

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	食物アレルギー診断技術向上と抗原改変食品作成を目標とした IgE の構造エピトープ・線形エピトープの解析
フリガナ	カワモト ノリオ
代表者名	川本 典生
所属機関 (機関名) (役職名)	岐阜大学医学部附属病院 小児科 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	関連の内容の一部を以下の学会で発表した、ないし発表予定である 1) 熊谷千紗, 川本典生, 金山朋子, 川本美奈子, 大西秀典. エピトープ解析を目指したカゼインのオーバーラッピングペプチドの作成の試み. 東海小児アレルギー談話会(第 81 回)(2022 年 2 月 26 日 名古屋市/オンライン) 2) 熊谷千紗, 川本典生, 三輪友紀, 金山朋子, 川本美奈子, 大西秀典. カゼイン IgE エピトープを定量的に評価する手法の確立. 日本アレルギー学会(第 71 回)(2022 年 10 月 7-9 日 東京/オンライン) また、その他の内容については、さらに検討を加えて学会発表を行っていく予定である。

研究結果要約

我々は、IgE の結合部位（エピトープ）を破壊してアレルギー反応を抑制しつつ、一定の T 細胞エピトープを残すことで「食べて治す」抗原改変食品の開発を行い、これによる経口免疫療法を実施してその有効性や安全性を検証してきた。最近、IgE エピトープの研究の一環として、オーバーラッピングペプチドを大腸菌により大量に作成し、実験を行ってきた。従来の合成によるペプチドより、比較的多くペプチドを取得できるため、様々な応用が考えられた。この一環として、IgE 抗体の立体構造エピトープと線形エピトープの認識の仕組みを解明するため、オーバーラッピングペプチドを用いて、血清中の線形エピトープを低減し、その処理後にアレルゲンへの結合量が変化するかを評価し、立体構造および線形エピトープの反応の検出を試みた。オーバーラッピングペプチド-GST 融合体を大腸菌で培養後精製し、グルタチオン磁気ビーズに固相化し、ペプチドに結合する血清中の IgE 抗体を除去した。 α S1 カゼインを用いた検討では、除去の処理後に特異的 IgE 抗体の測定値は 8 割以上低下した。立体構造をとらないとされる α S1 カゼインでは、立体構造エピトープはあまり多くないと推察された。今回、立体構造エピトープと線形エピトープを比較する手法は概

ね確立できたと考えられたため、今後、立体構造をとる事がわかっているその他の蛋白質で同様の実験を行い、比較検討していく予定である。

研究目的

即時型食物アレルギーは、食物アレルギーの中でも最も多く、また、特に低年齢に多い。一部にはアナフィラキシーショックにより死に至るリスクもあり、また、日々の食事について慎重に対応する必要から生活の質にも多大な影響があるため、重要な課題である。学校現場で食物アレルギーのアナフィラキシーショックでの死亡例の発生を受けて、特に、こども園等（保育園・幼稚園・託児所）や学校などの教育現場において、その安全対策は進みつつある。

即時型の食物アレルギーの症状誘発には、IgE 抗体が関わっており、臨床現場では特定の抗原に特異的に反応する抗原特異的 IgE 抗体の測定が臨床検査として広く行われている。この検査値が高いほど一般的には症状が誘発される可能性は高くなるが、比較的低値でもアナフィラキシーを引き起こすことがある一方で、比較的高値でも症状が誘発されない場合もあり、現時点では、食べて誘発される症状を確認する食物経口負荷試験が診断のためのゴールドスタンダードとなっている。近年米国でこの食物経口負荷試験による初の死亡例が報告され、安全に食物負荷試験を実施する方法が検討され、また食物経口負荷試験の結果を予測するための様々な試みがなされている。

我々は牛乳アレルギーのメカニズム解析を長年にわたり行ってきており、IgE の結合部位（エピトープ）を破壊しつつも一定の T 細胞エピトープを残すことで、IgE によるアレルギー反応を減弱しつつも「食べて治す」抗原改変食品の開発を行い、これを用いた経口免疫療法を実施してその有効性や安全性を検証してきた¹⁻³⁾。また、これまでに IgE 抗体の結合力（アフィニティー）に着目し、ヒトでははじめて低アフィニティーIgE 抗体の存在を検証し、その働きの違いについても研究をすすめてきた^{4,5)}。

今後即時型アレルギーの症状誘発については、IgE 抗体の量とともに質に着目し、アレルギー反応の起こりやすさを予測し、また、エピトープを修飾することで「食べて治す」抗原改変食品あるいは食物アレルギーワクチンの開発につなげていく必要があると考えている。

新たな着眼点として IgE のエピトープのうち、立体構造エピトープ(conformational epitope)と線形エピトープ(sequential epitope)に着目し、その違いを確認することで食物アレルギー診断技術の向上を図り、また、今後の抗原改変食品開発の基礎技術にする事を目標としている。「食べて治す」抗原改変食品は加水分解により立体構造エピトープが破壊されていると考えられるため、線形エピトープのみが残る食品である。この構成比を知ることで将来的には「食べて治す」抗原改変食品の治療効果を予測したり、メカニズムの解析をしたりすることが出来るようになる考えた。

研究計画及び研究手法

牛乳の蛋白質として、 α S1 カゼインと β ラクトグロブリンについて実験を進める計画であった。理由としては、カゼインは牛乳アレルギーの主要なアレルゲンであることがあげられる⁶⁾。一方で、カゼインは3次構造をとらないとされており⁷⁾、その場合に立体構造エピトープがあるのかについては不明である。一方 β ラクトグロブリンは牛乳の主要なアレルゲンの一つではあるが、カゼインに比べて感作の割合も低い。しかし一定の立体構造を取るものと考えられるため、重要なモデルであると考えた。

そこで、 α S1 カゼインと β ラクトグロブリンの Signal peptides を除いた領域について、10 アミノ酸ずつオーバーラップさせた 20 アミノ酸からなるオーバーラッピングペプチドを、大腸菌を用いて合成を試みた。下にそれぞれのアミノ酸の配列を示す(図1)。下線と太字が Signal peptides を除いた部分を示している。具体的には、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo Co, Osaka, Japan)を用いて、pGEX-5X-1 に上記のオーバーラッピングペプチドの一つ一つを発現する遺伝子配列を挿入した。大腸菌(ClearColi® BL21)に形質転換し、GST が融合したペプチドをグルタチオンセファロースカラムにより抽出し、精製した上で、実験に供した。

図1 α_{s1} カゼインおよび β ラクトグロブリンのアミノ酸配列

<Alpha-S1-casein (CSN1S1) Bos taurus (Bovine); UniPort P02662; NCBI NP_851372.1>
 10 20 30 40 50 60 70 80
 MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHQGLPQEV LNENLLRFFV APFPEVFGKE KVNELSKDIG SESTEDQAME DIQMEAESI
 90 100 110 120 130 140 150 160
SSSEEIVPNS VEQKHIQKED VPSERYLGYL EQLRLKKYK VPQLEIVPNS AEERLHSMKE GIHAQQKEPM IGVNQELAYF

170 180 190 200 210
YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYTD APSFSDIPNP IGSENSEKTT MPLW
 * Signal peptide: 1-15
 <Beta-lactoglobulin (LGB) Bos taurus (Bovine); UniPort P02754; NCBI NP_776354.2>
 10 20 30 40 50 60 70 80
MKCLLLALAL TCGAQUALIVT QTMKGLDIQK VAGTWYSLAM AASDISLLDA QSAPLRVYVE ELKPTPEGDL EILLQKWENG
 90 100 110 120 130 140 150 160
ECAQKKIIAE KTKIPAVFKI DALNENKVLV LDTDYKKYLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR TPEVDDEALE KFDKALKALP
 170
MHIRLSFNPT QLEEQCHI
 * Signal peptide: 1-16

精製された GST が融合したペプチドをグルタチオン結合磁性ビーズに固相化し、カゼイン特異的 IgE 抗体が確認できている血清を混合して吸着し、各ペプチドに結合する IgE 抗体を除去し、抗体の除去の有無で ELISA 法の結果に違いが出るかを検証する。GST が融合したペプチドは複数種類を除去する必要があるために、事前に ELISA 法で抗体価を評価し、検出できているものを中心に免疫沈降をおこなって吸着除去する (図 2)。

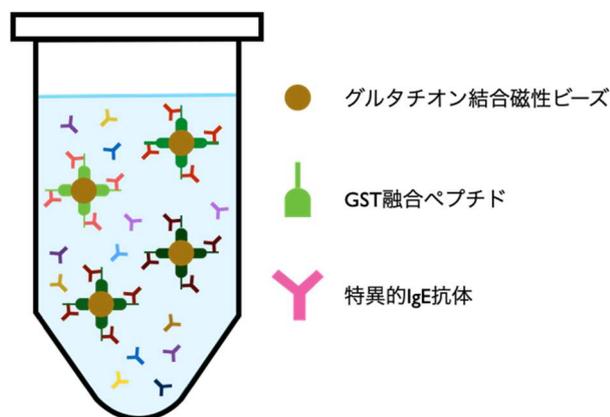


図 2 GST-ペプチド融合体を用いた免疫沈降

ELISA 法は、高感度化のため、化学発光法を用いて行った。蛋白質または GST が融合したペプチドを ELISA プレートに固相化し、BSA でブロッキングした後に、血清を添加して Plate Shaker で震盪しながら反応させ、血清を洗浄除去後、ビオチン化抗ヒト IgE 抗体を添加し反応させ、さらに洗浄除去後、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を添加して反応、最後に化学発光法で測定を行った。測定には発光マイクロプレートリーダーを用いた。

結果と考察

この実験には、大量のペプチドが必要であり、大腸菌を用いた大量の発現をできる系が必須であると考えており、まずは、19 種類の α S1 カゼインのオーバーラッピングペプチド-GST 融合体を大腸菌(ClearColi® BL21)に形質転換し、大量培養の上、グルタチオンセファロースカラムを用いて精

製を行った。これを用いて、 α S1 カゼインについて実験をおこなった。代表的な結果を表1に示す。ペプチド番号 1~19 とカゼイン(Casein)についてそれぞれの ELISA 法による測定値の陰性コントロール(GST 蛋白)に対する比を示す。この場合、ペプチド 2, 7, 10, 12, 14 が特に比が高く、このペプチドに対する特異的 IgE 抗体が多く含まれていると考えられた。

表1 各ペプチドの ELISA による結果

Peptide No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Results (ratio against GST)	0.4	2	1.4	0.5	0.5	0.6	3.8	0.7	0.7	2.1
Peptide No. or casein	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Casein
Results (ratio against GST)	0.6	7.1	0.5	2.3	1.7	0.7	0.9	0.4	0.6	63.2

そこで、この中で、もっとも測定値の高かった 12 番および、その次に測定値の高かった 14 番のペプチドについて、免疫沈降を用いて IgE 抗体を吸着するための条件設定を行った。磁性ビーズの量

表2 磁気ビーズの量と測定値の低下について

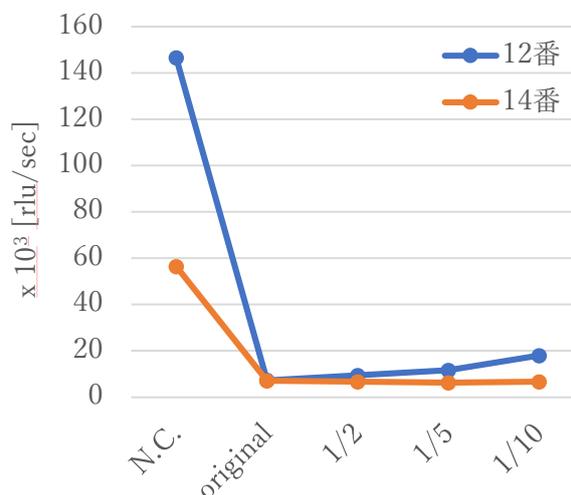
	磁気ビーズの量	ペプチドの量	12 番結果 [rlu/sec]	14 番結果 [rlu/sec]
N.C.	50 μ l	100 μ g	146581	56430
Original	50 μ l	100 μ g	7251	7059
1/2scale	25 μ l	50 μ g	9359	6647
1/5scale	10 μ l	10 μ g	11552	6239
1/10scale	5 μ l	5 μ g	17966	6604

を初期量、1/2 量、1/5 量、1/10 量と漸減して、共免疫沈降による処理をおこなった(表2)。また、ペプチドを発現していない GST 蛋白を磁気ビーズに固相化して、陰性コントロール(N.C.)として使用した。結果の測定値は表2に、グラフを図3に示す。

ペプチドを発現していない GST のみを結合した磁性ビーズで処理した後の血清では、高い

測定値(12 番で 146581 rlu/sec, 14 番で 56430 rlu/sec)を示したのに対して、同量の GST-オーバーラッピングペプチド融合体を用いて処理をした後の血清では、ELISA の測定値が著しく低下(12 番で 7251 rlu/sec, 14 番で 7059 rlu/sec)し、それぞれ約 1/20 と約 1/8 の測定値となった。また、同じ

図3 免疫沈降によるの測定値の変化



実験系のなかでビーズの量を 1/2 量、1/5 量、1/10 量と減らした時に、特に測定値の高い 12 番については、ビーズの量が減るにつれて、測定値も上昇した。特に 1/10 量と初期量では、約 2.5 倍の測定値の上昇となった。

これらの事から、①グルタチオン結合磁性ビーズを用いることにより、それぞれのペプチドへの特異的 IgE 抗体価が著明に抑制される、つまりペプチドに結合する IgE 抗体が除去される事、②検査値の高いペプチドでは、磁性ビーズの量を減らすと一部の特異的抗体を十分に除去する事ができない事がわかった。一方で、ビーズの量を増やすと、血清も希釈されて行く傾向にある事から、最低限の量で実験をおこなう必要があると考えられた。以上の事をふまえて、初期の ELISA の測定値から、必要な磁性ビーズの量のある程度推定した上で、実験に用いるのがよいと考えられた。

続いて、表 1 の結果および表 2、図 2 の結果から必要なビーズの量を決定し、表 3 に示すような量の GST-オーバーラッピングペプチド融合体を持ちいて各ペプチドに結合する特異的 IgE 抗体を除去することとした。

表 3 ペプチド毎のビーズの量および結合させるペプチドの量

配列	番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ビーズ	($\mu\text{l}/\text{tube}$)	22	22	22	22	22	22	110	22	22	22
ペプチド	($\mu\text{g}/\text{tube}$)	50	50	50	50	50	50	200	50	50	50
配列	番号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
ビーズ	($\mu\text{l}/\text{tube}$)	22	110	22	22	22	22	22	22	22	
ペプチド	($\mu\text{g}/\text{tube}$)	50	200	50	50	50	50	50	50	50	

共免疫沈降後の ELISA 法による測定値の変化を図 4 に示す。オーバーラッピングペプチドを用いた共免疫沈降によって、同量の GST 蛋白が結合したビーズによる共免疫沈降に比べて、ほとんどのペプチドの測定値が著減したにも関わらず、 αS1 カゼインに対する検査値は 15%の低下に留まった。測定値においてはペプチドの 2 番は 2.1 倍、ペプチドの 7 番は 24.0 倍、ペプチドの 10 番も 2.0

倍、ペプチドの 12 番も

16.9 倍、ペプチドの 14

番も 4.3 倍検査値が低

下している。検体量の

制限もあり、その他の

ペプチドについてどの

程度低下しているかを

全て測定する事はでき

なかったが、全てのペ

プチドについて同様の処理をおこなっている事、さら

にそれらのペプチドは何れも測定値として低いもので

あるため、一定の低減が得られていると考えられた。

また、他のサンプルでも同様の実験を行ったが、類似

の結果であった。

α S1 カゼインの測定値の低下が限定的であった

点について、天然型のカゼインはリン酸化の影響を

受けているとの報告もあり、大腸菌で作成したペプ

チドがリン酸化を受けていないことが理由の一つと

考えられたため、天然型の α S1 カゼインおよび（大

腸菌による）リコンビナントの α S1 カゼインを等量

で固相化して ELISA を行った。代表的な結果を図 5

に示す。リコンビナントの方が天然型に比べて、測定値は低下した。オーバーラッピングペプチド

も大腸菌での合成のためリコンビナントと同等であることから、今後はリコンビナントを Standard

に用いた方が良いと考えられた。

図 4 共免疫沈降前後の測定値の変化

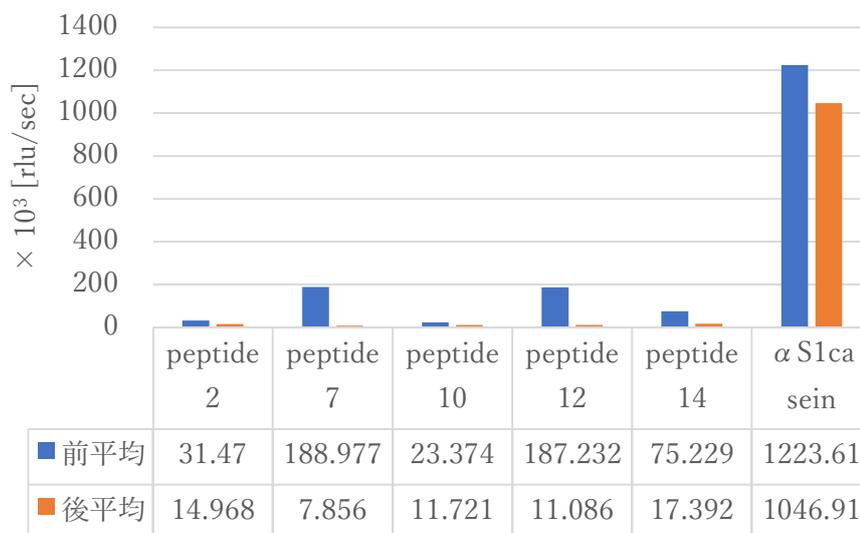


図 5 天然型とリコンビナントの比較

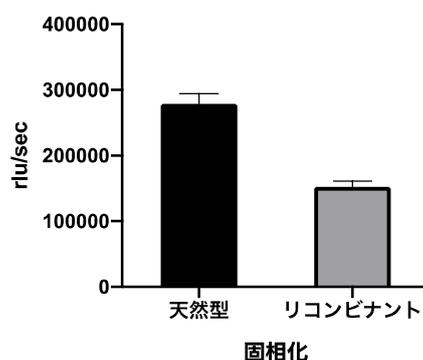
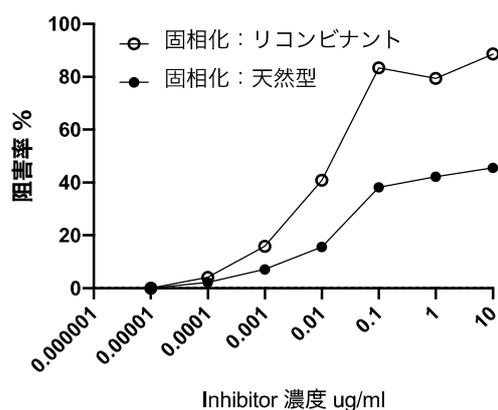


図 6 天然型とリコンビナントの阻害率の比較



そこで、天然型およびリコンビナントの α S1 カゼインを固相化し、それぞれ同じ濃度のオーバーラッピングペプチドを添加し、Inhibition ELISA による阻害率を比較した。結果を図 6 に示す。リコンビナント蛋白を固相化したものについては、8 割を超える Inhibition がかかっており、結果として、 α S1 カゼインにおいては、立体構造エピトープはほとんどなく、線形エピトープがほとんどであると推察できた。また天然型では阻害は 4 割程度に留まった。 α S1 カゼインは一般的に立体構造をとらない蛋白質であると知られており、その点は矛盾がない結果であると考えられた。また、天然型との違いについては、リン酸化の影響の可能性が最も考えられた。

β ラクトグロブリンについても同様のオーバーラッピングペプチドを作成した。16 種類のペプチドのうち半分程度までは作成できたが、残りについては、期間内に作成が終了しなかったため、引き続き作成を続けている。

今後の研究活動について

本研究の中で、オーバーラッピングペプチドによって多くの線形エピトープを阻害したが、天然型のアレルゲンに対する反応への阻害は限定的であった。特に大腸菌による合成ペプチドにおいては、リン酸化が行われない事や糖鎖による違いなど、他の要素の影響も考えられる。今回リコンビナント蛋白質を固相化に用いることによって、大部分の IgE の結合が阻害されたことから、リン酸化の影響も受けることがわかった。今回立体構造をとらないとされるカゼインではこのような結果であったが、立体構造をとるとされる他の蛋白質では検証できておらず、早期にその部分の確認を行っていきたいと考えている。他のアレルゲンでも立体構造エピトープの重要性を示唆する報告がある⁸⁾。次の挑戦としては、オーバーラッピングペプチドの作成について、GST 蛋白に結合するペプチドを間にスペーサーを置いて繰り返し配列する事で、さらに効率の良い特異的 IgE 抗体の除去を行う事ができる可能性がある。今回の実験から得られた事で、次なる改良をおこなって病態の解明に資する情報を得たいと考えている。

参考文献

- 1) Ueno HM, Kato T, Ohnishi H, Kawamoto N, Kato Z, Kaneko H, Kondo N, Nakano T. T-cell epitope-containing hypoallergenic β -lactoglobulin for oral immunotherapy in milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016 Dec;27(8):818-824.
- 2) Ueno HM, Kato T, Ohnishi H, Kawamoto N, Kato Z, Kaneko H, Kondo N, Nakano T. Hypoallergenic casein hydrolysate for peptide-based oral immunotherapy in cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jul;142(1):330-333.
- 3) Kawamoto N, Kaneko H, Kawamoto M, Ohnishi H, Matsui E, Teramoto T, Kato Z, Fukao T, Ueno HM, Nakano T, Kondo N. Oral immunotherapy with antigenicity-modified casein induces desensitization in cow's milk allergy. *Allergy*. 2020 Jan;75(1):197-200.
- 4) Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Mar;133(3):904-5.e6.
- 5) Kawamoto N, Kamemura N, Kido H, Fukao T. Detection of ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants and its relationship to eczema. *Pediatr Allergy Immunol*. 2017 Jun;28(4):355-361.
- 6) 中野 泰至, 下条 直樹, 森田 慶紀, 有馬 孝恭, 富板 美奈子, 河野 陽一. 牛乳アレルギー患者におけるカゼイン, β ラクトグロブリン感作に関する研究. *アレルギー*. 2010 Feb; 59(2):117-122.
- 7) 青木 孝良, 水野 礼, 木村 利昭, 堂迫 俊一: カゼインミセルの構造モデルと乳の加工. *ミルクサイエンス*. 2017 Aug;66(2):125-143.
- 8) Kobayashi A, Ichimura A, Kobayashi Y, Shiomi K. IgE-binding epitopes of various fish parvalbumins exist in a stereoscopic conformation maintained by Ca(2+) binding. *Allergol Int*. 2016 Jul;65(3):345-8.

以上