

植物種子に存在する塩可溶性タンパク質のアレルギー症状に寄与する構造の解明

丸山 伸之

京都大学大学院農学研究科

概要 大豆は日常の食生活に欠かせない食素材であると同時に、食物アレルギーの主要な原因物質の一つともなっている。即時性大豆アレルギーの患者の多くにおいて、7S グロブリンと 11S グロブリンに対して感作されていることが明らかになっている。7S グロブリンは複数のサブユニットにより構成されているが、サブユニット間でのアレルゲン性の違いや構造との関係については明確になっていない。本研究では、大豆 7S グロブリンのアレルゲン性についてサブユニットレベルで解析するとともに、アレルゲン性に寄与するエピトープ領域についても解析を行い、大豆の塩可溶性タンパク質のアレルギー症状に関わる構造の知見を得ることを目的として行った。

純度の高い試料を使用するため、 α 、 α' 、 β の 3 種類の大豆 7S グロブリンのサブユニットを大腸菌発現系によって調製した。それらのサブユニットに対して、患者血清に対する特異的 IgE 抗体価を測定したところ、 α' および α サブユニットに対して反応性を示す患者が、 β サブユニットに対して反応性を示す患者よりも多いことが示された。このことは、7S グロブリンの α' および α サブユニットが、大豆アレルギーの主要な原因タンパク質であることを示唆している。

さらに、 α' サブユニットの一次構造をもとに設計した合成ペプチドを結合させたアレイによって α' サブユニットのエピトープの解析を行うことによって、エピトープは分子全体に分布しており、エクステンション領域およびコア領域にわたって存在していることを示した。 α' サブユニットの構造情報と比較すると、エピトープ領域には β -ストランドや α -ヘリックスの 2 次構造をとる領域が含まれていた。

また、落花生 7S グロブリンである Ara h 1 のエピトープと比較すると、いくつかのエピトープについて、両タンパク質のアライメント上で類似した部位に存在するものが見られた。

今後、より多くの植物種について同様の解析がなされることにより、植物種子の塩可溶性タンパク質のアレルゲン性に寄与する構造が明確になるものと思われる。

1. 研究目的

食物アレルギーを発症する患者は増加の一途をたどっている。小麦や大豆などの植物種子は広く食品として利用されているが、種子に含まれるタンパク質(種子タンパク質)はアレルギーの原因物質(アレルゲン)となるものが多い。症状が重篤となる場合には、死に至ることもとあるため、アレルギー症状に関わるアレルゲンの構造要因の解明が急務とされている。種子には発芽期の窒素源となる貯蔵タンパク質が豊富に含まれている。それらは、溶解性に基づき、アルブミン(水可溶性)、グロブリン(塩溶液可溶性)、プロラミン(60-70%アルコール可溶性)、グルテリン(希酸・

希アルカリ可溶性)と命名されている¹⁾。

大豆は日常の食生活に欠かせない食素材であると同時に、食物アレルギーの主要な原因物質の一つともなっている。食物のアレルゲンについて、World Health Organization/International Union of Immunological Societies においてデータベース化されている。大豆においても、8 種類のタンパク質がアレルゲンとして登録されている (Table 1)。Gly m 1 (Hydrophobic protein) と Gly m 2 (Defensin) は、1980 年代にスペインのバルセロナで起こった喘息症状に対する原因抗原として同定された。花粉に含まれるタンパク質によって感作されている患者が、果

Table 1. Soybean allergen

Allergen	Biochemical name	Molecular Weight
Gly m 1	Hydrophobic protein	7k
Gly m 2	Defensin	8k
Gly m 3	Profilin	14k
Gly m 4	Pathogenesis-related protein, PR-10	17k
Gly m 5	7S Globulin	48-65k
Gly m 6	11S Globulin	52-61k
Gly m 7	Seed biotinylated protein	76k
Gly m 8	2S Albumin	16k

物や野菜などを摂取することにより口腔症状を起こすアレルギーに関連するアレルゲンが、それぞれ Gly m 3 (Profilin)と Gly m 4 (PR-10)と命名されている^{2,3)}。大豆に含まれる種子貯蔵タンパク質は、アルブミンとグロブリンが多くを占め、それらもアレルゲンとして登録されている (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)^{4,6)}。これらのアレルゲンの中で、即時性の大豆アレルギーの患者の多くにおいて、7S グロブリンと 11S グロブリンに対して感作されていることが明らかになっている。^{4,5)} 7S グロブリンと 11S グロブリンともに、複数のサブユニットにより構成されているが、どのサブユニット間でのアレルゲン性の違いや構造との関係については明確になっていない。

本研究では、食品素材として重要な位置を占めている大豆に豊富に含まれる 7S グロブリンのアレルゲン性についてサブユニットレベルで解析するとともに、アレルゲン性に寄与するエピトープ領域についても解析を行い、大豆の塩可溶性タンパク質のアレルギー症状に関わる構造の知見を得ることを目的として行った。

2. 研究方法

2.1 材料

大豆に対してアレルギー症状を示すことが臨床的に確定診断された患者血清を本研究に用いた。

2.2 大豆 7S グロブリンに対する組換えタンパク質の調製

大腸菌発現系を用いて、大豆 7S グロブリンの各サブユニットの組換えタンパク質を調製した。大豆 7S グロブリンの各サブユニットを発現する大腸菌を培養し、超音波によ

り菌体を破碎処理したのち、アフィニティーカラムおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて組換えタンパク質を調製した。

2.3 大豆 7S グロブリンのサブユニットに対する特異的 IgE 抗体量の測定

組換えタンパク質を ELISA プレートに吸着させた。ウェルをリン酸緩衝液により洗浄後、患者血清と反応させた。数時間インキュベートしたのち、リン酸緩衝液で洗浄し、酵素標識した抗ヒト IgE 抗体を用いて各画分に結合したヒト IgE 抗体量をマイクロプレートリーダーにより測定した。それぞれのタンパク質に対して結合した特異的 IgE 量を定量した。測定値は大豆に対する ImmunoCAP 値に基づく検量線に対して補正し、特異的 IgE 抗体値を求めた。

2.4 大豆 7S グロブリンのサブユニットのエピトープの解析

大豆 7S グロブリンの一次構造をもとにして、オーバーラッピングペプチドを合成し、ニトロセルロース膜にスポットした。患者血清を反応させ、洗浄後、酵素標識した抗ヒト IgE 抗体を用いて検出した。

3. 研究結果

3.1 7S グロブリンのサブユニットレベルでのアレルゲン性の解析

大豆 7S グロブリンは、 α 、 α' 、 β の3種類のサブユニットにより構成されている (Fig. 1)⁷⁾。これらのサブユニットを発現する大腸菌を破碎後の可溶性画分をアフィニティーカラムおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行うことにより、7S グロブリンの各サブユニットに対する組換えタンパク質を精製した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーでの溶出位置から 7S グロブリンと同様の会合体をしていると考えられた。それらのサブユニットに対して、患者血清に対する特異的 IgE 抗体価を測定したところ、 α' および α サブユニットに対して反応性を示す患者が、 β サブユニットに対して反応性を示す患者よりも多いことが示された。このことは、7S グロブリンの α' および α サブユニットが、大豆アレルギーの主要な原因タンパク質であることを示唆している。

3.2 ペプチドアレイによる大豆 7S グロブリンのエピトープ解析

α' サブユニットの一次構造をもとに設計した合成ペプ

チドを結合させたアレイによって α' サブユニットのエピトープを解析した。エピトープは分子全体に分布しており、エクステンション領域およびコア領域ともに存在していた。IgE 抗体が結合する複数の領域が同定できた (Figs. 2-4)。 α' サブユニットのコア領域の構造情報と比較すると、⁸⁾エピトープ領域には β -ストランドや α -ヘリックスが含まれていた。落花生 7S グロブリンである Ara h 1 のエピトープと比較すると^{9,10)}、いくつかのエピトープについて、両タンパク質のアミノ酸配列をアライメントした場合に類似した部位に存在するものが見られた。

4. 考 察

大豆アレルギーについて正確に診断された患者血清を

用いて、 α' サブユニットのエピトープを見出した。落花生の 7S グロブリンである (Ara h 1) において報告されているエピトープと、立体構造上、類似した部位に存在するものが見られた。エピトープを立体構造に基づいて解析することにより、アレルギー症状に相関する立体構造が見出される可能性が示唆された。

5. 今後の課題

本研究において、大豆 7S グロブリンに対する合成ペプチドを用いて一次構造に基づくエピトープを解析した。今後、より多くの植物種について同様の解析がなされることにより、植物種子の塩可溶性タンパク質のアレルゲン性に寄与する構造が明確になるものと思われる。

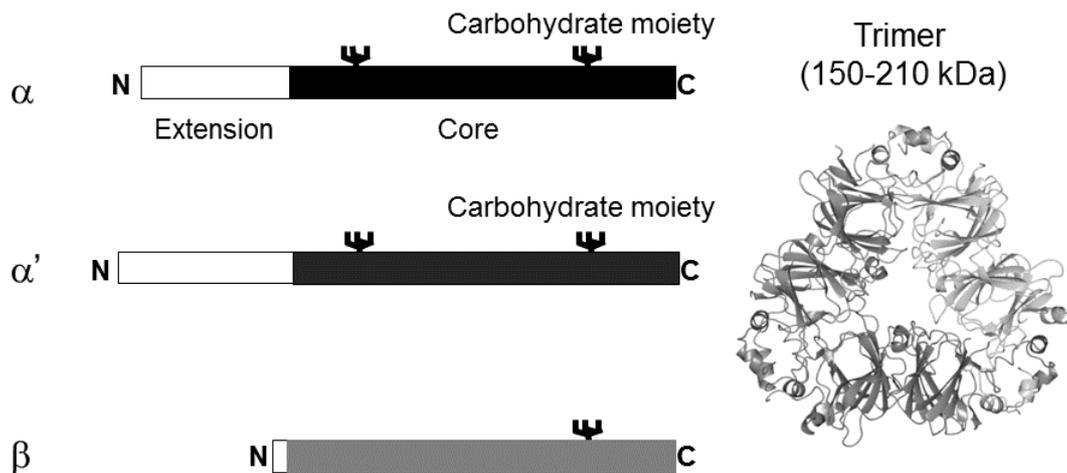


Fig. 1. Schematic structure of soybean 7S globulin

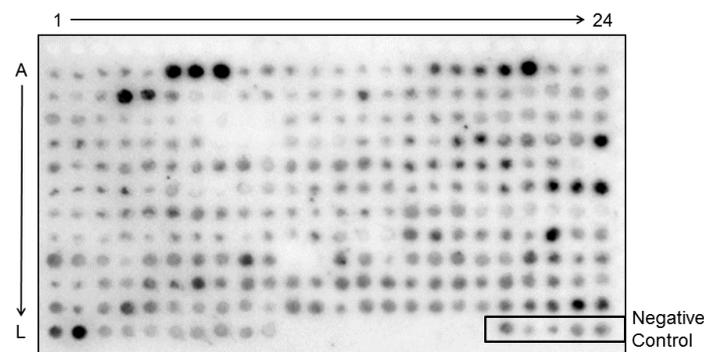


Fig. 2. Peptides of soybean 7S globulin reacted with patient's sera

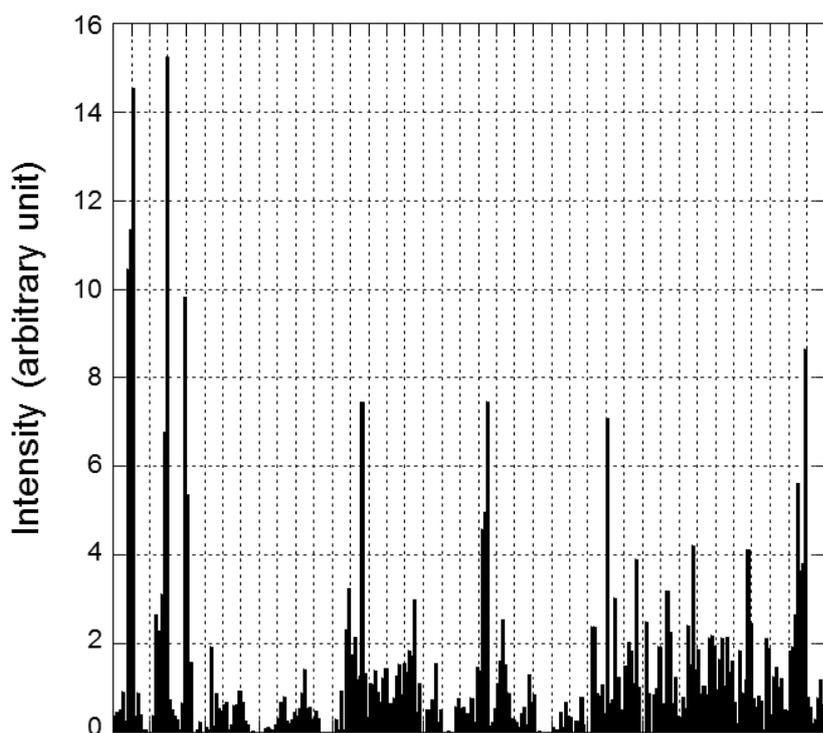


Fig. 3. Antigenic reactivity of peptides with patient's sera

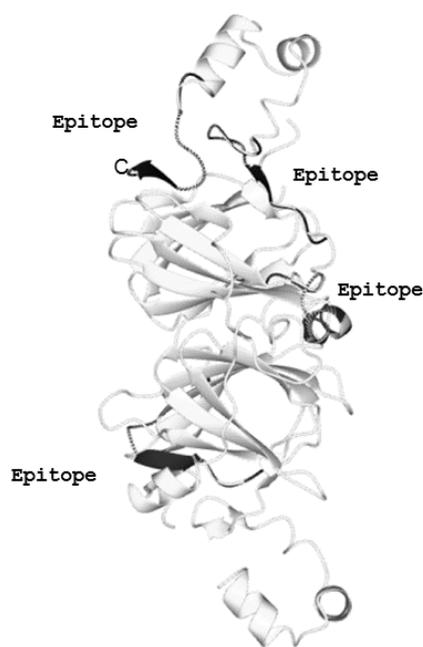


Fig. 4. Epitope of 7S globulin on the 3D structure

謝辞

本研究を遂行する上で、多大な研究助成金を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝の意を表します。

6. 文献

- 1) Osborne TB: The Vegetable Protein, Longmans Green and Co., 1924;154.
- 2) Fukutomi Y, Sjölander S, Nakazawa T, Borres MP, Ishii T, Nakayama S, Tanaka A, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakamura H, Akiyama K., Clinical relevance of IgE to recombinant Gly m 4 in the diagnosis of adult soybean allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:860-863.
- 3) Rihs HP, Chen Z, Ruëff F, Petersen A, Rozynek P, Heimann H, Baur X., IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):1293-301.
- 4) Ito K, Sjölander S, Sato S, Movérare R, Tanaka A, Söderström L, Borres M, Poorafshar M, Ebisawa M., 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;128(3):673-5.
- 5) Holzhauser T, Wackermann O, Ballmer-Weber BK, Bindslev-Jensen C, Scibilia J, Perono-Garoffo L, Utsumi S, Poulsen LK, Vieths S., Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy., *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(2):452-8.
- 6) Ebisawa M, Brostedt P, Sjölander S, Sato S, Borres MP, Ito K. Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(4):976-8.e1-5.
- 7) Maruyama N, Katsube T, Wada Y, Oh MH, Barba De La Rosa AP, Okuda E, Nakagawa S, Utsumi S., The roles of the N-linked glycans and extension regions of

- soybean beta-conglycinin in folding, assembly and structural features. *Eur J Biochem.* 1998;258(2):854-62.
- 8) Maruyama Y, Maruyama N, Mikami B, Utsumi S. Structure of the core region of the soybean beta-conglycinin alpha' subunit. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2004;60(Pt 2):289-97.
- 9) A.W. Burks, D. Shin, G. Cockrell, J.S. Stanley, R.M. Helm, G.A. Bannon., Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity., *Eur. J. Biochem.* 1997;245:334-339.
- 10) D.S. Shin, C.M. Compadre, S.J. Maleki, R.A. Kopper, H. Sampson, S.K. Huang, A.W. Burks, G.A. Bannon., Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein., *J. Biol. Chem.* 1998;273:13753-13759.

Analysis of Structures Related to Allergenicity of Salt-Soluble Proteins in Plant Seeds

Nobuyuki Maruyama

Kyoto University, Graduate School of Agriculture

Summary

Soybeans, although an essential element of food in regular diets, are also a major cause of food allergies. It is well-known that many patients with immediate-type hypersensitivity to soybeans are sensitive to 7S globulin and 11S globulin. 7S globulin is composed of multiple subunits; however, the differences in allergenicity among subunits and their relationship to structure are unknown. Therefore, the objectives of the present study were: to analyze the allergenicity of 7S globulin from soybeans at the subunit level; to analyze the epitope regions as well that contribute to allergenicity; and to obtain findings on salt-soluble soybean protein structures related to allergic symptoms.

Soybean 7S globulin consists of three subunits: α , α' , and β . In assessment of IgE antibody titers specific to patients' serum, a greater number of patients demonstrated reactivity to the α and α' subunits than to the β subunit. This result suggests that the α and α' subunits of 7S globulin are the major proteins which cause soybean allergies. Furthermore, the epitopes of the α' subunit were analyzed using an array in which a synthetic peptide based on the primary structure of the α' subunit was bound; this analysis demonstrated that epitopes are distributed throughout the molecule, including the extension region and the core region. When compared to epitopes in the peanut 7S globulin Ara h 1, several epitopes were present in the same positions of both proteins in the alignment. In the future, similar analyses of more plant species may aid in determining the plant seed salt-soluble protein structures that contribute to allergenicity.