



食物アレルギーの抗原タンパク質 ～これだけは知っておきたいQ&A～

○ 中村政志^{1,2},

下條尚志^{1,2}, 青木祐治^{1,2}, 佐藤奈由^{1,2}, 松永佳世子¹

1. 藤田医科大学 医学部 アレルギー疾患対策医療学
2. ホーユ株式会社 総合研究所

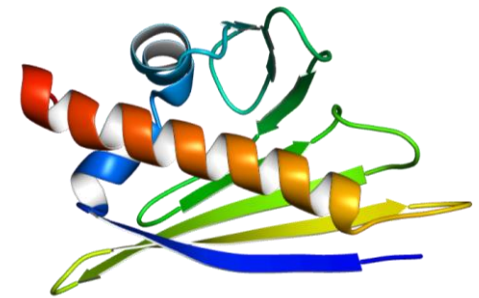


必須10のポイント

- ① タンパク質って何？
- ② 抗原タンパク質って何？
- ③ 植物由来の抗原タンパク質の種類は？
- ④ 動物由来の抗原タンパク質の種類は？
- ⑤ 抗原タンパク質はどうやって同定するの？
- ⑥ 既に多くの抗原タンパク質が報告されているのに、まだ抗原解析を行う必要があるの？
- ⑦ 抗原タンパク質は食物のどの部分にあるの？
- ⑧ ソバアレルギーは同じ釜で茹でたうどんでも本当に発症するの？
- ⑨ 調理・加工方法で抗原タンパク質の組成は変わるの？
- ⑩ 研究は楽しいですか？

Q1: タンパク質って何？

A: 極性・電荷が異なる側鎖を持った20種類のアミノ酸がペプチド結合で連結し、立体構造を形成し、糖鎖などの翻訳後修飾が付き、様々な機能性を示す分子です。



Bet v 1 (PR-10)

PDBJ(<https://pdbj.org/mine/summary/1btv>)

極性		非極性 (疎水性)
酸性 ASP GLU	中性 THR* ASN SER GLN	ILE* LEU* VAL* GLY PRO ALA
塩基性 LYS* HIS* ARG	芳香環 TYR	TRP* PHE*
	含硫 CYS	MET*

<https://bio.biopapyrus.jp/molecular-biology/aminoacid.html>

表2 ● タンパク質の構造

一次構造	アミノ酸の配列	NH_2 ————— COOH ポリペプチド鎖
二次構造	ペプチド鎖 (N-HとC=Oとの間) が水素結合を形成	NH_2 ————— COOH βシート構造 αヘリックス構造
三次構造	ポリペプチド鎖が折りたたまれ立体構造を形成	NH_2 ————— COOH (折りたたまれた鎖の立体構造)
四次構造	三次構造を形成しているサブユニットがさまざまな結合で結合し、タンパク質複合体を形成	一本のポリペプチド鎖 (サブユニット) NH_2 ————— COOH (複数のサブユニットの集合)

<https://www.nutri.co.jp/nutrition/keywords/ch2-3/keyword3/>

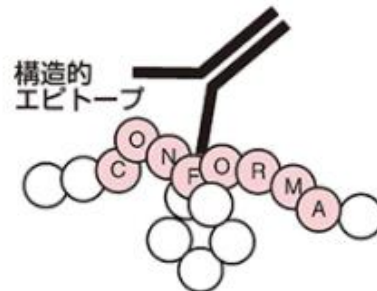
Q2: 抗原タンパク質って何？

A: IgE抗体が結合する対象となるタンパク質です。

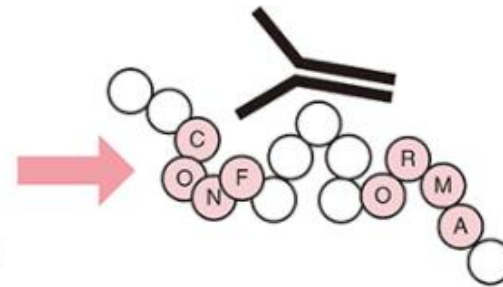
抗体が実際に結合するアミノ酸配列の領域をエピトープと呼び、連続性と構造的エピトープがあります。

QQFPQQQ (ω -5 gliadin) など
※ ペプチド合成できれば解析可

Arg5, Lys10, Glu29, Try30, His35, Gln38 (Hes b 6.02)
※ 解析が容易でない



構造的エピトープは連続性エピトープに比して熱変性および消化酵素の影響を受けやすい



Q3: 植物由来の抗原タンパク質の種類は？

A: 植物由来では、6割以上が4つのタンパク質ファミリーに属するという報告があります。

■ 表5-2 植物性食物アレルギータンパク質スーパーファミリーの特徴

植物性食物アレルギータンパク質ファミリー	プロラミン			クーピン	PR-10	プロフィリン
	LTP	2Sアルブミン	α -アミラーゼ/トリプシンインヒビター			
分子量(kDa)	6~13	10~15	12~16	40~80 (7Sグロブリン) 300~450 (11Sグロブリン)	17~18	13~15
タンパク質構造の特徴	ジスルフィド架橋により4つの α -ヘリックスが結合して三次構造を形成し、中心に脂質結合する空間を持つ			β -バレル構造多量体を形成	植物ステロイドを結合する疎水ポケットを持つ β -バレル構造	α -ヘリックスと β -シートを含む球状構造
熱消化への耐性	非常に安定	安定	安定	安定	加熱によって低アレルギー化されやすい	比較的安定
溶解性	疎水性	水溶性	水溶性	塩溶性	水溶性	水溶性
生物種	果物・種子類	種子類	穀物	種子類	果物	果物
アレルギー症状への関与	即時型アレルギー、アナフィラキシー	即時型アレルギー、アナフィラキシー	小麦によるパン職人喘息	即時型アレルギー、アナフィラキシー	バラ科果物のOAS	限定的(一部の患者に限られている)
その他	モモやリンゴでは外表皮組織に存在					植物間で広汎な交差抗原性に関与

LTP：脂質輸送タンパク質、OAS：口腔アレルギー症候群

感作したタンパク質の種類によって、熱安定性や症状の出方(病態)が異なる傾向があります。

Q4: 動物由来の抗原タンパク質の種類は？

A: 動物由来では、トロポミオシン、バルブアルブミン、カゼインの3つのタンパク質ファミリーに属すと報告されています。

■ 表5-3 動物性食物アレルギータンパク質スーパーファミリーの特徴

動物性食物アレルギータンパク質ファミリー	トロポミオシン	バルブアルブミン	カゼイン	リボカリン
分子量(kDa)	35	12	19~25	16~20
タンパク質の特徴	α -ヘリックス構造のサブユニット2本がよじれあってアクチンに巻きついている	EF-handを特徴とするCa ²⁺ 結合性の酸性タンパク質	牛乳中にカルシウム-カゼイン-リン酸複合体の形で存在	8つの逆平行鎖 β -バレルが折り畳まれた中に一つのリガンド結合部位を持った構造を持つ
熱消化への耐性	非常に安定	非常に安定	非常に安定	不安定
溶解性	水溶性	水溶性	水溶性	水溶性
生物種	すべての動物	脊椎動物	哺乳類	グラム陰性菌から動植物まで幅広く存在

ただし、これらの抗原タンパク質種だけでは理解できない症例も少なくありません。

Q5: 抗原タンパク質はどうやって同定するの？

A: 免疫ブロット、質量分析、抗原性確認の工程で行われます。

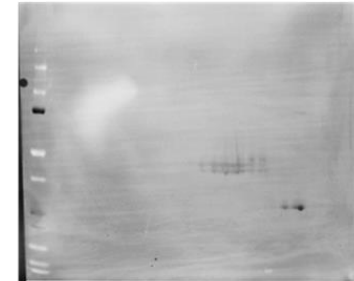
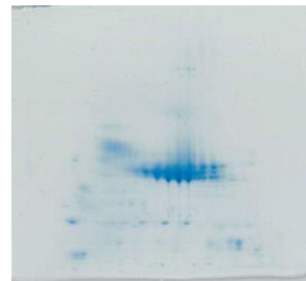
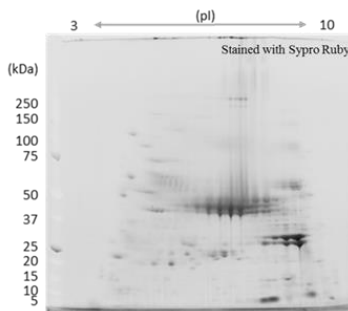
私たちの解析方法概要

① タンパク質を抽出

② 2D-PAGEで丁寧に分離

③ PVDF膜に転写

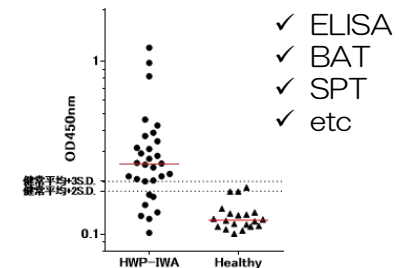
④ 血清を当てたのち
IgE抗体を検出



④ 各スポットの濃度を数値化
臨床情報との相関解析

⑤ 抗原タンパク質の同定
(質量分析・データベース解析)

⑥ 精製タンパク質で検証
Glutenin, low molecular weight subunit 1D1

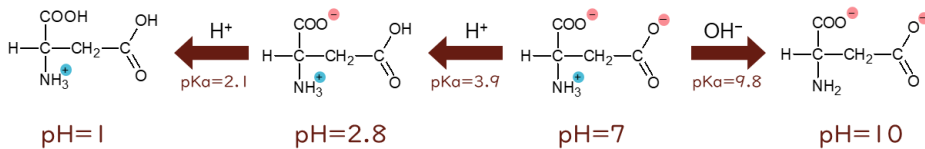


タンパク質の“分子量”と“等電点”

- アミノ酸は個々に分子量が異なり、カルボキシル基とアミノ基、種類によって側鎖にもイオン性の官能基を持つ。
- よって、大量のアミノ酸から構成されるタンパク質においては、分子量や等電点が全く一致することはほぼない。

等電点 (pI)

分子中の正電荷と負電荷が等しくなるpHが等電点

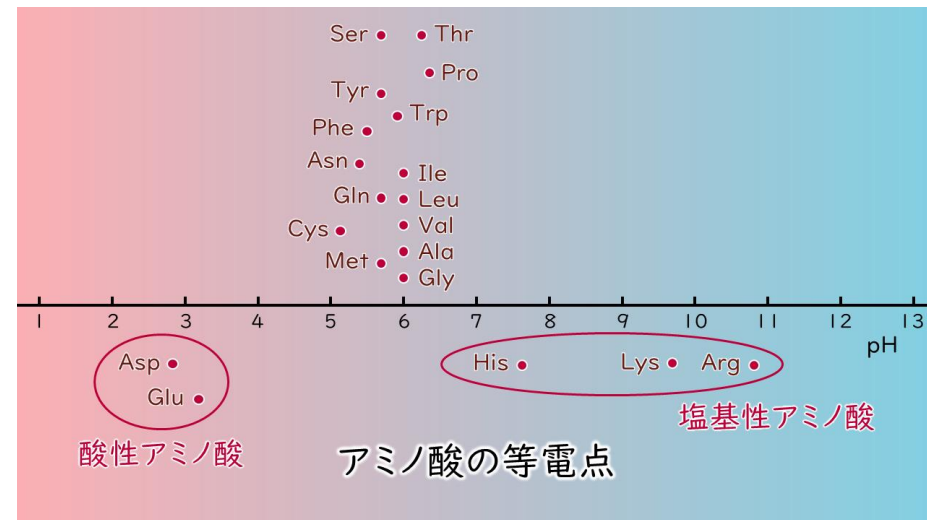


高

水素イオン濃度

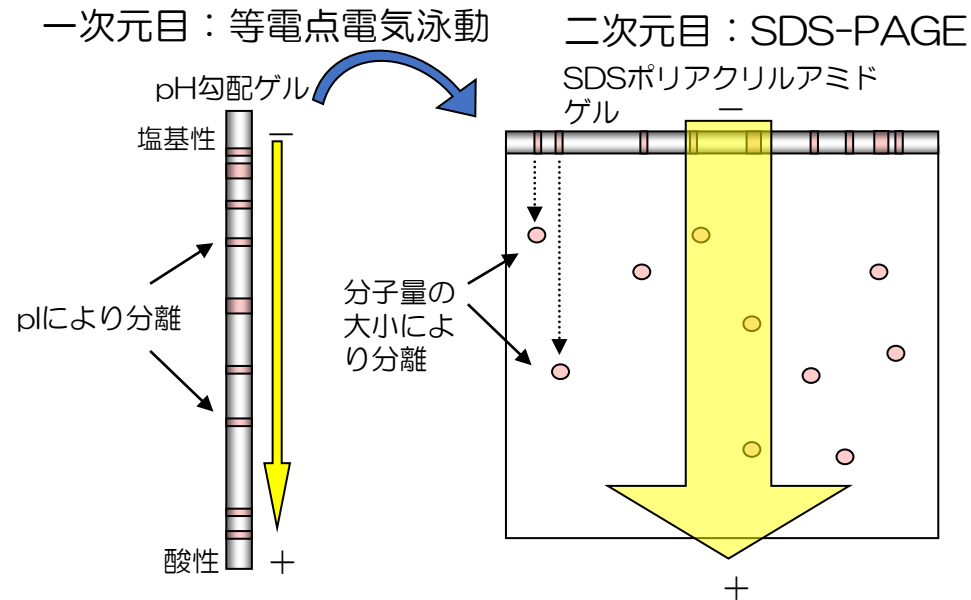
低

等電点 (アスパラギン酸)



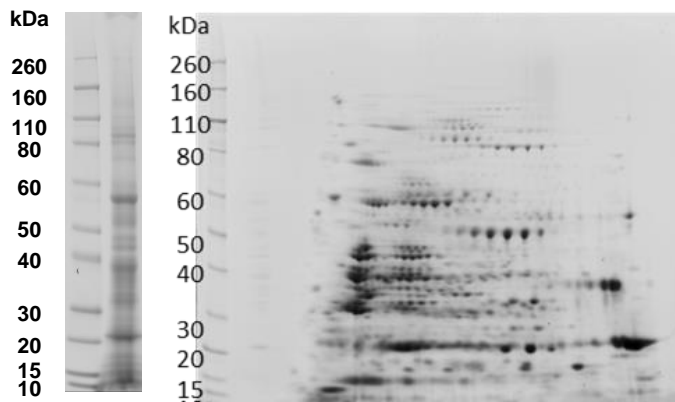
抗原タンパク質の網羅的探索

- タンパク質固有の“分子量”と“等電点”の性質で分離することで、抗原タンパク質の単離が可能。
- 抗原解析には二次元電気泳動と免疫ブロットの組み合わせが有用である。



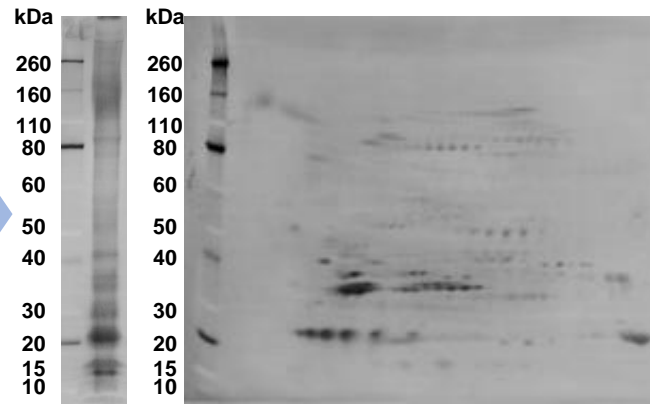
1D-PAGE

2D-PAGE



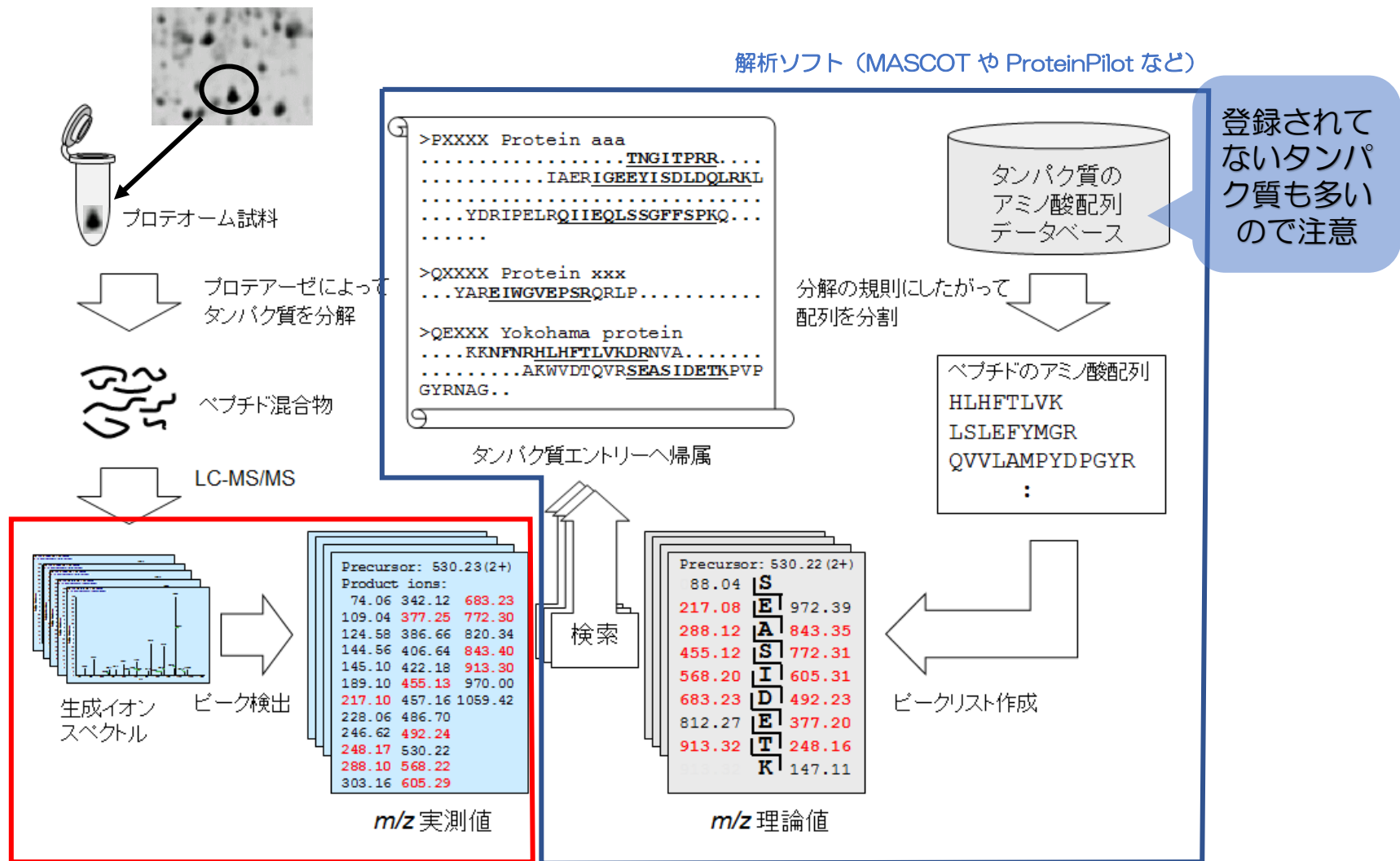
1D-WB

2D-WB



SDS-PAGE上の1つのバンドには、実際には複数のタンパク質が含まれている。

質量分析によるタンパク質の同定



質量分析装置 (TripleTOF 6600など)

精製タンパク質での抗原性検証

- 大腸菌等でリコンビナントタンパク質を合成、粗抽出物から抗体カラムなどで精製することで、該当のタンパク質を高純度に用意し、ELISA等でIgE抗体の反応性を評価、検証する。

発現系	大腸菌	酵母	昆虫細胞	動物細胞
特徴	<ul style="list-style-type: none"> コストが安い 不溶性タンパク質になりやすい 古くから研究されているので条件豊富 大量発現が可能 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞壁破砕が必要 操作が煩雑 大量発現が可能 	<ul style="list-style-type: none"> バキュロウイルスを使用 可溶性タンパク質が得られる ある程度の発現が可能 	<ul style="list-style-type: none"> 活性のあるタンパク質が得られる フォールディングが適切 コストが高いため、大量発現は困難
修飾	翻訳後修飾がほとんど起こらない	翻訳後修飾に問題あり 動物細胞に近い	糖鎖付加、リン酸化、アミド化等の修飾も起こる ただし、翻訳後修飾に問題があることもある	翻訳後修飾が起こる 糖タンパクの発現等に適する

大腸菌の発現系では抗原性が低い（もしくはない）場合も散見される。

- 立体構造？
- 翻訳後修飾？

検証は慎重に

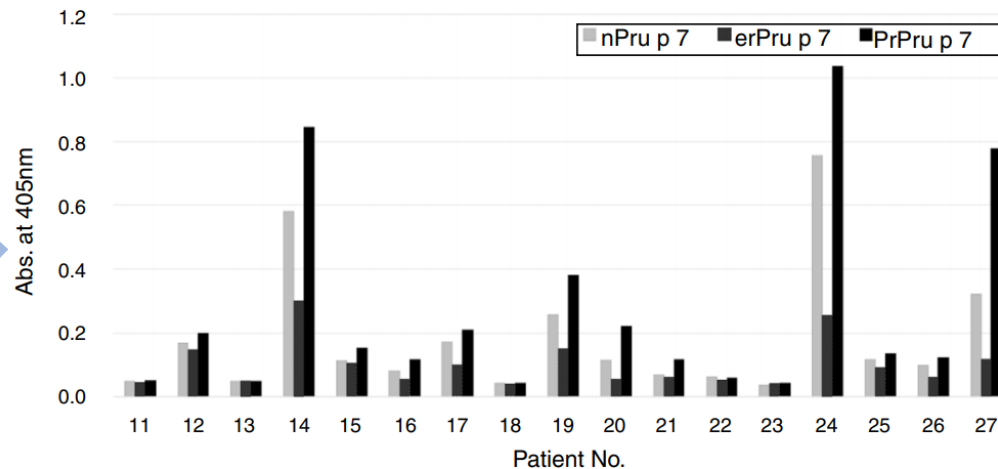


Figure 5 Reactivity of patients' IgE to natural and recombinant Pru p 7 in ELISA.

IgE in the sera of the systemic group (No. 11–27 in Table 1) was determined by ELISA with nPru p 7, erPru p 7, prPru p 7.

Q6: 既に多くの抗原タンパク質が報告されているのに、まだ抗原解析を行う必要があるの？

A: 既存のIgE検査薬では、偽陽性や偽陰性が多く、感度や特異度に問題がある事例が散見されます。

＜エビアレルギーの検査感度比較＞

	項目	結果	症例数	感度
プリックテスト	エビ	陽性	26	90%
		陰性	3	
特異的IgE抗体検査 (CAP-FEIA)	エビ粗抗原	陽性	11	38%
		陰性	18	
	エビトロポミオシン (Pen a 1)	陽性	2	7%
		陰性	27	

第1回 日本アレルギー学会 東海地方会で発表した資料から抜粋

解決策のひとつは、新たなアレルゲンコンポーネント検査法の確立であると考え、様々なアレルギーの抗原解析を行っています。

大豆の抗原タンパク質

- Gly m 4 は花粉-食物アレルギー症候群の原因抗原、Gly m 8 は小児の即時型大豆アレルギーとの関連が報告されている。

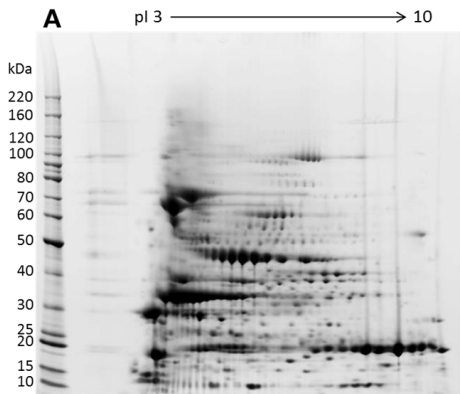
■ 表5-5 主な大豆アレルゲン

タンパク質	アレルゲン	分子量 (kDa)	関連する病型
疎水性種子タンパク質 (LTP)	Gly m 1	7	大豆穀粉塵の吸入性アレルゲン
ディフェンシン	Gly m 2	8	
プロフィリン	Gly m 3	14	
PR-10 (Bet v 1 ホモログ)	Gly m 4	17	OAS
貯蔵タンパク質 (7Sグロブリン)	Gly m 5	48~65	即時型アレルギー
貯蔵タンパク質 (11Sグロブリン)	Gly m 6	52~61	即時型アレルギー
種子特異的ビオチン化タンパク質	Gly m 7	76	
貯蔵タンパク質 (2Sアルブミン)	Gly m 8	12	即時型アレルギー

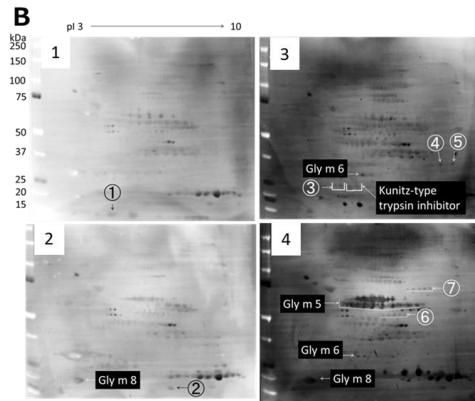
食物アレルギー診療ガイドライン2016 https://www.jspaci.jp/allergy_2016/index.html



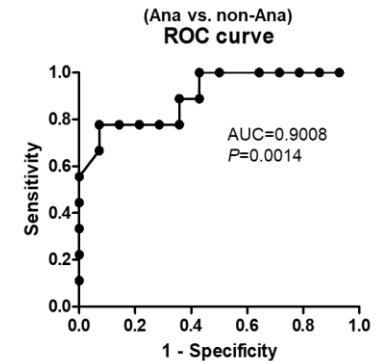
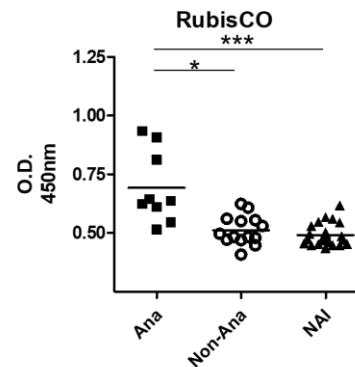
2D-PAGE



Immunoblot in patients



重症大豆アレルギーの抗原「RubisCO」を同定



小麦の抗原タンパク質

- 多くのアレルゲンコンポーネントが存在し、それぞれが異なる病態に関与すると報告されている

■ 表5-4 主な小麦アレルゲン

タンパク質	アレルゲン	分子量 (kDa)	関連する病型
水・塩溶性タンパク質			
α -アミラーゼ/トリプシンインヒビター	Tri a 15, 28, 29, 30	13~16	パン職人喘息
アシル-CoAオキシダーゼ			
ペルオキシダーゼ		36	
脂質輸送タンパク質 (LTP)	Tri a 14	9	
水・塩不溶性タンパク質 (グルテン)			
グリアジン (アルコール可溶性)			
α -グリアジン	Tri a 21		HWPEIA
β -グリアジン			
γ -グリアジン	Tri a 20	35~38	
ω -5グリアジン	Tri a 19	65	An, WDEIA
グルテニン (アルコール不溶性)			
高分子量グルテニン	Tri a 26	88	An, WDEIA
低分子量グルテニン	Tri a 36	40	An, WDEIA

HWPEIA : hydrolyzed wheat protein exercise-induced anaphylaxis

WDEIA : wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis

An : anaphylaxis

種子類の抗原タンパク質

- 種子類では、生物学的分類上はかけ離れたもの同士でも交差抗原性が認められることがあり、コンポーネントレベルでの理解が重要になってくる。

■ 表5-7 種子類の主なアレルゲン

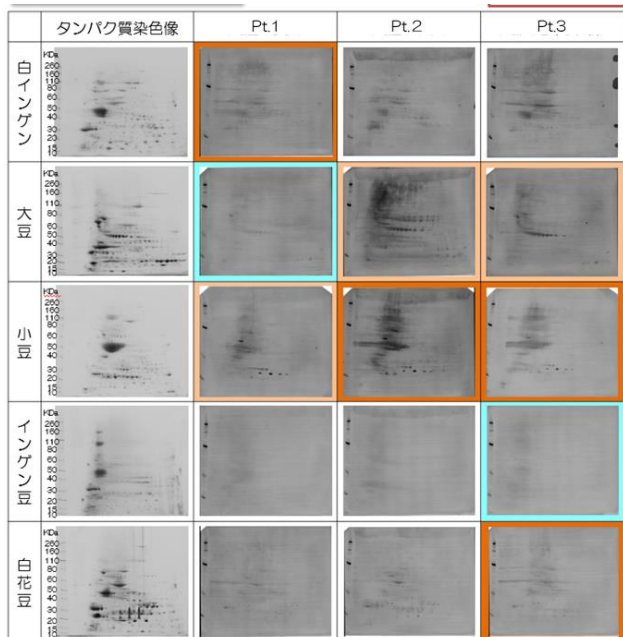
ナッツ名	学名	プロラミン		クーピン		PR-10	プロフィリン	オレオシン
		LTP	2Sアルブミン	7Sグロブリン	11Sグロブリン			
ピーナッツ	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 9 Ara h 16 Ara h 17	Ara h 2 Ara h 6 Ara h 7	Ara h 1	Ara h 3	Ara h 8	Ara h 5	Ara h 10 Ara h 11 Ara h 14 Ara h 15
大豆	<i>Glycine max</i>	Gly m 1	Gly m 8	Gly m 5	Gly m 6	Gly m 4	Gly m 3	
ブラジルナッツ	<i>Bertholletia Excelsa</i>		Ber e 1		Ber e 2			
ピスタチオ	<i>Pistacia vera</i>		Pis v 1	Pis v 3	Pis v 2 Pis v 5			
カシューナッツ	<i>Anacardium occidentale</i>		Ana o 3	Ana o 1	Ana o 2		Ana o Profilin	
クルミ	<i>Juglans regia</i>	Jug r 3	Jug r 1	Jug r 2	Jug r 4	Jug r 5		
	<i>Juglans nigra</i>		Jug n 1	Jug n 2				
ヘカナンナッツ	<i>Carya illinoensis</i>		Car i 1	Car i 2	Car i 4			
ヘーゼルナッツ	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 8	Cor a 14	Cor a 11	Cor a 9	Cor a 1	Cor a 2	Cor a 12 Cor a 13
アーモンド	<i>Prunus dulcis</i>	Pru du 3			Pru du 6		Pru du 4	
ゴマ	<i>Sesamum indicum</i>		Ses i 1 Ses i 2	Ses i 3	Ses i 6 Ses i 7			Ses i 4 Ses i 5

食物アレルギー診療ガイドライン2016 https://www.jspaci.jp/allergy_2016/index.html



佐藤奈由 客員助教

- 7S, 11S globulinを中心に交差反応を示す
- 感作抗原は症例により異なる



果物・野菜の抗原タンパク質

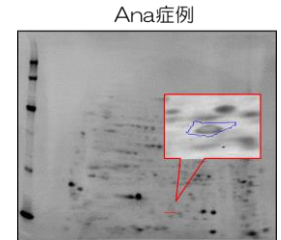
- 果物・野菜で同定されているアレルゲンの多くはPR-10、プロフィリンであり、主に口腔アレルギー症状を示す。一方、全身症状を示した症例では、GRP感作が複数報告されている。

■ 表5-8 果物・野菜の生物学的分類と主なアレルゲン

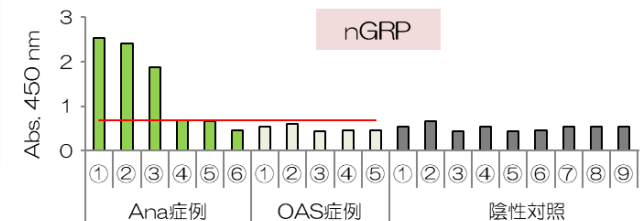
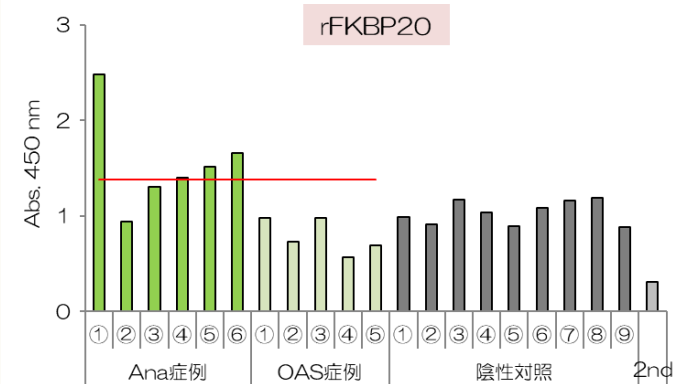
果物野菜名	学名	綱	目	科	アレルゲン		
					LTP	PR-10	プロフィリン
リンゴ	<i>Malus domestica</i>	真正双子葉	バラ	バラ	Mal d 3	Mal d 1	Mal d 4
サクランボ	<i>Prunus avium</i>				Pru av 3	Pru av 1	Pru av 4
アンズ	<i>Prunus armeniaca</i>				Pru ar 3	Pru ar 1	
ナシ	<i>Pyrus communis</i>				Pyr c 3	Pyr c 1	Pyr c 4
モモ	<i>Prunus persica</i>				Pru p 3	Pru p 1	Pru p 4
イチゴ	<i>Fragaria ananassa</i>				Fra a 3	Fra a 1	Fra a 4
セロリ	<i>Apium graveolens</i>				セリ	セリ	Api g 2 Api g 6
ニンジン	<i>Daucus carota</i>		Dau c 1	Dau c 4			
キウイフルーツ	<i>Actinidia deliciosa</i>	ツツジ	マタビ	Act d 10	Act d 8	Act d 9	
ブドウ	<i>Vitis vinifera</i>	ブドウ	ブドウ	Vit v 1			
大豆	<i>Glycine max</i>	マメ	マメ	Gly m 1	Gly m 4	Gly m 3	
オレンジ	<i>Citrus sinensis</i>	ムクロジ	ミカン	Cit s 3		Cit s 2	
トマト	<i>Solanum lycopersicum</i>	双子葉植物	ナス	ナス	Sola l 3 Sola l 6 Sola l 7	Sola l 4	Sola l 1
レタス	<i>Lactuca sativa</i>		キク	キク	Lac s 1		
キャベツ	<i>Brassica oleracea</i>		フラチョウソウ	アブラナ	Bra o 3		
メロン	<i>Cucumis melo</i>		スマレ	ウリ			Cuc m 2
バナナ	<i>Musa acuminata</i>	単子葉植物	ショウガ	バショウ	Mus a 3		Mus a 1



下條尚志 客員准教授



桃アレルギーの全身症状の新規抗原「FKBP」を同定



鶏卵の抗原タンパク質

- 卵白の主なアレルゲンは、オボムコイドとオボアルブミンである。オボムコイドは加熱によって変性しにくい性質を持つ。

■ 表5-9 主な鶏卵（卵白）アレルゲン

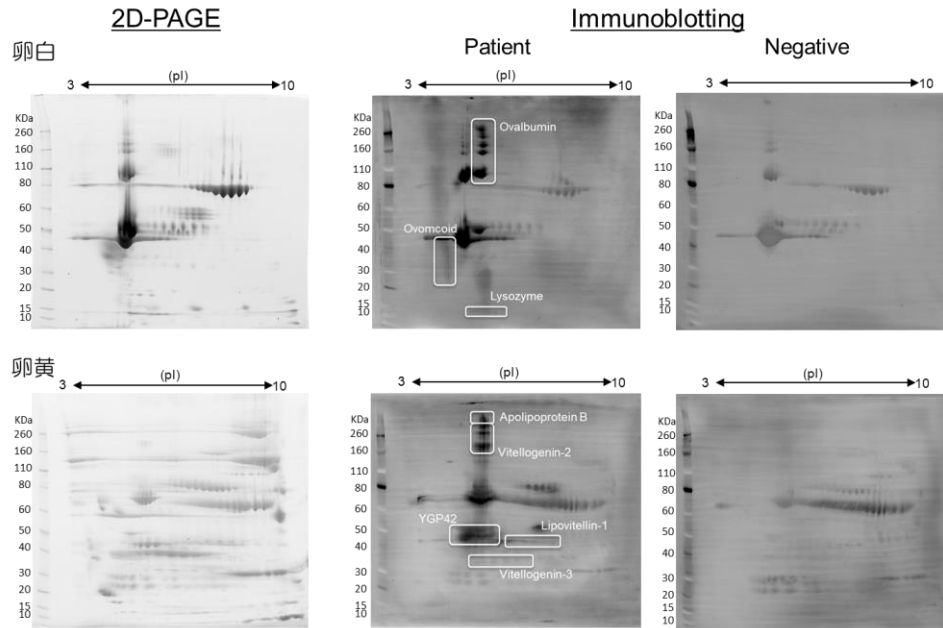
タンパク質	アレルゲン	含有量 (%)	分子量 (kDa)	機能	アレルゲン性
オボムコイド	Gal d 1	11	28	トリプシンインヒビター	+++
オボアルブミン	Gal d 2	54	44	セリンプロテアーゼインヒビター	++
オボトランスフェリン (コンアルブミン)	Gal d 3	12	78	鉄結合	+
リゾチーム	Gal d 4	3~4	14	ムコ多糖類加水分解作用 抗炎症・抗感染作用	+

食物アレルギー診療ガイドライン2016 https://www.jspaci.jp/allergy_2016/index.html



青木祐治 客員助教

- 卵白だけでなく、卵黄のタンパク質に感作している例も多い
- 卵による消化管アレルギーの場合、卵黄にも注意



牛乳の抗原タンパク質

- 主なアレルゲンは、カゼインとβ-ラクトグロブリンである。

■ 表5-10 主な牛乳アレルゲン

タンパク質	アレルゲン	含有量(%)	分子量(kDa)	アレルゲン性
カゼイン	Bos d 8	80	20~30	+++
α _{s1} -カゼイン	Bos d 9	30	23.6	
α _{s2} -カゼイン	Bos d 10	9	25.2	
β-カゼイン	Bos d 11	29	24	
κ-カゼイン	Bos d 12	10	19	
血清タンパク質		20		
α-ラクトアルブミン	Bos d 4	4	14.2	+
β-ラクトグロブリン	Bos d 5	10	18.3	++
血清アルブミン	Bos d 6	1	67	+
免疫グロブリン	Bos d 7	2	160	+

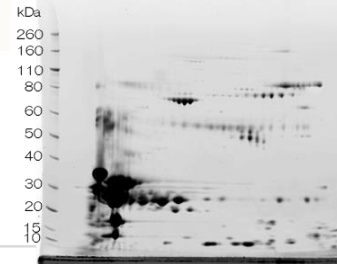


青木祐治 客員助教

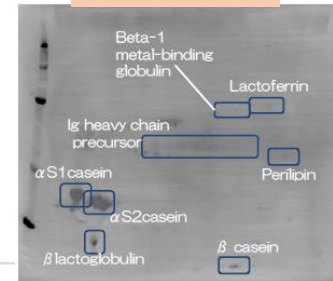
- 19種の抗原を同定
- ラクトフェリンは予後不良のマーカーか

食物アレルギー診療ガイドライン2016 https://www.jspaci.jp/allergy_2016/index.html

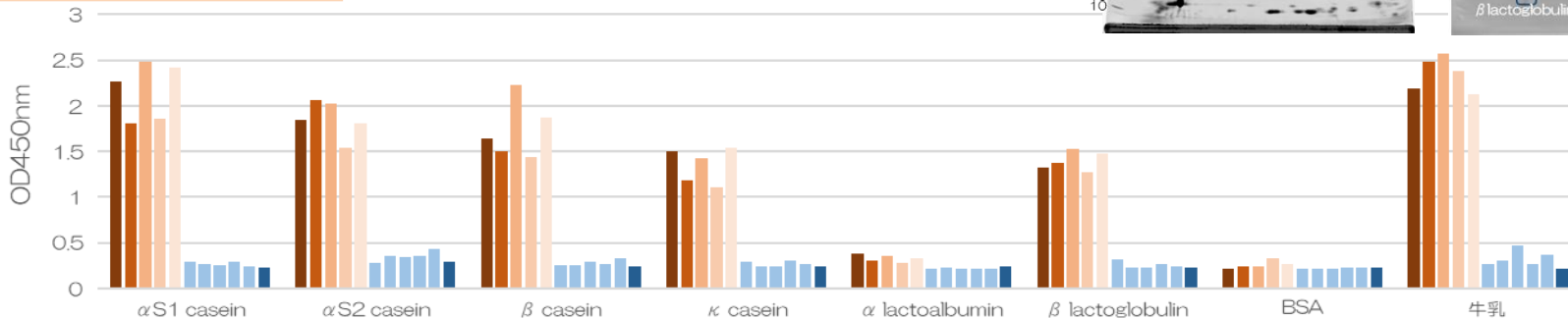
タンパク質の染色像



免疫プロット像

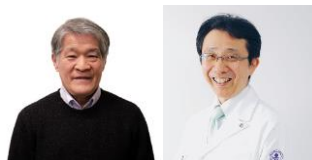


ELISAの結果



Q7: 抗原タンパク質は食物のどの部分にあるの？

<桃の場合>



成田宏史 教授 近藤康人 教授
(京都栄養医療専門学校)

LTP
は皮



GRPは
身

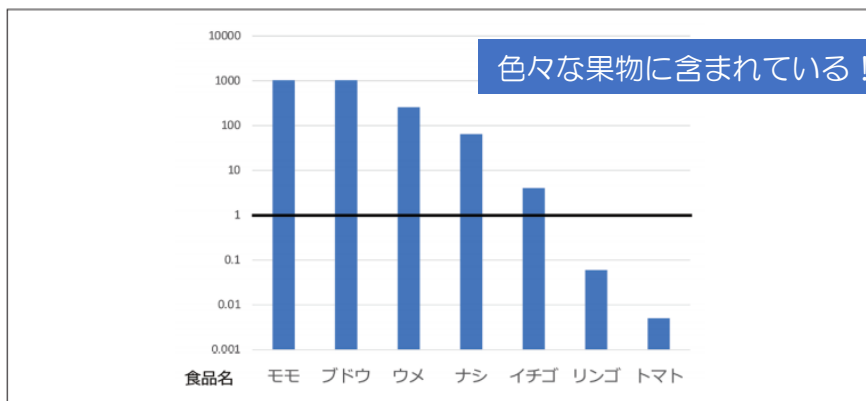
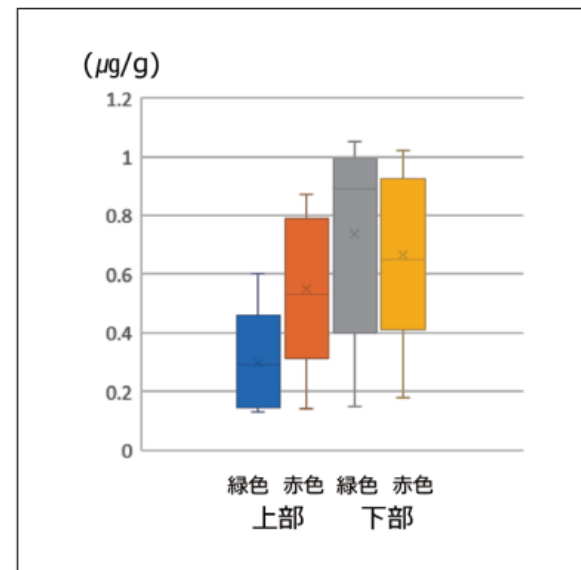
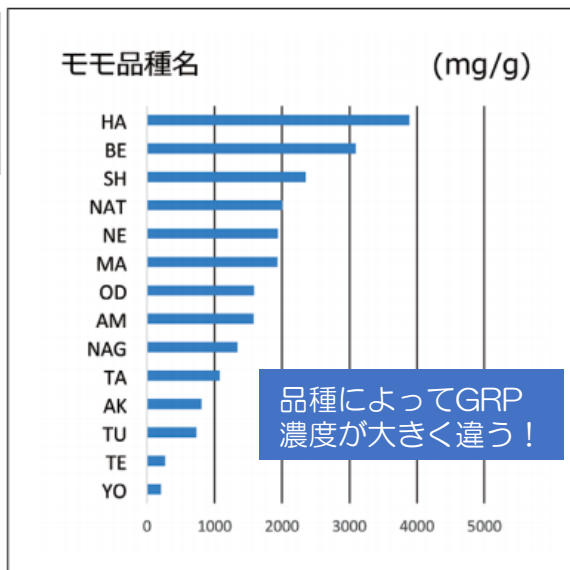
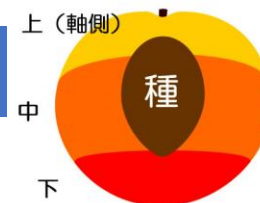


図2 Aによるモモ GRP 量の品種間比較が大きく異なっていた

図3 モモ部位別 GRP 定量
モモは下部(萼から遠い)ほど濃度が濃く、また、表面が緑色から赤色に熟している部位で濃度が濃くなる

下の方(甘い方)がGRP濃度が高い



これは果物ナビが独自に糖度を計測して作成したものです

おいしい桃の選び方・見分け方 実際に食べた結果 (kudamononavi.com)

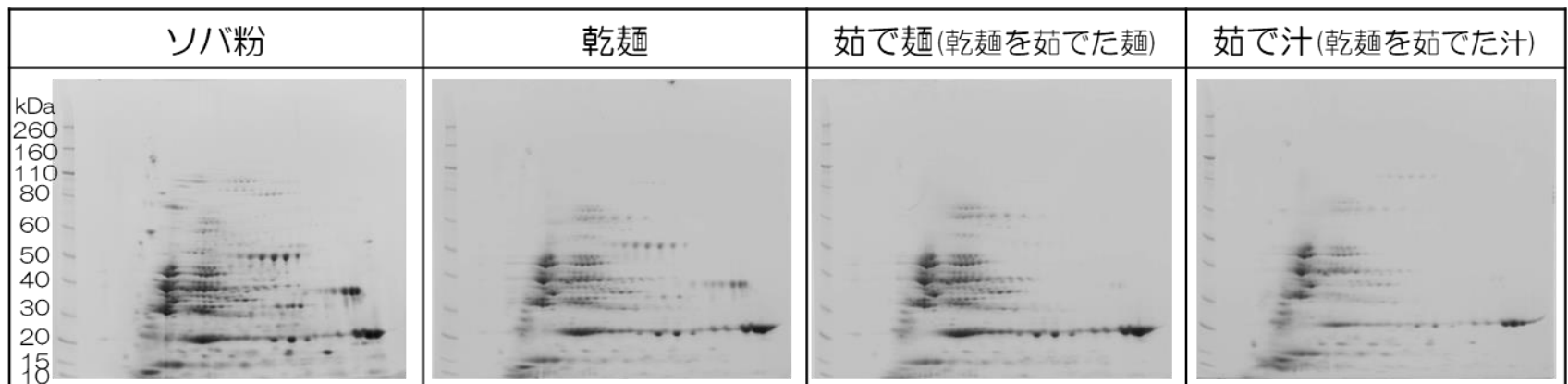
図4 リアルタイムPCRによる種類別完熟果肉あたりのGRP量の比較
モモでの発現量が一番高く、以下ブドウ、ウメ、ナシ、イチゴ、リンゴ、トマトの順に低くなることが判明した
(Actinを1としたときの発現量比)

Q8: ソバアレルギーは同じ釜で茹でたうどんでも本当に発症するの？

A: 茹で汁にも、比較的高い濃度で麺と同じ組成のタンパク質が含まれていますので、茹で汁も危険です。



<調理過程におけるソバタンパク質の評価>



タンパク質濃度

6.9mg/ml

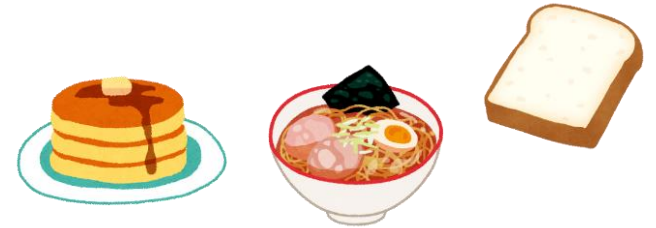
2.0mg/ml

2.1mg/ml

0.3mg/ml

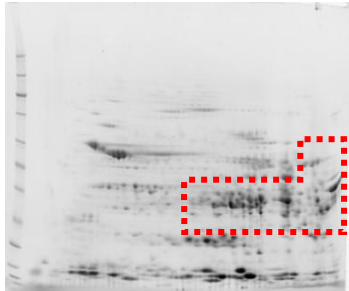
Q9: 調理・加工方法で抗原タンパク質の組成は変わるの？

A: 変わる可能性があります。

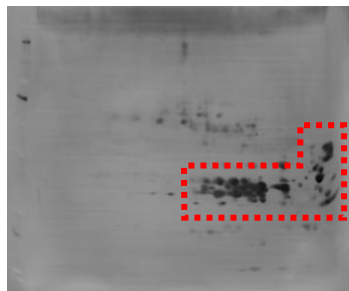


＜小麦製品の種類別タンパク質組成＞

小麦粉の2D-PAGE



WDEIAの免疫プロット



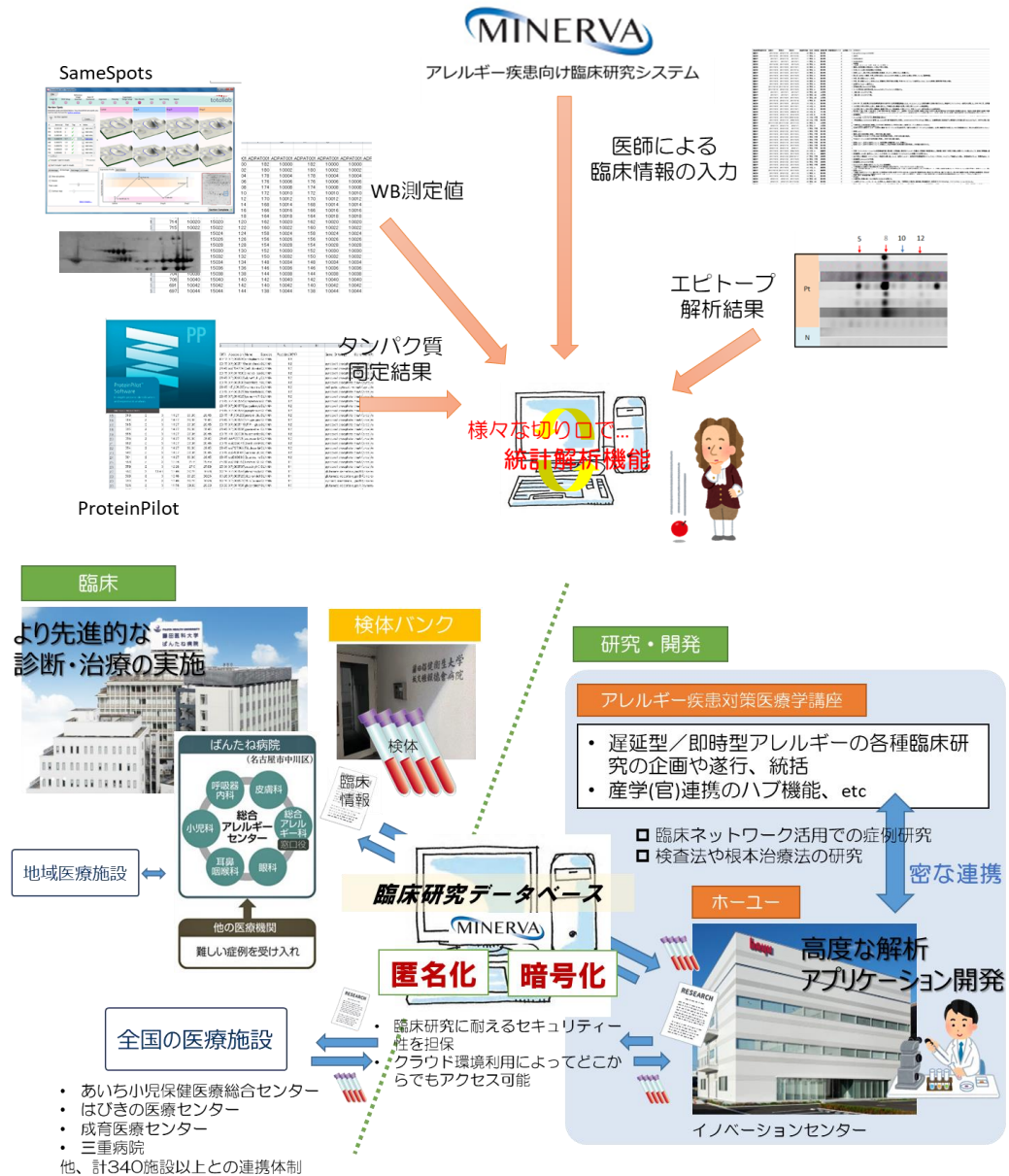
	ラーメン1 (ノンフライ)	ラーメン2 (ノンフライ)	ラーメン3 (フライ)	ラーメン4 (フライ)
ラーメン1 (ノンフライ)				
	ホットケーキ	パスタ	うどん	食パン
ホットケーキ				

Q10: 研究は楽しいですか？

A: 楽しいです。研究することで医療現場の課題が解決され、診療に貢献できた時はとてもうれしく感じます。

- 私のアレルギー研究人生において、最も大きな影響を与えたこと、それは、全国の先生方と一丸となって取り組んだ「茶のしずく石鹼の事例」でした。
- 日本アレルギー学会の特別委員会に参加させていただき、疫学調査、検査法確立、関連遺伝子解析など、未知を既知に変えていき、それを迅速に医療現場に還元し、改善していくという活動は、（言葉は悪いですが）とても刺激的で楽しかったと思います。
- 一方で、原因不明のアナフィラキシーを繰り返し、何度も病院に搬送されてくる患者さん達を目の当たりにし、アレルギー疾患対策の未成熟さを強く感じていました。
- 現状を変えなければいけない、アレルギー疾患対策にもっと貢献したい、そのために何ができるのかを考えてきました。

- 2015年4月、藤田医科大学にアレルギー疾患対策医療学講座（ホーユー寄附講座）が開設されました。
- より効果的・効率的に研究を遂行するため、臨床研究データベース(MINERVA)を構築しました。
- 2016年9月、最先端のアレルギー設備を整えた研究所（イノベーションセンター（ホーユー））を開設しました。
- 藤田医科大学総合アレルギーセンター、そして全国の医療機関や研究機関の先生方とともに、「アレルギー疾患に苦しめない社会の実現」を目指し、さらに研究を進めてまいります。



謝辞

臨床（成人）

ホーユ株式会社
総合研究所 先端技術研究室

- 北野宏樹
- 安田隆宏
- 大野史晃
- 酒井智美
- 鶴見侑大
- 佐藤美希

抗原解析



GRP

学校法人大和学園
京都栄養医療専門学校 管理栄養士科

- 成田宏史 教授
- 京都女子大学 家政学部 食物栄養学科
- 門間敬子 教授

藤田医科大学 医学部
総合アレルギー科

- 矢上晶子 教授
 - 鈴木加余子 准教授
 - 二村恭子 講師
- 小児科
- 近藤康人 教授
 - 森雄司 助教

臨床（小児）

あいち小児保健医療総合センター
免疫・アレルギーセンター アレルギー科

- 伊藤浩明 センター長
- 松井照明 医長

東京工業大学 生命理工学院

- 林宣宏 准教授 Proteomics

岐阜大学 化学・生命工学科

- 大野敏 准教授 精製抗原

岐阜薬科大学 薬学部

- 田中宏幸 准教授 感受性

総合アレルギーセンターの先生方



ここに記載しきれない多くの先生のご協力に感謝申し上げます。