

研究課題名	ソバアレルギーの特性改変に効果的な手法の探索		
フリガナ	サトウ リエ		
代表者名	佐藤 里絵		
所属機関 (機関名) (役職名)	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 上級研究員		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	近藤康人 (コンドウヤスト)	学校法人 藤田学園 藤田 医科大学 ばんだね病院 小児科 教授	ソバアレルギー患者の診断・ 問診、収集した血清の抗体価 の調査
	手島玲子 (テシマレイコ)	学校法人 加計学園 岡山 理科大学 獣医学科 食品 衛生講座 教授	ソバアレルギーコンポーネン トの消化性試験
本助成金による発 表論文, 学会発表	国際誌への投稿に向け準備中である。		

## 研究結果要約

ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) はアミノ酸バランスの良い (アミノ酸スコア 100) タンパク質や、脂質、食物繊維、ビタミン、および抗酸化作用等を持つルチンの豊富な作物である。一方でソバは、ごく微量でアナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こすことから、日本では特定原材料として加工食品への表示義務が課されている。ソバは日本だけでなく世界各地で食べられている食品であり、ソバアレルギーの低減は重要な課題である。ソバアレルギーの原因物質であるソバアレルギーはすでに複数同定されている。我々はアナフィラキシーの原因アレルゲンであるとの報告のある **Fag e 2** について解析を進めてきており、一部のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換すると消化耐性が低下することを示すと同時に、エピトープ配列の同定を行ってきた。本研究では、ソバアレルギーと、症状およびソバ特異的 IgE 抗体価との関連性を調査し、**Fag e 2** と **BW10kDa** との両方に結合活性を示す患者血清は、比較的高いソバ特異的 IgE 抗体価および重篤な症状を示すものであることがわかった。また、そば乾麺を調理した際、調理後のアレルゲンの消化性が変化する可能性を示した。今後、これらのアレルゲンのアレルギー誘発性を明らかにすることで、ソバアレルギーのより正確な診断や低アレルゲン食品の開発、ならびに低アレルゲン品種の作出に貢献したい。

## 研究目的

現在、患者が食物アレルギーを引き起こさないようにする方法は、原因食品の摂食を避けること、である。我々が避けるべき原因食品を知るためには、正確な診断が必要とされる。近年、食物アレルギーの原因物質である食物アレルギーに関し、1種類の原因食品には複数のアレルギーが含まれること、患者によって反応するアレルギーが異なること、および、どのアレルギーに反応するかによって症状に差異が生じることがあること、などが明らかになってきた。そこで、個々のアレルギー（アレルギーコンポーネント）を同定することと、それぞれがどのような症状の原因アレルギーであるか関連付けることが、より正確な診断に繋がると期待され、症状と関連付けられたアレルギーコンポーネントに対する特異的 IgE 抗体価を測定する食物アレルギー検査である **Component Resolved Diagnosis (CRD)** の確立が進んでいる。実際、小児に症例の多い乳や、重篤な症状で知られる小麦や落花生で CRD を実施し、従来の検査法の場合と比べ、さらに正確な診断を行うことができることが示されてきている。また、CRD による検査結果を踏まえ、アレルギーコンポーネントを低減できる加工・調理法の確立やテーラーメイド低アレルギー食品の開発、またアレルギーコンポーネントを欠失・低減した作物品種の育成に対するニーズも高まっている。

ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) はタデ科ソバ属に属する作物で、アミノ酸バランスの良い（アミノ酸スコア 100）タンパク質を含み、脂質や食物繊維、ビタミン、および抗酸化作用等

を持つチンも豊富な食品である。一方でソバは、ごく微量でアナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こすことから、日本では特定原材料として加工食品への表示義務が課されている。また、ソバアレルギーは寛解されにくいことが知られている。

ソバアレルギーはすでに複数同定されており<sup>1)</sup>、**Fag e 2** はアナフィラキシーの原因アレルギーであるとの報告がある<sup>3)</sup>。我々は **Fag e 2** について解析を進めてきており、一部のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換すると消化耐性が低下することを明らかにするとともに、エピトープ配列の同定を行ってきた<sup>4, 5)</sup>。本研究では、①ソバアレルギーと症状およびソバ特異的 IgE 抗体価との関連性、②調理加工等がソバアレルギーの消化性に及ぼす影響、③**Fag e 2** における変異が消化性・アレルギー誘発性に及ぼす影響、を解明し、ソバアレルギー改変を目指す。本研究で得られる成果は、ソバアレルギーの CRD の確立や低アレルギー食品の開発、低アレルギーソバ品種の作出に貢献すると期待される。

## 研究計画及び研究手法

### ① ソバアレルギーと症状との関連性

症状の履歴やソバ特異的 IgE 抗体価の明らかな血清を用い、ソバアレルギーの中でも **Fag e 2**、**BW10kDa**、および **Fag e 4** に注目し、これらアレルギーと症状およびソバ特異的 IgE 抗体価との関連を調査する。方法としては、これまでにソバアレルギーに関連して我々が収集した血清と、ソバから抽出したタンパク質画分とを用いたウ

ウェスタンブロットにより、各患者血清とソバタンパク質画分中のタンパク質との反応性を確認する。

② 調理加工等がソバアレルギーの消化性に及ぼす影響

アレルギーは分子量や含有量、消化性などの性質がそれぞれ異なる。また、消化性は熱や圧により変化する可能性がある。そこで、ソバアレルギーとしてすでに報告されているもののうち、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 に注目し、調理加工等の処理前後で消化性が変化するかどうかを調査する。検出は、市販されているそば麺から抽出したタンパク質画分と、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 の 3 種類のソバアレルギーに対する特異的抗体とを用いたウェスタンブロットにて行う。

③ Fag e 2 における変異が消化性・アレルギー誘発性に及ぼす影響

Fag e 2 は消化耐性を示すアレルギーである<sup>3)</sup>が、Fag e 2 を構成するアミノ酸残基のうち、一部のシステイン残基を他のアミノ酸残基に置換すると、消化耐性が低下（消化性が向上）することを我々はすでに報告している<sup>4)</sup>。また、我々はすでに Fag e 2 のエピトープ配列を同定している<sup>5)</sup>。そこで、本研究では、Fag e 2 の IgE エピトープ配列を他のアミノ酸残基に置換すると消化性やアレルギー誘発性が変化するかを調査する。アレルギー誘発性の調査に用いる EXiLE (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression)

法はヒト Fc $\epsilon$ RI を発現させたラット培養マスト細胞株 (RS-ATL8) の転写因子 (NF- $\kappa$ B) 活性化をルシフェラーゼアッセイにて検出する *in vitro* 試験法で、高感度・高特異性で、より臨床に近い形で Fc $\epsilon$ RI の架橋によるマスト細胞活性化を測定できる。本研究では、-80°C で保存可能な患者血清中 IgE と、Fag e 2 変異体との反応性を EXiLE 法で検出し、Fag e 2 のエピトープのどのアミノ酸残基がアレルギー反応の惹起に影響するか調査する。

結果と考察

1) ソバアレルギーと症状との関連性

現在、一般に栽培・流通しているソバは、他殖性品種である。他殖性品種では、種子 1 粒ごとに遺伝的背景が異なっている。本研究では、その他殖性品種の 1 つであるキタワセソバ (Fagopyrum esculentum Moench cv. Kitawase-soba) を材料として用いた。キタワセソバの種子複数粒を粉碎し、得られた粉末に milli Q で 2 倍希釈した 2×Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) を加え、Rotator を用いて 4°C にて転倒攪拌することで、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は遠心し上清を取り分け、フィルターを用いてろ過後、ソバタンパク質画分とした。得られたタンパク質画分のタンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) を用いて測定し決定した。得られたタンパク質画分は電気泳動にて分離し、分離したタンパク質は PVDF 膜に転写した。転写後の膜は我々が作成した Fag e 2、BW10kDa、あるいは Fag e

4 特異的抗体を用いてウェスタンブロットに供した。その結果、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 特異的抗体との結合活性を示すバンドが観察されたことから、材料として用いたキタワセソバから抽出したソバタンパク質画分は、今回の検出対象である Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 を含んでいることがわかった。次に、この膜と、我々がソバアレルギーに関連して収集した血清とを用いたウェスタンブロットを行った。その結果、各患者血清とソバタンパク質画分中のタンパク質との反応性はそれぞれ異なっていた。Fag e 2 および BW10kDa に結合活性を示す患者血清は複数見られたが、Fag e 4 に結合活性を示す血清は見当たらなかった。Fag e 4 との結合活性を示す患者血清を見つけることができなかった理由の 1 つに、Fag e 4 の分子量が小さく、検出がうまくできていない可能性があることが挙げられる。次に、この結合活性と、各患者の症状およびソバ特異的 IgE 抗体価を比較したところ、Fag e 2 と BW10kDa との両方に結合活性を示す患者血清は、比較的高いソバ特異的 IgE 抗体価を示し、重篤な症状を示すものである可能性が示唆された。

## 2) 調理加工等がソバアレルギーの消化性に及ぼす影響

消化耐性についてすでに報告されている Fag e 2 のほか、消化性などの性質が不明な BW10kDa や Fag e 4 に注目し、調理加工等の処理前後で消化性が変化するかどうかを調査した。材料として、市販のそば乾麺を用い、(i)調理する前のそば乾麺、

(ii)商品に記載されている調理法に従い茹でたもの（通常調理）、および、(iii)圧力鍋を用いて茹でたもの（高圧調理）、の 3 種類を準備した。通常調理および高圧調理のそば麺は、凍結乾燥後、粉碎し、粉末とした。粉末からのタンパク質画分の抽出は①と同様に行った。得られたタンパク質画分は Takagi et al. (2003)<sup>6)</sup>の方法に従い、消化試験に供した。消化試験後のサンプルは電気泳動にて分離後、ゲルを coomassie brilliant blue 染色および銀染色にて可視化するとともに、PVDF 膜に転写し、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 の 3 種類のソバアレルギー特異的抗体を用いたウェスタンブロットにて、Fag e 2、BW10kDa、および Fag e 4 を検出した。その結果、Fag e 4 については、ほとんど検出できなかった。この原因として、①の結果と同様、Fag e 4 の分子量が小さく、検出がうまくできていない可能性があり、検出系の改善の必要がある。また、Fag e 2 は、乾麺と比べ、通常調理により消化性が高まる傾向が見られたのに対し、BW10kDa は、通常調理では消化性が変化しない傾向が見られた。このことは、BW10kDa は比較的消化耐性の高いアレルギーである可能性を示している。

## 3) Fag e 2 における変異が消化性・アレルギー誘発性に及ぼす影響

①において、Fag e 2 と結合活性を示すことがわかった患者血清を用い、EXiLE 法にてアレルギー誘発性評価を行った。EXiLE 法は Nakamura et al. (2010)<sup>7)</sup>に従って行った。予備試験として、キタワセソバから抽出したタンパク質

画分を EXiLE 法に供した。その結果、健常者血清と比較して、ソバアレルギー患者血清の中に、キタワセソバタンパク質の濃度依存的に反応性を示す血清があることがわかった。次に、キタワセソバタンパク質画分の代わりにリコンビナント Fag e 2 野生型を用いて同様の実験を行ったところ、濃度依存的にリコンビナント Fag e 2 野生型と反応性を示す血清は見られなかった。したがって、本研究の目的である、Fag e 2 における変異がアレルギー誘発性に及ぼす影響を評価することができなかった。

#### 今後の研究活動について

Fag e 4 については、はっきりとした検出結果を得ることができなかった。これについては、検出に用いるタンパク質濃度の改善や、検出系の検討・改良を行い、追試を行う予定である。また、リコンビナント Fag e 2 を用いた Fag e 2 のアレルギー誘発性評価ができなかった点については、今回解析に用いた患者血清が Fag e 2 以外のアレルギーに結合することによりアレルギー誘発性に関与している可能性、および、リコンビナント Fag e 2 が native の Fag e 2 とは異なる立体構造を取っている可能性が考えられ、さらなる検討が必要である。また、ソバは他殖性作物であり、ある1つのソバ品種であっても、その中には複数の遺伝的背景、すなわち変異を含んでいる可能性がある。したがって、今回解析に用いたリコンビナント Fag e 2 が、今回解析に用いた患者血清の結合できる配列を持っているかどうかについても検討し、Fag e 2 のアレルギー誘発性に関する解

析を進めて行きたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) 近藤康人、宇理須厚雄、和田映子、鶴田光敏、矢崎雄彦、山田一恵、増田進、森田豊. そば主要アレルギーの Immunoblotting 法による検討. アレルギー. 1993; 42(2): 142-148.
- 2) Urisu A, Kondo Y, Morita Y, Wada E, Tsuruta M, Yasaki T, Yamada K, Kuzaya H, Suzuki M, Titani K, Kurosawa K. Identification of a major allergen of buckwheat seeds by immunoblotting methods. Allergy Clin Immunol News. 1994; 6: 151-155.
- 3) Tanaka K, Matsumoto K, Akasawa A, Nakajima T, Nagasu T, Iikura Y, Saito H. Pepsin-resistant 16-kD buckwheat protein is associated with immediate hypersensitivity reaction in patients with buckwheat allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2002; 129(1): 49-56.
- 4) Satoh R, Koyano S, Takagi K, Nakamura R, Teshima R, Sawada J. Immunological characterization and mutational analysis of the recombinant protein BWp16, a major allergen in buckwheat. Biol Pharm Bull. 2008; 31(6): 1079-1085.
- 5) Satoh R, Koyano S, Takagi K, Nakamura R, Teshima R. Identification of an IgE-binding epitope of a major buckwheat allergen, BWp16, by SPOTs assay and mimotope screening. Int Arch Allergy Immunol. 2010; 153(2): 133-140.

- 6) 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.* 2003; 26(7): 969-973.
- 7) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy.* 2010; 65(10): 1266-1273.