

必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2003年7月にコーデックス総会で採択された「組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」<sup>1)</sup>

([ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03\\_34e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03_34e.pdf))で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性(特にペプシン抵抗性)並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対するIgE抗体の存在の有無のスクリーニングがあげられ、検討項目として、動物モデルの使用の推奨等が述べられている。また、国内においては、組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準が平成16年1月に作定された。

さらに、2004年第27回Codex総会において、TFFBTの再設置が採択され、わが国が議長国を引き受けることになり、2005年9月に第五回タスクフォース会合が行なわれた。ここで、「組換えDNA動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」の策定を行なうこと、「栄養または健康に資する組換えDNA植物由来食品の安全性評価」の策定作業を行なうことで、合意がなされた。生産者のメリットを考慮した第一世代バイオテクノロジー応用食品に加え、第二世代の消費者のメリットも考慮したモダンバイオテクノロジー応用食品についても実用化が現実のものとなりつつある現状に対応するため、第二世代のバイオテクノロジー応用食品の安全性評価にも対応できる安全性評価法の検討を行うことが急務となっている。なお、2007年9月の第7回タスクフォース会合において、上記ガイドラインは、step5/8に進められ、タスクフォースでの合意が得られ、2008年の第31回コーデックス総会で、最終的な合意が得られた。また、米国FDAでは、2009年1月遺伝子組換え(GE)動物の規制に関するガイドラインを作成し公表した。このような状況を踏まえ、今後とも、栄養改変した遺伝子組換え作物、遺伝子組換え動物の開発は更に進んでいくことが予想される。

本分担研究では、遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する研究として、(1)遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた組換え食品のアレルゲン性の検討、(3)エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のア

レルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討及びアレルゲンデータベース(ADFS)の充実を図ることを目的に研究を行う。

平成20年度は、(1)遺伝子組換えニワトリを用いてアレルゲンの量的、質的変動の解析手法の検討、(2)動物を用いる組換えニワトリのアレルゲン性の検討、(3)アレルゲン予測の解析法の検討並びにADFSのデータの更新をとりあげ、研究を進めた。

具体的には、

(1) GFP導入ニワトリと対象ニワトリの筋肉を用いて、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動をアレルゲン特異的抗体並びにコメアレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。

(2)動物を用いるアレルゲン性の検討では、マウスを用いる経口感作、経口惹起の方法について更なる検討を加えるとともに、GFP導入ニワトリと非組換えニワトリ肉の感作を行い、両者のアレルゲン性について比較検討を行った。

(3)アレルゲン予測の解析法の検討では、(i)新規導入タンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、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)のインデックスと立体構造の揺らぎのインデックスを用いたアレルゲン予測法の検討を行い、(ii)新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)に関しては、アレルゲンの整備、エピトープ情報、糖鎖情報の更新、並びに相同性検索方法の信頼性の調査研究を行った。

## B. 研究方法

### (1) GFP導入組換え(GM)ニワトリの解析

(i) Non-GM及びGMニワトリ肉からのタンパク質の抽出

遺伝子組換え(GM)ニワトリには、EGFP遺伝子を組み込んだpCAGIpuroベクターをエレクトロポレーション法により導入したニワトリES細胞を受精卵胚に移植することにより作成した個体を用い、主には解卵前後の雛の筋肉を解析に用いた。また、アレルゲン含量の比較用には、成体に成長したNon-GM、GMニワトリの筋肉も用いた。これらのニワトリはすべて、広島大学大学院生物圏科学研究科にて作製された。鶏肉1gに対し20mLのPBSを加え、Polytron(Kinematica)を用いて30秒破砕後、氷上で30秒静置を3回繰り返して、鶏肉中のタンパク質を抽出した。10000rpm、10minの遠心で沈殿を取り除いた後、Dismic-45(Advantec)にてフィルター濾過し、溶液中のタンパク質濃度をBCA assay Kit(Pierce, IL, USA)にて測定し、試料とした。試料は使用時まで-80℃で保存した。

(ii) Non-GM 及び GM 鶏肉中のアレルゲン量の量的変化の比較

鶏肉タンパク質 (5.6ug/lane) を 12.5% アクリルアミドゲル (DRC, Tokyo) 中で SDS-PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜 (BA83, S&S, Dassel, Germany) に電氣的に転写した (37mA, overnight)。転写膜を 0.5% casein/PBS 中に浸し、室温 2 時間ブロッキングを行った後、0.1% casein/PBS で 1000 倍希釈した Rabbit anti-chicken serum albumin 抗体 (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Netherlands) 溶液中で室温 1 時間インキュベートした。0.05% Tween 20/PBS 溶液で室温 10 分の洗浄を 3 回行った後、2000 倍希釈した HRP-conjugated anti-rabbit Ig 抗体 (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) 溶液中で室温 1 時間インキュベートした。洗浄後の膜は Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, USA) を用いて HRP 化学発光反応を行った。検出されたバンドの density の測定は、Scion Image (NIH, Maryland) ソフトを用いて行った。

(iii) Non-GM 及び GM ニワトリ肉抽出物と、鶏肉特異的 IgE 抗体陽性を示す患者血清との反応性の比較

鶏肉特異的 IgE に対する Immuno-CAP スコア 3 以上の患者 5 名の血清を用いた。Subject 1 の血清は藤田保健衛生大学・宇理須博士より供与いただいた。Subject 2-5 の血清は Plasma Lab. International (Washington, USA) より購入した。

鶏肉タンパク質 (3.75ug/lane) を 10-20% アクリルアミドゲル (DRC, Tokyo) 中で SDS-PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜 (BA83, S&S, Dassel, Germany) に電氣的に転写した (37mA, overnight)。室温で 2 時間ブロッキングを行った転写膜を、0.1% casein/PBS で 5 倍希釈した患者血清溶液中で室温 1 時間インキュベートした後、4°C で終夜インキュベートした。0.05% Tween 20/PBS 溶液で室温 10 分の洗浄を 3 回行った後、1000 倍希釈した HRP-conjugated anti-human IgE 抗体 (Nordic Immunological Laboratories) 溶液中で室温 1.5 時間インキュベートした。洗浄後の膜は Konica Immunostain (Konica Minolta, Tokyo) を用いて HRP 化学発色反応を行った。

(iv) 二次元電気泳動による non-GM 及び GM 鶏肉中のアレルゲン量の質的变化の比較

鶏肉タンパク質 (10・g) は 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) を用いて脱塩・脱脂した後、Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) 125・l に溶解し、Immobiline Drystrip (pH3-10 NL, 7 cm long, GE

Healthcare) に終夜膨潤させた。1 次元目の等電点電気泳動は、膨潤後の Immobiline Drystrip を IPGphor isoelectric focusing system III (GE Healthcare) の説明書に従い 20°C 下で 10kVhr 以上となるよう行った。等電点電気泳動終了後の Drystrip を 1% (w/v) DTT を含む平衡化バッファー (50mM Tris-HCl [pH8.8], 6M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS, and a small amount of BPB) 中で室温 10 分振とうして還元後、2.5% (w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファー中で室温 10 分振とうして SH 基の保護を行った。平衡化後の Drystrip を 10-20% アクリルアミドゲル (DRC, Tokyo) 中で SDS-PAGE により分離した後 (2 次元目)、PVDF 膜 (Immune-blot, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) に電氣的に転写した (37mA, overnight)。転写膜を Cy5 mono-reactive dye (GE Healthcare) /PBS 溶液中で室温 1 時間インキュベートし、全タンパク質を蛍光標識した。メタノールおよび 0.05% PBS-T でそれぞれ 3 回洗浄後、室温で 2 時間ブロッキングを行い、上述と同様に Rabbit anti-chicken serum albumin 抗体あるいは 10 倍希釈した患者血清とインキュベートした後、HRP 標識抗体と反応させた。HRP 化学反応は ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare,) を用いて行い、Typhoon9400 (Amersham Biosciences) を用いて Cy5 (633nm/670BP30) および ECL plus (457nm/520BP40) の蛍光を検出した。

IgE 結合タンパク質の同定のため、鶏肉タンパク質 (100・g) を上述と同様に 2 次元分離した後、アクリルアミドゲルを CBB 染色し、IgE 結合タンパク質に相当するスポットを切り出した。切り出したゲルは 30%アセトニトリル・25mM 重炭酸アンモニウム溶液中で脱色した後、50%アセトニトリル・25mM 重炭酸アンモニウム溶液で脱水し遠心濃縮機で乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (25・g/ml Trypsin Gold-Mass Spec Grade [Promega, Madison, Wisc., USA], 25mM bicarbonate ammonium, 0.1% [w/v] N-Octyl-glucoside) を加え、37°C で 16 時間ゲル内消化を行った。50%アセトニトリル・1%トリフルオロ酢酸溶液を加えてゲルからトリプシン消化ペプチドを抽出し、遠心濃縮機で濃縮後、Zip-Tip C18 (Millipore cooperation, Billerica, MA) を用いて脱塩処理を行った。ペプチドは・-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (・-CHCA, Sigma-Aldrich) と混合し、4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems, CA) により MS スペクトルおよび MS/MS フラグメントイオン質量を取得した。タンパク質同定のサーチエンジンには Mascot MS/MS ion search (Matrix Science Inc.,

MA)を用い、NCBI Inr タンパク質データベース内での相溶性検索を行った。

(v) 鶏肉サンプル中に混入した卵アレルギーの抽出

Ovomucoid の確認には、Western blotting と 2 次元電気泳動を行った。Western blotting は、鶏肉タンパク質 (3.75ug/lane) を 10% アクリルアミドゲル (DRC, Tokyo) を用い、上述と同様に行った。1 次抗体には 1000 倍希釈した Mouse anti-ovomucoid 抗体 (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、2 次抗体には 2000 倍希釈した HRP-conjugated anti-mouse Ig 抗体 (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) を用いた。Ovalbumin の確認には、Ovomucoid と同様に Western blotting を行った。特異的抗体には 1000 倍希釈した Rabbit anti-ovalbumin 抗体 (Polysciences, Inc.) を用いた。

(vi) キメラ鶏卵に含まれるアレルギーの確認

キメラ鶏卵 (未受精卵) および Non-GM 鶏卵は卵黄と卵白に分け、それぞれを凍結乾燥し、凍結乾燥粉末 0.2g あたり 20mL の PBS を加えて室温で 3 時間振とうして水溶性タンパク質を抽出した。抽出物は 10000rpm で 30 分間遠心して固形物を取り除いた後、Dismic-45 (Advantec) を用いてフィルター濾過し、使用するまで -80°C で保存した。タンパク質濃度は BCA assay Kit (Pierce) を用いて測定した。

Western blotting は、鶏卵タンパク質 (5ug/lane) を 10-20% アクリルアミドゲル (DRC, Tokyo) を用い、上述と同様に行った。アレルギー特異的抗体にはそれぞれ、Mouse anti-ovomucoid 抗体 (Cosmo Bio Co., Ltd., 1:1000)、Rabbit anti-ovalbumin 抗体 (Polysciences, Inc., 1:1000)、Rabbit anti-lysozyme 抗体 (Nordic Immunology, 1:2000)、Rabbit anti-chicken serum albumin (α-livetin) 抗体 (Nordic Immunology, 1:2000) を用いた。

## (2) 食物アレルギー動物モデルの開発

(実験 1) 実験には 7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (Vehicle)、非組換えとり肉 (NG)、組換えとり肉 (GM)、陰性対照としてペプシン (PEP) および陽性対照として卵白アルブミン (OVA) 投与群を 6~7 匹/群で設定した。非組換えあるいは組換えとり肉 1g に対して 10 mL のリン酸緩衝生理食塩液を加えてホモジネートした後、4°C 下 8400g で 30 分間遠心分離した上清をさらに 19000g で 30 分間遠心分離した上清を限外ろ過膜で濃縮して得た抽出液に、等量のリノール酸/大豆レシチン混合液 4:1 (LL) を加えて乳化し、NG 群あるいは GM 群に用いた。Vehicle、PEP および OVA 群の

媒体は、生理食塩液と LL の乳化液とした。いずれの群も 2 回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に各蛋白質 10 mg/0.4 mL LL/匹の割合で経口投与して惹起 (1 回目) した。さらに、2 週間後、卵レシチンを用いた LL を媒体として 10 mg/0.4 mL/匹の割合で経口投与して惹起 (2 回目) した。惹起後 30 分間に観察されるアナフィラキシー症状の強さにスコアをつけ、1 匹のマウスが示した症状の最大スコアをその個体のスコアとした。各投与群間の差は Mann-Whitney の方法で検定した。また、2 回目の経口惹起の 6 日後に採血し、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で測定した。

(実験 2) 7~10 週齢の雌性 BALB/c マウスに SA 0.3 mg/匹を併用下、LL を媒体として OVA 1 mg を経口投与した (SA/OVA/LL)。投与 0.5、1、3、6、12 および 24 時間後に 3 匹のマウスから、パイエル板、腸管膜リンパ節および脾臓を採取し、コラゲナーゼ処理によってそれぞれの細胞 (PP、MLN および SL) を分離した。洗浄後の PP と MLN、赤血球を溶血させた後に洗浄した SL は 1 mL あたり  $2 \times 10^7$  個に調整し、FITC 標識抗 CD4 抗体で染色した。Mouse Foxp3 Buffer Set (ベクトンディッキンソン) を用いて、CD4 抗体標識後の細胞を PE 標識抗 Foxp3 抗体で染色した。CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合はフローサイトメトリー (BD FACS Calibur, ベクトンディッキンソン) で調べ、各投与時間の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合を無処置動物 (n=6) と比較した (t 検定)。

(実験 3) 7 週齢の雌性 BALB/c マウス 6 匹に SA/OVA/LL の条件で抗原を経口投与した。別のマウス 6 匹を SA/OVA/LL の条件で感作した際には、同じ頻度で生理食塩液に溶解した CD3 抗体 10 μg/匹を腹腔内投与した (SA/OVA/LL + α-CD3)。感作 3 週間後に OVA 10 mg/0.4 mL LL/匹の割合で経口投与して惹起 (1 回目) した。さらに、2 週間後、卵レシチンを用いた LL を溶媒として 10 mg/匹の割合で経口投与して惹起 (2 回目) した。感作の成立および強度はアナフィラキシー症状のスコアで評価した。

## (3) アレルギー予測の解析法

(i) 既知のアレルギーとの相溶性の比較方法の検討-アレルギーに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討

新規に導入したタンパク質のアレルギー性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することは非常に重要な課題である。アレルギーであるタンパク質とアレルギーでないタンパク質をアミノ酸配列から高精度に判別するには、3つの段階が必要である。第1に、判別シス

テムを作るための質のよいデータセットを用意すること、第2に、アレルゲンのエピトープとなる配列の特徴をつかまえること、第3に、特徴を用いて予測のシステムを開発することである。

第1のデータセットの準備の手順について以下に記す。アレルゲンタンパク質と非アレルゲンタンパク質については、かなりの数知られているので、そこからアレルゲンに特異的な配列を探索した。そこで3つのことを仮定して、データセットを準備した。(1)アレルゲンとIgEとの結合部位は、複数の断片からなっている。(2)断片のうち少なくとも一つはアレルゲンに特有の断片である。(3)結合に関与する断片は、何回も出現する。以上のことを満足する断片(3~8残基)をアレルゲンの蛋白質から抽出した結果、8696個の断片を得た。

第2のアレルゲンのエピトープとなる特異的な配列の特徴を捕まえるためには、抗体結合部位の立体構造の揺らぎとの相関に関する解析を行った。

(ii) 新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の構築について

ADFSはUniProtデータベースに基づく運用システムを採用しているが、今回データを参照するAOL<sup>2)</sup>は、アレルゲンシークエンスをすべてNCBIのgene identifier (gi) 番号により管理している。よって、AOLとADFSのデータの比較・統合を行なうため、AOLのgi番号に対応するUniProt IDへと変換した。UniProtに対応するエントリが存在しない場合は、RefSeq、GenPept、PDB等のデータベースよりシークエンス情報を取得した。

アレルゲン情報はアレルゲン名とそのアミノ酸配列(UniProtのアクセッション番号)によって整理され、同一名で同一シークエンスを持つものは基本的に一つのエントリにまとめられる。なお、この条件の中でも、エピトープ情報や立体構造情報等の有無に違いがある場合は、エントリを分けて表示している。IUISが発行する正式なアレルゲン名(イソアレルゲン名)が存在しない場合は、由来する生物の属と種の頭文字をそれぞれ3文字と1(または2)文字で表し、末尾に「?」を付した。

また、この一年間に新たに論文に発表されたアレルゲンおよびエピトープについては、昨年度と同様の方法によりNCBI PubMedを検索し、アレルゲン12種、エピトープ31種について情報を追加した。エピトープについては、タンパク質の糖鎖部分それぞれ自体が生物活性のあるエピトープとして働く例がいくつか知られているため、本年度よりこの場合を他と区別し、「S」という記号を振って分類した。

新規に登録されたアレルゲンのアミノ酸配列を加味し、アレルゲンのモチーフ検索に用いるためのモチーフセットの再抽出を行なった。モチーフ抽出ツールはMEMEを用いた。その際、アミノ酸残基数は50、E-valueは0.01、モードはzoopsを使用した<sup>3)</sup>。

また本年度は、ADFSが独自に提供しているアレルゲン性予測ツールであるMotif-based法による解析手法の信頼性について、下記の3通りの手法により評価を行なった。

①人工生成非アレルゲンデータセットを用いた評価: ADFS収載アレルゲンのうち、アミノ酸残基数が26残基以上の902種をtrue allergenとし、この配列を、(A)逆順に並べたもの、(B)window size 20でシャッフルしたもの、(C)window sizeなしでシャッフルしたもの、の3つをtrue non-allergenと定義した。これらのアレルゲンデータセットを対象に、BLAST E-value カットオフ値を様々に変えながらMotif-based法によるアレルゲン性予測を行なった結果について、真陽性(TP)、真陰性(TN)、偽陽性(FP)および偽陰性(FN)を元に、次の式で定義される精度(precision)、感度(recall; 再現性)、および確度(specificity)を算出した。

$$\text{Precision} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FP})$$

$$\text{Recall} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$$

$$\text{Specificity} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$$

②10分割交差試験法: 902種のアレルゲンデータをランダムに10分割し、一つ一つのデータセットについて、残りの9個のデータセットを用いて抽出したモチーフとシークエンスにより試験を行なった。

③とうもろこしタンパク質のアレルゲン性: とうもろこしが発現するタンパク質をランダムに50種選び、FAO/WHO法<sup>4)</sup>およびMotif-based法により解析を行なった。

## C. 研究結果 および 考察

(1) GFP 導入組換え(GM)ニワトリ肉を用いたアレルゲン性試験

(i) Non-GM及びGMニワトリ肉からの可溶性タンパク質の抽出

Non-GM及びGMニワトリ筋肉1gあたり約15mgのタンパク質が得られた。この抽出タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBBで染色した(図1a)。遺伝子組換え、非組換えニワトリ間でタンパク質のパターンはほぼ同様のパターンを示したものの、分子量26kDa、30kDa、43kDaなどのタンパク質に個体差が大きく現れた。

(ii) Non-GM及びGMニワトリ肉中のアレルゲン量の量的変化の比較

鶏肉の既知アレルゲン Chicken serum albumin (CSA) について、特異的抗体を用いた Western Blotting による Non-GM、GM 鶏肉抽出物中の発現量変化の検討を行った (図 1b)。CSA の分子量 70kDa のバンドを定量したところ、GM では Non-GM に比べ、発現量の平均値は小さいものの、有意差はみられなかった (図 1c)。

次に鶏肉抽出サンプルを 2 次元分離し、Cy5 (総タンパク質) および ECL (Rabbit anti-chicken serum albumin 抗体) で 2 重染色して既知アレルゲン CSA を検出した結果、Non-GM、GM 鶏肉共に分子量 70kDa、pI5-6 付近にスポットが検出された (図 2)。Non-GM、GM 鶏肉間で CSA の pI に大きな変化が見られなかったことから、EGFP 遺伝子導入による CSA の質的変化はみられないものと考えられた。

(iii) Non-GM 及び GM ニワトリ抽出物と、鶏肉特異的 IgE 抗体価陽性を示す患者血清との反応性の比較

CSA の他にも、未同定の鶏肉 IgE 結合タンパク質が報告されていることから、Non-GM および GM 鶏肉の抽出タンパク質を SDS-PAGE で分離し、鶏肉アレルギーをもつ患者血清との反応性をイムノブロットにより評価した。実験に使用した鶏肉アレルギー患者血清の情報、表 1 にまとめた。その結果、Non-GM・GM 共に個体差により反応性が大きく異なるものの、Non-GM と GM 群間では患者血清 IgE と結合するタンパク質の分子量に大きな違いは見られなかった (図 3)。すべての鶏肉アレルギー患者血清中の IgE は、既知アレルゲン Chicken serum albumin (CSA) と分子量の等しい 70kDa タンパク質との結合が認められた。その他、鶏肉抽出タンパク質のうち鶏肉アレルギー患者血清 IgE と結合したタンパク質には、27kDa、34kDa (Subject 4)、36kDa (Subject 1, 3)、38kDa (Subject 1, 2, 3)、45kDa (Subject 1, 3)、80kDa (Subject 1, 2, 3)、250kDa (Subject 4) の分子量のものがあり (表 2)、患者による個人差がみられた。

さらに CSA と同様に、Non-GM および GM 鶏肉抽出タンパク質を 2 次元電気泳動にて分離し、転写した膜の Cy5 (総タンパク質) および ECL (血清中特異的 IgE) による 2 重染色を行い、遺伝子組換えによる IgE 結合タンパク質の質的変動を検出した。Subject 2 の血清を用いた結果を図 4 に示す。Non-GM と GM 間では同様の IgE 結合タンパク質スポットパターンが検出され、顕著な量的あるいは pI の変化などの質的変動はみられなかった。

(iv) 二元電気泳動を用いた IgE 結合タンパク質スポットの検出および同定

患者血清を用いた実験では、既知アレルゲン CSA の他に表 2 に示した分子量の IgE 結合タンパ

ク質が検出された。そこで、まだ同定されていない IgE 結合タンパク質スポットの同定を試みた。

各患者血清の IgE 結合タンパク質スポットの 2 次元電気泳動パターンを図 5 に示す。Cy5 および ECL による 2 重染色は実験 (2) と同様に行った。Subject 1 および 3 は 1 次元イムノブロットではほぼ同様のパターンを示したため、Subject 3 の血清を用いた。その結果、34kDa タンパク質はスマア状のパターンを示したが、その他のタンパク質はスポットとして検出された。

図 5 に示した No. 1-8 のスポットをゲルから切り出し、ゲル内トリプシン消化したペプチド断片の MS/MS 解析を行い、IgE 結合タンパク質を同定したところ、表 3 に示した 7 つのタンパク質が同定された。Ovomucoid は理論分子量 24kDa のタンパク質であるが、SDS-PAGE では糖鎖修飾のために高分子量側へシフトすることが知られている。Ovomucoid (Gal d 1) と Ovalbumin (Gal d 2)、Ovotransferrin (Gal d 3) は、鶏卵のアレルゲンとしてよく知られており、今回のニワトリの筋肉サンプル採取の過程で混入した可能性が考えられる。したがって、apolipoprotein A-I precursor (27kDa) が新規の鶏肉 IgE 結合タンパク質であることが示唆された。

(v) 鶏肉サンプル中に混入した卵アレルゲンの確認

実験 (iv) より、鶏肉サンプル中への Ovomucoid および Ovalbumin の混入が疑われたため、それぞれの特異的抗体を用いた Western blotting により混入を検出した。Ovomucoid (図 6a) および Ovalbumin (図 6b) は個体によって含有量が著しく異なっており、これが患者血清との反応性に影響したものと考えられる。一方、成長したニワトリの筋肉中には Ovomucoid および Ovalbumin は検出されなかった。CSA は成長したニワトリの筋肉中にも同程度の発現が検出された (図 6c)。

(vi) キメラ鶏卵に含まれるアレルゲンの確認

卵白・卵黄抽出タンパク質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色パターンを図 7a に示した。卵白アレルゲンとして知られる Ovomucoid (図 7b)、Ovalbumin (図 7c)、Lysozyme (図 7d)、および卵黄アレルゲンとして知られる  $\alpha$ -livetin (chicken serum albumin, 図 7e) の Non-GM および GM 鶏卵間での含有量をそれぞれの特異的抗体を用いた Western blotting により比較した。Non-GM、GM 各 4 個のアレルゲン量を定量した結果、Non-GM および GM 鶏卵間でいずれのアレルゲン量も有意な変化は示さなかった。

## (2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

(実験 1) 2 回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、Vehicle 群 0.14、陰性対照とした PEP 群 0.57 に対して、陽性対照とした OVA 群は 2.86 であり、OVA 群のスコアは有意 ( $p < 0.01$ ) に高く、本モデル系が成立していることを確認した。NG 群と GM 群のスコアは Vehicle 群に対して有意 ( $p < 0.01$ ) に高く、いずれも感作が成立した。しかし、NG 群と GM 群のスコア平均はいずれも 2.43 であり、両群のスコアに統計学的に差を認めなかった (Fig. 1)。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、NG 群は 5/7 例、GM 群は 4/7 例のマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出された (図 9)。

(実験 2) SA/OVA/LL の条件で抗原を投与したマウスから経時的に採取した各組織リンパ球中の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合を表 4 に示した。いずれの採取時間においても PP、MLN および SL の CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合は無処置動物に比べて差は認められなかった。

(実験 3) 2 回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、SA/OVA/LL 群 3.50 に対して、SA/OVA/LL +  $\alpha$ -CD3 群 1.67 であり、SA/OVA/LL +  $\alpha$ -CD3 群のスコアは有意 ( $p < 0.05$ ) に低下した (図 10)。

以下、本年度の結果を考察する。

我々が開発したマウスの食物アレルギーモデルを用いて、遺伝子組換えとり肉および非組換えとり肉の食物アレルギー性を比較した。とり肉からは蛋白質濃度 4.5~8.5 mg/mL の抽出液が得られ、抽出された蛋白質は週に 2 回の経口投与で十分な感作が得られる程度に食物アレルギー性が高かった。惹起によって引き起こされたアナフィラキシー症状の程度に差が認められないこと、抗原特異的 IgG1 抗体価検出の頻度および抗体価は同レベルであったことから、遺伝子組換えとり肉および非組換えとり肉の食物アレルギー性は同等であると考えられた。

昨年の実験において、LL と SA は、感作の早い時期に蛋白質の特異性に依存せずに、免疫組織のリンパ球のポピュレーションを変化させることによって、食物アレルギーの発症に関与していることが示唆された。今年度は、ポピュレーションの変化をもたらす原因を調べる目的で、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>の発現を指標として Treg 細胞の誘導を調べた。経口投与 1 日後の MLN で最も早いポピュレーションの変化が観察されたことから、投与後 24 時間以内の Treg 細胞の誘導を調べた。その結果、いずれの組織においても Treg 細胞の割合の増加傾向は観察されなかった。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) などの自己免疫疾患モデルにおいては、Treg 細胞

が自己寛容の維持に機能していることが報告されている。本モデルにおいて、Treg 細胞の誘導が観察されなかったことは、食物アレルギー性の蛋白質の暴露に対して経口免疫寛容が維持されず、食物アレルギー成立につながることも考えられた。さらに EAE では、マウスへの抗原投与の前後に CD3 抗体を投与して Treg 細胞を誘導した結果、EAE の臨床症状が抑制され寛容が修復することも報告されている。本モデルにおいても、SA/OVA/LL に対して SA/OVA/LL +  $\alpha$ -CD3 群で食物アレルギー反応が抑制されたことから、*in vivo* での感作成立に Treg 細胞が関与している可能性が考えられた。

## (3) アレルゲン予測の解析法

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討

(a) アレルゲンに特有な断片周辺の配列

方法の項目で示した各断片の中心の周り前後 10 残基のアミノ酸分布を見たところ、ウエーブレット様の分布を示した。中心にピークを持ちその両サイドに浅い谷を持った分布である。この分布を示すアミノ酸は、電荷を持つアミノ酸 (D, E, K) と小さなアミノ酸 (A, G) である。これに対して、それと反転した分布 (中心に谷がありその両サイドに低いピークを示す分布) を示すアミノ酸もあり、芳香族のアミノ酸 (F, W, Y, H) とイオウを含むアミノ酸 (C, M) およびイミノ酸 (P) がそのようなアミノ酸である。また、このような特徴を持たないアミノ酸は、疎水性のアミノ酸 (I, V, L) と、親水的なアミノ酸 (T, S) である。これらのアミノ酸の分布に対して、一種のインデックス (アレルゲンユニーク断片インデックス: AUF インデックス) を定義した。それを用いると、各アミノ酸配列に対して、アレルゲンらしさを特徴づけるプロット (AUF プロット) を作成することができる。

FUA インデックスが高い領域は、アラニンやグリシンなどの高分子に柔軟性を与えるアミノ酸と、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどの電荷を持った非常に親水性の高い残基が中心に分布し、周辺には芳香族のアミノ酸など大きく主鎖の自由度を制限するようなアミノ酸が分布していることを意味している。アレルゲンに特有な断片は、土台の上にふらふらした親水性のセグメントをつけたような形のところとなっていることになる。

(b) 立体構造の揺らぎとの相関

図 11 は、アレルゲン Bet v1 の立体構造解析から得られる B 因子のプロットで、単独の場合 (VIII) と抗体と結合した場合 (IX) を比較し、差を取ったものがプロット (X) である。プロット VII はエピトープの部分である。右側のグラフィックスは、立体構造において結合部位の揺らぎが、

複合体形成によって大きく抑えられているところ（青色）と、揺らぎを増大させられているところ（赤色）を示している。揺らぎが抑えられているところと増大しているところがいずれも立体構造的にはかたまっていることも良く分かる。

結合部位がどのような性質を持っているかを、AUF プロット、疎水性プロットを組み合わせで解析してみると、AUF ピークでも比較的親水的な部分がエピトープと一致していることが分かった（図 12）。AUF ピークの位置を二次構造の分布と比較してみると、AUF ピークはおおむね二次構造の端に位置していることが分かる。つまり、タンパク質の外側に向いている部位でエピトープに相当する部分が AUF プロットを利用することによって予測できる可能性を示唆している。

図 2 から分かるように、AUF ピークはたくさんあり、そのうちのどの部分がエピトープになりやすいかについてはまだ十分情報が得られていない状況である。アレルゲンだけに絞って考えてみると、立体構造もエピトープの情報も得られているものは極めて限られているからである。したがって、さらに解析を進めていくには、より問題を拡大する必要がある。つまり、タンパク質—タンパク質結合の問題ととらえ、結合部位の特徴を同じアプローチで調べてみることを試みつつある。実際、図 11, 12 で示されたような AUF プロットの特徴が、より一般的なタンパク質—タンパク質相互作用の問題でも、アレルゲンユニーク断片インデックス（AUF インデックス）のプロットのピークが立体構造の揺らぎが大きいところであり、結合部の確率も高いということが分かってきている。更に詳細に検討をし、アレルゲン予測につなげたいと考える。

(ii) アレルゲンデータベース（ADFS）の構築について

今年度の追加作業により、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1339 本となった。また、エピトープ情報は 6 種のアレルゲンについて線形及びコンフォメーションエピトープ情報を加え、さらに 6 種の糖鎖自体がエピトープ活性を持つアレルゲンについても情報を加えたため（表 5）、エピトープ既知のアレルゲンの数は 76 種となった。昨年同様、エピトープ情報を集積したアレルゲンデータベースとしては、現時点で世界最大の規模である。

昨年度の作業により、ADFS では、アレルゲンが糖鎖修飾を受けていることが UniProt の情報から判別できる場合はその修飾部位と糖鎖の種類に関する「Carbohydrate Information」を提供するようになったが、本年度はさらに、糖鎖自体が IgE と結合し、好塩基球からのヒスタミン遊離を起

す場合（Olee1）や IL-4 産生を誘導する場合（Phl p 1）などについて情報を追加した。多くの IgE 結合性糖鎖は生物活性を持たず、*in vitro* の臨床試験におけるバックグラウンドの上昇に寄与していることが知られている<sup>5)</sup>。しかし少なくとも一部のアレルゲンにおける糖鎖は上記のようにアレルギーの発症に関与すると考えられており、アレルゲンデータベースが糖鎖エピトープの情報を収載することは望ましいと考える。このようなアレルゲンデータベースは今のところ ADFS 以外に存在しない。

本年度は、Stadler らの理論に従って ADFS が独自に作成したアレルゲン性予測ツールである Motif-based 法の有効性を 3 種の方法により評価した。

まず、人工生成非アレルゲンデータセットを用いた評価においては、902 本の真のアレルゲンアミノ酸配列と、その 3 倍量に当たる真の非アレルゲンアミノ酸配列とを用い、本ツールがどれだけ正しくアレルゲン性を予測できるかについて調べた。Motif-based 法では第一段階にクエリ配列とモチーフとの比較を行ない、第二段階では BLAST によるペアワイズ検索を行なう。そこで、BLAST のマトリクスやギャップペナルティなどの各種パラメータ、および E-value カットオフ値を様々に変化させ、最もパフォーマンスの優れた条件を探したところ、マトリクスとして Blosom80、開始および伸張ギャップペナルティをそれぞれ 13 および 2、フィルタを True に設定した場合であった。図 13A は従来の ADFS で用いていた BLAST パラメータによって解析した場合、図 13B は最もパフォーマンスの優れていた条件である。図 13B のうち、Precision (%), Recall (%), Specificity (%) の合計が最大になる BLAST E-value カットオフ値は  $10^{-13}$  で、このときのそれぞれの値は 100.0%、99.4%、100.0%と、極めて良好であった。この結果を受け、本年度より ADFS の Motif-based アレルゲン性予測ツールにおける BLAST のパラメータ設定は上記の組み合わせを使用することとした。E-value カットオフ値のみはユーザが任意に変更できるが、これは後に述べる理由により  $10^{-3}$  を初期値とした。

上記の試験は、リファレンスとなるデータベース中にクエリアレルゲン配列自身が含まれていることになる。そこで、実際にアレルゲン性が未知のタンパク質を本法で解析した場合を再現するため、次に 10 分割交差試験を行なった。これは、合計 902 種のアレルゲン配列をアルファベット順に 10 分割し、一つ一つのデータセットについて、自分自身を含まない他の 9 つのデータセットを用いて生成したモチーフにより解析を行なう手法であ

る。本試験においても最大のパフォーマンスを示すBLASTのパラメータ設定を使用した。各データセットにより Precision (%), Recall (%), Specificity (%) の合計が最大になる BLAST E-value カットオフ値は  $10^{-15}$  から  $10^{-3}$  までの間で変化した。これは、シークエンスを 10 分割した際のデータセットのばらつきによるものと推測される。実際にユーザが解析するクエリ配列は多様であることから、最適な E-value カットオフ値を一つ設定することは困難であり、適切な値をユーザ自身が設定すべきであると考えられる。ADFS では、最大値である  $10^{-3}$  をもってカットオフ値の初期値とすることとした。この条件における 10 分割交差試験の解析結果を示したのが表 6 である。平均すると、Precision 96.5%、Recall 85.5%、Specificity 98.9% となった。Stadler らが 2003 年に報告した時点では、同法の Precision および Recall はそれぞれ 94.8% および 86.2% であり、いわゆる FAO/WHO の方法ではそれぞれ 37.6~68.0% および 92.2~97.0% であった (Specificity は不明) [3]。これらの数値から、ADFS の Motif-based 法によるアレルギー性予測ツールの信頼性は Stadler の報告における結果とほぼ同程度で、FAO/WHO 法よりも精度の面で大きく上回っていることが分かる。

最後に、実際の作物由来タンパク質のアレルギー性を本法により調べるため、Hileman ら<sup>6)</sup>が報告の中でランダムに抽出した 50 種類のとうもろこしタンパク質について、FAO/WHO 法と本法とを比較した (表 7)。FAO/WHO 法においては、連続する 6 アミノ酸残基の完全一致をもって判定すると、50 種のタンパク質中 47 種がアレルギーであると判断され、偽陽性が極めて多いということが分かる。これに対し Motif-based 法では、アレルギーであることが既知であるタンパク質はすべて陽性判定を出していると同時に、クエリタンパク質自体のアレルギー性は知られていないが他の生物種におけるアナログがアレルギーであるような場合 (7S-globulin like GLB1-S) を正しく検出できていることが分かる。

FAO/WHO 法は、遺伝子組み換え作物に新規に導入するタンパク質のアレルギー性を予測する上では現在でも標準的な手法とされているが、その偽陽性の多さゆえに、批判も根強い<sup>7)</sup>。Stadler らが開発した Motif-based 法は FAO/WHO 法の欠点を大きく改善した有望な手法であり、それをウェブツールとして公開しているのは現在のところ ADFS のみである。しかし、ADFS の Motif-based 法のパフォーマンスを定量的に評価することはこれまで困難であった。今回、様々な角度から同法の評価を行ない、不十分であったパラメータ設定を改めるなどの作業を通じて、ADFS の

Motif-based 法が Stadler らが報告したものと同程度かそれ以上のパフォーマンスを有していることが分かった。今後は、この新しい有用なアレルギー性予測法の普及と活用に努めたいと考える。

#### D. 結論

(1) GFP 導入有遺伝子組換えニワトリを用いたアレルギー性試験

GFP 導入遺伝子組換えニワトリと非組換えニワトリ肉抽出タンパク質と鶏肉アレルギー患者血清との反応性には、大きな違いはみられなかった。広く鶏肉のアレルギーとして知られる主要アレルギーである CSA (69kD) 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、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、組換えニワトリ肉並びに非組換えニワトリ肉の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、アレルギー反応に関与する抗原特異的 IgG1 抗体産生及びアナフィラキシー症状に両者で違いはみられなかった。また、本実験系で用いたマウスを用いる経口感作の成立過程において、抑制性 T (Treg) 細胞が関与している可能性が考えられた。

(3) アレルギー予測の解析法では、

(i) 既知のアレルギーとの相同性の比較方法 - 既知のアレルギーに特徴的なアレルギーユニーク断片 (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ギー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 12 種のアレルギーのエピトープ情報を追加し、アレルギーデータセットの整備、タンパク質の相同性検索ツールである Motif-based 法の信頼性の調査研究を行った。

#### E. 参考文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/codex/codex.html>
- 2) <http://www.allergenonline.com/>
- 3) Stadler, M. B. & Stadler, B. M., FASEB J., 17: 1141-1143 (2003)
- 4) Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34, pp47-60 (2003)
- 5) van Ree, R., Int. Arch. Allergy Immunol., 129:189-197 (2002)
- 6) Hileman, R. E., et. Al., Int. Arch. Allergy



Immunol., 128:280-291 (2002)

7) Goodman, R. E., et. Al., Nature Biotechnol., 26: 73-81 (2008)

## F. 健康危険情報

なし

## 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. 31, 1079-1085 (2008)

2) 手島玲子：遺伝子組換え食品、食品衛生学雑誌 49(4), J-269- J274 (2008)

3) 手島玲子, 西島正弘：遺伝子組換え食品の安全性評価, 食品衛生研究 58(8), 51-56 (2008)

4) Nakamura R., Satoh R, Nakajima Y., Kawasaki N., Yamaguchi T., Sawada J., Nagoya H., Teshima R. Comparative Study of GH-Transgenic and Non-Transgenic Amago Salmon Allergenicity and Proteomic Analysis of Amago Salmon Allergens. (submitted)

5) Asakawa N, Sakiyama N, Teshima R, Mitaku S. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. J Investigational Allergology Clinical Immunology, submitted.

6) Kezuka Y., Itagaki T., Satoh R., Teshima R., Nonaka T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of major buckwheat allergen. submitted

### 2. 学会発表

1) 新藤智子、金澤由基子、小島幸一、手島玲子：腸管免疫を介したアレルギーマウスの食物アレルギーモデルの確立一、第 15 回免疫毒性学会 (2008.9)

2) 手島玲子：組換え植物の安全性評価の実際、平成 20 年度日本植物細胞分子生物学会市民公開シンポジウム (2008.11)

3) 佐藤里絵、中村里香、小松晃、大島正弘、手島玲子：トリプトファン含量の高い遺伝子組換えイネのアレルゲン性の解析、日本生化学第 81 年会 (2008. 12)

4) 佐藤里絵、児矢野聡、高木加代子、中村里香、澤田純一、手島玲子：ソバ主要アレルゲン Bwp16 の解析、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会

(2008.11)

6) 中村亮介, 酒井信夫, 松岡英樹, 秋山晴代, 佐藤雄嗣, 穂山浩, 手島玲子：c-kit 欠損 W/W<sup>v</sup> マウスにおけるタンパク質の経口感作とその関連遺伝子, 日本生化学第 81 年会 (2008. 12)

7) 中村里香、中村亮介、堀内浩幸、手島玲子：遺伝子組換え食品のアレルギー性評価法の確立、日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)

8) 中島亮介、中村里香、手島玲子：アレルゲンデータベース ADFS のデータ改訂について、日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)

9) 手島玲子：GM 作物の食品安全性評価の現状と課題、2009 年日本育種学会つくば大会シンポジウム (2009.3)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

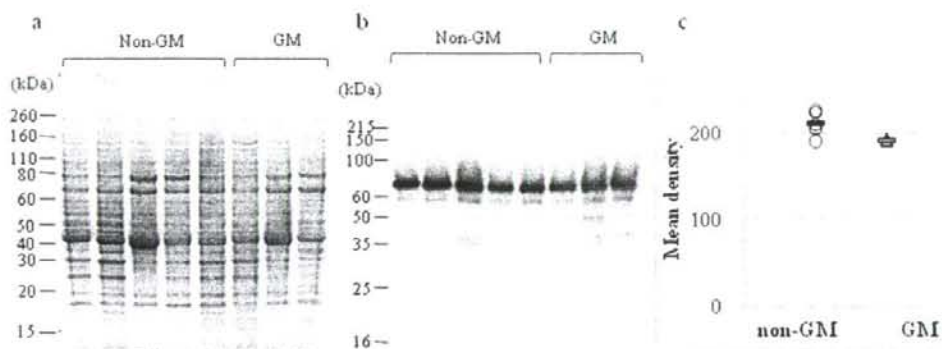
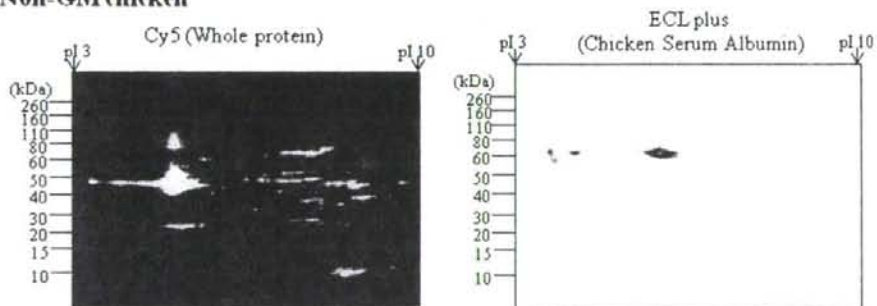


図1 鶏肉中の既知アレルゲンChicken serum albumin (CSA) の定量

- a 鶏肉抽出タンパク質CBBパターン
- b CSA特異的抗体を用いたWestern blotting
- c b で得られた分子量69kDaのバンドのdensityを計測した。

Non-GM chicken



GM chicken

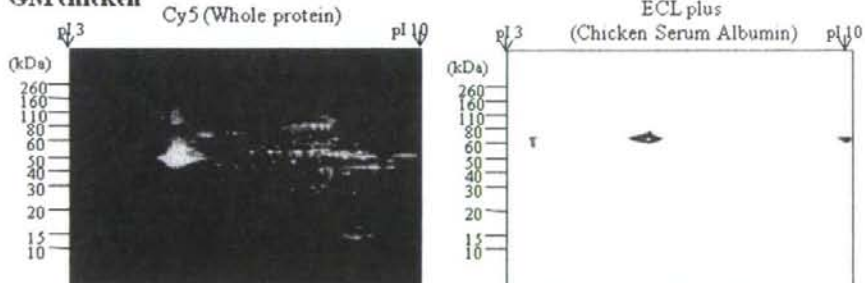


図2 2次元電気泳動によるCSAの検出

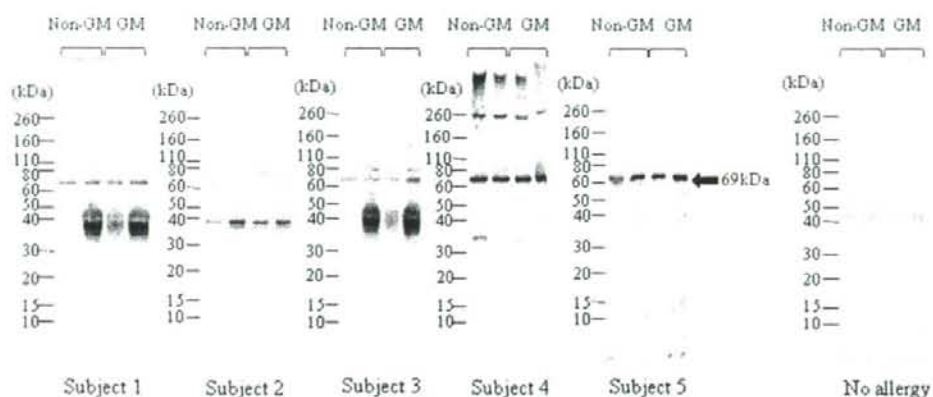


図3 Non-GM GM鶏肉の鶏肉アレルギー患者血清との反応性比較

Subject 1-5 鶏肉アレルギー患者血清 (血清情報は表1に記載)  
No allergy 健康人血清

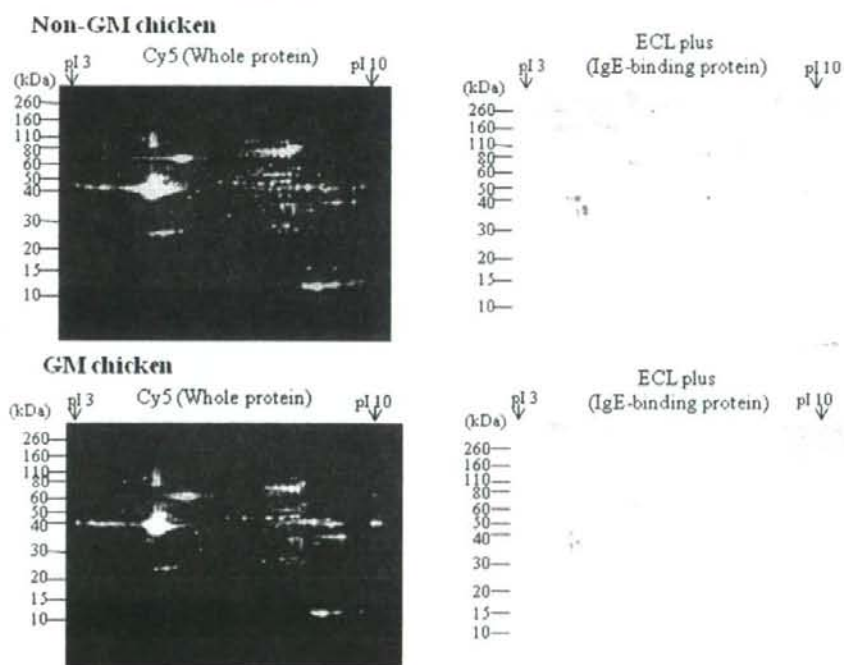


図4 2D-PAGEによるNon-GM GM鶏肉の鶏肉アレルギー患者血清との反応性比較

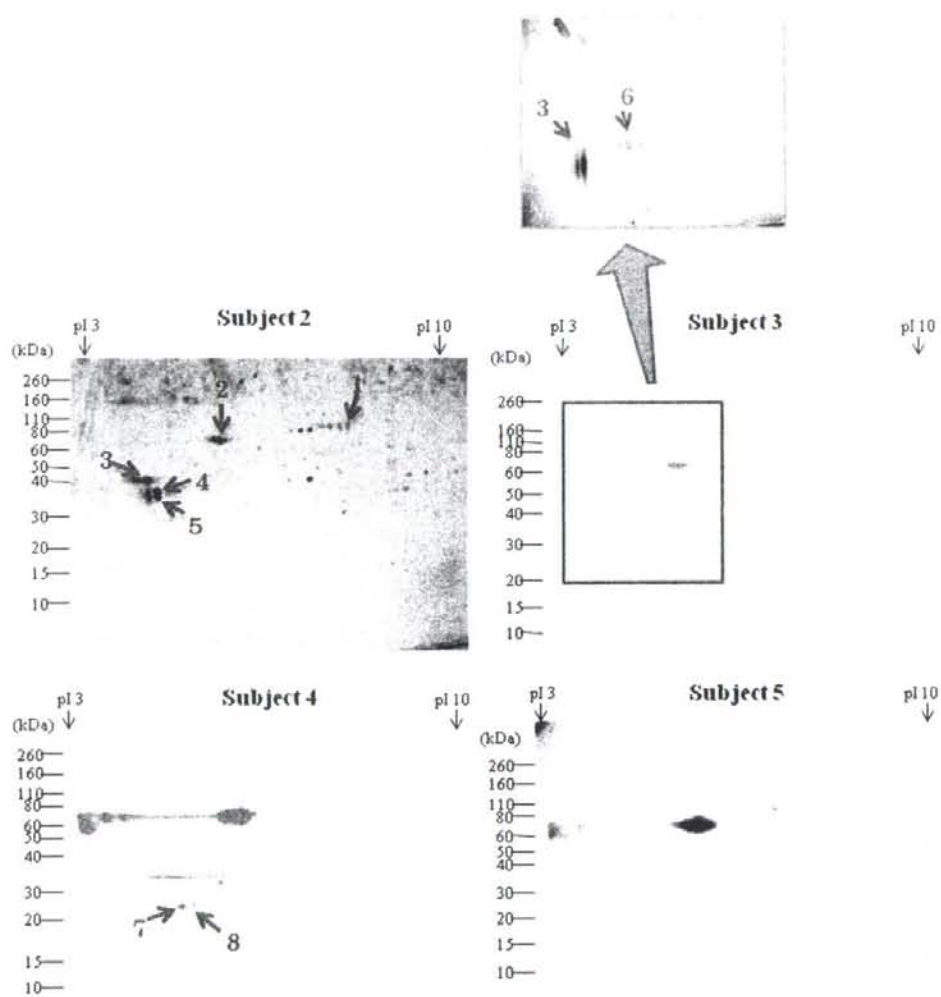


図5. Non-GM鶏肉と鶏肉アレルギー患者4名の血清I g Eとの結合タンパク質の同定  
I g E結合タンパク質スポットをナンバリングし(矢印)、MALDI-TOF-MS/MSによる解析結果を表3に示した。

	allergy to	specific IgE (IU/ml)	Immuno-CAP score	Age	Gender	Total IgE	Specific IgE score of major allergen
Subject 1	chicken meat		3	3	M	2703	ovomucoid 39.1 (4)/ mite-1 (5)/ dog epithelium (2)/ egg white (6)/ wheat (5)/ sesame (4)/ potato (4)/ apple (3)/ yolk 36.9 (4)/ melon (3)/ gelatin <0.34 (0)
Subject 2	chicken meat	18	4				penicillin (2)/ brewer's yeast (3)/ yeast (3)/ sweet potato (3)/ lamb (4)/ oat (3)/ cheese (2)/ sardine (2)/ mushroom (2)/ bee (2)/ cockroach (6)/ ant (4)/ mosquito (6)/ paracite (4)/ moth (5)/ eumycetes (2-6)/ A. niger (3)/ A. Oryzae (4)
	chicken serum albumin	28	4				
	chicken wing	11	3				
Subject 3	chicken meat	10.2	3	48	F		egg white 100 (6)/ Cow's milk >100 (6)/ Wheat >31.4 (4)/ Casein >100 (6)
Subject 4	chicken meat	41.8	4	33	M		Soya bean 71.6 (5)/ Pork 6.35 (3)/ Beef 11.8 (3)/ Rice 23.3 (4)/ Turkey meat >100 (6)/ nBos d 5 b-lactoglobulin, Milk 4.93 (3)/ Mutton 10.9 (3)
Subject 5	chicken meat	59.2	5				cat epithelium and dander 12.8 (3)/ dog epithelium 0.42 (1)/ horse dander <0.1 (0)/ cow dander 0.14 (0)/ dog dander 0.82 (1)/ egg white 0.55 (1)/ wheat 0.81 (2)/ egg yolk 62.3 (5)/ cockroach, German 2.66 (2)/ Brewer's yeast <0.1 (0)/ Mango 0.66 (1)/ Banana <0.1 (0)/ Garasspanel 1.0.23 (0)/ Moth 0.92 (2)/ Mold-panel 1.9.18 (3)/ Tree-panel 1.0.13 (0)/ Weed-panel 1.1.42 (2)
	chicken feathers	45.2	4	39	F	748.18	

表1 評価に用いた鶏肉アレルギー患者情報

Subject MW (kDa)	1	2	3	4	5
30	○	○	○		
69 (CSA)	○	○	○	○	○
45	○		○		
38	○	○	○		
36	○		○		
34				○	
27				○	

表2 鶏肉アレルギー患者血清 I g E 結合タンパク質 (図3より)

Spot	Protein Hits	GI	MW (Da)	pI	Sequence coverage	Matched peptide
1	ovotransferrin BB type (Gallus gallus)	71274075	79606	6.85	12%	4
2	albumin (Gallus gallus)	45383974	71868	5.51	10%	4
3	Ovomucoid precursor (Allergen Gal d 1) (Gal d I)	124757	23660	4.75	25%	2
4	Vimentin Tropomyosin beta chain (Tropomyosin 2) (Beta-tropomyosin)	57240090	30092	4.75	17%	2
		136089	32871	4.69	7%	2
5	Apolipoprotein A-IV (Gallus gallus)	45384392	40828	4.8	13%	3
6	Ovalbumin (Plakalbumin) (Allergen Gal d 2) (Gal d II)	129293	43196	5.19	30%	8
7	apolipoprotein A-4 precursor	211146	30672	5.97	7%	2
8	apolipoprotein A-4 precursor	211146	30672	5.97	14%	4

表3 MALDI-TOF-MS/MSによる I g E 結合タンパク質の同定結果

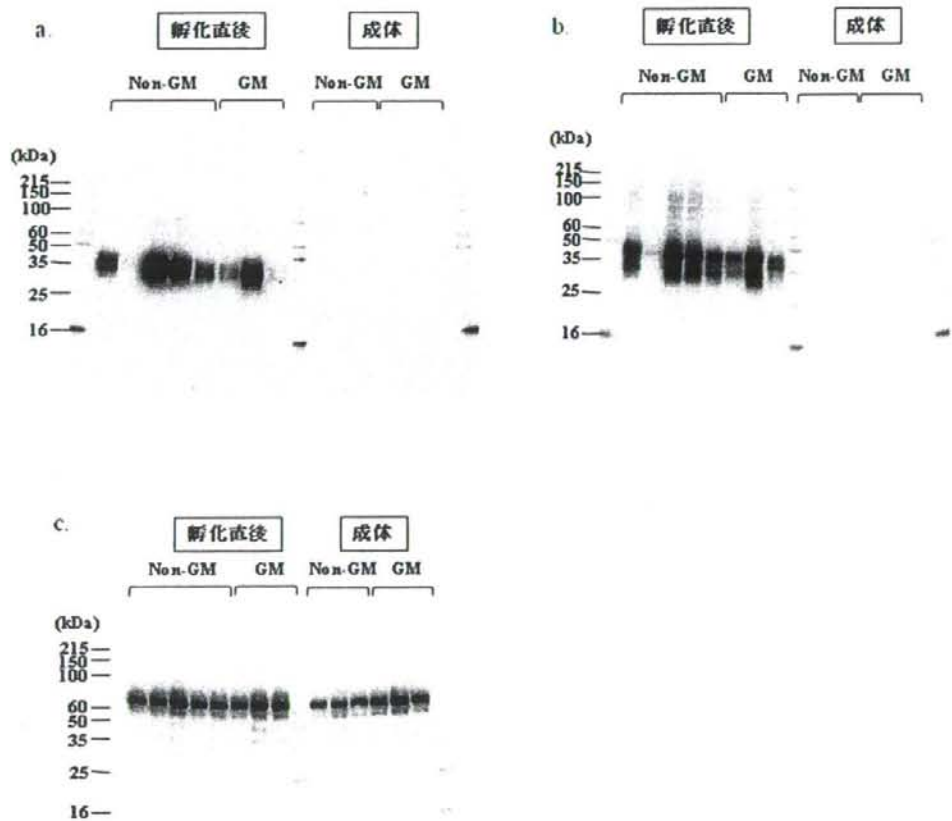


図6. 孵化直後および成体の鶏肉に含まれるアレルゲンタンパク質の検出

- a. Ovomucoid特異的抗体を用いたWestern blot
- b. Ovalbumin特異的抗体を用いたWestern blot
- c. CSA特異的抗体を用いたWestern blot

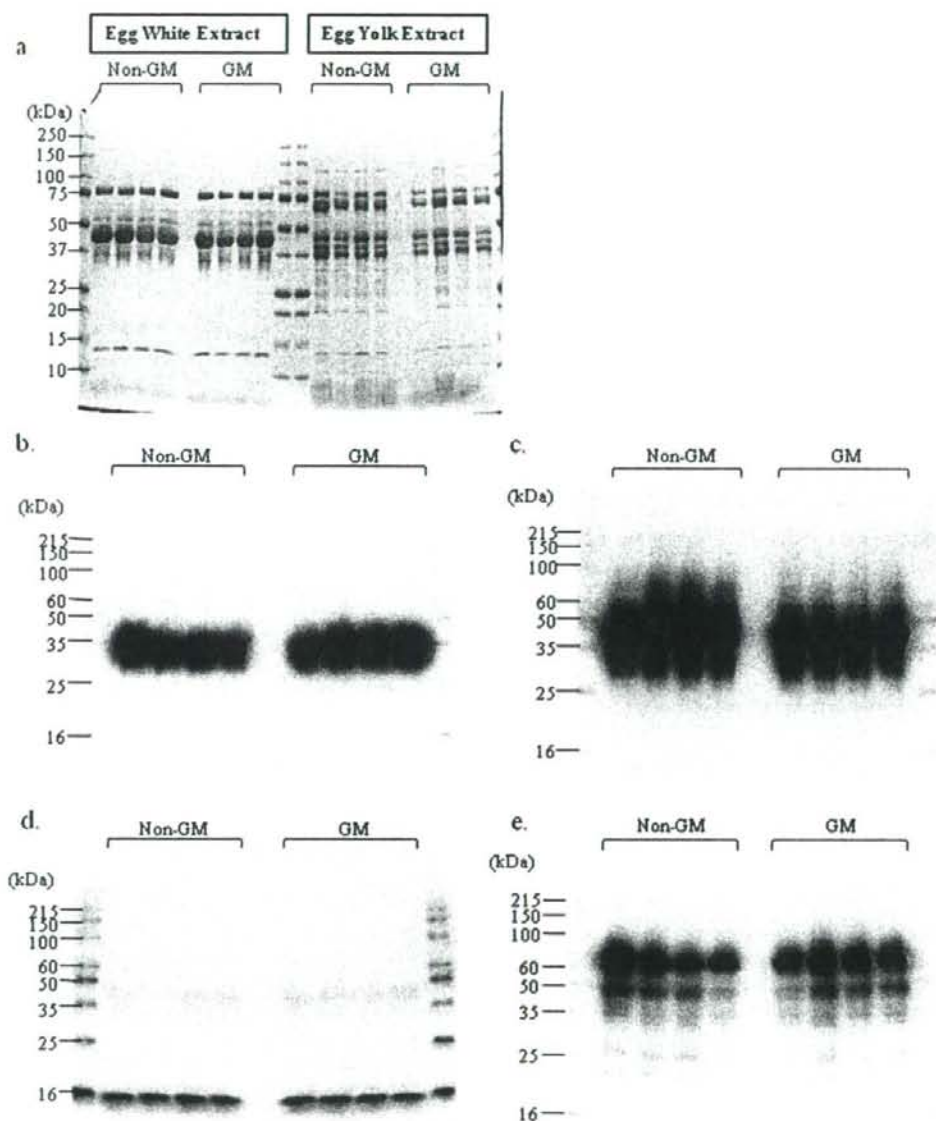


図7. Non-GM GM鶏卵に含まれるアレルゲンタンパク質の検出

- 卵白 (Egg White) および卵黄 (Egg Yolk) 抽出タンパク質のCBEB染色パターン
- Ovomucoid特異的抗体を用いたWestern blot
- Ovalbumin特異的抗体を用いたWestern blot
- Lysozyme特異的抗体を用いたWestern blot
- CSA ( $\alpha$ -livetin) 特異的抗体を用いたWestern blot

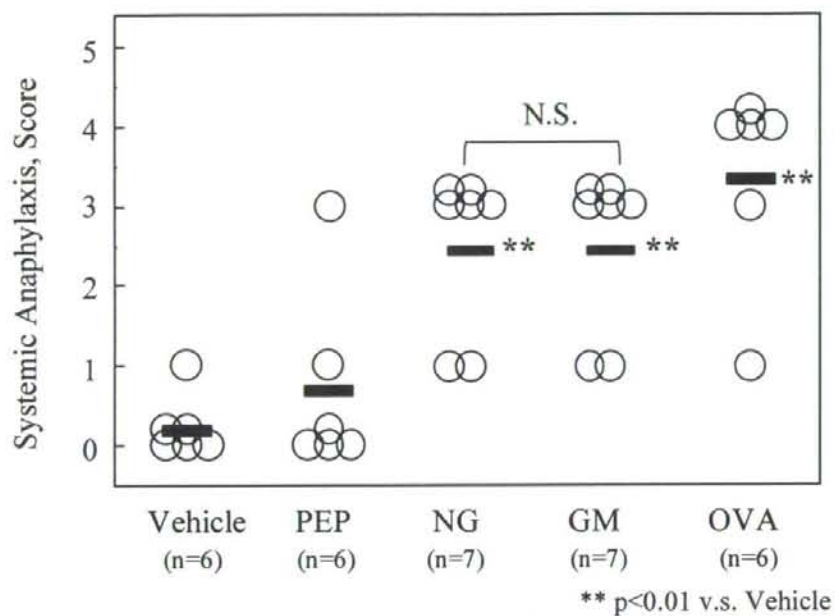


Fig 8 Antigen-induced systemic anaphylactic scores at the 2nd challenge

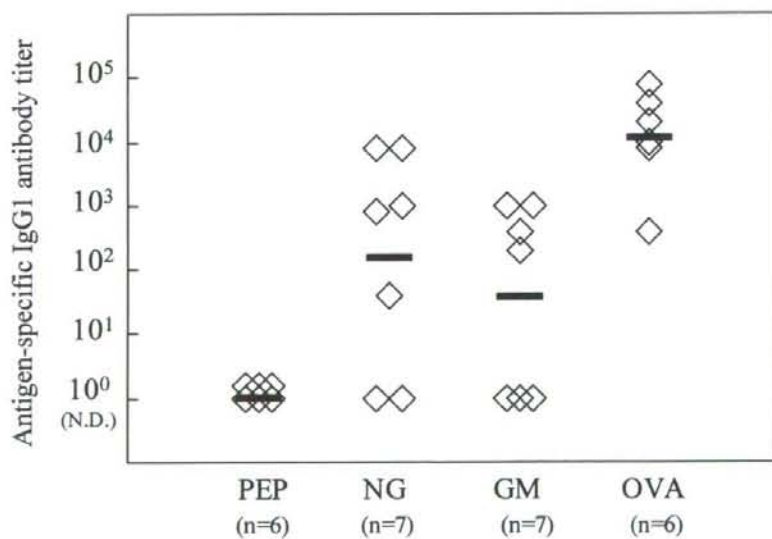


Fig 9 Comparison of the serum level of antigen-specific IgG1 antibody



表 4 Population of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> lymphocytes from Peyer's patch (PP), mesenteric lymph node (MLN) and spleen (SL) in SA/OVA/LL group mice.

Tissue	The percentages of CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> populations within lymphocytes						
	Hours after oral administration						
	Naive	0.5	1	3	6	12	24
PP	1.7±0.4	1.2±0.6	1.9±1.0	1.0±0.4	1.8±0.2	1.7±0.2	1.5±0.3
MLN	5.5±0.7	4.6±0.7	4.8±1.6	5.5±0.4	6.0±0.5	6.4±0.9	5.7±0.9
SL	2.8±0.7	3.3±0.2	3.5±0.6	3.0±0.3	3.8±0.1 *	3.3±0.3	3.1±0.2

\* p<0.05

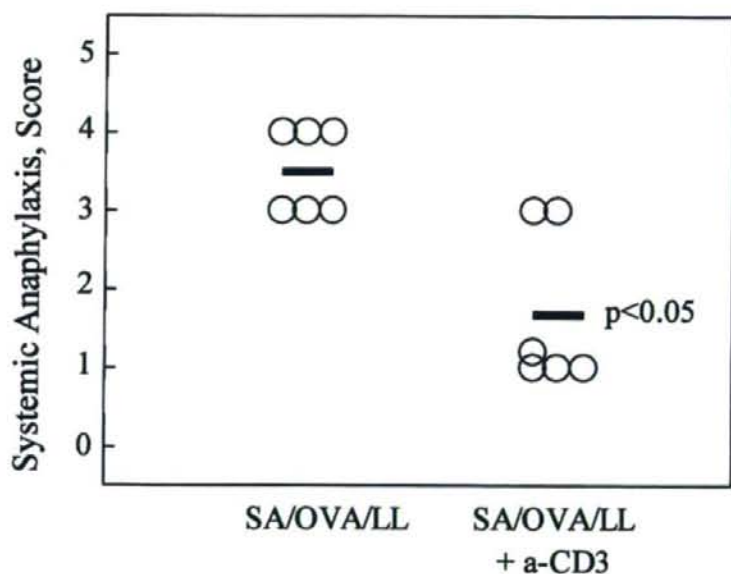


图 10 Effect of anti-CD3 antibody on systemic anaphylactic score in murine food allergy model

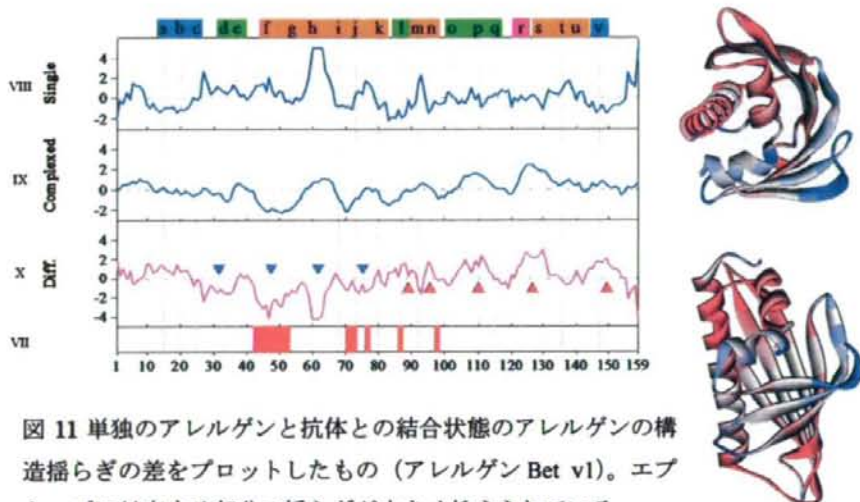


図 11 単独のアレルゲンと抗体との結合状態のアレルゲンの構造揺らぎの差をプロットしたもの（アレルゲン Bet v1）。エプトープに対応する部分の揺らぎが大きく抑えられている。

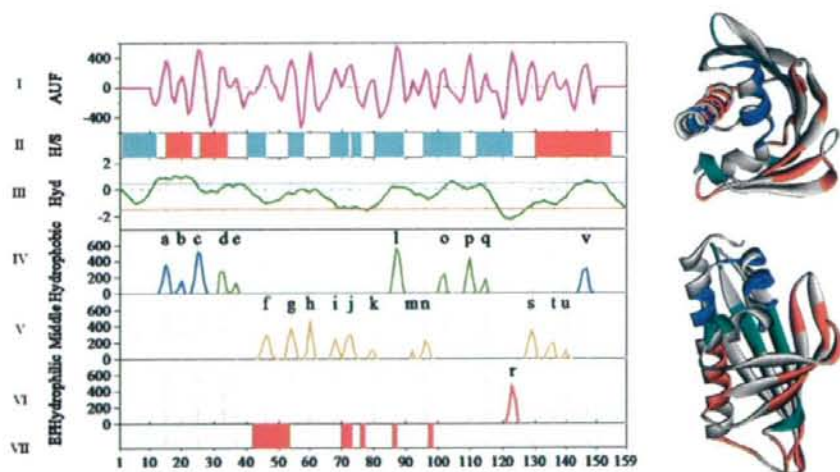


図 12 アレルゲン Bet v1 に関する AUF プロットによる解析。AUF ピークを疎水性によって分類してみると、比較的親水的な AUF ピークがエプトープとよく一致していた。

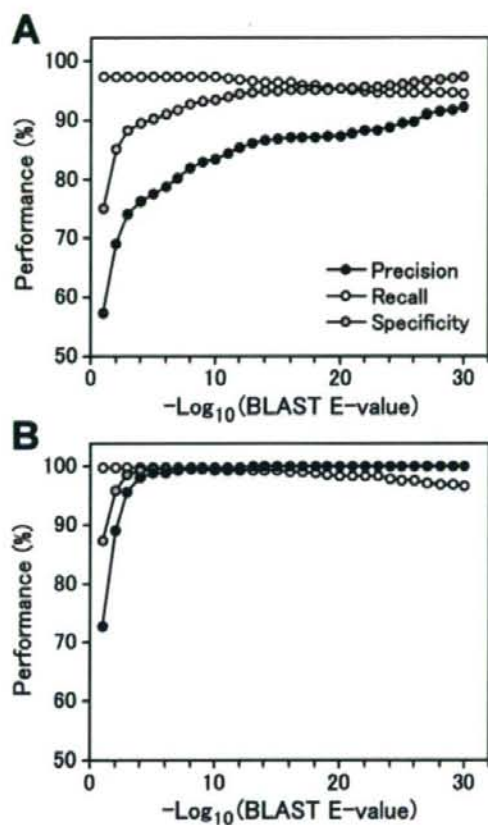


図13 Motif-based法のパフォーマンス

902種のアレルゲンおよびそれをランダム化して得られた2706種の非アレルゲンに対して旧来(A)および本年度作業後(B)のADFSにおけるMotif-based法のパフォーマンスを示す。精度(●)、感度(O)および確度(O)の定義については本文を参照。Bにおいて最も良好な結果を示したのは、BLASTのE-valueカットオフ値として $10^{-13}$ を用いた場合であった。

表5 平成20年度 ADFS に追加したエピトープ情報

## (a) (ペプチド)

Epitope	N	Type	start	end	Sequence	Description	Method	CTYPE	Allergen	Reference (PMID)	UniProt No.
001	1	IgE	72	86	NISGHCSOCTFLGEE		ELISA	L	Ziz m 1	18435802	Q2VST0
001	2	IgE	292	320	VWNRYYDLKTNYSSEILEYVNSGTXYL		ELISA	L	Ziz m 1	18435802	Q2VST0
001	3	IgE	282	301	VWNRYYDLKT		ELISA	L	Ziz m 1	18435802	Q2VST0
002	1	IgE	25	34	AEVDCSRFFN	long-term persistent	Spots	L	Gai d 1	17573723	P01005
002	2	IgE	33	44	PHATDKFKVDL	long-term persistent	Spots	L	Gai d 1	17573723	P01005
002	3	IgE	71	80	SIEFGTNSK	long-term persistent	Spots	L	Gai d 1	17573723	P01005
002	4	IgE	137	148	VEGGASVYDKRHD	long-term persistent	Spots	L	Gai d 1	17573723	P01005
003	1	IgE	561	578	MOGQVQKYGTFCNKRLA		Inhibition-ELISA	L	Ari s 7	18186812	A5XBJ8
004	1	IgE	360	365	ATPTPT		Spots	L	Ole s 9	18096638	Q94G86
004	2	IgE	372	381	WCVPKPQVSD		Spots	L	Ole s 9	18096638	Q94G86
004	3	IgE	400	409	PIQPGGACFE		Spots	L	Ole s 9	18096638	Q94G86
004	4	IgE	430	436	RNSWNC		Spots	L	Ole s 9	18096638	Q94G86
005	1	IgE	32	45	CEKDERFFSDKIAK	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	2	IgE	38	47	FFSDKIAKYI	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	3	IgE	44	57	AKYPIQYVLSRYP	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	4	IgE	50	63	QYVLSRYPYGLNY	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	5	IgE	74	87	NQLPIYPIYAKPAA	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	6	IgE	88	99	VRSFAGILQWQV	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	7	IgE	118	129	RHPHRLSFMAL	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	8	IgE	122	165	PHLSFMALPKKNG	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	9	IgE	132	145	KKNQDKTEPTNT	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	10	IgE	158	169	EAVESTVATLED	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
005	11	IgE	174	187	IESPPIENTVQVTS	acids shown in red lead to a decrease of IgE binding	directed mutagenesis	L	Bos d 8 (kappa)	18186809	P02668
006	1	IgE			LRTPDRAVSPY	IgE mimotope (37-46 + 70-78)	phage display	C	Phu p 3	18242709	P81402
006	2	IgE			NHLRTDASIP	IgE mimotope (35-46 + 76-78)	phage display	C	Phu p 3	18242709	P81402

## (b) (糖鎖)

Sugar	N	Type	Treatment of allergens	Method	Description	Allergen	Reference (PMID)	UniProt No.
001	1	IgE	recombinant protein PNGase A,	histamine release from human basophils	predominant glycan MMXF	Lyc e 2	12631291	Q41215, P29000
002	1	IgE	trifluoromethanesulfonic acid (TFMS)	histamine release from human basophils	predominant glycan (MUXF, MMXF)	Api g 5	12958180	P81943
003	1	IgE	recombinant protein	histamine release from human basophils		Cup a 1	12569984	Q9SCG8
004	1	IgE	PNGase F	histamine release from human basophils	glycosylation site at the Asn-111	Ole e 1	9893198	P19963
005	1	IgE	recombinant protein	IL-4 release from human basophils		Phi p 1	15195999	P43213
006	1	IgE	recombinant protein	IL-4 release from human basophils		Phi p 13	15195999	Q9XG86