用いられ、混入事故の防止に役立てられている。しかし、いくらに関しては食品中の微量検出法が確立されていないため、アレルギー物質制度の実効的運用が困難であり、食の安全を確保する上での不安要因となっている。一方、諸外国では、魚卵アレルギーに関する症例報告は少ないものの、ロシアや欧米で広く喫食されるキャビアを始めとしてイタリアのボツルガ、台湾の烏魚子など、多くの国に魚卵を食する文化が存在するため、潜在的な魚卵アレルギー患者が存在すると推測される。以上の状況を踏まえると、魚卵アレルギーの速やかな実態解明を行う必要があることは疑いがない。

食物アレルギーの全貌を理解するためには、まず、アレルギータンパク質の確定と食物交差抗原となる可能性を明らかにする必要がある。また、アレルギーの諸性質（アレルギーの安定性や抗原交差性の成立範囲など）を理解するためには、IgE 結合領域（エпитープ）の確定が必要である。そこで本研究では、魚卵、特にいからの原材料であるシロザケ卵に注目し、そのアレルギータンパク質に関する包括的な検討と、シロザケ卵を対象とした高感度微量検知法の開発を行った。

まず第一章では、シロザケ卵に含まれるアレルギータンパク質を同定し、これを介した魚種間交差性について検討した。その結果、シロザケ卵の主要アレルギータンパク質が卵黄タンパク質の一種 β' -component (β' -c) であることを確認した。また、いくらアレルギー患者血清を用いた阻害 ELISA により、シロザケ卵と他のサケ科魚卵間に、 β' -c を介した強い魚種間交差性が存在することを明らかにした。さらに、種々の魚種卵の β' -c に対して IgE 反応性を持ついくらアレルギー患者血清が相当数見いだされた事実から、 β' -c を介した抗原交差性が広範囲の魚種間に成立することが示された。以上の結果は、各種魚卵の主要アレルギータンパク質が β' -c であることを示唆している。

次に第二章では、 β' -c の前駆タンパク質であるビテロジェニン (Vg) の遺伝子を用いた cDNA クローニングによってシロザケ β' -c の一次構造を調べた。シロザケ Vg の構造は不明であるため、Vg の一次構造が報告されている魚種の中から、シロザケの近縁種であるニジマス遺伝子を参考にしてプライマを作製し、これを用いた。また、限定消化した β' -c の消化ペプチドを N 末端アミノ酸配列分析に供し、その結果を cDNA クローニングによる演繹アミノ酸配列と比較した。その結果、 β' -c をコードする 3 種類の塩基配列とそこから演繹した各 170 残基のアミノ酸配列を決定した。これらはアイソフォームの関係にあり、わずかに 1~5 アミノ酸残基のみが異なっていた。そして、消化ペプチドを用いた検討により、シロザケ β' -c を構成する 2 種類のサブユニット（分子量 18k および 16k）の内部アミノ酸配列がほぼ等しいことが確認された。また、両サブユニットのアミノ酸配列は、先に述べた 3 種類の演繹アミノ酸配列に極めて良く一致していた。さらに、決定した演繹アミノ酸配列の一つを基に作製した組換え β' -c の IgE 結合能は、Native β' -c のそれと大きな差が見られなかった。以上の結果より、シロザケ β' -c は同

等の IgE 結合能を持ったアイソフォームによって構成されていると推測した。加えて、cDNA クローニングにより 3 種類の演繹アミノ酸配列が見いだされたことから、同定された 2 種類のサブユニット毎に、より多くのアイソフォームが存在すると思われた。

続いて第三章では、消化ペプチドと合成ペプチドを用いて、シロザケ β' -c の IgE エピトープ解析を行った。まず、消化ペプチドを用いた検討によって、IgE 反応性を持つ 4 種のペプチドを見いだした。そこで、これらのアミノ酸配列を基にオーバーラップペプチドを合成して IgE 反応性を調べたところ、5 種類の IgE エピトープ配列を見いだすことができた。これらの IgE エピトープのアミノ酸配列を他魚種 β' -c のアミノ酸配列と比較したところ、2 種類の IgE エピトープはサケ科魚種間の抗原交差性に関与していると推測され、残り 3 種類は広範囲の魚種間交差性に関与することが示唆された。

そして第四章では、第一章から第三章で明らかにしたアレルゲンタンパク質に関する知見を活用しつつ、加工食品中に微量に混入したシロザケ卵タンパク質のみを検出可能なアッセイ系の構築を目指した。その際、抗 β' -c 抗体の抗原に対する特性が、抗体の由来動物種によって異なることを見いだした。そこで、異種動物由来の抗 β' -c 抗体を併用することで、高い魚種特異性と十分な検出感度を持ったシロザケ卵検知法を開発した。本研究で開発した検知法は、シロザケ卵と他の魚卵を区別可能であり、その検出限界は $0.78 \mu\text{g/g}$ であった。また、添加回収試験でも良好な結果を得ており、実用的な性能を持っていることが確認された。

最後に第五章では、異種動物に由来した抗スケトウダラ β' -c 抗体の併用による、食品含有スケトウダラ卵検知法の開発を試みた。その結果、抗原の抽出に用いた sodium dodecylsulfate (SDS) と 2-mercaptoethanol (2Me) が検知法の魚種特異性に大きな影響を及ぼし、さらにスケトウダラ卵検知法の検出感度を大きく低下させることを見いだした。そこで本章では、SDS および 2Me を含まない抗原抽出試薬を新たに採用することによって、シロザケ卵検知法と同等の検出感度を持つスケトウダラ卵検知法を開発を可能とした。以上の結果より、異種動物由来抗体の併用が、シロザケ以外の魚種卵検知法においても有効であると判断した。

本研究で得られた知見を列挙する。(1) 各種魚卵の主要アレルゲンタンパク質が β' -c であることを示した。(2) シロザケ β' -c のアミノ酸配列を決定し、複数のアイソフォームが存在することを見いだした。(3) シロザケ β' -c のアミノ酸配列中に存在する 5 種類の IgE エピトープを決定した。(4) 広範囲の魚類の間に β' -c を介した抗原交差性が存在することを明らかとした。(5) 異なる動物種に由来する抗 β' -c 抗体の併用が、高い抗原特異性をもつ魚卵検知法の開発に有効であることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	川 合 祐 史
副 査	教 授	佐 伯 宏 樹
副 査	教 授	一 色 賢 司
副 査	准教授	岸 村 栄 毅
副 査	博 士	穂 山 浩

(国立医薬品食品衛生研究所)

学 位 論 文 題 名

魚卵アレルギータンパク質の構造解析および検知法の開発

魚卵の喫食習慣をもつ日本社会では、1980年代より魚卵アレルギーの存在が報告されてきた。また、食物アレルギー表示制度において「いくら」が表示推奨品目に指定されており、魚卵アレルギーは留意すべき症例のひとつとして認識されている。しかし、他の食物アレルギーと比較すると、魚卵アレルギーに関する学術的情報の蓄積は充分とはいえない。本論文はこれらの背景を踏まえたもので、魚卵アレルギーに対する科学的探究を目的としている。

食物アレルギーの全貌を理解するには、まずアレルギーを確定して構造解析をおこなうとともに、食物間におけるアレルギー交差性の範囲を明らかにする必要がある。そこで本論文では、魚卵、特にいからの原材料であるシロザケ卵に注目し、そのアレルギーに関する包括的な調査と、シロザケ卵を対象とした高感度微量検知法の開発が行われた。

本論文は5章より構成されている。まず第一章では、シロザケ卵に含まれるアレルギータンパク質を同定し、これを介した魚種間交差性について検討した。その結果、シロザケ卵の主要アレルギータンパク質が卵黄タンパク質の一種 β' -component (β' -c) であることを、複数の免疫化学的手法を用いて確認した。また、いくらアレルギー患者血清を用いた阻害ELISAにより、シロザケ卵と他のサケ科魚卵間に、 β' -c を介した強い魚種間交差性が存在することを明らかにした。

第二章では、 β' -c の前駆タンパク質であるビテロジェニン (Vg) の遺伝子を用いた cDNA クローニングによって、シロザケ β' -c の一次構造を調べた。また、精製 β' -c のペプチドマッピングによるアミノ酸配列調査も同時におこなった。その結果、 β' -c をコードする3種類の塩基配列とそこから演繹した各 170 残基のアミノ酸配列を決定した。これらはアイソフォームの関係にあり、わずかに1~5アミノ酸残基のみが異なっていた。そして、消化ペプチドを用いた検討により、シロザケ β' -c を構成する2種類のサブユニット（分子量 18k および 16k）の内部アミノ酸配列がほぼ等しいことを確認した。また、決定した演繹アミ

ノ酸配列の一つを基に作製した組換え β' -c の IgE 結合能が、Native β' -c のそれと大きな差異がないことも示した。以上の結果より、シロザケ β' -c は同等の IgE 結合能を持ったアイソフォームによって構成されていると推測した。

第三章では、消化ペプチドと合成ペプチドを用いて、シロザケ β' -c の IgE エピトープ解析を行った。まず、消化ペプチドを用いた検討によって、IgE 反応性を持つ 4 種のペプチドを見いだした。そこで、これらのアミノ酸配列を基にオーバーラップペプチドを合成して IgE 反応性を調べたところ、5 種類の IgE エピトープ配列を見いだすことができた。これらの IgE エピトープのアミノ酸配列を他魚種 β' -c のアミノ酸配列と比較したところ、2 種類の IgE エピトープがサケ科魚類間の抗原交差性に、また残り 3 種類は広範囲の魚種間交差性にそれぞれ関与していると推測した。

第四章では、第一章から第三章で明らかにしたアレルゲンタンパク質に関する知見を活用しつつ、加工食品中に微量に混入したシロザケ卵タンパク質のみを検出可能なアッセイ系の構築を試みた。その際、抗 β' -c 抗体の抗原に対する特性が、抗体の由来動物種によって異なることを見いだした。そこでこの知見を活用し、ウサギとラット由来の抗 β' -c 抗体を併用することで、高い魚種特異性と十分な検出感度を持ったシロザケ卵検知法を開発した。本研究で開発した検知法は、シロザケ卵と他の魚卵を判別可能であり、その検出限界は $0.78 \mu\text{g/g}$ であった。また、添加回収試験でも良好な結果が得られ、実用的な性能を持っていることが確認された。

第五章では、異種動物に由来した抗スケトウダラ β' -c 抗体を併用して、食品含有スケトウダラ卵検知法の開発を試みた。その結果、抗原の抽出に用いた sodium dodecylsulfate (SDS) と 2-mercaptoethanol (2Me) が検知法の魚種特異性に大きな影響をおよぼし、さらにスケトウダラ卵検知法の検出感度を大きく低下させることを見いだした。そこで本章では、SDS および 2Me を含まない抗原抽出試薬を新たに採用することによって、シロザケ卵検知法と同等の検出感度を持つスケトウダラ卵検知法の開発を可能とした。以上の結果より、異種動物由来抗体の併用が、シロザケ以外の魚種卵検知法においても有効であると判断した。

これら一連の成果は、いくらアレルギーに関する基本的な情報を網羅的に解明したもので、学術的に極めて高く評価することができる。さらに、魚卵アレルギーにおける発症機構の解明、食品衛生学的安全性の向上、アレルギー患者に対する食事指導など多方面に貢献できる内容である。よって審査員一同は、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。