

大豆アレルギーの新規抗原の探索と検出法の確立

京都大学大学院 農学研究科

丸山 伸之

世界保健機関と国際免疫学連合によってアレルゲンのデータベースが構築されている。大豆は食物アレルギーの主要な原因食品であり、そのアレルゲンとして8つのものが登録されている。Gly m 1 (hydrophobic protein)およびGly m 2 (defensin)はスペインで起こったバルセロナ喘息に対する吸入性の原因抗原として同定されたアレルゲンである(1)。Gly m 1 は hydrophobic protein と呼ばれているが、一次構造から多くの植物でアレルゲンと報告されている lipid transfer protein であると考えられる。種子に大量に含まれる貯蔵タンパク質は多くの植物の種子において重要なアレルゲンであり、大豆においても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)(2, 3)。一方、profilin と PR-10 はそれぞれ果物類および野菜類の主要アレルゲンであり、大豆においても Gly m 3(profilin)と Gly m 4(PR-10)として同定されている(4-6)。学童期以降は、花粉により感作されることが最初の原因となり、その後、花粉タンパク質と類似のタンパク質を含む食物を摂取することによりアレルギー反応を引き起こすことが増える。Profilin と PR-10 はその代表的なアレルゲンである。学童期以降の大豆アレルギー患者は、カバノキ科花粉の主要アレルゲンである Bet v 1(PR-10)が関与するとされ、Gly m 4 が重要なアレルゲンとなっている。しかし、Gly m 4 以外のアレルゲンに対する感作頻度に関して明確になっていない。本研究では、学童期以降の大豆アレルギー患者を対象に、既知の大豆アレルゲンに対する感作頻度を明らかにするとともに、新規な大豆アレルゲンを同定した。さらに、それらのアレルゲンを検出するための抗体を作製することを目的とした。

実験方法

1. ELISA 法による血清中のアレルゲン特異的 IgE 抗体価測定

大豆アレルギー患者の血清は兵庫県立加古川医療センターより提供された。96 ウエルプレートの各ウエルにコーティング液を添加し、4°Cで一晩静置して抗原をコーティングした。コーティング液を除去後、洗浄液で 3 回洗浄した(7)。その後、1% BSA 溶液で 1 時間ブロッキングした。1% BSA 溶液を除去後、大豆アレルギー患者血清を加え、室温で 3 時間放置した。血清を回収し洗浄後、酵素標識抗ヒト IgE 抗体を添加し、室温で 2 時間静置した。酵素標識抗ヒト IgE 抗体

を除去し、洗浄後、基質溶液を加え、37°Cで1時間静置した。反応停止液を加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。少なくとも2回の反復を行った。

2. 新規大豆アレルゲンの探索のためのタンパク質の分画

ダイズ種子 5g に対し緩衝液を用いて室温下で1時間攪拌した。その後、4°Cで15分間、10,000rpmで遠心分離し、上清を回収した。次に、大豆抽出物を0.2μmのフィルターで濾過し、ゲル濾過クロマトグラフィー（Cytiva, Superdex 75, 16/60）を用いて分子量に基づき分離した。溶出液は約100分間について回収した。さらに逆相クロマトグラフィーによりアセトニトリルの0~80%グラジエントを行った。

3. 組み換え型既知大豆アレルゲンの調製

pColdGST を用いて Gly m 3 に対する大腸菌発現系を構築した。構築した発現ベクターを、Rossetta-gami2 に形質転換した。Gly m 3 の発現を誘導するため、イソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシドを添加し、15 °C、150rpm で16時間培養した。遠心分離で回収した菌体を、PBS 溶液で再懸濁し、超音波処理した。遠心分離後の上清を GSTrap カラムに供し、標的タンパク質を 50mM Tris-HCl, (pH 8.0), 10mM グルタチオンで溶出した。溶出液を 4 °C で16時間、HRV 3C プロテアーゼで切断し、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)タグを切断した。その後、GST タグを HisTrap を用いて除去した。さらに、溶出した素通り画分をゲルろ過クロマトグラフィーにかけ、Gly m 3 を精製した。

大豆 BBPI および大豆 KTI の発現ベクターを構築するために、合成した大豆 BBPI および大豆 KTI に対する遺伝子を PCR により増幅した。BBPI および KTI についてはベクター pPICZα を用いてピキア酵母発現ベクターを構築した。BMGY 培地で 28°C、200rpm の条件下で培養した。菌体を BMMY 培地に移し、吸光度が O.D.600=6.0 になるまで培養した。0.5%(v/v)メタノールを 24 時間毎に2日間添加した。その後、遠心分離により培養液を回収した。硫酸アンモニウムで目的タンパク質を沈殿させ、遠心分離により沈殿物を回収した。その沈殿を PBS 溶液に溶解し、透析した後、HisTrap カラムで精製した。

4. 大豆 PPIase の発現と精製

Prolyl isomerase (PPIase) の発現ベクターを構築するために、大豆 PPIase の遺伝子を合成し、PCR で增幅後、制限酵素処理を行った。次に、制限酵素で消化したベクター pColdGST を用いて、発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターを SHuffle T7 に形質転換した。LB 培地により、37°C、200rpm の条件下で、O.D.600 の吸光度が 0.4~0.6 になるまで培養した。イソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシドを添加し、15°C、150rpm で 16 時間発現を誘導した。遠心分離により回収した菌体を PBS 溶液で再懸濁し、超音波処理した。遠心分離を行い、大腸菌破碎液の可溶性画分を回収した。遠心上清を GSTrap カラムにアプライし、50 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 10 mM グルタチオンで目的タンパク質を溶出した。この溶出液を HRV 3C プロテアーゼで 16 時間処理し、GST タグを切断した。その後、HisTrap カラムにより、GST タグを除去し、大豆 PPIase を回収した。

5. 大豆アレルゲンに対する抗体の作製

Gly m 3 および大豆 PPIase をウサギに対し複数回の皮内投与による免疫を行い、最初の投与から約 2 ヶ月後に採血を行なった。

実験結果

1. 学童期以降の大豆アレルギー患者のアレルゲン感作プロファイル

学童期以降の大豆アレルギー患者のプロファイルとして、Gly m 3、Gly m 4、Gly m 5、Gly m 6、Gly m 8 のアレルゲンについて特異的 IgE 抗体値を測定した(図 1)。Gly m 4 に対して 28 名が陽性であり、感作頻度が約 78% と最も高く、次いで Gly m 3 に対して 10 名が陽性を示し、約 28% の感作頻度であった。Gly m 3 と Gly m 4 の両方に陽性を示す患者は、6 名であり、Gly m 3 と Gly m 4 のいずれかに感作されている患者は約 89% であった。一方、貯蔵タンパク質である Gly m 5、Gly m 6 に対しては、2 名の患者が陽性であり、約 6% の感作頻度であった。Gly m 8 に対して陽性を示す患者はいなかった。以上のことから、Gly m 4 が学童期以降の主要なアレルゲンであるが、Gly m 3 も高い感作頻度を示すこ

と、貯蔵タンパク質に感作される患者は少ないことが示された。

2. 新規大豆アレルゲンの探索

本研究での 36 名中 4 名の大豆アレルギー患者は、Gly m 3、Gly m 4、Gly m 5、Gly m 6、Gly m 8 のいずれにも感作を示さなかった。それらの患者について、大豆 BBPI および大豆 KTI についての感作を調べたところ、1 人の患者が大豆 BBPI に感作を示した。さらに、残り 3 人の患者について、感作しているアレルゲンの探索を行った。まず、大豆抽出物をゲルろ過クロマトグラフィーにかけた。そのフラクションについて患者 3 名の血清を別々に反応させ、1 名の患者の血清について反応性を示すフラクションを検出できた。さらに、そのゲルろ過クロマトグラフィーのフラクションについて逆相クロマトグラフィーを用いてさらに分離した。それらのフラクションと患者血清中との反応について ELISA を用いて測定し、高い結合能を示すフラクションが存在することを確認した。このフラクションの構成タンパク質を、SDS-PAGE 後の質量分析により分析した。その結果に基づいて、シクロフィリン・スーパーファミリーに属し、主にタンパク質のフォールディングを促進する酵素として機能する PPIase を第一のアレルゲン候補として推定した(8)。そこで、大腸菌により組み換え型 PPIase を作製し(図 2)、ELISA で血清を用いて検証したところ、組み換え型 PPIase が患者血清と高い反応性を有することが明確となった。よって、PPIase が本患者の主要アレルゲンであると考えられた。

3. 大豆アレルゲンに対する抗血清を用いた検出

大豆以外の植物の種子抽出液を陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、そのフラクションについて Gly m 3 に対する抗ウサギ血清を用いてウェスタンブロットをしたところ、一般的な Profilin の分子量に近いサイズにバンドが検出された。このバンドが Profilin であることを確認中である。

考察

本研究により、学童期以降の大豆アレルギー患者の多くが、Gly m 4 および Gly m 3 に感作されていることが明らかとなった。よって学童期以降の大豆アレルギ

一にはカバノキ科やイネ科の花粉が最初の感作源となっている可能性が高い。また、本研究において PPIase が大豆の新規アレルゲンとして同定された。PPIase はピーナッツにおいてもアレルゲンとして同定されているタンパク質であり、近年、花粉感作との関係が指摘されている(8)。感作頻度は低いものの、今後、花粉との関連についても明らかになることが期待される。また、作製した Gly m 3 の抗ウサギ血清は、様々な植物の種子タンパク質とも反応性を示す可能性が高い。現在作製中の大豆 PPIase の抗ウサギ血清を含めて、これらのアレルゲンの検出に広く使用できる可能性が示唆された。

要約

学童期以降の大豆アレルギーは花粉による感作が原因となることが多い。これまで、PR-10 である Gly m 4 に対する報告が主であり、それ以外のアレルゲンに対する感作について十分な報告がない。本研究では、Gly m 4 に加え、Gly m 3 にも比較的多くの患者が感作されることを示した。Gly m 3 と Gly m 4 のいずれかに感作されている患者は全体の約 89% であり、両アレルゲンに感作されている患者も約 17% 存在していた。また、新たに PPIase が大豆アレルゲンとなることが示唆された。さらに、それらの抗体を作製し、アレルゲンの検出が可能であることを示した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、兵庫県立加古川医療センターの足立厚子先生には大豆アレルギー患者の血清の分与していただきました。京都大学大学院農学研究科大学院生 楊 紫晴氏には実験の実施にご協力を戴きました。また、研究助成を賜りました財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心から感謝申し上げます。

文献

- (1) R González, L Zapatero, F Caravaca, J Carreira.
Identification of soybean proteins responsible for respiratory allergies.
Int Arch Allergy Appl Immunol. 1991;95(1):53-7.

(2) K Ito, S Sjölander, S Sato, R Movérare, A Tanaka, L Söderström, M Borres, M Poorafshar, M Ebisawa.

IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese children.

J Allergy Clin Immunol. 2011 Sep;128(3):673-5.

(3) N Maruyama, S Sato, C Cabanos, A Tanaka, K Ito, M Ebisawa.

Gly m 5/Gly m 8 fusion component as a potential novel candidate molecule for diagnosing soya bean allergy in Japanese children.

Clin Exp Allergy. 2018 Dec;48(12):1726-1734.

(4) Y Fukutomi, S Sjölander, T Nakazawa, MP Borres, T Ishii, S Nakayama S, A Tanaka, M Taniguchi, A Saito, H Yasueda, H Nakamura, K Akiyama.

Clinical relevance of IgE to recombinant Gly m 4 in the diagnosis of adult soybean allergy.

J Allergy Clin Immunol. 2012 Mar;129(3):860-863.e3.

(5) J Kleine-Tebbe, A Wangorsch, L Vogel, DN Crowell, UF Haustein, S Vieths.

Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1– related PR-10 protein in soybean, SAM22.

J Allergy Clin Immunol. 2002 Nov 1;110(5):797–804.

(6) HP Rihs, Z Chen, F Ruëff, A Petersen, P Rozynek, H Heimann, X Baur. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes.

J Allergy Clin Immunol. 1999 Dec;104(6):1293-301.

(7) N Maruyama, T Nakagawa, K Ito, C Cabanos, MP Borres, R Movérare, A Tanaka, S Sato, M Ebisawa.

Measurement of specific IgE antibodies to Ses i 1 improves the diagnosis of sesame allergy.

Clin Exp Allergy. 2016 Jan;46(1):163-71.

(8) PM Matricardi, E Potapova, V Panetta, J Lidholm, L Mattsson, E Scala, R Bernardini, C Caffarelli, A Casani, R Cervone, L Chini, P Comberiati, GD

Castro, MMD Giudice, ID Iacono, ADR Businco, M Gallucci, A Giannetti, V Moschese, E Varin, A Bianchi, M Calvani, T Frediani, F Macrì, N Maiello, F Paravati, U Pelosi, D Peroni, G Pingitore, M Tosca, AM Zicari, G Ricci, R Asero, S Tripodi; Italian Pediatric Allergy Network

IgE to cyclophilins in pollen-allergic children: Epidemiologic, clinical, and diagnostic relevance of a neglected panallergen.

J Allergy Clin Immunol. 2024 Mar 19:S0091-6749(24)00235-5.

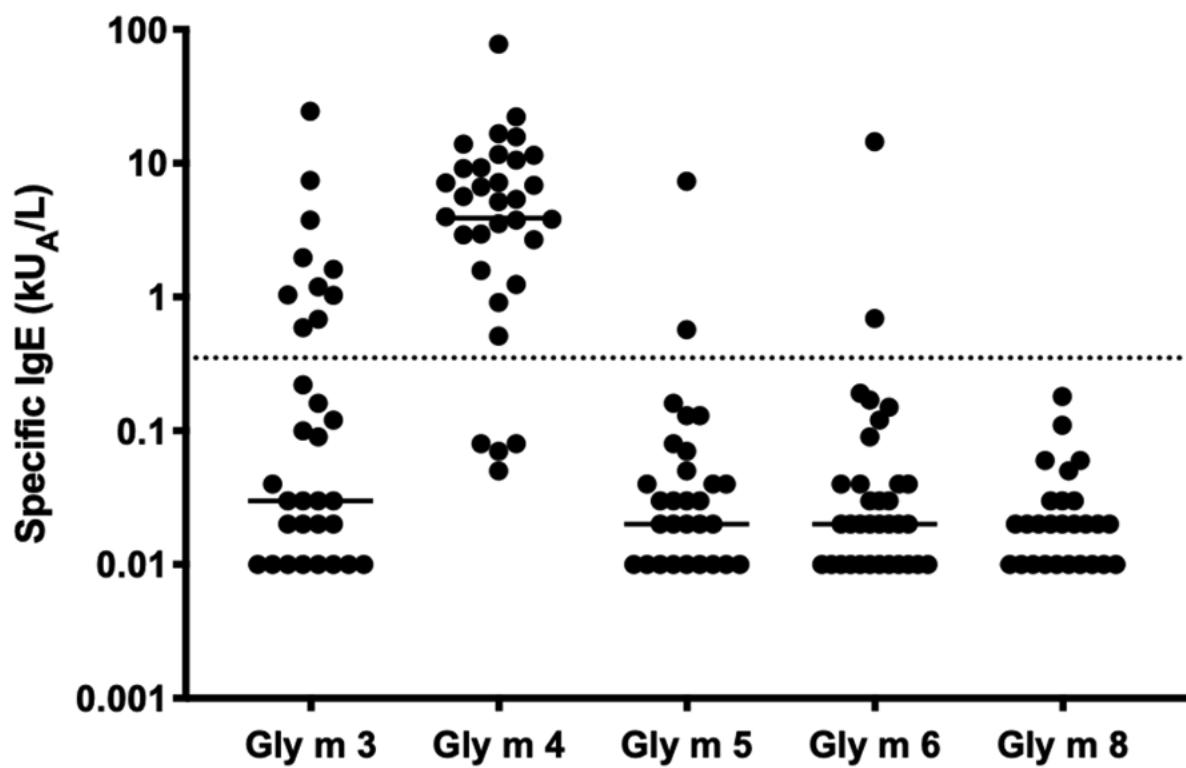


図 1. 主要大豆アレルゲンに対する感作プロファイル

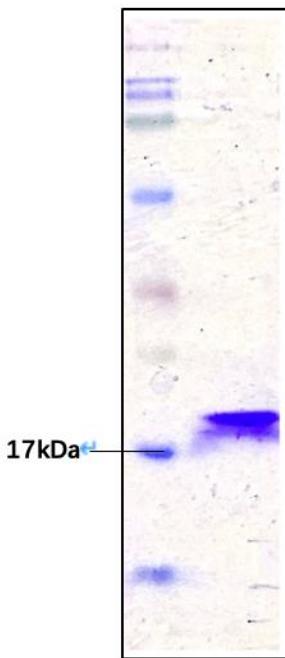


図 2. 組み換え型大豆 PPIase