

することができた。患者血清を用いた ELISA および阻害 ELISA の結果から、rSCP の IgE 反応性は天然 SCP と同等であると判断された。 5) ブラックタイガーSCP の IgE エピトープ：SCP は Ca^{2+} 結合性タンパク質であるが、ブラックタイガーSCP からキレート剤 (EGTA) を用いて Ca^{2+} を除去すると、IgE 反応性は約半分に低下することを見いだした。また、CD スペクトルの測定により、ブラックタイガーSCP の立体構造は Ca^{2+} 除去により少し変化することが判明した。次に、ブラックタイガーSCP の全長をカバーするオーバーラップペプチドを合成したが、いずれのペプチドにも IgE 結合能は認められなかった。これらの結果から、ブラックタイガーSCP の IgE エピトープは立体構造のみに依存していると考えられた。 6) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定：クロアワビに検出された 100 kDa の新規アレルゲンを、塩溶性タンパク質画分から硫酸塩析 (10-20%飽和) およびヒドロキシアパタイト HPLC により精製し、部分アミノ酸配列分析によりパラミオシンであることを明らかにした。患者血清を用いた ELISA では、患者 18 人中 16 人がクロアワビトロポミオシンに反応し、またトロポミオシンに反応した患者はすべてクロアワビパラミオシンにも反応した。免疫ブロッティングにより、IgE 陽性反応を示すパラミオシンは軟体動物にかなり広く分布すると推定された。さらに、阻害免疫ブロッティングおよび阻害 ELISA により、パラミオシンはトロポミオシンと抗原交差性を示すという非常に興味深い事実が判明した。 7) クロアワビパラミオシンの一次構造解析：クロアワビの新しいアレルゲンとして同定したパラミオシンについて、部分アミノ酸配列情報をもとに cDNA をクローニングし、全アミノ酸配列 (860 残基) を解明した。クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンとは約 70% という高い相同性を示したが、アレルゲンとして同定されているダニ類やアニサキスのパラミオシンとの相同性は約 35% であった。 8) 魚類 ELISA 検知法の開発：マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を作製し、魚類を検知するサンドイッチ ELISA 系を構築した。本サンドイッチ ELISA は、マサバパルブアルブミンとの反応性を 100% とした場合、各種魚類パルブアルブミンと 22.6-99.0% の反応性を示し、さらに 22 魚種からの抽出液のすべてと反応した。検出限界は 0.23 μg (魚類タンパク質) /g (食品)、定量限界は 0.70 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。5 種類のモデル加工食品を用いて試験室間バリデーションに供したところ、添加した魚類タンパク質の回収率は 69.4-84.8%、併行精度は 1.2-3.3%、室間精度は 3.1-10.5% と良好であった。また、各種市販加工食品を分析した場合、偽陰性あるいは偽陽性はほとんど認められなかった。

A. 研究目的

これまでの研究により、魚類の主要アレルゲンはパルブアルブミン、甲殻類および軟体動物の主要アレルゲンはトロポミオシンであることが明らかにされている。しかし、魚貝類は種類が多いので、これら主要アレルゲンの IgE エピトープや一次構造に関する情報は十分とはいえない。また、主要アレルゲン以外のアレルゲンも同定されているが、その性状も十分には解明されていないし、さらに未知アレルゲンの存在も報告されている。このよう背景のもとに本研究では、魚貝類アレルギーを分子レベルで理解し、また魚貝類アレルギーの診断・治療に資すること目的として、各種魚貝類アレルゲンに関する分子生物学的性状の解明を行った。一方、魚類は重要なアレルギー原因食品で、わが国をはじめとした多くの国でアレルギー表示対象となっているが、その検知法は開発されていない。そこで本研究では、加工食品に含まれる魚類を定量的に検知するサンドイッチ

ELISA 法の開発もあわせて行った。

B. 研究方法

1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と降海型 (サクラマス) のパルブアルブミン比較

加熱抽出液の調製：ヤマメおよびサクラマスの背側普通肉をそれぞれ 3 倍量の PBS (0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0) とホモジナイズし、ホモジネートを 80 °C の温浴中で 20 min 加熱した。冷却後、遠心分離し、得られた上清を加熱抽出液とした。

精製方法：加熱抽出液を Sephacryl S-100 カラム (2.5 x 105 cm) に添加し、PBS で溶出した。溶出液は 10 mL ずつ分取し、280 nm の吸光度を測定するとともに、抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体との反応を ELISA で調べた。ELISA 陽性フラクションを集め、次に TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm) を用いた逆相

HPLC に供した。カラムは 0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルの濃度勾配により、流速 1 mL/min で溶出した。220 nm における吸光度を UV 検出器でモニターしながら、ピークに対応する溶出液を手動で分取し、抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体との反応を ELISA で調べた。

SDS-PAGE : SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (GE Healthcare) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare) を使用した。泳動に先立ち、試料を 5% ジチオスレイトール-2.5% SDS に溶解し、沸騰浴中で 10 min 加熱変性した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

ELISA : 加熱抽出液中のパルブアルブミン濃度の測定および精製過程でのパルブアルブミンの検出には可視光 ELISA を用いた。試料 50 μ L を 96 ウェル平底プレート (ELISA 用プレート H タイプ; 住友ベークライト) に固相化後、1 次抗体である抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (1 : 5000 ; Sigma-Aldrich) 50 μ L、2 次抗体である HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:10000 ; Kirkegaard & Perry Laboratories) 50 μ L と順次反応させた。次いで基質溶液 (0.1% α -フェニレンジアミンおよび 0.03%過酸化水素を含む 0.05 M リン酸-クエン酸緩衝液、pH 5.0) を用いて酵素反応を行い、490 nm の吸光度を測定した。パルブアルブミンの定量のためには、マサバパルブアルブミン (0.03-10 μ g/mL) を用いて検量線を作成した。一方、加熱抽出液と患者血清 (パルブアルブミンを認識する 5 名の患者からのプール血清またはコラーゲンを認識する 4 名の患者からのプール血清) との反応は蛍光 ELISA で調べた。この場合、適宜希釈した加熱抽出液 50 μ L を 96 ウェル平底プレート (ELISA 用プレート H タイプ (黒); 住友ベークライト) に固相化し、1 次抗体には患者血清 (1:250) を、2 次抗体には β -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (0.25 μ g/mL; American Qualex) を用いた。酵素反応には 0.01% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-1 mM MgCl₂-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、励起波長 367 nm、蛍光波長 453 nm で蛍光強度を測定した。

分子量の測定 : 精製パルブアルブミンの分子量

は 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) を用いて分析した。試料溶液 1 μ L (数 10 pmol の試料を含む) とマトリックス溶液 (10 mg/mL の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸溶液) 4 μ L をサンプルチューブの中で混ぜ、1 μ L をサンプルプレート (Opti-TOF 96 Well Insert, 123 x 81 mm ; Applied Biosystems) の上にアプライして乾燥後、測定に供した。

2) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

加熱抽出液の調製 : チダイの背側普通肉を 3 倍量の PBS (0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0) とホモジナイズし、ホモジネートを 80 °C の温浴中で 20 min 加熱した。冷却後、遠心分離し、得られた上清を加熱抽出液とした。

精製方法 : 加熱抽出液を Sephadex G-75 カラム (2.5 x 100 cm) に添加し、PBS で溶出した。溶出液は 10 mL ずつ分取し、各フラクションについて 280 nm の吸光度を測定するとともに、SDS-PAGE に供した。PA I および PA II を含むフラクションを集め、次に TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm) を用いた逆相 HPLC に供した。カラムは 0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルの濃度勾配により、流速 1 mL/min で溶出した。220 nm における吸光度を UV 検出器でモニターしながら、ピークに対応する溶出液を手動で分取した。対照として用いたマアジおよびマサバのパルブアルブミンも、同様にゲルろ過と逆相 HPLC の組み合わせで精製した。なお、マアジおよびマサバの場合、パルブアルブミンは 1 成分でアイソフォームはほとんどみられない。

SDS-PAGE : SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (GE Healthcare) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare) を使用した。泳動に先立ち、試料を 5% ジチオスレイトール-2.5% SDS に溶解し、沸騰浴中で 10 min 加熱変性した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

リシルエンドペプチダーゼ分解 : 精製アレルゲン (50 μ g) を 1 mL の 2 M 尿素-1 mM EDTA-0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、1 μ g のリシルエンドペプチダーゼを添加して 37 °C で 24 h 消化した。酵素消化物を TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm) を用いた逆相 HPLC に供し、

0.1 %トリフルオロ酢酸溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配 (0-70 %、120 min) により流速 1 mL/min で溶出した。溶出液の 220 nm における吸光度を UV 検出器で連続的に測定し、各ピークに対応する溶出液を分取した。

アミノ酸配列分析：アミノ酸配列は 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) を用いて分析した。試料溶液 1 μ L (数 10 pmol の試料を含む) とマトリックス溶液 (10 mg/mL の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸溶液) 4 μ L をサンプルチューブの中で混ぜ、1 μ L をサンプルプレート (Opti-TOF™ 96 Well Insert, 123 x 81 mm ; Applied Biosystems) の上にアプライして乾燥させた後、MSMS 1kv Positive 測定メソッドで分析した。

ELISA：ウサギ抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体およびマウス抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) とパルブアルブミンとの反応性は可視光 ELISA で調べた。試料 50 μ L を 96 ウェル平底プレート (住友ベークライト) に固相化後、1 次抗体であるウサギ抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体 (1:5000) またはマウス抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (1:5000) 50 μ L、2 次抗体である HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:10000、American Qualex ; 1 次抗体にポリクローナル抗体を用いた場合) または HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:10000、Kirkegaard & Perry Laboratories ; 1 次抗体にモノクローナル抗体を用いた場合) 50 μ L と順次反応させた。次いで基質溶液 (0.1% α -フェニレンジアミンおよび 0.03% 過酸化水素を含む 0.05 M リン酸-クエン酸緩衝液、pH 5.0) を用いて酵素反応を行い、490 nm の吸光度を測定した。一方、パルブアルブミンと患者血清との反応性は蛍光 ELISA で調べた。この場合、適宜希釈した試料溶液 50 μ L を 96 ウェル平底プレート (ELISA 用プレート H タイプ (黒) ; 住友ベークライト) に固相化し、1 次抗体には患者血清 (1:250) を、2 次抗体には β -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (0.25 μ g/mL; American Qualex) を用いた。酵素反応には 0.01% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-1 mM MgCl_2 -0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、励起波長 367 nm、蛍光波長 453 nm で蛍光強度を測定した。

cDNA クローニング：生きているチダイから背

側普通肉を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて total RNA を抽出した。total RNA から mRNA Purification Kit (GE Healthcare) を用いて mRNA を精製し、さらに Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて Marathon cDNA ライブラリーを作製した。Marathon cDNA ライブラリーは 3'RACE および 5'RACE のテンプレートとして用いた。まず、既報の魚類パルブアルブミンのアミノ配列から保存性が高い領域に着目して設計したフォワードプライマー (PA-F、5'-TTGAGGAGGAGGAGCTGAAGCT-3') と API アダプタープライマーの組み合わせで 3'RACE を、リバープライマー (PA-R、5'-AGCTTCAGCTCCTCCTCCTCAA-3') と API プライマーとの組み合わせで 5'RACE を行った。PCR 増幅産物は pT7Blue-2 T-Vector (Novagen) にサブクローニング後、PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を分析した。データ解析には解析ソフト SeqEd Version 1.0.3 (Perkin Elmer) を用いた。次いで、得られた部分塩基配列をもとに、PA I の場合は遺伝子特異的フォワードプライマー (PA I-F、5'-CCTTCAAAGGACTGCAGGAT-3') と API プライマーを用いた 3'RACE に、PA II の場合は遺伝子特異的フォワードプライマー (PA II-R、5'-TGCCTTAACAAGGGCAGCAAA-3') と API プライマーを用いた 5'RACE に供した。増幅産物はサブクローニング後、塩基配列を解析した。

3) 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造解析

cDNA ライブラリーの作製：生きているブラックタイガーおよびクルマエビから尾肉を、生きているズワイガニから脚肉を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて total RNA を抽出した。total RNA から mRNA Purification Kit (GE Healthcare) を用いて mRNA を精製し、さらに Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて Marathon cDNA ライブラリーを作製した。Marathon cDNA ライブラリーは以下の cDNA クローニング実験のテンプレートとして用いた。

ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP をコードする cDNA のクローニング：ブラックタイガー SCP については、すでにならわっている部分アミノ酸配列データをもとに degenerate リバープライマー (bla-r) を設計し、アダプタープライマー (API) と組み合わせで 5'RACE を行った。

PCR 増幅産物は pT7Blue-2 T-Vector (Novagen) にサブクローニング後、塩基配列を解析した。次いで、5'RACE により明らかになった塩基配列から設計した遺伝子特異的フォワードプライマー (bla-gsp-f) と AP1 プライマーを用いて 3'RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。クルマエビ SCP についても、同じ戦略で 5'RACE および 3'RACE を行い、コードする全長 cDNA の塩基配列を解析した。

ズワイガニの SCP をコードする cDNA のクローニング: ズワイガニについては、既報の甲殻類 3 種 (コウライエビ *Fenneropenaeus orientalis*、ザリガニ類 *Pontastacus leptodactylus*、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii*) の SCP のアミノ酸配列および本研究で解析したブラックタイガー SCP のアミノ酸配列から保存性の高い領域を選び、その領域について塩基配列情報のあるブラックタイガーとアメリカザリガニの塩基配列をもとに 2 つのプライマー (crab-f および crab-r) を設計した。これら 2 種類のプライマーとアダプタープライマーとを組み合わせて RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

4) ブラックタイガー SCP の大腸菌における発現

大腸菌における発現および精製: ブラックタイガー SCP を、pFN6A (HQ) Flexi vector (Promega) を用いて HisGln (HQ) タグつきタンパク質として大腸菌で発現した。まず、ブラックタイガー SCP をコードする cDNA を、Sgf I 認識部位をもつフォワードプライマーおよび Pme I 認識部位をもつリバースプライマーを用いて増幅した。増幅産物および pFN6A (HQ) Flexi vector を Sgf I と Pme I で消化後、ライゲーションした。大腸菌 (Single Step (KRX) Competent Cells ; Promega) をライゲーション産物で形質転換し、0.01% X-gal、0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) および 0.01% ampicillin を含む LB agar plate で、37 °C、一晚培養した。形成された形質転換体の中からシングルコロニーを採取し、0.01% ampicillin を含む 5 mL の LB 培地で 7 °C、一晚培養した。得られた培養液の全量を 0.01% ampicillin を含む LB 培地 500 mL に植菌し、37 °C で OD_{600nm} が 0.6 に達するまで振とう培養した。その後、ラムノースおよび IPTG をそれぞれ終濃度が 0.1% および 1 mM となるよう添加し、さらに 37 °C、3 h 振とう培養を行って HQ タグつきタンパク質の発現誘導を行った。遠心分離により集めた菌体に

1 mM PMSF-0.5 M NaCl-20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 25 mL を加えて懸濁し、250 μ L の 10 mg/mL lysozyme-Dulbecco's PBS を加え、4 °C で 1 h 穏やかに振とうして大腸菌を溶菌させた。さらに、超音波破碎機 (UP2005 型、Dr. Hielscher) を用いて破碎した後、遠心分離した。得られた上清を HisTrap Chelating HP カラム (GE-Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供した。カラムに吸着した HQ タグつき SCP は 500 mM イミダゾールで溶出した。

天然 SCP (nSCP) の精製: nSCP は、既報 (Shiomi et al. Int Arch Allergy Immunol 2008; 146: 91-98) に従って硫酸塩析 (70-90%飽和) およびヒドロキシアパタイト HPLC により精製した。

ELISA および阻害 ELISA: HQ タグつきの組換え SCP (rSCP) の IgE 反応性は、nSCP と比較しながら上述した蛍光 ELISA で調べた。rSCP および nSCP は種々の濃度でマイクロプレートに固相化し、患者血清 (SCP を認識することが判明している 5 人の患者からのプール血清) との反応を調べた。また、阻害 ELISA では、患者血清を種々の濃度の rSCP または nSCP とインキュベート後、固相化している rSCP または nSCP (固相化濃度は 1 μ g/mL) と反応させた。

5) ブラックタイガー SCP の IgE エピトープ

ブラックタイガー SCP の IgE 反応性に及ぼす Ca²⁺の影響: ブラックタイガー SCP の IgE 反応性を、キレート剤 (EGTA) の非存在下 (Ca²⁺保持) および存在下 (Ca²⁺除去) での蛍光 ELISA により調べた。プレートには SCP (1 μ g/mL) を固相化し、5 mM EGTA を含まないまたは含む患者血清と反応させた。

円偏光二色性 (CD) スペクトル: CD スペクトルの測定には JASCO J-720 spectropolarimeter を用いた。ブラックタイガー SCP を、0.15 M NaCl-0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) または 5 mM EGTA-0.15 M NaCl-0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に 50 μ g/mL の濃度で溶解し、190-250 nm の範囲で CD スペクトルを測定した。測定は 7 回繰り返し、データは平均値で示した。

ペプチドの合成: ブラックタイガー SCP の全長をカバーするように、10 残基ずつずらした 20 残基 (C 末端ペプチドのみ 23 残基) のペプチド 18 種類を PMMS-8 peptide synthesizer (島津製作所) を用いて合成した。合成後、逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) で精製し、正しく合成されたかどうか

かは 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer を用いた分子量測定により確認した。

ペプチドの IgE 反応性：ペプチドの IgE 反応性は、プレートに Nunc Immobilizer Amino plate for peptide (Nagel Nunc International) を用いた蛍光 ELISA により調べた。ペプチドは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で固相化し、上述の蛍光 ELISA 法に準じて行った。

6) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

精製方法：クロアワビの筋肉 (5 g) を液体窒素を用いて凍結粉碎後、20 mL の 0.5 mM Cys-0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加えてホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離し、得られた上清を水溶性タンパク質画分とした。沈殿に 20 mL の同じ溶媒を加えて再度ホモジナイズし、遠心分離で得られた上清を除去した。沈殿には 25 mL の 5 mM ジチオスレイトール-0.9 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 14 h 激しく振とうした。ここに MgCl_2 および ATP がそれぞれ終濃度で 1 mM になるように添加し、さらに 1 h 振とうした。これを超遠心分離 (117,000 \times g) に供し、得られた上清を塩溶性タンパク質画分とした。塩溶性タンパク質画分に対し硫酸塩析を行い、飽和度 10-20% における沈殿を Bio-Scale CHT2-I カラム (0.7 \times 5.2 cm) を用いたヒドロキシアパタイト HPLC に供した。カラムはリン酸緩衝液 (pH 6.8) の濃度勾配 (0.01-0.24 M, 30 min) により、流速 1 mL/min で溶出した。

アミノ酸配列分析：精製した 100 kDa アレルゲン (150 μg) を 0.5 mL の 4 M 尿素-1 mM EDTA-0.02 M ethanolamine-0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、1.5 μg のリシルエンドペプチダーゼを添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ で 18 h 消化した。酵素消化物を TSKgel ODS-120T カラム (0.46 \times 25 cm) を用いた逆相 HPLC に供し、0.1 % トリフルオロ酢酸溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配 (0-70 %, 120 min) により流速 1 mL/min で溶出した。溶出液の 220 nm における吸光値を UV 検出器で連続的に測定し、各ピークに対応する溶出液を分取した。分取した溶出液を乾固後、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を分析した。

SDS-PAGE：SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (GE Healthcare) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare) を使用し

た。試料は 0.2 M ジチオスレイトール-4% SDS-8 M 尿素-0.125 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、70 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 加熱して変性後、泳動に供した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

ELISA および阻害 ELISA：クロアワビから精製した 100 kDa アレルゲン (パラミオシン) およびトロポミオシンの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA により検討した。精製品溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 50 μL を用いて 96 ウェル平底プレート (ELISA 用プレート H タイプ; 住友ベークライト) に固相化後、患者血清 (1:200 希釈) 50 μL 、 β -galactosidase 標識ヤギ抗ヒト IgE 溶液 (1:1000 希釈) 50 μL と順次反応させた。次いで、0.01% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-1 mM MgCl_2 -0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 50 μL を添加して酵素反応を行い、励起波長 367 nm、蛍光波長 453 nm で蛍光強度を測定した。阻害 ELISA では、患者血清 (1:100 希釈) に等量の阻害剤 (パラミオシンまたはトロポミオシン) 溶液 (0.002-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h 反応後、一次抗体として用いた。

イムノブロッティングおよび阻害イムノブロッティング：6 種軟体動物 (クロアワビ、サザエ、ムラサキガイ、ホタテガイ、スルメイカ、マダコ) の筋肉をそれぞれ液体窒素で凍結粉碎後、4 倍量の 0.9 M KCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加えてホモジナイズした。ホモジネートをそのまま遠心分離して得た上清を非加熱抽出液、ホモジネートを沸騰浴中で 10 min 加熱してから遠心分離して得た上清を加熱抽出液とした。抽出液を SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜はブロッキング後、患者血清または健常者血清 (1:200 希釈) と、次いで HRP 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (1:5000 希釈; Kirkegaard & Perry Laboratories) と反応させた。最後に ECL Plus Western Blotting Reagents (GE Healthcare) を用いて検出した。阻害イムノブロッティングでは、患者血清 (1:100 希釈) に等量の阻害剤 (パラミオシンまたはトロポミオシン) 溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h 反応後、一次抗体として用いた。

7) クロアワビパラミオシンの一次構造解析

部分アミノ酸配列データをもとに degenerate プ

ワードプライマー (DegeF1) を設計し、AUAP (abridged universal anchor primer) と組み合わせ、3'RACE を行った。PCR 増幅産物の塩基配列を直接解析し、得られた配列をもとに設計した遺伝子特異的リバースプライマーと部分アミノ酸配列データをもとに設計した degenerate フォワードプライマー (DegeF2) との組み合わせにより RT-PCR を行った。PCR 増幅産物は pT7Blue-2 T-Vector (Novagen) にサブクローニング後、塩基配列を解析した。次いで、RT-PCR により明らかになった塩基配列をもとに 5'RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

8) 魚類 ELISA 検知法の開発

標準溶液の調製：マアジの筋肉をホモジナイザーで均一化し、凍結乾燥を行った。乾燥終了後、再びホモジナイザーで均一化して得た粉末を魚標準品とした。魚標準品のタンパク質量を 2-D Quant kit (GE Healthcare) で定量したところ、470 mg/g であった。標準品を適宜希釈し、検量線作成のための標準溶液 (0.78-50 ng/mL) を調製した。

試料溶液の調製：試料 (市販の食品原料・加工食品およびモデル加工食品) 1 g をホモジナイザーで均一化後、特定原材料抽出用試薬 (森永生科学研究所) を用いて調製した抽出液 19 mL と混合し、一晚振とう抽出を行った。次いで 3,000 x g で 20 分間遠心分離して上清を回収し、試料抽出液を得た。試料抽出液を検体希釈液で 20 倍に希釈して試料溶液とした。

サンドイッチ ELISA による測定：組換えマサバパルブアルブミンをウサギに免疫してポリクローナル抗体を取得した。ポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートは、ポリクローナル抗体の固相化、洗浄、牛血清アルブミンによるブロッキング、洗浄、凍結乾燥により調製した。マイクロプレートに試料溶液を 100 μ L/well 添加して常温で 1 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄した。次いでペルオキシダーゼで標識したポリクローナル抗体溶液を 100 μ L/well 添加し、常温で 1 時間反応させた後、5 回洗浄した。酵素反応のために酵素基質液を 100 μ L/well 添加し、常温で 20 分間放置後、反応停止液を 100 μ L/well 添加した。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 650 nm で測定した。

サンドイッチ ELISA のバリデーション：魚標準品を 10 μ g/g の濃度で添加した 5 種類のモデル加工食品 (クリームコロッケ、鶏肉団子、豚肉シ

ュウマイ、野菜チキンスープ、白がゆ) について、3 試験機関でサンドイッチ ELISA により測定した。参加機関は試料毎に 2 回の抽出・測定を行った。測定は 3 ウェルを用い、同一プレート上で 8 濃度 (ブランクを含む) の標準溶液の測定も行った。得られた吸光度データに基づき、日水製薬において検量線 (4 係数ロジスティック曲線) を作成し、検量線を使って各試料中の抗原の濃度を計算した。さらに、回収率、併行精度、室間精度を求めた。

C. 研究結果

1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と降海型 (サクラマス) のパルブアルブミン比較

ヤマメ 3 個体、サクラマス 3 個体から調製した加熱抽出液を SDS-PAGE で分析したところ、10 kDa 付近のパルブアルブミンは明らかにヤマメの方が多いたことが判明した (図 1)。37 kDa、120 kDa および 240 kDa 付近に認められるバンドは、それぞれトロポミオシン、コラーゲン α 鎖、コラーゲン β 鎖と推定され、両魚種での含量はほぼ同程度と判断された。なお、ヤマメにのみ顕著にみられる 20 kDa 付近のバンドはパルブアルブミンの 2 量体と推定される。

SDS-PAGE 分析の結果、パルブアルブミン含量はサクラマスよりヤマメの方が多いたことがわかったので、抗カエルパルブアルブミン抗体を用いた ELISA による定量を試みた。マサバパルブアルブミンで作成した検量線 (図 2) をもとにヤマメおよびサクラマス普通肉中のパルブアルブミンを定量した結果を図 3 に示すが、ヤマメでは 1.8-7.8 mg/g、サクラマスでは 0.28-0.52 mg/g となり、SDS-PAGE の結果とよく対応していた。

ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液に対する患者血清の反応性は図 4 に示す。コラーゲンを認識する患者血清は、両魚種の加熱抽出液に対して同程度の反応を示したが、パルブアルブミンを認識する患者血清は明らかにヤマメ抽出液に対して強く反応した。

次に両魚種のパルブアルブミンを Sephacryl S-100HR カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよび TSKgel ODS-120T カラムを用いた逆相 HPLC により精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、ELISA 分析により両魚種ともパルブアルブミンはフラクション 38 付近に溶出され

た (図 5)。ELISA 陽性画分を逆相 HPLC に供すると、両魚種ともにパルブアルブミンは3つのピークに検出された (図 6; それぞれのピークに対応したパルブアルブミンを保持時間の順に、ヤマメ PA I、PA II、PA III、サクラマス PA I、PA II、PA III と呼ぶ)。これらパルブアルブミンの分子量を MALDI/TOF-MS で分析した結果を表 1 に示すが、ヤマメの PA I、PA II および PA III は、それぞれサクラマスの PA I、PA II、PA III と非常に近い値であった。

2) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

チダイ普通肉から調製した加熱抽出液を Sephadex G-75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィー (図 7A) に供したところ、SDS-PAGE 分析により PA I および II はフラクション 37-42 に確認された。フラクション 37-42 を合一して TSKgel ODS-120T を用いた逆相 HPLC に供すると、保持時間 33.2 分 (Peak I) と 37.3 分 (Peak II) に顕著なピークが認められた (図 7B)。SDS-PAGE 分析の結果、peak I の成分は PA I、peak II の成分は PA II であることが判明した (図 7C)。

精製 PA I をリシルエンドペプチダーゼで分解し、ペプチド断片を逆相 HPLC で分離した (図 8A)。これらペプチド断片のうち3つ (ペプチド I-1、I-2、I-3) を任意に選んで MALDI TOF-MS/MS によりアミノ酸配列を解析したところ、ペプチド I-1、I-2、I-3 はそれぞれ魚類パルブアルブミンの 20-27、97-107、45-54 に相当した (図 11 参照)。この結果から、PA I はパルブアルブミンのアイソフォームであると同定した。一方、PA II のリシルエンドペプチダーゼ分解により得られたペプチド断片についても3つ (ペプチド II-1、II-2、II-3) を任意に選んでアミノ酸配列を解析した (図 8B)。その結果、ペプチド II-1、II-2、II-3 はそれぞれ魚類パルブアルブミンの 73-80、84-96、55-64 に相当し (図 11 参照)、PA II もパルブアルブミンのアイソフォームであると同定した。なお、チダイパルブアルブミンをコードする cDNA の塩基配列および演繹アミノ酸配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されているが (accession No. : AB375264)、PA I および II のいずれとも異なっているため、データベース上のチダイパルブアルブミンを PA III と呼ぶことにする。

PA I および PA II の IgG 抗体および患者血中 IgE

との反応性は、マアジのパルブアルブミン、マサバのパルブアルブミンも用いて比較検討した。抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体の反応性を可視光 ELISA で調べたところ、PA II の反応性はマアジパルブアルブミン、マサバパルブアルブミンとほぼ同程度であったが、PA I は著しく弱いと判断された (図 9A)。抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体との反応性も、チダイ PA I のみが他のパルブアルブミンより弱いと考えられた (図 9B)。一方、12 名の患者血清を用いた蛍光 ELISA では、1 名の患者血清は PA I と PA II に同程度に反応したが、その他の患者血清は PA I に対する反応性は PA II に対するよりも弱かった (図 10A)。次に、チダイパルブアルブミンの IgE 反応性をマアジパルブアルブミン、マサバパルブアルブミンと比較するために、プール血清を用いて蛍光 ELISA を行った。その結果、PA I の IgE 反応性は他のパルブアルブミンより明らかに弱かった (図 10B)。

PA-F と AP1 を用いた 3'RACE により、約 450 bp の増幅産物が認められた。サブクローニングで得られた 8 クローンの塩基配列を解析したところ、5 クローンは PA I を、2 クローンは PA II を、1 クローンは PA III をコードしていた。一方、PA-F と AP1 を用いた 5'RACE においては約 250 bp の増幅産物が得られた。サブクローニングで得られた 5 クローンのうち、2 クローンは PA I を、3 クローンは PA III をコードしていた。残りの塩基配列を解析するために、PA I-F と AP1 を用いた 3'RACE、AP1 と PA II-R を用いた 5'RACE を行ったところ、3'RACE で得られた 13 クローンはすべて PA I を、5'RACE で得られた 6 クローンはすべて PA II をコードしていた。こうして PA I をコードする完全長 cDNA (705 bp) および PA II をコードする完全長 cDNA (654 bp) の全塩基配列を決定することができた (DDBJ/EMBL/GenBank の accession No. : PA I, AB62511; PA II, AB62512)。翻訳領域の演繹アミノ酸配列は、PA I は 107 残基 (開始 Met を除いた残基数で示す)、PA II は 108 残基で、リシルエンドペプチダーゼ分解ペプチドはそれぞれのアミノ酸配列に確認された (図 11)。PA I と PA II のアミノ酸配列の相同性は 72% と高く、各種魚類パルブアルブミンとも 52-80% の相同性を示した。PA I は、他の魚類パルブアルブミンにみられない特徴的ないくつかの残基 (Lys-13、Ala-41、Asp-45 など) を含むことが注目された。

3) 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造解析

RACE 法により、3 種甲殻類 (ブラックタイガー、クルマエビおよびズワイガニ) の SCP をコードする全長 cDNA をクローニングし、塩基配列解析により全アミノ酸配列 (いずれも 192 残基) を決定することができた。コウライエビの SCP については α 鎖と β 鎖の 2 種類のサブユニットが報告されているが、本研究で取り上げた 3 種甲殻類の SCP では 1 種類のクローンしか得られなかった。3 種甲殻類 SCP のアミノ酸配列を、コウライエビ、ザリガニ類 *P. leptodactylus*、アメリカザリガニ、ホタテガイおよびチョウセンハマグリ の SCP と並べて図 12 に、お互いのアミノ酸配列相対率を表 2 に示す。

ブラックタイガーとクルマエビの SCP はお互いに 96% と高い配列相対性を示した。また、ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP が α 鎖と β 鎖より成るか不明であるが、コウライエビ SCP の α 鎖とは 91-94%、 β 鎖とは約 80% の相対性を示し、 α 鎖と非常に類似していた。ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP はザリガニ類 SCP とは 81%、ズワイガニ SCP とは約 75% の相対性を、ズワイガニ SCP は他の甲殻類 SCP と 72-79% の相対性を示すというように、各種甲殻類の SCP はお互いに類似していた。一方、甲殻類と軟体動物 (貝類) の SCP との間の相対性はわずか 10-21% と非常に低かった。

4) ブラックタイガーSCP の大腸菌における発現

HQ タグつきブラックタイガーSCP を pFN6A (HQ) Flex vector 系を用いて大腸菌で発現したところ、rSCP は大腸菌の抽出液 (可溶部) に得られ、HisTrap Chelating HP カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製することができた (図 13)。患者血清を用いた ELISA により、rSCP は nSCP とほぼ同等の IgE 反応性を示すと判断された (図 14A)。また、事前に患者血清を nSCP あるいは rSCP とインキュベートすると、nSCP との反応性も rSCP との反応性も同程度に阻害された (図 14B)。

5) ブラックタイガーSCP の IgE エピトープ

患者血清とブラックタイガーSCP の反応性を EGTA 非存在下および存在下で ELISA により調べたところ、いずれの患者血清も EGTA 存在下で反応性が約半分に低下した (図 15)。EGTA 非存在下では、ブラックタイガーSCP は α ヘリックス

スに特徴的な 208 nm および 222 nm 付近に負の極大をもつ CD スペクトルを与えた (図 16)。一方、EGTA 存在下では α ヘリックス含量の減少がみられ、立体構造がやや変化していることが確認された。ブラックタイガーSCP の全長をカバーする 18 種類の合成ペプチドは、患者血清を用いた蛍光 ELISA の結果からすべて IgE 反応陰性と判断された (データ示さず)。

6) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

100 kDa アレルゲンは大部分が塩溶性タンパク質画分に回収されたので、塩溶性の筋肉タンパク質の 1 成分と考えられた。塩溶性タンパク質画分から、硫酸塩析 (10-20% 飽和沈殿) および Bio-Scale CHT2-I カラムを用いたヒドロキシアパタイト HPLC により 100 kDa アレルゲンを精製した。ヒドロキシアパタイト HPLC では、100 kDa アレルゲンは retention time 23.8 min の左右対称のピークに溶出された (図 17A)。こうして得られた 100 kDa アレルゲンは、SDS-PAGE 分析により純度は高いと判断された (図 17B)。

精製した 100 kDa アレルゲンをリシルエンドペプチダーゼで消化後、逆相 HPLC により多数のペプチド断片が単離された。このうち任意に 4 つの断片 (ペプチド 1-4) を選択し、アミノ酸配列を分析した。配列データを BLAST で検索したところ、ペプチド 1、2、3、4 はムラサキイガイパラミオシン (DDBJ/EMBL/GenBank の accession No. は AB16070) の 121-135、147-158、203-214、825-836 の領域とそれぞれ対応していた (図 18)。ペプチド 3 はムラサキイガイパラミオシンの 203-214 の領域と完全に一致し、ほかのペプチドもムラサキイガイパラミオシンの対応する領域と比べて 1-4 残基しか変異がみられなかった。これらの結果から、100 kDa アレルゲンはクロアワビのパラミオシンであると結論した。

クロアワビから精製したパラミオシン (100 kDa アレルゲン) およびトロポミオシンの IgE 反応性を、18 人の甲殻類アレルギー患者の血清を用いた蛍光 ELISA で調べた。CAP-RAST により、患者 18 人中 5 人は軟体動物に対してもアレルギーを示すと診断されているが、その他の患者の軟体動物に対する反応性は不明であった。しかし、トロポミオシンは甲殻類および軟体動物において交差性を示す共通のアレルゲンであることに対応して、クロアワビトロポミオシンに対する

陽性反応は 16 人もの多くの患者で認められた (図 19)。さらに興味深いことに、トロポミオシンに陽性反応を示した 16 人の患者はすべてクロアワビのパラミオシンに対しても反応した。

6 種軟体動物の非加熱抽出液を SDS-PAGE で分析すると、いずれの抽出液にも 37 kDa および 100 kDa のタンパク質が認められた (図 20A)。37 kDa タンパク質 (トロポミオシン) は種類によらず、100 kDa タンパク質 (パラミオシン) は少なくとも 4 種 (クロアワビ、サザエ、ムラサキガイ、マダコ) で IgE 反応は陽性であった (図 20B)。加熱抽出液の場合、トロポミオシンは 6 種に明瞭にみられ、IgE 陽性反応を示した (図 21)。しかし、SDS-PAGE およびイムノブロットングのいずれにおいても、パラミオシンは検出されなかった。

患者血清を予めクロアワビパラミオシンとインキュベートすると、軟体動物パラミオシンとの反応は完全に消失し、さらにトロポミオシンとの反応も消失または減少した (図 20C)。また、患者血清を予めクロアワビトロポミオシンとインキュベートした場合、軟体動物トロポミオシンとの反応だけでなく軟体動物パラミオシンとの反応も完全に消失した。パラミオシンとトロポミオシンの間の抗原交差性を、さらに阻害 ELISA でも検討した。図 22 に示すように、患者血清とパラミオシンとの反応および患者血清とトロポミオシンとの反応は、いずれもトロポミオシンおよびパラミオシンによって阻害された。阻害の程度は、いずれにおいてもトロポミオシンの方がかなり強かった。

7) クロアワビパラミオシンの一次構造解析

クロアワビパラミオシンをコードする完全長 cDNA (3025 bp) を、3'RACE、RT-PCR および 5'RACE によりクローニングすることができた (塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースの accession No. AB571843 に登録済み)。得られた cDNA は 2580 bp (アミノ酸 860 残基に対応) の翻訳領域を含んでいた。翻訳領域のアミノ酸配列を、ムラサキガイ、ダニ類 (ヤケヒョウヒダニ、ネッタイタマニクダニ)、アニサキスのパラミオシンのアミノ酸配列と並べて図 23 に示した。また、これらパラミオシンのアミノ酸配列相同性を表 3 にまとめた。クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキガイパラミオシンとは約 70% という高い相同性を示したが、アレルギー

ンとして同定されているダニ類やアニサキスのパラミオシンとの相同性は約 35% であった。

8) 魚類 ELISA 検知法の開発

サンドイッチ ELISA の検量線を図 24 に示すが、0.78-50 ng/mL の範囲で良好な反応性を確認した。検出限界は 0.58 ng/mL (0.23 μ g 魚類タンパク質/g 食品に相当)、定量限界は 1.76 ng/mL (0.70 μ g/g 相当) であった。したがって本サンドイッチ ELISA により、魚類タンパク質は 0.78-50 ng/mL (0.31-20 μ g/g) の範囲で定量可能である。

8 種魚類 (ウナギ、マイワシ、マアジ、チダイ、マサバ、カツオ、メバチ、ヒラメ) およびウシガエルから精製したパルブアルブミン (アイソフォームがある場合は主要成分のみ) に対するサンドイッチ ELISA の反応性を評価するために、各種パルブアルブミンを 0.078-250 ng/mL に調製して各 2 重測定した。得られた吸光度より各種パルブアルブミンにおける標準曲線を 4 係数ロジスティック解析により作成し、回帰式: $y = \frac{A-D}{1+(x/C)^B} + D$ (A: 吸光度が最大となる濃度、D: 吸光度が最小となる濃度、C: 吸光度が中間となる濃度、B: 傾き) の C をもとに、反応率 $\{=100 \times (\text{マサバパルブアルブミンの C 値}) / (\text{比較対象のパルブアルブミンの C 値})\}$ を計算した。その結果、魚類パルブアルブミンはいずれも十分に反応し、反応性は 22.6-100.0% (マサバパルブアルブミンとの反応性を 100% とする) と見積もられた。一方、ウシガエルパルブアルブミンとの反応性はわずか 1.2% で、無視できるレベルであった。

次に、サンドイッチ ELISA の各種食品原材料 (魚 22 種類、棘皮動物 1 種類、甲殻類 9 種類、頭足類 8 種類、巻貝 4 種類、二枚貝 9 種類、魚卵 2 種類、海藻 5 種類、鶏卵、牛乳、ゼラチン、ごま、肉類 3 種類、野菜 6 種類、果物 5 種類、穀類 8 種類、きのこ 2 種類、豆 4 種類、ナッツ 4 種類、茶 5 種類、スパイス 10 種類) との反応性を検証した。魚 22 種類は期待通りすべて陽性反応を示したが、定量値 (4.0-46100 μ g/g) は魚種によって著しく異なった。魚の他には、頭足類 8 種類中の 5 種類 (ミズダコ、ヤナギダコ、ヤリイカ、アオリイカ、モンゴウイカ) および魚卵 2 種類 (タラコ、イクラ) で 1.2-3.8 μ g/g の非常に弱い陽性反応が認められたが、残りの 82 種類はすべて陰性であった。

日水製薬で実施した試験室内バリデーション

では、5種モデル加工食品に添加した魚類タンパク質の回収率は63.6-81.8%、同時再現性の標準偏差は1.2-8.1%、日差再現性（6日間）の標準偏差は8.1~9.5%といずれも良好であった。3試験室で実施した試験室間バリデーションの結果を表4に示す。試験室内バリデーションと同様に、モデル加工食品からの魚類タンパク質の回収率は69.4-84.8%と良好であった。また、2回抽出の併行精度（RSD_r）はいずれの試料においても3.3%以下、室間精度（RSD_R）もおおむね10%以下で、サンドイッチELISAの精度は高いと判断された。

サンドイッチELISAを市販の各種加工食品に供した結果を表5に示す。魚を含むというラベルがある食品21種類のうち、18種類については濃度はかなり異なるものの魚類タンパク質が検出された。偽陰性の結果を与えた食品は発酵食品2種類（ナンプラー、マグロ酒盗）とコーゲンパウダーであった。一方、魚を含まない加工食品16種類のうち、頭足類を含む2種類（イカ煎餅、タコ焼き）と魚卵（タラコ）を含む1種類（タラコパスタソース）の計3種類で、きわめて弱い（1.2-3.8 µg/g）偽陽性反応がみられた。

D. 考察

1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型（ヤマメ）と降海型（サクラマス）のバルブアルブミン比較

SDS-PAGEによりヤマメのバルブアルブミン含量はサクラマスよりかなり高いことが示唆され、このことはELISAによる定量（ヤマメ：1.8-7.8 mg/g、サクラマス：0.28-0.52 mg/g）で裏付けられた。マサババルブアルブミンで作成した検量線で定量したので、正確な含量ではないかもしれないが、両魚種におけるバルブアルブミンの相対的な含量は反映していると考えられる。さらに、コーゲンを認識する患者の血清は両魚種に対して同程度のIgE反応性を示したが、バルブアルブミンを認識する患者の血清は明らかにヤマメの方に強く反応した。

ゲルろ過および逆相HPLCにより、両魚種から3成分のバルブアルブミン（PA I、PA II、PA III）が得られた。逆相HPLCでの保持時間はヤマメのPA I、PA IIおよびPA IIIはそれぞれサクラマスのPA I、PA II、PA IIIとほぼ一致し、またMALDI/TOF-MSで分析した分子量もヤマメのPA I、PA IIおよびPA IIIはそれぞれサクラマスの

PA I、PA II、PA IIIとほぼ一致した。これらの結果から、組成比はやや異なるかもしれないが、両魚種のバルブアルブミンは同じ3成分のアイソフォームで構成されていると考えられる。

本研究結果から、少なくともバルブアルブミンを認識する魚類アレルギー患者にとっては、ヤマメの方がサクラマスよりアレルギー発症の可能性が高いといえる。*Oncorhynchus nerka*の陸封型（ヒメマス）と降海型（ベニザケ）は同等のIgE反応性を示すというKond et al. (Allergol Int 2009; 58: 295-299)の結果も考慮すると、サケ類の表示奨励を降海型に限っている現行のアレルギー表示制度は見直しの必要があるかもしれない。

2) チダイに含まれるバルブアルブミンアイソフォームの性状

Kobayashi et al. (2006)は、マダイの抽出液に一部患者の血清IgEと反応するがバルブアルブミンモノクローナル抗体とは反応しない14 kDaのアレルゲンを見いだしている。われわれはチダイにも類似の14 kDaアレルゲンを検出したので、本研究ではチダイを試料として、12 kDaのバルブアルブミン（PA II）とあわせて14 kDaアレルゲン（PA I）を精製し、精製品のアミノ酸配列分析によりPA Iはバルブアルブミンアイソフォームであることを証明した。予備実験レベルではあるが、マダイの14 kDaアレルゲンもバルブアルブミンアイソフォームであることをすでに認めている。

ELISAにより、PA IはPA IIと比べてだけでなく、マアジやマサバのバルブアルブミンと比べても、抗カエルバルブアルブミンモノクローナル抗体、抗マサババルブアルブミンポリクローナル抗体、さらには魚類アレルギー患者の血中IgEとの反応性はかなり弱いと判断された。Kobayashi et al. (2006)が行ったイムノブロットングでは、マダイの14 kDaアレルゲンと抗カエルバルブアルブミンモノクローナル抗体との反応は陰性であった。本研究で実施したELISAは定量的方法であるが、PA Iは抗カエルバルブアルブミンモノクローナル抗体と陽性反応を示すとはいえ、その反応性は弱いと評価された。定性的方法であるイムノブロットングにおいて、マダイ14 kDaアレルゲンは抗カエルバルブアルブミンモノクローナル抗体と反応しないと評価されたことはやむを得ないといえる。

バルブアルブミンはポリペプチド鎖の長さお

よびアミノ酸配列の特徴から α タイプと β タイプにわけられている。 α タイプのパルブアルブミンは109残基またはそれ以上であるとされているので、107残基のPA I、108残基のPA II、PA IIIはいずれも β タイプであると推定される。実際、 β タイプに特徴的とされている6残基(Ala-13、Leu-15、Cys-18、Phe-66、Gln-68、Thr-78)も、PA IでAla-13がLys-13に変異していることを除くと完全に保存されている。

魚類パルブアルブミンのIgE結合エピトープに関しては、Gad c 1で最初に検討された。Gad c 1のIgE反応性は加熱処理やタンパク質変性剤処理によっても影響を受けないこと、 Ca^{2+} 除去によって立体構造が変化してもIgE反応性の低下は約25%であることから、IgE結合エピトープはアミノ酸配列に依存すると考えられ、4つのペプチド領域がIgE結合エピトープとして提唱されている。しかし近年、コイやマサバのパルブアルブミンでは、 Ca^{2+} 除去によってIgE反応性が著しく低下することが見いだされ、立体構造エピトープの重要性が示唆された。立体構造エピトープは解明されていないが、IgE反応性が弱いと判断されたPA Iにのみ特徴的ないくつかの残基(Lys-13、Ala-41、Asp-45のなど)が見いだされたことは興味深い。これら残基は魚類パルブアルブミンの立体構造エピトープに関与している可能性があるため、PA Iをモデルタンパク質として各種改変パルブアルブミンのIgE反応性を評価することは、今後の興味深い検討課題であろう。

3) 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造解析

甲殻類SCPのアミノ酸配列はお互いに70%以上の高い配列相同性を示すこと、甲殻類SCPと軟体動物SCPとの間の配列相同性は11-21%と非常に低いことが判明した。筆者らが行ったイムノブロッティングおよび阻害イムノブロッティング実験の結果から、エビ類(とくにクルマエビ類)のSCPのIgE反応性は強くかつお互いに抗原交差性を示すが、カニ類および軟体動物のSCPのIgE反応性は陰性または非常に弱いと考えられた。確かに、3種クルマエビ科(ブラックタイガー、クルマエビおよびコウライエビ)のSCPは、お互いのアミノ酸配列相同性は90%以上であるし(コウライエビの場合、主要なサブユニットされている α 鎖の配列に基づく)、ザリガニ類のSCPとの間でも高い配列相同性(約80%)がみられ

るので、抗原交差性を示すことは理解できる。また、軟体動物SCPのIgE反応性は陰性であることは、甲殻類SCPのアミノ酸配列とは著しく異なっていることで説明できる。しかし、IgE反応性が陰性と判断されたズワイガニSCPの場合、そのアミノ酸配列はエビ類SCPとかなり類似していた(72-79%)。他のカニ類のSCPのアミノ酸配列は今のところ不明であるが、少なくともズワイガニSCPはエビ類SCP同様にIgE反応性を示すと予想される。以前のイムノブロッティングでカニ類SCPのIgE反応性がみられなかったのは、カニ類におけるSCP含量が低いためであったと推定される。いずれにしても今後は、エビ類SCPのIgE結合エピトープを解析することがまず望まれる。それとあわせて、甲殻類(とくにカニ類)SCPの配列データの蓄積、甲殻類におけるSCP含量の測定も必要である。

4) ブラックタイガーSCPの大腸菌における発現

ブラックタイガーSCPをHQタグつきタンパク質として大腸菌で発現し、rSCPを精製することができた。患者血清を用いたELISA結果から、rSCPのIgE反応性はnSCPと同等であると判断された。さらに阻害ELISAの結果も、rSCPはnSCPのIgE結合エピトープを完全に保持していることを支持した。本研究で得たrSCPはHQタグつきであるが、今後の甲殻類アレルギー研究や甲殻類アレルギーの診断において、標準アレルゲンとして有用であると思われる。

5) ブラックタイガーSCPのIgEエピトープ

SCPは Ca^{2+} 結合性タンパク質であるが、ブラックタイガーSCPからキレート剤(EGTA)を用いて Ca^{2+} を除去すると、IgE反応性は約半分に低下することを見いだした。SCPは無脊椎動物特有のタンパク質で、脊椎動物特有のパルブアルブミンに相当すると考えられている。パルブアルブミンはたまたま魚類の主要アレルゲンであり、SCP同様に、 Ca^{2+} 除去によりIgE反応性はかなり低下することが知られている。

CDスペクトルの測定により、ブラックタイガーSCPの立体構造は Ca^{2+} 除去により少し変化することが判明した。 Ca^{2+} 除去によるIgE反応性の低下とあわせて、 Ca^{2+} 結合によって保持されている立体構造がIgEエピトープとして重要であることを意味している。しかし、 Ca^{2+} 除去によってもIgE反応性が完全に消失するわけではないので、一次構造エピトープも存在する可能性が考え

られた。そこで、ブラックタイガーSCPの全長をカバーするオーバーラップペプチドを合成してIgE反応性をELISAで評価したが、IgE反応性を示すペプチドは認められなかった。これらの結果から、ブラックタイガーSCPのIgEエпитープは立体構造のみに依存していると考えられた。

6) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

クロアワビから精製した100 kDaアレルゲンは、リシルエンドペプチダーゼ分解で得られたペプチド断片のアミノ酸配列分析結果から、パラミオシンであることが判明した。甲殻類ではトロポミオシンのほかに、アルギニンキナーゼ、SCPおよびミオシン軽鎖もアレルゲンであることが最近次々に報告されている。軟体動物の場合、トロポミオシン以外のアレルゲンの同定例はない。その意味で、パラミオシンは軟体動物の第2のアレルゲンである。

パラミオシンとは患者18人中16人が反応するので、トロポミオシン同様に主要アレルゲンであると判断された。また、非加熱抽出液を用いたイムノブロットングの結果は、パラミオシンはクロアワビ特有のアレルゲンではなく、少なくとも数種軟体動物の間で交差性を示すアレルゲンであることを示している。それにも関わらず、これまでの軟体動物アレルゲンに関する研究においては見落とされてきた。これまでの研究では、沸騰水で加熱調理した試料のホモジネートから調製した加熱抽出液、または生試料のホモジネートを加熱して調製した加熱抽出液が用いられてきた。トロポミオシンは耐熱性であるので、イムノブロットングにより加熱抽出液中でも容易に検出できるし、クロマトグラフィーによって加熱抽出液から容易に精製できる。それに対してパラミオシンは、本研究で明らかにしたように加熱に対しては不安定で変性不溶化する。そのため、もっぱら加熱抽出液を用いてきたこれまでの研究では見落とされたと考えられる。

パラミオシンは無脊椎動物特有のタンパク質で、すでにダニやアニサキスではアレルゲンの一つとして同定されている。パラミオシンはかなり易熱性であるので(変性不溶化してもアレルゲンは変化しない可能性もあるが)、加熱調理した軟体動物によるアレルギーにはトロポミオシンほど寄与していないと予想される。しかし、生食の習慣があるわが国では軽視できないかもしれ

ない。また、パラミオシンは、軟体動物を扱っている労働者における接触アレルギーや軟体動物摂取による口腔アレルギー症候群に関与することは十分に考えられる。軟体動物に起因するアレルギー症状を考える際には、今後はトロポミオシンとともにパラミオシンも念頭においておく必要がある。

7) クロアワビパラミオシンの一次構造解析

イムノブロットングおよび阻害イムノブロットングの結果から、パラミオシンはクロアワビ特有のアレルゲンではなく、ムラサキイガイ、スルメイカなど各種軟体動物間で抗原交差性を示すアレルゲンであると推定される。しかし、抗原交差性を分子レベルで理解するための基礎情報であるアミノ酸配列は、ムラサキイガイで解析されているのみである。そこで本研究では、クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列をcDNAクローニングにより解析した。

クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンと約70%という高い相同性を有していた。この高い配列相同性が抗原交差性の裏付けであることは間違いない。一方、パラミオシンはダニ類(ヤケヒョウヒダニ、ネッタイタマニクダニ)やアニサキスのアレルゲンとしてすでに同定され、一次構造も明らかにされている。しかし、これらパラミオシンとクロアワビパラミオシンの配列相同性は約35%と低いので、抗原交差性はないと予想される。

クロアワビパラミオシンは他の軟体動物のパラミオシンと交差性を示すだけでなく、クロアワビトロポミオシンとも交差性を示すという興味深い事実が明らかにされている。そこで、クロアワビパラミオシンおよびムラサキイガイパラミオシンのアミノ酸配列をBLAST検索によりクロアワビトロポミオシンの配列と比較した。その結果、クロアワビパラミオシンの3つの領域(¹⁸¹LKLQVDDLSRQ¹⁹²、³¹⁵LNTRIAQLEDE³²⁵、⁶⁸¹LFNENVRLADE⁶⁹¹)、ムラサキイガイパラミオシンの3つの領域(¹⁸⁴LKAAVDDLTRQ¹⁹⁴、³¹⁸LSIKIQELEDT³²⁸、⁶⁸⁴LQAEVNRLADE⁶⁹⁴)はクロアワビトロポミオシンの249-259の領域(LQKEVDRLEDE)に類似していることが判明した。領域249-259はbrown shrimpトロポミオシンで報告されているIgEエпитープの一つで、この領域のアミノ酸配列は甲殻類のトロポミオシン、クロアワビを含む軟体動物のトロポミオシン

のすべてで保存されている。したがって、甲殻類と軟体動物のトロポミオシンの間での抗原交差性の少なくとも一部は、アミノ酸配列が保存されている領域 249-259 によって説明可能である。同様に、クロアワビおよびムラサキイガイの上記3つの領域は、パラミオシンとトロポミオシンとの間の交差性の説明になるかもしれない。もしそうなら、軟体動物パラミオシンは甲殻類トロポミオシンとも交差することが考えられるので、今後の検討が望まれる。

8) 魚類 ELISA 検知法の開発

わが国では魚ではなく特定の2魚種(サバとサケ)が表示の対象になっている。そこで当初、マサバパルブアルブミンに対するモノクローナル抗体を用いるサバ ELISA 検知法の開発を目指した。しかし、サバパルブアルブミンのみを特異的に認識するモノクローナル抗体は得られなかった。さらに、魚類パルブアルブミン全般に反応するモノクローナル抗体も得られず、マサバパルブアルブミンに対するモノクローナル抗体を利用する魚類 ELISA 検知法の開発も困難であると判断した。そこで、マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を用いる魚類 ELISA 検知法の開発を目指すこととした。

最近、Fæsta and Plassen (J Immunol Methods 2008; 329: 45-55) により、タラパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を利用した魚類 ELISA 検知法が報告された。しかし、この ELISA 法の定量限界は 5 µg/g で、わが国のアレルギー表示制度ではアレルギータンパク質が数 µg/g 以上の場合に表示することが望まれていることを考えると、感度の点でやや不足である。また、この ELISA 法は、調べた 32 魚種中 12 種で回収率が 1%以下で、かなり多くの魚種に適用できない可能性がある。それに対して本研究で開発したサンドイッチ ELISA は、感度も高いし(定量限界 0.7 µg/g)、ほとんどの魚種に適用可能である。また、われわれのサンドイッチ ELISA は、厚生労働省で示されている試験室間バリデーションのプロトコールを、試験室数が少ないという点を除くとすべて満たしており、加工食品中の魚類タンパク質を定量する信頼性の高い方法であるといえる。

開発したサンドイッチ ELISA は、市販の加工食品におおむね適用可能であったが、一部で偽陰性または偽陽性がみられた。偽陰性を示した食品

は発酵食品 2 種類(ナンプラー、マグロ酒盗)とコラーゲンパウダーであるが、発酵食品では発酵過程でプロテアーゼ作用を受けてペプチドまたはアミノ酸に分解されること、コラーゲンパウダーの場合はパルブアルブミンが除去されていることを考えると不思議な結果ではない。一方、魚を含まない加工食品 16 種類のうち、頭足類を含む 2 種類(イカ煎餅、タコ焼き)と魚卵(タラコ)を含む 1 種類(タラコパスタソース)の計 3 種類で、きわめて弱い(1.2-3.8 µg/g)偽陽性反応がみられたが、表示レベル以下であるのでそれほど問題ないと考えられる。

E. 結論

1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)のパルブアルブミン比較

ヤマメおよびサクラマスは同じ 3 成分のパルブアルブミンアイソフォームを含む。パルブアルブミン含量はヤマメの方が明らかに高いので、アレルギーの点ではヤマメの方が重要である。

2) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

チダイには 2 成分のパルブアルブミンアイソフォーム (PAI および II) が含まれるが、PAI は IgE 反応性が他の魚類パルブアルブミンより非常に弱く、パルブアルブミンの立体構造 IgE エピトープ解析におけるモデルタンパク質となる。

3) 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造解析

3 種甲殻類(ブラックタイガー、クルマエビ、ズワイガニ)のアミノ酸配列(いずれも 192 残基)を cDNA クローニングにより解析した。甲殻類 SCP のアミノ酸配列はお互いに 70%以上の相同性を示すが、軟体動物 SCP との相同性は非常に低い(10-21%)。

4) ブラックタイガーSCPの大腸菌における発現

ブラックタイガーSCPの組換え品は天然品と同等のIgE反応性を示すので、標準アレルギーとして有用である。

5) ブラックタイガーSCPのIgE エピトープ

ブラックタイガーSCPのIgE エピトープは、アミノ酸配列ではなく立体構造に依存している。Ca²⁺を除去すると立体構造が変化し、IgE 結合能が低下する。

6) クロアワビに見いだされた新規アレルギーの

精製・同定

クロアワビに見いだされた 100 kDa の新規アレルギーを精製し、部分アミノ酸配列分析によりパラミオシンと同定した。パラミオシンはトロポミオシン同様に主要アレルギーで、トロポミオシンに次ぐ軟体動物第 2 のアレルギーでもある。また、パラミオシンとトロポミオシンの間には抗原交差性が認められる。

7) クロアワビパラミオシンの一次構造解析

クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列はムラサキイガイパラミオシンと高い相同性を示し、抗原交差性を裏付けている。しかし、ダニ類やアニサキスのパラミオシンとの配列相同性は低く、交差性はないと思われる。

8) 魚類 ELISA 検知法の開発

マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を利用したサンドイッチ ELISA 系は、感度および特異性に優れ、加工食品中の魚類タンパク質の定量法として非常に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Emoto, S. Ishizaki and K. Shiomi: Tropomyosins in gastropods and bivalves: identification as major allergens and amino acid sequence features. *Food Chem.*, 114, 634-641 (2009)
- 2) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畝尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 塩見一雄: 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法に適した抽出方法の開発. *食衛誌*, 50, 153-159 (2009)
- 3) 繁平有希, 猪又直子, 中河原怜子, 大川智子, 澤城晴名, 中村和子, 小林征洋, 塩見一雄, 池澤善郎: スルメイカの塩辛摂取後に発症したアニサキスアレルギーの 1 例: 精製及び組み換えアレルギーを用いたアレルギー解析を含めて. *アレルギー*, 59, 55-60 (2010)
- 4) 塩見一雄: 「えび」, 「かに」のアレルギー表示の義務化. *日水誌*, 75, 495-499 (2009)
- 5) 柴原裕亮, 上坂良彦, 阿部晃久, 山田彰一, 潮秀樹, 塩見一雄: ELISA 法による食品中の頭足類アレルギーの検出. *日本食品科学工学会誌*, 57, 198-204 (2010)
- 6) 清木興介, 織田浩司, 柴原裕亮, 蒲生玲子, 有馬優美, 酒井信夫, 中村 厚, 安達玲子, 塩見一雄, 穂山 浩, 手島玲子: 加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討. *食品衛生学雑誌*, 51, 133-138 (2010)
- 7) K. Shiomi, S. Yoshida, T. Sawaguchi and S. Ishizaki: A major IgE epitope of rainbow trout collagen $\alpha 2$ chain. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51, 153-159 (2010)
- 8) 塩見一雄: 魚介類アレルギーに関する最新の分子生物学的知見. *食品衛生学雑誌*, 51, 139-152 (2010)
- 9) Y. Kobayashi, K. Ikeda and K. Shiomi: Elucidation of IgE-binding epitopes of Anisakis simplex allergen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 174, 128-131 (2010)
- 10) 中村和子, 猪又直子, 大川智子, 前田修子, 桐野実緒, 塩見一雄, 池澤善郎: アスピリン 1.5g の組み合わせ負荷試験により診断し得た, イカによる食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの一例. *アレルギー*, 59, 1634-1641 (2010)
- 11) M. Suzuki, Y. Kobayashi, Y. Hiraki, H. Nakata and K. Shiomi: Paramyosin of the disk abalone *Haliotis discus discus*: identification as a new allergen and cross-reactivity with tropomyosin. *Food Chem.*, 124, 921-926 (2011)
- 12) Y. Kobayashi, K. Ohsaki, K. Ikeda, S. Kakemoto, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi: Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol. Int.*, 60, 144-150 (2011)
- 13) 福本 瞳, 朝山祥子, 高田香織, 二神綾子, 塩見一雄, 川名誠司: パルブアルブミンによる口腔アレルギー症候群—手の職業性接触皮膚炎を合併した例. *皮膚病診療*, 33, 1035-1038 (2011)
- 14) M. Kanamori, H. Tanaka, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: New extraction method suitable for immunoblotting analysis of fish allergens. *Eur. Food Res. Technol.*, 233, 991-997 (2011)
- 15) F.-F. Guo, H. Kubota and K. Shiomi: Purification, immunological properties and molecular cloning of two allergenic parvalbumins from the crimson sea

bream *Evynnis japonica*. Food Chem., 132, 835-840 (2012)

16) 嶋倉邦嘉, 綿谷ゆきな, 塩見一雄: サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と遡河型 (サクラマス) のアレルギー性比較. 食衛誌 (印刷中)

17) S. Ishizaki, Y. Sakai, T. Yano, S. Nakano, T. Yamada, Y. Nagashima, K. Shiomi, Y. Nakao and H. Akiyama: Specific detection of potentially allergenic salmonid fish residues in processed foods by polymerase chain reaction. Biosci. Biotechnol. Biochem. (accepted)

2. 学会発表

1) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畷尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 塩見一雄: 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検出法に適した抽出法について. 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009 年 5 月, 東京)

2) Z. Hong, H. Ushio and K. Shiomi: Method of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. International Union of Biochemistry and Molecular Biology 2009 (2009 年 8 月, 上海)

3) 張 虹, 潮 秀樹, 塩見一雄: 無脊椎動物主要アレルギートロポミオシンのモノクローナル抗体作製及び応用. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月, 盛岡)

4) 鈴木 翠, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: クロアワビのパラミオシン: トロポミオシンとの IgE 反応交差性および一次構造解析. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会 (2009 年 10 月, 盛岡)

5) 鈴木 翠, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: クロアワビパラミオシンの大腸菌における発現および組み換えパラミオシンの IgE 反応性. 平成 22 年度日本水産学会春季大会 (2010 年 3 月, 藤沢)

6) 福本 瞳, 小坂祥子, 中田朋子, 高田香織, 二神綾子, 塩見一雄, 川名誠司: 魚の成分であるパルブアルブミンによる接触蕁麻疹と口腔アレルギー症候群の 1 例. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010 年 5 月, 京都)

7) 柴原裕亮, 上坂良彦, 阿部晃久, 山田彰一, 潮 秀樹, 塩見一雄: ELISA 法を用いた頭足類検出試薬の開発. 第 99 回日本食品衛生学会学術講演会 (2010 年 5 月, 東京)

8) K. Yasuda, K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio, K. Shiomi: Unique peptide sequence inducing inflammatory response of macrophage. 35th FEBS Congress 2010 (2010 年 6-7 月, Göteborg, Sweden)

9) 張 虹, 潮 秀樹, 塩見一雄: 無脊椎動物主要アレルギートロポミオシンに対するモノクローナル抗体作製とその性状解析. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (2010 年 9 月, 京都)

10) 郭 芳菲, 久保田紘章, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: チダイに検出された 13 kDa アレルゲンの精製および同定. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (2010 年 9 月, 京都)

11) 額瀨愛子, 三田 大, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: ブラックタイガーの新規アレルギーとして同定された sarcoplasmic calcium-binding protein の一次構造解析および大腸菌における発現. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (2010 年 9 月, 京都)

12) 塩見一雄, 綿谷ゆきな, 嶋倉邦嘉: 陸封型と降海型のサケ類のアレルギー性比較. 第 101 回日本食品衛生学会学術講演会 (2011 年 5 月, 東京)

13) 柴原裕亮, 上坂良彦, 汪 俊, 山田彰一, 塩見一雄: ELISA 法を用いた魚類検出試薬の開発. 第 102 回日本食品衛生学会学術講演会 (2011 年 9 月, 秋田市)

14) 額瀨愛子, 三田 大, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: スロワイカニの sarcoplasmic calcium-binding protein の一次構造解析および組換えタンパク質の IgE 反応性. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 (2011 年 9 月, 長崎市)

15) 森井愛花, 三田 大, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: ブラックタイカニ sarcoplasmic calcium-binding protein の IgE 反応性は立体構造に依存する. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 (2011 年 9 月, 長崎市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

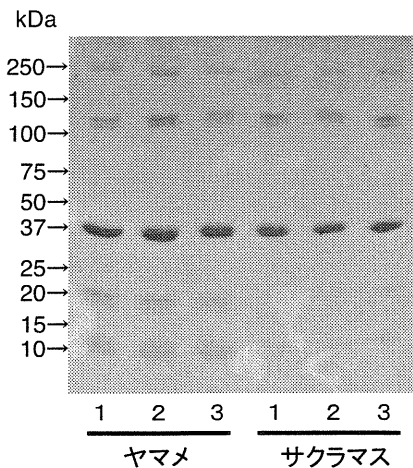


図 1. ヤマメおよびサクラマスの普通肉から調製した加熱抽出液の SDS-PAGE.

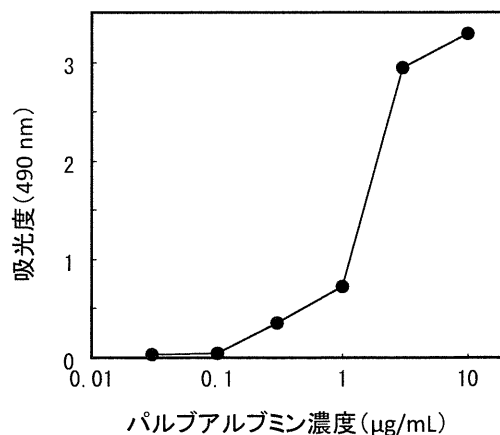


図 2. パルブアルブミン定量のために精製マサバパルブアルブミンを用いて作成した検量線.

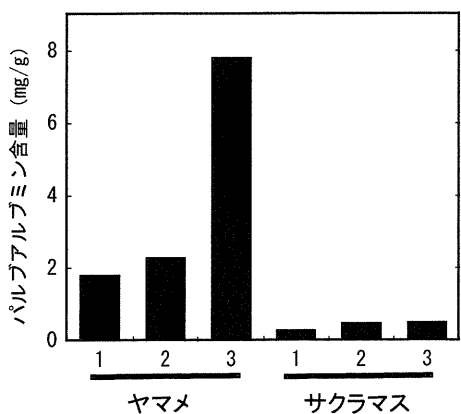


図 3. ヤマメおよびサクラマスのパルブアルブミン含量.

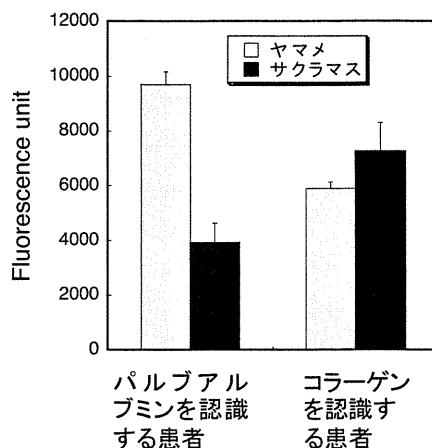


図 4. ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液と患者血清との反応.

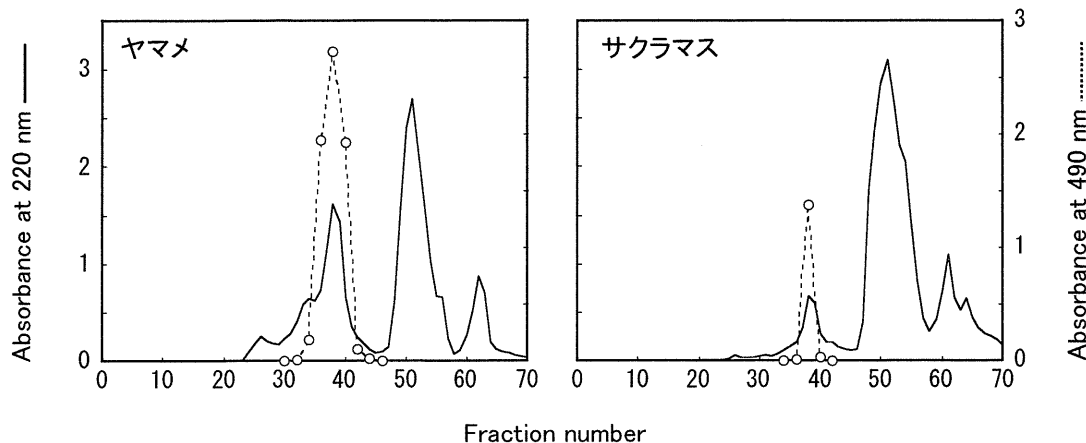


図 5. ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液のゲルろ過.

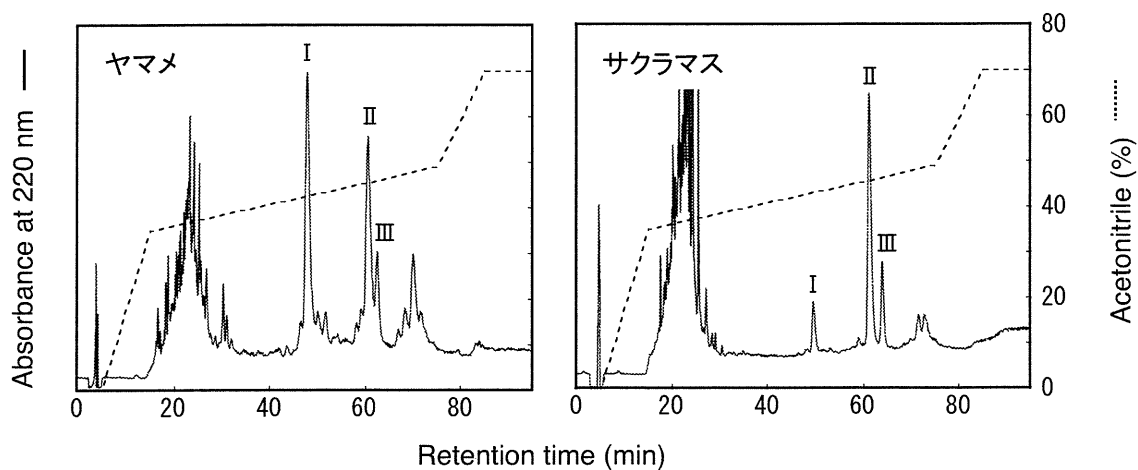


図 6. ヤマメおよびサクラマスに含まれるパルブアルブミンの逆相 HPLC による精製.

表 1. ヤマメおよびサクラマスから精製した 3 成分のパルブアルブミンの分子量

魚種	分子量		
	PA I	PA I	PA I
ヤマメ	11615.6	11145.9	11144.9
サクラマス	11615.4	11143.0	11143.4

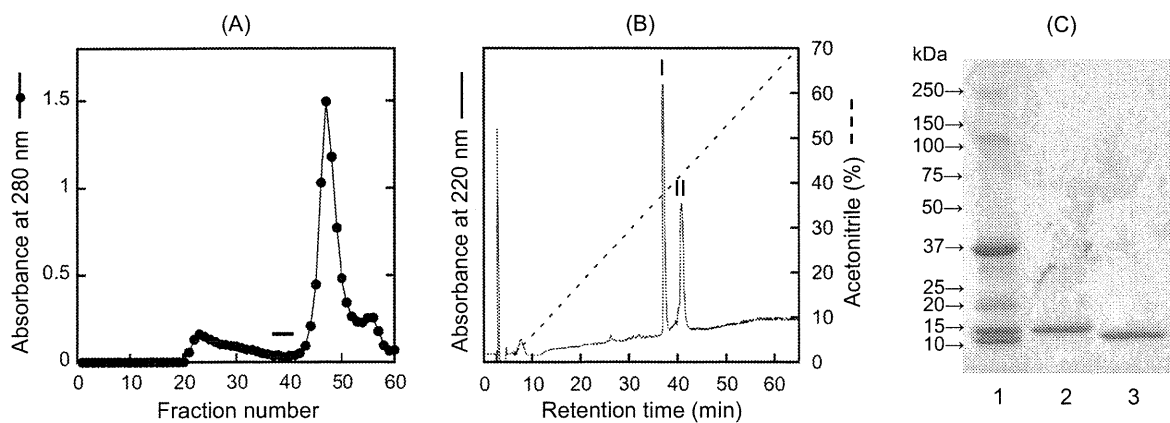


図 7. チダイからの PA I および PA II の精製. (A) ゲルろ過. (B) 逆相 HPLC. (C) SDS-PAGE. 試料: レーン 1, 加熱抽出液; レーン 2, 精製 PA I; レーン 3, 精製 PA II.

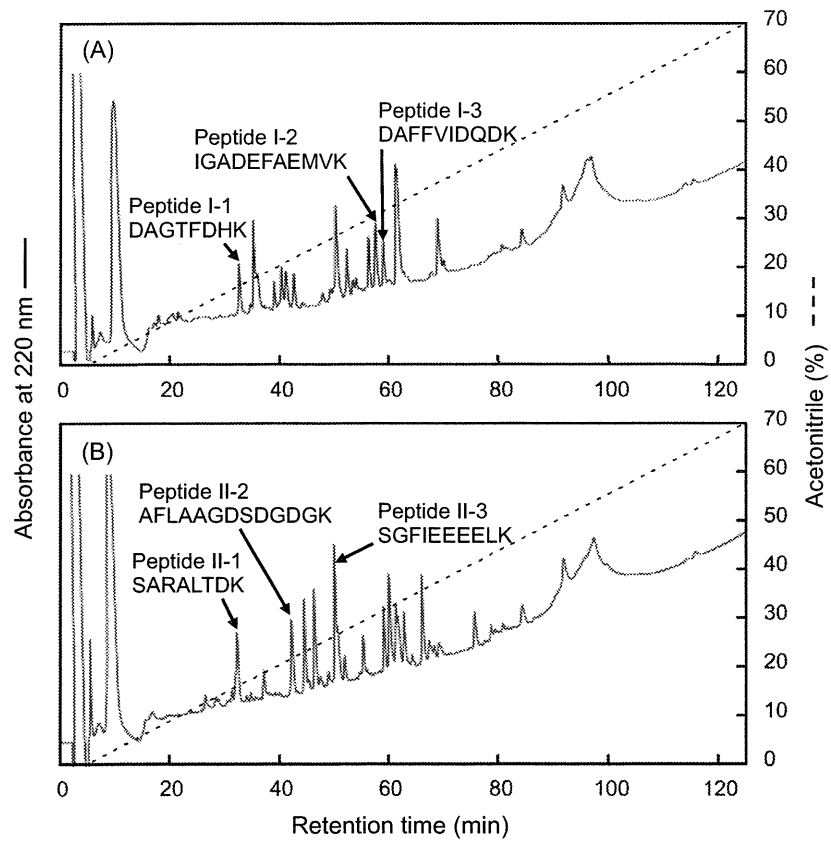


図 8. PA I (A) および II (B) のリシルエンドペプチダーゼ分解により生じたペプチド断片の逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) による単離.

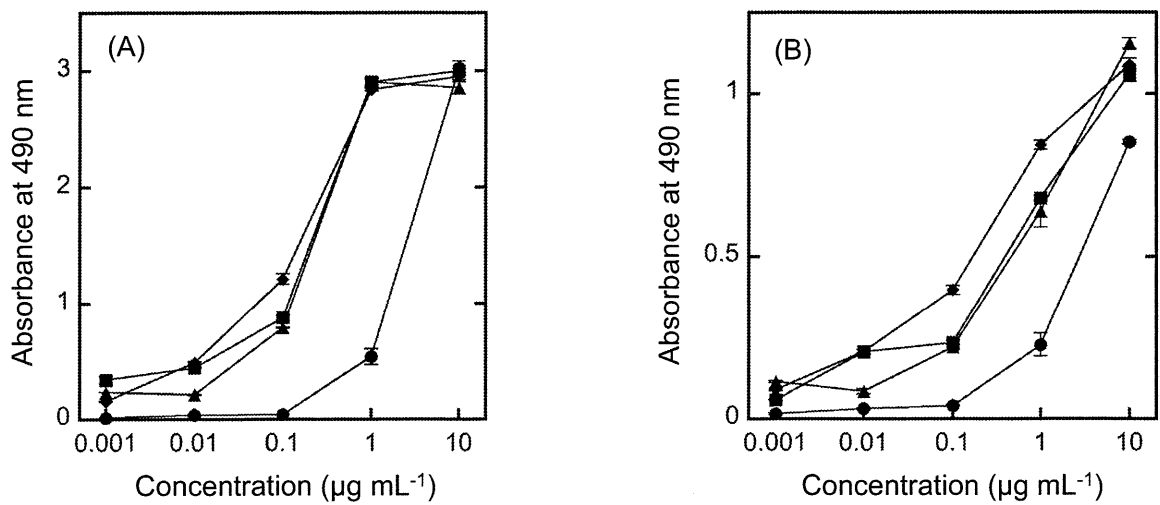


図 9. PA I (●), PA II (■), マアジパルブアルブミン (◆) およびマサバパルブアルブミン (▲) の IgG 反応性 (可視光 ELISA). (A) 抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体との反応性. (B) 抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体との反応性.

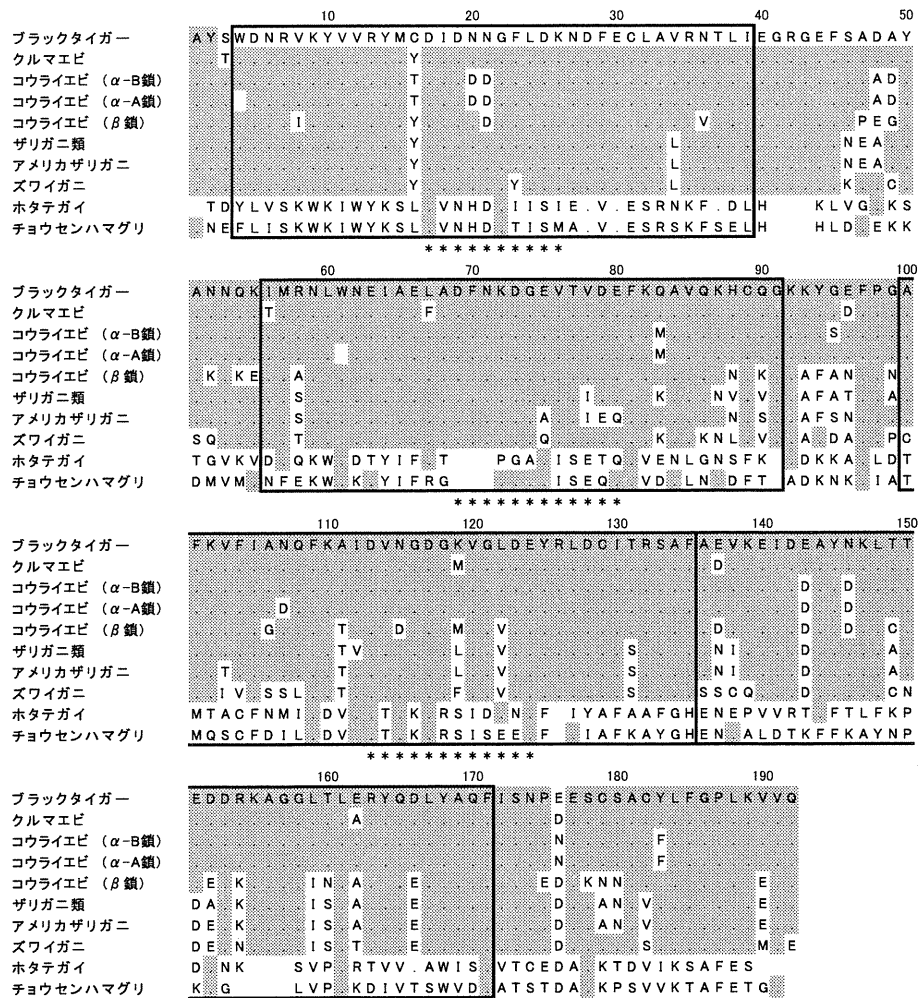


図 12. 甲殻類および軟体動物の SCP のアミノ酸配列.

表 2. 甲殻類および軟体動物の SCP のアミノ酸配列相同率 (%)

	ブラック タイガー	クルマエビ	コウライエビ			ザリガニ類	アメリカ ザリガニ	ズワイ ガニ	ホタテ ガイ	チョウセン ハマグリ
			α-B鎖	α-A鎖	β鎖					
ブラック タイガー	100	96	94	94	80	81	75	15	21	
クルマエビ		100	91	91	80	81	76	17	21	
コウライ エビ			100	98	83	80	80	73	16	20
				100	79	79	72	14	18	
					100	82	73	15	19	
ザリガニ類					100	93	79	16	21	
アメリカ ザリガニ						100	78	11	21	
ズワイガニ							100	12	14	
ホタテガイ								100	53	
チョウセン ハマグリ									100	