

ベースの一つであると思われる⁹⁾。ADFSの全アレルギーデータをこのデータベースと比較することにより、より精度の高いデータセットを確保することができれば、ADFSの高度なインターフェイスがさらに活かされることであろう。我々は本年2月に、AllergenOnlineの運営に関与している国際団体(ILSI-HESI)の担当者と接触する機会を得、両アレルギーデータベースの比較を行なうことに合意した。来年度以降は、AllergenOnlineのデータを参照し、ADFSの信頼性向上に努めたいと考える。

E. 結論

(1) 高トリプトファン含有遺伝子組換えイネを用いたアレルギー性試験

高トリプトファン含有遺伝子組換えイネと非組換えイネ(玄米)抽出タンパク質とコメアレルギー患者血清との反応性には、顕著な変化はみられなかった。広くコメのアレルゲンとして知られる主要アレルゲンであるRAG2 (14kD), Glyoxalase 1 (33kD)についてポリクローナル抗体との反応性から組換えに伴う量的、質的変動はみられず、コメアレルギー患者血清IgEと反応するタンパク質もGM, non-GM間で大きな差はみられなかった。

(2) 動物を用いるアレルギー性の検討

BALB/cマウスを用いる経口感作の方法について検討を行い、溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。本動物モデルは組換え蛋白質のアレルギー惹起性の変化の有無を調べるために有効であることが、GMコメ、nonGMコメを用いた研究から示された。

また、消化管を主要な反応の場とする本動物モデルのアレルギー発症機序を解明することは、食物アレルギーの発症機構の解明にもつながると考えられる。

(3) アレルゲン予測の解析法では、

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法 - 既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスとタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)B因子を用いたアレルゲンエピトープ予測法の検討を行った。

(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルギーデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新作業を行った。新たに9種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、キーワード検索機能の強化、タンパク質の相同性検索ツールにPSI-BLASTの追加、アレルゲンの糖鎖修飾の有無の検索機能の追加を行った。

F. 参考文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/codex/codex.html>
- 2) <http://www.allergen.org/>
- 3) <http://fermi.utmb.edu/SDAP/>
- 4) <http://www.expasy.org/cgi-bin/lists?allergen.txt>
- 5) <http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>
- 6) van Ree, R., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 129:189-197 (2002)
- 7) Altschul, S.F., et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)
- 8) Sampson, H., *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 113: 805-819 (2004)
- 9) <http://www.allergenonline.com/>

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 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 buckwheat.* *Biol. Pharm. Bull.* In press (2008)
- 2) 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面善之、小島幸一、手島玲子：経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル、*秦野研究所年譜* 30, 9-16 (2007)
- 3) 手島玲子：遺伝子組換え農作物の食品としての安全性評価技術、*農林水産技術研究ジャーナル* 30(9), 22-27 (2007)

2. 学会発表

- 1) 朝川直行、手島玲子、美宅成樹：アレルゲンタンパク質の頻出する配列領域の特徴、第7回日本蛋白質科学会年会(2007.5)
- 2) 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面喜之、小島幸一、手島玲子：経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(6)、第14回免疫毒性学会(2007.9)
- 3) 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、佐藤雄嗣、穂山浩、澤田純一：食物アレルゲン(オボムコイド)のマウス経口感作への油脂の影響について、第14回免疫毒性学会(2007.9)
- 4) Teshima R., Nakamura R: Development of allergen database for food safety (ADFS), HESI new methods workshop (2007, 10)

- 5) Teshima R. : GMO safety-assessment in Japan. International symposium on genetically modified organisms. (2007.10)
- 6) 中村里香、手島玲子、佐藤里絵、中島紫、川崎ナナ、山口照英、澤田純一、名古屋博之 : GM 遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルゲン性について、日本生化学第 80 年会 (2007. 12)
- 7) 中島治、児矢野聡、穂山浩、澤田純一、手島玲子 : 組換え食品中の Cry3Bb1 と食物アレルギー患者血清との反応性評価の研究、日本薬学会第 128 年会 (2008. 3)
- 8) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、手島玲子、澤田純一、リコンビナントソバアレルゲン Bwp16 の免疫科学的解析、日本生化学第 80 年会 (2007. 12)
- 9) 佐藤里絵、中村里香、小松晃、大島正弘、手島玲子 : 高トリプトファン含有遺伝子組換えイネ系統のアレルゲン性に関する研究、日本薬学会第 128 年会 (2008. 3)
- 10) Teshima R., Okunuki H., Nakamura R., Sawada J. : The effect of plant oil on oral sensitization of mice with ovomucoid., 13th International congress of mucosal immunology (2007.7)
- 11) Nakamura R., Nakamura R., Teshima R. : Allergen database/Introduction of ADFS, HESI novel protein safety evaluation workshop (2008.2)
- 12) Teshima R., Nakamura R., Sato R. : Analysis of allergens and allergenome/Fish, Rice, HESI novel protein safety evaluation workshop (2008.2)

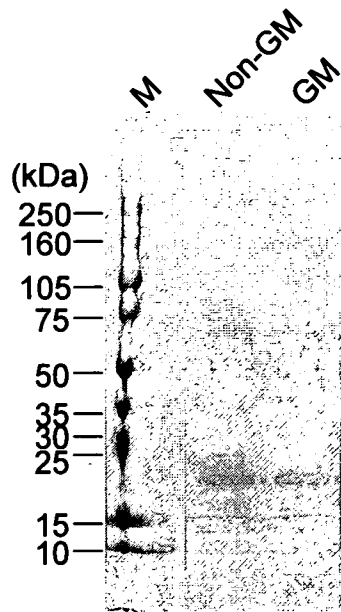


図1 Non-GM及びGM rice抽出物のCBB染色パターンと比較.
M: Molecular marker. Protein samples: 10mg/レーン.

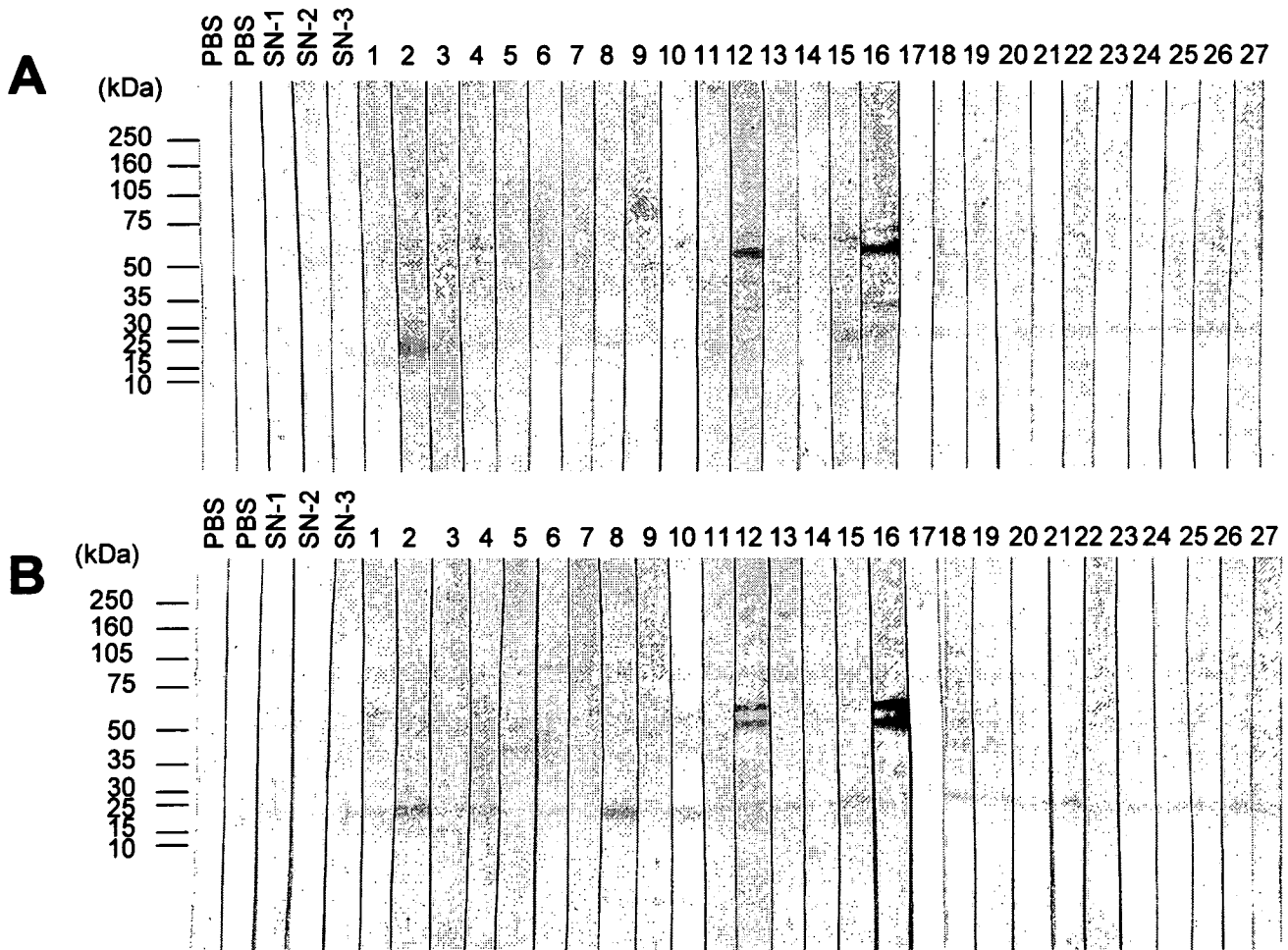


図2 Non-GM及びGM rice抽出物と米特異的IgE抗体価陽性を示す患者血清との反応性の比較.
A; Non-GM rice, B; GM rice. 正常血清; SN-1~3, 患者血清; #1 ~ 27

表1 本研究に用いた米特異的IgE抗体価陽性を示す患者血清情報。

	主病診断名	米特異的 IgE抗体価 (スコア)	年 齢	性 別	Total IgE
001	アナフィラキシー	5.77(3)	6	M	1270
002	食物アレルギー	16.6(3)	3	F	6510
003	気管支喘息、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎	3.01(2)	1	M	15000
004	アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、合併-スギ花粉症	1.14(2)	1.0 4	M	185
005	食物アレルギー、喘息、アトピー性皮膚炎、アナフィラキシー	3.97(3)	6	M	4040
006	アトピー性皮膚炎、食物アレルギー	63.9(5)	13	M	22810
007	アトピー性皮膚炎、食物アレルギー	(4)	4	F	14230
008	アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、気管支喘息	25.3(4)	9	M	8381
009	アトピー性皮膚炎、食物アレルギー	7.46(3)	5	M	780
010	食物アレルギー(多項目)、合併-アトピー性皮膚炎(重症)	(4)	1	M	2545
011	食物アレルギー(小麦、牛乳、卵白)、合併-アトピー性皮膚炎、BA 牛乳でアナフィラキシー	(2)	4	M	428
012	FA、AD(重症)	26.2(4)	1	M	9325
013	FA、合併-AD(エビ、マヨネーズで発赤、マグロでかゆみ)	1.37(2)	5	M	596
014	FA、合併-AD	1.23(2)	1	F	978
015	アトピー性皮膚炎、喘息、食物アレルギー	(4)	1	M	4000
016	アトピー性皮膚炎、食物アレルギー	(5)	1	M	ND
017	-	11(3)	0	-	-
018	-	49(4)	0	-	-
019	-	5(3)	0	-	-
020	-	36(4)	0	-	-
021	-	8.2(3)	0	-	-
022	-	5.1(3)	0	-	-
023	-	5(3)	0	-	-
024	-	17(3)	0	-	-
025	-	10(3)	0	-	-
026	-	6.4(3)	-	-	-
027	-	5.24(3)	-	-	-

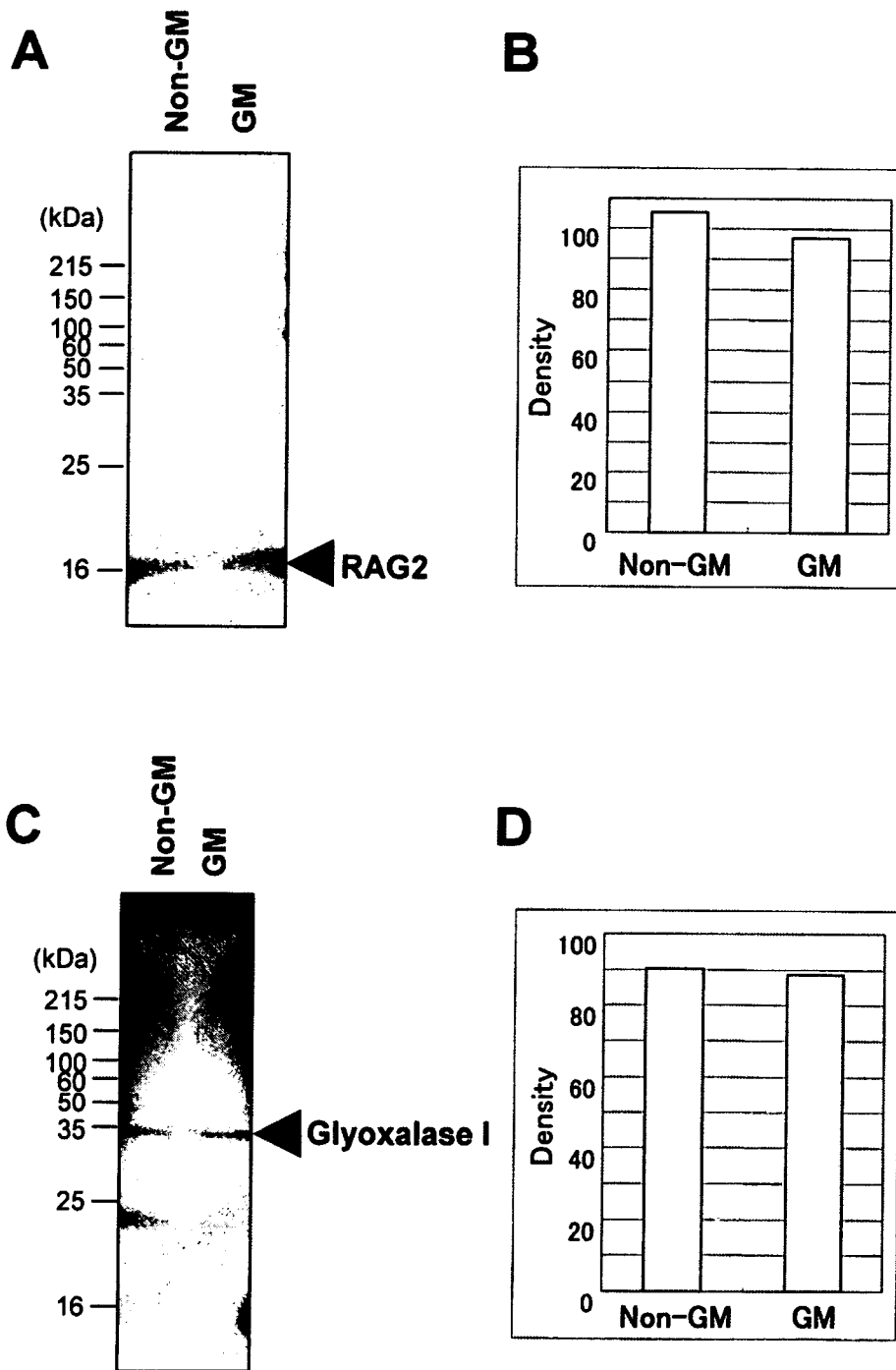


図3 Non-GM及びGM rice抽出物間のアレルゲン発現量の比較.
 A及びB; RAG2, C及びD; Glyoxalase I.
 A及びC; 電気泳動像, B及びD; 発現量.

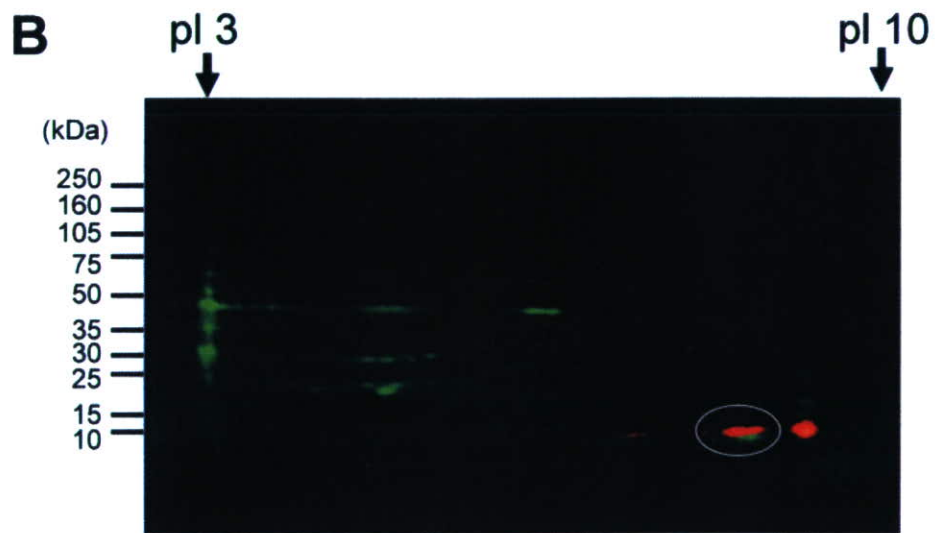
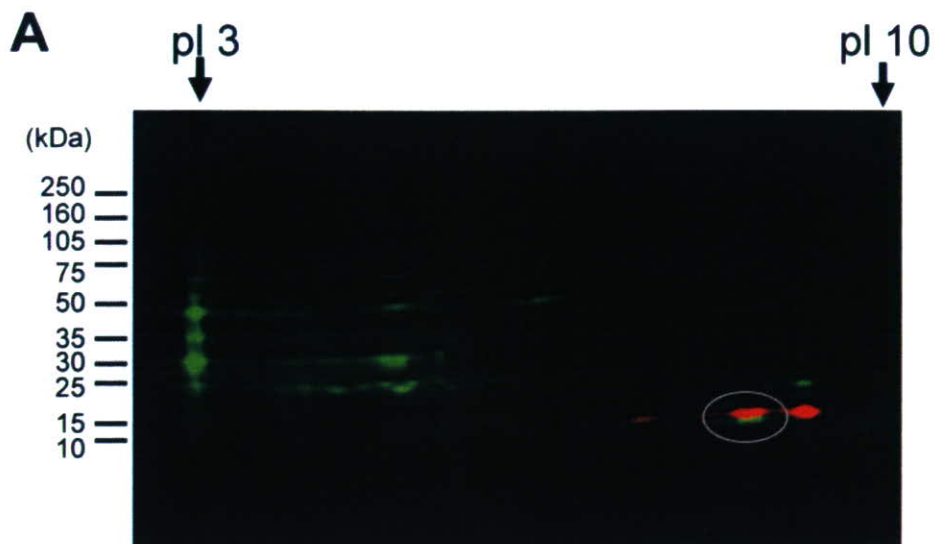


図4 遺伝子組換えによるRAG2の質的变化.

A; Non-GM rice, B; GM rice.

Green; Cy5 (whole protein)

Red; ECL (Immunostain with anti-RAG2 antibody, 1:20000)

白丸で囲んだスポットは等電点(計算値, pI8.06)よりRAG2と予想されるスポット.

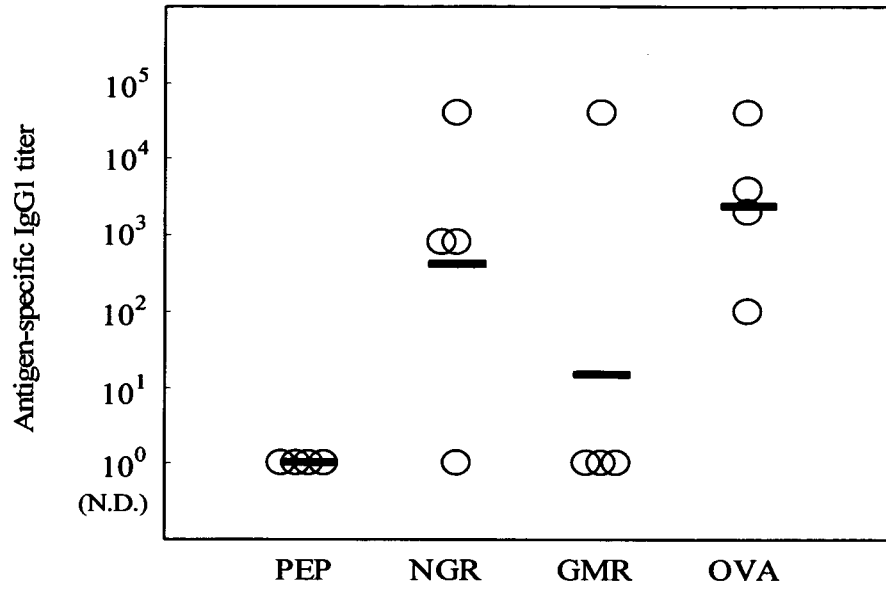


Figure 5 A comparison of the serum level of Antigen-specific IgG1 Antibody

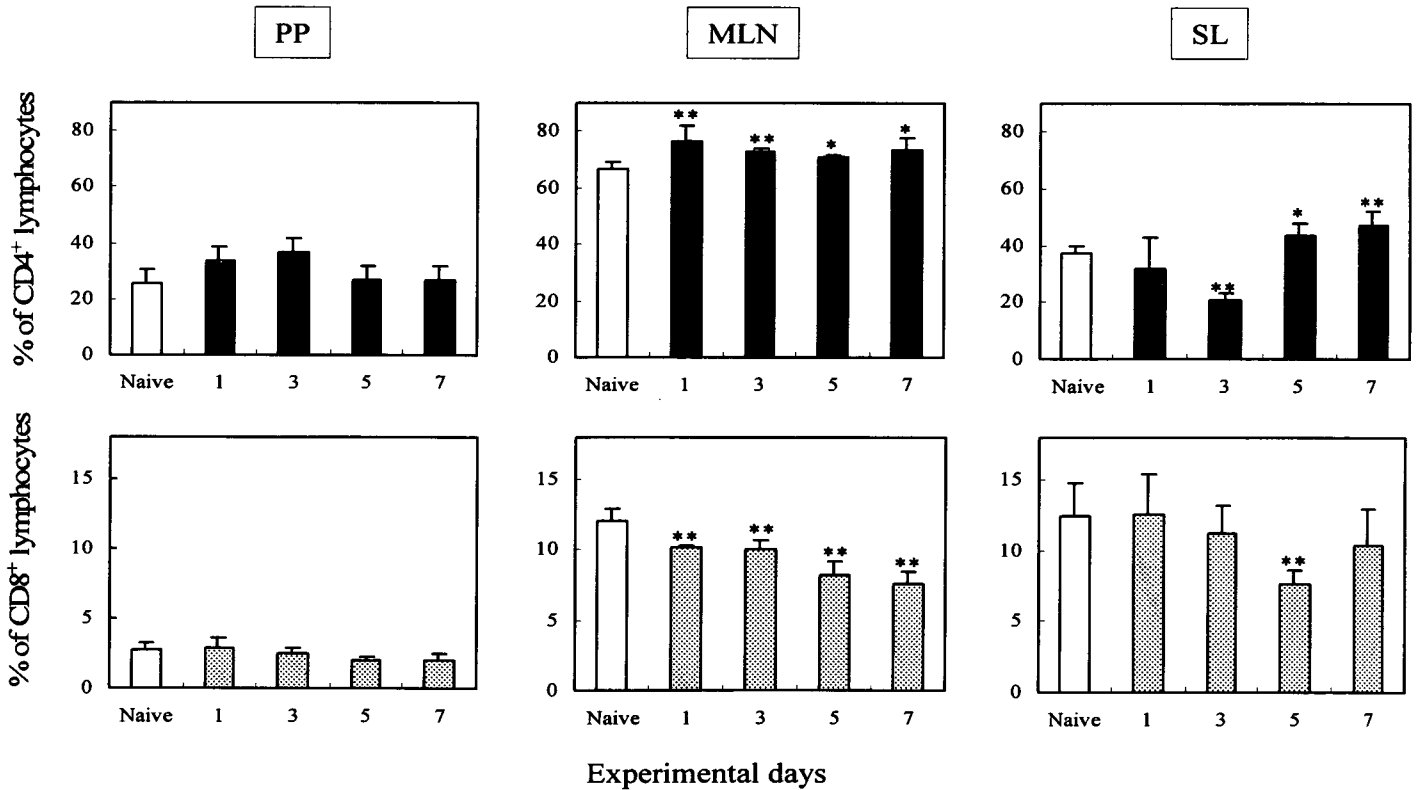
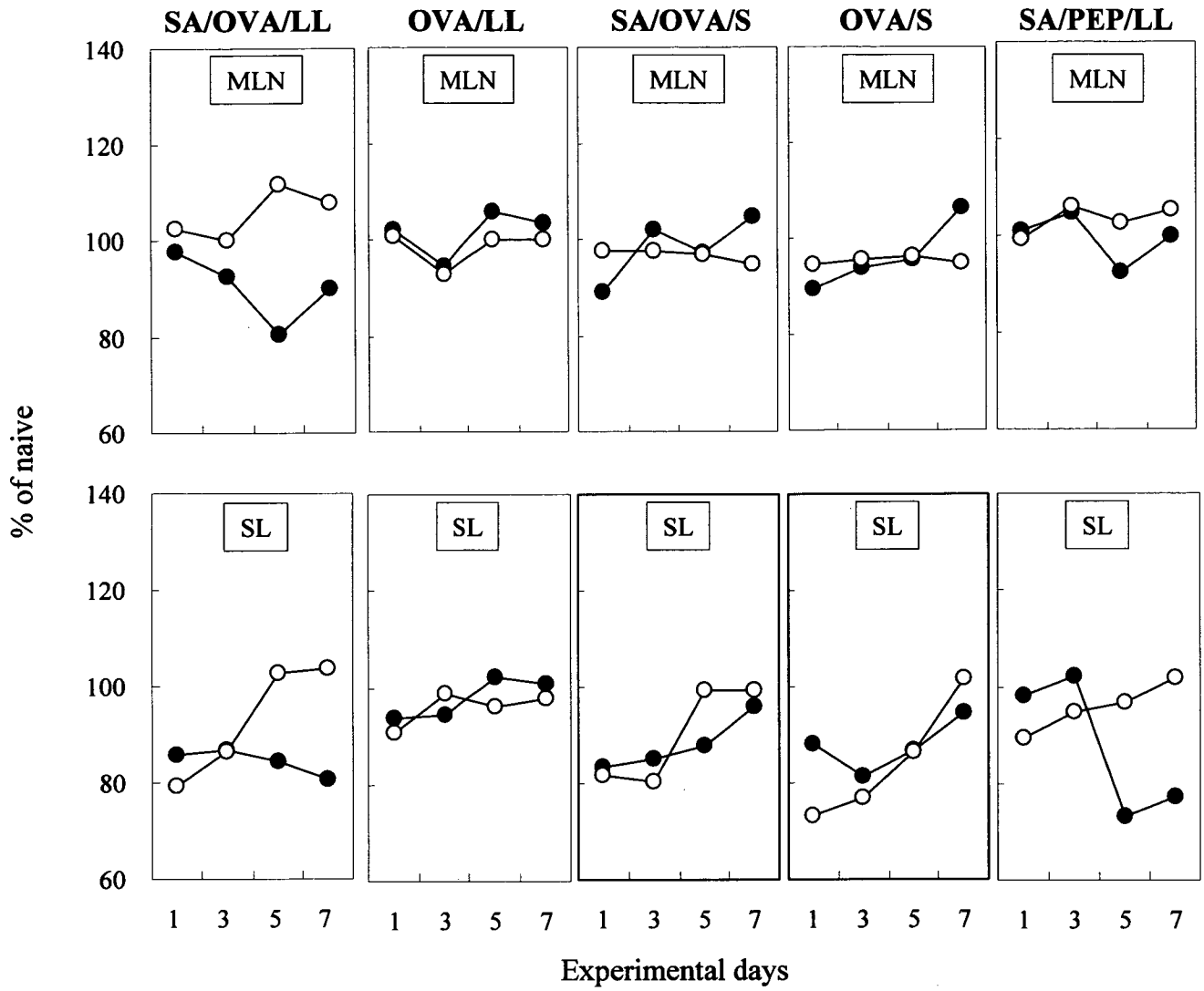


Figure 6 Population of CD4+ and CD8+ lymphocytes from Peyer's patch (PP), mesenteric lymph node (MLN) and spleen (SL) in SA/OVA/LL group mice

*,**Significantly different from the values for naive (* p<0.05, ** p<0.01)



7 Alterations in population of CD4⁺(○) and CD8⁺(●) lymphocytes from mesenteric lymph node (MLN) and spleen (SL) in various groups of mice

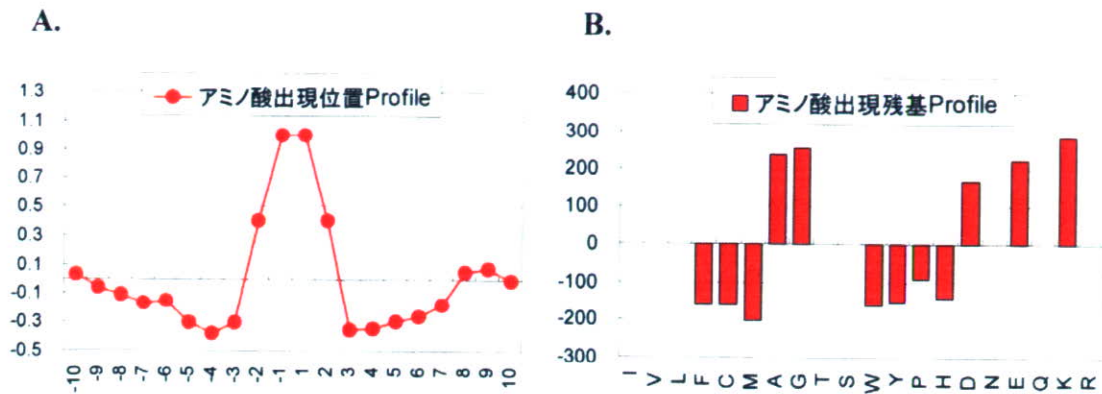


図8. アレルゲンのユニーク配列に特徴的なアミノ酸の分布。A:特徴的な部分だけを抽出したユニバーサル分布、B:各アミノ酸の分布の強度 (AUF インデックス)。

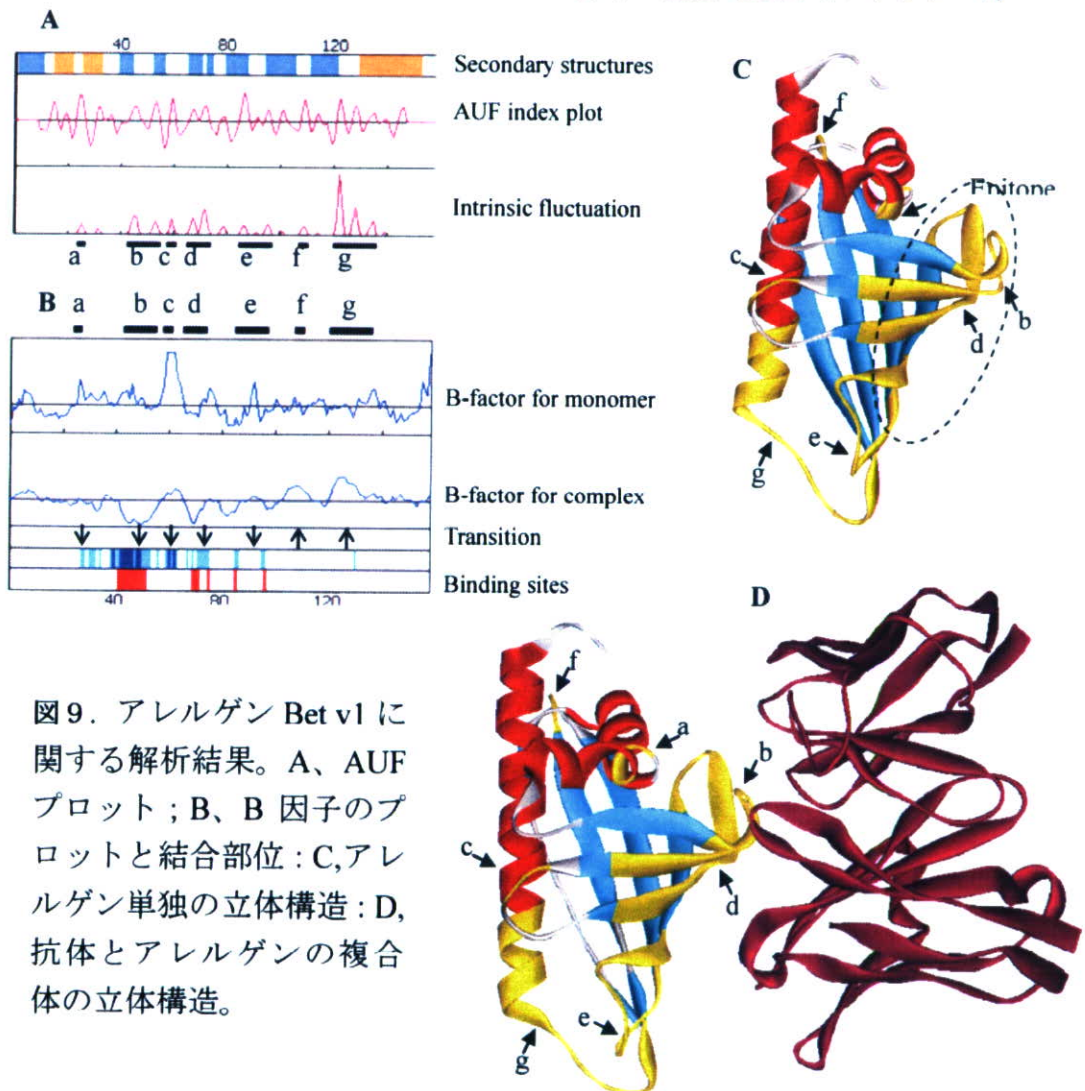


図9. アレルゲン Bet v1 に関する解析結果。A、AUF プロット；B、B 因子のプロットと結合部位；C、アレルゲン単独の立体構造；D、抗体とアレルゲンの複合体の立体構造。

表2 平成19年度ADFSに追加したエピートープ情報

Allergen	N	Type*	start	end	Sequence	Description	Method	Reference(PMID)
Cuc m 2	1	L	6	20	YVDDHLMCDIDGNRL SATFPAPFRLEEIAAILKD	major major major	SPOT-method	17397911
	2	L	36	55	FD			
	3	L	66	75	FLGGTKYMV AVIRGKKGSGGITVKKT			
	4	L	81	100	NQA			
	5	L	106	120	YDEPLTPGQCNMIVE			
	6	L	122	131	LGDYLIEQGL			
Phl p 5b	1	C			K, K, K, K, K, K, K, K, K, K	Ten potential IgE-interacting residues of Phl p 5b (K130, K141, K147, K171, K174, K185, K195, K219, and K229) were identified	Site-directed mutagenesis & inhibition-ELISA	16735798
Bet v 1	1	C			C-QQFLSVRAL-C	IgE-mimotope (9-22+104-113)	phage display & computer-aided epitope search	11053238
	2	C			CFPYCYPSESA	IgG-mimotope (58-67)		
Cyp c 1.01	1	C			C-YRQVTLAGHR-C	IgE-mimotope (23+25-29)	phage display & computer-aided epitope search	16150491
	2	C			C-FKGVRLDGTP-C	IgE-mimotope (33-37)		
	3	C			C-FRGLDVAGNV-C	IgE-mimotope (87+89-92+94)		
	4	C			C-AREYGTNRWV-C	IgE-mimotope (77-79)		
	5	C			C-YRGARVDGLM-C	IgE-mimotope (23+25-29)		
Lol p 1	1	C			SAHGTSTGVRGP	IgE-mimotope (20-24+53-57)	phage display computer-aided epitope search	11478946
	2	C			SVHMINTSQVHL	-		
	3	C			SDTTMGQVHRHP	-		
	4	C			KQASNLTVMHYP	-		
	5	C			YSLPQRTHLHLP	-		
	6	C			HLPTSSLFDTTH	-		
	7	C			HQNLNLGSSWST	-		
Hev b 6.02	1	C				N'- and C'-terminal regions are important to bind with IgE a single substitution Asn14Asp (IgE binding activity decreased to 27%)	chimera protein & inhibition-ELISA	11909866
Hev b 6.0202	1	C					Hev b 6.0201, natural isotype	16638575
Api g 1.01	1	C				Api g 1.01 K44E mutant; binding activity to anti-Bet v1 IgE was increased	point mutation	17267036
Phl p 1	1	C				C'-terminal 115 amino acids are important to bind with IgE Fab.	immunoblot	16750995
Phl p 5a	1	C			SRLGRSSAWV	IgE-mimotope (273-287)	phage display	15577826
	2	C			RLTENTEPLL	IgE-mimotope (33-42)		
	3	C			KLKFGAARV	IgE-mimotope (50-59)		

*L: linear epitope
C: conformational epitope

Allergen Database for Food Safety - Microsoft Internet Explorer
<http://allergen.nih.gov/ADFS/keywordsearch.do>

Allergen Database for Food Safety

Allergen Search: Keyword Search
 Result : 18 Page 1 of 1 << prev 1 next >>

Name	UniProt Acc	Taxonomic Name	Common Name	Category	Epitope	Structure	Sugar	Description
Amb a 3	P00304	Ambrosia artemisiifolia	common ragweed,short ragweed,annual ragweed,Ragweed	pollen	L	-	sugar	Pollen allergen Amb a 3 Amb a III Allergen RaD
Ara h 1	P43238	Arachis hypogaea	peanut,Arachis hypogaea L.	food	L	-	sugar	Allergen Ara h 1, clone P41B precursor Ara h 1
Ara h 1	P43237	Arachis hypogaea	peanut,Arachis hypogaea L.	food	L	-	sugar	Allergen Ara h 1, clone P17 precursor Ara h 1
Asp f 10	P28296	Aspergillus fumigatus	-	fungus	L	-	sugar	Oryzin precursor EC 3A.21.63 Alkaline proteinase ALP Elastase Elastolytic serine proteinase.
Asp f 2	P75017	Aspergillus fumigatus	-	fungus	L	-	sugar	Major allergen Asp f 2 precursor Asp f II
Bos d 4	P00711	Bos taurus	cow,Bos bovis,Bos primigenius taurus,bovine,cattle,domestic cow,domestic cattle	food	L	3	sugar	Alpha-lactalbumin precursor Lactose synthase B protein Allergen Bos d 4.
Bos d 8 (kappa)	P02668	Bos taurus	cow,Bos bovis,Bos primigenius taurus,bovine,cattle,domestic cow,domestic cattle	food	L	-	sugar	Kappa-casein precursor [Contains: Casoxin C, Casoxin 6, Casoxin A, Casoxin B, Casoplatein].
Ory j 1	P18632	Cryptomeria japonica	Japanese cedar	pollen	L	-	sugar	Sugi basic protein precursor SBP Major allergen Ory j 1 Ory j I
Ory j 2	P43212	Cryptomeria japonica	Japanese cedar	pollen	L	-	sugar	Polyelecturonase precursor EC 3.2.1.15 PG Pectinase Major pollen allergen Ory j 2 Ory j II

ページが表示されました

図10 ADFSの操作画面

キーワード検索により、エピトープ情報を持ち糖鎖修飾を受けているアレルゲンのみをリストアップした例を示す。アレルゲンの名前や生物種、カテゴリ (pollen, mite, animal, fungus, insect, food, latex and others)、エピトープ情報の有無とその種別、立体構造情報の有無とその数等が示されている。右から2番目のカラムが今回追加された糖鎖修飾の有無に関する情報である。なお、ADFSへのアクセスは、通常のインターネットブラウザを用い、<http://allergen.nih.gov/ADFS/> のURLを入力すればよい。

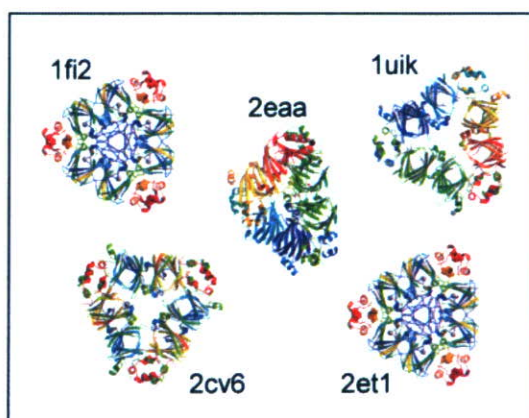


図 11 Cupinスーパーファミリー

結晶構造解析がなされている5種のcupinスーパーファミリー分子をPDB IDとともに示した。特徴的なヘキサマー構造が見て取れる。

PSI-BLAST result (UniProt Name)	BLAST	PSI-BLAST result (UniProt Name)	BLAST
Q84ND2 Ber_e_F049	○	Q94LX2 Gly_m_F090	×
Q84ND2 Ber_e_2	○	Q82580 Ara_h_3	○
P11828 Gly_m_F076	○	Q9SEW4 Jug_r_2	○
P04776 Gly_m_glycinin_G1	○	P04347 Gly_m_F070	○
P04776 Gly_m_F067	○	Q9SQH7 Ara_h_4	○
P04776 Gly_m_F066	○	Q39922 Gly_s_F074	○
P04405 Gly_m_glycinin_G2	○	Q39921 Gly_s_F081	○
P04405 Gly_m_F069	○	P93707 Gly_m_F073	○
P04405 Gly_m_F068	○	P93708 Gly_m_F072	○
Q8GZP6 Ana_o_2	○	P43238 Ara_h_1	×
Q23880 Fag_e_F063	○	P02858 Gly_m_F075	○
Q23880 Fag_e_1	○	P43237 Ara_h_1	×
Q8W1C2 Cor_a_9	○	Q43452 Gly_m_F080	○
Q9XHP0 Ses_i_6	○	Q43452 Gly_m_F077	○
Q9XFM4 Fag_e_1	○	Q9AUD0 Ses_j_3	○
Q9XFM4 Fag_ag_1	○	Q9AUD0 Ses_i_3	○
Q23878 Fag_e_F062	○	Q8LKN1 Ara_h_3/4	○
Q23878 Fag_e_1	○	Q9AVK8 Gly_m_bd	○
P25974 Gly_m_conglycinin	×	Q9AVK8 Gly_m_Bd28K	○
P25974 Gly_m_F085	×	Q8LGR7 Fag_t_F065	○
Q8L5L5 Ana_o_1.0101	×	Q39858 Gly_m_F071	○
Q8L5L6 Ana_o_1.0102	×	Q9M642 Fag_g_F064	○
P11827 Gly_m_conglycinin	○	Q84U10 Len_c_3.03	○
P11827 Gly_m_F086	○	Q84U10 Len_c_1.0102	○
Q22121 Gly_m_F089	×	Q39853 Gly_m_conglycinin	×
Q8S4P9 Cor_a_11	×	Q39853 Gly_m_F087	×
Q7Y1C1 Jug_n_F103	○	Q702P1 Pis_s_1.0101	○
Q7Y1C1 Jug_n_2	○	Q84U11 Len_c_3.02	○
P13916 Gly_m_conglycinin	×	Q84U11 Len_c_1.0101	○
P13916 Gly_m_F084	×	Q702P0 Pis_s_1.0102	○

表3 PSI-BLASTによる相同性検索の例(Ber e 2の場合)

ブラジルナッツのアレルゲンであるBer e 2のアミノ酸配列(UniProt ID: Q84ND2)に相同性の高いアレルゲンを、ADFSのProtein Search機能であるBLASTおよびPSI-BLASTによって検索した。なお、各種パラメータはADFSの初期値によった(ただし、PSI-BLASTの繰り返し回数は最大の5回とした)。この場合、BLASTでは47種、PSI-BLASTでは60種のアレルゲンがヒットし、BLASTの結果である47種は、すべてPSI-BLASTの結果に含まれていた。表は、PSI-BLASTでヒットした60種のアレルゲンについて、そのUniProt IDとアレルゲンの名前、およびそのアレルゲンがBLAST検索によってヒットしたかどうか(ヒットした場合に○、しなかった場合に×)を示している。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Akiyama H, Sakata K, Kondo K, Tanaka A, Liu MS, Oguchi T, Furui S, Kitta K, Hino A, Teshima R.	Individual Detection of Genetically Modified Maize Varieties in Non-Identity Preserved Maize Samples.	J. Agric. Food Chem.	56(6)	1977-1983	2008
Toyota A, Akiyama H, Sugimura M, Watanabe T, Sakata K, Shiramasa Y, Kitta K, Hino A, Esaka M, Maitani T.	Rapid quantification methods for genetically modified maize contents using genomic DNAs pretreated by sonication and restriction endonuclease digestion for a capillary-type real-time PCR system with a plasmid reference standard.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	70(12)	2965-2973	2006 Dec
Akiyama H, Sasaki N, Sakata K, Ohmori K, Toyota A, Kikuchi Y, Watanabe T, Furui S, Kitta K, Maitani T.	Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products.	J. Agric. Food Chem.	55(15)	5942-5947	2007 Jul
Oguchi T, Onishi M, Chikagawa Y, Minegishi Y, Kodama T, Akiyama H, Ohno Y, Futo S, Hino A, Furui S, Kitta K	Development of Event-Specific Quantitation Method for GA21 Maize, Which Is a GM Event without CaMV35S Promoter.	J. Food Hyg. Soc.	49(1)	16-22	2008 Feb
渡邊敬浩, 白政優子, 古井 聡, 橋田和美, 峯岸恭孝, 穠山 浩, 米谷民雄	安全性未審査遺伝子組換えコメ(LLRice)を対象とした検知技術の開発と評価	J. Food Hyg. Soc. Japan	48(6)	170-178	2007 Dec
Shimizu E, Kato H, Nakagawa Y, Kodama T, Futo S, Minegishi Y, Watanabe T, Akiyama H, Teshima R, Furui S, Hino A, Kitta K	Development of Screening Method for Genetically Modified Soybean by Plasmid Based Quantitative-Competitive PCR.	J. Agric. Food Chem	submitted		2008
大森清美, 土屋久世, 渡邊敬浩, 穠山浩, 米谷民雄, 山田利治, 伊藤伸一, 佐藤修二	トウモロコシ加工食品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討	食品衛生学雑誌	49(1)	45-50	2008 Feb
渡邊敬浩, 笠間菊子, 菊地博之, 鈴木達也, 時下祥子, 坂田こずえ, 松木容彦, 日野明寛, 穠山 浩, 米谷民雄	遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810系統)の定量PCR法を対象とした外部精度管理試験	食品衛生学雑誌	47(1)	15-27	2006 Feb
Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, Yamamoto S, Igimi S.	Intragastric immunization with recombinant Lactobacillus casei expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against Salmonella enterica serovar Enteritidis.	Vaccine	25(18)	3599-3605	2007 May

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Satoh R, Koyano S, Takagi K, Nakamura R, Teshima R, Sawada J	Immunological Characterization and Mutational Analysis of the Recombinant Protein Bwpl6, a Major Allergen Buckwheat.	Biol. Pharm. Bull.	in press		2008
新藤智子, 金澤由基子, 古谷真美, 田面善之, 小島幸一, 手島玲子	経口感作および経口惹起によるマウスの 食物アレルギーモデル	秦野研究所年 報	30	9-16	2007
手島玲子	遺伝子組換え農作物の食品としての安全 性評価技術	農林水産技術 研究ジャーナ	30(9)	22-27	2007